

TESIS DOCTORAL

# Desarrollo y estudio del potencial inmunomodulador de tres novedosas estrategias para la aplicación de la terapia celular

REBECA BLÁZQUEZ DURÁN

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular, Biomedicina y Biotecnología

2016



Centro de Cirugía de Mínima Invasión  
Minimally Invasive Surgery Centre

*Jesús Usón*



**TESIS DOCTORAL**

**Desarrollo y estudio del potencial inmunomodulador de tres  
novedosas estrategias para la aplicación de la terapia celular**

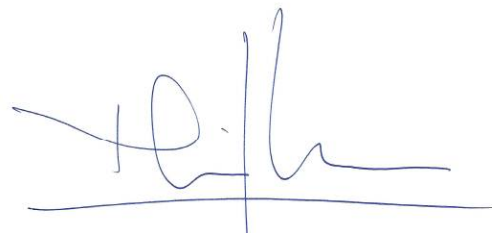
REBECA BLÁZQUEZ DURÁN

Programa de Doctorado en Biología Molecular y Celular,  
Biomedicina y Biotecnología

Conformidad de los directores:



Fdo. Dr. D. Javier García Casado



Fdo. Dr. D. Francisco Miguel Sánchez Margallo





Este trabajo ha sido financiado en parte por la Junta de Extremadura, el Fondo Social Europeo y los Fondos FEDER a través de las ayudas concedidas a Rebeca Blázquez (TE12066) y Javier García (TA13042 e IBI3123), así como por la ayuda a grupos catalogados de la Junta de Extremadura (GR15175), las ayudas de Redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RD12/0042/0025 a Francisco Miguel Sánchez Margallo y Claudia Báez), el Séptimo Programa Marco Europeo (FP7-HEALTH-2009-1.4-3 242038) y por el Centro de Cirugía de Mínima Invasión.



Consejería de Economía e Infraestructuras



UNIÓN EUROPEA

Fondo Europeo de Desarrollo Regio  
Fondo Social Europeo

Una manera de hacer Europa





# Índice • • • •

Lista de abreviaturas .....	13
RESUMEN.....	15
ABSTRACT .....	17
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>19</b>
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	19
Concepto de terapia celular .....	19
Células madre: clasificación .....	20
Células madre mesenquimales: características y mecanismos de acción .....	22
Investigación preclínica y clínica en terapia celular.....	25
JUSTIFICACIÓN DE LA IMPORTANCIA UNITARIA DE LA TESIS .....	28
BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS.....	30
BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR.....	34
BLOQUE III: ESTUDIO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MSESNQUMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>

<b>RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
<b>BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS.....</b>	<b>43</b>
I.A. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto producido por la combinación de MSCs y suturas quirúrgicas sobre la deposición de colágeno.....	43
Optimización de la adhesión de MSCs a suturas quirúrgicas .....	44
Análisis fenotípico de MSCs adheridas a suturas quirúrgicas .....	45
Estudio de la resistencia de las MSCs adheridas a los pases de sutura .....	46
Análisis proteómico <i>in vitro</i> de los tipos de colágeno secretado por las MSCs.....	47
Análisis <i>in vivo</i> de los depósitos de colágeno tras la implantación de las MSCs adheridas a las suturas.....	48
I.B. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto producido por la combinación de MSCs y mallas quirúrgicas sobre la respuesta inflamatoria .....	50
Análisis de la adhesión celular a las mallas quirúrgicas .....	50
Análisis fenotípico de las MSCs cocultivadas con las mallas quirúrgicas .....	51
Estudio de viabilidad celular tras la criopreservación de las mallas quirúrgicas recubiertas con MSCs .....	52
Análisis <i>in vitro</i> del potencial inmunomodulador de las mallas recubiertas con MSCs.....	53
Estudio de los aspectos de seguridad relacionados con la implantación de las mallas recubiertas con MSCs.....	57
Estudio <i>in vivo</i> : evaluación histológica de la implantación de mallas recubiertas con MSCs .....	60
Estudio <i>in vivo</i> : distribución fenotípica de los macrófagos en el sitio de implantación de mallas recubiertas con MSCs .....	61
Estudio <i>in vivo</i> : análisis de expresión de genes relacionados con inflamación en el sitio de implantación de mallas recubiertas con MSCs .....	62



---

BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR.....	64
II.A. Evaluación de la seguridad y biodistribución de MSCs administradas por vía intrapericárdica en modelo porcino.....	64
Evaluación de la viabilidad, actividad metabólica y fenotipo celular en presencia de líquido pericárdico.....	65
Optimización del marcaje de las MSCs para su localización mediante resonancia magnética .....	67
Localización mediante resonancia magnética de las MSCs administradas por vía intrapericárdica.....	69
Examen macroscópico y localización histológica de las MSCs administradas por vía intrapericárdica.....	71
Localización mediante detección del cromosoma Y de las MSCs administradas por vía intrapericárdica .....	73
II.B. Estudio inmunológico de la administración intrapericárdica de CDCs en modelo porcino .....	75
Estudio de las subpoblaciones linfocitarias y sus marcadores de activación en sangre periférica y líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs .....	76
Análisis bioquímico del líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs .....	78
Análisis de citocinas en plasma y líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs .....	79
Evaluación de los parámetros de funcionalidad cardiaca tras la administración intrapericárdica de CDCs.....	80
BLOQUE III: ESTUDIO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO .....	83

III.A. Evaluación del potencial inmunomodulador de exosomas derivados de MSCs sobre células T estimuladas <i>in vitro</i> .....	83
Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre la capacidad de proliferación linfocitaria .....	84
Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre la distribución de subpoblaciones de células T estimuladas <i>in vitro</i> .....	86
Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre el contenido intracelular en IFN- $\gamma$ de células T estimuladas <i>in vitro</i> .....	89
III.B. Comparación de diferentes métodos de aislamiento de exosomas derivados de MSCs para uso clínico.....	90
Concentración de proteína total en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.....	92
Concentración y tamaño de las partículas contenidas en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.....	93
Análisis proteómico de las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.....	95
<b>DISCUSIÓN</b> .....	97
<b>BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS.....</b>	<b>97</b>
I.A. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto producido por la combinación de MSCs y suturas quirúrgicas sobre la deposición de colágeno.....	97
I.B. Evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> del efecto producido por la combinación de MSCs y mallas quirúrgicas sobre la respuesta inflamatoria .....	100
<b>BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR .....</b>	<b>106</b>

BLOQUE III: ESTUDIO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO .....	114
<b>CONCLUSIONES</b> .....	123
<b>CONCLUSIONS</b> .....	125
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	127
<b>ANEXO I. Publicaciones recogidas en esta tesis</b> .....	149
Mesenchymal stem cell-coated sutures enhance collagen depositions in sutured tissues .....	155
Surgical meshes coated with mesenchymal stem cells provide an anti- inflammatory environment by a M2 macrophage polarization .....	165
Intrapericardial administration of mesenchymal stem cells in a large animal model: a bio-distribution analysis .....	167
Intrapericardial delivery of cardiosphere-derived cells: an immunological study in a clinically relevant large animal model .....	187
Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on <i>in vitro</i> stimulated T cells .....	205
Comparative study of isolated human mesenchymal stem cells derived exosomes for clinical use.....	215
<b>ANEXO II. Otras contribuciones científicas</b> .....	225
PUBLICACIONES .....	227
Artículos indexados en JCR.....	227
Artículos no indexados en JCR .....	228
Abstracts indexados en JCR .....	228
Libros.....	230

COMUNICACIONES A CONGRESOS .....	230
Nacionales.....	230
Internacionales .....	233
PATENTES .....	238



# Lista de abreviaturas • • • •

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>AEMPS</b>	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
<b>Arg-1</b>	Arginasa 1
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ASCs</b>	Células madre adultas ( <i>Adult Stem Cells</i> )
<b>CAT</b>	Comité de Terapias Avanzadas ( <i>Committee for Advanced Therapies</i> )
<b>CCK-8</b>	<i>Cell Counting Kit 8</i>
<b>CCMIJU</b>	Centro de Cirugía de Mínima Invasión “Jesús Usón”
<b>CDCs</b>	Células derivadas de cardiosferas ( <i>Cardiosphere-derived cells</i> )
<b>EMA</b>	Agencia Europea del Medicamento ( <i>European Medicines Agency</i> )
<b>ESCs</b>	Células madre embrionarias ( <i>Embryonic Stem Cells</i> )
<b>Exo-DCs</b>	Exosomas derivados de células dendríticas ( <i>Dendritic Cells-derived exosomes</i> )
<b>exo-MSCs</b>	Exosomas derivados de MSCs
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>FDA</b>	Agencia de Alimentos y Medicamentos ( <i>Food and Drug Administration</i> )
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento fibroblástico ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
<b>FSC</b>	Dispersión frontal ( <i>Forward scatter</i> )
<b>GGT</b>	Gamma-glutamil transferasa
<b>GMP</b>	Buenas prácticas de manufactura ( <i>Good Manufacturing Practice</i> )
<b>GSCs</b>	Células madre germinales ( <i>Germinal Stem Cells</i> )
<b>hASCs</b>	Células madre adiposas humanas ( <i>human Adipose Stem Cells</i> )
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>Hepatocyte Growth Factor</i> )
<b>HLA</b>	Antígeno leucocitario humano ( <i>Human Leukocyte Antigen</i> )
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución ( <i>High-performance liquid chromatography</i> )
<b>IFN-<math>\alpha</math></b>	Interferón alfa
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>IL</b>	Interleucina
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintasa inducible ( <i>inducible Nitric Oxide Synthase</i> )
<b>iPSCs</b>	Células madre pluripotentes inducidas ( <i>induced Pluripotent Stem Cells</i> )
<b>ISCT</b>	Sociedad Internacional de Terapia Celular ( <i>International Society for Cellular Therapy</i> )

<b>LP</b>	Líquido pericárdico
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido ( <i>Lipopolysaccharide</i> )
<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos 1 ( <i>Monocyte Chemoattractant Protein 1</i> )
<b>MFI</b>	Intensidad de fluorescencia media ( <i>Mean Fluorescence Intensity</i> )
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> )
<b>miARN</b>	Micro ARN
<b>MIP-1<math>\alpha</math></b>	Proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa ( <i>Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha</i> )
<b>MRFI</b>	Intensidad de fluorescencia relativa media ( <i>Mean Relative Fluorescence Intensity</i> )
<b>MSCs</b>	Células madre mesenquimales ( <i>Mesenchymal Stem Cells</i> )
<b>MWCO</b>	Límite de peso molecular ( <i>Molecular Weight Cut Off</i> )
<b>NIH</b>	<i>National Institutes of Health</i>
<b>NKs</b>	Células asesinas naturales ( <i>Natural Killer cells</i> )
<b>NKT</b>	Células T asesinas naturales ( <i>Natural Killer T cells</i> )
<b>PBLs</b>	Linfocitos de sangre periférica ( <i>Peripheral Blood Lymphocytes</i> )
<b>pBM-MSCs</b>	MSCs porcinas derivadas de médula ósea ( <i>porcine Bone Marrow-derived Stem Cells</i> )
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas ( <i>Platelet-Derived Growth Factor</i> )
<b>PFLs</b>	Linfocitos de líquido pericárdico ( <i>Pericardial Fluid Lymphocytes</i> )
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PLGA</b>	Ácido poli-láctico-co-glicólico ( <i>poly-lactic-co-glycolic acid</i> )
<b>PLL</b>	Poli-L-lisina
<b>PMA</b>	Forbol-miristato-acetato ( <i>Phorbol Myristate Acetate</i> )
<b>qRT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa ( <i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>RM</b>	Resonancia Magnética
<b>SD</b>	Desviación estándar ( <i>Standard Deviation</i> )
<b>SLA</b>	Antígeno leucocitario porcino ( <i>Swine Leukocyte Antigen</i> )
<b>SPIO</b>	Óxido de hierro superparamagnético ( <i>superparamagnetic iron oxide</i> )
<b>SSC</b>	Dispersión lateral ( <i>Side scatter</i> )
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta ( <i>Transforming Growth Factor beta</i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa ( <i>Tumor Necrosis Factor alpha</i> )
<b>VEGFA</b>	Factor de crecimiento endotelial vascular A ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i> )

## Resumen • • • •

La terapia celular ha emergido en los últimos años como una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, la vía y tipo de administración de estas terapias son factores enormemente condicionantes para la correcta implantación del producto terapéutico y, por tanto, para su eficacia. En este sentido, es necesario el desarrollo de métodos y vías de administración alternativos que aseguren viabilidad y la correcta implantación de las células madre para conseguir la optimización de estas terapias.

Esta tesis doctoral plantea estrategias alternativas para favorecer la implantación y aumentar el efecto terapéutico de las células madre adultas. Cada una de estas estrategias constituye un bloque con entidad propia que se desarrolla a lo largo de los diferentes apartados de este trabajo. La primera estrategia se centra en el uso combinado de las células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells, MSCs*) con materiales quirúrgicos para favorecer la implantación y la actividad biológica de las células. La segunda estrategia aborda una nueva vía de administración en el contexto de la terapia celular para el tratamiento de lesiones de origen cardiovascular. En concreto, las células madre adultas son administradas por vía intrapericárdica, evaluando su biodistribución y actividad inmunomoduladora en un modelo de animal grande. Por último, para la tercera estrategia se evalúa la actividad inmunomoduladora de exosomas derivados de MSCs, y se realiza una comparativa de diferentes metodologías de aislamiento de dichas vesículas para su extrapolación y aplicación en el entorno clínico.





# A b s t r a c t • • • •

In the recent years, stem cell therapy has emerged as a novel therapeutic tool for the treatment of a wide range of diseases. The administration route has a significant impact on the success of these therapies as it determines the correct implantation of the therapeutic product as well as its effectiveness. In this sense, the evaluation of new approaches, alternative implantation routes and techniques is urgently needed.

This PhD work analyses different strategies to improve the implantation and the therapeutic effect of adult stem cells. The results of these strategies are discussed along the different sections of this thesis. The first strategy was focused in the combination of mesenchymal stem cells (MSCs) and surgical materials to enhance the implantation and biological activity of MSCs. The second strategy addressed an innovative administration route in the context of cardiovascular cell therapy. Concretely, adult stem cells were intrapericardially administered, evaluating their bio-distribution and immunomodulatory activity in a large animal model. Finally, the immunomodulatory activity of MSCs-derived exosomes was evaluated and different isolation methods were assessed for their extrapolation in the clinical context.



## INTRODUCCIÓN GENERAL

---

### CONCEPTO DE TERAPIA CELULAR

El campo de las células madre ha revolucionado muchos de los paradigmas de la biología y se ha convertido en una de las alternativas más prometedoras para la medicina del futuro [1].

La terapia celular surge como una terapia avanzada cuyo objetivo es reemplazar, reparar y/o mejorar la función de tejidos u órganos dañados mediante la administración de células que han sido seleccionadas y expandidas fuera del organismo. La terapia celular representa una alternativa válida, y a menudo superior, a los tratamientos convencionales, ya que se dirige a la causa de la patología, es potencialmente curativa, establece conexiones con las células o el tejido de alrededor y da lugar a tejido funcional. Además, las células pueden reaccionar ante determinados estímulos y restaurar la homeostasis metabólica de manera más adecuada de lo que lo hacen los agentes químicos [2].

De acuerdo con la Agencia de Alimentos y Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA), la terapia celular somática se define como la administración a humanos de células vivas de líneas no germinales autólogas, alogénicas o xenogénicas, las cuales han sido manipuladas o procesadas *ex vivo*, sin incluir los productos de sangre transfundida. La manipulación de los productos para terapia celular incluye la propagación *ex vivo*, expansión, selección o tratamiento farmacológico de las células, u otras alteraciones de sus características biológicas. Estos productos tienen como objeto el tratamiento, diagnóstico y/o prevención de determinadas patologías [3].

Hoy en día, la terapia celular está en constante expansión en cuanto a los tipos celulares administrados. Las estrategias de los tratamientos basados en terapia celular incluyen el aislamiento y la transferencia de poblaciones de células madre específi-

cas, de células efectoras o de células maduras que han sido inducidas o reprogramadas para readquirir pluripotencialidad [4].

A continuación, se describe el concepto de célula madre y se presentan sus diferentes clasificaciones.

### **CÉLULAS MADRE: CLASIFICACIÓN**

El concepto de célula madre implica dos características fundamentales: la capacidad de autorreplicación mediante divisiones simétricas y la capacidad de diferenciación para dar lugar a uno o más tipos celulares, a través de divisiones asimétricas (Figura 1). De este modo, la clasificación de las células madre en base a su capacidad de diferenciación recoge las siguientes categorías [5,6]:

- Totipotentes u omnipotentes. Son las células más desdiferenciadas, y poseen por tanto capacidad para diferenciarse a cualquier tipo celular, incluyendo el trofoblasto, que dará lugar a la placenta, los tejidos extraembrionarios y el cordón umbilical. El ovocito fertilizado y las células de las primeras divisiones embrionarias son totipotentes, ya que pueden diferenciarse tanto hacia tejidos embrionarios como extraembrionarios, formándose así, a partir de ellas, el embrión y la placenta.
- Pluripotentes. Poseen capacidad para dar origen a células de las tres capas embrionarias —endodermo, mesodermo y ectodermo—.
- Multipotentes u órgano específicas, con capacidad para dar lugar a las células de una de las capas embrionarias, pudiendo originar los tipos celulares de un tejido u órgano determinado.
- Oligopotentes. Son capaces de diferenciarse hacia dos o más linajes dentro de un tejido específico.
- Unipotentes. Las líneas celulares unipotentes están bastante comprometidas, ya que se diferencian a un único tipo celular.



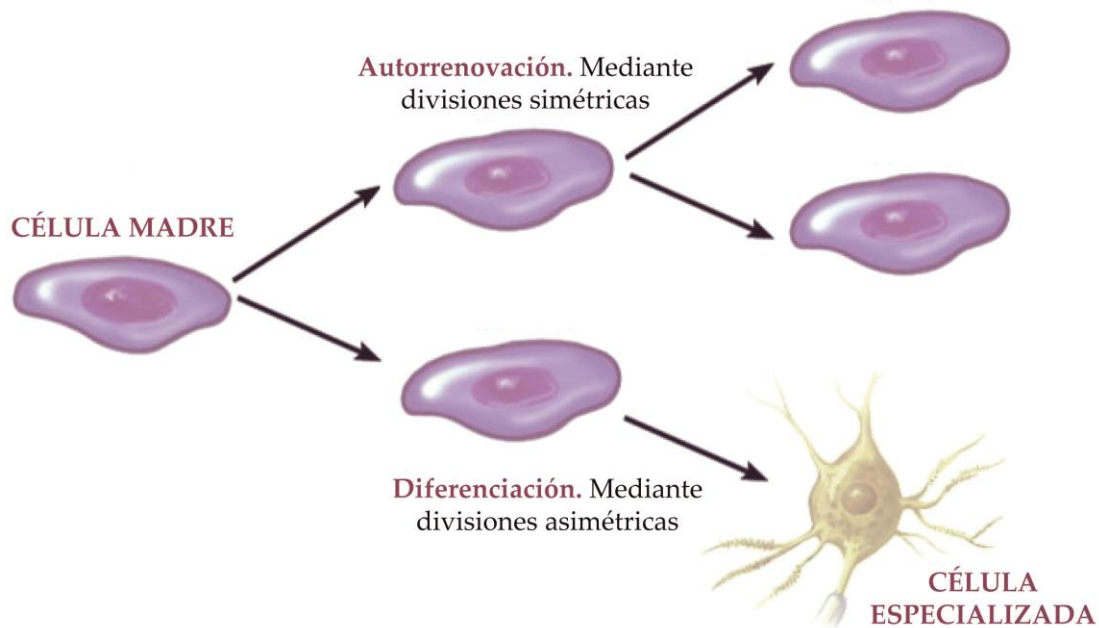


Figura 1. Propiedades fundamentales de las células madre: autorreplicación y diferenciación. (Adaptado de [7]).

Además, las células madre pueden clasificarse también en función de su origen en [1,6]:

- Células madre embrionarias (*Embryonic Stem Cells*, ESCs). Son pluripotentes y proceden de la masa celular interna del blastocisto. Expresan marcadores específicos como Nanog y Oct4, factores de transcripción que mantienen a la célula en un estado desdiferenciado.
- Células madre germinales embrionarias (*Germinal Stem Cells*, GSCs), también pluripotentes y obtenidas de la cresta gonadal del feto.
- Células madre adultas (*Adult Stem Cells*, ASCs). Se originan a partir de tejidos adultos maduros y se consideran multipotentes, aunque hay estudios que defienden su capacidad para diferenciarse a tipos celulares de capas embrionarias diferentes. En este grupo se incluyen las células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), objeto de estudio en esta tesis, que serán descritas en el siguiente apartado.
- Células madre residentes. Son células generadas durante la ontogénesis y que permanecen en estado de quiescencia hasta que un determinado estímulo local

activa su proliferación, diferenciación o migración. Las células madre residentes se encuentran en los llamados “nichos de células madre”, los cuales poseen un microambiente que desempeña un papel primordial en la homeostasis celular y la reparación tisular. A este grupo pertenecerían las células derivadas de cardiosferas (*Cardiosphere-Derived Cells*, CDCs), que son objeto de estudio en esta tesis y que se tratarán con más detenimiento en el bloque II de esta introducción.

- Células madre pluripotentes inducidas (*induced Pluripotent Stem Cells*, iPSCs o iPS), descritas por primera vez en 2006 por Takahasi y Yamanaka [8]. En su trabajo, se exponía cómo la inducción de la expresión de Oct4, Sox2, cMyc y Klf4 en fibroblastos murinos era capaz de conferir pluripotencialidad a estas células maduras. En el año siguiente, se generaban las primeras líneas de iPSCs humanas [9,10]. Desde entonces, se han desarrollado diferentes metodologías para generar iPSCs que han permitido solventar las principales desventajas de las iniciales, como la baja eficiencia de reprogramación o la elevada incidencia de mutagénesis [11]. Actualmente, la terapia con iPSCs es un campo prometedor dentro de la medicina regenerativa, y se están llevando a cabo numerosos estudios en los que se utilizan estas células para el tratamiento de diferentes patologías.

## **CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES: CARACTERÍSTICAS Y MECANISMOS DE ACCIÓN**

Las células madre mesenquimales o MSCs son, quizás, las células madre multipotentes más ampliamente reconocidas. Pueden obtenerse a partir de una diversa variedad de tejidos adultos, como médula ósea, tejido adiposo, hueso, sangre de cordón umbilical o sangre periférica, entre otros [6]. Estas células fueron descritas por primera vez por Pittenger *et al.* como una población con capacidad proliferativa en cultivo con morfología fibroblástica que expresaba una serie de marcadores de superficie y era capaz de diferenciarse a linajes mesenquimales en condiciones de cultivo *in vitro* [12].

Actualmente, la Sociedad Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*, ISCT), establece los siguientes criterios mínimos para la identificación de MSCs [13]:

- crecimiento en adherencia a plástico y morfología fibroblástica en condiciones de cultivo estándar;
- expresión de los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105 en al menos el 95% de la población celular;
- ausencia de marcadores endoteliales y hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14, CD11b CD19 y HLA-II;
- capacidad de diferenciación *in vitro* hacia linajes adipogénico, osteogénico y condrogénico.

Otros marcadores de superficie característicos de las MSCs son CD13, CD29, CD44, CD54, CD106, CD117, CD140b, CD166 o Stro1, y otros cuya ausencia también se ha descrito en esta población celular son CD31, CD34 o CD61 [14]. Además de su capacidad de diferenciación, la actividad antiinflamatoria y reparadora de estas células se ha demostrado en diferentes modelos animales.

En cuanto a los mecanismos de acción de las MSCs, las teorías iniciales postulaban que el efecto beneficioso de la terapia con células madre residía en la regeneración tisular a través de la diferenciación de las células implantadas [15]. Hoy en día sabemos que esta diferenciación no ocurre con una frecuencia lo suficientemente alta como para ser significativa en cuanto a las mejoras funcionales observadas tras la administración de células madre, y las evidencias actuales indican que el mecanismo regenerativo de estas terapias reside principalmente en la producción de diversos factores paracrinos por parte de las células administradas. Los mediadores solubles secretados por las MSCs, que incluyen diferentes citocinas y factores de crecimiento, contribuyen a la citoprotección, angiogénesis, reparación tisular, normalización de la matriz extracelular y modulación de la inflamación. Además de

este mecanismo de reparación exógeno, a menudo de corta duración, existe un potente y duradero mecanismo de reparación endógena a través de la activación de los nichos de células madre del propio huésped gracias al microambiente generado por las MSCs [16].

En los últimos años, se han llevado a cabo numerosos estudios relacionados con la capacidad inmunomoduladora de las MSCs. Estas células parecen ser capaces de actuar en diferentes puntos de la respuesta inmune: suprimen la proliferación de células T y B, la secreción de citocinas y la citotoxicidad; regulan el balance entre Th1/Th2 y la función de las células T reguladoras; inhiben la maduración, activación y presentación de antígeno en las células dendríticas, e inhiben la activación de NKs mediada por IL-2 [17]. Además, existen evidencias de que las MSCs ejercen otros efectos inmunomoduladores que varían en función del microambiente inflamatorio local de cada enfermedad.

Entre los principales mediadores del efecto inmunomodulador de las MSCs, además del contacto célula-célula, se encuentran factores solubles como el factor de crecimiento transformante beta (*Transforming Growth Factor beta*, TGF- $\beta$ ), la prostaglandina E2 (PGE2), el factor de crecimiento de hepatocitos (*Hepatocyte Growth Factor*, HGF), la IL-10, el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), el factor de necrosis tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) o la IL-1 $\beta$ , entre otros. Aunque se ha descrito más de una docena de factores solubles implicados en la inmunomodulación de MSCs, el papel de cada uno y la relación entre ellos no están claramente establecidos, más aún si se tiene en cuenta que existen variaciones en función del origen de las MSCs, las células diana y el microambiente particular en cada una de las situaciones. En general, el papel de las MSCs en relación con la respuesta inmune está relacionado con la inducción y expansión de células reguladoras que compiten activamente para lograr el establecimiento de un microambiente tolerogénico y de moderación de la respuesta inmune [18]. Además, estas células se consideran débilmente inmunogénicas, mostrando una baja expresión de HLA clase I y ausencia de HLA clase II y moléculas coestimuladoras como CD40, CD80 y CD86 [19].

## INVESTIGACIÓN PRECLÍNICA Y CLÍNICA EN TERAPIA CELULAR

Antes de aplicar cualquier terapia en la práctica clínica, es necesario estudiar a fondo el balance entre sus riesgos potenciales y los beneficios que puede aportar. En terapia celular, es fundamental llegar a comprender el espectro completo de acción de las células madre y acumular evidencias preclínicas acerca de su seguridad y eficacia terapéutica. El papel de la investigación preclínica utilizando modelos animales para llegar a tener toda esta información es esencial, aunque es cierto que algunos aspectos de la biología celular son específicos para diferentes especies, pudiendo existir diferencias entre los modelos utilizados y el efecto final en humanos. Por ello, es de vital importancia la realización de estudios en diferentes organismos como fuentes celulares y como receptores para estudios alogénicos y xenogénicos que permitan establecer una prueba de principio y evaluar la seguridad de estas terapias [20].

El éxito de las terapias basadas en células madre requiere un trabajo exhaustivo a la hora de elegir y desarrollar los modelos animales de enfermedad, seleccionando los animales que posean los órganos y tejidos más similares en tamaño y fisiología con el humano.

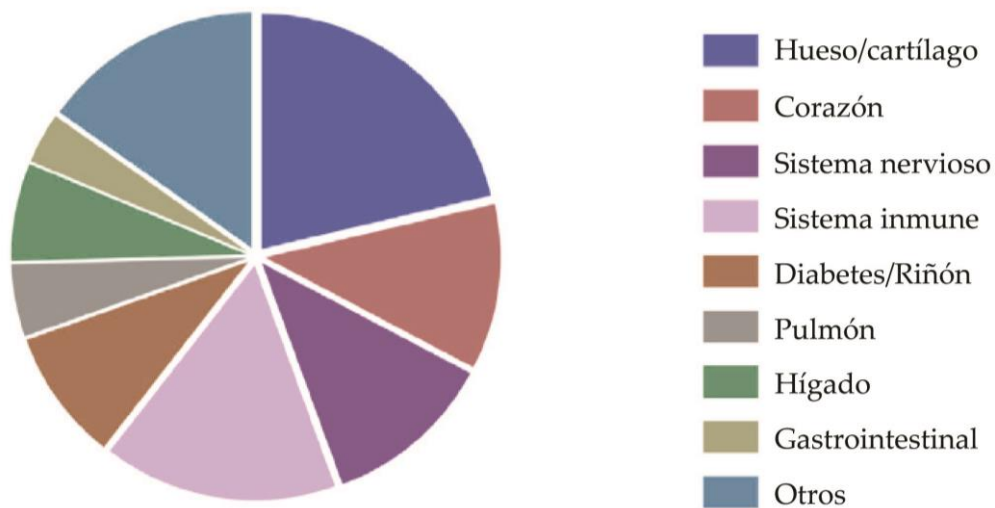
Los modelos murinos han sido los modelos de elección en muchos de los estudios relacionados con la biología de las células madre debido a su relativo bajo precio, facilidad de manipulación —también manipulación genética— y rápido desarrollo. Sin embargo, su capacidad para predecir la eficacia y seguridad de las terapias es limitada [21].

Los modelos de animal grande ofrecen ventajas significativas a la hora de reproducir determinadas condiciones de enfermedad humana y de evaluar las terapias basadas en células madre. La mayor esperanza de vida de estas especies posibilita la realización de estudios largos en el tiempo, y la mayoría de parámetros fisiológicos —entre ellos, las propiedades del sistema inmune, que juega un papel determinante en la reacción del receptor a la administración de células— son mucho más simi-

lares al humano que en los roedores. Los modelos de animal grande presentan también una ventaja significativa relacionada con la reproducibilidad del número y tipos de células madre que pueden ser extraídas y expandidas a partir de los mismos. Además, su papel a la hora de estudiar la seguridad es determinante, ya que las dosis, vías de administración y resultados del tratamiento tienen gran valor en cuanto a la predictibilidad en humanos. Sin embargo, estos modelos también presentan algunas limitaciones, como la relativa ausencia de líneas celulares estables y bien caracterizadas y la escasa disponibilidad de anticuerpos específicos, *arrays* de expresión y otros reactivos [22].

Por otro lado, la investigación clínica en terapias basadas en el uso de células engloba un amplio espectro de condiciones, patologías y tipos celulares, aunque la mayor parte de los ensayos clínicos usan MSCs como herramienta terapéutica. Según establecía una estimación publicada en julio de 2015, que incluía 374 ensayos clínicos en los que se usaban MSCs (Figura 2), más del 60% de los mismos se dirigía al tratamiento de enfermedades osteoarticulares, cardíacas, neurológicas/neurodegenerativas y las relacionadas con inmunidad/autoinmunidad [23]. En el momento de redacción de este trabajo, la búsqueda en la base de datos de ensayos clínicos del NIH (*National Institutes of Health*), arroja 502 resultados para este mismo tipo celular. En 2011, sin embargo, el número de ensayos clínicos que utilizaban MSCs como herramienta terapéutica era de 123 [24], lo que demuestra el fuerte auge que estas terapias están experimentando en los últimos años.

No obstante, en algunos de estos ensayos, que cubren un amplio rango de indicaciones, las hipótesis clínicas son bastante especulativas y los mecanismos terapéuticos no están completamente definidos. Esto, junto a la falta de evidencias preclínicas, lleva a que esta aplicación prematura, más empírica que racional, falle a la hora de arrojar resultados convincentes acerca de la eficacia de las terapias, haciendo que disminuya la credibilidad en este campo aún en desarrollo [25].



**Figura 2. Clasificación de los ensayos clínicos con MSCs en función del tipo de patología.** (Adaptado de [23]).

A pesar de esto, y en general, los ensayos clínicos llevados a cabo hasta ahora han demostrado de manera consistente la seguridad de estas terapias, y los beneficios terapéuticos obtenidos en los pacientes están en constante aumento [24,26], evidenciando la utilidad de estas terapias cuando los diseños clínicos son los adecuados.

## JUSTIFICACIÓN DE LA IMPORTANCIA UNITARIA DE LA TESIS

---

El Centro de Cirugía de Mínima Invasión “Jesús Usón” (CCMIJU) es un centro multidisciplinar dedicado a la investigación y formación en técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas. El área de Terapia Celular cuenta con diferentes líneas de investigación relacionadas con el desarrollo de diferentes terapias basadas en el empleo de células madre adultas y sus productos —exosomas— para el tratamiento de diferentes patologías. El carácter multidisciplinar del CCMIJU permite que la investigación básica desarrollada en el laboratorio pueda verse fácilmente aplicada en modelos *in vivo*, combinando estas terapias con las aproximaciones quirúrgicas mínimamente invasivas empleadas en el centro, y realizando la fase de evaluación preclínica en modelos animales de diferentes patologías, en los que el CCMIJU tiene una dilatada experiencia.

En este sentido, esta tesis se enmarca dentro de un contexto multidisciplinar de desarrollo de terapias avanzadas basadas en el uso de células madre, abordando tres planteamientos representativos de las diferentes líneas de investigación que se encuentran en desarrollo en la Unidad de Terapia Celular del CCMIJU: la combinación de células madre adultas con diferentes materiales quirúrgicos, la terapia celular en el área cardiovascular —dirigida al tratamiento de infarto de miocardio— y el uso de exosomas derivados de células madre adultas como terapia inmunomoduladora. Cada una de las diferentes aproximaciones que se plantean en este trabajo posee un elemento innovador que marca una diferencia con las terapias “tradicionales” más ampliamente estudiadas en el campo de la medicina regenerativa. Esta apuesta por la originalidad y la innovación responde a una demanda creciente que surge como consecuencia de la modesta tasa de éxito obtenida al trasladar a la clínica las estrategias convencionales en terapia celular, a pesar de los prometedores resultados *in vitro*.



Aunque el potencial terapéutico de diferentes líneas de células madre adultas ha sido ampliamente demostrado y existen numerosas evidencias científicas que prueban sus múltiples efectos biológicos, la complejidad de estas terapias al ser administradas en un organismo vivo requiere nuevas aproximaciones y soluciones que solventen los inconvenientes que limitan el potencial terapéutico de estas terapias tal y como se han concebido hasta el momento.

## BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

---

La combinación de células madre con diferentes materiales quirúrgicos es un importante campo de estudio. Sin duda, las células madre constituyen una herramienta terapéutica útil que puede ser utilizada de maneras diversas para potenciar el efecto del material quirúrgico o para solventar problemas relacionados con la implantación de los mismos.

Entre los materiales quirúrgicos más habitualmente utilizados en la práctica clínica se encuentran las suturas quirúrgicas, cuyo fin es conseguir el cierre de defectos sin cicatrices o deformidades. A lo largo de los últimos años se han desarrollado nuevas suturas con mejores propiedades físicas y actividad biológica. En este sentido, está ampliamente instaurada la utilización de suturas modificadas, recubiertas con agentes antimicrobianos, como una herramienta útil para la reducción de infecciones con una seguridad y tolerancia demostradas [27,28]. Más recientemente, el uso de suturas recubiertas se ha utilizado para mejorar la integridad de los tejidos y la respuesta inmune. En particular, se ha conseguido mejorar la cicatrización intestinal gracias a suturas recubiertas con factor de crecimiento insulínico humano recombinante [29]. Estas suturas modificadas se han aplicado también para mejorar la cicatrización de tendón a hueso, en este caso, utilizando un recubrimiento con factor de crecimiento recombinante humano derivado de plaquetas BB [30]. Además, también se ha demostrado la mejora de la integridad tisular al emplear suturas recubiertas con inhibidor de metaloproteinasas de matriz en las anastomosis intestinales [31,32]. Por último, también cabe resaltar que se ha conseguido potenciar la respuesta inmune Th1 en pacientes con carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello en estadios avanzados mediante el empleo de suturas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 [33,34].

Las MSCs se han utilizado recientemente en combinación con suturas para mejorar la resistencia de las anastomosis de colon [35]. De forma similar, se han desarrollado biosuturas con MSCs derivadas de médula ósea para reducir las adherencias intraabdominales [36].

En términos de aplicación clínica, las suturas podrían considerarse un soporte físico que impediría la dispersión de las células tras su implantación. Una de las suturas sintéticas absorbibles más utilizadas es la compuesta por ácido poli-láctico-co-glicólico (*poly-lactic-co-glycolic acid*, PLGA), un componente para los *scaffolds* temporales usados en ingeniería de tejidos para proporcionar un soporte físico a las células implantadas. Para crear las interacciones deseadas con otras moléculas, o para favorecer las interacciones entre células y *scaffold*, suele ser necesaria la modificación química del PLGA [37]. Así, el tratamiento del PLGA con NaOH, por ejemplo, proporciona una superficie más hidrofílica, incrementa el área superficial, altera la porosidad y aumenta el grado de rugosidad de la superficie [38].

La combinación de suturas y MSCs podría presentar numerosas ventajas relacionadas con la mejora de la deposición de colágeno. El uso de un solo factor biológico presenta algunas limitaciones que pueden superarse si se opta por las MSCs, las cuales secretan de forma directa una amplia variedad de citocinas y factores de crecimiento, e indirectamente también inducen la liberación de estas sustancias por parte de las células residentes [39]. Además, el tratamiento químico de las suturas y su recubrimiento con MSCs es un procedimiento sencillo, pudiendo ser realizado por todo el personal sanitario. Dado que las células se encontrarían recubriendo la sutura, el proceso queda simplificado al realizarse de manera conjunta y en un solo paso la sutura y la administración de células madre.

Desde un punto de vista logístico, esta estrategia terapéutica sería fácilmente aplicable, permitiendo su utilización rutinaria sin necesidad de una infraestructura compleja. Además, dado el uso actual de la terapia alogénica con MSCs y la proliferación de bancos de líneas de células madre [40,41], esta sería una opción factible

en un futuro próximo. Este tipo de tratamiento podría suponer una alternativa terapéutica útil, pudiendo proporcionar un efecto beneficioso en la fase de remodelación tisular —especialmente en pacientes con dificultades en la cicatrización—, mejorando así este proceso tras la cirugía.

Otro producto ampliamente empleado en la práctica clínica son las mallas quirúrgicas. Estas están diseñadas para su implantación permanente en el organismo con el fin de estabilizar y reforzar diferentes defectos de los tejidos blandos, especialmente hernias. El refuerzo ejercido por estas mallas no se debe al material en sí mismo, sino que está causado por la producción de tejido alrededor de sus fibras [42].

Actualmente, cada año se implantan alrededor de un millón de mallas quirúrgicas en todo el mundo. Desafortunadamente, estos procedimientos presentan una elevada tasa de complicaciones como la recurrencia y el desarrollo de una reacción inflamatoria que termina con fibrosis y formación de adherencias, causando dolor e incomodidad al paciente. Tras la implantación quirúrgica del material, se desarrollan varios procesos como la formación de un coágulo y la adherencia plaquetaria, seguida por la migración de fibroblastos, células polimorfonucleares y macrófagos. Estos últimos se fusionan para dar lugar a las células gigantes multinucleadas, y permanecen en el material implantado durante un periodo de tiempo indeterminado. El fracaso en la resolución de la respuesta inflamatoria da lugar a una reacción a cuerpo extraño, formación de tejido de granulación y encapsulación del implante, impidiendo la integración funcional de este en el tejido circundante. A menudo, estas complicaciones hacen necesaria la retirada del material [43].

En los últimos años han aparecido nuevos diseños de mallas de muy bajo peso —ultraligeras— y construidas con nuevos materiales para reducir las complicaciones atribuidas a su implantación —reacción inflamatoria adversa, dolor crónico o erosión de la malla, entre otras— [44]. En este sentido, los nuevos diseños de las mallas quirúrgicas se han centrado en mejorar la biocompatibilidad de los materia-

les [45] y en la búsqueda de mecanismos que permitan la transmigración y localización de células huésped beneficiosas [46]. Así, se ha probado en la clínica el recubrimiento de mallas de polipropileno con plasma autólogo [47] o titanio [48] para reducir la reacción a cuerpo extraño e incrementar la biocompatibilidad.

En este sentido, el uso combinado de mallas quirúrgicas y MSCs podría incrementar la biocompatibilidad del material, reduciendo la reacción inflamatoria tras su implantación quirúrgica. Avalando el uso de MSCs como agente inmunomodulador pueden encontrarse numerosas publicaciones donde se demuestra que esta capacidad es mediada, al menos en parte, de manera paracrina a través de la regulación de células NK [49,50], células NKT invariantes [51], linfocitos T citotóxicos [52], células T  $\gamma\delta$  [53], células dendríticas [54,55] y macrófagos [56,57].

## BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR

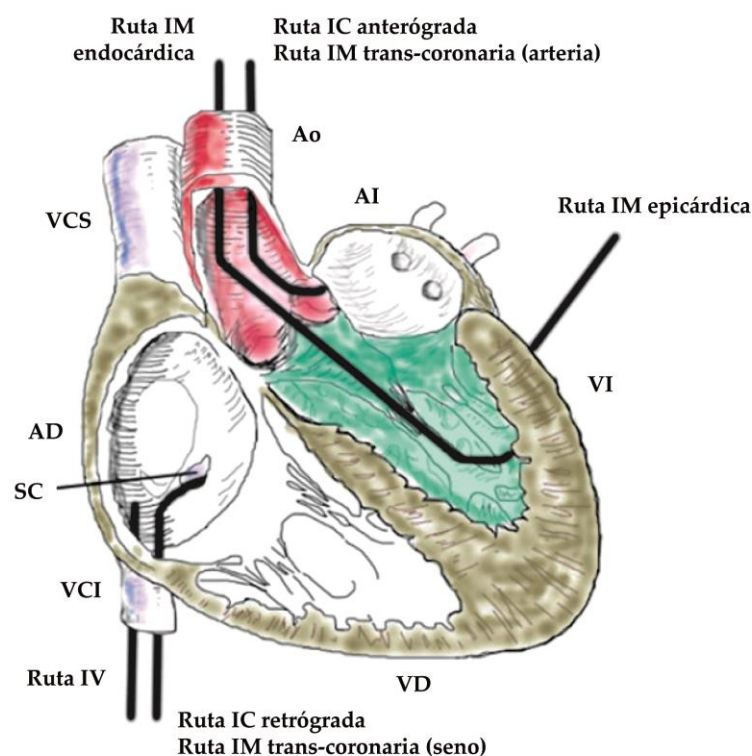
---

El potencial de las células madre para mejorar la función cardíaca ha sido demostrado en diferentes ensayos preclínicos y clínicos [58–60]. Aunque ya existen algunos productos relacionados con la terapia celular en el mercado [61], se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos que corroboran que las MSCs son una fuente celular prometedora para el tratamiento de lesiones cardiovasculares [62,63]. En dichos ensayos, estas células han cumplido con los requerimientos de seguridad exigidos por las autoridades competentes más restrictivas, como la FDA, la Agencia Europea del Medicamento (EMA) y el Comité de Terapias Avanzadas (CAT) europeo o la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Además, las MSCs son especialmente atractivas gracias a su fácil disponibilidad, multipotencialidad, capacidad de autorrenovación y baja inmunogenicidad [58,64,65].

Entre los tipos celulares que más se están estudiando en los últimos años a la hora de abordar el tratamiento del infarto de miocardio se encuentran las células derivadas de cardiosferas o CDCs, las cuales han mostrado su capacidad para reparar el miocardio dañado, probablemente debido a que su función natural es precisamente esa [66], pues se trata de una subpoblación de células madre cardíacas. Algunos ensayos en modelo animal pequeño han mostrado mejoras en la funcionalidad cardíaca tras la administración de CDCs [67,68] y posteriores ensayos en modelo de animal grande consiguieron reducir el tamaño de infarto y mejorar los parámetros hemodinámicos, aunque no obtuvieron efectos relevantes en la funcionalidad cardíaca [69,70]. Tras varios estudios más, se llegó a la conclusión de que el tratamiento con CDCs produce un efecto beneficioso sobre el tejido cardíaco dañado, debido a un descenso en la apoptosis de cardiomiocitos, el reclutamiento de células madre residentes, la estimulación de la proliferación de cardiomiocitos, el incremento de la densidad de los vasos sanguíneos y el descenso en la deposición de colágeno y consecuente fibrosis [71]. Actualmente, diferentes ensayos clínicos están evaluando la

eficacia de la administración intracoronaria de CDCs, tanto autólogas (ensayo CADUCEUS) como alogénicas (ensayos ALLSTAR y DYNAMIC) [72–74].

Además de la elección del tipo celular, encontrar la ruta adecuada para la administración de células madre es un paso fundamental para el éxito de estas terapias, pues determina en gran medida el efecto terapéutico. Por el momento, las vías de administración más utilizadas en los ensayos clínicos son la inyección intramiocárdica directa o a través de catéter (mediante aproximación transcoronaria o transendocárdica), la infusión intravenosa o la administración intracoronaria, tanto arterial como venosa [75] (Figura 3).



**Figura 3.** Principales rutas de administración de células madre en terapia celular cardiovascular. VI: ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; AI: aurícula izquierda; AD: aurícula derecha; SC: seno coronario; Ao: aorta; VCS: vena cava superior; VCI: vena cava inferior. (Adaptado de [76]).

Todas estas rutas presentan sus ventajas y también todas plantean ciertos inconvenientes. Por ejemplo, la administración intracoronaria produce un patrón de distribución celular más uniforme, pero puede provocar el bloqueo de las arterias coronarias [77,78]; la administración intramiocárdica parece presentar una tasa de

retención celular más alta, aunque también existe una pérdida elevada de las células administradas debido a la contracción del miocardio [79]; finalmente, la infusión intravenosa es el método más sencillo para la administración de estas terapias, sin embargo, su tasa de retención celular es muy baja [80]. En la actualidad, la mayor parte de los estudios preclínicos ha demostrado claramente que, en general, la tasa de retención alcanzada por cualquiera de estos métodos es bastante baja [81].

Aunque aún existen numerosas cuestiones abiertas a las que dar respuesta —dosis, momento de la administración o tipos celulares—, es necesario investigar y desarrollar técnicas y vías de administración alternativas que aseguren la viabilidad de las células administradas, su potencial proliferativo y de diferenciación y su capacidad de implantación. Además, sería conveniente poder garantizar la implantación de las células durante un periodo de tiempo suficiente para alcanzar el efecto terapéutico deseado. En este sentido, una mayor retención podría potenciar un mayor efecto reparador en el tejido afectado, permitiendo la estimulación paracrina a través de la liberación de factores de crecimiento, moléculas proangiogénicas, factores inmunomoduladores y moléculas proliferativas y antiapoptóticas.

Actualmente, se están estudiando diferentes vías de administración para su uso clínico [79], pero muy pocos ensayos plantean la administración intrapericárdica como una alternativa segura y eficaz a otros procedimientos quirúrgicos. El líquido pericárdico (LP) es un ultrafiltrado de plasma secretado por la membrana serosa del pericardio cuya función es disminuir la fricción entre el corazón y los tejidos adyacentes. Su composición es muy similar a la del plasma —con menor concentración de proteínas, triglicéridos y colesterol— por lo que podría considerarse, en cierto modo, un vehículo óptimo para preservar la viabilidad y funcionalidad de las células madre.

Comparada con otras vías, la administración intrapericárdica permitiría la administración de altas dosis de células. En el caso de la administración intramiocárdica, existen limitaciones en cuanto al volumen, y además se han descrito efectos adver-



sos como la aparición de arritmias [82,83]. Las vías intravenosa e intracoronaria presentan una tasa de retención celular muy baja, y generalmente una elevada cantidad de las células administradas quedan retenidas en los pulmones [84]. Por el contrario, el LP, al poseer una baja tasa de recambio, permitiría que las células transferidas permanecieran durante tiempos largos en este medio. Además, la administración intracoronaria se relaciona frecuentemente con daño en el miocardio debido a obstrucciones microvasculares [85,86]. Esto, sin embargo, no sería un problema en el caso de la inyección intrapericárdica, ya que esta ruta es independiente del flujo vascular y microvascular.

En la actualidad, diferentes estudios han demostrado que la vía intrapericárdica es un método eficaz para administrar agentes farmacológicos [87,88]. Se han realizado ensayos en modelo de animal grande usando factor de crecimiento fibroblástico (*Fibroblast Growth Factor*, FGF), L-arginina o ácidos grasos omega-3 [89–91]. El tratamiento con FGF en modelo porcino de infarto de miocardio crónico mostró un efecto beneficioso al incrementar la vascularización del miocardio, sin presentar efectos adversos [92]. La administración de L-arginina se ha probado en perros, reduciendo la severidad de las arritmias ventriculares [90]. Por último, los ácidos grasos omega-3 administrados por vía intrapericárdica consiguieron reducir las arritmias y el tamaño del infarto en un modelo porcino de esta patología [91].

Por todo ello, la administración intrapericárdica de células madre podría constituir una alternativa a las rutas tradicionales, consiguiendo solventar los principales riesgos y limitaciones de estas y logrando así una mayor retención de células en el tejido dañado, lo que potencialmente se traduciría en una mejora de la eficacia de estas terapias.

### BLOQUE III: ESTUDIO DE LOS EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO

---

Los exosomas son pequeñas vesículas membranosas secretadas por las células al espacio extracelular a través de un proceso exocítico. Estas vesículas, que desempeñan un importante papel en la comunicación intercelular, contienen ARN —ARNm y miARN—, lípidos y proteínas. Algunas de estas proteínas —como las tetraspaninas CD9, CD63 y CD81— se expresan de forma ubicua en todos los exosomas, aunque en función del tipo celular del que provengan pueden encontrarse proteínas específicas relacionadas con la funcionalidad de las vesículas, que también puede ser variable dependiendo de la célula de origen. La caracterización de la expresión de ARN, lípidos y proteínas en exosomas de diferentes células y organismos se encuentra ampliamente descrita en la base de datos de ExoCarta [93].

Los exosomas pueden aislarse fácilmente mediante diferentes métodos a partir de cultivos celulares *in vitro* o de fluidos corporales, existiendo diferentes protocolos disponibles en la bibliografía [94]. Entre ellos, pueden encontrarse diferencias en función de su finalidad —procedimientos para investigación básica, diagnóstica o clínica—. El método más extendido para el aislamiento de exosomas es el basado en la ultracentrifugación, a menudo combinada con gradientes de sacarosa. Este método, sin embargo, requiere de un equipamiento adecuado que no siempre está disponible en un entorno clínico. Otros métodos para aislar exosomas incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC), ultrafiltración, precipitación con polímeros e inmunoseparación basada en partículas magnéticas [95]. Sin embargo, para una producción de exosomas a nivel clínico, es un requisito indispensable que el protocolo de aislamiento sea un método seguro, reproducible y que permita la producción a gran escala [96].

En términos preclínicos, los exosomas se han utilizado ampliamente en modelos murinos para el tratamiento de diferentes patologías como infecciones [97,98], alergias [99] o enfermedades autoinmunes [100,101]. En cuanto al potencial immuno-

modulador de estas vesículas, los primeros estudios *in vivo* los realizaron Pêche *et al.* empleando exosomas derivados de células dendríticas de médula ósea [102,103].

En comparación con los estudios preclínicos, son pocos los ensayos clínicos que se están desarrollando utilizando exosomas como agentes terapéuticos, aunque sí existen numerosos ensayos que estudian el papel de estas microvesículas como biomarcadores diagnósticos y pronósticos. En uno de estos ensayos, se están empleando exosomas derivados de células dendríticas en pacientes oncológicos [104,105]; otro de ellos emplea exosomas derivados de líquido ascítico para tratar el cáncer colorrectal [106] y únicamente uno de ellos, un ensayo egipcio en fase II-III en pacientes diabéticos, está utilizando exosomas derivados de MSCs de sangre de cordón umbilical como herramienta para reducir el estado inflamatorio y mejorar el control glucémico de los pacientes (NCT02138331). En todos estos ensayos se ha demostrado la seguridad y tolerabilidad de los tratamientos.

El potencial terapéutico de los exosomas derivados de MSCs (exo-MSCs) se ha demostrado con éxito en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares en modelo murino [107]. En este sentido, su acción beneficiosa podría ser debida en gran parte a su contenido en factores proangiogénicos, descrito en diferentes subpoblaciones de células madre [108].

No existen diferencias entre exo-MSCs y exosomas derivados de otros tipos celulares en términos de morfología, aislamiento y condiciones de preservación. Sin embargo, los exo-MSCs expresan, además de los marcadores de superficie comunes para todos los exosomas —como CD9 y CD81—, algunas moléculas de adhesión entre las que se encuentran CD29, CD44 o CD73, las cuales están presentes también en la membrana celular de las MSCs [109].

Como se ha mencionado anteriormente, hoy en día está ampliamente aceptado que el efecto terapéutico producido tras la implantación de células madre adultas está mediado, en gran parte, de manera paracrina. De hecho, en el contexto del infarto de miocardio se cuantificó experimentalmente que el efecto producido por meca-

nismos paracrinos constituía hasta el 80% del efecto total producido por las células madre adultas [110].

En comparación con el empleo de MSCs, son muchas las ventajas atribuidas a la terapia con exosomas o factores biológicos. Por ejemplo, mientras que las células transferidas pueden morir o no llegar a anidar en el tejido dañado, los factores biológicos pueden administrarse más fácilmente de forma localizada, permitiendo así un mejor control de la dosis ya que, además, no existe el problema de pérdida de viabilidad celular [111].

Actualmente, se están llevando a cabo diversos ensayos preclínicos con exo-MSCs para la reparación de diferentes tejidos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el efecto inmunomodulador de estas vesículas, que podrían presentar una actividad reguladora sobre la diferenciación, activación y función de diferentes poblaciones de linfocitos T similar a la que poseen las MSCs de las que provienen [109], como ya se ha descrito anteriormente.

Esta potencial actividad inmunomoduladora de los exosomas derivados de MSCs, junto con el desarrollo de un protocolo de aislamiento adecuado para la práctica clínica, podría abrir la puerta al desarrollo de alternativa a las terapias inmunomoduladoras tradicionales y a las basadas en el uso de células.

Una vez introducidos los conceptos generales sobre los que se desarrolla este trabajo, así como cada uno de los tres bloques específicos que constituyen esta tesis doctoral, a continuación se enumeran los objetivos generales y específicos planteados para este estudio.

# Objetivos • • • •

## **I. Desarrollo y evaluación del uso de materiales quirúrgicos como vehículos para favorecer la implantación de MSCs.**

*I.A.* Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto producido por la combinación de MSCs y suturas quirúrgicas sobre la deposición de colágeno.

*I.B.* Evaluación *in vitro* e *in vivo* del efecto producido por la combinación de MSCs y mallas quirúrgicas sobre la respuesta inflamatoria.

## **II. Evaluación de la ruta intrapericárdica como vía alternativa para la administración de células madre en terapia celular cardiovascular.**

*II.A.* Evaluación de la seguridad y biodistribución de MSCs administradas por vía intrapericárdica en modelo porcino.

*II.B.* Estudio inmunológico de la administración intrapericárdica de CDCs en modelo porcino.

## **III. Estudio de los exosomas derivados de MSCs como agentes responsables de su actividad paracrina inmunomoduladora.**

*III.A.* Evaluación del potencial inmunomodulador de exosomas derivados de MSCs sobre células T estimuladas *in vitro*.

*III.B.* Comparación de diferentes métodos de aislamiento de exosomas derivados de MSCs para uso clínico.



## BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

---

En relación con el objetivo I, en este bloque se aborda la combinación de células madre tanto con suturas como con mallas quirúrgicas. En el primer caso, como ya se ha expuesto anteriormente, se postula que la implantación de MSCs en el tejido a través de las suturas podría proporcionar un efecto beneficioso en la fase de remodelación tisular relacionado con la mejora de la deposición de colágeno, mejorando así la cicatrización tras la cirugía. En cuanto al uso combinado de MSCs con mallas quirúrgicas, planteamos que este podría incrementar la biocompatibilidad del material inerte, reduciendo la frecuente reacción inflamatoria tras su implantación quirúrgica.

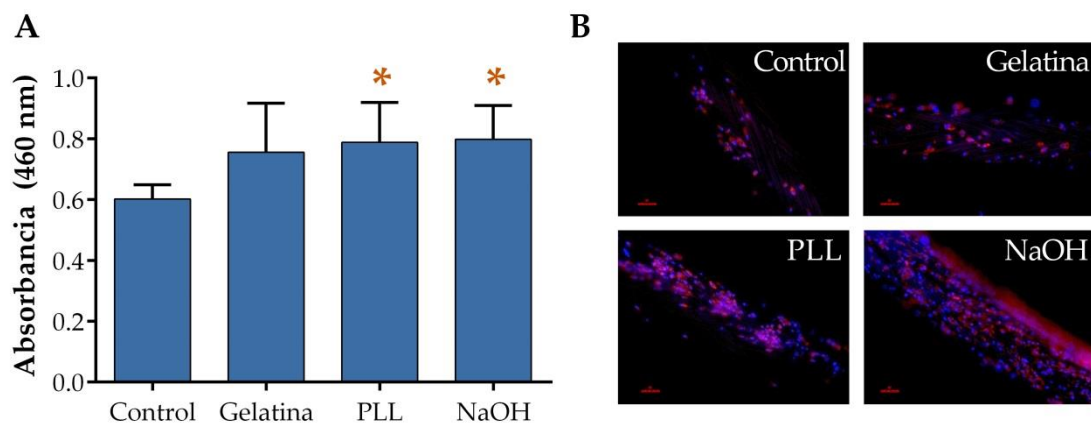
Para el desarrollo de este trabajo, se realizaron en primer lugar ensayos *in vitro* encaminados a optimizar la adhesión celular a los materiales quirúrgicos, así como a determinar que el fenotipo y la viabilidad celular no se vieran comprometidos. Asimismo, se realizaron estudios *in vivo* para evaluar el efecto biológico de las suturas y mallas combinadas con MSCs.

### **I.A. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y SUTURAS QUIRÚRGICAS SOBRE LA DEPOSICIÓN DE COLÁGENO**

A continuación, se presentan los resultados relacionados con el objetivo I.A. Para llevar a cabo este estudio, se realizaron ensayos *in vitro* con el fin de determinar el fenotipo de las células en combinación con las suturas, la permanencia de las MSCs en el material tras realizar diferentes pases de sutura por tejido y los tipos de colágeno secretado por las MSCs en cultivo. Finalmente, se realizó un ensayo *in vivo* en modelo murino para analizar los depósitos de colágeno en los tejidos suturados.

## Optimización de la adhesión de MSCs a suturas quirúrgicas

Para la combinación de MSCs con suturas quirúrgicas, se utilizó una sutura absorbible multifilamento trenzada de PLGA. Con el objetivo de mejorar la adhesión celular al material inerte, se realizaron diferentes tratamientos en las suturas antes de su incubación con las células. Estos tratamientos fueron: gelatina, poli-L-lisina (PLL) o NaOH. A continuación, se realizó el cocultivo con células madre mesenquimales porcinas derivadas de médula ósea (*porcine Bone Marrow-derived MSCs*, pBM-MSCs) y se cuantificó la tasa de adhesión celular mediante el método del CCK-8. Este ensayo colorimétrico mide la actividad metabólica de las células, existiendo una relación directa entre dicha actividad y el número de células, por tanto, a mayor absorbancia, mayor número de células adheridas a la sutura. Como control, se utilizaron suturas sin ningún tratamiento incubadas con pBM-MSCs. Asimismo, se tomaron imágenes de microscopía de suturas combinadas con células previamente marcadas con las sondas fluorescentes *Hoechst* y *Vybrant* para apreciar visualmente la distribución de las células sobre las suturas.



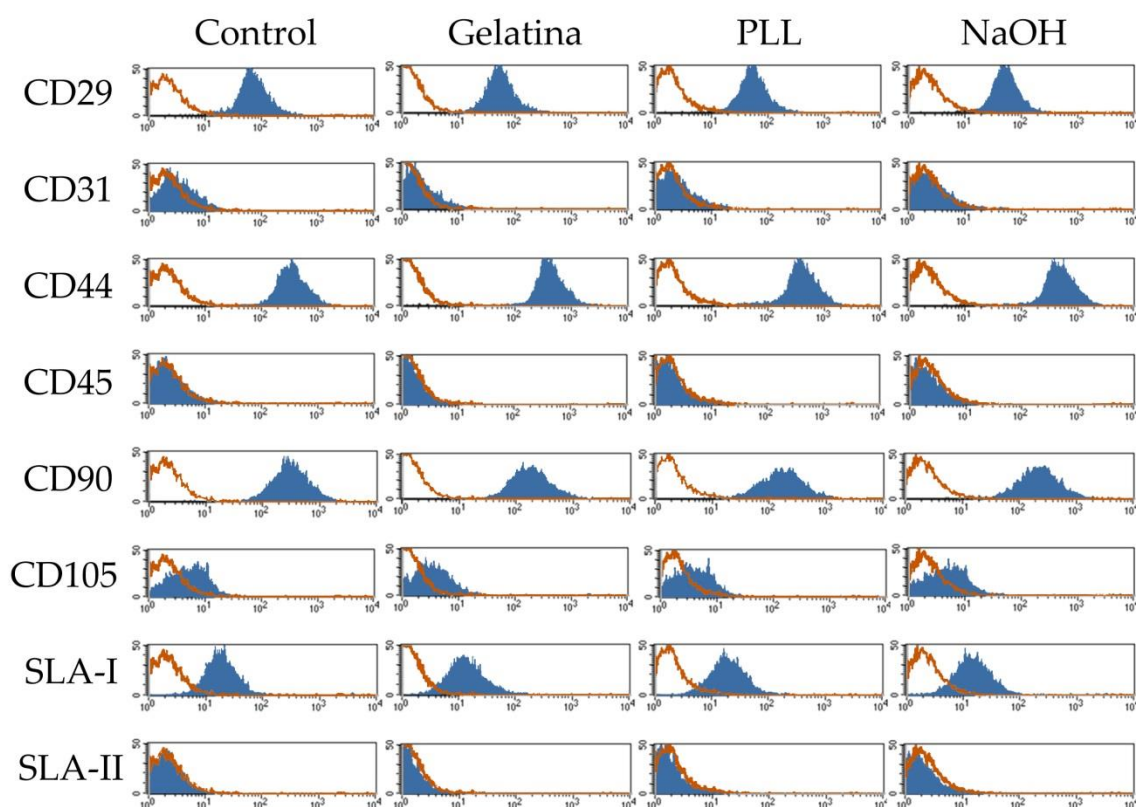
**Figura 4. Adhesión celular a las suturas con diferentes tratamientos.** Con el fin de mejorar la adhesión de las MSCs a la sutura, estas se trataron con gelatina, PLL o NaOH antes de su cultivo con las células. El gráfico (A) representa la adhesión celular cuantificada mediante CCK-8. Los valores representan la media ± SD de 9 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada tratamiento con el control (sutura sin tratar). \*  $p \leq 0.05$ . Las imágenes de microscopía (B) muestran las MSCs adheridas a las suturas con los diferentes tratamientos, así como a la sutura sin tratar (control). Las células se marcaron con las sondas fluorescentes *Hoechst* y *Vybrant*. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación de 10X. Escala: 100 μm.



Los resultados, representados en la Figura 4A, mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las suturas sin tratar y las sometidas a tratamiento con PLL y NaOH, alcanzándose una mayor tasa de adhesión celular en estas últimas. El tratamiento con gelatina no produjo cambios significativos en términos de adhesión celular en comparación con el control de sutura no tratada. La figura 4B muestra las imágenes obtenidas mediante microscopía, en las que puede apreciarse también una mayor presencia de células en las suturas tratadas con PLL y NaOH.

### **Análisis fenotípico de MSCs adheridas a suturas quirúrgicas**

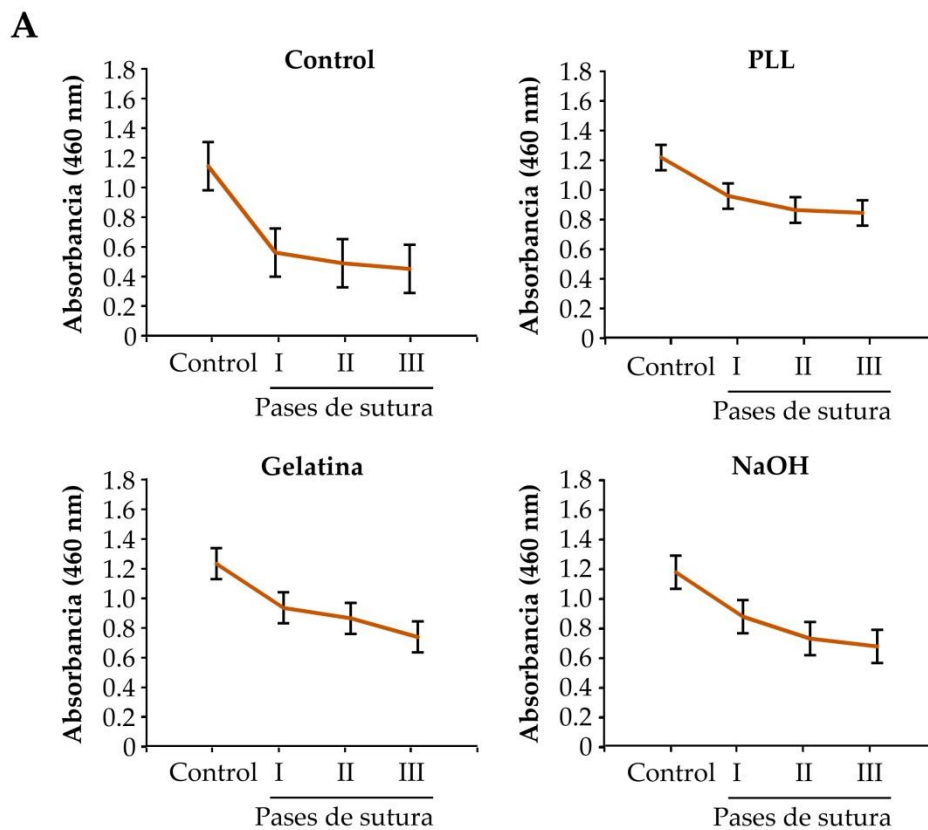
Con el fin de determinar si la adhesión de las MSCs a las suturas podría estar afectando al fenotipo de las pBM-MSCs se realizó un análisis de expresión de los marcadores de superficie CD29, CD31, CD44, CD45, CD90, CD105, SLA-I y SLA-II por citometría de flujo, tanto en células en condiciones de cultivo estándar como en células combinadas con las suturas. Los resultados, representados en la Figura 5, mostraron que el fenotipo de las células no se ve afectado por su cocultivo con las suturas sometidas a los diferentes tratamientos.

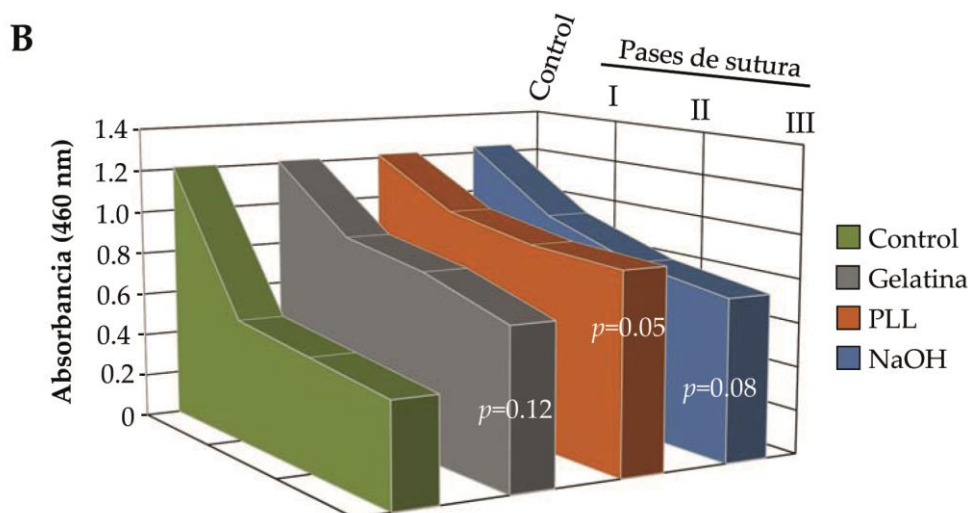


**Figura 5. Análisis fenotípico de las MSCs adheridas a las suturas con los diferentes tratamientos.** La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo multicolor. En la figura se muestran los histogramas representativos de cada condición, junto con los niveles de expresión de cada marcador. Se utilizaron MSCs en condiciones de cultivo estándar como control. El nivel de expresión se representa como la intensidad de fluorescencia relativa media (*Mean Relative Fluorescence Intensity*, MRFI). La MRFI se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia media (*Mean Fluorescence Intensity*, MFI) por su control negativo.

### Estudio de la resistencia de las MSCs adheridas a los pases de sutura

Para analizar la fuerza de adhesión de las células a la sutura, el material inerte con los diferentes tratamientos se cocultivó con MSCs y se realizaron tres pases de la sutura a través de tejido intestinal *ex vivo*, que sirvió como tejido de referencia. La cuantificación de las células que permanecían adheridas a la sutura tras cada pase se realizó utilizando el método del CCK-8. Nuestros resultados indican que, tras el tercer pase, únicamente hay diferencias significativas en la sutura tratada con PLL, en la que el número de células que permanecieron adheridas fue mayor que en la sutura sin tratamiento (Figura 6).

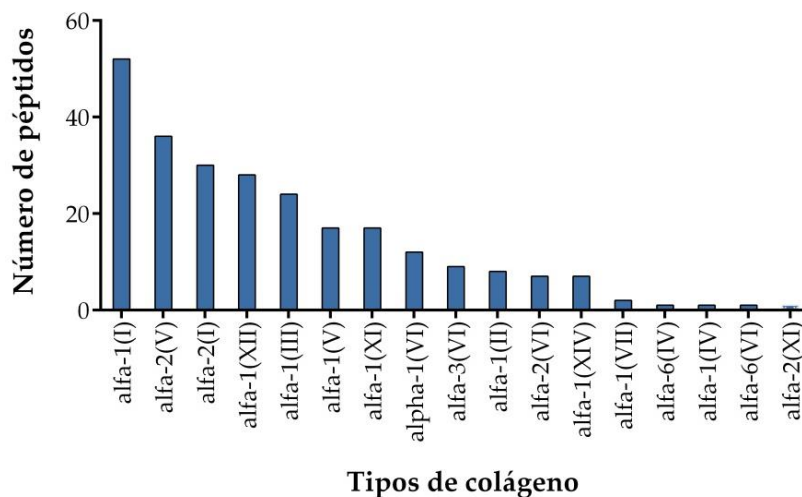




**Figura 6. Resistencia de las MSCs adheridas a diferentes pases de sutura.** Las suturas con los diferentes tratamientos, así como suturas sin tratar (control), recubiertas con MSCs, se utilizaron para realizar tres pases a través de un tejido de referencia. La adhesión de las MSCs a las suturas se determinó antes de realizar los pases por el tejido y después de cada uno de ellos. Los gráficos (A) muestran la adhesión celular cuantificada mediante CCK-8 para cada una de las suturas antes (control) y después de cada uno de los pases. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 5 experimentos independientes. El gráfico inferior (B) representa conjuntamente los valores medios mostrados en los gráficos superiores. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada medida con su control correspondiente (antes de los pases, pase I, pase II o pase III) de la sutura sin tratar. La significación estadística de cada comparación tras el tercer pase se muestra en la figura.

### **Análisis proteómico *in vitro* de los tipos de colágeno secretado por las MSCs**

Con el fin de identificar los tipos de colágeno secretados por las MSCs, así como otras proteínas del secretoma posiblemente implicadas en el proceso de cicatrización, se realizó un análisis proteómico por espectrometría de masas de los medios de cultivo recogidos tras 72 horas de cultivo estándar y concentrados, contrastando el espectro obtenido con la base de datos *Swissprot* para humano y porcino. Este análisis semicuantitativo fue realizado en el Laboratorio de Proteómica Cardiovascular del CNIC. La proteína más abundante encontrada en los medios de cultivo, expresada en función de número de péptidos, fue la cadena alfa-1(I) del colágeno, seguida por las cadenas alfa-2(V), alfa-2 (I), alfa-1 (XII) y alfa-1 (III). En la Figura 7 se muestra el número de péptidos identificado para cada una de las cadenas.



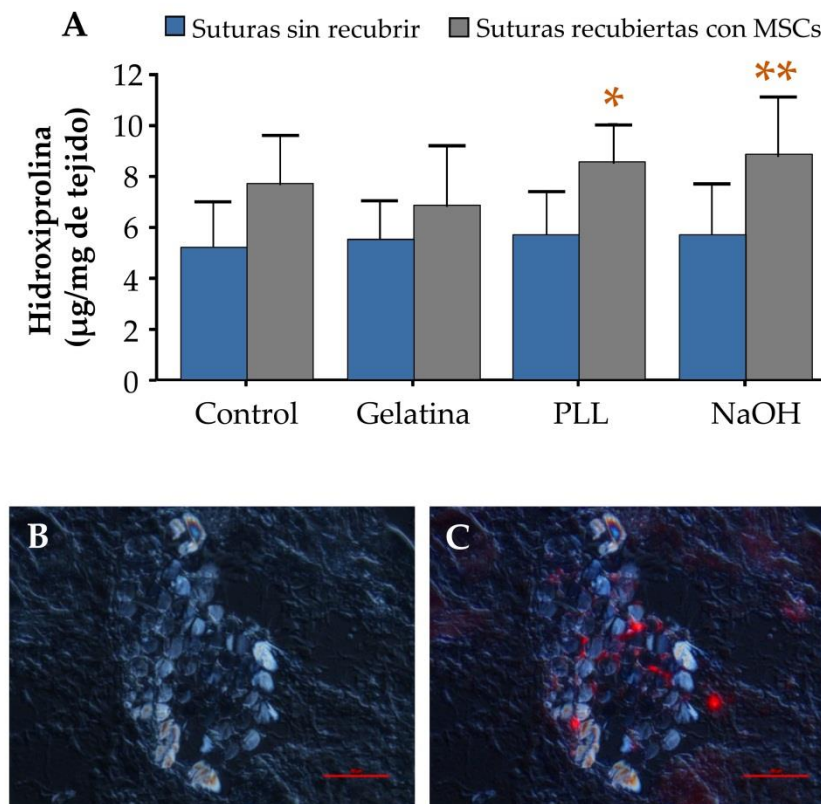
**Figura 7. Identificación y cuantificación de los tipos de colágeno liberados por las MSCs *in vitro*.** Los sobrenadantes de las pBM-MSCs cultivadas *in vitro* se recogieron y concentraron. Se aisló la proteína total, se separó en gel de SDS-poliacrilamida y se realizó la digestión de cada banda con una solución de tripsina. Los péptidos resultantes se analizaron mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. La identificación de proteínas se realizó con SEQUEST usando la base de datos de *Swissprot* para humano. Únicamente se consideraron las proteínas identificadas con al menos dos péptidos.

### **Análisis *in vivo* de los depósitos de colágeno tras la implantación de las MSCs adheridas a las suturas**

Para este estudio, se utilizaron ratones B6D2 (n=8), en cada uno de los cuales se realizaron cuatro incisiones de 1.5 cm en la piel de la zona dorsal. En el grupo control (n=4), se utilizaron las suturas sometidas a los diferentes tratamientos, así como no tratadas, para suturar cada una de las incisiones. En el grupo de ensayo (n=4) se utilizaron suturas con los mismos tratamientos y recubiertas con MSCs murinas derivadas de médula ósea. Pasada una semana, la zona de piel con cada una de las cicatrices se separó del resto, se determinó la cantidad de hidroxiprolina —componente principal del colágeno— mediante un *kit* comercial y se normalizó esta cantidad en relación al peso del tejido.

Nuestros resultados mostraron que el contenido en hidroxiprolina en aquellos tejidos en los que se empleó sutura sin recubrimiento celular fue el más bajo, sin diferencias significativas entre los diferentes tratamientos. Sin embargo, la deposición de colágeno en el tejido se vio favorecida en todos los tejidos en los que se utilizaron suturas con recubrimiento celular. En cuanto a los diferentes tratamientos, se

apreció un aumento estadísticamente significativo en la cantidad de hidroxiprolina con la sutura tratada con NaOH, respecto a su control sin células. También con el tratamiento con PLL se detectó una cantidad elevada de hidroxiprolina, con una  $p=0.06$  en la comparación con su control sin células (Figura 8).



**Figura 8. Contenido en hidroxiprolina en tejido suturado.** Pasados 6 días tras la realización de las suturas en piel de ratones B6D2, se realizó la cuantificación de hidroxiprolina en el tejido suturado con cada una de las suturas, tanto recubiertas con MSCs como sin recubrir. El gráfico muestra la cantidad de hidroxiprolina normalizada en relación al peso seco del tejido suturado. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 4 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada tipo de sutura con su control sin recubrir con células (\*  $p \leq 0.1$ ; \*\*  $p \leq 0.05$ ). Las imágenes de microscopía (B) corresponden a imágenes representativas del tejido suturado con sutura tratada con PLL y recubierta con MSCs marcadas con la sonda fluorescente *Vybrant*, a dos días tras la sutura del tejido. Las imágenes se obtuvieron mediante microscopía óptica (izquierda) y mediante combinación de las imágenes de microscopía óptica y de fluorescencia (derecha) con una magnificación de 20X. Escala: 100  $\mu$ m.

## **I.B. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y MALLAS QUIRÚRGICAS EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

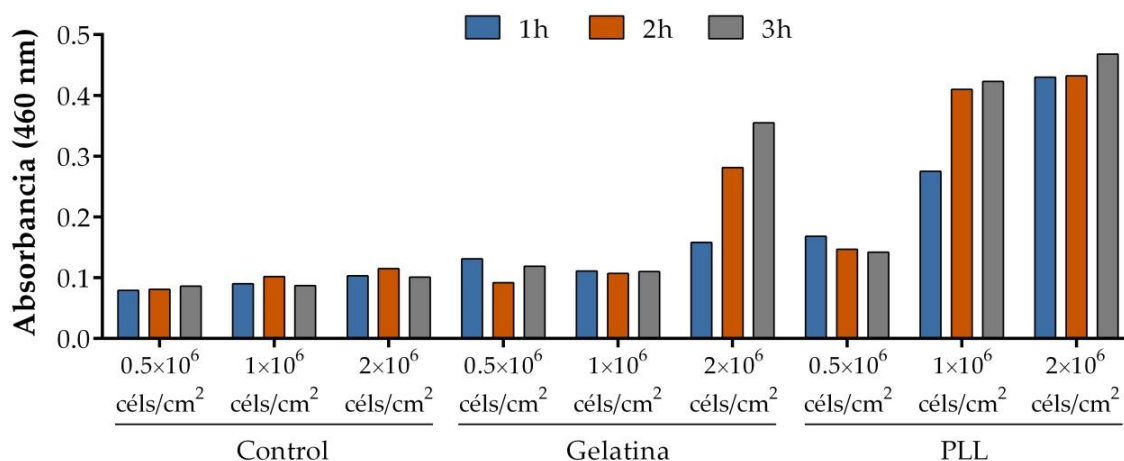
El presente bloque de resultados se corresponde con el objetivo I.B. En este trabajo, la combinación de las células con el material quirúrgico se realizó tomando como base la experiencia adquirida en el estudio anterior. Así, las primeras pruebas *in vitro* se centraron en optimizar la adhesión celular al material inerte y en estudiar el perfil fenotípico de las células en esta combinación. En este trabajo, quisimos introducir además una determinación importante a la hora de considerar la aplicación clínica de este producto: la factibilidad de criopreservación de la combinación. Para el análisis de la actividad biológica, se realizaron ensayos *in vitro* evaluando la capacidad inmunomoduladora sobre linfocitos T estimulados y la capacidad de polarización de macrófagos utilizando la línea celular promonocítica U937. Finalmente, se realizó un ensayo *in vivo* en modelo murino en el que se analizaron tanto aspectos de seguridad como de bioactividad.

### **Análisis de la adhesión celular a las mallas quirúrgicas**

Para este estudio, se utilizó una malla quirúrgica de polipropileno, monofilamento, no absorbible y de bajo peso. En el caso de la combinación de MSCs con estas mallas quirúrgicas, el material inerte (4 cm<sup>2</sup>) fue tratado con gelatina y PLL, y cocultivado con diferentes dosis celulares (0.5, 1 y 2 millones/cm<sup>2</sup>) durante diferentes tiempos (1, 2 y 4 horas) para finalmente determinar la tasa de adhesión celular del mismo modo que para las suturas. En este caso se utilizaron MSCs humanas derivadas de tejido adiposo (*human Adipose Stem Cells*, hASCs). Como se muestra en la Figura 9, las tasas de adhesión más elevadas se obtuvieron con las concentraciones celulares mayores (1 y 2 millones/cm<sup>2</sup>), con escasas diferencias en función del tiempo de incubación. Teniendo en cuenta que el protocolo de combinación de MSCs y mallas quirúrgicas debe ser viable, práctico y rápido para su aplicación en la clínica, finalmente se escogió el tratamiento con PLL y el recubrimiento con la dosis y



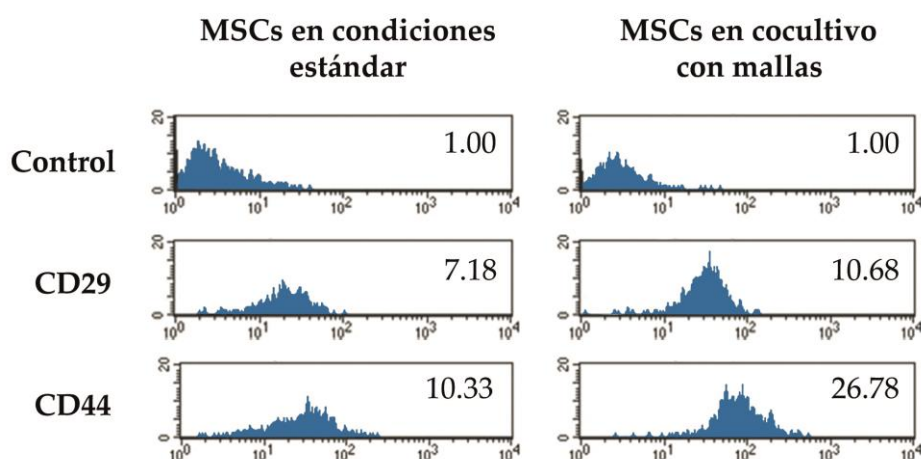
tiempo de incubación intermedios (1 millón de células/cm<sup>2</sup> durante 2 horas) para realizar el estudio.

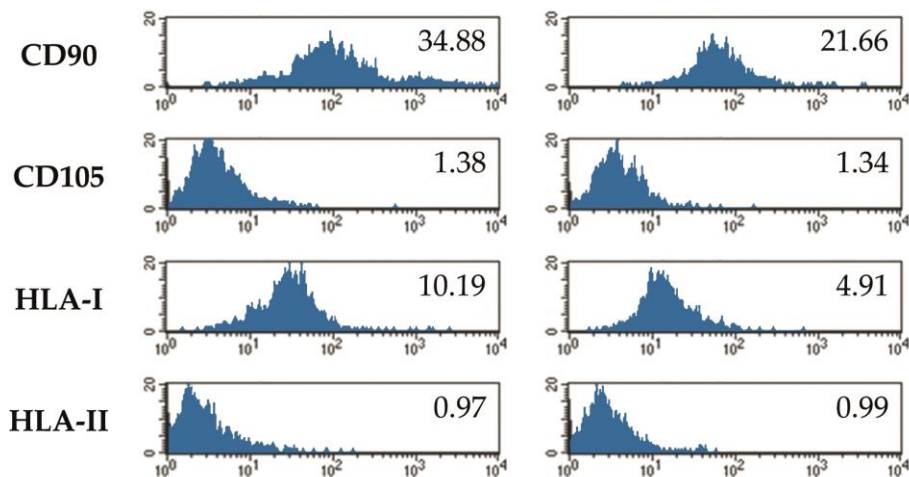


**Figura 9. Adhesión celular a las mallas quirúrgicas con los diferentes tratamientos, dosis celulares y tiempos de incubación.** Con el fin de mejorar la adhesión de las MSCs a las mallas, estas se trataron con gelatina o PLL antes de su cultivo con las células. Asimismo, se incluyeron mallas no tratadas como control. Para el recubrimiento con MSCs, se probaron varias dosis celulares y tiempos de incubación. El gráfico representa la adhesión celular cuantificada mediante CCK-8.

### **Análisis fenotípico de las MSCs cocultivadas con las mallas quirúrgicas**

Para comparar el fenotipo de las MSCs cultivadas en condiciones estándar con el de las células adheridas a las mallas, se realizó una caracterización por citometría de flujo de diferentes marcadores de superficie (CD29, CD44, CD90, CD105, HLA clase I y HLA clase II) tras una semana de cultivo. Los resultados obtenidos (Figura 10) mostraron que el fenotipo de las células no se ve alterado por su cocultivo con mallas quirúrgicas tratadas con PLL.



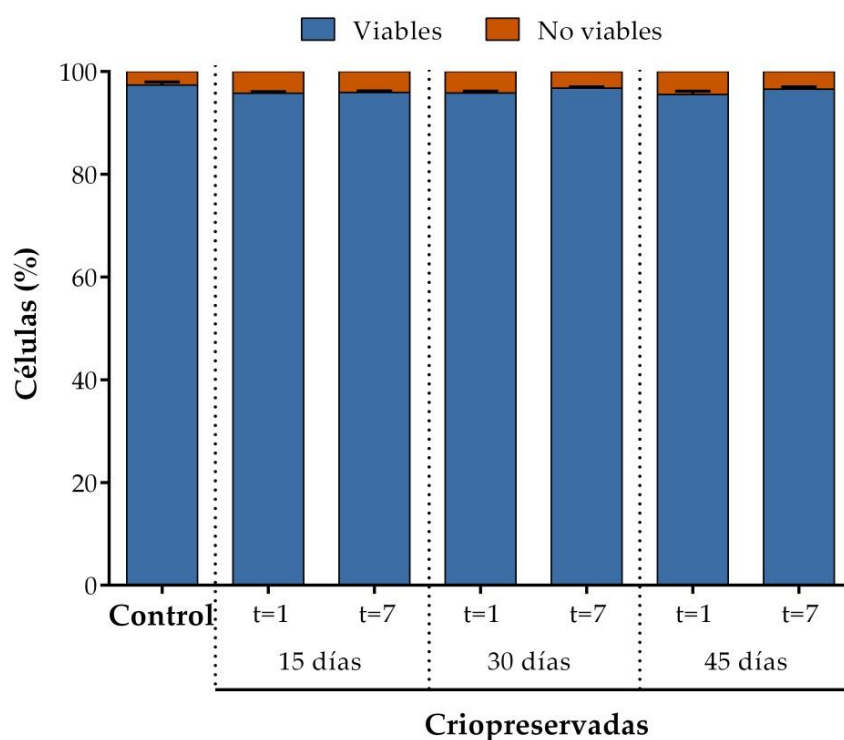


**Figura 10. Análisis fenotípico de las MSCs adheridas a las mallas quirúrgicas.** La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo multicolor. Se compararon los perfiles fenotípicos de las MSCs en condiciones de cultivo estándar con las adheridas a las mallas. En la figura se muestran los histogramas representativos de cada condición, junto con los niveles de expresión de cada marcador. El nivel de expresión se representa como MRFI, calculado mediante la división de la MFI por su control negativo.

### **Estudio de viabilidad celular tras la criopreservación de las mallas quirúrgicas recubiertas con MSCs**

Considerando la potencial aplicación clínica de las mallas recubiertas con MSCs, se quiso abordar la factibilidad de su conservación, un punto importante a tener en cuenta a la hora de trasladar el modelo al entorno clínico-quirúrgico. Para ello, se determinó si la criopreservación de las mallas recubiertas podría afectar a la viabilidad de las MSCs. Los ensayos de viabilidad se realizaron tras diferentes tiempos de criopreservación (15, 30 y 45 días), a 1 y 7 días tras la descongelación. Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas en la viabilidad celular entre el control (mallas recubiertas con MSCs no sometidas a criopreservación) y las células de las mallas criopreservadas y descongeladas, independientemente del tiempo de criopreservación y cultivo tras la descongelación (Figura 11).





**Figura 11. Viabilidad celular tras la criopreservación de las mallas recubiertas con MSCs.** Las mallas recubiertas con MSCs se congelaron en un medio comercial. Después de 15, 30 y 45 días, se descongelaron y cultivaron durante 1 o 7 días (t=1 y t=7, respectivamente). La viabilidad celular se calculó mediante la técnica de tinción por exclusión de azul de tripano en un contador automático. Como control, se utilizaron mallas sin congelar.

### **Análisis *in vitro* del potencial inmunomodulador de las mallas recubiertas con MSCs**

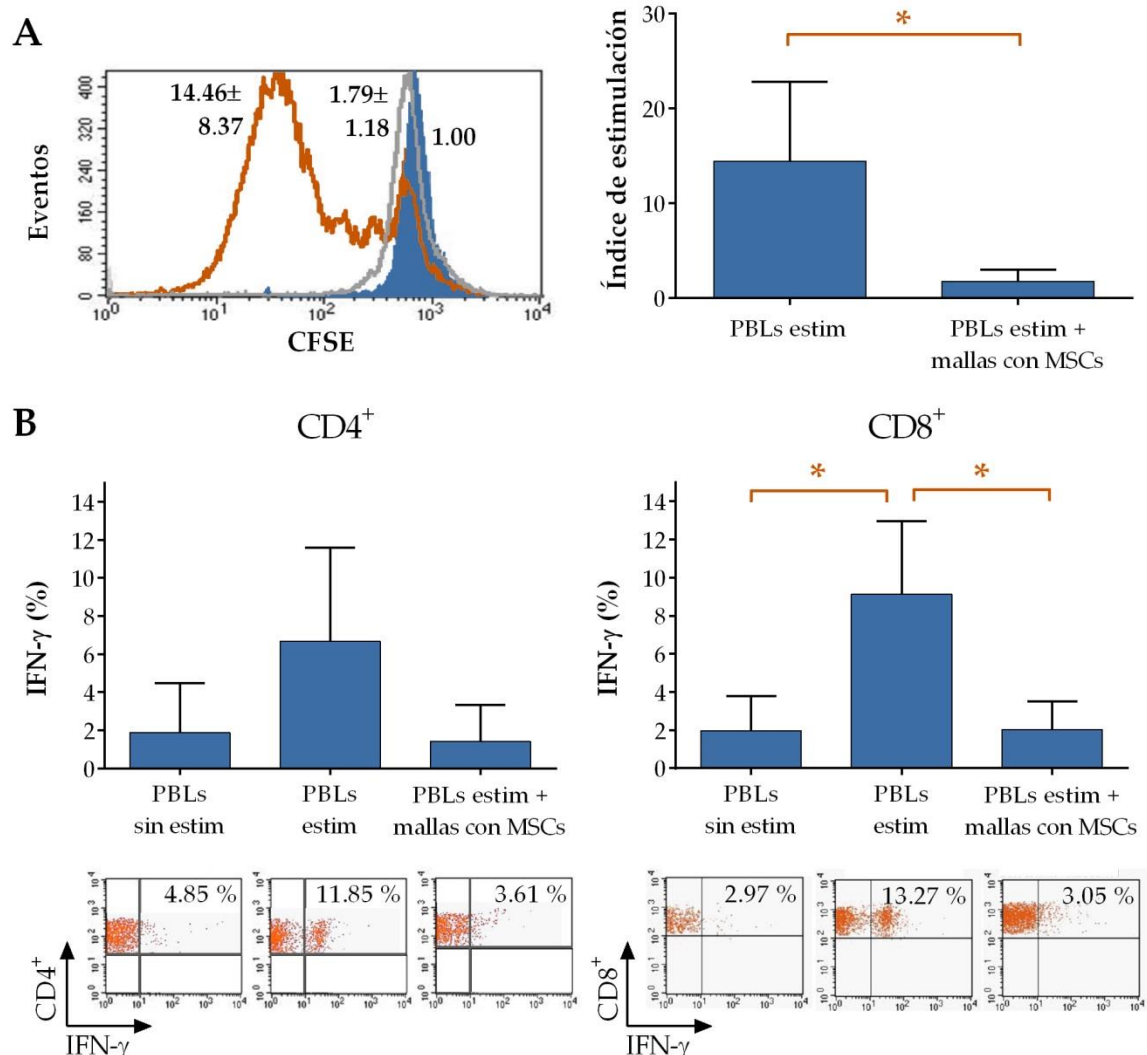
Con el fin de abordar el estudio de la actividad biológica de las mallas recubiertas con MSCs, se realizó un ensayo *in vitro* para determinar su efecto inmunomodulador sobre la tasa de proliferación de subpoblaciones linfocitarias. En este ensayo, las mallas recubiertas se cocultivaron durante 6 días con linfocitos de sangre periférica (*Peripheral Blood Lymphocytes*, PBLs) procedentes de tres donantes sanos y estimulados con microesferas recubiertas con anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28. Estas microesferas simulan el efecto de las células presentadoras de antígeno, activando las células T en reposo. Como control negativo, se utilizaron PBLs sin estimular; como control positivo, PBLs estimulados.

La actividad proliferativa de los PBLs cocultivados con las mallas recubiertas durante 6 días, así como de los controles, se determinó mediante el marcaje de los mismos con la sonda fluorescente carboxifluoresceína succinimidil éster (CFSE) antes de comenzar el ensayo. Esta sonda atraviesa la membrana y se une de manera covalente a diferentes moléculas del citoplasma celular, repartiéndose por igual durante la división celular, de manera que cada célula dividida acumulará la mitad de colorante que la célula de la que procede. La medida de la intensidad de fluorescencia del CFSE mediante citometría de flujo permite determinar la actividad proliferativa de los PBLs cultivados en las diferentes condiciones. Así, a mayor intensidad de fluorescencia emitida por una célula, menor número de divisiones celulares habrá tenido y, por tanto, menor tasa proliferativa.

Como es lógico, la tasa de proliferación de los PBLs sin estimular fue baja, y la tasa más elevada se produjo en el control positivo. Cuando los linfocitos estimulados fueron cultivados en presencia de las mallas recubiertas, la tasa de proliferación descendió significativamente hasta casi alcanzar el valor del control negativo (Figura 12A).

Junto con el análisis de proliferación, también se realizó la determinación del contenido intracelular de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  es una citocina proinflamatoria secretada por células del sistema inmune bajo ciertas condiciones de activación, existiendo una relación directa entre la secreción de esta citocina y el nivel de activación de las células T. Para determinar el efecto que las mallas recubiertas ejercen sobre la producción de IFN- $\gamma$  por las células T, se realizó un ensayo en las mismas condiciones que en el estudio de proliferación linfocitaria. Tras los 6 días de cultivo, los PBLs se incubaron con un inhibidor del transporte celular para retener el IFN- $\gamma$  producido en el interior celular y se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. A continuación, se fijaron, permeabilizaron y marcaron con anti-IFN- $\gamma$ , para ser posteriormente analizadas por citometría de flujo.

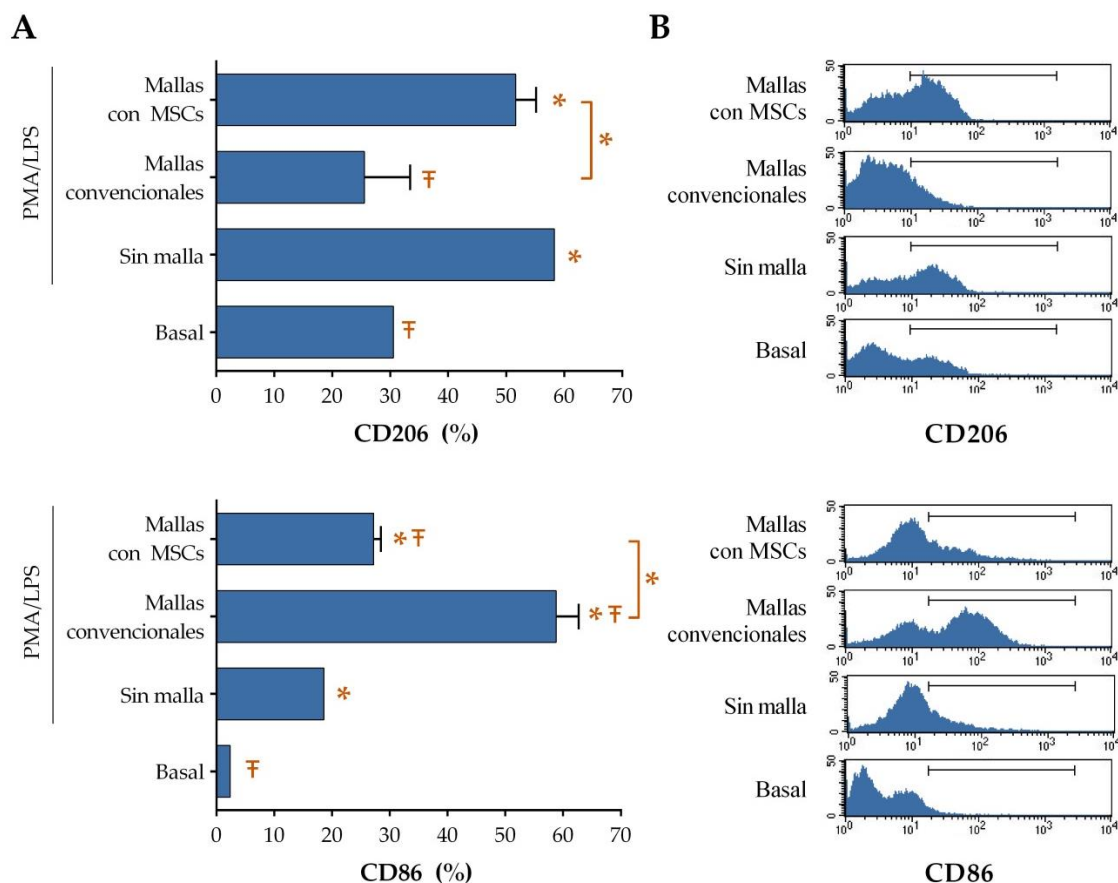
Los resultados de la determinación intracelular de IFN- $\gamma$  en las subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> mostraron que el porcentaje de IFN- $\gamma$  en las células CD8<sup>+</sup> descendió significativamente en condiciones de cocultivo con mallas recubiertas con MSCs, en comparación con el control positivo. En las células CD4<sup>+</sup> también se aprecia este descenso, aunque no llegó a ser estadísticamente significativo (Figura 12B). Así, estos resultados indican que las mallas recubiertas con MSCs no solo impiden la proliferación linfocitaria, sino también la producción de IFN- $\gamma$  en la subpoblación CD8<sup>+</sup>.



**Figura 12. Capacidad de proliferación y producción de IFN- $\gamma$  en PBLs estimulados *in vitro* y cultivados en presencia de mallas recubiertas de MSCs.** Para la determinación de la actividad proliferativa, los PBLs marcados con CFSE estimulados *in vitro* se cultivaron durante 6 días con mallas recubiertas con MSCs. Como controles, se utilizaron PBLs sin estimular y PBLs estimulados, ambos sin mallas quirúrgicas. El histograma (A, izquierda) representa la intensidad de fluorescencia del CFSE para los PBLs no estimula-

dos (relleno azul), PBLs estimulados (línea naranja) y PBLs estimulados en presencia de mallas recubiertas (línea gris). También se muestran los índices de estimulación de cada condición, calculados como como las frecuencias de células con baja expresión de CFSE de cada condición divididas entre la frecuencia de células con baja expresión de CFSE en el control negativo (células no estimuladas). En el gráfico (A, derecha) los valores representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando los índices de estimulación del control positivo (PBLs estimulados) y de los PBLs estimulados cultivados en presencia de mallas recubiertas ( $* p \leq 0.05$ ). Para la determinación de IFN- $\gamma$ , los PBLs se cultivaron en las mismas condiciones que en el ensayo de proliferación. Tras 6 días, el contenido de IFN- $\gamma$  intracelular se determinó por citometría de flujo. Los gráficos (B) representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes, tanto para la subpoblación CD4<sup>+</sup> como para la CD8<sup>+</sup>. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada condición con el control positivo ( $* p \leq 0.05$ ). Debajo, se muestran los gráficos de puntos representativos para cada condición. El número de los cuadrantes indica el porcentaje de células positivas para IFN- $\gamma$ .

Por último, se realizó un ensayo para determinar el papel inmunomodulador de las mallas recubiertas en relación con la polarización de macrófagos, una de las células más importantes implicadas en la reacción inflamatoria producida comúnmente tras la implantación de mallas quirúrgicas convencionales. Para ello, se realizó un cultivo celular de la línea U937, las cuales se diferenciaron hacia macrófagos y estimularon con forbol-miristato-acetato (*Phorbol Myristate Acetate*, PMA) y lipopolisacárido (*Lipopolysaccharide*, LPS) y se cocultivaron con las mallas recubiertas. Como control negativo se utilizaron células de la línea U937 sin diferenciar ni estimular y como control positivo, se utilizaron células diferenciadas y estimuladas en cocultivo con mallas convencionales. También se incluyó en el estudio un control de MSCs en condiciones de cultivo estándar, en el que se cocultivaron estas con las células U937 diferenciadas y estimuladas. Tras tres días, las U937 se analizaron por citometría de flujo utilizando CD86 como marcador del fenotipo M1 y CD206 como marcador del fenotipo M2. Como se muestra en la Figura 13, las mallas recubiertas disminuyeron significativamente el porcentaje de células positivas para CD86 e incrementaron el de células con expresión de CD206, en comparación con las mallas sin recubrir, en las que puede apreciarse claramente una polarización de macrófagos hacia fenotipo M1, que consigue ser revertida tanto por las MSCs en condiciones de cultivo estándar como por las mallas recubiertas por las mismas.



**Figura 13. Polarización fenotípica de las células U937 diferenciadas a macrófagos y cultivadas en presencia de mallas recubiertas con MSCs.** Las U937 fueron diferenciadas y activadas *in vitro* con PMA y LPS, y cultivadas en presencia de mallas recubiertas con MSCs y mallas convencionales. Como control negativo, se utilizaron U937 sin diferenciar ni activar (basal); como control positivo, U937 diferenciadas y activadas, sin mallas. El fenotipo se determinó tras 6 días de cultivo mediante citometría de flujo, usando CD86 como marcador de fenotipo M1 y CD206 como marcador de fenotipo M2. Los gráficos (A) representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples, seguida de una prueba U de Mann-Whitney comparando los grupos dos a dos (\*  $p \leq 0.05$  con respecto al control sin estimular o entre los grupos indicados por la línea;  $\nabla \leq 0.05$  con respecto al control sin mallas). A la derecha (B) se muestran los histogramas representativos de cada condición.

## Estudio de los aspectos de seguridad relacionados con la implantación de las mallas recubiertas con MSCs

Teniendo en cuenta que la seguridad es uno de los principales aspectos a considerar a la hora de aplicar la terapia celular, nuestro primer ensayo *in vivo* fue encaminado a determinar los posibles efectos adversos tras la implantación de las mallas recubiertas con MSCs. Para este estudio, se utilizaron mallas quirúrgicas recubiertas con MSCs derivadas de médula ósea murina. Como control, se utilizaron mallas convencionales sin recubrir. El material quirúrgico se implantó en el espacio subcu-

táneo de la región abdominal de ratones ICR (n=16). Transcurrida una semana tras esta implantación, se tomaron muestras de sangre de los animales y seguidamente fueron eutanasiados. Para el estudio de seguridad se realizaron determinaciones hematológicas, evaluación a través de un sistema de óptica laparoscópica y un análisis por resonancia magnética (RM).

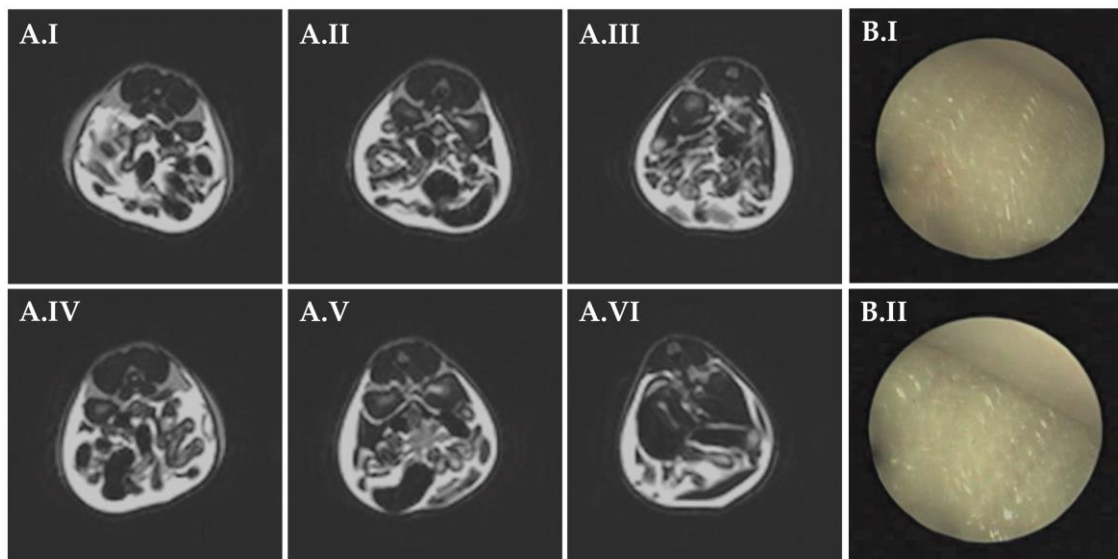
Para determinar si la implantación de las mallas estaba afectando al estado general de los animales, se realizó un análisis hematológico completo a partir de las muestras sanguíneas tomadas previamente a la eutanasia. Ninguno de los parámetros estudiados presentó alteraciones significativas en los animales con mallas recubiertas con MSCs en comparación con el grupo control (Tabla 1).

**Tabla 1. Parámetros hematológicos medidos 7 días tras la implantación de las mallas.** Los valores representan la media  $\pm$  SD de cada grupo (n=3).

PARÁMETRO (UNIDADES)	Mallas control	Mallas recubiertas con MSCs
WBC ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	8.22 $\pm$ 3.18	5.94 $\pm$ 2.52
RBC ( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	5.99 $\pm$ 1.43	4.87 $\pm$ 0.55
HGB (g/dl)	10.03 $\pm$ 2.06	8.57 $\pm$ 0.99
HCT (%)	31.50 $\pm$ 6.46	27.80 $\pm$ 2.19
VCM (fl)	52.90 $\pm$ 2.25	57.43 $\pm$ 4.93
HCM (pg)	16.87 $\pm$ 0.85	17.63 $\pm$ 1.22
CHCM (g/dl)	31.83 $\pm$ 0.42	30.77 $\pm$ 1.22
ADE – CV (%)	13.77 $\pm$ 0.92	16.93 $\pm$ 5.39
ADE – SD (fl)	30.57 $\pm$ 1.98	41.40 $\pm$ 16.75
Plaquetas ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	1167.33 $\pm$ 238.54	1324.67 $\pm$ 166.18
VPM (fl)	4.70 $\pm$ 0.20	4.83 $\pm$ 0.12
ADP	14.53 $\pm$ 0.06	14.63 $\pm$ 0.15
PCT (%)	0.55 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.06
Ratio CD4/CD8	1.73 $\pm$ 0.35	1.9 $\pm$ 0.49

WBC: Recuento leucocitario; RBC: Recuento eritrocitario; HGB: hemoglobina; HCT: hematocrito; VCM: Volumen Corpuscular Medio; HCM: Hemoglobina Corpuscular Media; CHCM: Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media; ADE: Amplitud de Distribución de Eritrocitos; CV: coeficiente de variación; SD: desviación estándar; VPM: Volumen Plaquetario Medio; ADP: Amplitud de Distribución Plaquetaria; PCT: plaquetocrito.

La evaluación macroscópica de la implantación se realizó mediante una observación a través de un sistema de óptica laparoscópica y un análisis por RM en el día 7 tras la implantación de las mallas. Aunque el uso de modelo de animal pequeño dificulta la interpretación de los resultados obtenidos por RM, esta evaluación mostró un aspecto anatómico normal sin signos de efusión o inflamación en la zona de la implantación (Figura 14A). En la observación por sistema óptico de laparoscopia se prestó especial atención a la evaluación de posibles adherencias. Como se muestra en la Figura 14B, las imágenes obtenidas no presentaron alteraciones importantes.



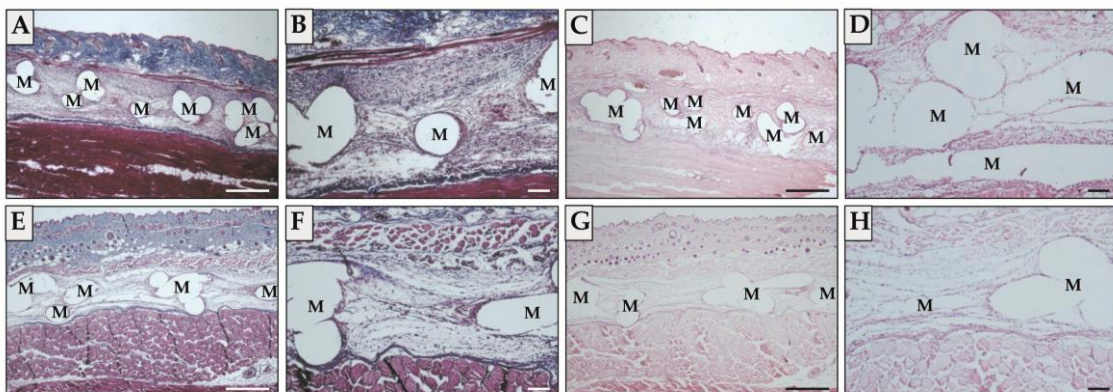
**Figura 14. Evaluación de la implantación de las mallas recubiertas con MSCs por RM y sistema óptico de laparoscopia.** Siete días tras la implantación de las mallas en el espacio subcutáneo de la zona abdominal de los ratones, se realizó una evaluación macroscópica de la implantación mediante un análisis por RM y una observación a través de un sistema de óptica laparoscópica. La figura muestra las imágenes de RM (A) de animales en los que se implantaron mallas convencionales (A.I-A.III) y mallas recubiertas con MSCs (A.IV-A.VI). A.I y A.IV corresponden a secciones proximales de la cavidad abdominal; A.II y A.V, a secciones de la zona media del abdomen y A.III y A.VI, a secciones de la zona distal del abdomen. También se muestran las imágenes obtenidas a partir del examen mediante sistema óptico de laparoscopia (B) en animales en los que se implantaron mallas convencionales (B.I) y mallas recubiertas con MSCs (B.II).



### Estudio *in vivo*: evaluación histológica de la implantación de mallas recubiertas con MSCs

El estudio histológico se realizó en la zona compuesta por la piel, malla, músculo y peritoneo de los animales en el día 7 tras la implantación. Se utilizaron las tinciones hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson.

La comparación entre los tejidos provenientes de animales en los que se implantaron mallas convencionales frente a aquellos con malla recubierta con MSCs no reveló evidencias histológicas de inflamación, necrosis, hemorragia o neovascularización en el sitio de implantación. Tampoco se encontraron cambios notables en los depósitos de colágeno en torno al material inerte. Por último, sí se apreciaron ligeras diferencias en la densidad de las células adheridas a las mallas implantadas, siendo menor en los animales en los que se implantaron mallas recubiertas con MSCs (Figura 15).



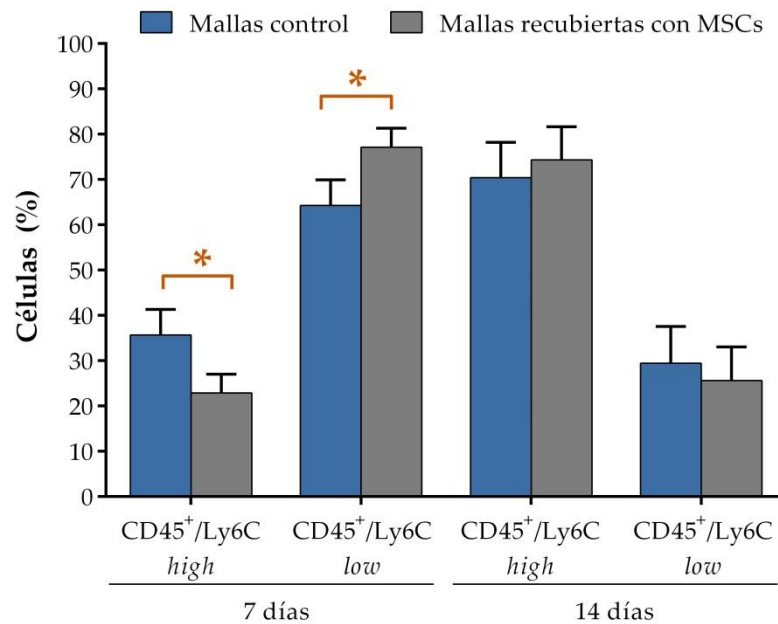
**Figura 15. Evaluación histológica del sitio de implantación de las mallas quirúrgicas.** Siete días tras la implantación de las mallas, la capa compuesta por piel, malla, músculo y peritoneo de los animales con mallas convencionales y mallas recubiertas con MSCs se procesó para su examen histológico. La figura muestra las imágenes microscópicas de los diferentes cortes histológicos teñidos con tricrómico de Masson (A, B, E y F) y hematoxilina-eosina (C, D, G y H), tanto de animales con mallas convencionales (A-D) como con mallas recubiertas con MSCs (E-H). Las imágenes se obtuvieron con magnificaciones de 4X (A, C, E y G) y 10X (B, D, F y H). Escalas: 500  $\mu$ m y 100  $\mu$ m para 4X y 10X, respectivamente. "M" indica la localización de las fibras de la malla.



## **Estudio *in vivo*: distribución fenotípica de los macrófagos en el sitio de implantación de mallas recubiertas con MSCs**

La presencia de macrófagos infiltrados en el sitio de implantación de las mallas quirúrgicas se determinó por citometría de flujo en los días 7 y 30 tras la implantación, utilizando anticuerpos monoclonales murinos frente a CD45 y Ly6C. En primer lugar, las células fueron seleccionadas en función de su tamaño y complejidad (FSC/SSC) y de la expresión de CD45, seleccionando así la población correspondiente a macrófagos. La expresión de Ly6C nos permitió identificar las diferentes subpoblaciones. Así, las células con alta densidad de expresión de Ly6C (*Ly6C high*) corresponderían al fenotipo M1 proinflamatorio, mientras que las de baja densidad de expresión (*Ly6C low*) corresponderían a los macrófagos con fenotipo M2 antiinflamatorio.

Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en la distribución fenotípica de los macrófagos a día 7 entre los animales en los que se implantaron mallas convencionales y aquellos con mallas recubiertas con MSCs. En concreto, se observó una disminución en el porcentaje de macrófagos CD45<sup>+</sup>/*Ly6C high* y un incremento en el porcentaje de los CD45<sup>+</sup>/*Ly6C low* en el grupo de mallas recubiertas con MSCs, con respecto al grupo en el que se implantaron mallas convencionales, siendo ambos cambios estadísticamente significativos (Figura 16). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a día 30.

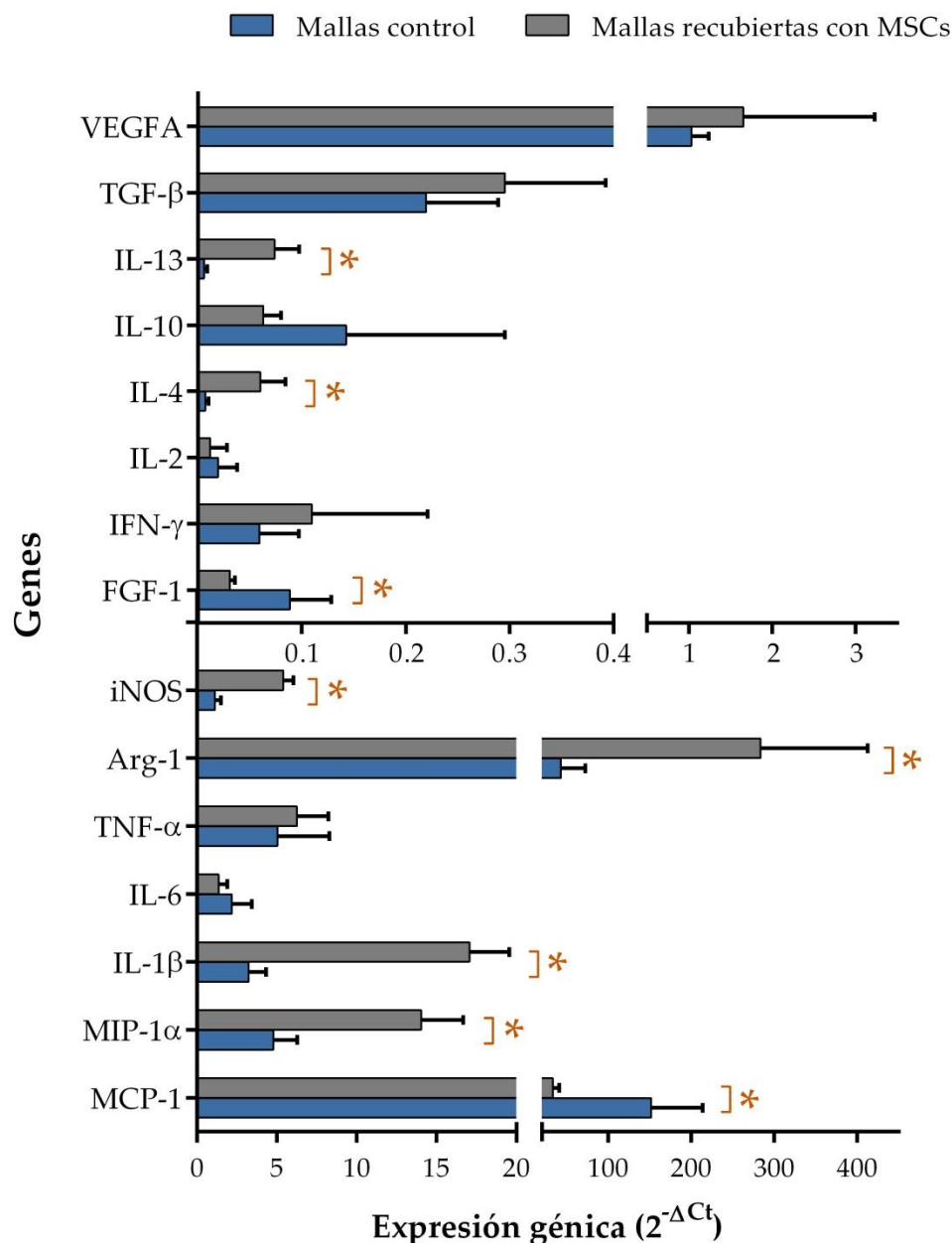


**Figura 16. Fenotipo de los macrófagos en el lugar de implantación de las mallas.** Tras la retirada de las mallas a los días 7 y 30 después de su implantación, las células se despegaron de las mismas mediante una solución de tripsina para su análisis por citometría de flujo utilizando los marcadores CD45 y Ly6C. El gráfico representa la coexpresión de ambos marcadores, distinguiéndose dos poblaciones: CD45<sup>+</sup>/Ly6C *high* (macrófagos con fenotipo M1) y CD45<sup>+</sup>/Ly6C *low* (macrófagos con fenotipo M2). Los valores representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada subpoblación entre los animales con mallas convencionales y aquellos en los que se implantaron mallas recubiertas (\*  $p \leq 0.05$ ).

### Estudio *in vivo*: análisis de expresión de genes relacionados con inflamación en el sitio de implantación de mallas recubiertas con MSCs

El estudio de expresión génica por qRT-PCR se realizó a partir del ARN total aislado de las células que se encontraban adheridas a las mallas tras ser retiradas 7 días después de su implantación. Este ensayo fue realizado por el Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia de la Unidad de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura. Como se muestra en la Figura 17, los resultados obtenidos del análisis transcripcional revelaron un incremento significativo en la expresión de la proteína inflamatoria de macrófagos-1 alfa (*Macrophage Inflammatory Protein-1 alpha*, MIP-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, arginasa-1 (Arg-1) y óxido nítrico sintasa inducible (*inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS), así como una disminución en la expresión de la proteína quimiotáctica de monocitos (*Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCP-1) y FGF-1, en los animales con mallas recubiertas con células, en comparación con los

animales en los que se implantaron mallas convencionales. No se encontraron diferencias significativas en el resto de genes estudiados (IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  y VEGFA).



**Figura 17. Expresión génica de factores solubles relacionados con la inflamación en las células adheridas a las mallas tras su implantación.** Siete días tras la implantación de las mallas, estas fueron retiradas y se aisló el ARN total de las células adheridas a las mismas. Se realizó una qRT-PCR de un panel de genes relacionados con la inflamación. Los productos de qRT-PCR se cuantificaron mediante la expresión  $2^{-\Delta C_t}$  utilizando GADPH como gen de referencia. El gráfico representa la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando la expresión de cada gen entre los animales con mallas convencionales y aquellos en los que se implantaron mallas recubiertas (\*  $p \leq 0.05$ ).

## BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR

---

En este segundo bloque se presentan los resultados relacionados con el objetivo II, relativo al estudio de la ruta intrapericárdica como vía de administración de células madre en terapia celular cardiovascular. Para este trabajo, se realizó un primer ensayo *in vivo* con el fin de estudiar la seguridad y distribución de MSCs tras su administración intrapericárdica en un modelo porcino. Asimismo, se llevó a cabo un segundo ensayo *in vivo* para estudiar el efecto de la inyección intrapericárdica de células en un modelo porcino de infarto de miocardio, esta vez en términos de inmunomodulación. En este último ensayo, se optó por utilizar un tipo celular más específico obtenido a partir de células madre residentes cardíacas, el cual está arrojando resultados prometedores en diferentes ensayos clínicos llevados a cabo en los últimos años.

### **II.A. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y BIODISTRIBUCIÓN DE MSCs ADMINISTRADAS POR VÍA INTRAPERICÁRDICA EN MODELO PORCINO**

En el presente apartado se presentan los resultados en relación con el objetivo II.A. Para analizar la seguridad y el patrón de distribución *in vivo* de las MSCs administradas por vía intrapericárdica, se realizó un ensayo en modelo de animal grande (n=4). Cada uno de los cuatro animales recibió una dosis de  $100 \times 10^6$  células. Esta inyección se realizó por toracotomía en el espacio pericárdico 7 días después de la inducción del infarto, en el caso de animales sometidos a dicho procedimiento. La biodistribución de las células se analizó mediante RM, PCR e histología.

## **Evaluación de la viabilidad, actividad metabólica y fenotipo celular en presencia de líquido pericárdico**

Para este trabajo, se realizó una primera aproximación *in vitro* encaminada a evaluar el efecto del líquido pericárdico o LP en los cultivos celulares. Dado que este fluido sería el medio en el que las células se encontrarían tras su administración, es de gran importancia comprobar que se trata de un medio adecuada para las mismas.

En primer lugar, se realizó una aproximación inicial *in vitro* consistente en una comparativa entre la composición bioquímica del LP y el plasma de origen porcino. A continuación, se cultivaron las pBM-MSCs en presencia de diferentes concentraciones de LP (10, 25, 50, 75 y 100 %) y se estudiaron la viabilidad, capacidad de proliferación y fenotipo de las células en estas condiciones. Como control, se incluyeron pBM-MSCs cultivadas en condiciones estándar (10 % FBS).

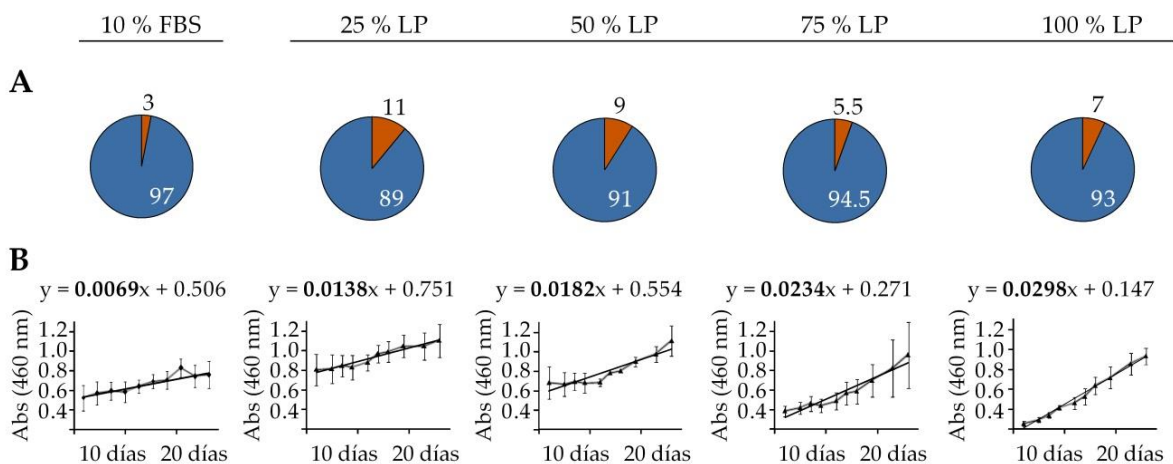
En cuanto al análisis bioquímico del LP comparado con el plasma sanguíneo, los datos obtenidos mostraron valores significativamente menores de colesterol, fósforo, triglicéridos y proteínas totales en LP, mientras que el resto de los parámetros analizados mostró valores similares en ambos fluidos (Tabla 2).

El estudio de viabilidad celular de las MSCs en presencia de LP se realizó tras 7 días de cultivo mediante la técnica de tinción por exclusión de azul de tripano en un contador automático. Los resultados arrojaron valores de viabilidad similares en todas las condiciones, sin diferencias significativas entre el grupo control y los cultivos en presencia de diferentes concentraciones de LP (Figura 18A).

Las diferentes concentraciones de LP tampoco afectaron a la tasa de proliferación, que fue medida durante 26 días mediante la técnica del CCK-8. Es más, los resultados apuntan un ligero aumento —no significativo— de la proliferación celular proporcional a la concentración de LP, que se refleja en el valor creciente de la pendiente de la línea de tendencia de la gráfica a concentraciones crecientes de LP (Figura 18B).

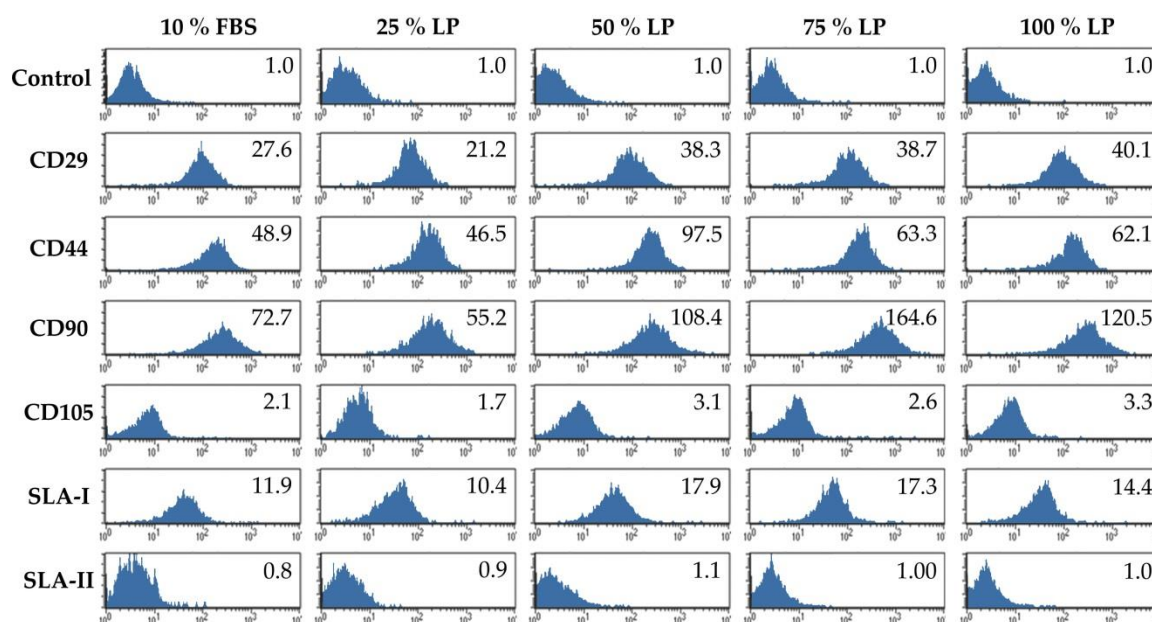
**Tabla 2. Análisis bioquímico de líquido pericárdico y plasma.** Los valores representan la media  $\pm$  SD de cada grupo (n=3). \* $p \leq 0.05$ .

PARÁMETRO (UNIDADES)	Líquido pericárdico	Plasma
Bilirrubina total (mg/dl)	0.03 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.11
Calcio (mg/dl)	7.87 $\pm$ 2.12	11.47 $\pm$ 1.33
Colesterol (mg/dl) *	4.00 $\pm$ 1.00	81.00 $\pm$ 8.66
Creatinina (mg/dl)	2.20 $\pm$ 0.07	2.24 $\pm$ 0.09
Glucosa (mg/dl)	86.67 $\pm$ 3.21	82.67 $\pm$ 13.05
Fósforo (mg/dl) *	5.47 $\pm$ 1.36	6.49 $\pm$ 1.03
Proteína total (g/dl) *	0.95 $\pm$ 0.29	5.82 $\pm$ 0.65
Triglicéridos (mg/dl) *	14.33 $\pm$ 5.51	88.67 $\pm$ 38.55
Urea (mg/dl)	18.03 $\pm$ 2.96	20.20 $\pm$ 2.95



**Figura 18. Viabilidad y proliferación celular de las pBM-MSCs cultivadas en presencia de LP.** Las pBM-MSCs se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de LP (25, 50, 75 y 100%) procedente de tres animales sanos. Como control, se utilizaron células en condiciones de cultivo estándar, con 10 % FBS. El porcentaje de células viables se determinó tras 7 días de cultivo mediante la técnica de tinción por exclusión de azul de tripano en un contador automático. Los gráficos superiores (A) representan los porcentajes medios de células viables y no viables en cada una de las condiciones. La proliferación celular se cuantificó mediante la técnica del CCK-8 durante 26 días, realizando medidas cada 2-3 días. Los gráficos inferiores (B) muestran la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Las pendientes de las líneas de tendencia corresponden a la tasa de proliferación celular. Los resultados de absorbancia se analizaron mediante un ANOVA, comparando todos los grupos para cada punto de tiempo.

Por último, el fenotipo de las células cultivadas durante 7 días en las diferentes condiciones se analizó mediante citometría de flujo. Como se aprecia en la Figura 19, el perfil de expresión de los marcadores analizados en los diferentes grupos es similar, no encontrándose diferencias importantes en ninguno de ellos. Este ensayo también se llevó a cabo, con idéntico resultado, tras 14 días de cultivo (datos no mostrados).



**Figura 19. Análisis fenotípico de las pBM-MSCs cultivadas en presencia de LP.** La caracterización fenotípica se realizó mediante citometría de flujo multicolor. Se compararon los perfiles fenotípicos de las MSCs en condiciones de cultivo estándar (10 % FBS) con las cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de LP. En la figura se muestran los histogramas representativos de cada condición, junto con los niveles de expresión de cada marcador. El nivel de expresión se representa como MRFI, calculado mediante la división de la MFI por su control negativo.

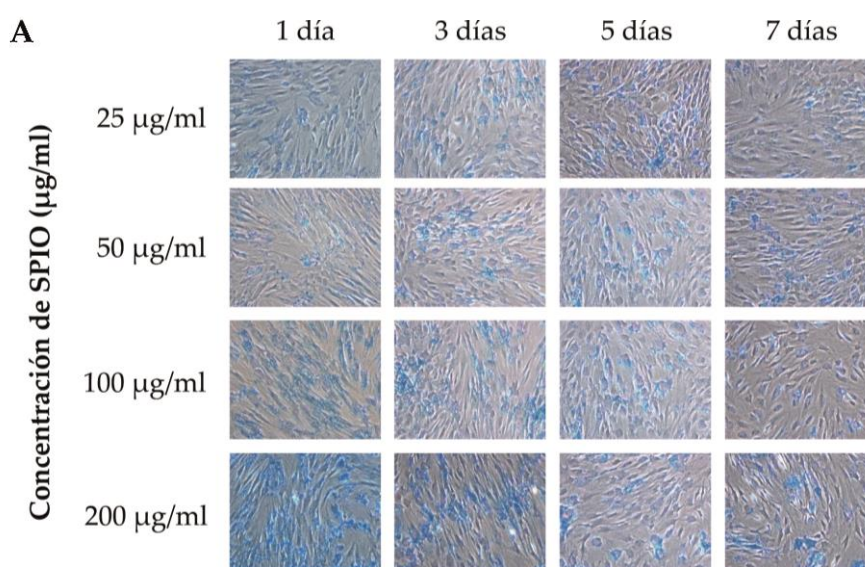
### **Optimización del marcaje de las MSCs para su localización mediante resonancia magnética**

El Endorem® es un producto que incorpora en su formulación partículas de óxido de hierro superparamagnético (*superparamagnetic iron oxide*, SPIO), las cuales pueden ser internalizadas fácilmente por las MSCs mediante endocitosis. Estas partículas son de gran utilidad para el seguimiento celular *in vivo* utilizando técnicas de RM, pues proporcionan una señal óptima que permite su localización.

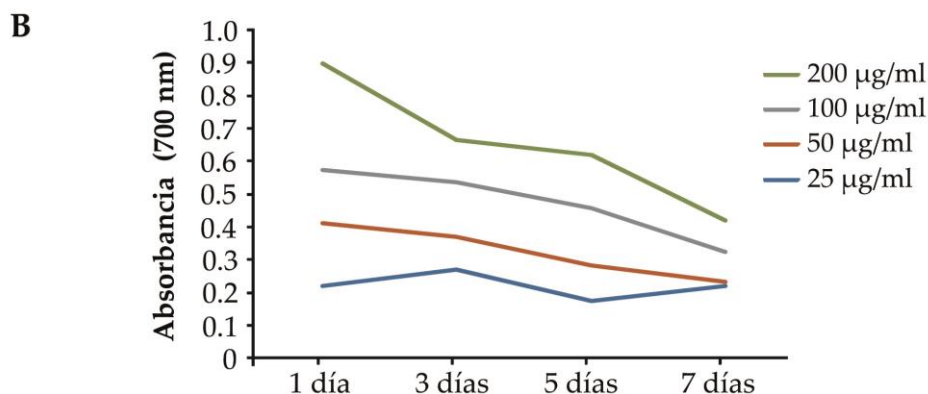


Antes de realizar el ensayo *in vivo*, se realizó un primer estudio *in vitro* para definir la dosis óptima de SPIO para el marcaje de las células. Para ello, las MSCs se incubaron durante 7 días con concentraciones finales de SPIO de 25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . El contenido de SPIO intracelular se determinó tras 1, 3, 5 y 7 días de cultivo mediante tinción con azul de Prusia sobre las células previamente lavadas y fijadas. Esta tinción se basa en la detección de iones férricos generados con ácido clorhídrico, los cuales se hacen reaccionar con ferrocianuro de potasio, generándose ferrocianuro férrico (o azul de Prusia), con coloración azul visible con microscopía óptica. Además de la observación por microscopía, el contenido celular en azul de Prusia se cuantificó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 700 nm en los extractos celulares previamente lisados.

En la Figura 20 se muestran tanto las imágenes obtenidas por microscopía tras la tinción (Figura 20A) como los valores de absorbancia para los diferentes grupos (Figura 20B). Estos resultados evidencian que la internalización de SPIO se incrementa proporcionalmente a la concentración de estas partículas en el medio, y decrece con el tiempo como consecuencia de su liberación exocítica. Estos datos de absorbancia sugieren que, para un seguimiento *in vivo* preciso de las células marcadas, la RM debería realizarse a los 7 días como máximo y empleando una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Así, para su administración, las células se marcaron con 100  $\mu\text{g/ml}$  de SPIO 24 h previamente a la inyección.







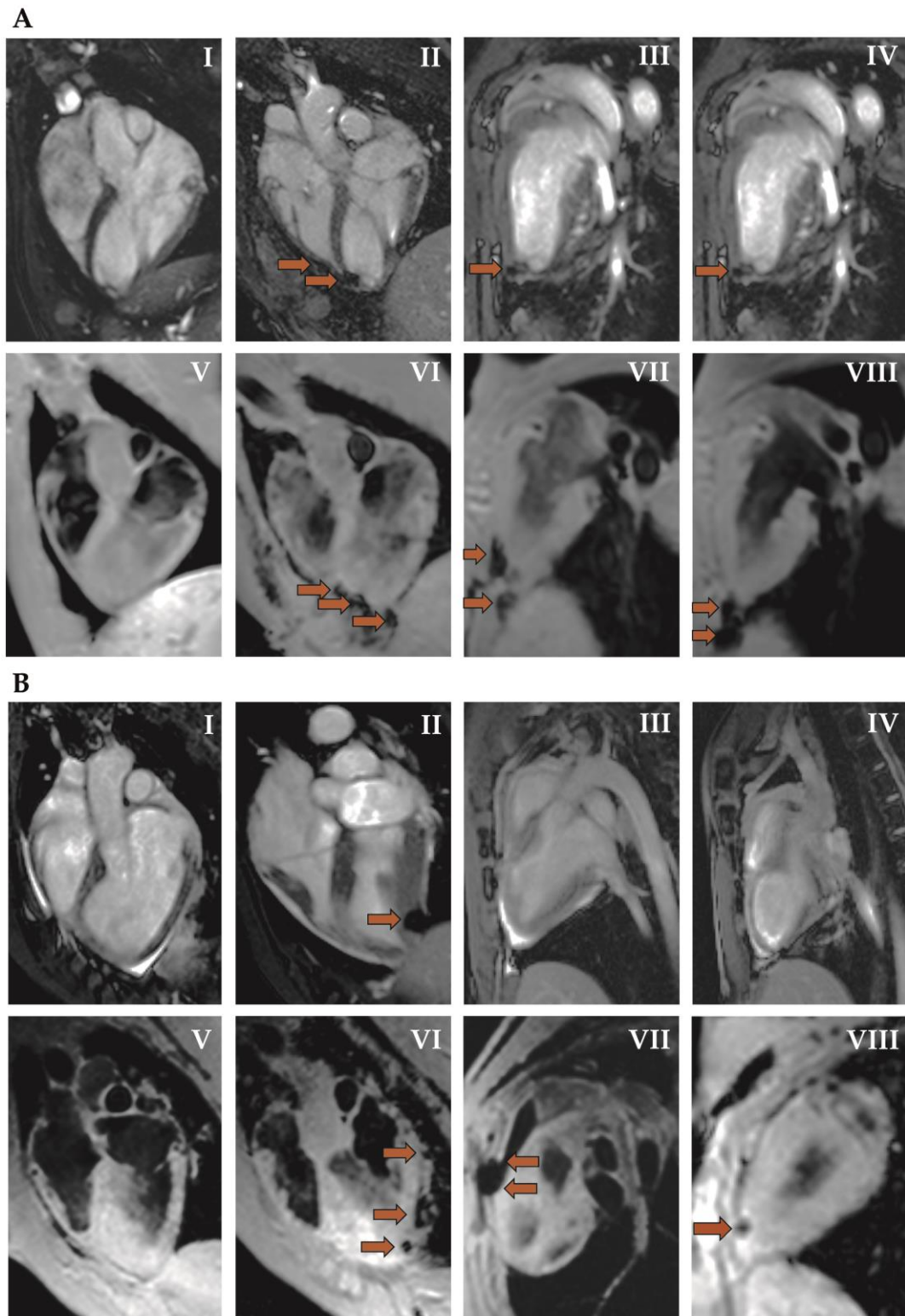
**Figura 20. Optimización del marcaje con SPIO.** Las pBM-MSCs se marcaron con diferentes concentraciones de SPIO. Las partículas internalizadas por las células se detectaron mediante una tinción de azul de Prusia. Las imágenes de microscopía (A) muestran las células marcadas con diferentes concentraciones de SPIO durante diferentes tiempos y teñidas. La tinción de azul de Prusia se cuantificó por espectrofotometría tras lisar las células. El gráfico (B) muestra el contenido en SPIO de las células con los diferentes marcajes a lo largo del tiempo.

### Localización mediante resonancia magnética de las MSCs administradas por vía intrapericárdica

El seguimiento *in vivo* de las células marcadas con SPIO y administradas en el espacio intrapericárdico se realizó mediante un estudio por RM a diferentes tiempos.

Las imágenes obtenidas evidenciaron que la distribución celular en los animales sometidos previamente a infarto de miocardio se concentra en pequeñas áreas del ventrículo izquierdo (Figura 21A y vídeos S1 y S2 disponibles en <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0122377>). En cambio, en animales sanos, aunque también se localizan preferentemente en la zona correspondiente al ventrículo izquierdo, la localización es más difusa que en el caso de corazones sometidos a infarto (Figura 21B y vídeos S3 y S4 disponibles en <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371%2Fjournal.pone.0122377>).

Es importante resaltar en este punto que, debido a la sensibilidad limitada de la RM, no es posible descartar la presencia de las células administradas en otras localizaciones cardiacas. Por ello, para realizar una detección más precisa de las células administradas, este estudio se complementó con análisis histológicos y moleculares que fueron realizados tras la eutanasia de los animales.



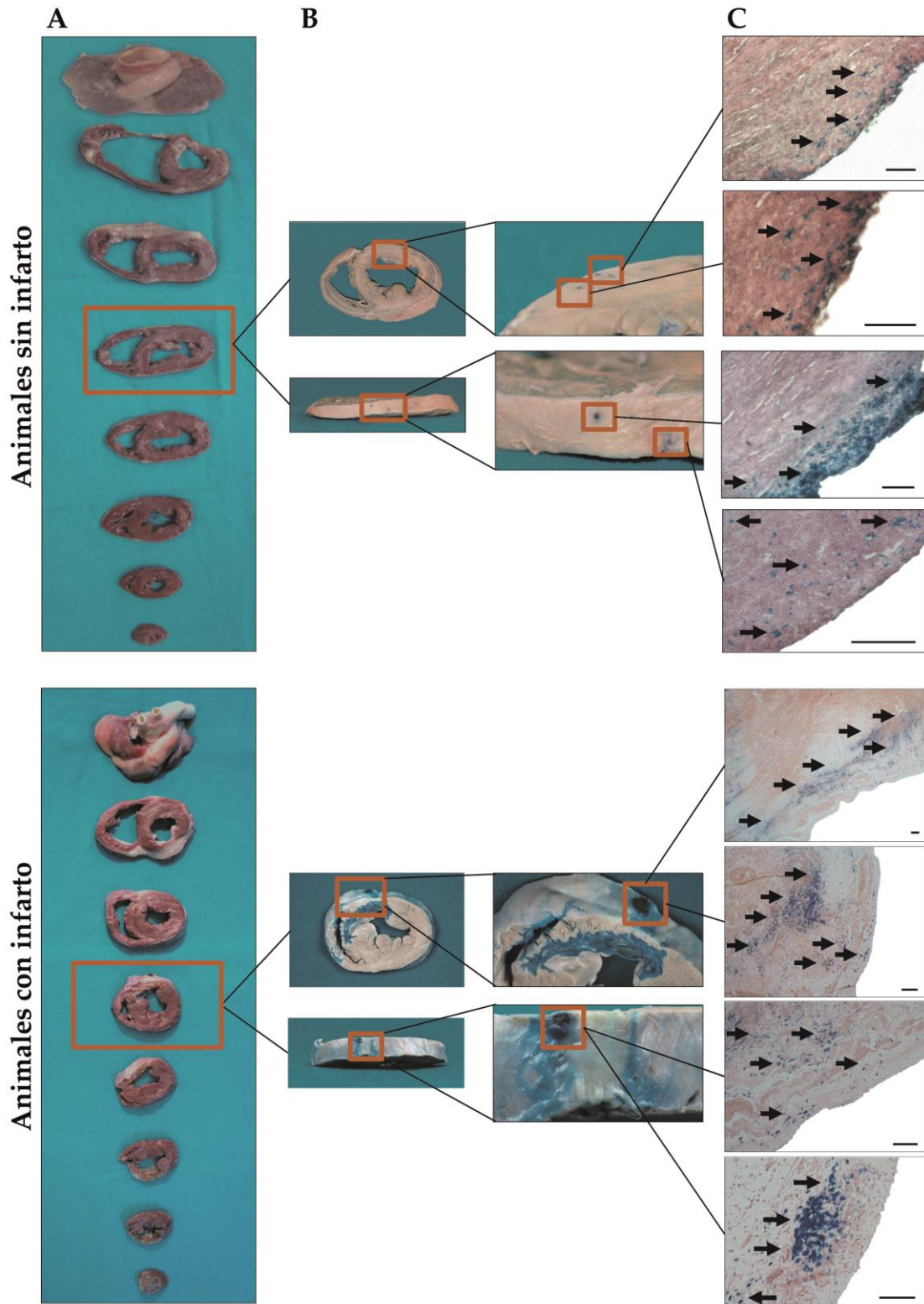
**Figura 21.** Seguimiento *in vivo* mediante RM de las células administradas por vía intrapericárdica. Se inyectó un total de  $100 \times 10^6$  células en el espacio pericárdico de cerdos *Large White*. El examen mediante RM se realizó en un equipo de 1.5 T. La figura muestra las imágenes de la evaluación mediante RM de animales sanos (A) y animales con infarto (B), tanto antes de la inyección (I y V) como tres días después (II-IV y VI-VIII). Las imágenes muestran secuencias obtenidas en modo cine (I-IV) y secuencias potenciadas en T2\* (V-VIII). Las flechas indican la localización de las partículas de hierro superparamagnético.

## **Examen macroscópico y localización histológica de las MSCs administradas por vía intrapericárdica**

Los animales fueron eutanasiados 7 días tras la inyección de células. En primer lugar, se realizó un examen *in situ* del corazón y los tejidos adyacentes. Se llevó a cabo una inspección visual focalizada en la detección de posibles complicaciones asociadas a los procedimientos y de daños potenciales en el pericardio, epicardio y en las estructuras adyacentes del mediastino. Esta inspección evidenció una conformación normal de los tejidos, con algunas pequeñas adherencias pericárdicas a la pared torácica debidas a la propia intervención e independientes del tratamiento.

A continuación, se aspiró el líquido pericárdico y se comenzó con la toma de muestras para histología y análisis moleculares. El volumen y la apariencia del líquido pericárdico fueron normales, indicando la ausencia de pericarditis. Su análisis bioquímico no reveló cambios significativos en ninguno de los parámetros estudiados con respecto al análisis realizado antes de la inyección celular. Por último, se extrajeron el pericardio y el corazón, realizando una evaluación macroscópica de los mismos en la que no se encontraron alteraciones importantes.

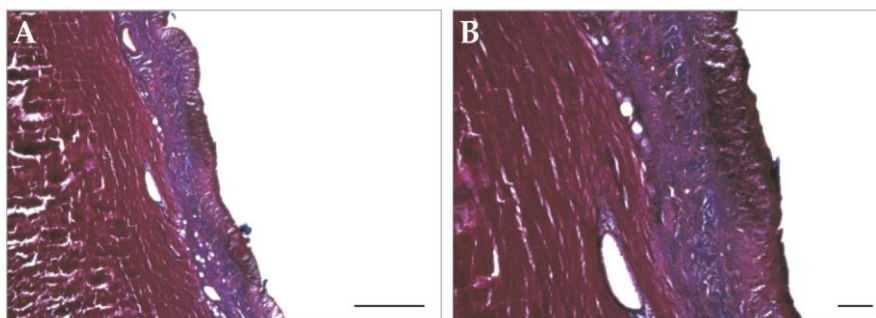
Para los estudios de histología y moleculares, cada corazón fue dividido en varias secciones transversales que fueron fijadas y se realizó una tinción de azul de Prusia para la localización histológica de las células administradas. También se llevó a cabo un examen histológico del tejido parafinado con una tinción combinada de azul de Prusia y eosina. Las evaluaciones macroscópica y microscópica de estos tejidos mostraron diferencias en la distribución de las células entre los corazones infartados y no infartados, observándose una localización preferente de las células en el ventrículo izquierdo, con una distribución más difusa en el miocardio no infartado (Figura 22A). Por el contrario, en los animales con infarto la distribución celular apareció confinada en un área más restringida (Figuras 22B). Estos resultados confirman y se corresponden con la localización celular mediante RM.



**Figura 22. Detección macroscópica e histológica de las células marcadas con SPIO.** Pasados 7 días tras la inyección intrapericárdica de células, los corazones se seccionaron en láminas de 1 a 3 cm y se fotografiaron (A). Para la detección macroscópica de las células, las láminas se fijaron en formaldehído y se realizó una tinción de azul de Prusia (B). Finalmente, se prepararon las secciones para histología, utilizando una tinción combinada de azul de prusia y eosina. Las flechas indican la presencia de células marcadas (C). Escala: 100  $\mu$ m.



Por último, se realizó una evaluación histológica del tejido cardiaco con la tinción tricrómica de Masson, que permite visualizar las fibras de colágeno I en azul, además del tejido muscular (rojo) y núcleos celulares (morado-marrón). En las imágenes obtenidas no se encontraron evidencias de remodelación adversa en el tejido (Figura 23).



**Figura 23. Secciones histológicas del ventrículo izquierdo.** Tras 7 días desde la administración intrapericárdica de células, se prepararon secciones histológicas a partir de tejido cardiaco del ventrículo izquierdo, y se tiñieron con tricrómico de Masson para visualizar las deposiciones de colágeno. Los cortes se visualizaron a una magnificación de 4X (A) y 10X (B). Escala: 500  $\mu\text{m}$  y 100  $\mu\text{m}$  para 4X y 10X, respectivamente.

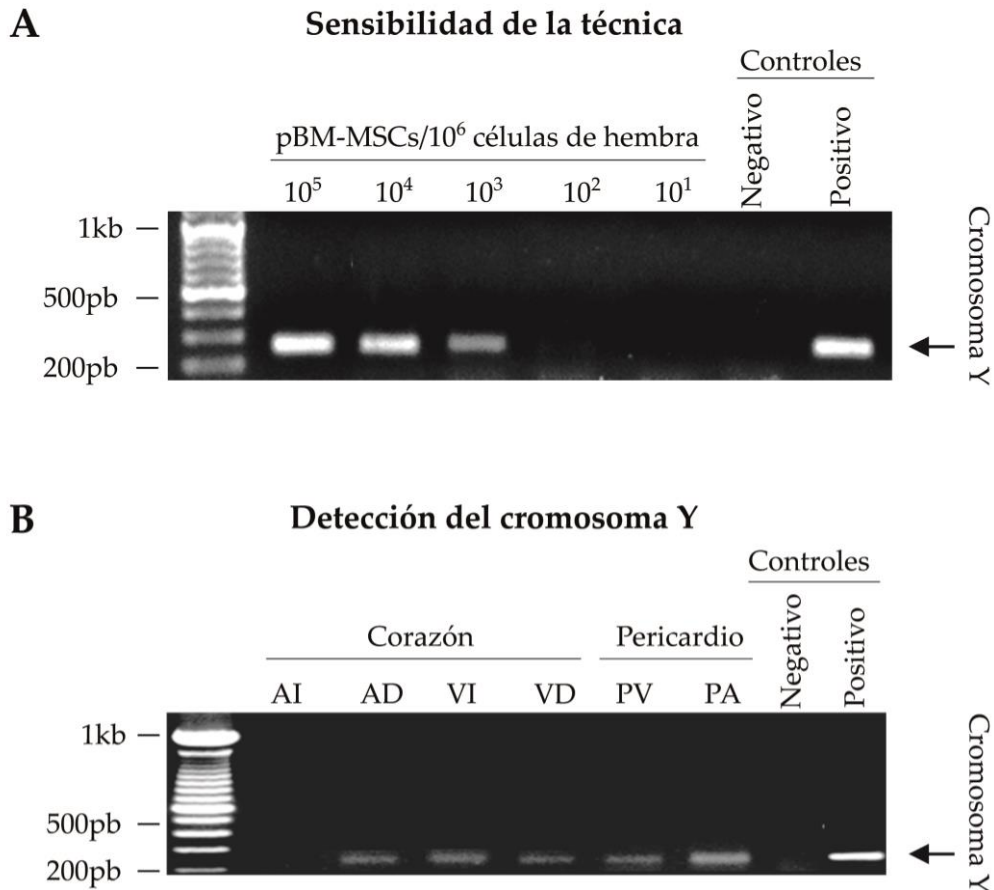
### **Localización mediante detección del cromosoma Y de las MSCs administradas por vía intrapericárdica**

Dado que la tinción de SPIO puede arrojar falsos positivos debido a la presencia de partículas libres, la amplificación del cromosoma Y sirve para confirmar la persistencia de las células tanto en corazón como en pericardio tras 7 días desde su administración.

La detección de las MSCs, procedentes de cerdos machos y administradas por vía intrapericárdica en receptoras hembras, se realizó mediante una PCR en la que se amplificó el cromosoma Y en muestras de tejido de diferentes localizaciones cardíacas y en pericardio.

En primer lugar, para determinar el umbral de detección de la técnica, se realizó un ensayo preliminar utilizando muestras con 10,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  y  $10^5$  células de macho diluidas en un millón de células de hembra. Tras la amplificación por PCR del cromosomas Y, se observó un límite de detección de 100 a 1000 células de macho por cada millón de células de hembra (Figura 24A).

En cuanto a la detección de las células administradas, la Figura 24B muestra que las pBM-MSCs de macho pudieron ser detectadas en las muestras tisulares de ventrículo izquierdo, aurícula derecha y ventrículo derecho, así como en pericardio. Esto confirma la presencia de las células en dichas localizaciones 7 días tras su implantación.



**Figura 24. Detección del cromosoma Y en el tejido cardíaco tras la administración de pBM-MSCs procedentes de donante macho.** Para determinar la sensibilidad de la técnica, se realizó una PCR inicial amplificando el cromosoma Y en muestras con el ADN genómico de un millón de células de hembra y con cantidades decrecientes de células de macho (A). Para la detección del cromosoma Y en el tejido cardíaco de los animales que recibieron las células, se realizó el aislamiento de ADN genómico a partir de diferentes localizaciones del tejido cardíaco, y se llevó a cabo la PCR con cebadores específicos para el cromosoma Y (B). Como controles negativo y positivo, se utilizó ADN genómico de células de hembra y de macho, respectivamente. AI: aurícula izquierda; AD: aurícula derecha; VI: ventrículo izquierdo; VD: ventrículo derecho; PV: pericardio de ventrículo; PA: pericardio aurícula.

## II.B. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERICÁRDICA DE CDCs EN MODELO PORCINO

Una vez estudiados los aspectos de seguridad y biodistribución de las células administradas por vía intrapericárdica, una importante cuestión que quedaba abierta fue si, utilizando esta vía de administración, las células madre podrían mediar un efecto inmunomodulador a nivel local. Para ello, se realizó un segundo ensayo en modelo de infarto crónico en animal grande centrado en la evaluación de distintos parámetros inmunológicos.

Aunque en el primer ensayo *in vivo* se administraron pBM-MSCs, para este estudio elegimos las CDCs debido a los resultados altamente prometedores que estas células están arrojando en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo actualmente. En ellos se están administrando CDCs autólogas o alogénicas en el contexto del infarto de miocardio agudo, tanto tras la realización de bypass coronario (estudio SCIPPIO, NCT00474461) como tras la implantación de *stents* coronarios (estudio CADUCEUS, NCT00893360), así como en casos con patología crónica (estudio DYNAMIC, NCT02293603).

Para este estudio, se emplearon cuatro cerdos de raza *Large White*. Siete semanas tras la creación del modelo de infarto, cada uno de los cuatro animales recibió, mediante toracotomía, una dosis intrapericárdica de  $3 \times 10^5$  CDCs/kg. Cuatro semanas después de la inyección, los animales se eutanasiaron.

Antes de la inyección de CDCs se tomaron muestras de sangre y LP de cada uno de los animales. Este muestreo se repitió previamente a la eutanasia. Se determinó la composición bioquímica y la concentración de diferentes citocinas en plasma y en el sobrenadante de LP después de su centrifugación, mientras que la fracción celular resultante de esta, así como las células blancas sanguíneas, se analizaron mediante citometría de flujo. Por último, se realizó una evaluación de la funcionalidad cardíaca y una caracterización de la zona del infarto mediante RM antes de la administración de las células y en los días 7 y 30 tras la inyección.

Los resultados de este estudio, correspondientes al objetivo II.B, se presentan a continuación.

### **Estudio de las subpoblaciones linfocitarias y sus marcadores de activación en sangre periférica y líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs**

Para comparar el perfil fenotípico de los linfocitos residentes en líquido pericárdico antes de la administración y 30 días después, las células obtenidas tras centrifugar los LP se analizaron mediante citometría de flujo. También se realizó este análisis en los PBLs aislados a partir de las muestras sanguíneas obtenidas previamente a la inyección de CDCs y 30 días después. En este análisis, centramos nuestra atención en la cuantificación de diferentes poblaciones linfocitarias (linfocitos T CD4<sup>+</sup>, linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células NK) y en la expresión de marcadores de activación.

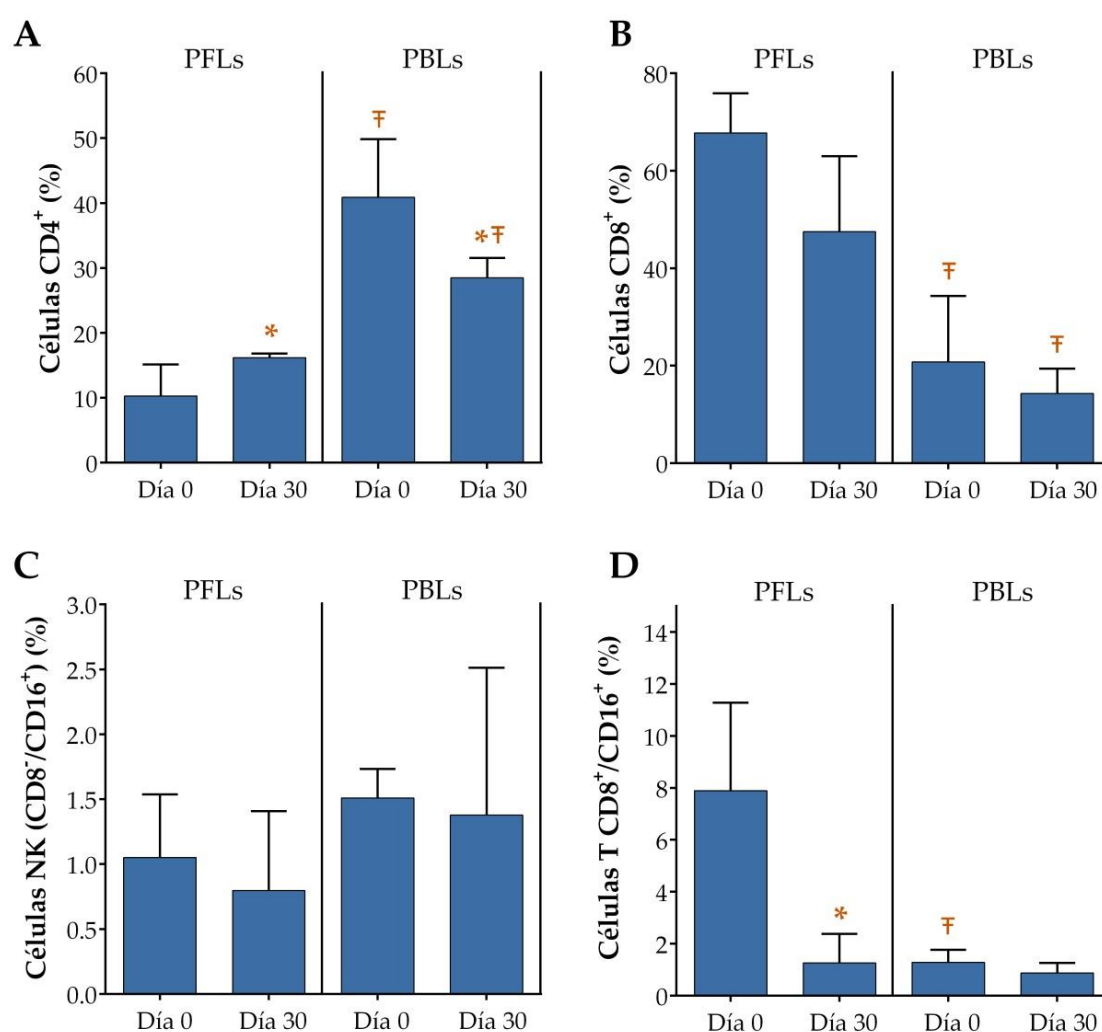
En cuanto al análisis de la subpoblación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, se encontró un aumento significativo de estas células en LP en el día 30 tras la terapia, en comparación con el punto de tiempo inicial. Sin embargo, en sangre periférica el porcentaje de esta población linfocitaria se vio significativamente disminuido a día 30. La comparación estadística en términos de porcentaje de esta subpoblación en LP y sangre periférica mostró diferencias significativas entre los fluidos en los dos puntos de tiempo estudiados, existiendo un mayor porcentaje en sangre periférica (Figura 25A).

El porcentaje de linfocitos T CD8<sup>+</sup> no cambió de forma significativa entre los días 0 y 30. Sin embargo, sí se apreciaron diferencias significativas entre los distintos fluidos, existiendo un mayor porcentaje de estas células en LP (Figura 25B).

Por último, respecto al porcentaje de células NK (CD8<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>), no se apreció ningún cambio significativo entre el día 0 y 30 ni entre los diferentes fluidos (Figura 25C).



El análisis de los marcadores de activación en las poblaciones linfocitarias se centró en la expresión de CD16 en la superficie de células T CD8<sup>+</sup>. Nuestros resultados mostraron que el porcentaje de estas células (CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>) en LP se redujo significativamente tras la administración de CDCs. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en sangre periférica. El elevado porcentaje en LP a día 0 de esta subpoblación no se apreció en sangre periférica, existiendo antes de la inyección de CDCs una diferencia estadísticamente significativa entre ambos fluidos que desaparece a día 30 (Figura 25D).



**Figura 25. Distribución de las diferentes subpoblaciones linfocitarias en LP y sangre periférica.** Los linfocitos del LP y de sangre periférica (PFLs y PBLs, respectivamente) se aislaron antes de la administración de CDCs y 30 días después para el análisis por citometría de flujo. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney comparando los distintos puntos de tiempo para las células procedentes del mismo fluido y las poblaciones de diferentes fluidos en cada punto de tiempo (\*  $p \leq 0.05$  con respecto al día 0; <sup>‡</sup>  $p \leq 0.05$  con respecto al mismo punto de tiempo en PFLs).

### Análisis bioquímico del líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs

Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los líquidos pericárdicos tomados antes de la administración de CDCs y 30 días después fueron analizados para determinar la composición bioquímica de los mismos.

La mayoría de los parámetros analizados no se vieron alterados por la inyección de células, observándose diferencias significativas únicamente en los valores de fosfatasa alcalina, creatinina, gamma-glutamil transferasa (GGT) y proteína total (Tabla 3). Concretamente, se produjo un aumento significativo en los valores de fosfatasa alcalina, creatinina y proteína total, mientras que la GGT arrojó valores menores a los 30 días tras la inyección, en comparación con los valores obtenidos en el análisis realizado antes de la administración.

**Tabla 3. Análisis bioquímico de líquido pericárdico antes y después de la administración intrapericárdica de CDCs.** Los valores representan la media  $\pm$  SD de cada grupo (n=4). \* $p \leq 0.05$ .

PARÁMETRO (UNIDADES)	LP antes de la administración	LP después de la administración
Albúmina (g/dl)	0.84 $\pm$ 0.23	1.09 $\pm$ 0.42
Fosfatasa alcalina (U/l) *	14.00 $\pm$ 5.29	20.67 $\pm$ 6.03
Bilirrubina total (mg/dl)	0.03 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01
Colesterol (mg/dl)	9.67 $\pm$ 4.62	12.33 $\pm$ 6.81
Creatinina (mg/dl) *	1.35 $\pm$ 0.26	1.83 $\pm$ 0.35
GGT (U/l) *	24.33 $\pm$ 10.02	15.33 $\pm$ 6.35
Glucosa (mg/dl)	91.67 $\pm$ 5.77	86.33 $\pm$ 1.53
AST (U/l)	12.33 $\pm$ 2.08	13.33 $\pm$ 8.50
ALT (U/l)	0.00 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.71
Colesterol HDL (mg/dl)	5.17 $\pm$ 1.67	5.73 $\pm$ 1.79
Colesterol LDL (mg/dl)	7.49 $\pm$ 1.81	8.60 $\pm$ 4.14
CRP (mg/l)	0.39 $\pm$ 0.54	0.70 $\pm$ 0.46
Proteína total (g/dl) *	1.73 $\pm$ 0.45	2.18 $\pm$ 0.60
Triglicéridos (mg/dl)	5.00 $\pm$ 2.00	11.67 $\pm$ 8.14
Urea (mg/dl)	17.40 $\pm$ 8.62	22.53 $\pm$ 3.34
Calcio (mg/dl)	4.60 $\pm$ 1.04	5.17 $\pm$ 1.71

GGT:  $\gamma$ -glutamil transpeptidasa; AST: aspartato aminotransferasa; ALT: alanina amino-transferasa; CRP: proteína C reactiva.

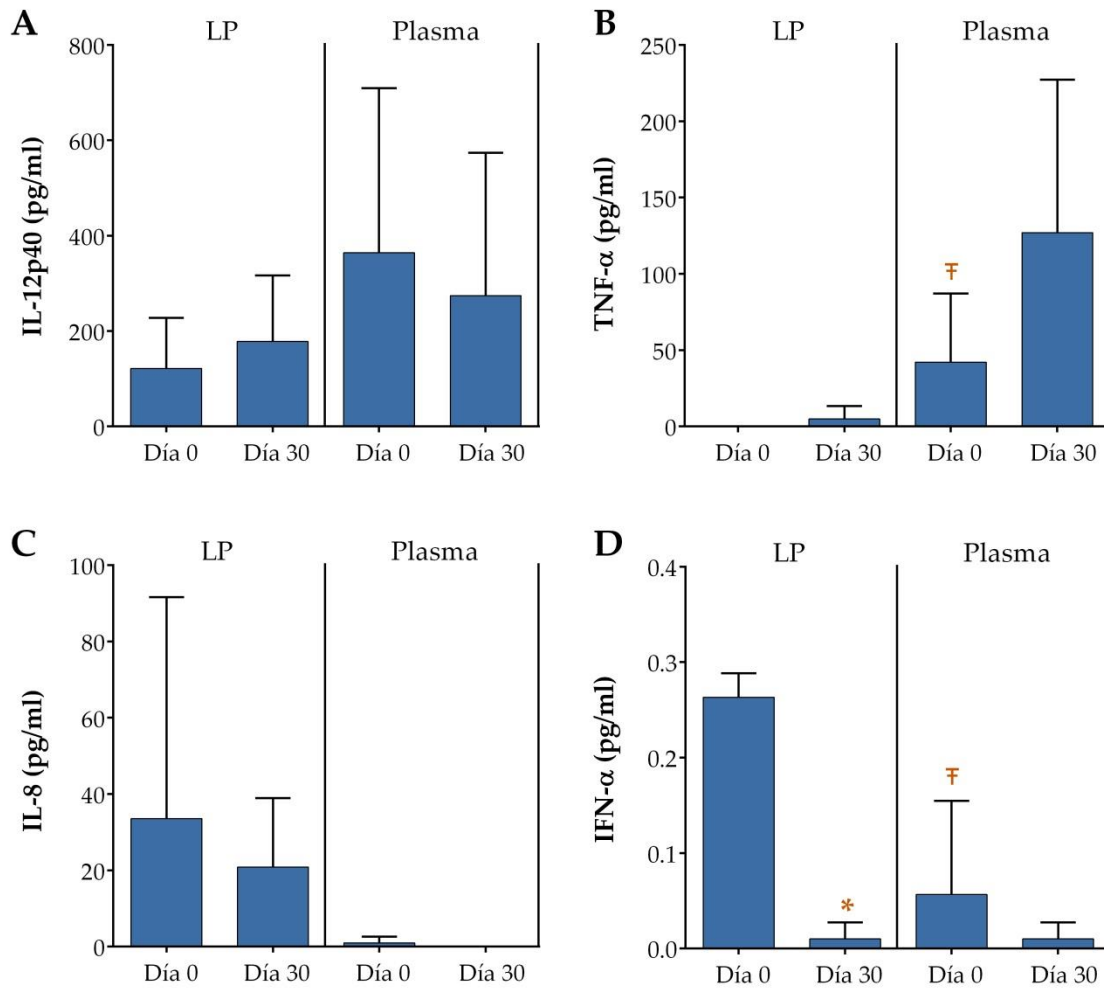
## **Análisis de citocinas en plasma y líquido pericárdico tras la administración intrapericárdica de CDCs**

Los sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación de los líquidos pericárdicos, así como los plasmas, se analizaron mediante tecnología *Luiminex xMAP*, un inmunoensayo en sándwich multiplexado que permite determinar simultáneamente los niveles de diferentes citocinas. Se analizó un panel de citocinas de origen porcino compuesto por IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Este ensayo fue realizado por el Servicio de Técnicas Aplicadas a la Biociencia de la Unidad de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura.

Los resultados mostraron que solamente cuatro de las nueve citocinas fueron detectables mediante esta técnica. La primera de ellas, la IL-12p40, no presentó cambios significativos entre plasma y LP. Sin embargo, en este último se encontró una tendencia a aumentar ( $p=0.06$ ) en el día 30 postinyección, en comparación con el análisis antes de la inyección (Figura 26A).

De manera similar, el TNF- $\alpha$  se encontró de manera más abundante en plasma que en LP a día 0, pero en este caso no se encontraron diferencias entre antes y después de la administración (Figura 26B). Por el contrario, los niveles de IL-8 fueron más elevados en LP, sin apreciarse tampoco cambios entre los diferentes puntos de tiempo (Figura 26C).

Por último, los resultados obtenidos mostraron una diferencia acentuada en los niveles de IFN- $\alpha$  en LP. Concretamente, el nivel de esta citocina se redujo de manera significativa tras la administración de CDCs (Figura 26D).



**Figura 26. Concentración de citocinas en LP y plasma.** La concentración de citocinas se determinó tanto en LP como en plasma antes de la inyección de CDCs y 30 días después, mediante tecnología *Luminex xMAP*. Los gráficos representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba U de Mann-Whitney comparando los distintos puntos de tiempo para un mismo fluido y los diferentes fluidos en cada punto de tiempo (\*  $p \leq 0.05$  con respecto al día 0;  $\nabla p \leq 0.05$  con respecto al mismo punto de tiempo en LP).

### Evaluación de los parámetros de funcionalidad cardíaca tras la administración intrapericárdica de CDCs

Para analizar el posible efecto de la administración de CDCs sobre diferentes parámetros de funcionalidad cardíaca, se realizó un estudio de RM antes de la administración de CDCs y a los 7 y 30 días tras la inyección. Los parámetros analizados fueron el tamaño y masa del infarto, fracción de eyección y volúmenes diastólico y

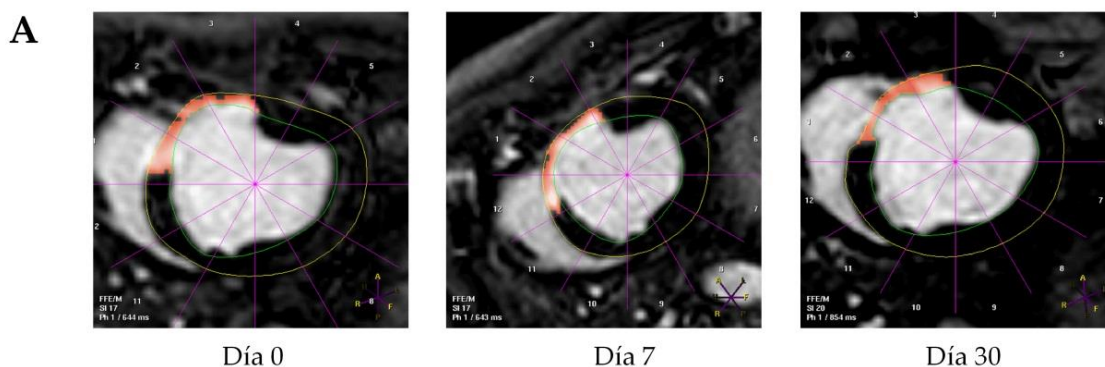
sistólico finales. Para poder realizar una comparación robusta, evitando la interferencia del crecimiento de los animales en los resultados, los datos referentes a los volúmenes se normalizaron en relación a la superficie corporal, utilizando la fórmula descrita por Kelley *et al.* [112].

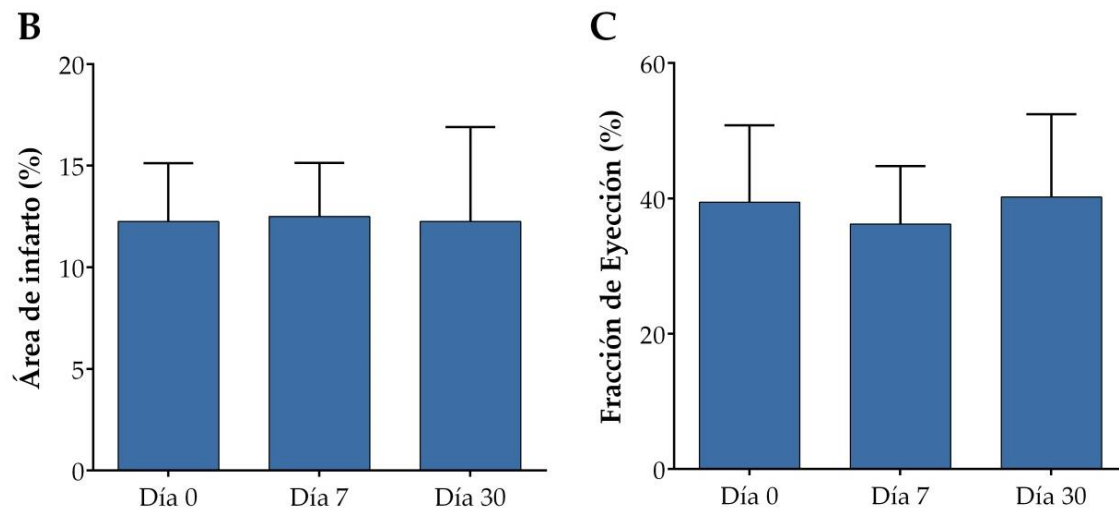
Los resultados obtenidos no mostraron diferencias significativas entre los diferentes puntos de tiempo en ninguno de los parámetros analizados (Tabla 4 y Figura 27).

**Tabla 4. Parámetros de funcionalidad cardíaca calculados a partir de las imágenes de RM.** Los valores representan la media  $\pm$  SD de cada grupo (n=4). \* $p \leq 0.05$ .

PARÁMETRO (UNIDADES)	Día 0 (pre-administración)	Día 7	Día 30
<b>Masa animal (kg)</b>	43.50 $\pm$ 2.65	44.75 $\pm$ 1.89	57.25 $\pm$ 3.09
<b>FE (%)</b>	39.40 $\pm$ 11.40	36.20 $\pm$ 8.56	40.2 $\pm$ 12.23
<b>VDFi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	120.63 $\pm$ 30.69	122.18 $\pm$ 34.72	106.30 $\pm$ 21.63
<b>VSFi (ml/m<sup>2</sup>)</b>	75.70 $\pm$ 32.01	80.03 $\pm$ 32.24	65.18 $\pm$ 26.04
<b>% Infarto</b>	12.25 $\pm$ 2.87	12.5 $\pm$ 2.64	12.25 $\pm$ 4.65
<b>Masa del infarto (g)</b>	10.18 $\pm$ 4.05	10.92 $\pm$ 4.38	8.73 $\pm$ 4.12

FE: Fracción de Eyección; VDFi: Volumen Diastólico Final indexado con respecto área de la superficie corporal; VSFi: Volumen Sistólico Final indexado con respecto al área de la superficie corporal.





**Figura 27. Evaluación de la funcionalidad cardiaca mediante RM.** La función cardiaca se determinó mediante la medición de diferentes parámetros a partir de las imágenes de RM. El panel de imágenes superior (A) muestra una vista representativa de la localización del infarto en la pared anterior y el septo en vista de eje corto al final de la diástole. Los gráficos representan los porcentajes de área de infarto (B) y fracción de eyección (C), obtenidos antes de la administración de CDCs, así como 7 y 30 días después. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 4 animales diferentes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples, aunque no se encontraron diferencias significativas.

### BLOQUE III: ESTUDIO DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO

---

El último bloque de resultados de este trabajo es el relacionado con el objetivo III, consistente en evaluar el uso terapéutico de exosomas como agentes responsables de la actividad paracrina inmunomoduladora de las MSCs.

En primer lugar, se realizó un estudio dirigido a determinar si los exosomas son capaces de ejercer un efecto inmunomodulador sobre las células T estimuladas *in vitro*. Para ello, se utilizaron exosomas aislados a partir de sobrenadantes de cultivos celulares de MSCs humanas derivadas de tejido adiposo. Para el aislamiento de las vesículas se utilizó el protocolo más estandarizado, basado en la ultracentrifugación. Una vez confirmado el potencial inmunomodulador de estas microvesículas, se planteó el desarrollo de un protocolo de aislamiento adecuado para su uso en el entorno clínico y que, por tanto, no necesite un equipamiento específico, sea altamente reproducible y permita obtener un elevado número de estas vesículas de manera sencilla. Para ello, se realizó una comparativa entre el protocolo estándar y otros en los que la ultracentrifugación no es necesaria.

#### III.A. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MSCs SOBRE CÉLULAS T ESTIMULADAS *IN VITRO*

Para este estudio, que se corresponde con el objetivo III.A, se cocultivaron los exosomas derivados de MSCs (exo-MSCs) con PBLs humanos estimulados, del mismo modo que en el ensayo de proliferación linfocitaria descrito en el bloque I.B. Como control positivo se utilizaron PBLs estimulados sin exosomas y como control negativo, PBLs sin estimular. Se estudió el efecto de diferentes dosis de exo-MSCs (4, 8 y 16  $\mu\text{g}/10^6$  PBLs) sobre la capacidad de proliferación, expresión de marcadores de diferenciación/activación y niveles intracelulares de IFN- $\gamma$  de los linfocitos.

## **Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre la capacidad de proliferación linfocitaria**

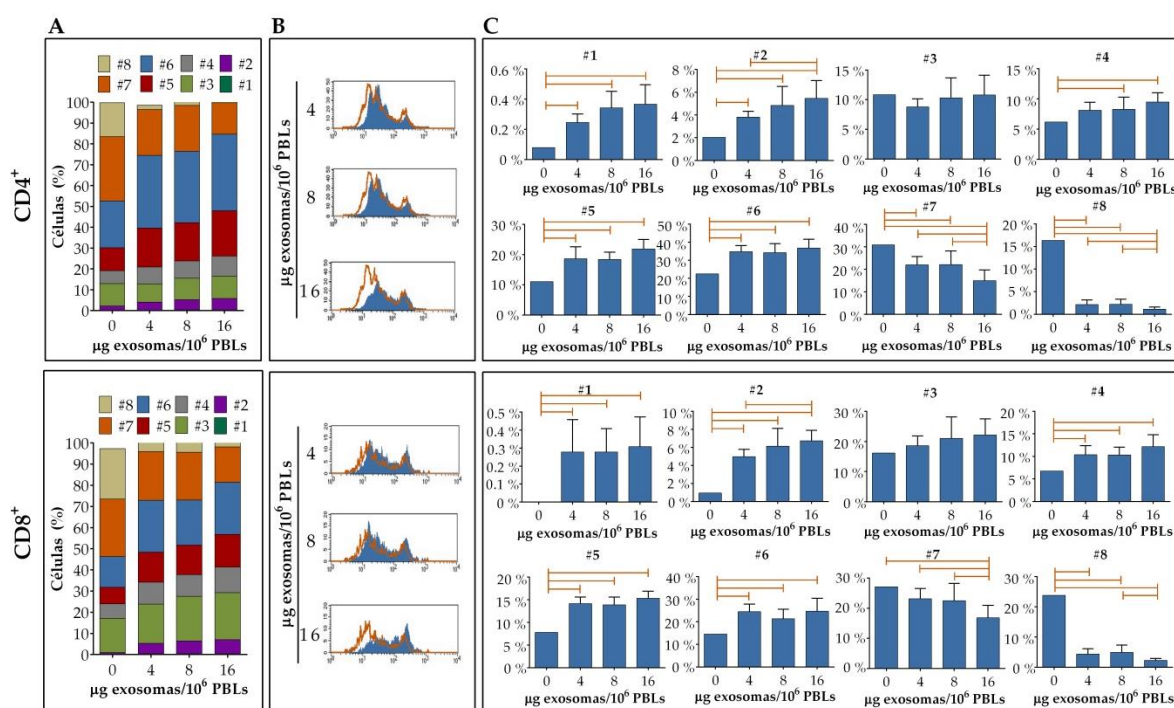
La actividad proliferativa de los PBLs cocultivados con exosomas durante 6 días, así como de los controles, se determinó mediante el marcaje de los mismos con CFSE antes de comenzar el ensayo. Este análisis de proliferación linfocitaria se realizó tanto en células T CD4<sup>+</sup> como en T CD8<sup>+</sup>.

Como cabía esperar, la tasa de proliferación de los PBLs no estimulados (control negativo) fue muy baja, y el valor más elevado fue el alcanzado por los PBLs estimulados (control positivo), apreciándose un total de ocho ciclos de división celular. Como se muestra en la Figura 28A, cuando los PBLs estimulados se cultivaron en presencia de diferentes concentraciones de exo-MSCs, la tasa de proliferación descendió de manera proporcional a la cantidad de exosomas, tanto en células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup>. Un porcentaje alto de estas células cocultivadas con exosomas mostró un bajo número de divisiones celulares, mientras que solamente un pequeño porcentaje de las mismas alcanzó un número elevado de divisiones (Figura 28B). La Figura 28C recoge una representación detallada del porcentaje de células en cada ciclo de división, en la que puede apreciarse cómo concentraciones crecientes de exosomas fueron capaces de reducir la proliferación de ocho generaciones a siete en ambas subpoblaciones linfocitarias.

El análisis estadístico reveló diferencias significativas en diferentes ciclos celulares, tanto en la subpoblación CD4<sup>+</sup> como en CD8<sup>+</sup>. Los dos primeros ciclos de división celular suponen un bajo porcentaje de células tanto en ausencia como en presencia de exosomas, lo que indica que el efecto de la estimulación policlonal comienza tras estos dos ciclos. No obstante, la presencia de exosomas implica un porcentaje de células significativamente mayor en estos dos ciclos celulares, aunque no llegan a alcanzar el 10 %. Además, los exosomas retienen a las células en ciclos de división más bajos (ciclos 4, 5 y 6), en los que el porcentaje de células es significativamente más alto en pre-



sencia de las microvesículas, en detrimento de los ciclos 7 y 8, que muestran un porcentaje de células significativamente reducido con dosis crecientes de exosomas.



**Figura 28. Capacidad proliferativa de los PBLs estimulados *in vitro* y cultivados en presencia de exosomas.** Los PBLs previamente marcados con CFSE fueron estimulados y cultivados en presencia de diferentes concentraciones de exo-MSCs. Como control, se utilizaron PBLs marcados y estimulados, sin exosomas. Tras 6 días, los PBLs se recogieron y se marcaron con anticuerpos anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8, y se analizó la intensidad de fluorescencia del CFSE en las diferentes subpoblaciones mediante citometría de flujo. La figura muestra el porcentaje del total de células que se encuentra en cada ciclo de división celular (indicados como #) (A), así como un histograma representativo de cada condición (B). También se muestra una representación detallada del porcentaje de células para cada ciclo de división celular, en función de las condiciones de cultivo. Los datos representan la media  $\pm$  SD de 8 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante ANOVA de un factor y pruebas *post-hoc* mediante el análisis de Bonferroni. Las líneas horizontales indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

Por último, se calculó el índice de estimulación como las frecuencias de células con baja expresión de CFSE de cada condición divididas entre la frecuencia de células con baja expresión de CFSE en el control negativo (células no estimuladas). Para las células estimuladas, se obtuvieron unos índices de estimulación de 692.3 y 655.6 en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, respectivamente. Sin embargo, cuando se analizó este valor en los PBLs estimulados y en presencia de exosomas, los valores del índice de estimulación disminuyeron significativamente tanto en las células CD4<sup>+</sup> ( $589.93 \pm 39.31$ ;  $585.00 \pm 80.27$  y  $529.14 \pm 58.88$  con dosis de 4, 8 y 16 µg de exo-

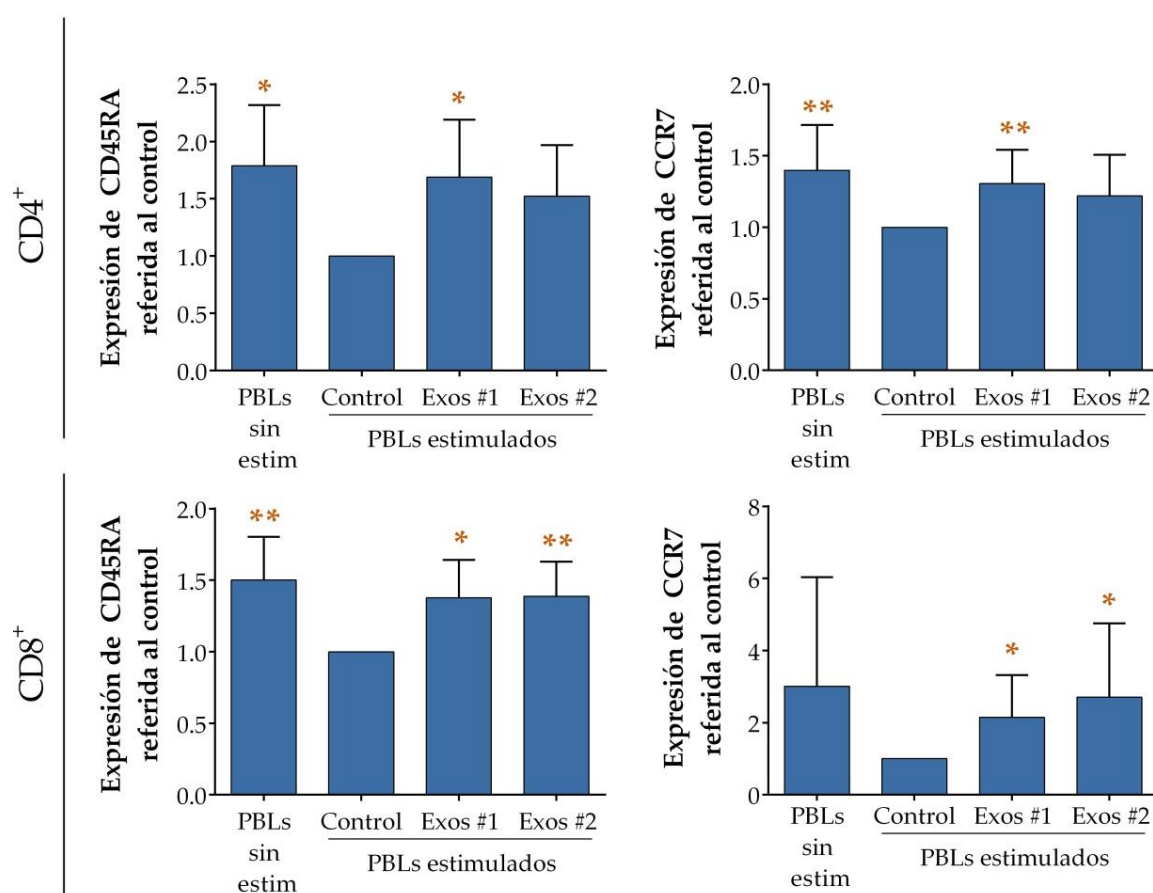
mas/ $10^6$  PBLs, respectivamente) como en las  $CD8^+$  ( $519.75 \pm 60.97$ ;  $488.03 \pm 107.32$  y  $437.40 \pm 79.25$  con dosis de 4, 8 y 16  $\mu\text{g}$  de exosomas/ $10^6$  PBLs, respectivamente).

### **Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre la distribución de subpoblaciones de células T estimuladas *in vitro***

Para identificar diferentes poblaciones dentro de las células T se utiliza de manera habitual el marcaje de las diferentes isoformas de CD45, una proteína tirosina fosfatasa reguladora de la activación de quinasas de la familia Src que se expresa en todas las células hematopoyéticas. Esta proteína cuenta con diferentes isoformas generadas por *splicing* alternativo de exones comprendidos en el dominio extracelular. Una de estas isoformas, CD45RA, se expresa en células T *naïve*, así como en células T efectoras  $CD4^+$  y  $CD8^+$ . Tras contactar con el antígeno, las células T memoria-efectora y memoria-central dejan de expresar CD45RA para expresar CD45RO. Así, tanto CD45RA como CD45RO pueden ser utilizadas para diferenciar de manera general células T *naïve* y efectoras de poblaciones de células T memoria.

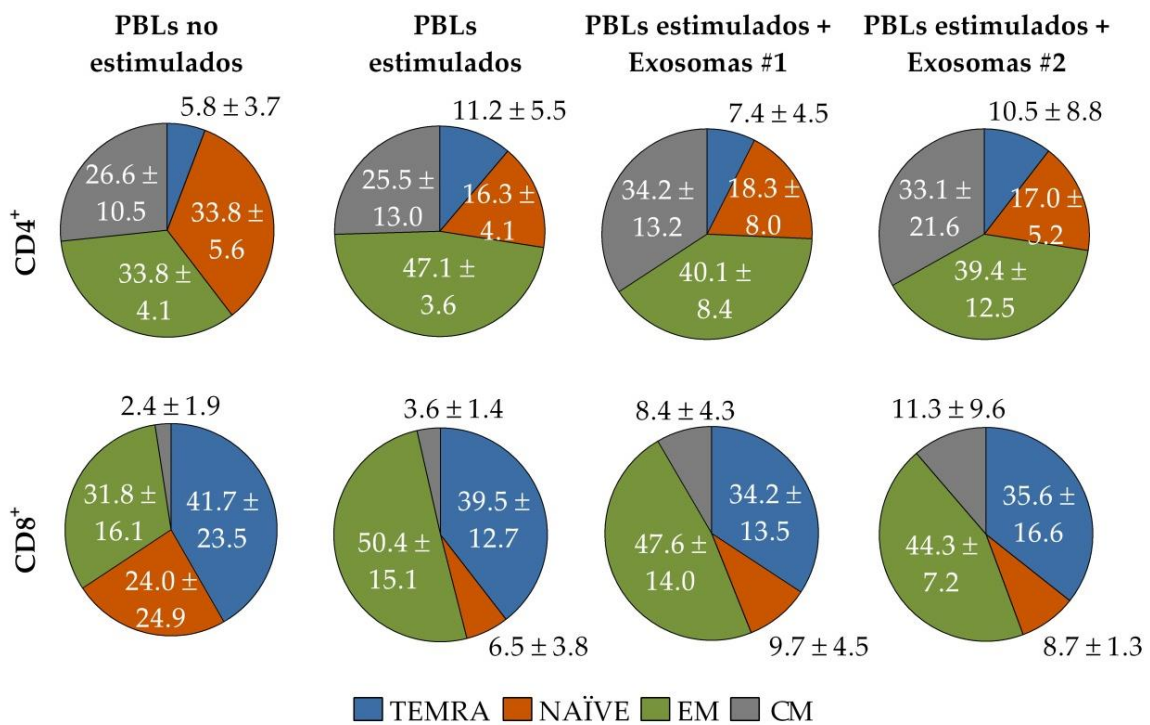
Además, es posible diferenciar entre poblaciones memoria-central y memoria-efectora y entre poblaciones *naïve* y efectoras añadiendo un segundo marcador: CCR7. Este receptor de quimiocinas está ampliamente considerado como un marcador de superficie para esta discriminación. Tanto las células *naïve* como las memoria-central expresan este receptor para poder migrar a los órganos linfoides secundarios, mientras que la carencia de este receptor permite a las células efectoras y memoria-efectora acumularse en los tejidos periféricos. Por tanto, la coexpresión de estos dos marcadores de superficie permite distinguir cuatro subpoblaciones de células T: células T *naïve* ( $CD45RA^+/CCR7^+$ ), células T memoria-central ( $CD45RA^-/CCR7^+$ ) células T memoria-efectora ( $CD45RA^-/CCR7^-$ ) y células T efectoras ( $CD45RA^+/CCR7^-$ ).

Para este ensayo, los PBLs cultivados en las condiciones descritas anteriormente se marcaron tras 6 días de cultivo con anticuerpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD45RA y anti-CCR7. La expresión cuantitativa de CD45RA y CCR7 se normalizó con relación al control positivo (PBLs estimulados cultivados en ausencia de exosomas). El análisis de la expresión de CD45RA y CCR7 en las subpoblaciones T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> mostró una disminución significativa en la expresión de ambos marcadores en el control positivo (PBLs estimulados), en comparación con el control negativo (PBLs sin estimular), en ambas subpoblaciones. Esta pérdida de CD45RA y CCR7 en los PBLs estimulados fue parcialmente compensada por el cultivo en presencia de exo-MSCs (Figura 29).



**Figura 29.** Expresión de CD45RA y CCR7 en PBLs estimulados *in vitro* y cultivados en presencia de exosomas. Tras 6 días de cultivo, los PBLs estimulados y cultivados en presencia de 16  $\mu\text{g}/10^6$  PBLs de exo-MSCs de diferentes donantes (Exos #1 y Exos #2) se analizaron mediante citometría de flujo. Como control negativo, se utilizaron PBLs sin estimular; como control positivo, PBLs estimulados y sin exosomas. Se determinó la expresión de CD45RA y CCR7 en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los gráficos representan la expresión de CD45RA y CCR7 normalizada en relación al control positivo (PBLs estimulados sin exosomas). Los valores representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada punto con el control (\*  $p \leq 0.1$ ; \*\*  $p \leq 0.05$ ).

Asimismo, también se estudió el efecto de los exosomas sobre la distribución de las cuatro subpoblación mencionadas anteriormente, analizando la coexpresión de CD45RA y CCR7 en las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. Como se muestra en la Figura 30, aunque la presencia de exosomas no alteró de manera significativa el porcentaje de células *naïve* (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>), sí se apreció un descenso significativo de las células T efectoras (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>) en la subpoblación CD8<sup>+</sup> cuando las células se cultivaron en presencia de exosomas, en comparación con el control positivo. En el caso de la subpoblación CD4<sup>+</sup>, la presencia de exosomas supuso una reducción del porcentaje de células memoria-efectora (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) y un incremento significativo del porcentaje de células memoria-central (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>).

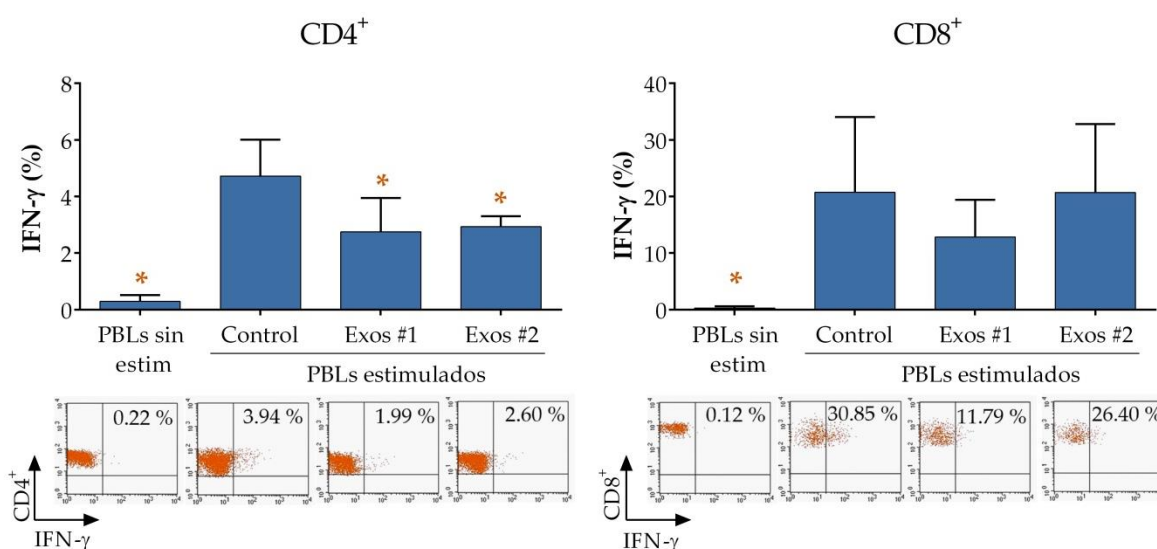


**Figura 30. Coexpresión de CD45RA y CCR7 en los PBLs estimulados *in vitro* y cultivados en presencia de exosomas.** Tras 6 días de cultivo, los PBLs estimulados y cultivados en presencia de 16 µg/10<sup>6</sup> PBLs de exo-MSCs de diferentes donantes (Exosomas #1 y Exosomas #2) se analizaron mediante citometría de flujo. Como control negativo, se utilizaron PBLs sin estimular; como control positivo, PBLs estimulados y sin exosomas. Se determinó la coexpresión de CD45RA y CCR7 en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. La coexpresión de ambos marcadores permite distinguir cuatro subpoblaciones de células T: células T efectoras (*terminally differentiated CD45RA<sup>+</sup> cells*, TEMRA, CD45<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>), células T vírgenes o *naïve* (CCR7<sup>+</sup>/CD45RA<sup>+</sup>), células T memoria-efectora (*effector memory*, EM, CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) y células T memoria-central (*central memory*, CM, CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>). Los valores representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

## Efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre el contenido intracelular en IFN- $\gamma$ de células T estimuladas *in vitro*

Para determinar el efecto que los exosomas ejercen sobre el contenido intracelular en IFN- $\gamma$  de células T, se realizó de nuevo un ensayo en las mismas condiciones que en el resto de experimentos de inmunomodulación. Tras los 6 días de cultivo, los PBLs se incubaron con un inhibidor del transporte celular y se marcaron con anticuerpos anti-CD4 y anti-CD8. A continuación, se fijaron, permeabilizaron y marcaron con anti-IFN- $\gamma$ , y se analizaron por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que el porcentaje de IFN- $\gamma$  intracelular se redujo cuando los PBLs estimulados se cultivaban en presencia de exosomas, en comparación con el control positivo, tanto en las células CD4<sup>+</sup> como en las CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, esta reducción solamente resultó estadísticamente significativa en la subpoblación CD4<sup>+</sup> (Figura 31).



**Figura 31. Contenido en IFN- $\gamma$  intracelular de los PBLs estimulados *in vitro* y cultivados en presencia de exosomas.** Tras 6 días de cultivo, los PBLs estimulados y cultivados en presencia de  $16 \mu\text{g}/10^6$  PBLs de exo-MSCs de diferentes donantes (Exos #1 y Exos #2) se analizaron mediante citometría de flujo. Como control negativo, se utilizaron PBLs sin estimular; como control positivo, PBLs estimulados y sin exosomas. Se determinó la presencia intracelular de IFN- $\gamma$  en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 3 experimentos independientes. Debajo, se muestran los gráficos de puntos representativos para cada condición. El número de los cuadrantes indica el porcentaje de células positivas para IFN- $\gamma$ . Los resultados se analizaron mediante la prueba t de Student, comparando cada punto con el control positivo (\*  $p \leq 0.05$ ).

### **III.B. COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MSCs PARA USO CLÍNICO**

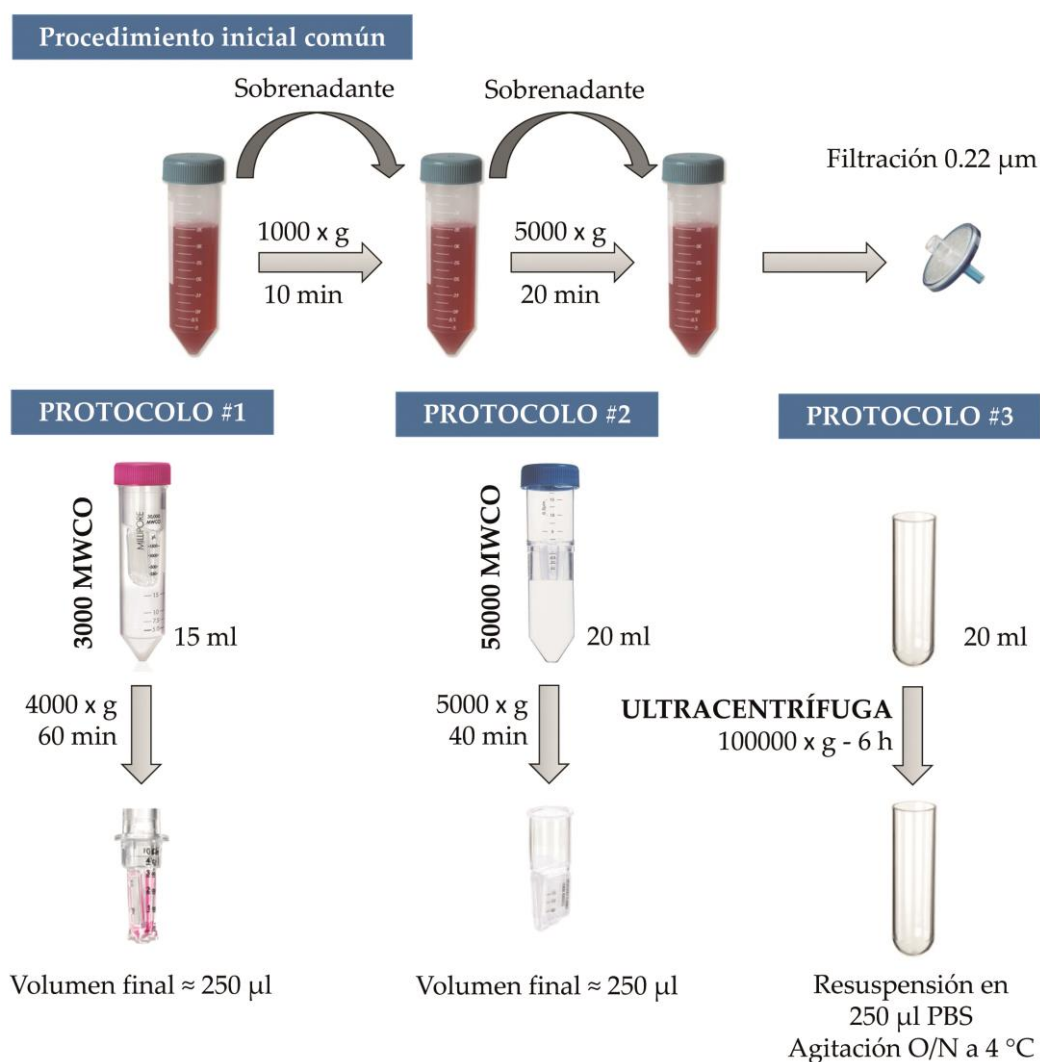
En este último bloque se presentan los resultados relacionados con el objetivo III.B, dirigido a comparar diferentes métodos de aislamiento de exosomas, con el fin de encontrar un protocolo fácilmente reproducible en la práctica clínica y con un alto rendimiento, permitiendo la obtención de un elevado número de estas partículas.

Los protocolos comparados se resumen en la Figura 32. Básicamente, las diferencias entre ellos radican en que los dos primeros (protocolos #1 y #2) se basan en el empleo de concentradores con límites de peso molecular (*Molecular Weight Cut Off*, MWCO) de 3000 y 50000 Da, respectivamente, mientras que en el último (protocolo #3) se utiliza un protocolo estándar de ultracentrifugación.

Antes de llevar a cabo cada protocolo, todos los sobrenadantes fueron centrifugados y filtrados como se detalla en la Figura 32 para eliminar células muertas, restos celulares y otras partículas. A partir de este momento, se siguió uno de los tres protocolos de estudio para el aislamiento de los exosomas.

Las fracciones enriquecidas de exosomas procedentes de cada uno de los protocolos empleados fueron comparadas en términos de concentración y de tamaño y número de partículas. Por último, se realizó un análisis proteómico para la identificación, cuantificación y clasificación del perfil proteico de estas vesículas.



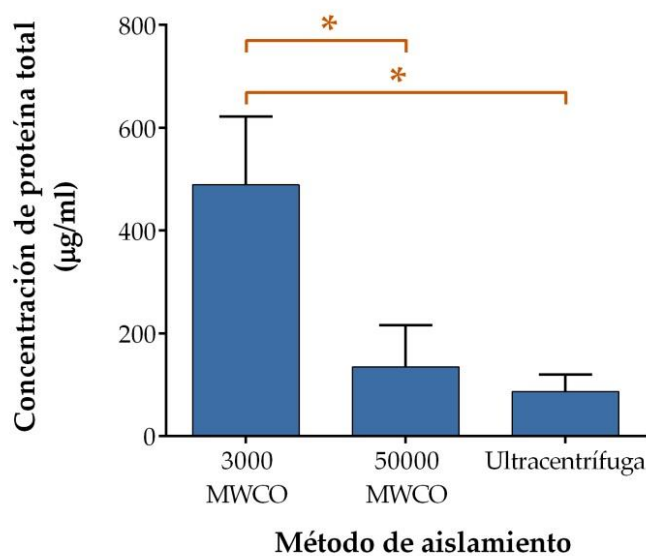


**Figura 32. Protocolos utilizados para el aislamiento de las fracciones enriquecidas de exosomas.** Antes de iniciar cada uno de los tres protocolos, los sobrenadantes de las MSCs se recogieron y centrifugaron a 1000 x g 10 min y 5000 x g 20 min, descartando los precipitados, y se pasaron por un filtro de 0.22 µm. A partir de aquí, se llevaron a cabo cada uno de los protocolos específicos. Protocolo #1: Se utilizaron concentradores de 3000 Da MWCO previamente lavados con PBS, en los que se añadieron 15 ml de los sobrenadantes obtenidos tras el procedimiento inicial común, y se realizó una centrifugación de 4000 x g durante 60 min. El volumen obtenido, aproximadamente 250 µl, se almacenó a -20 °C. Protocolo #2: Se utilizaron concentradores de 50000 Da MWCO previamente lavados con PBS, en los que se añadieron 20 ml de los sobrenadantes obtenidos tras el procedimiento inicial común, y se realizó una centrifugación de 5000 x g durante 40 min. El volumen obtenido, aproximadamente 250 µl, se almacenó a -20 °C. Protocolo #3: Se añadieron 20 ml de los sobrenadantes obtenidos tras el procedimiento inicial común en tubos especiales para ultracentrifuga, se pesaron, calibraron y se llevó a cabo una ultracentrifugación a 100000 x g durante 6 h. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 250 µl de PBS. Tras mantenerse en agitación durante toda la noche, se almacenó a -20 °C.

### Concentración de proteína total en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento

En primer lugar, la concentración de exo-MSCs aislados mediante los diferentes protocolos se determinó de manera indirecta mediante la medida de proteína total utilizando el método de Bradford.

Los resultados obtenidos mostraron una concentración de proteína total significativamente más elevada en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas con el protocolo #1 (concentrador de 3000 Da MWCO), comparado con los otros dos protocolos. Sin embargo, los protocolos #2 (concentrador de 50000 Da MWCO) y #3 (ultracentrifugación) no mostraron diferencias significativas entre ellos, aunque las muestras obtenidas mediante el protocolo #2 mostraron un rango más extenso hacia valores de concentración de proteína total más elevados que las muestras obtenidas mediante el protocolo #3 (Figura 33).



**Figura 33. Concentración de proteína total en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.** La concentración de exosomas se determinó de manera indirecta a través de la determinación de proteína total mediante el método de Bradford, extrapolando los valores de absorbancia a partir de una recta patrón realizada con concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 6 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples, seguida de una prueba U de Mann-Whitney comparando los grupos dos a dos (\*  $p \leq 0.05$ ).



## **Concentración y tamaño de las partículas contenidas en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento**

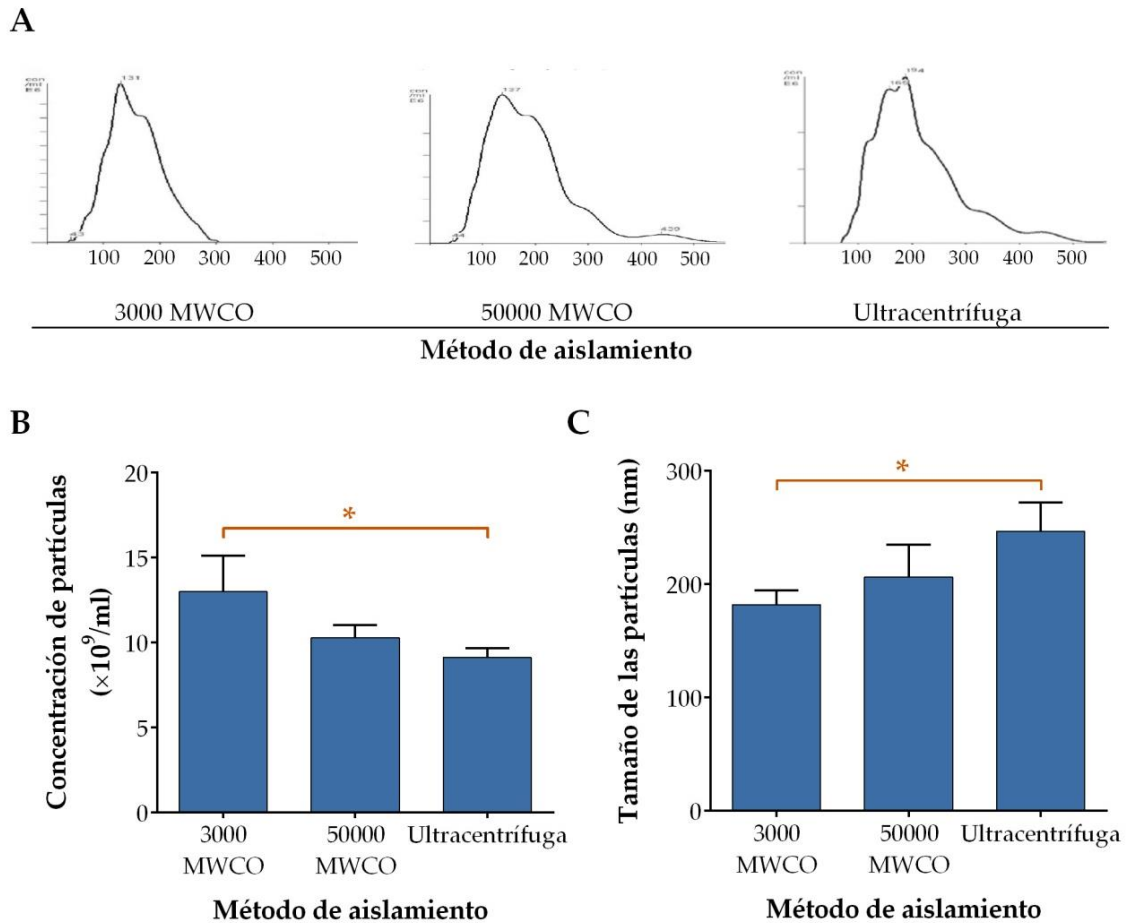
Además de la cuantificación mediante la medida de proteína total, se realizó la cuantificación y se determinó la distribución del tamaño de las vesículas aisladas mediante un análisis de rastreo de nanopartículas basado en la observación del movimiento browniano de las nanopartículas individuales, cuya velocidad depende de la viscosidad y la temperatura del líquido, así como del tamaño y la forma de las nanopartículas. Este método permitió utilizar este principio para medir el tamaño de las nanopartículas en soluciones coloidales. Estas determinaciones se llevaron a cabo en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona.

Los datos referidos a la concentración de partículas muestran que esta fue significativamente mayor en las fracciones obtenidas con el protocolo #1 (concentradores de 3000 Da MWCO), en relación con la alcanzada con el protocolo que incluye ultracentrifugación. El protocolo #2 (concentradores de 50000 Da MWCO) proporcionó valores de concentración intermedia entre los otros dos, no mostrando diferencias significativas con ninguno de ellos (Figura 34B).

Es importante resaltar que esta medida directa de la concentración de partículas nos permitió también comprobar que la estimación indirecta mediante la cuantificación de proteína total puede considerarse una medida válida. Aunque no puede establecerse correlación directa entre cantidad de proteína total y número de partículas, sí puede apreciarse que en ambas determinaciones se alcanzaron valores mayores para el protocolo #1 y menores para el #3, mientras que los valores alcanzados para el protocolo #2 se situaban entre los anteriores.

Finalmente, los resultados referentes al tamaño de las partículas mostraron que este varía ligeramente en función del método de aislamiento empleado, encontrándose una media de tamaño inferior cuando se emplean métodos basados en el uso de concentradores, en comparación con la ultracentrifugación. Como es lógico, cuando

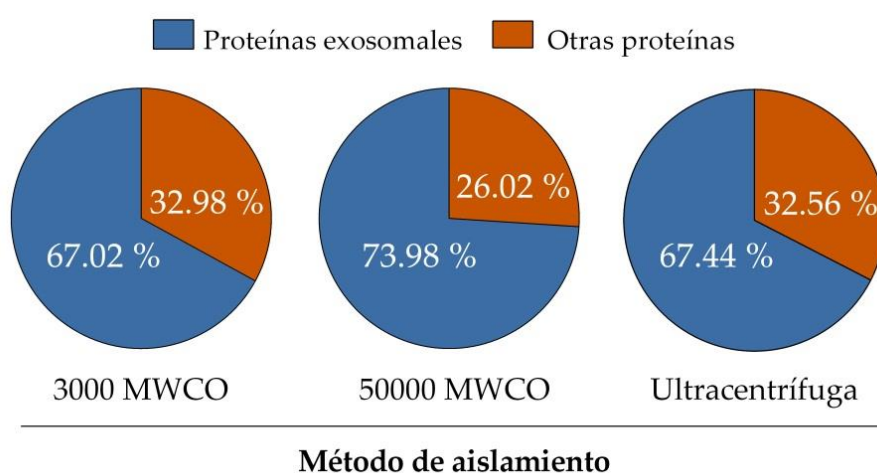
se empleó el concentrador de menor límite de peso molecular, la media del tamaño de las partículas aisladas fue menor que con el concentrador de límite de peso molecular más elevado. Solamente se observaron diferencias significativas entre el protocolo número #1 (concentrador de 3000 Da MWCO) y el #3 (ultracentrifugación), siendo este último protocolo el que arrojó valores más elevados para el tamaño de las partículas (Figura 34C).



**Figura 34. Concentración y tamaño de las partículas presentes en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.** La concentración y tamaño de las partículas se determinó mediante el análisis proporcionado por el sistema de rastreo de nanopartículas. La figura muestra las imágenes representativas proporcionadas por este sistema (A), en las que el eje X hace referencia al tamaño (100 nm por división) y el eje Y representa la concentración de partículas por ml. Los gráficos representan independientemente los datos de concentración (B) y tamaño (C) de las partículas para cada uno de los protocolos. Los valores representan la media  $\pm$  SD de 6 experimentos independientes. Los resultados se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples, seguida de una prueba U de Mann-Whitney comparando los grupos dos a dos (\*  $p \leq 0.05$ ).

## Análisis proteómico de las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento

Para analizar el perfil proteico de las muestras procedentes del aislamiento con cada uno de los protocolos, se realizó un análisis proteómico de alta resolución en el Laboratorio de Proteómica Cardiovascular del CNIC. Para ello, se aisló la proteína total, se separó en gel de SDS-poliacrilamida y se realizó la digestión de cada banda con una solución de tripsina. Los péptidos resultantes fueron analizados mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem. La identificación de proteínas se realizó con SEQUEST usando la base de datos de *Swissprot*. Los resultados obtenidos fueron analizados empleando la herramienta *Gene-Ontology*, un recurso para obtener una clasificación de las diferentes proteínas identificadas en relación a sus funciones biológicas. Concretamente, se determinó el porcentaje de proteínas propias de los exosomas, clasificadas con el término “exosomas vesiculares extracelulares” (*Extracellular Vesicular Exosome*, GO:0070062), en relación al total de proteínas identificadas. Los resultados mostraron que este porcentaje fue del 65.22 % para el protocolo #1 (de un total de 345 proteínas identificadas), 73.98 % para el #2 (de un total de 307 proteínas) y 67.44 % para el #3 (de un total de 172 proteínas) (Figura 35).



**Figura 35. Caracterización proteómica del perfil proteico en las fracciones enriquecidas de exosomas obtenidas mediante diferentes protocolos de aislamiento.** El total de proteínas identificadas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem fueron clasificadas empleando la herramienta informática *Gene-Ontology*. Las gráficas muestran el porcentaje de proteínas relacionadas con vesículas exosomales (GO:0070062) sobre el total de proteínas identificadas para cada muestra.



# Discusión • • • •

En esta tesis se presentan tres estrategias novedosas relacionadas con la aplicación de la terapia celular. Los estudios realizados corresponden a pruebas preliminares y pruebas de concepto dirigidas a evaluar la factibilidad y la eficacia potencial de estas estrategias para, en lo sucesivo, seguir explorándolas y desarrollándolas.

A continuación, se discutirá cada uno de los bloques presentados en el capítulo de resultados, siguiendo el mismo esquema.

## BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA FAVORECER LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

---

### **IA. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y SUTURAS QUIRÚRGICAS SOBRE LA DEPOSICIÓN DE COLÁGENO**

El uso de suturas recubiertas con células madre utilizando diferentes formulaciones ha mostrado un efecto beneficioso en la cicatrización de anastomosis de colon [35,36], fístulas enterocutáneas [113] y en la reparación de tendones [114].

En este trabajo nuestro primer objetivo fue mejorar la implantación de MSCs en las suturas, para lo que evaluamos el efecto de diferentes tratamientos en la tasa de adhesión celular.

Nuestros primeros resultados mostraron que las suturas compuestas de PLGA fueron las más adecuadas en términos de adhesión celular (datos no mostrados en este trabajo). Aunque en diferentes trabajos se han combinado MSCs de rata [36,115] y ratón [35] con las suturas consiguiendo una buena adhesión, en este trabajo quisimos optimizar este parámetro. El PLGA se utiliza en la actualidad como soporte en ingeniería de tejidos, y se han desarrollado numerosas modificaciones para potenciar la adhesión celular y el potencial de diferenciación de las MSCs. En particular,

el potencial condrogénico, osteogénico y adipogénico de las MSCs se ha mejorado recubriendo el PLGA con diferentes compuestos como el TGF- $\beta$ 1 [116], ascorbato-2-fosfato [117] y factores de transcripción adipogénicos [118], respectivamente. Además, el tratamiento de PLGA con NaOH ha demostrado una mejora de la adhesión celular, crecimiento y diferenciación condrogénica [38], así como un aumento significativo en la proliferación de MSCs derivadas de médula ósea [119]. Por último, la combinación de PLGA y células madre se ha aplicado ampliamente en los campos de la cicatrización [120] y el daño tisular [121].

En este trabajo se demuestra que los tratamientos con PLL o NaOH produjeron un aumento significativo en la tasa de adhesión celular. Sin embargo, únicamente las MSCs adheridas a las suturas tratadas con PLL mostraron una mejora en la fuerza de adhesión a la sutura tras varios pases a través del tejido, lo que hace que este sea el tratamiento elegido para la implantación de MSCs. Apoyando estos resultados, estudios previos han demostrado que las células madre embrionarias presentan una adhesión celular óptima a suturas tratadas con PLL [122]. También se han utilizado soportes modificados con PLL con el objeto de mejorar la adhesión y eficiencia de producción de componentes cartilagosos por condrocitos [123].

Las MSCs presentan funciones biológicas relacionadas con la cicatrización similares a las de fibroblastos dérmicos y, como ellos, también pueden migrar a los tejidos dañados [124]. Además, las MSCs secretan fibronectina, factores de crecimiento y colágeno, esenciales para la reorganización de la matriz extracelular y beneficiosos a la hora de aumentar la integridad de los tejidos dañados [125–128]. En este trabajo se demuestra que las suturas recubiertas con MSCs podrían ejercer un efecto beneficioso en el cierre de defectos cutáneos y en su cicatrización a través de un incremento en el depósito de colágeno en el tejido suturado. Este aumento en la cantidad de colágeno podría estar mediado de forma indirecta por las MSCs, a través de la secreción de factores solubles que inducen la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos. Por otro lado, también podría existir un mecanismo directo, consistente en la liberación de colágeno por parte de las propias MSCs.

En cuanto al mecanismo indirecto, es difícil definir todos los factores solubles implicados en la activación de fibroblastos, aunque algunos de los principales participantes serían TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, FGF y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) [129]. Estos factores solubles proporcionan un microambiente favorable para la reparación tisular, promoviendo la quimiotaxis de fibroblastos hacia el tejido dañado, incrementando su síntesis de colágeno y modulando el proceso inflamatorio. Adicionalmente, se ha visto que la interacción entre MSCs y fibroblastos puede ser mediada por el contacto célula-célula o por moléculas solubles, y daría lugar al incremento de la producción de colágeno tipo I por los fibroblastos [39]. Por otro lado, apoyando el mecanismo por el cual las MSCs estarían directamente implicadas en el proceso de remodelación tisular, se ha demostrado que las MSCs humanas derivadas de médula ósea presentan funciones biológicas que son, en cierto modo, similares a las de los fibroblastos, siendo también capaces de migrar hacia los tejidos dañados [124].

En este trabajo hemos comprobado que el tipo de colágeno más abundante secretado por las MSCs fue el colágeno alfa-1(I), que juega un papel importante en la angiogénesis, invasión y cicatrización, así como en el mantenimiento y funcionalidad de la matriz extracelular [130,131]. El análisis proteómico de los tipos de colágeno secretados por las MSCs indica que las suturas recubiertas con estas células podrían tener un efecto beneficioso en la fase de remodelación durante la cicatrización.

Por último, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* para evaluar el efecto de las suturas recubiertas sobre la deposición de colágeno en el tejido suturado. Para este tipo de ensayos de cicatrización, la adecuación del modelo murino ha sido ampliamente demostrada [132,133]. Basándonos en estudios previos de cicatrización empleando MSCs derivadas de tejido adiposo [39] y otros realizados en ratones resistentes a colagenasa [130], consideramos que el tiempo óptimo para realizar las cuantificaciones de colágeno tras la implantación de las MSCs vehiculadas en las diferentes suturas sería de una semana. Este ensayo mostró un marcado aumento en la depo-

sición de colágeno en los tejidos en los que se emplearon suturas recubiertas tratadas con NaOH y, en menor medida, en aquellos en los que se utilizaron suturas recubiertas tratadas con PLL, frente a las mismas suturas sin células.

Finalmente, es importante destacar algunas limitaciones del presente estudio. En primer lugar, no se ha realizado la identificación de los tipos de colágeno *in vivo*, ni tampoco la fuente del mismo (fibroblastos residentes, fibroblastos migratorios o MSCs). En segundo lugar, este estudio muestra que el depósito de colágeno en el tejido suturado se ve incrementado por las suturas recubiertas por MSCs, sin embargo, es difícil concluir si este efecto está mediado directamente por la secreción de colágeno por parte de las propias células o de manera indirecta a través de la liberación de factores solubles que pudieran promover la migración de fibroblastos o moléculas antiinflamatorias que favorecerían la fase de remodelación.

En conclusión, y de acuerdo con estudios previos que demuestran que las MSCs juegan un importante papel en la reparación y regeneración tisular [134,135], el uso de las suturas tratadas y recubiertas con células aseguraría la presencia de las MSCs en el tejido suturado, lo que podría potenciar la remodelación tisular y cicatrización en un tiempo más corto que con suturas convencionales, pudiendo ser especialmente útiles en aquellos pacientes con dificultades en la cicatrización.

#### **I.B. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y MALLAS QUIRÚRGICAS SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA**

Las mallas quirúrgicas se emplean de manera habitual para proporcionar un soporte físico en tejidos debilitados en casos de hernias incisionales [136], prolapso de órganos pélvicos [137], incontinencia urinaria [138] y otras patologías. Se estima que cada año se implantan alrededor de un millón de mallas quirúrgicas en todo el mundo [43]. Sin embargo, tras la implantación de estas mallas, es frecuente observar fibrosis y una fuerte reacción a cuerpo extraño que cursan con dolor e incomodidad, y a menudo obligan a la retirada de las mismas [139].



En este trabajo, partimos de la hipótesis de que el uso combinado de MSCs y mallas quirúrgicas podría ejercer un efecto beneficioso y reducir la respuesta inflamatoria contra el material implantado. Además, la combinación de mallas quirúrgicas con MSCs alogénicas es particularmente interesante debido a su baja inmunogenicidad, propiedades antiinflamatorias, multipotencialidad y capacidad de autorrenovación [140]. Apoyando nuestra hipótesis, existen numerosos estudios que han demostrado la capacidad moduladora *in vitro* e *in vivo* de las MSCs sobre diferentes poblaciones celulares inmunitarias [49,141,142]. Otro estudio más reciente y que se encuentra estrechamente relacionado con este trabajo demostró que las MSCs también modulan la activación de macrófagos, reduciendo la reacción a cuerpo extraño frente a andamiajes sintéticos —comúnmente denominados como *scaffolds*— [143].

En el presente estudio, se realizó la combinación de MSCs con mallas quirúrgicas no absorbibles para su aplicación en procedimientos quirúrgicos. Nuestros ensayos *in vitro* e *in vivo* fueron desarrollados con una malla monofilamento de polipropileno de bajo peso molecular, uno de los materiales más comunes para la reparación de hernias en la actualidad.

El primer conjunto de experimentos se encaminó a mejorar la adhesión de las MSCs a la malla de polipropileno. De forma acorde con los resultados previos empleando suturas de PLGA recubiertas con MSCs, la mejor tasa de adhesión se alcanzó cuando las mallas fueron tratadas con PLL.

Para evaluar la posible aplicación clínica de estas mallas recubiertas, centramos nuestra atención en el uso de esta combinación como un producto “listo para usar”. Con este fin, se realizó el análisis de la actividad biológica de mallas recubiertas sometidas a criopreservación y posteriormente descongeladas. Nuestro estudio demuestra claramente que este tipo de conservación es óptimo en términos de viabilidad celular. Estos resultados son relevantes, e indican que las mallas recubiertas podrían ser empleadas como producto terapéutico, el cual podría estar sujeto a los controles de calidad que exige la normativa actual para la aplicación de terapias basadas en la aplicación de células madre. La criopreservación de estas mallas re-

cubiertas con MSCs asegura el mantenimiento de la actividad biológica y su conservación durante un periodo de tiempo considerable, simplificando los aspectos logísticos comúnmente relacionados con las terapias celulares.

Nuestro siguiente objetivo se centró en determinar *in vitro* la interacción entre las mallas recubiertas con MSCs y el sistema inmune. Como cabía esperar, las mallas recubiertas con MSCs mostraron un efecto regulador sobre la proliferación linfocitaria y el contenido intracelular de IFN- $\gamma$ . Además, los ensayos realizados con la línea celular promonocítica U937 demostraron que estas mallas también son capaces de contrarrestar la diferenciación hacia el fenotipo M1 producida cuando esta línea se cocultiva con mallas convencionales. Estos resultados concuerdan con estudios previos *in vitro* en los que se demuestra que las MSCs potencian la diferenciación de macrófagos hacia el fenotipo M2 [144].

Por último, para analizar los aspectos inmunológicos y de seguridad de la implantación de mallas recubiertas, se realizó un ensayo *in vivo* utilizando un modelo murino inmunocompetente.

En términos de seguridad, no se encontraron alteraciones en la hematología, imágenes de RM ni en la observación mediante sistema de óptica laparoscópica, indicando que las mallas recubiertas pueden ser implantadas sin efectos adversos para el paciente.

Una vez abordados los aspectos de seguridad, quisimos determinar los mecanismos inmunológicos implicados en la actividad moduladora de las mallas recubiertas con MSCs. Existe un dogma ampliamente aceptado que sostiene que las MSCs ejercen una actividad inmunomoduladora en presencia de mediadores inflamatorios. En esta inmunomodulación, la liberación de factores paracrinos por las MSCs regularía la migración, activación y diferenciación de macrófagos [145], los cuales desempeñan un papel central en la reacción a cuerpo extraño después de la implantación de este tipo de materiales quirúrgicos. Por ello, el principal objetivo de nuestros ensayos *in vivo* se centró en la monitorización de las subpoblaciones de

macrófagos infiltrados en el área de implantación de las mallas. Los resultados mostraron un aumento significativo de la polarización hacia el fenotipo M2 en los macrófagos infiltrados. Estos resultados fueron similares en estudios previos en los que se utilizaron MSCs para el tratamiento de infarto de miocardio [146] y daño renal agudo [147]. Sin embargo, es importante resaltar que solamente se encontró este efecto sobre la polarización de macrófagos a día 7 tras la implantación, y no en el estudio a 30 días.

En relación con esta última observación, quisimos profundizar en el mecanismo responsable de la inmunomodulación de la respuesta inmune en la zona de implantación. Para ello, el estudio se centró en el análisis transcripcional de los factores solubles asociados a la respuesta inmune frente a biomateriales en el lugar de implantación de las mallas. Aunque muchas citocinas y quimiocinas son pleiotrópicas y difíciles de clasificar, una categorización simplificada incluiría entre los factores proinflamatorios a citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , y entre los antiinflamatorios, a IL-4, IL-10, IL-13 y TGF- $\beta$  [148–150]. Adicionalmente, en nuestro análisis incluimos también el factor de crecimiento VEGFA, considerado como proinflamatorio y proangiogénico.

A día de hoy, sabemos que el principal tipo celular responsable del inicio de la reacción a cuerpo extraño son los macrófagos derivados de monocitos sanguíneos [151]. Esta reacción es secuencial, y existen numerosas señales intercelulares que dictan las acciones de las células vecinas. De manera simplificada, la reacción a cuerpo extraño podría dividirse en dos etapas: fase inflamatoria —primero aguda y después crónica— y fase de reparación —recuperación y reconstrucción tisular—. Nuestros ensayos *in vivo* se han realizado a 7 y 30 días. Estos puntos de tiempo se corresponderían con una fase inflamatoria aguda (7 días) y con el período de inflamación crónica (30 días), estando este último incluido dentro de la etapa de formación del tejido de granulación [152]. Por ello, es importante señalar que el análisis transcripcional se centró principalmente en la primera fase de la reacción a

cuerpo extraño, ya que no se detectaron cambios a largo plazo en la polarización de macrófagos a día 30.

Así, las primeras dos citocinas que mostraron un aumento significativo en su expresión cuando se utilizaron mallas combinadas con MSCs, en comparación con las mallas sin recubrir, fueron IL-4 e IL-13, ambas relacionadas con la polarización de macrófagos hacia el perfil M2 [153]. Estos resultados estarían en concordancia con el estudio realizado por Nakajima *et al.*, en el que utilizaron MSCs en un modelo de daño de médula espinal en rata, encontrando un aumento en estas mismas citocinas asociado a una polarización de macrófagos hacia M2 en los animales tratados [57].

Nuestros resultados mostraron también un descenso significativo de MCP-1 en los animales en los que se implantaron mallas recubiertas con MSCs. Esta disminución de MCP-1, junto con el aumento en IL-4 e IL-3, ha sido previamente asociado con la polarización de macrófagos hacia M2 [154] y con el bloqueo de la señalización que media la polarización hacia M1 [155].

Además, teniendo en cuenta que la expresión divergente de Arg-1 e iNOS ha contribuido en gran medida a la nomenclatura dicotómica de los macrófagos [156], consideramos que la inclusión de ambos en el análisis transcripcional sería relevante. Arg-1 e iNOS han sido definidos como marcadores útiles para los fenotipos M1 y M2, respectivamente [157]. La enzima iNOS genera óxido nítrico a partir de L-arginina, mientras que Arg-1 hidroliza la arginina, reduciendo así la biodisponibilidad de óxido nítrico [158]. Nuestro estudio *in vivo* demuestra que la expresión de Arg-1 se incrementó de manera significativa en aquellos animales tratados con mallas recubiertas con MSCs, en comparación con aquellos en los que se implantaron mallas convencionales. Por otro lado, la expresión relativa de iNOS fue muy baja en ambos grupos en comparación a la expresión de Arg-1. De nuevo, estos resultados concuerdan con la inducción de la polarización de macrófagos hacia M2 en el sitio de implantación.

Para terminar con el análisis del estudio de expresión génica, cabe mencionar que muchos de los factores solubles analizados no mostraron cambios en su expresión (IL-2, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y VEGFA). Sin embargo, y sorprendentemente, sí se observó un incremento significativo en la expresión de IL-1 $\beta$  en los animales con mallas recubiertas con MSCs. En principio, este resultado parece oponerse a la polarización hacia M2 reflejada en los cambios en IL-4, IL-13, MCP-1 y Arg-1. Sin embargo, se ha demostrado que las propias MSCs sometidas a hipoxia liberan IL-1 $\beta$  [159], por lo que consideramos que el aumento en la expresión de esta citocina podría ser consecuencia de su liberación directa por las células implantadas.

A falta de estudios más profundos en modelo de animal grande que confirmen estos resultados preliminares, podría concluirse que el uso combinado de MSCs y mallas quirúrgicas parece cumplir con los requerimientos de seguridad para una futura aplicación clínica, proporcionando un microambiente inmunomodulador que podría reducir la respuesta inflamatoria a menudo asociada a la implantación de estos materiales.

## BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR

---

En terapia celular, la elección de la ruta de administración es un elemento fundamental que determinará en gran medida el éxito del tratamiento. En la actualidad, se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos en los que se emplean diferentes vías, existiendo distintas ventajas y desventajas para todas ellas.

En el contexto del infarto de miocardio, la intervención coronaria percutánea se realiza de manera rutinaria, ya que la principal estrategia terapéutica para esta patología es la reperfusión temprana de las arterias coronarias ocluidas. Por esta razón, la administración de células por vía intracoronaria es una de las aproximaciones más ampliamente utilizadas, en comparación con otros métodos [160]. De hecho, las estrategias endoluminales están especialmente indicadas para el tratamiento del infarto de miocardio en su fase aguda, coincidiendo con una elevada expresión de factores quimiotácticos y moléculas de adhesión celular [161]. Sin embargo, la administración intracoronaria de células madre presenta ciertas desventajas: la retención celular es muy baja y existe riesgo de oclusiones microvasculares si se administran células del tamaño de las MSCs o CDCs [77,78]. También existe la opción de la administración endoluminal mediante infusión intravenosa, que constituye el método más sencillo, pero en este caso la tasa de retención celular es incluso menor [80].

Por otro lado, la inyección intramiocárdica se ha considerado como una vía óptima para la administración de células en pacientes con infarto crónico, que se corresponde con una baja expresión de señales de atracción celular como factores quimiotácticos y moléculas de adhesión celular. Esta vía muestra una tasa de retención mayor, pero existe una pérdida significativa de células debida a la contracción del miocardio [79]. Además, la administración intramiocárdica en el miocardio isquémico o cicatrizado podría dar lugar a agrupaciones celulares aisladas de la arquitectura normal y por tanto, con un aporte sanguíneo pobre que limitaría la

supervivencia celular [161]. Por todas estas razones, la búsqueda de nuevas vías de administración podría proporcionar la respuesta apropiada para los diferentes escenarios clínicos.

La administración intrapericárdica podría solventar los inconvenientes de la inyección intramiocárdica, ya que no conlleva agresión para el miocardio y proporciona una distribución homogénea de las células. Sin embargo, ambas rutas implican un procedimiento quirúrgico más invasivo que los utilizados para la administración por vía endoluminal, lo que requiere necesariamente una cierta estabilidad vascular en el paciente.

La seguridad y la eficacia de las terapias intrapericárdicas se ha demostrado previamente en diferentes estudios [162,163], y los modelos de animal grande como el cerdo se han utilizado ampliamente para la evaluación de diferentes compuestos [91,92]. En este trabajo, se analizó la idoneidad del LP como vehículo para la administración de MSCs, así como la biodistribución de estas células tras su administración en un modelo animal clínicamente relevante. La especie porcina presenta numerosas similitudes anatómicas y fisiológicas con el humano, especialmente a nivel cardiovascular, por lo que constituye el modelo animal más apropiado para la extrapolación clínica de los resultados. Además, existe un número creciente de ensayos preclínicos en este campo que utilizan este mismo modelo, lo que sin duda ayudará a interpretar y poner en contexto los resultados obtenidos [164].

En la actualidad existen numerosas evidencias de la integración exitosa de las células madre en el tejido cardíaco [165], y está ampliamente aceptado que la vía de administración es uno de los principales factores a la hora de determinar el efecto terapéutico [81]. En terapia celular, la viabilidad, supervivencia y capacidad migratoria de las células administradas en el tejido receptor —especialmente en infarto de miocardio y accidente cerebrovascular— deben estar garantizadas [166]. En este sentido, nuestros primeros experimentos se encaminaron a evaluar el LP como vehículo para la administración de células madre.

En primer lugar, se realizó la comparación del perfil bioquímico entre LP y plasma —medio inocuo para el crecimiento y la supervivencia celular—. Los resultados mostraron la existencia de algunas diferencias significativas en la composición bioquímica de ambos fluidos, lo que es normal si consideramos que el LP es un ultrafiltrado del plasma. Además, los experimentos *in vitro* demostraron que, cultivadas en LP, las MSCs alcanzan una viabilidad, proliferación y supervivencia óptimas. Hasta donde sabemos, esta es la primera vez que se demuestra de manera experimental que el LP es un vehículo óptimo para las MSCs.

De acuerdo con nuestras observaciones *in vitro*, se planteó que la administración intrapericárdica de MSCs podría favorecer la retención de las células en la proximidad del tejido dañado, preservando su bioactividad. Basándonos en este planteamiento, nuestro ensayo *in vivo* se desarrolló en un modelo porcino en el que los animales recibieron una elevada dosis de MSCs, sin que se apreciaran signos de inflamación, efusión pericárdica o adherencias adversas. Teniendo en cuenta que la seguridad es un aspecto esencial en terapia celular cardiovascular, nuestros hallazgos sugieren que la administración intrapericárdica es una vía segura para la implantación de las MSCs. Estos resultados concuerdan con estudios previos en los que se administraron biomateriales combinados con MSCs de manera segura utilizando esta misma ruta [167,168].

El seguimiento *in vivo* por técnicas de resonancia mostró claramente que las células administradas se localizaron preferentemente adyacentes al ventrículo izquierdo. Estos resultados son de gran relevancia, ya que esta es la zona principalmente afectada en el infarto de miocardio [169], por lo que esta ruta podría proporcionar, inicialmente, una tasa de retención y una localización celular óptimas. Es interesante destacar que, según estudios previos realizados por nuestro grupo [170], la utilización de la vía intramiocárdica en el mismo modelo animal y bajo condiciones similares consiguió una distribución y retención celulares comparables a las obtenidas con la administración intrapericárdica.



Cabe mencionar también que el seguimiento *in vivo* mediante resonancia de las células marcadas con SPIO puede resultar algo controvertido, ya que las partículas libres de hierro pueden dar lugar a falsos positivos, como consecuencia de la exocitosis de SPIO desde las células vivas [171,172]. Además, otro problema bastante común es que, si las células mueren, las partículas magnéticas seguirán siendo detectadas en la RM y podrían ser internalizadas por otras células [173]. En este trabajo, nuestros resultados sugieren que, en condiciones preclínicas, el seguimiento de las células por RM puede realizarse a corto plazo durante al menos 7 días. Además, para excluir la posibilidad de que las partículas detectadas correspondan en realidad a falsos positivos, se realizaron estudios histológicos y un análisis por PCR. La amplificación del cromosoma Y, junto con la localización histológica de las partículas de SPIO, demostraron la presencia de MSCs en el miocardio. Sin embargo, aunque la presencia de MSCs queda demostrada por histología y por PCR, debemos asumir que algunas de las células SPIO-positivas observadas en las muestras tisulares podrían corresponder a células fagocíticas [174,175].

En relación a una anidación hipotéticamente ineficiente ligada al empleo de células madre exógenas, nuestros análisis histológicos y por PCR confirman claramente la presencia de las células administradas en diferentes localizaciones cardiacas, demostrando que las MSCs son capaces de migrar de manera eficiente desde el LP al tejido cardiaco. Adicionalmente, deberíamos considerar también que el drenaje linfático del LP podría actuar como una “puerta abierta” para las MSCs, resultando en una distribución sistémica de las células administradas de manera intrapericárdica.

En cuanto al aspecto inmunológico, se ha propuesto que la introducción de células madre exógenas podría ser obstaculizada por el rechazo inmune [176]. En el caso de la administración intrapericárdica, la respuesta inmune contra las células podría ser mediada por la activación de linfocitos en el saco pericárdico. De hecho, la presencia de linfocitos ha sido descrita en pacientes con diferentes enfermedades cardiacas [177]. Por ello, aunque las MSCs poseen una potente actividad inmunosupresora [49], no podría descartarse una hipotética respuesta contra las células

administradas. Para responder esta cuestión, nos propusimos realizar un segundo ensayo en modelo animal centrándonos en los aspectos inmunológicos tras la administración intrapericárdica de CDCs.

Uno de los parámetros que determinamos en este segundo ensayo fue el perfil fenotípico de los linfocitos aislados a partir del LP de los animales antes y después de la inyección de CDCs. Los resultados mostraron un incremento significativo del porcentaje de células CD4<sup>+</sup> tras la terapia; sin embargo, los porcentajes de células T CD8<sup>+</sup> y NKs no se vieron afectados por la administración celular. Estudios previos han demostrado que la administración alogénica de MSCs potencia la inducción de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>/Foxp3<sup>+</sup> [178]. El aumento de la subpoblación de células T CD4<sup>+</sup> en nuestros resultados podría corresponderse con la expansión *in vivo* de células T reguladoras, sin embargo, esta hipótesis deberá ser confirmada en futuros estudios.

En cuanto al análisis de los marcadores de activación en las poblaciones linfocitarias, se observó un descenso significativo en el porcentaje de células CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> en LP tras la administración de CDCs. Estas células CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> se han considerado como células T efectoras completamente diferenciadas [179] y positivas a perforina tal y como se ha descrito en cerdo [180]. Basándonos en estos resultados, podríamos asumir que el elevado porcentaje de células CD8<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup> en LP —medido 7 semanas tras la creación de infarto— podría ser consecuencia del microambiente inflamatorio existente tras el infarto de miocardio. Además, el descenso significativo de sus niveles —medido 30 días tras la administración celular— estaría poniendo de manifiesto la actividad inmunomoduladora de las CDCs, ejercida bajo condiciones de inflamación [181].

Por otra parte, estudios previos han demostrado en un amplio conjunto de pacientes que la presencia de linfocitos activados con un inmunofenotipo especial es frecuente en el LP de pacientes con diferentes variantes de enfermedad cardiaca que han sido sometidos a intervenciones a corazón abierto [177]. Nuestros resultados

están en consonancia con esta observación. De hecho, el porcentaje y fenotipo de las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el LP de los animales infartados es significativamente diferente a estos mismos porcentajes en sangre periférica.

En relación con el análisis bioquímico de los LP, la mayoría de los parámetros determinados no se vieron alterados por la terapia. Solamente los valores de fosfatasa alcalina, creatinina, proteína total y GGT mostraron diferencias significativas tras la administración de CDCs.

La fosfatasa alcalina está presente en muchos tejidos humanos y es un marcador ampliamente conocido de MSCs derivadas de médula ósea y células madre embrionarias [182–184]. Posiblemente, el incremento de fosfatasa alcalina en el LP a los 30 días postinyección, en comparación con los valores registrados antes de la inyección, podría considerarse una consecuencia de la presencia de CDCs en este fluido.

Aparte del aumento en fosfatasa alcalina, también se registró un incremento en los niveles de proteína total tras la administración de CDCs. Esto podría deberse, igualmente, a la presencia de las células transferidas o a las proteínas liberadas de manera paracrina por las mismas.

Por último, es importante denotar la disminución de GGT observada tras la inyección. Los niveles de esta enzima en suero se han utilizado en estudios previos para predecir la enfermedad cardíaca coronaria en un amplio cohorte de pacientes, hallándose una fuerte asociación entre niveles enzimáticos y enfermedad en pacientes de menos de 60 años de edad [185]. Los niveles de GGT han resultado ser también marcadores predictivos para el desarrollo de enfermedad cardiovascular [186]. Además, existe una relación directa entre los niveles de GGT séricos y el flujo de sangre coronaria [187], así como una clara asociación entre esta enzima y la severidad del fallo cardíaco [188]. De acuerdo con estos hallazgos clínicos, y teniendo en cuenta que en este estudio se realizó la determinación de GGT en LP y no en suero, podemos asumir que el descenso significativo de su concentración puede considerarse un indicador de buen pronóstico que podría reflejar una mejora de la función cardíaca.

Aparte del análisis de las subpoblaciones linfocitarias y de los parámetros bioquímicos en LP y sangre periférica, quisimos determinar también el efecto de la inyección intrapericárdica de CDCs sobre la concentración de citocinas. La limitada disponibilidad de anticuerpos monoclonales específicos para cerdo no nos permitió realizar un análisis en profundidad de la respuesta inflamatoria. En este sentido, únicamente se realizó la determinación un panel de citocinas compuesto por IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Entre los resultados más relevantes obtenidos en este análisis destaca la elevada presencia de IL-8 en LP, en comparación con sus niveles en suero. Este resultado concuerda con estudios similares realizados en pacientes sometidos a cirugía arterial coronaria, en los que se encontraron elevados niveles de IL-8 en LP, especialmente en aquellos pacientes que habían sufrido infarto de miocardio en las cuatro semanas previas al estudio, en comparación con pacientes con angina de pecho estable [189]. Además, teniendo en cuenta que esta citocina se ha relacionado con procesos inflamatorios locales en pacientes con efusión pericárdica [190], su presencia podría ser consecuencia de la respuesta inflamatoria normalmente ligada al infarto agudo de miocardio [191].

Por último, también se encontraron cambios significativos en los niveles de IFN- $\alpha$ . Esta citocina es secretada por fibroblastos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, células NKs y células T. Su descenso significativo en el espacio pericárdico tras la inyección de CDCs podría ser el reflejo de una mejora general en términos de activación inflamatoria. Además, existen estudios clínicos que han reportado una asociación entre el IFN- $\alpha$  y la pericarditis, estando esta última relacionada con terapias basadas en la administración de IFN- $\alpha$  [192–194].

Finalmente, en cuanto a la evaluación de los parámetros de funcionalidad cardiaca, la ausencia de una mejora de la funcionalidad, que contrasta con los cambios significativos observados en el proceso inflamatorio local, podría deberse al empleo de animales con un infarto de siete semanas. En este modelo, la cronicidad y el extenso tamaño del daño en el miocardio constituyen un serio obstáculo para la identifi-

cación de mejoras en la función cardíaca. Para abordar esta cuestión, será necesaria la realización de futuros estudios en modelos más agudos en los que las células puedan intervenir durante fases más tempranas de la remodelación adversa.

En conclusión, estos resultados demuestran que el LP es un vehículo óptimo para las MSCs, y que la vía intrapericárdica es adecuada para la administración de estas células. Esta ruta presenta una gran ventaja, consistente en la posibilidad de administración de grandes cantidades de células sin riesgo de oclusión vascular. Además, al contrario de lo que se produce en la administración intramiocárdica, donde el miocardio dañado no proporciona un microambiente adecuado para la supervivencia celular, la administración intrapericárdica asegura un microambiente óptimo para el mantenimiento de la viabilidad de las células administradas. Por último, los cambios en los parámetros inmunológicos evidencian la actividad inmunomoduladora de las células administradas, lo que beneficiaría de manera indirecta la reparación cardíaca endógena.

### BLOQUE III: ESTUDIO DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO

---

Las MSCs poseen propiedades inmunomoduladoras mediadas de manera directa por contacto célula-célula y de manera indirecta a través de la liberación de factores inmunosupresores. La liberación de estos factores se ve potenciada bajo condiciones inflamatorias, actuando sobre la función de células T —proliferación, diferenciación y citotoxicidad— [195] y B —proliferación y secreción de anticuerpos— [196], la citotoxicidad de células NK [50] y la maduración y activación de células dendríticas [197], así como en el incremento de células T reguladoras [198,199].

Los exosomas derivados de MSCs son unos prometedores agentes biológicos para el desarrollo de nuevas terapias libres de células. Actualmente, estas microvesículas se han probado en condiciones preclínicas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares [200], daño renal [201], enfermedad de injerto contra huésped [202] y patologías neurológicas [203], entre otras. A nivel clínico, y en relación con la actividad inmunosupresora de estas vesículas, los exo-MSCs se han ensayado en pacientes con enfermedad de injerto contra huésped, quienes experimentaron una mejora de sus síntomas durante 5 meses [204]. Además, desde un punto de vista inmunológico, también han conseguido mostrar actividad inmunomoduladora induciendo la tolerancia periférica [205] y modulando la respuesta inmune [206].

En este trabajo quisimos, en primer lugar, estudiar la actividad inmunomoduladora de los exo-MSCs en subpoblaciones de células T bajo condiciones *in vitro*. Para ello, las células T aisladas de donantes sanos se cultivaron y estimularon con anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28, como método para simular la estimulación producida por células presentadoras de antígeno [207]. Los parámetros que se estudiaron para evaluar la inmunomodulación fueron la actividad proliferativa de las células T, su diferenciación hacia células memoria y la funcionalidad en cuanto a producción de IFN- $\gamma$ .

Aunque se trata de resultados preliminares, en esta tesis se pone de manifiesto la capacidad de los exo-MSCs, para inhibir la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Estos resultados son similares a los obtenidos por O de la Rosa *et al.*, quienes utilizaron MSCs en cocultivo con PBLs humanos activados [195]. Además, otros estudios recientes han demostrado también que las MSCs inhiben la proliferación de células T mediante la señalización TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B [208]. En este sentido, en los próximos estudios relacionados con esta línea se evaluará si la actividad antiproliferativa de los exo-MSCs está también relacionada con la activación de NF- $\kappa$ B.

A continuación, y para confirmar la hipótesis de que los exo-MSCs podrían detener la diferenciación de células T hacia fenotipos efectores o memoria, las células T estimuladas *in vitro* se cultivaron en presencia de exo-MSCs y se monitorizó el perfil de diferenciación de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en función de la coexpresión de CD45RA y CCR7. La coexpresión de estos dos marcadores nos permitió diferenciar cuatro subpoblaciones linfocitarias: células T *naïve* (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>+</sup>), células T memoria-central (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>+</sup>) células T memoria-efectora (CD45RA<sup>-</sup>/CCR7<sup>-</sup>) y células T efectoras (CD45RA<sup>+</sup>/CCR7<sup>-</sup>). Nuestros resultados mostraron que los exo-MSCs interfieren en la diferenciación *in vitro* de los PBLs mediada por la estimulación con anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28. De hecho, los exo-MSCs ejercieron un efecto inhibitorio en la diferenciación hacia células T efectoras y células T memoria-efectora en las subpoblaciones CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, respectivamente. Estos resultados muestran de nuevo similitudes con otros estudios en los que se utilizaron MSCs con PBLs estimulados *in vitro* con toxoide tetánico, en los que las células T mostraron una reducción en la respuesta mediada por células T memoria [209].

Por último, la actividad inmunomoduladora de los exo-MSCs se determinó mediante la cuantificación del IFN- $\gamma$  intracelular en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Estos ensayos confirmaron que los exo-MSCs fueron capaces de reducir el contenido intracelular de IFN- $\gamma$  en los PBLs, de manera similar a estudios *in vitro* con hASCs, en los que estas redujeron significativamente —tanto en contacto directo

como separados en *transwells* — la producción de dicha citocina en células mononucleares de sangre periférica a través de la liberación de factores solubles [195].

Teniendo en cuenta que el IFN- $\gamma$  es determinante en desórdenes inflamatorios mediados por el sistema inmune, podemos asumir que los exo-MSCs serían útiles como vehículos para la inmunosupresión local. Además, en contraposición con la terapia celular, en la que la viabilidad, migración e implantación de las células se ve frecuentemente comprometida, el uso de exo-MSCs supone una gran ventaja a la hora de poder establecer dosis definidas y controladas [210]. Adicionalmente, diferentes autores han reportado la susceptibilidad de las MSCs alogénicas administradas frente a células T CD8<sup>+</sup> y NKs, lo que mantiene abierto el debate sobre el problema que esto podría suponer para la eficacia clínica de las MSCs [211]. Sin embargo, los exo-MSCs no se verían afectados por la lisis mediada por estas células, lo que constituye otra ventaja importante frente al uso de células.

Un aspecto que es necesario discutir en este punto es el papel de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC) en los exosomas. Pêche *et al.* han descrito que los exosomas derivados de células dendríticas de médula ósea (exo-DCs), como las células de las que proceden, expresan MHC clase I y clase II, así como moléculas coestimuladoras [102]. En experimentos *in vivo* realizados en rata se observaron respuestas regulatorias e inducción de tolerancia frente a aloinjertos cardiacos a través de la presentación de antígenos por el MHC de los exo-DCs del donante [103].

Por el contrario, la caracterización de exo-MSCs ha demostrado la ausencia de MHC clase II y moléculas coestimuladoras en estas microvesículas, lo cual resulta lógico dado que las MSCs son también negativas para estos marcadores. En cuanto al MHC clase I, la expresión de estas moléculas en MSCs es muy baja, y su presencia en exo-MSCs está aún en debate. De hecho, en Exocarta —una base de datos de proteínas exosomales, <http://www.exocarta.org>— no figura la presencia de HLA-A, HLA-B o HLA-C entre las 939 proteínas encontradas en exo-MSCs. Sin embargo, el



análisis proteómico de exosomas de MSCs derivadas de células madre embrionarias humanas sí mostró la presencia de moléculas de HLA-A [212].

Por otro lado, considerando que los ensayos clínicos que utilizan MSCs de manera alogénica no han causado rechazo inmunológico, podría asumirse que los exosomas de MSCs no activadas utilizados de manera alogénica podrían tener consecuencias similares. La ausencia de MHC clase II y moléculas coestimuladoras en los exo-MSCs podría indicar también que estas vesículas ejercen una inhibición directa sobre las células T, siendo independiente de la presentación de antígeno. Sin embargo, aunque el efecto inhibitor se estudió únicamente de manera alogénica, en un futuro se llevarán a cabo experimentos para determinar si este efecto es más acentuado sobre células T autólogas.

Las limitaciones de este trabajo están relacionadas con el carácter *in vitro* de las determinaciones realizadas. En un futuro, se planea realizar estudios conducentes a comprobar estos efectos en un modelo *in vivo*, lo que ayudará también a determinar la vía de administración, dosis y frecuencia para terapias basadas en exo-MSCs.

No obstante, como paso previo al traslado de esta terapia a modelo animal quisimos, una vez constatado el potencial inmunomodulador de los exo-MSCs, realizar una comparativa entre diferentes protocolos de aislamiento de exosomas. Con ello, buscamos establecer una metodología que proporcionara una alternativa a los métodos tradicionales basados en la ultracentrifugación, y que estuviera orientada a una producción de exosomas mediante un protocolo más estandarizado y extrapolable a la práctica clínica.

El primero de los protocolos incluidos en este estudio comparativo se basa en el empleo de concentradores de 3000 Da MWCO. Este tipo de concentradores se ha utilizado previamente para la obtención de concentrados de exosomas procedentes de distintos tipos celulares [213]. El segundo protocolo presenta grandes similitudes con el primero, pero en este lugar se utilizaron concentradores de 50000 Da MWCO, empleados con anterioridad para el aislamiento de exosomas

tumorales [214] y procedentes de orina [215]. Por último, se incluyó un protocolo de aislamiento de exosomas basado en la ultracentrifugación, el método de purificación más ampliamente descrito para el aislamiento de estas microvesículas [216–218].

El estudio realizado comparó los tres protocolos en términos de concentración de proteína total, de concentración y tamaño de las partículas y de análisis proteómico. Los resultados obtenidos indican que el uso de concentradores comerciales con un menor tamaño de poro (3000 Da MWCO) y centrifugados a menor velocidad permite la obtención de un mayor número de exosomas con menor tamaño y mayor pureza. Esta observación está en consonancia con el trabajo publicado por Cvjetkovic *et al.*, en el que los autores comparan la influencia del rotor y el tiempo de centrifugación en el aislamiento y purificación de microvesículas. En dicho trabajo se sugiere que deberían evitarse centrifugaciones demasiado largas —superiores a 4 horas— para reducir la contaminación excesiva de proteínas solubles. También se observó que tiempos muy inferiores a 70 minutos resultan insuficientes para el aislamiento de exosomas [219].

Por otro lado, los resultados de concentración y pureza en las muestras aisladas mediante el protocolo basado en la ultracentrifugación fueron los más bajos. En relación con esta metodología, es importante señalar que en este trabajo se ha aplicado la ultracentrifugación sin gradiente de densidad en sacarosa, aunque algunos estudios describen ultracentrifugaciones empleando una solución de sacarosa al 30 %. De acuerdo con experiencias previas, el rendimiento obtenido en el aislamiento de exo-MSCs empleando gradientes de densidad de sacarosa a este porcentaje es significativamente inferior que sin ellos (datos no mostrados). Puesto que el objetivo principal de este trabajo era comparar diferentes métodos de aislamiento de exosomas para su futura aplicación clínica, se decidió descartar el método de aislamiento de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Este método, a pesar de proporcionar un alto grado de pureza, presentaba unos rendimientos demasiado bajos para su posterior aplicación clínica.

En este sentido, es importante destacar un aspecto relacionado con la pureza de las muestras obtenidas mediante ultracentrifugación. Los resultados obtenidos mostraron que entre las partículas aisladas empleando esta metodología, existían algunas mayores de 220 nm. Estos resultados resultan llamativos si se tiene en cuenta que los sobrenadantes ultracentrifugados han sido sometidos a un proceso de filtración empleando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ , aunque similares perfiles de tamaño se han observado en el caso de exosomas derivados de placenta aislados mediante ultracentrifugación [220]. En el caso de los exosomas de placenta, se demuestra que las muestras ultracentrifugadas y previamente filtradas a 0.22  $\mu\text{m}$  daban como resultado un perfil de vesículas con tamaños superiores a 220 nm. El grado de pureza, sin embargo, se incrementó significativamente cuando los sobrenadantes fueron sometidos a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, obteniéndose partículas con un tamaño entre 50 y 150 nm.

Tanto los resultados publicados por Sarker S *et al.* [220] como los publicados en el presente trabajo parecen indicar que los aislamientos realizados mediante ultracentrifugación sin gradiente de sacarosa dan como resultado una población de vesículas de tamaño heterogéneo, con partículas de elevado tamaño, en comparación con los aislamientos realizados empleando gradientes de sacarosa. El hecho de que puedan ser detectadas vesículas con tamaños superiores a 0.22  $\mu\text{m}$  —a pesar del prefiltrado de los sobrenadantes— podría deberse a un proceso de agregación de vesículas tras el aislamiento [221].

Un aspecto favorable acerca del uso de concentradores frente al uso de métodos basados en la ultracentrifugación radica en el coste, ya que la ultracentrifugación requiere la adquisición de equipos costosos. Por el contrario, los protocolos en los que se emplean filtros concentradores únicamente requieren centrífugas convencionales de menor coste y ampliamente disponibles en clínicas, hospitales y centros de investigación.

Por último, es importante resaltar el creciente interés de la industria en la producción de vesículas extracelulares. A día de hoy, tres empresas —Capricor Inc., Anosys Inc. y ReNeuron Group PLC— se están especializando en el desarrollo de terapias basadas en vesículas extracelulares aisladas de diferentes fuentes —células derivadas de cardiosferas, células madre neurales y células dendríticas, respectivamente—. Sorprende que, a pesar del potencial terapéutico de estas vesículas, el impacto que tienen actualmente en la industria y en el desarrollo de ensayos clínicos sea aún muy limitado.

Una de las razones que limitan la incorporación de las vesículas extracelulares en ensayos clínicos es la necesidad de un proceso de estandarización para su aislamiento. En este sentido, aunque la ultracentrifugación se ha considerado tradicionalmente como el método que proporciona un mayor grado de pureza en el aislamiento de exosomas, este método, desde el punto de vista industrial, es costoso en términos de tiempo y energía.

En los últimos años han comenzado a comercializarse *kits* para el aislamiento de exosomas como ExoQuick —precipitación en columna polimérica—, Exo-spin —centrifugación a través de resina— o las columnas qEV de exclusión por tamaño. La ventaja principal de estos métodos comerciales radica en la rapidez de los aislamientos, aunque suponen un considerable encarecimiento del proceso y, además, ninguno de ellos ha podido resolver de manera eficiente el problema de la heterogeneidad de las partículas aisladas, obteniéndose también partículas no exosomales en los concentrados finales [222].

Otro de los métodos usados para el aislamiento de exosomas es la captura por inmovilización, usando principalmente anticuerpos antitetraspaninas. Este método, sin embargo, presenta numerosas limitaciones, ya que los anticuerpos pueden unirse covalentemente a otras partículas. Aun así, este método proporciona una elevada especificidad frente a otras técnicas [223], ofreciendo mejores resultados que los métodos basados en la ultracentrifugación y en la separación por gradientes de densidad [224].

Consideramos que los métodos basados en la ultrafiltración podrían ser una buena alternativa para el procesamiento a gran escala de sobrenadantes de cultivos celulares, aunque aún es necesario establecer qué tipo de concentradores es el más apropiado para el aislamiento de exosomas. En general, la concentración de partículas obtenidas es considerablemente menor con dispositivos concentradores de baja presión en comparación con dispositivos concentradores mediante centrifugación [222]. Además, para una aplicación terapéutica este material biológico debe ser producido bajo condiciones controladas y siguiendo la normativa de buenas prácticas de manufactura (*Good Manufacturing Practice, GMP*). El establecimiento de GMP para la obtención de exosomas con métodos de filtración requiere unos controles de calidad que tengan en cuenta el tamaño de las vesículas, presencia/ausencia de marcadores bioquímicos, ausencia de contaminantes como agregados de proteínas, esterilidad y estabilidad del producto final, métodos para optimizar el almacenamiento del producto y por último, métodos analíticos que sirvan para controlar todos los aspectos anteriormente enumerados [225].

A pesar de que el trabajo aquí presentado, al tratarse de un desarrollo experimental *in vitro*, tiene evidentes limitaciones, consideramos que el aspecto más interesante y novedoso de los resultados radica en el enfoque hacia una futura aplicación clínica de los exosomas derivados de MSCs.

En resumen, en este trabajo se demuestra un paralelismo entre los exo-MSCs y las MSCs en términos de inmunomodulación, siendo dichas partículas prometedoras candidatas para su futura aplicación clínica en el contexto del tratamiento de enfermedades de base inflamatoria. Por otro lado, el desarrollo de protocolos de aislamiento de exosomas estandarizados y bajo la normativa de buenas prácticas de manufactura tendrá un impacto muy favorable para la futura aplicación de estas terapias en el ámbito clínico.



# Conclusiones • • • •

1. El uso de suturas tratadas con poli-L-lisina y recubiertas con MSCs asegura la presencia de las células en el tejido suturado y mejora la deposición de colágeno en modelo murino.
2. Las mallas quirúrgicas tratadas con poli-L-lisina y recubiertas con MSCs han demostrado ser un producto terapéutico seguro en modelo murino, proporcionando un microambiente antiinflamatorio mediado por la polarización de macrófagos hacia fenotipo M2.
3. El líquido pericárdico es un vehículo adecuado para el mantenimiento de la viabilidad de las MSCs. Estas células, administradas de manera intrapericárdica en modelo porcino, son detectable durante al menos 7 días en tejido cardíaco y pericardio.
4. La administración intrapericárdica de CDCs en modelo porcino provoca cambios en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias, así como un descenso de IFN- $\alpha$ , demostrando la actividad inmunomoduladora de estas células.
5. Los exosomas derivados de MSCs ejercen un efecto inhibitor sobre la activación de las células T *in vitro*, comparable a la inmunomodulación mediada por MSCs.
6. El empleo de concentradores de bajo peso molecular para el aislamiento de exosomas permite la obtención de una elevada concentración de estas microvesículas, y facilitaría la aplicabilidad clínica de estas terapias al constituir un método sencillo y reproducible.





## Conclusions • • • •

1. The combined use of poly-L-lysine treated sutures with MSCs favors the implantation of these cells in the sutured tissue and enhances the collagen deposition in a murine model.
2. Poly-L-lysine treated surgical meshes coated with MSCs have demonstrated their safety in a murine model, providing an anti-inflammatory environment mediated by M2 macrophage polarization.
3. Pericardial fluid provides an adequate environment for MSCs viability. Intrapericardially administrated MSCs are detectable in cardiac tissue and pericardium for at least 7 days.
4. The intrapericardial administration of CDCs in a porcine model triggers different changes in the distribution of lymphocyte subsets and a decrease in IFN- $\alpha$  levels, demonstrating the immunomodulatory activity of these cells.
5. MSCs-derived exosomes have an inhibitory effect on the activation of *in vitro* stimulated T cells, which is comparable to MSCs-mediated immunomodulation.
6. The isolation of exosomes using low molecular weight concentrators provides a high concentration of these microvesicles. This is a simple and replicable method to be applied in clinical practice.



## Bibliografía • • • •

1. Chaparro O, Beltrán O. Reprogramación nuclear y células pluripotentes inducidas. *Rev Med Fac Med*. 2009;17: 252–263.
2. William JM, Petersen BE. Origin, evolution and direction of human somatic cell therapy. *Cell Therapy*. Madrid, Spain: McGraw-Hill Interamericana de España S.L.; 2007. pp. 3–14.
3. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for human somatic cell therapy and gene therapy. *Hum Gene Ther*. 2001;12: 303–314. doi:10.1089/10430340150218431
4. American Society of Gene & Cell Therapy. Gene Therapy and Cell Therapy Defined [Internet]. [cited 21 Jul 2016]. Available: <http://www.asgct.org/general-public/educational-resources/gene-therapy--and-cell-therapy-defined>
5. Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Somatic cell reprogramming and transitions between pluripotent states: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010;143: 508–525. doi:10.1016/j.cell.2010.10.008
6. Kolios G, Moodley Y. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respir Int Rev Thorac Dis*. 2013;85: 3–10. doi:10.1159/000345615
7. Gómez-Mauricio, R.G. Caracterización y evaluación del potencial terapéutico de células madre mesenquimales obtenidas de tejido adiposo en el tratamiento del infarto agudo de miocardio en modelo porcino. Universidad de Salamanca. 2012.
8. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126: 663–676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
9. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131: 861–872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
10. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318: 1917–1920. doi:10.1126/science.1151526
11. Yoshida Y, Yamanaka S. iPS cells: a source of cardiac regeneration. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;50: 327–332. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.10.026

12. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284: 143–147.
13. Dominici M, Blanc KL, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*. 2006;8: 315–317. doi:10.1080/14653240600855905
14. Raveh-Amit H, Berzsenyi S, Vas V, Ye D, Dinnyes A. Tissue resident stem cells: till death do us part. *Biogerontology*. 2013;14: 573–590. doi:10.1007/s10522-013-9469-9
15. Pelacho B, Mazo M, Gavira JJ, Prósper F. Adult stem cells: from new cell sources to changes in methodology. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011;4: 154–160. doi:10.1007/s12265-010-9245-z
16. Matri M, Lin H, Lee T. Enhancing the efficacy of mesenchymal stem cell therapy. *World J Stem Cells*. 2014;6: 82–93. doi:10.4252/wjsc.v6.i2.82
17. Gao F, Chiu SM, Motan D a. L, Zhang Z, Chen L, Ji H-L, et al. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis*. 2016;7: e2062. doi:10.1038/cddis.2015.327
18. Najar M, Raicevic G, Fayyad-Kazan H, Bron D, Toungouz M, Lagneaux L. Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytherapy*. 2016;18: 160–171. doi:10.1016/j.jcyt.2015.10.011
19. Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother*. 2016;2: 3–20. doi:10.1016/j.jocit.2014.12.001
20. Bolli R, Ghafghazi S. Cell therapy needs rigorous translational studies in large animal models. *J Am Coll Cardiol*. 2015;66: 2000–2004. doi:10.1016/j.jacc.2015.09.002
21. International Society for Stem Cell Research (ISSCR). Guidelines for stem cell research and clinical translation. 2016; Available: <http://www.isscr.org/guidelines2016>
22. Harding J, Roberts RM, Mirochnitchenko O. Large animal models for stem cell therapy. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4: 23. doi:10.1186/scrt171
23. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2015;17: 11–22. doi:10.1016/j.stem.2015.06.007

24. Trounson A, Thakar RG, Lomax G, Gibbons D. Clinical trials for stem cell therapies. *BMC Med.* 2011;9: 52.
25. Daley GQ. The promise and perils of stem cell therapeutics. *Cell Stem Cell.* 2012;10: 740–749. doi:10.1016/j.stem.2012.05.010
26. Li MD, Atkins H, Bubela T. The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med.* 2014;9: 27–39. doi:10.2217/rme.13.80
27. Mingmalairak C, Ungbhakorn P, Paocharoen V. Efficacy of antimicrobial coating suture coated polyglactin 910 with tricosan (Vicryl plus) compared with polyglactin 910 (Vicryl) in reduced surgical site infection of appendicitis, double blind randomized control trial, preliminary safety report. *J Med Assoc Thail Chotmaihet Thangphaet.* 2009;92: 770–775.
28. Stadler S, Fleck T. Triclosan-coated sutures for the reduction of sternal wound infections? A retrospective observational analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2011;13: 296–299. doi:10.1510/icvts.2011.269001
29. Rijcken E, Fuchs T, Sachs L, Kersting CM, Bruewer M, Kriegelstein CF. Insulin-like growth factor 1-coated sutures improve anastomotic healing in an experimental model of colitis. *Br J Surg.* 2010;97: 258–265. doi:10.1002/bjs.6781
30. Uggen C, Dines J, McGarry M, Grande D, Lee T, Limpisvasti O. The effect of recombinant human platelet-derived growth factor BB-coated sutures on rotator cuff healing in a sheep model. *Arthrosc J Arthrosc Relat Surg Off Publ Arthrosc Assoc N Am Int Arthrosc Assoc.* 2010;26: 1456–1462. doi:10.1016/j.arthro.2010.02.025
31. Pasternak B, Missios A, Askendal A, Tengvall P, Aspenberg P. Doxycycline-coated sutures improve the suture-holding capacity of the rat Achilles tendon. *Acta Orthop.* 2007;78: 680–686. doi:10.1080/17453670710014392
32. Pasternak B, Rehn M, Andersen L, Agren MS, Heegaard A-M, Tengvall P, et al. Doxycycline-coated sutures improve mechanical strength of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2008;23: 271–276. doi:10.1007/s00384-007-0401-0
33. Shibuya TY, Wei WZ, Zormeier M, Ensley J, Sakr W, Mathog RH, et al. Anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibody-coated suture enhances the immune response of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125: 1229–1234.
34. Shibuya TY, Kim S, Nguyen K, Do J, McLaren CE, Li K-T, et al. Bioactive suture: a novel immunotherapy for head and neck cancer. *Clin Cancer Res Off J*

- Am Assoc Cancer Res. 2004;10: 7088–7099. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0052
35. Pascual I, Fernández de Miguel G, García Arranz M, García-Olmo D. Biosutures improve healing of experimental weak colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis.* 2010;25: 1447–1451. doi:10.1007/s00384-010-0952-3
  36. Dolce CJ, Stefanidis D, Keller JE, Walters KC, Newcomb WL, Heath JJ, et al. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. *Surg Endosc.* 2010;24: 2687–2693. doi:10.1007/s00464-010-1026-x
  37. Lee ES, Na K, Bae YH. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J Control Release Off J Control Release Soc.* 2003;91: 103–113.
  38. Park GE, Pattison MA, Park K, Webster TJ. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26: 3075–3082. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.08.005
  39. Kim W-S, Park B-S, Sung J-H, Yang J-M, Park S-B, Kwak S-J, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci.* 2007;48: 15–24. doi:10.1016/j.jdermsci.2007.05.018
  40. Cooper K, Viswanathan C. Establishment of a mesenchymal stem cell bank. *Stem Cells Int.* 2011;2011: 905621. doi:10.4061/2011/905621
  41. Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol.* 2013;228: 680–687. doi:10.1002/jcp.24223
  42. Zogbi L. The Use of Biomaterials to Treat Abdominal Hernias. In: Pignatello R, editor. *Biomaterials Applications for Nanomedicine.* InTech; 2011. Available: <http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/the-use-of-biomaterials-to-treat-abdominal-hernias>
  43. Brown C, Finch J. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl.* 2010;92: 272–278. doi:10.1308/003588410X12664192076296
  44. Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials.* 1998;19: 2235–2246.
  45. Engelsman AF, van der Mei HC, Ploeg RJ, Busscher HJ. The phenomenon of infection with abdominal wall reconstruction. *Biomaterials.* 2007;28: 2314–2327. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.01.028

46. Barski D, Gerullis H, Georgas E, Bär A, Lammers B, Ramon A, et al. Coating of mesh grafts for prolapse and urinary incontinence repair with autologous plasma: exploration stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int.* 2014;2014: 296498. doi:10.1155/2014/296498
47. Gerullis H, Georgas E, Eimer C, Arndt C, Barski D, Lammers B, et al. Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int.* 2013;2013: 536814. doi:10.1155/2013/536814
48. Junge K, Rosch R, Klinge U, Saklak M, Klosterhalfen B, Peiper C, et al. Titanium coating of a polypropylene mesh for hernia repair: effect on biocompatibility. *Hernia J Hernias Abdom Wall Surg.* 2005;9: 115–119. doi:10.1007/s10029-004-0292-8
49. Casado JG, Tarazona R, Sanchez-Margallo FM. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. *Stem Cell Rev.* 2013;9: 184–189. doi:10.1007/s12015-013-9430-y
50. DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev.* 2012;21: 1333–1343. doi:10.1089/scd.2011.0139
51. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Millo E, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells.* 2008;26: 1275–1287. doi:10.1634/stemcells.2007-0878
52. Rasmusson I, Uhlin M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol.* 2007;82: 887–893. doi:10.1189/jlb.0307140
53. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells.* 2009;27: 693–702. doi:10.1634/stemcells.2008-0687
54. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev.* 2007;16: 719–731. doi:10.1089/scd.2007.0065
55. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation.* 2007;83: 71–76. doi:10.1097/01.tp.0000244572.24780.54

56. Chen L, Tredget EE, Wu PYG, Wu Y. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PloS One*. 2008;3: e1886. doi:10.1371/journal.pone.0001886
57. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, et al. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012;29: 1614–1625. doi:10.1089/neu.2011.2109
58. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011;109: 923–940. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.243147
59. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *BioMed Res Int*. 2013;2013: 547902. doi:10.1155/2013/547902
60. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011;4: 145–153. doi:10.1007/s12265-010-9246-y
61. Plant AL, Parker GC. Translating stem cell research from the bench to the clinic: a need for better quality data. *Stem Cells Dev*. 2013;22: 2457–2458. doi:10.1089/scd.2013.0188
62. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PloS One*. 2012;7: e47559. doi:10.1371/journal.pone.0047559
63. Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later. *Stem Cells Dev*. 2010;19: 1109–1120. doi:10.1089/scd.2009.0465
64. Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Korevaar SS, Engela AU, Weimar W, Baan CC. Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther*. 2011;22: 1587–1591. doi:10.1089/hum.2011.039
65. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012;18: 128–134. doi:10.1016/j.molmed.2011.10.004
66. Vanelli A. Isolation, characterization and differentiation potential of cardiac progenitor cells in adult pigs. Università degli Studi di Milano. 2011.
67. Davis DR, Kizana E, Terrovitis J, Barth AS, Zhang Y, Smith RR, et al. Isolation and expansion of functionally-competent cardiac progenitor cells direct-



- ly from heart biopsies. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49: 312–321. doi:10.1016/j.yjmcc.2010.02.019
68. Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens. *Circulation.* 2007;115: 896–908. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655209
69. Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee S-T, Smith RR, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 2009;120: 1075–1083. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058
70. Lee S-T, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 2011;57: 455–465. doi:10.1016/j.jacc.2010.07.049
71. Smith RR, Marbán E, Marbán L. Enhancing retention and efficacy of cardiosphere-derived cells administered after myocardial infarction using a hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomatter.* 2013;3: e24490.
72. Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUtologous stem CELls to reverse ventricUlar dyS-function). *J Am Coll Cardiol.* 2014;63: 110–122. doi:10.1016/j.jacc.2013.08.724
73. Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet.* 2012;379: 895–904. doi:10.1016/S0140-6736(12)60195-0
74. Kapelios CJ, Nanas JN, Malliaras K. Allogeneic cardiosphere-derived cells for myocardial regeneration: current progress and recent results. *Future Cardiol.* 2016;12: 87–100. doi:10.2217/fca.15.72
75. Huang NF, Lam A, Fang Q, Sievers RE, Li S, Lee RJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium. *Regen Med.* 2009;4: 527–538. doi:10.2217/rme.09.32
76. Campbell NG, Suzuki K. Cell delivery routes for stem cell therapy to the heart: current and future approaches. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012;5: 713–726. doi:10.1007/s12265-012-9378-3

77. Sanganalmath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013;113: 810–834. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300219
78. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006;27: 1114–1122. doi:10.1093/eurheartj/ehi818
79. Van Ramshorst J, Rodrigo SF, Schaliij MJ, Beeres SLMA, Bax JJ, Atsma DE. Bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: the past and the future. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4: 182–191. doi:10.1007/s12265-010-9249-8
80. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011;4: 177–181. doi:10.1007/s12265-010-9253-z
81. Fukushima S, Sawa Y, Suzuki K. Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart. *Future Cardiol.* 2013;9: 215–227. doi:10.2217/fca.12.85
82. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation.* 2007;115: 2254–2261. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.662577
83. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008;132: 598–611. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038
84. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003;108: 863–868. doi:10.1161/01.CIR.0000084828.50310.6A
85. Grieve SM, Bhindi R, Seow J, Doyle A, Turner AJ, Tomka J, et al. Microvascular Obstruction by Intracoronary Delivery of Mesenchymal Stem Cells and Quantification of Resulting Myocardial Infarction by Cardiac Magnetic Resonance. *Circ Heart Fail.* 2010;3: e5–e6. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931360
86. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intracoronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004;363: 783–784. doi:10.1016/S0140-6736(04)15695-X

87. Sun F, Sánchez FM, Fernández-Portales J, Crisóstomo V, Díaz-Güemes I, Báez-Díaz C, et al. Chronic intrapericardial catheterization for repeated drug delivery: technical feasibility study in the Göttingen minipig. *J Invasive Cardiol.* 2012;24: 210–214.
88. Sun F, Sánchez FM, Crisóstomo V, Luis L, Usón J, Maynar M. Subxiphoid access to normal pericardium with micropuncture set: technical feasibility study in pigs. *Radiology.* 2006;238: 719–724. doi:10.1148/radiol.2382042182
89. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Xu X, Sellke FW. Intrapericardial administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution and comparison with intracoronary and intravenous administration. *Catheter Cardiovasc Interv Off J Soc Card Angiogr Interv.* 2003;58: 375–381. doi:10.1002/ccd.10378
90. Fei L, Baron AD, Henry DP, Zipes DP. Intrapericardial delivery of L-arginine reduces the increased severity of ventricular arrhythmias during sympathetic stimulation in dogs with acute coronary occlusion: nitric oxide modulates sympathetic effects on ventricular electrophysiological properties. *Circulation.* 1997;96: 4044–4049.
91. Xiao Y-F, Sigg DC, Ujhelyi MR, Wilhelm JJ, Richardson ES, Iaizzo PA. Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008;294: H2212–2218. doi:10.1152/ajpheart.91502.2007
92. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD, et al. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;292: 795–802.
93. Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: A compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics.* 2009;9: 4997–5000. doi:10.1002/pmic.200900351
94. Raimondo F, Morosi L, Chinello C, Magni F, Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics.* 2011;11: 709–720. doi:10.1002/pmic.201000422
95. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles.* 2013;2. doi:10.3402/jev.v2i0.20360
96. Kittel A, Falus A, Buzás E. Microencapsulation technology by nature: Cell derived extracellular vesicles with therapeutic potential. *Eur J Microbiol Immunol.* 2013;3: 91–96. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.2.1

97. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine*. 2009;27: 1750–1757. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.022
98. Kuate S, Cinatl J, Doerr HW, Uberla K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology*. 2007;362: 26–37. doi:10.1016/j.virol.2006.12.011
99. Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernández-García H, Villalba M, Théry C, et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;181: 1519–1525. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1519
100. Cai Z, Zhang W, Yang F, Yu L, Yu Z, Pan J, et al. Immunosuppressive exosomes from TGF- $\beta$ 1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells. *Cell Res*. 2012;22: 607–610. doi:10.1038/cr.2011.196
101. Yin W, Ouyang S, Li Y, Xiao B, Yang H. Immature dendritic cell-derived exosomes: a promise subcellular vaccine for autoimmunity. *Inflammation*. 2013;36: 232–240. doi:10.1007/s10753-012-9539-1
102. Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*. 2003;76: 1503–1510. doi:10.1097/01.TP.0000092494.75313.38
103. Pêche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant*. 2006;6: 1541–1550. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01344.x
104. Viaud S, Théry C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res*. 2010;70: 1281–1285. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3276
105. Besse B, Charrier M, Lapierre V, Dansin E, Lantz O, Planchard D, et al. Dendritic cell-derived exosomes as maintenance immunotherapy after first line chemotherapy in NSCLC. *Oncoimmunology*. 2015;5: e1071008. doi:10.1080/2162402X.2015.1071008
106. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2008;16: 782–790. doi:10.1038/mt.2008.1

107. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med.* 2011;6: 481–492. doi:10.2217/rme.11.35
108. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, et al. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res.* 2011;109: 724–728. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253286
109. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci.* 2014;15: 4142–4157. doi:10.3390/ijms15034142
110. Chimenti I, Smith RR, Li T-S, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res.* 2010;106: 971–980. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210682
111. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol.* 2013;6: e26631. doi:10.4161/cib.26631
112. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM, Anderson CR. Body surface area of female swine. *J Anim Sci.* 1973;36: 927–930.
113. Volpe BB, Santos Duarte A da S, Ribeiro TB, Stocchero I, Kharmandayan P, Olalla Saad ST, et al. Mesenchymal stromal cells from adipose tissue attached to suture material enhance the closure of enterocutaneous fistulas in a rat model. *Cytotherapy.* 2014;16: 1709–1719. doi:10.1016/j.jcyt.2014.08.004
114. Yao J, Woon CY-L, Behn A, Korotkova T, Park D-Y, Gajendran V, et al. The effect of suture coated with mesenchymal stem cells and bioactive substrate on tendon repair strength in a rat model. *J Hand Surg.* 2012;37: 1639–1645. doi:10.1016/j.jhssa.2012.04.038
115. Adas G, Arikan S, Karatepe O, Kemik O, Ayhan S, Karaoz E, et al. Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Langenbecks Arch Surg Dtsch Ges Für Chir.* 2011;396: 115–126. doi:10.1007/s00423-010-0717-z
116. Park K, Cho K-J, Kim J-J, Kim I-H, Han DK. Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci.* 2009;9: 221–229. doi:10.1002/mabi.200800187
117. Kim H, Kim HW, Suh H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2003;24: 4671–4679.
118. Yang HN, Park JS, Woo DG, Jeon SY, Do H-J, Lim H-Y, et al. C/EBP- $\alpha$  and C/EBP- $\beta$ -mediated adipogenesis of human mesenchymal stem cells (hMSCs)

- using PLGA nanoparticles complexed with poly(ethylamine). *Biomaterials*. 2011;32: 5924–5933. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.04.072
119. Zhu S, Zhang B, Man C, Ma Y, Liu X, Hu J. Combined Effects of Connective Tissue Growth Factor-modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and NaOH-treated PLGA Scaffolds on Repair of Articular Cartilage Defect in Rabbits. *Cell Transplant*. 2013; doi:10.3727/096368913X6697790
120. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2007;25: 2648–2659. doi:10.1634/stemcells.2007-0226
121. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol*. 2011;6: 457–478. doi:10.1146/annurev-pathol-011110-130230
122. Yao J, Korotkova T, Riboh J, Chong A, Chang J, Smith RL. Bioactive sutures for tendon repair: assessment of a method of delivering pluripotential embryonic cells. *J Hand Surg*. 2008;33: 1558–1564. doi:10.1016/j.jhsa.2008.06.010
123. Kuo Y-C, Chung C-Y. Chondrogenesis in scaffolds with surface modification of elastin and poly-L-lysine. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2012;93: 85–91. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.12.011
124. Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2005;19: 1561–1563. doi:10.1096/fj.04-2978fje
125. DeLany JP, Floyd ZE, Zvonic S, Smith A, Gravois A, Reiners E, et al. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2005;4: 731–740. doi:10.1074/mcp.M400198-MCP200
126. Kratchmarova I, Kalume DE, Blagoev B, Scherer PE, Podtelejnikov AV, Molina H, et al. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics MCP*. 2002;1: 213–222.
127. Fletcher J. The role of collagen in wound healing. *Prof Nurse Lond Engl*. 2000;15: 527–530.
128. Landsman A, Taft D, Riemer K. The role of collagen bioscaffolds, foamed collagen, and living skin equivalents in wound healing. *Clin Podiatr Med Surg*. 2009;26: 525–533. doi:10.1016/j.cpm.2009.08.012



129. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther Off Publ Eur Soc Laser Dermatol*. 2003;5: 25–34. doi:10.1080/14764170305499
130. Beare AHM, O’Kane S, Krane SM, Ferguson MWJ. Severely impaired wound healing in the collagenase-resistant mouse. *J Invest Dermatol*. 2003;120: 153–163. doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12019.x
131. Lee K-Y, Huang SM, Li S, Kim J-M. Identification of differentially expressed genes in papillary thyroid cancers. *Yonsei Med J*. 2009;50: 60–67. doi:10.3349/ymj.2009.50.1.60
132. Butala P, Szpalski C, Soares M, Davidson EH, Knobel D, Warren SM. Zmpste24-/- mouse model for senescent wound healing research. *Plast Reconstr Surg*. 2012;130: 788e–798e. doi:10.1097/PRS.0b013e31826d102b
133. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 2014;6: 265sr6. doi:10.1126/scitranslmed.3009337
134. Yeum CE, Park EY, Lee S-B, Chun H-J, Chae G-T. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013;7: 279–291. doi:10.1002/term.521
135. Badiavas AR, Badiavas EV. Potential benefits of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for wound healing. *Expert Opin Biol Ther*. 2011;11: 1447–1454. doi:10.1517/14712598.2011.606212
136. Bilsel Y, Abci I. The search for ideal hernia repair; mesh materials and types. *Int J Surg Lond Engl*. 2012;10: 317–321. doi:10.1016/j.ijssu.2012.05.002
137. Rogo-Gupta L. Current trends in surgical repair of pelvic organ prolapse. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2013;25: 395–398. doi:10.1097/GCO.0b013e3283648cfb
138. Kirby AC, Nager CW. Indications, contraindications, and complications of mesh in the surgical treatment of urinary incontinence. *Clin Obstet Gynecol*. 2013;56: 257–275. doi:10.1097/GRF.0b013e31828563d2
139. Śmietański M, Śmietańska IA, Modrzejewski A, Simons MP, Aufenacker TJ. Systematic review and meta-analysis on heavy and lightweight polypropylene mesh in Lichtenstein inguinal hernioplasty. *Hernia J Hernias Abdom Wall Surg*. 2012;16: 519–528. doi:10.1007/s10029-012-0930-5

140. Knaän-Shanzer S. Concise review: the immune status of mesenchymal stem cells and its relevance for therapeutic application. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2014;32: 603–608. doi:10.1002/stem.1568
141. Wang Y, Chen X, Cao W, Shi Y. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat Immunol*. 2014;15: 1009–1016. doi:10.1038/ni.3002
142. DelaRosa O, Dalemans W, Lombardo E. Mesenchymal stem cells as therapeutic agents of inflammatory and autoimmune diseases. *Curr Opin Biotechnol*. 2012;23: 978–983. doi:10.1016/j.copbio.2012.05.005
143. Swartzlander MD, Blakney AK, Amer LD, Hankenson KD, Kyriakides TR, Bryant SJ. Immunomodulation by mesenchymal stem cells combats the foreign body response to cell-laden synthetic hydrogels. *Biomaterials*. 2015;41: 79–88. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.11.020
144. Gao S, Mao F, Zhang B, Zhang L, Zhang X, Wang M, et al. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- $\kappa$ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2014;239: 366–375. doi:10.1177/1535370213518169
145. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol Ther J Am Soc Gene Ther*. 2012;20: 14–20. doi:10.1038/mt.2011.211
146. Cho D-I, Kim MR, Jeong H, Jeong HC, Jeong MH, Yoon SH, et al. Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med*. 2014;46: e70. doi:10.1038/emm.2013.135
147. Geng Y, Zhang L, Fu B, Zhang J, Hong Q, Hu J, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5: 80. doi:10.1186/scrt469
148. Brodbeck WG, Voskerician G, Ziats NP, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM. In vivo leukocyte cytokine mRNA responses to biomaterials are dependent on surface chemistry. *J Biomed Mater Res A*. 2003;64: 320–329. doi:10.1002/jbm.a.10425
149. Brodbeck WG, Nakayama Y, Matsuda T, Colton E, Ziats NP, Anderson JM. Biomaterial surface chemistry dictates adherent monocyte/macrophage cytokine expression in vitro. *Cytokine*. 2002;18: 311–319. doi:10.1006/cyto.2002.1048



150. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol.* 2008;20: 86–100. doi:10.1016/j.smim.2007.11.004
151. Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials.* 2012;33: 3792–3802. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.034
152. Zheng F, Lin Y, Verbeken E, Claerhout F, Fastrez M, De Ridder D, et al. Host response after reconstruction of abdominal wall defects with porcine dermal collagen in a rat model. *Am J Obstet Gynecol.* 2004;191: 1961–1970. doi:10.1016/j.ajog.2004.01.091
153. Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, Jawdat D, Al Khaldi A, Abomaray FM, et al. Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev.* 2013;9: 620–641. doi:10.1007/s12015-013-9455-2
154. Liu C, Li Y, Yu J, Feng L, Hou S, Liu Y, et al. Targeting the shift from M1 to M2 macrophages in experimental autoimmune encephalomyelitis mice treated with fasudil. *PloS One.* 2013;8: e54841. doi:10.1371/journal.pone.0054841
155. Huang S, Miao R, Zhou Z, Wang T, Liu J, Liu G, et al. MCP1P1 negatively regulates toll-like receptor 4 signaling and protects mice from LPS-induced septic shock. *Cell Signal.* 2013;25: 1228–1234. doi:10.1016/j.cellsig.2013.02.009
156. Sharda DR, Yu S, Ray M, Squadrito ML, De Palma M, Wynn TA, et al. Regulation of macrophage arginase expression and tumor growth by the Ron receptor tyrosine kinase. *J Immunol.* 2011;187: 2181–2192. doi:10.4049/jimmunol.1003460
157. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012;122: 787–795. doi:10.1172/JCI59643
158. Rath M, Müller I, Kropf P, Closs EI, Munder M. Metabolism via Arginase or Nitric Oxide Synthase: Two Competing Arginine Pathways in Macrophages. *Front Immunol.* 2014;5: 532. doi:10.3389/fimmu.2014.00532
159. Li Z, Wei H, Deng L, Cong X, Chen X. Expression and secretion of interleukin-1 $\beta$ , tumour necrosis factor- $\alpha$  and interleukin-10 by hypoxia- and serum-deprivation-stimulated mesenchymal stem cells. *FEBS J.* 2010;277: 3688–3698. doi:10.1111/j.1742-4658.2010.07770.x
160. Kwon Y-W, Yang H-M, Cho H-J. Cell Therapy for Myocardial Infarction. *Int J Stem Cells.* 2010;3: 8–15.

161. Wollert KC, Drexler H. Clinical Applications of Stem Cells for the Heart. *Circ Res.* 2005;96: 151–163. doi:10.1161/01.RES.0000155333.69009.63
162. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation.* 2000;101: 454–458.
163. Maisch B, Pankuweit S. Current treatment options in (peri)myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. *Herz.* 2012;37: 644–656. doi:10.1007/s00059-012-3679-9
164. Crisóstomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, Báez-Díaz C, Usón J, et al. Development of a closed chest model of chronic myocardial infarction in Swine: magnetic resonance imaging and pathological evaluation. *ISRN Cardiol.* 2013;2013: 781762. doi:10.1155/2013/781762
165. Sharma R, Raghubir R. Stem cell therapy: a hope for dying hearts. *Stem Cells Dev.* 2007;16: 517–536. doi:10.1089/scd.2006.0070
166. Hyun JS, Tran MC, Wong VW, Chung MT, Lo DD, Montoro DT, et al. Enhancing stem cell survival in vivo for tissue repair. *Biotechnol Adv.* 2013;31: 736–743. doi:10.1016/j.biotechadv.2012.11.003
167. Ladage D, Turnbull IC, Ishikawa K, Takewa Y, Rapti K, Morel C, et al. Delivery of gelfoam-enabled cells and vectors into the pericardial space using a percutaneous approach in a porcine model. *Gene Ther.* 2011;18: 979–985. doi:10.1038/gt.2011.52
168. Yang Y, Dreessen de Gervai P, Sun J, Glogowski M, Gussakovsky E, Kupriyanov V. MRI studies of cryoinjury infarction in pig hearts: ii. Effects of intrapericardial delivery of adipose-derived stem cells (ADSC) embedded in agarose gel. *NMR Biomed.* 2012;25: 227–235. doi:10.1002/nbm.1735
169. Ruiz-Esparza GU, Flores-Arredondo JH, Segura-Ibarra V, Torre-Amione G, Ferrari M, Blanco E, et al. The physiology of cardiovascular disease and innovative liposomal platforms for therapy. *Int J Nanomedicine.* 2013;8: 629–640. doi:10.2147/IJN.S30599
170. Gomez-Mauricio RG, Acarregui A, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Gallo I, Hernández RM, et al. A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Für Pharm Verfahrenstechnik EV.* 2013;84: 29–39. doi:10.1016/j.ejpb.2012.11.028
171. Jasmin null, Torres ALM, Jelicks L, de Carvalho ACC, Spray DC, Mendez-Otero R. Labeling stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: analysis of the labeling efficacy by microscopy and magnetic resonance

- imaging. *Methods Mol Biol.* 2012;906: 239–252. doi:10.1007/978-1-61779-953-2\_18
172. Cromer Berman SM, Kshitiz null, Wang CJ, Orukari I, Levchenko A, Bulte JWM, et al. Cell motility of neural stem cells is reduced after SPIO-labeling, which is mitigated after exocytosis. *Magn Reson Med.* 2013;69: 255–262. doi:10.1002/mrm.24216
173. Bull E, Madani SY, Sheth R, Seifalian A, Green M, Seifalian AM. Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine.* 2014;9: 1641–1653. doi:10.2147/IJN.S48979
174. Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, Landa N, Miller L, Daniels D, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation.* 2007;116: 138–45. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.106.680231
175. Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M, Adam G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *RoFo Fortschritte Auf Dem Geb Röntgenstrahlen Nukl.* 2013;185: 1149–1166. doi:10.1055/s-0033-1335438
176. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ Res.* 2008;102: 1155–1168. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.175158
177. Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1994;104: 48–56.
178. Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol.* 2013;91: 12–18. doi:10.1038/icb.2012.60
179. Björkström NK, Gonzalez VD, Malmberg K-J, Falconer K, Alaeus A, Nowak G, et al. Elevated Numbers of FcγRIIIA+ (CD16+) Effector CD8 T Cells with NK Cell-Like Function in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol.* 2008;181: 4219–4228. doi:10.4049/jimmunol.181.6.4219
180. Denyer MS, Wileman TE, Stirling CMA, Zuber B, Takamatsu H-H. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;110: 279–292. doi:10.1016/j.vetimm.2005.10.005
181. De Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest.* 2015;125: 3147–3162. doi:10.1172/JCI81321

182. Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*. 2009;94: 173–184. doi:10.3324/haematol.13740
183. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*. 2001;276: 31171–31178. doi:10.1074/jbc.M102788200
184. O'Connor MD, Kardel MD, Iosfina I, Youssef D, Lu M, Li MM, et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2008;26: 1109–1116. doi:10.1634/stemcells.2007-0801
185. Lee D-H, Silventoinen K, Hu G, Jacobs DR, Jousilahti P, Sundvall J, et al. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28,838 middle-aged men and women. *Eur Heart J*. 2006;27: 2170–2176. doi:10.1093/eurheartj/ehl086
186. Jiang S, Jiang D, Tao Y. Role of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2013;18: 53–56.
187. Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Ciftci O, Yildirim I, Baycan S, et al. Association between serum gamma-glutamyltransferase levels and coronary microvascular function in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2007;25: 2497–2503. doi:10.1097/HJH.0b013e3282f05bf1
188. Poelzl G, Eberl C, Achrainger H, Doerler J, Pachinger O, Frick M, et al. Prevalence and prognostic significance of elevated gamma-glutamyltransferase in chronic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009;2: 294–302. doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.826735
189. Ege T, Canbaz S, Yuksel V, Duran E. Effect of pericardial fluid pro-inflammatory cytokines on hemodynamic parameters. *Cytokine*. 2003;23: 47–51.
190. Pankuweit S, Wädlich A, Meyer E, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Cytokine activation in pericardial fluids in different forms of pericarditis. *Herz*. 2000;25: 748–754.
191. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res*. 2004;94: 1543–1553. doi:10.1161/01.RES.0000130526.20854.fa

192. Boonen A, Stockbrügger RW, van der Linden S. Pericarditis after therapy with interferon-alpha for chronic hepatitis C. *Clin Rheumatol.* 1999;18: 177–179.
193. Gressens B, Gohy P. Pericarditis due to interferon-alpha therapy during treatment for chronic hepatitis C. *Acta Gastro-Enterol Belg.* 2004;67: 301–302.
194. Popescu C, Arama V, Gliga S. Acute pericarditis due to pegylated interferon alpha therapy for chronic HCV hepatitis - case report. *BMC Gastroenterol.* 2011;11: 30. doi:10.1186/1471-230X-11-30
195. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A.* 2009;15: 2795–2806. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0630
196. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyó JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol.* 2012;3: 212. doi:10.3389/fimmu.2012.00212
197. Liu W, Liu J, Wu J, Zhang L, Liu F, Yin L, et al. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PloS One.* 2013;8: e55487. doi:10.1371/journal.pone.0055487
198. Engela AU, Baan CC, Peeters AMA, Weimar W, Hoogduijn MJ. Interaction between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and regulatory T-cells. *Cell Transplant.* 2013;22: 41–54. doi:10.3727/096368912X636984
199. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol.* 2012;3: 126. doi:10.3389/fimmu.2012.00126
200. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res.* 2014;114: 333–344. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300639
201. Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4: 34. doi:10.1186/scrt194
202. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A-K, Radtke S, Ruesing J, Doeppner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia.* 2014;28: 970–973. doi:10.1038/leu.2014.41

203. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells Dayt Ohio*. 2012;30: 1556–1564. doi:10.1002/stem.1129
204. Ludwig A, Kordelas L, Rebmann V, Radtke S, Felderhoff-Müser U, Horn P, et al. Exosomes – From Bench to Bedside. *Klin Pädiatr*. 2012;224. doi:10.1055/s-0032-1330775
205. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid A-A, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett*. 2012;147: 47–54. doi:10.1016/j.imlet.2012.06.001
206. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Tan SS, Choo ABH, Lim SK. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev*. 2014;23: 1233–1244. doi:10.1089/scd.2013.0479
207. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods*. 2003;275: 251–255. doi:10.1016/S0022-1759(03)00010-3
208. Dorronsoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernández-Rueda J, Lang V, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol*. 2014;44: 480–488. doi:10.1002/eji.201343668
209. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev*. 2007;16: 597–604. doi:10.1089/scd.2006.0110
210. Maguire G, Friedman P, McCarthy D, Friedman R, Maniotis A. Stem Cell Released Molecules and Exosomes in Tissue Engineering. *Procedia Eng*. 2013;59: 270–278. doi:10.1016/j.proeng.2013.05.121
211. Crop MJ, Korevaar SS, de Kuiper R, Ijzermans JNM, van Besouw NM, Baan CC, et al. Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells. *Cell Transplant*. 2011;20: 1547–1559. doi:10.3727/096368910X564076
212. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, et al. Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics*. 2012;2012: 971907. doi:10.1155/2012/971907



213. Hooper C, Sainz-Fuertes R, Lynham S, Hye A, Killick R, Warley A, et al. Wnt3a induces exosome secretion from primary cultured rat microglia. *BMC Neurosci.* 2012;13: 144. doi:10.1186/1471-2202-13-144
214. Gastpar R, Gehrmann M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, et al. Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res.* 2005;65: 5238–5247. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3804
215. Alvarez ML, Khosroheidari M, Kanchi Ravi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int.* 2012;82: 1024–1032. doi:10.1038/ki.2012.256
216. Théry C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Curr Protoc Cell Biol Editor Board Juan Bonifacino Al.* 2006;3.22: 1–29. doi:10.1002/0471143030.cb0322s30
217. Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp.* 2012; e3037. doi:10.3791/3037
218. Campoy I, Lanau L, Altadill T, Sequeiros T, Cabrera S, Cubo-Abert M, et al. Exosome-like vesicles in uterine aspirates: a comparison of ultracentrifugation-based isolation protocols. *J Transl Med.* 2016;14: 180. doi:10.1186/s12967-016-0935-4
219. Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles.* 2014;3. doi:10.3402/jev.v3.23111
220. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, et al. Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med.* 2014;12: 204. doi:10.1186/1479-5876-12-204
221. Lane RE, Korbie D, Anderson W, Vaidyanathan R, Trau M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep.* 2015;5: 7639. doi:10.1038/srep07639
222. Lobb RJ, Becker M, Wen Wen S, Wong CSF, Wiegmans AP, Leimgruber A, et al. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles.* 2015;4. doi:10.3402/jev.v4.27031
223. Taylor DD, Shah S. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. *Methods.* 2015;87: 3–10. doi:10.1016/j.ymeth.2015.02.019

224. Tauro BJ, Greening DW, Mathias RA, Ji H, Mathivanan S, Scott AM, et al. Comparison of ultracentrifugation, density gradient separation, and immunoaffinity capture methods for isolating human colon cancer cell line LIM1863-derived exosomes. *Methods*. 2012;56: 293–304. doi:10.1016/j.ymeth.2012.01.002
225. James A Smith, Kelvin S. Ng., Benjamin E. Mead, Sue Dopson, Brock Reeve, James Edwards, et al. Extracellular Vesicles Commercial Potential As By-products of Cell Manufacturing for Research and Therapeutic Use. *BioProcess Int*. 2015;13.



**ANEXO I. Publicaciones  
recogidas en esta tesis • • • •**



Los resultados incluidos en esta tesis doctoral han sido publicados como artículos científicos en diferentes revistas internacionales. A continuación, se detallan estas publicaciones y su correspondencia con los distintos bloques de esta tesis:

## BLOQUE I: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE PRODUCTOS TERAPÉUTICOS BASADOS EN EL USO DE MATERIALES QUIRÚRGICOS COMO VEHÍCULOS PARA MEJORAR LA IMPLANTACIÓN DE CÉLULAS MADRE ADULTAS

---

### I.A. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y SUTURAS QUIRÚRGICAS SOBRE LA DEPOSICIÓN DE COLÁGENO

- Casado JG, **Blázquez R**, Jorge I, Álvarez V, Gómez-Mauricio G, Ortega-Muñoz M, Vázquez J, Sánchez-Margallo FM. Mesenchymal stem cell-coated sutures enhance collagen depositions in sutured tissues. *Wound Repair Regen.* 2014; 22(2):256-64. doi: 10.1111/wrr.12153

IF (JCR) = 2.628 Q1 Surgery (49/199)

Q1 Dermatology (12/61)

Q2 Medicine, Research & Experimental (56/124)

Q3 Cell Biology (110/187)

### I.B. EVALUACIÓN *IN VITRO* E *IN VIVO* DEL EFECTO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE MSCs Y MALLAS QUIRÚRGICAS SOBRE LA RESPUESTA INFLAMATORIA

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Casado JG. Surgical meshes coated with mesenchymal stem cells provide an anti-inflammatory environment by a M2 macrophage polarization. *Acta Biomater.* 2016; 31:221-230. doi: 10.1016/j.actbio.2015.11.057

IF (JCR) = 6.008 Q1 Engineering, Biomedical (3/76)

Q1 Materials Science, Biomaterials (2/33)

## BLOQUE II: EVALUACIÓN DE LA RUTA INTRAPERICÁRDICA COMO VÍA ALTERNATIVA PARA LA ADMINISTRACIÓN DE CÉLULAS MADRE EN TERAPIA CELULAR CARDIOVASCULAR

---

### II.A. EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y BIODISTRIBUCIÓN DE MSCs ADMINISTRADAS POR VÍA INTRAPERICÁRDICA EN MODELO PORCINO

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, García-Lindo M, Usón A, Álvarez V, Casado JG. Intrapericardial administration of mesenchymal stem cells in a large animal model: a bio-distribution analysis. PLoS ONE. 2015; 10(3):e0122377. doi: 10.1371/journal.pone.0122377

IF (JCR) = 3.057 Q1 Multidisciplinary Sciences (11/63)

### II.B. ESTUDIO INMUNOLÓGICO DE LA ADMINISTRACIÓN INTRAPERICÁRDICA DE CDCs EN MODELO PORCINO

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Álvarez V, Casado JG. Intrapericardial delivery of cardiosphere-derived cells: an immunological study in a clinically relevant large animal model. PLoS ONE. 2016; 11(2):e0149001. doi: 10.1371/journal.pone.0149001

IF (JCR) = 3.057 Q1 Multidisciplinary Sciences (11/63)

### BLOQUE III: EVALUACIÓN DE EXOSOMAS DERIVADOS DE CÉLULAS MADRE COMO AGENTES INMUNOMODULADORES Y COMPARATIVA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE AISLAMIENTO APLICABLES EN EL ENTORNO CLÍNICO

---

#### III.A. EVALUACIÓN DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MSCs SOBRE CÉLULAS T ESTIMULADAS *IN VITRO*

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Álvarez V, Tarazona R, Casado JG. Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5:556. doi: 10.3389/fimmu.2014.00556

IF (JCR) = 5.695 Q1 Immunology (25/150)

#### III.B. COMPARACIÓN DE DIFERENTES MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS DERIVADOS DE MSCs PARA USO CLÍNICO

- Álvarez V, **Blázquez R**, Sánchez Margallo FM, de la Rosa O, Jorge I, Tapia A, Casado JG. Comparative study of isolated human mesenchymal stem cell derived exosomes for clinical use. *Acta Bioquim Clin Latinoam*. 2015; 49(3): 311-320.

IF (JCR) = 0.074 Q4 Medical Laboratory Technology (29/30)





## Mesenchymal stem cell-coated sutures enhance collagen depositions in sutured tissues

Javier G. Casado, PhD<sup>1</sup>; Rebeca Blazquez, MSc<sup>1</sup>; Inmaculada Jorge, PhD<sup>2</sup>; Veronica Alvarez, MLT<sup>1</sup>; Guadalupe Gomez-Mauricio, PhD<sup>1</sup>; Mariano Ortega-Muñoz, BMSc<sup>2</sup>; Jesus Vazquez, PhD<sup>2</sup>; Francisco M. Sanchez-Margallo, PhD<sup>1</sup>

1. Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson, Caceres and  
2. Cardiovascular Proteomics Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain

### Reprint requests:

Dr. Javier G. Casado, Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre, Ctra. N-521 Km 41.8, Caceres 10071, Spain.  
Tel: +00 34927 005029;  
Fax: +00 34927 181033;  
Email: jgarcia@ccmijesususon.com

Authorship: Dr. Javier G. Casado and R. Blazquez contributed equally and should be considered as first authors.

Author contribution: Dr. F.M. Sanchez-Margallo contributed in conception and design, experimental supervision, manuscript writing, and financial support. Dr. G. Gomez-Mauricio and V. Alvarez: experimental development and collection of data. Dr. I. Jorge, M. Ortega-Muñoz, and Dr. J. Vazquez: mass spectrometry and proteomics data analysis.

Manuscript received: March 21, 2013  
Accepted in final form: December 23, 2013

DOI:10.1111/wrr.12153

### ABSTRACT

Sutures are commonly used for surgical procedures and new sutures are being developed to improve wound healing. In the past decade, it has been extensively shown that mesenchymal stem cells (MSCs) have a wound healing potential. To benefit the overall wound healing process, we aimed to analyze the usage of pre-treated sutures for improving the implantation of MSCs in the tissues. Our results firstly showed that suture pretreatments with gelatin, poly-L-lysine, and NaOH improved the adhesive strength of MSCs to sutures. These cells remained surrounding the sutured tissue and no significant phenotypic changes were found in those cells cultured onto pretreated sutures. In vivo experiments showed that the implantation of MSCs by suturing increases the collagen content in the sutured tissue. Moreover, proteomics analysis of secreted proteins showed that collagen alpha-1(I) chain was the most abundant collagen found. To our knowledge, this is the first report that aimed to improve the implantation of MSCs in tissue by suture pretreatments. Moreover, in vivo experiments suggest that MSC-coated sutures may enhance wound healing and tissue remodeling through the release of different collagen types being applicable for those patients that tend to have difficulty healing.

Absorbable sutures are commonly used in clinical practice for wound closure to achieve healing without scarring or deformity. New sutures have been developed over the past years to improve their physical properties and biological activity. In this sense, the usage of modified sutures coated with antimicrobial agents has been extensively accepted as a valuable tool for the reduction of wound infections with a shown safety and tolerability.<sup>1,2</sup> More recently, the usage of coated sutures has been applied to improve tissue integrity, healing, and immune response. In particular, the improvement of intestinal healing has been achieved by recombinant human insulin-like growth factor-coated sutures.<sup>3</sup> Modified sutures have also been applied to improve tendon-to-bone healing by recombinant human platelet-derived growth factor BB-coated sutures.<sup>4</sup> Moreover, matrix metalloproteinase-inhibitor-coated sutures have shown the improvement of tissue integrity during anastomotic repair.<sup>5,6</sup> Finally, the enhancement of a TH1 immune response in patients with advanced-stage head and neck squamous cell carcinoma have been achieved with antibody-coated sutures (anti-CD3/anti-CD28).<sup>7,8</sup>

Mesenchymal stem cells (MSCs) are a useful clinical tool for treatment of many diseases and have been recently used in combination with sutures to improve the strength of adhesion-free colonic anastomoses.<sup>9</sup> Similar biosutures have been developed using bone marrow MSCs to reduce intra-abdominal adhesions.<sup>10</sup>

For clinical applications, the sutures could be somehow considered as a scaffold to provide a biomechanical support

MFI	Mean fluorescence intensity
MRFI	Mean relative fluorescence intensity
MSC	Mesenchymal stem cell
MWCO	Molecular weight cutoff (in Daltons)
pBM-MSCs	Porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells
PLGA	Poly-lactic-co-glycolic acid
SLA-I	Swine leukocyte antigen class I
SLA-II	Swine leukocyte antigen class II



avoiding the spreading of MSCs. The synthetic absorbent sutures such as Vicryl are composed by poly-lactic-co-glycolic acid (PLGA) which is a component for temporary scaffolds in tissue engineering that provides a physical support for the implanted cells. To create desired interactions with other molecules or to enhance cell–scaffold interactions, the PLGA usually needs to be chemically modified.<sup>11</sup> For example, the pretreatment of PLGA with NaOH leads to a more hydrophilic surface, increased surface area, altered porosity, and a greater degree of roughness in the surface.<sup>12</sup>

The combined usage of sutures coated with MSCs may have numerous advantages to enhance collagen fibrosis. In contrast to the use of a single biological factor, the MSCs directly secrete a wide array of cytokines and growth factors, and indirectly induce their liberation by resident cells.<sup>13</sup> Additionally, the suture pretreatment and MSC coating is simple enough to be performed by individuals with no specialized training in cell biology. Finally, because the cells are already in the suture, the suturing and cell implantation is a single-step procedure.

From a logistic point of view, the therapeutic approach would be simple, allowing a routine application without needing a complex infrastructure. Moreover, according to the current usage of allogenic MSCs and the proliferation of stem cell banks<sup>14,15</sup>; this option would be feasible in the near future. This kind of treatment would be a useful alternative especially for patients with difficulties in healing. Conversely, there are some drawbacks for the application of MSC-coated sutures as a regular medical practice, such as regulatory impediments in some countries or the difficulties to use this system in an emergency operation.

The main objective of this work was to increase the MSCs adhesion to multifilament sutures to provide a much longer resistance to the suture passages. The implantation of MSCs in tissue via suturing may have a beneficial effect on the remodeling phase improving wound healing and closure after surgery.

## MATERIALS AND METHODS

### Isolation of MSCs

Porcine and murine bone marrow–derived MSCs were isolated from femurs of euthanized animals. The porcine stem cells were obtained from three Large White pigs aged between 3 and 4 months and weighed between 25 and 30 kg. The murine stem cells were obtained from three B6D2 mice aged between 2 and 6 months and weighed between 20 and 25 g. The cells were flushed via needle and syringe. Cell suspension was filtered through a 40 µm nylon mesh and mononuclear cells were isolated by centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO). Mononuclear cells were recovered and washed twice with phosphate buffered saline solution (PBS). Finally, mononuclear cells were resuspended in culture medium (Dulbecco's modified Eagle medium [DMEM] containing 10% fetal bovine serum), seeded onto tissue culture flasks and expanded at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Following 48 hours in culture, the nonadherent hematopoietic cells were removed. Adhered cells were passaged at 80–90% confluence by 0.25% trypsin solution (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD) and seeded to a new culture at a density of 5000–6000 cells/cm<sup>2</sup>. Culture medium was changed every 7 days. The porcine and

murine MSCs for in vitro and in vivo experiments were used at passages 10 to 15.

### Phenotypic analysis of MSCs by fluorescent activated cell sorting (FACS)

For flow cytometric analysis of porcine bone marrow–derived MSCs (pBM-MSCs), the cells were detached from sutures with 0.25% trypsin solution and suspended in culture medium (DMEM containing 10% fetal bovine serum). The cells were stained with FITC-conjugated human mAbs against CD90, CD105 (both cross-reactive with porcine), and porcine mAbs against CD29, CD31, CD44, CD45, SLA-I (swine leukocyte antigen class I) and SLA-II (swine leukocyte antigen class II) from Serotec (Kidlington, United Kingdom). The phenotypic analysis was performed as follows:  $2 \times 10^5$  cells were incubated for 30 minutes at 4 °C with appropriate concentrations of monoclonal antibodies in the presence of PBS containing 2% fetal bovine serum. The cells were washed and resuspended in PBS. The flow cytometric analysis was performed on a FACScalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA) after acquisition of  $10^5$  events. Cells were primarily selected using forward and side scatter characteristics and fluorescence was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Isotype-matched negative control antibodies were used in all the experiments. The mean relative fluorescence intensity was calculated by dividing the mean fluorescent intensity (MFI) by the MFI of its negative control.

### Suture pretreatments and cell seeding

The cells were detached from flasks with 0.25% trypsin solution, counted and adjusted at  $2 \times 10^6$  cells/mL. A total of  $4 \times 10^6$  cells in 2 mL of DMEM containing 10% fetal bovine serum were placed in a Nunc CryoTube (Nunc, Roskilde, Denmark) vial together with different sutures under continuous rotation for 2 hours at room temperature. The following sutures (sizes 2–0 or 3–0) were tested: Dexon-II (Covidien, Dublin, Ireland), an absorbable braided suture composed of the homopolymer of glycolic acid and coated with polycaprolactone, a copolymer of glycolide and epsilon-caprolactone (henceforth referred as “Suture #1”); Assufil (Assut Europe, Magliano Dei Marsi, Italy), an absorbable suture composed of braided multifilament of polyglycolic acid and coated with a mixture of polycaprolactone and calcium stearate (henceforth referred as “Suture #2”); Ticron (Tyco Healthcare, Mansfield, MA), a nonabsorbable polyester suture composed of polyethylene terephthalate coated with silicone (henceforth referred as “Suture #3”); Safil Quick (Braun, Tuttlingen, Germany), an absorbable braided suture, made of low molecular weight polyglycolic acid and coated with magnesium stearate (henceforth referred as “Suture #4”); Safil (Braun), an absorbable braided suture produced from polyglycolic acid and treated with a hydrolytic degradable synthetic coating consisting of glyconate (henceforth referred as “Suture #5”); and Vicryl (Ethicon, Somerville, NJ), an absorbable suture composed of a copolymer made from 90% glycolide and 10% L-lactide (henceforth referred as “Suture #6”). Once selected Suture #6 (Vicryl) as the best suture for MSC cell adhesion assays, this suture was precoated with gelatin from porcine skin or poly-L-Lysine hydrobromide (Sigma) at 1 mg/mL for 10 minutes. After



gelatin or poly-L-lysine treatments, the sutures were rinsed with PBS 1X. The NaOH treatments were performed with 1N NaOH (diluted in dH<sub>2</sub>O) for 10 minutes and rinsed with PBS 1X. The cellular adhesion to sutures was determined by Hoechst staining and CCK-8 assays.

#### Fluorescent staining procedures

The Hoechst staining was performed by incubating the sutures for 5 minutes at room temperature with 10 µg/mL Hoechst 33342 (Sigma). After Hoechst staining, the sutures were rinsed twice with PBS 1X. The CFSE staining was performed using the CFSE Cell Proliferation kit (Invitrogen, Eugene, OR) at a final concentration of 10 µM for 10 minutes at 37 °C, followed by immediate quenching with culture medium. According to manufacturer's recommendations, the Vybrant CM-DiI cell labeling solution from Molecular Probes (Invitrogen) was added directly to normal culture media to uniformly label suspended cells.

#### CCK-8 assays

The CCK-8 assay is a cell viability assay which measures the activity of living cells by assessing their mitochondrial activity. To quantify the cellular adhesion of mesenchymal stem cells on the sutures, the suture segments (8 cm in length) were placed on a 24-well plate with 300 µL of DMEM medium (without phenol-red) and 30 µL of CCK-8 (Sigma). The absorbance of supernatants was read 24 hours after at 450 nm.

#### Tensile strength and degradation rate of sutures

The linear breaking strength of pretreated Vicryl sutures was measured in three independent assays. The breaking strength was quantified in terms of kilograms.<sup>16</sup> The determination of degradation rates was quantified in dH<sub>2</sub>O at 37 °C by measuring the changes in pH. The experiment was performed in the absence of cells to eliminate potential changes caused by cell growth.

#### Analysis of collagen content in sutured skin wounds

Hydroxyproline is the major component of collagen and the total collagen can be easily quantified upon acid hydrolysis of collagen. The hydroxyproline content of single individual wounds ( $n = 4$  per group, five wounds per animal) was determined with the Total Collagen Assay kit (QuickZyme Biosciences, Leiden, The Netherlands). The B6D2 mice were anesthetized with isoflurane 2% and shaved. The skin incision length was 1.5 cm and created on the back of the mice. The incisions were closed by using Vicryl 4–0 sutures. These sutures were pretreated with gelatin, poly-L-lysine, or NaOH, and cocultured in the presence of B6D2 bone marrow-derived MSCs (obtained from femurs) as previously described in suture pretreatments and cell seeding section. Usually, 5–7 days are enough time to heal and mice were euthanized on day 6 postsuturing. The hydroxyproline level of excised tissues was normalized, dividing by the wet weight (mg) of the tissue. Briefly, the samples were diluted in 6 M HCl to obtain 20–60 mg tissue/mL. Closed tubes were kept in an oven at 95 °C for 20 hours and centrifuged for 10 minutes at

1,300×g. Hydrolyzed samples were used for the assay procedure (QuickZyme Biosciences). The amount of hydroxyproline was spectrophotometrically measured at 540 nm and quantified by comparison with a standard curve. Animal experiments were approved by the Ethical Committee for animal experimentation of Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson.

#### Characterization of the secreted collagen types from pBM-MSCs

To identify the proteins secreted from pBM-MSCs, the cells at passage 10–15 were in vitro cultured for 72 hours in serum-free medium. The supernatants were passed through a 0.22 µm filter to remove cell debris. For the enrichment of secreted large proteins, Vivaspin concentrators (Vivaspin 20, 50,000 MWCO from Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) were centrifuged at 5,000×g for 40 minutes. Proteins remaining in the upper face of the membranes were suspended and diluted in 50 mM Tris-HCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate [SDS], pH 7. The 75-fold concentrated supernatants were stored at –80°C for subsequent proteomics analysis. Protein digestion was performed by using a previously described protocol.<sup>17</sup> Briefly, 50 µg protein extracts were suspended in 75 µL sample buffer (5% SDS, 10% glycerol, 25 mM Tris-Cl, pH 6.8, 10 mM DTT, 0.01% bromophenol blue). The samples were applied onto a conventional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis gel. The run was stopped as soon as the front entered 3 mm into the resolving gel, so that the whole proteome became concentrated in the stacking/resolving gel interface. The protein band was visualized by Coomassie staining, excised, cut into cubes, and digested overnight at 37 °C with 60 ng/µL trypsin at 5:1 protein:trypsin (w/w) ratio in 50 mM ammonium bicarbonate, pH 8.8 containing 10% (v/v) ACN, and 0.01% (w/v) 5-cyclohexyl-1-pentyl-β-D-maltoside (CYMAL-5). The resulting peptides were analyzed by LC-MS/MS using an Easy-nLC 1000 system coupled to quadruple-Orbitrap hybrid mass spectrometer (Q-Exactive, Thermo Scientific, San Jose, CA). The instrument was operated in a data-dependent HCD MS/MS mode using the 20 most intense precursors detected in a survey scan from 390 to 1500 m/z. Protein identification was carried with SEQUEST (Protein Discoverer 1.3.0.339, Thermo Scientific) using the human Swissprot database (Uniprot release 2012\_5; containing 14,7003 sequence entries for *Homo sapiens*). SEQUEST results were validated using the probability ratio method<sup>18</sup> and false discovery rates (FDR) calculated using the refined method.<sup>19</sup> Peptide and scan counting was performed assuming as positive events those with a FDR equal or lower than 5%.

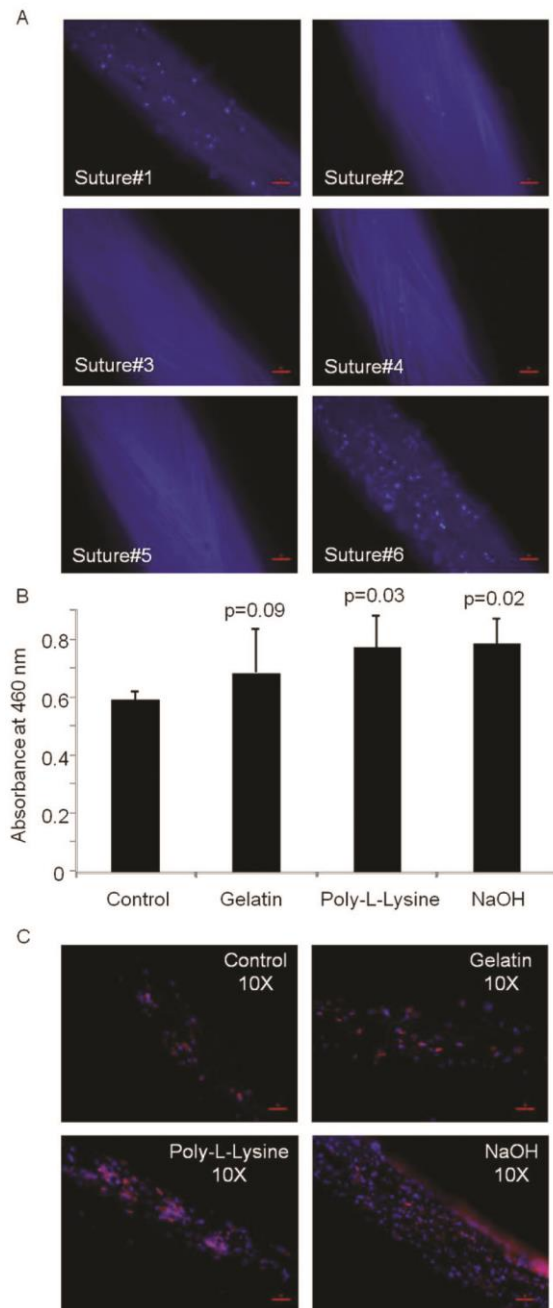
#### Statistical analysis

Data were statistically analyzed using the Student's *t*-test for variables with parametric distribution. All *p*-values ≤0.05 were considered statistically significant.

## RESULTS

#### MSC adhesion to sutures

To select the most appropriate suture for cell adhesion, several sutures were assayed and compared. Adhesion assays



comparing sutures #1 to #6 showed that the best adhesion was achieved on Suture #6. According to these results (Figure 1A), the Suture #6 was selected with the aim to improve the strength adhesion of pBM-MSCs. The sutures were pretreated with gelatin, poly-L-lysine, or NaOH. These

**Figure 1.** Suture pretreatments for improving MSCs adhesion. (A) Different multifilament sutures (see Material and Methods) were used to identify the best suture for MSC cell adhesion assays. (B) In order to enhance cell adhesion, Suture #6 were coated with gelatin or poly-L-lysine solutions, or pretreated with NaOH (see Materials and Methods). The graph represents the adhesion rates quantified by CCK-8 assay. The values represent the mean  $\pm$  standard deviation of nine independently performed experiments. The results were analyzed through a Student's *t*-test for variables with parametric distribution, comparing each measure with the control group. (C) The microscopy images represent the MSCs adhered to Suture #6. The staining was assessed by Hoechst and Vybrant dye and visualized at 10 $\times$  objective magnification. Scale bar: 100  $\mu$ m. All the *p*-values were calculated with respect to untreated/control sutures and are shown in the graph. MSC, mesenchymal stem cell.

pretreated sutures were cocultured with MSCs and adhesion rates were quantified by CCK-8 assays. Our results showed statistically significant differences in those sutures pretreated with NaOH ( $p = 0.034$ ) and those sutures coated with poly-L-Lysine ( $p = 0.024$ ) (Figure 1B). The microscopy images in Figure 1C represent the MSCs adhered to Suture #6.

#### Phenotypic analysis of MSCs cultured onto pretreated sutures

The stem cell phenotype of pBM-MSCs was analyzed at 72 hours by flow cytometry using commercially available antibodies against CD29, CD31, CD44, CD45, CD90, CD105, SLA class I, and SLA class II molecules. Our results showed that gelatin, poly-L-lysine, and NaOH treatments maintained the phenotypic stability of MSCs (CD29+/CD31-/CD44+/CD45-/CD90+/CD105+/SLA class I+/SLA class II-). Similar phenotype profiles were found when MSCs were cultured onto control and pretreated sutures (Figure 2).

#### Resistance of adherent MSCs to suture passages

To analyze the strength adhesion of MSCs to sutures, the cells were previously seeded onto pretreated and control sutures. These sutures were tested by suturing the gut of a euthanized pig which served as a reference tissue. The quantification of suture-adhered cells was performed by a CCK-8 assay in five independent experiments. Figure 3 represents the MSCs initially adhered to sutures and after the first, second, and third passage through the tissue. Our results showed that in comparison with untreated sutures, there is a significance in MSCs adhered to poly-L-lysine ( $p = 0.053$ ). Additionally, the microscopic observations of the sutured tissues (visualized with optical and fluorescent microscope) showed that MSCs were adhered to poly-L-lysine pretreated sutures (Figure 4).

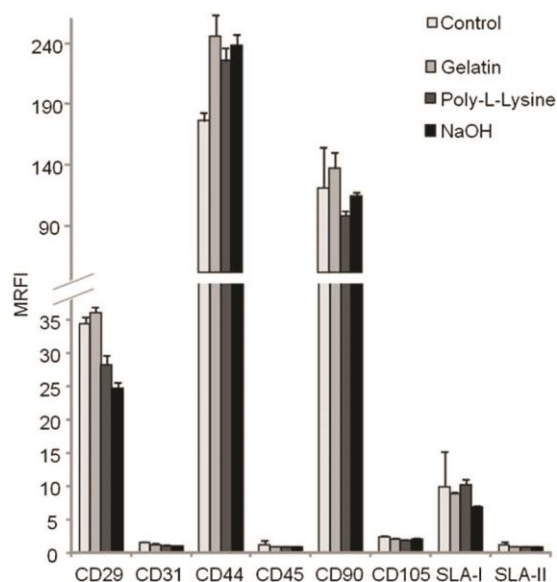
#### Tensile strength and degradation rate of modified sutures

The tensile strength analysis was assayed as previously described<sup>16</sup> and similar results were found when gelatin or



## MSCs-sutures increase collagen in wounds

Casado et al.



**Figure 2.** Phenotypic analysis of MSCs cultured onto pretreated sutures. The MSCs were phenotypically characterized by multicolor flow cytometry and compared between those cells cultured onto gelatin, poly-L-lysine, or NaOH pretreated sutures. The expression level of Stem Cell Markers (CD29, CD31, CD44, CD45, CD90, CD105) and swine leukocyte antigen (SLA-I and SLA-II) is represented as mean relative fluorescence intensity (MRFI). The MRFI is calculated by dividing the mean fluorescent intensity by its negative control. Values shown in the bars represent mean  $\pm$  standard deviation of three independently performed experiments. MSC, mesenchymal stem cell.

poly-L-lysine-treated sutures were compared with untreated sutures. In contrast, NaOH-treated sutures displayed a reduced (although not significant) tensile strength (Figure 5A). Moreover, to measure the degradation rates of different sutures, we analyzed the PLGA degradation. Sutures were immersed in water at 37 °C and pH changes were monitored for a period of 20 days. The *in vitro* degradation assays did not show any significant differences when different sutures were compared (Figure 5B).

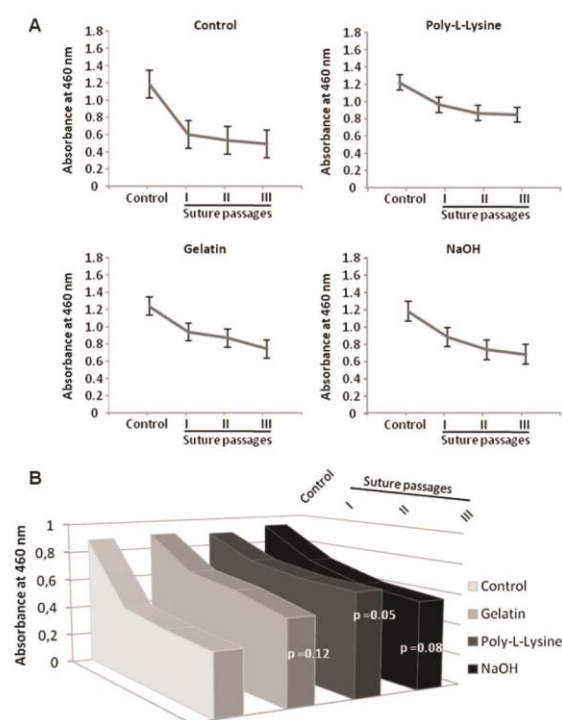
### Implanting of MSCs via suturing increases the collagen deposition in sutured wounds

It has been widely shown that mice provide a well-suited model for studying skin healing,<sup>20</sup> allowing a statistical analysis of results. The skin of B6D2 mice was carefully sutured with MSC-coated sutures using a continuous suture technique.

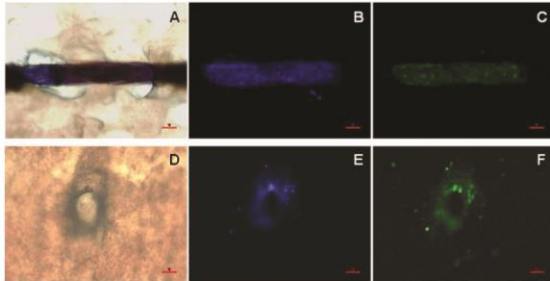
Based on preliminary studies with adipose-derived MSCs<sup>13</sup> and according to previous reports using collagenase-resistant mice,<sup>21</sup> we considered that the optimal time point for collagen quantifications was at day 6 or 7. The sutured skin wounds

were weighted and collagen was quantified by hydroxyproline assay. Our results showed that those sutures coated with MSCs tend to increase the collagen deposition in surgical wounds. Hydroxyproline assays showed that collagen depositions were markedly increased in those wounds closed by MSC-coated sutures pretreated with NaOH. Moreover, there is a trend toward significance in poly-L-Lysine pretreatment (Figure 6).

Finally, to show that MSCs are responsible for the increased collagen depositions, control experiments were done with poly-L-Lysine-coated, gelatin-coated, and NaOH-treated Vicryl sutures without any cells. The skin of four B6D2 mice was sutured with the different sutures and hydroxyproline assays were performed. No significant differences were found in the hydroxyproline content when the four sutures were compared (Figure S1).



**Figure 3.** Strength adhesion of MSCs to pretreated sutures and resistance to suture passages. (A) The graphs show the absorbance at 460 nm, which is proportional to the cell number, for untreated and coated/treated sutures after successive passages through the gut. The mean and the standard error of five independent experiments are shown. (B) The graph corresponds to the mean values showed above as a whole. The unpassed sutures were used as a reference and the three pretreated sutures were compared with untreated sutures. The results were analyzed through a Student's *t*-test for variables with parametric distribution, comparing each measure with the corresponding control. The *p*-values for the third passage are shown in the graph. MSC, mesenchymal stem cell.



**Figure 4.** Microscopic images of a sutured tissue by using a poly-L-lysine pretreated suture. Fresh porcine intestines were obtained from euthanized pigs and the small intestine was excised for the studies of suture passages. A, B, and C represent the microscopic image of a longitudinal section. D, E, and F represent the microscopic image of a cross section. (A,D) Suture pass through the intestinal lumen imaged with an optical microscope (10x). (B,E) Suture pass through the intestinal lumen imaged and visualization of Hoechst fluorescence under fluorescence microscopy (10x). (C,F) Visualization of CFSE fluorescence (10x). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ .

#### Proteomics analysis of secreted collagen from MSCs

To identify the collagen types secreted from MSCs as well as other proteins from the secretome that would be involved in the healing process and tissue repair, three different pBM-MSCs were in vitro cultured for 72 hours and supernatants were enriched for subsequent proteomics analysis. The usage of Vivaspin concentrators allowed us to enrich the supernatants with high molecular weight proteins (50,000 Daltons or more). To increase the statistical power of peptide identification, the MS/MS spectra were searched against a joint Human + Pig Swissprot database. The most abundant protein detected in the enriched supernatants, based on the number of identified peptides, was the Collagen alpha-1(I) chain followed by the Collagen alpha-2(V) chain, Collagen alpha-2 (I) chain, Collagen alpha-1 (XII) chain, and Collagen alpha-1 (III) chain. Figure 7 shows the number of peptides identified for each of the collagen types.

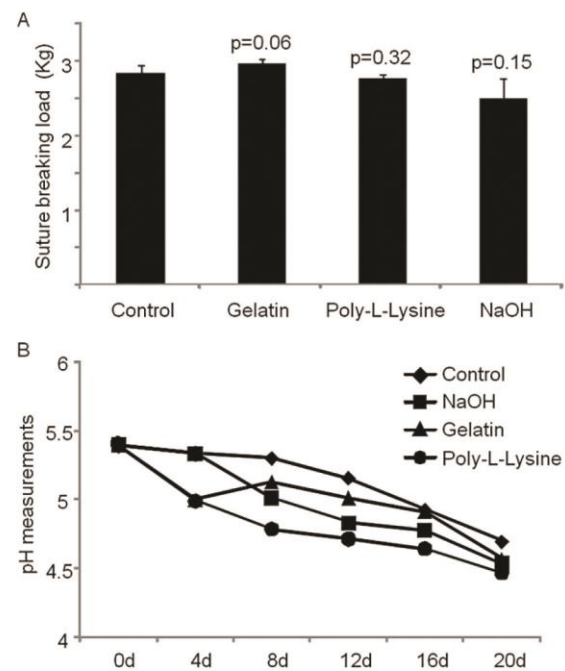
#### DISCUSSION

The usage of stem cell-coated sutures has shown a beneficial effect in the healing of colonic anastomoses;<sup>9,10</sup> and tendon repair.<sup>22</sup> Several studies using rat<sup>10,23</sup> and murine MSCs<sup>9</sup> have shown an optimal adhesion of these cells to sutures. In this work, we aimed to improve the implantation of MSCs in the sutured tissue evaluating the effect of different suture pretreatments.

Our first results showed that those sutures composed of PLGA were the most advantageous sutures for MSC adhesion. This compound is currently being used as scaffold in tissue engineering, and several modifications have been performed to enhance cellular adhesion and differentiation potential of MSCs. In particular, the chondrogenic, osteogenic, and adipogenic potential of MSCs have been enhanced by PLGA coatings with TGF-beta1,<sup>24</sup> ascorbate-2-phosphate,<sup>25</sup> and

adipogenic transcription factors,<sup>26</sup> respectively. Moreover, the NaOH pretreatments in PLGA scaffolds have previously shown an enhanced adhesion, growth, and chondrocyte differentiation,<sup>12</sup> as well as a significant proliferation of bone marrow-derived MSCs.<sup>27</sup> Finally, the combination of PLGA and MSCs have been widely used in settings such as wound healing<sup>28</sup> and tissue injury.<sup>29</sup>

In this work, we firstly show that suture pretreatments using poly-L-Lysine or NaOH show a significant increase in the adhesion capacity of MSCs. However, when the four groups were compared, the tensile strength of NaOH-treated sutures was slightly weakened, which would make these sutures inappropriate for surgical procedures. Moreover, only those MSCs that adhered to poly-L-Lysine-coated sutures display an enhanced strength adhesion to sutures, making these pretreated sutures optimal for MSC implantation. Supporting these results, it has been previously demonstrated by

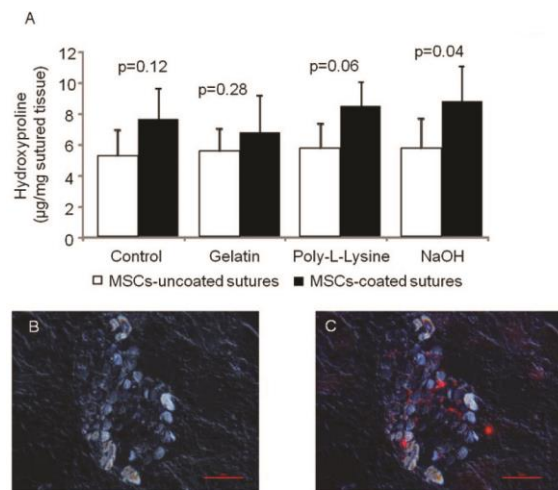


**Figure 5.** Tensile strength and degradation rates of pretreated sutures. (A) The linear breaking strength of pretreated Suture #6 was measured in terms of kilograms from three independent assays. The results were analyzed through a Student's *t*-test for variables with parametric distribution, comparing each measure with the corresponding control. No significant differences were found for any group. (B) Degradation behavior of pretreated Suture #6 by measuring the changes in the pH of the solutions. The PLGA degradation leads to the production of lactic acid and glycolic acid which decrease pH. The results were analyzed through a Student's *t*-test for variables with parametric distribution, comparing each measure with the control. The *p*-values obtained are shown in the graph. PLGA, poly-lactic-co-glycolic acid.



## MSCs-sutures increase collagen in wounds

Casado et al.



**Figure 6.** Hydroxyproline content in sutured skins. The Suture #6 (multifilament and absorbable) were coated with gelatin, poly-L-lysine solution or pretreated with NaOH. These sutures were cocultured in the presence of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as described in Materials and Methods. The skin tissue of B6D2 mice was sutured using the continuous suture technique and mice were euthanized on day 6. (A) The sutured tissues were excised and hydroxyproline was quantified for the estimation of collagen involved in the healing process. The different sutures (control, poly-L-Lysine-coated, gelatin-coated, and NaOH-treated) are represented by two bars comparing MSCs-uncoated and MSCs-coated. Values shown in the bars represent mean  $\pm$  standard deviation. At least three mice were used for each experiment. All the *p*-values are shown in the graph and were calculated by Student's *t*-test comparing the paired groups (MSCs-uncoated and MSCs-coated). (B) Representative visualization of sutured skin using optical microscopy (20 $\times$ ). (C) Visualization merging bright field and fluorescent image (20 $\times$ ). The cell staining was assessed by Vybrant CM-Dil. Absorbable suture was coated with poly-L-lysine and cocultured in the presence of MSCs. Tissue was sutured as previously described and mice were euthanized on day 2 of the experiment. Scale bar: 100  $\mu$ m. MSC, mesenchymal stem cell.

Yao et al. that embryonic stem cells have an optimal cell adhesion to poly-L-Lysine-coated sutures.<sup>22</sup> The usage of poly-L-Lysine-modified scaffolds has been also applied for chondrocytes with an enhanced cell adhesion and efficiency for producing cartilaginous components.<sup>30</sup>

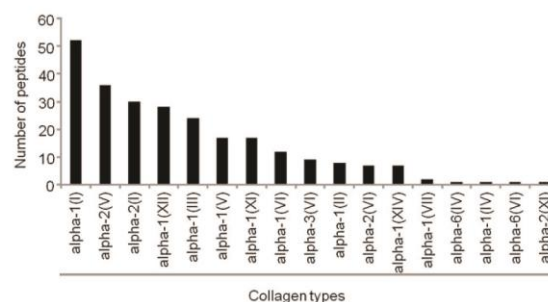
It has been shown that MSCs exhibit similar biological functions to dermal fibroblasts in the wound-healing process,<sup>31</sup> and similarly to fibroblasts they migrate toward injured tissues.<sup>32</sup> These MSCs by themselves have the capability of secreting fibronectin, growth factors, and collagen which are essential for matrix reorganization increasing the strength and integrity of injured tissue.<sup>33,34,35,36</sup> Here we show that MSC-coated sutures may have a beneficial effect in the wound healing by increasing the collagen depositions in the sutured tissues. The increase of collagen in the sutured tissue could be

indirectly mediated by MSCs through the release of soluble factors that induce the collagen synthesis on fibroblasts (indirect mechanism). On the contrary, the increase of collagen could be directly mediated through the release of collagen by MSCs (direct mechanism).

Regarding the indirect mechanism, it is difficult to define which soluble factors are implicated in the activation of fibroblasts, but probably transforming growth factor- $\beta$ 1, interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, fibroblast growth factor, and platelet-derived growth factor are the main participants in this process.<sup>37</sup> These soluble factors may provide a favorable microenvironment promoting the chemotaxis of fibroblast toward the damaged tissue, increasing their collagen synthesis and modulating the inflammatory process. Additionally, it has been found that MSC-fibroblast cross talk can be mediated by cell to cell contact or soluble molecules increasing type I collagen in fibroblasts.<sup>13</sup> On the other hand, supporting the mechanism which assumes the direct involvement of MSCs in the remodeling phase, it has been recently shown that human bone marrow-derived cells displayed biological functions very similar to dermal fibroblasts,<sup>31</sup> and similarly to fibroblasts, MSCs are able to migrate to injured tissues.<sup>32</sup>

In this work, we aimed to identify the different collagen types secreted by MSCs. For this, proteomic analysis was performed not only to identify but also to obtain semi-quantitative data on the secreted collagen chains. Here we demonstrate that the most abundant secreted collagen type was collagen alpha-1(I) which plays an important role in angiogenesis, invasion, and wound healing, as well as in the maintenance and function of extracellular matrix.<sup>21,38</sup> The proteomic analysis of secreted collagens indicates that biological sutures may have a direct beneficial effect on the remodeling phase during the wound healing.

Finally, it is important to note that there are two limitations of the present study that should be mentioned. Firstly, we did



**Figure 7.** Identification and quantification of collagen peptides released by MSCs. Supernatants from in vitro cultured porcine bone-marrow MSC line (pbmMSC05) were collected at passage 10–15 and concentrated using Vivaspin 20 (50,000 MWCO). Proteins were in-gel digestion with trypsin and the resulting peptides were analyzed by LC-MS/MS using an Easy-nLC 1000 system coupled to the quadruple Orbitrap mass spectrometer Q Exactive. The MS/MS raw files were searched against the Human Swissprot database. Peptides were identified with a false discovery rate higher than 5% and were taken only into account the proteins that were identified with at least two peptides. MSC, mesenchymal stem cell.

not identify the different collagen types in the sutured tissue neither the source of secreted collagen (resident fibroblasts, migrated fibroblasts, or MSCs). Secondly, this study has shown that collagen deposition in the sutured tissue is increased by MSC-coated sutures; however, it is difficult to conclude if this effect is directly mediated by MSCs (through the release of collagen) or indirectly mediated through the release of soluble factors that induce the migration of fibroblasts or anti-inflammatory molecules that boost the remodeling phase of wound healing.

In conclusion, according to the previous findings, which have shown the capacity of MSCs in the repairment and regeneration of damaged tissues,<sup>39,40</sup> the usage of pretreated sutures will ensure the presence of MSCs in the sutured tissue. This may enhance healing and tissue remodeling in the shortest time possible and may be applicable for those patients that tend to have difficulty healing.

## ACKNOWLEDGMENTS

**Source of Funding:** This work was supported by two grants from the MICINN. to J.V. (BIO2009–07990) and JGC (PTQ-11–04554) and one grant to RB (TE12066) from GobEx cofinanced by FSE.

**Conflict of Interest:** None of the authors has a conflict of interests.

## REFERENCES

- Mingmalairak C, Ungbhakorn P, Paocharoen V. Efficacy of antimicrobial coating suture coated polyglactin 910 with tricosan (Vicryl plus) compared with polyglactin 910 (Vicryl) in reduced surgical site infection of appendicitis, double blind randomized control trial, preliminary safety report. *J Med Assoc Thai* 2009; 92: 770–5.
- Stadler S, Fleck T. Triclosan-coated sutures for the reduction of sternal wound infections? A retrospective observational analysis. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2011; 13: 296–9.
- Rijcken E, Fuchs T, Sachs L, Kersting CM, Bruewer M, Kriegelstein CF. Insulin-like growth factor 1-coated sutures improve anastomotic healing in an experimental model of colitis. *Br J Surg* 2010; 97: 258–65.
- Uggen C, Dines J, McGarry M, Grande D, Lee T, Limpisvasti O. The effect of recombinant human platelet-derived growth factor BB-coated sutures on rotator cuff healing in a sheep model. *Arthroscopy* 2010; 26: 1456–62.
- Pasternak B, Rehn M, Andersen L, Agren MS, Heegaard AM, Tengvall P, et al. Doxycycline-coated sutures improve mechanical strength of intestinal anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 271–6.
- Pasternak B, Missios A, Askendal A, Tengvall P, Aspenberg P. Doxycycline-coated sutures improve the suture-holding capacity of the rat Achilles tendon. *Acta Orthop* 2007; 78: 680–6.
- Shibuya TY, Wei WZ, Zormeier M, Ensley J, Sakr W, Mathog RH, et al. Anti-CD3/anti-CD28 monoclonal antibody-coated suture enhances the immune response of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 1229–34.
- Shibuya TY, Kim S, Nguyen K, Do J, McLaren CE, Li KT, et al. Bioactive suture: a novel immunotherapy for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 7088–99.
- Pascual I, Fernandez de MG, Garcia AM, Garcia-Olmo D. Biosutures improve healing of experimental weak colonic anastomoses. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 1447–51.
- Dolce CJ, Stefanidis D, Keller JE, Walters KC, Newcomb WL, Heath JJ, et al. Pushing the envelope in biomaterial research: initial results of prosthetic coating with stem cells in a rat model. *Surg Endosc* 2010; 24: 2687–93.
- Lee ES, Na K, Bae YH. Polymeric micelle for tumor pH and folate-mediated targeting. *J Control Release* 2003; 91: 103–13.
- Park GE, Pattison MA, Park K, Webster TJ. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. *Biomaterials* 2005; 26: 3075–82.
- Kim WS, Park BS, Sung JH, Yang JM, Park SB, Kwak SJ, et al. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *J Dermatol Sci* 2007; 48: 15–24.
- Cooper K, Viswanathan C. Establishment of a mesenchymal stem cell bank. *Stem Cells Int* 2011; 2011: 905621.
- Moroni L, Fornasari PM. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation, characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues. *J Cell Physiol* 2013; 228: 680–7.
- Karabulut R, Sonmez K, Turkyilmaz Z, Bagbanci B, Basaklar AC, Kale N. An in vitro and in vivo evaluation of tensile strength and durability of seven suture materials in various pH and different conditions: an experimental study in rats. *Indian J Surg* 2010; 72: 386–90.
- Bonzon-Kulichenko E, Perez-Hernandez D, Nunez E, Martinez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, et al. A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10: M110.
- Martinez-Bartolome S, Navarro P, Martin-Maroto F, Lopez-Ferrer D, Ramos-Fernandez A, Villar M, et al. Properties of average score distributions of SEQUEST: the probability ratio method. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 1135–45.
- Navarro P, Vazquez J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res* 2009; 8: 1792–6.
- Butala P, Szpalski C, Soares M, Davidson EH, Knobel D, Warren SM. Zmpste24-/- mouse model for senescent wound healing research. *Plast Reconstr Surg* 2012; 130: 788e–98e.
- Beare AH, O’Kane S, Krane SM, Ferguson MW. Severely impaired wound healing in the collagenase-resistant mouse. *J Invest Dermatol* 2003; 120: 153–63.
- Yao J, Korotkova T, Riboh J, Chong A, Chang J, Smith RL. Bioactive sutures for tendon repair: assessment of a method of delivering pluripotential embryonic cells. *J Hand Surg [Am]* 2008; 33: 1558–64.
- Adas G, Arikian S, Karatepe O, Kemik O, Ayhan S, Karaoz E, et al. Mesenchymal stem cells improve the healing of ischemic colonic anastomoses (experimental study). *Langenbecks Arch Surg* 2011; 396: 115–26.
- Park K, Cho KJ, Kim JJ, Kim IH, Han DK. Functional PLGA scaffolds for chondrogenesis of bone-marrow-derived mesenchymal stem cells. *Macromol Biosci* 2009; 9: 221–9.
- Kim H, Kim HW, Suh H. Sustained release of ascorbate-2-phosphate and dexamethasone from porous PLGA scaffolds for bone tissue engineering using mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2003; 24: 4671–9.
- Yang HN, Park JS, Woo DG, Jeon SY, Do HJ, Lim HY, et al. C/EBP-alpha and C/EBP-beta-mediated adipogenesis of human mesenchymal stem cells (hMSCs) using PLGA nanoparticles



- complexed with poly(ethyleneimine). *Biomaterials* 2011; 32: 5924–33.
27. Zhu S, Zhang B, Man C, Ma Y, Liu X, Hu J. Combined effects of connective tissue growth factor-modified bone marrow-derived mesenchymal stem cells and NaOH-treated PLGA scaffolds on repair of articular cartilage defect in rabbits. *Cell Transplant* 2013 Jul 11 [Epub ahead of print].
  28. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells* 2007; 25: 2648–59.
  29. Singer NG, Caplan AI. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annu Rev Pathol* 2011; 6: 457–78.
  30. Kuo YC, Chung CY. Chondrogenesis in scaffolds with surface modification of elastin and poly-L-lysine. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012; 93: 85–91.
  31. Fioretti F, Lebreton-DeCoster C, Gueniche F, Yousfi M, Humbert P, Godeau G, et al. Human bone marrow-derived cells: an attractive source to populate dermal substitutes. *Wound Repair Regen* 2008; 16: 87–94.
  32. Opalenik SR, Davidson JM. Fibroblast differentiation of bone marrow-derived cells during wound repair. *FASEB J* 2005; 19: 1561–3.
  33. DeLany JP, Floyd ZE, Zvonice S, Smith A, Gravois A, Reiners E, et al. Proteomic analysis of primary cultures of human adipose-derived stem cells: modulation by Adipogenesis. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 731–40.
  34. Kratchmarova I, Kalume DE, Blagoev B, Scherer PE, Podtelejnikov AV, Molina H, et al. A proteomic approach for identification of secreted proteins during the differentiation of 3T3-L1 preadipocytes to adipocytes. *Mol Cell Proteomics* 2002; 1: 213–22.
  35. Fletcher J. The role of collagen in wound healing. *Prof Nurse* 2000; 15: 527–30.
  36. Landsman A, Taft D, Riemer K. The role of collagen bioscaffolds, foamed collagen, and living skin equivalents in wound healing. *Clin Podiatr Med Surg* 2009; 26: 525–33.
  37. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Reversal of photodamage with topical growth factors: a pilot study. *J Cosmet Laser Ther* 2003; 5: 25–34.
  38. Lee KY, Huang SM, Li S, Kim JM. Identification of differentially expressed genes in papillary thyroid cancers. *Yonsei Med J* 2009; 50: 60–7.
  39. Yeum CE, Park EY, Lee SB, Chun HJ, Chae GT. Quantification of MSCs involved in wound healing: use of SIS to transfer MSCs to wound site and quantification of MSCs involved in skin wound healing. *J Tissue Eng Regen Med* 2013; 7: 279–91.
  40. Badiavas AR, Badiavas EV. Potential benefits of allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells for wound healing. *Expert Opin Biol Ther* 2011; 11: 1447–54.

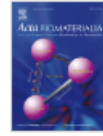
### Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Figure S1.** Hydroxyproline content in sutured skins using multifilament absorbable sutures without cells. The sutures were coated with gelatin or poly-L-lysine, or pre-treated with NaOH. The sutured tissues were excised and hydroxyproline was quantified for the estimation of collagen involved in the healing process. The different sutures (control, poly-L-Lysine-coated, gelatin-coated, and NaOH-treated) are represented. Four mice were used for the experiment.







Full length article

## Surgical meshes coated with mesenchymal stem cells provide an anti-inflammatory environment by a M2 macrophage polarization\*

Rebeca Blázquez, Francisco Miguel Sánchez-Margallo, Verónica Álvarez, Alejandra Usón, Javier G.

Casado  

Stem Cell Therapy Unit, 'Jesús Usón' Minimally Invasive Surgery Centre, Cáceres 10071, Spain

Received 7 April 2015, Revised 15 October 2015, Accepted 28 November 2015, Available online 30 November 2015

### Abstract

Surgical meshes are widely used in clinics to reinforce soft tissue's defects, and to give support to prolapsed organs. However, the implantation of surgical meshes is commonly related with an inflammatory response being difficult to eradicate without removing the mesh. Here we hypothesize that the combined use of surgical meshes and mesenchymal stem cells (MSCs) could be a useful tool to reduce the inflammatory reaction secondary to mesh implantation.

*In vitro* determinations of viability, metabolic activity and immunomodulation assays were performed on MSCs-coated meshes. Magnetic resonance imaging, evaluation by laparoscopic optical system and histology were performed for safety assessment. Finally, flow cytometry and qRT-PCR were used to elucidate the mechanism of action of MSCs-coated meshes.

Our results demonstrate the feasibility to obtain MSCs-coated surgical meshes and their cryopreservability to be used as an 'off the shelf' product. These biological meshes fulfill the safety aspects as non-adverse effects were observed when compared to controls. Moreover, both *in vitro* and *in vivo* studies demonstrated that, local immunomodulation of implanted meshes is mediated by a macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype.

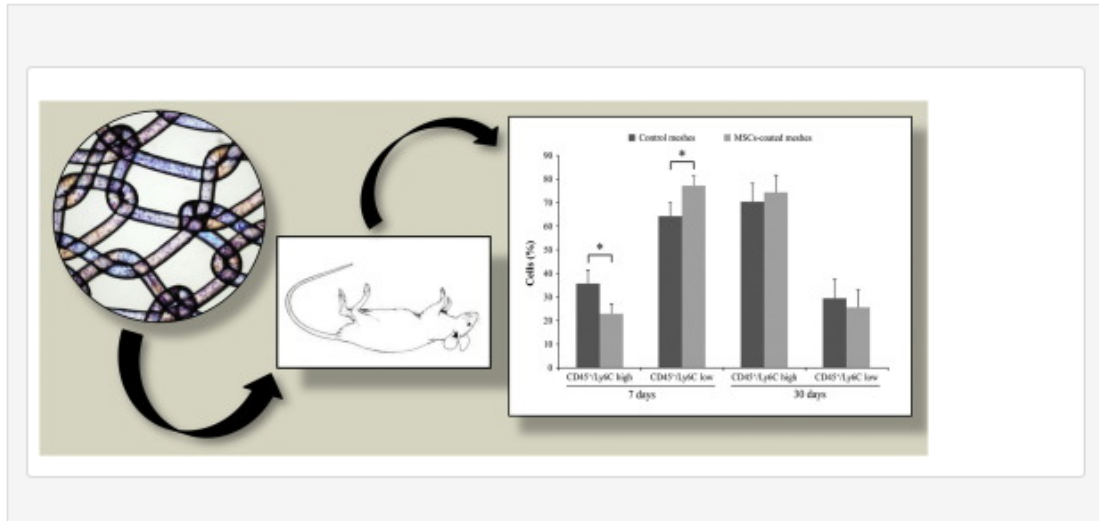
In conclusion, the combined usage of surgical meshes with MSCs fulfills the safety requirements for a future clinical application, providing an anti-inflammatory environment that could reduce the inflammatory processes commonly observed after surgical mesh implantation.

### Statement of Significance

Surgical meshes are medical devices widely used in clinics to resolve hernias and organs' prolapses, among other disorders. However, the implantation of surgical meshes is commonly related with an inflammatory response being difficult to eradicate without removing the mesh, causing pain and discomfort in the patient. Previously, the anti-inflammatory, immunomodulatory and pro-regenerative ability of mesenchymal stem cells (MSCs) have been described.

To our knowledge, this is the first report where the anti-inflammatory and pro-regenerative ability of MSCs have been successfully applied in combination with surgical meshes, reducing the inflammatory processes commonly observed after mesh implantation. Moreover, our *in vitro* and *in vivo* results highlight the safety and efficacy of these bioactive meshes as a 'ready to use' medical product.

## Graphical abstract



## Keywords

Biocompatibility; Foreign body response; Mesenchymal stem cell; Surgical mesh

👤 Corresponding author.

Copyright © 2015 Acta Materialia Inc. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.057>

\* Por motivos de *copyright*, no puede incluirse copia de este artículo completo.

## RESEARCH ARTICLE

# Intrapericardial Administration of Mesenchymal Stem Cells in a Large Animal Model: A Bio-Distribution Analysis

Rebeca Blázquez<sup>1</sup>\*, Francisco Miguel Sánchez-Margallo<sup>1</sup>\*, Verónica Crisóstomo<sup>2</sup>, Claudia Báez<sup>2</sup>, Juan Maestre<sup>2</sup>, Mónica García-Lindo<sup>3</sup>, Alejandra Usón<sup>1</sup>, Verónica Álvarez<sup>1</sup>, Javier G. Casado<sup>1</sup>\*

**1** Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre, Caceres, Spain, **2** Endoluminal Therapy and Diagnosis, Minimally Invasive Surgery Centre, Caceres, Spain, **3** Anaesthetics Unit, Minimally Invasive Surgery Centre, Caceres, Spain

\* These authors contributed equally to this work.

\* jgarcia@ccmijesususon.com


 OPEN ACCESS

**Citation:** Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, García-Lindo M, et al. (2015) Intrapericardial Administration of Mesenchymal Stem Cells in a Large Animal Model: A Bio-Distribution Analysis. PLoS ONE 10(3): e0122377. doi:10.1371/journal.pone.0122377

**Academic Editor:** Meijing Wang, Indiana University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** July 15, 2014

**Accepted:** February 15, 2015

**Published:** March 27, 2015

**Copyright:** © 2015 Blázquez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported in part by two grants from Redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RD12/0042/0025 to FMSM and CB) and European FP7-HEALTH-2009-1.4-3 (Grant Agreement 242038). Two grants from GobEx cofinanced by FSE (TE12066 to RB and TA13042 to JGC). One grant from GobEx cofinanced by FEDER to JGC (IB13123). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## Abstract

The appropriate administration route for cardiovascular cell therapy is essential to ensure the viability, proliferative potential, homing capacity and implantation of transferred cells. At the present, the intrapericardial administration of pharmacological agents is considered an efficient method for the treatment of cardiovascular diseases. However, only a few reports have addressed the question whether the intrapericardial delivery of Mesenchymal Stem Cells (MSCs) could be an optimal administration route. This work firstly aimed to analyze the pericardial fluid as a cell-delivery vehicle. Moreover, the *in vivo* biodistribution pattern of intrapericardially administered MSCs was evaluated in a clinically relevant large animal model. Our *in vitro* results firstly showed that, MSCs viability, proliferative behavior and phenotypic profile were unaffected by exposure to pericardial fluid. Secondly, *in vivo* cell tracking by magnetic resonance imaging, histological examination and Y-chromosome amplification clearly demonstrated the presence of MSCs in pericardium, ventricles (left and right) and atrium (left and right) when MSCs were administered into the pericardial space. In conclusion, here we demonstrate that pericardial fluid is a suitable vehicle for MSCs and intrapericardial route provides an optimal retention and implantation of MSCs.

## Introduction

Clinical and preclinical studies have shown that multipotent stem cells can be successfully used for the improvement of cardiac function [1–3]. Although there are quite a few stem cell products in the market [4], many different clinical trials are continuously demonstrating that MSCs are a promising cell source for regenerative therapy [5,6]. These cells fulfill the safety requirements being particularly attractive for their availability, multipotentiality, self-renewal ability and low immunogenicity [1,7,8]. The appropriate route for MSCs administration is a fundamental step

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

for the success of stem cell-based therapies and determines their therapeutic effect. At the present, there are many clinical trials being conducted using different administration routes. Some of the most common administration routes for cell delivery are: direct surgical intramyocardial injection, catheter-based intramyocardial administration (transcoronary venous or transendocardial approach), intravenous infusion, intracoronary artery administration or retrograde coronary venous delivery [9].

Several pros and cons are attributed to any of these routes. For example, intracoronary administration produces a more uniformly distributed pattern of MSCs [1] but may result in blockage of coronary arteries [10,11]. The intramyocardial delivery appears to have a higher retention rate although there is a significant loss of transplanted cells due to myocardial contraction [12]. Intravenous infusion is the easiest method for cell delivery but its retention rate is very low [13]. At the present, most of the preclinical studies have clearly demonstrated that the retention of transplanted cells in the heart is very low by any delivery method [14].

Although there are still so many other open questions that need to be answered (dose, timing or cell type), alternative techniques and administration routes need to be investigated to ensure the viability of transferred cells, proliferative/differentiation potential as well as their homing capacity. Moreover, it would be advisable to guarantee the implantation of cells for a period of time enough to reach the desired therapeutic effect. In this sense, a higher retention rate may have a greater impact on cardiac repair enabling paracrine stimulation through the release of growth factors, pro-angiogenic molecules, immunomodulatory factors, proliferative and anti-apoptotic molecules.

Several administration routes are currently being studied for clinical use [12], but only a few reports address the question whether the intrapericardial delivery of MSCs could be a safe and effective alternative to other surgical procedures. The pericardial fluid (PF) is an ultrafiltrate of plasma secreted by the serous membrane to decrease the friction between heart and adjacent tissues. The composition is very similar to plasma (with lower concentrations of proteins, triglycerides and cholesterol) and could be somehow considered an optimal vehicle to preserve the viability and functionality of MSCs.

Compared to other routes, the pericardial delivery permitted the administration of very high doses. On the contrary, the intramyocardial delivery is limited by volume and several adverse effects (i. e. arrhythmias) have been described [15,16]. In the case of intravenous and intracoronary routes, the main disadvantage is the low retention rate in the heart with a significant number of MSCs trapped in the lungs [17]. In contrast, PF provides a low turnover rate, allowing a long-term persistence of transferred cells. Additionally, it is important to note that, in the case of intracoronary administration of MSCs, these cells may induce a myocardial damage by microvascular obstruction [18,19], which is not a problem when injected intrapericardially, since this route is independent of impaired vascular functions which lead to myocardial infarction.

At the present, preclinical studies have shown that intrapericardial administration is an efficient method for delivering pharmacological agents [20,21]. Preclinical tests in large animal models have been performed using Fibroblast Growth Factor, L-Arginine or omega-3 fatty acids [22–24]. The treatment with Fibroblast Growth Factor in a porcine model of chronic myocardial ischemia has demonstrated a beneficial effect increasing the myocardial vascularity without adverse effects [25]. The delivery of L-Arginine has been tested in dogs reducing the severity of ischemic ventricular arrhythmias [23]. Finally, the intrapericardial delivery of omega-3 fatty acids reduced malignant arrhythmias and infarct sizes in a porcine infarct model [24].

In clinical settings, the blood supply to the myocardium becomes insufficient to those patients with arterial obstructions. This obstruction might also compromise the delivery of



transferred cells. The PF is independent of the vascular niche, has a low turnover rate that may provide a long term effect to achieve the desired therapeutic effect of stem cells.

Here we hypothesize that intrapericardial administration of MSCs may retain the cells in close proximity to the injury preserving its viability, homing and bioactivity. We also hypothesize that, the presence of MSCs in the PF, through the release of paracrine factors, may have a beneficial effect providing an optimal microenvironment for promoting cardiac repair.

In this work, our *in vitro* experiments have demonstrated for the first time that, PF preserves the phenotype, survival and proliferation rates of MSCs. The iron oxide labeling permitted *in vivo* tracking of intrapericardially administered MSCs by magnetic resonance imaging (MRI) in a clinically relevant animal model. The engraftment of MSCs in pericardium, ventricles and atrium was confirmed by histological examination and PCR detection. Although new medical devices such as AttachLifter has been developed to provide a secure implantation of cells in the pericardial space [26], to our knowledge, this is the first *in vitro* and *in vivo* imaging study where the distribution of MSCs after intrapericardial administration is finely detected. Altogether, our results suggest that PF could be considered an optimal vehicle for MSCs and intrapericardial administration an advantageous route for cardiovascular cell therapy.

## Materials and Methods

### Isolation of porcine bone marrow-derived mesenchymal stem cells

All experimental protocols were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Minimally Invasive Surgery Centre and fully complied with recommendations outlined by the local government. All surgery was performed under sevoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells (pBM-MSCs) were isolated from femurs of Large White male pigs aged between 3–4 months and weighed between 25–30 kilograms. The cell suspension was filtered through a 40  $\mu\text{m}$  nylon mesh and mononuclear cells were isolated by centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Mononuclear cells were recovered and washed twice with PBS. These cells were resuspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum (FBS), seeded onto tissue culture flasks and expanded at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Following 48 hours in culture, the non-adherent hematopoietic cells were removed. Adhered cells were passaged at 80%–90% confluence by 0.25% trypsin solution (Lonza, Walkersville, Inc.) and seeded to a new culture at a density of 5000–6000 cells/cm<sup>2</sup>. Culture medium was changed every 7 days. The pBM-MSCs at passages 10 to 15 were used for intrapericardial delivery.

### Biochemical analysis of pericardial fluid and plasma

Before intrapericardial injection of pBM-MSCs, blood and PF samples from animals were collected, centrifuged to eliminate cellular debris and processed in the random access clinical analyzer Metrolab 330 (Metrolab S.A., Buenos Aires, Argentina) to determine their biochemical composition (total bilirubin, calcium, cholesterol, creatinine, glucose, phosphorus, total proteins, triglycerides and urea concentrations). The measurements were compared by the Student's *t* test and paired test using SPSS software. A *p* value  $\leq 0.05$  was considered significant.

### CCK-8 proliferation and viability assays

The CCK-8 method is a cell viability assay which measures the activity of living cells by assessing their mitochondrial activity. In order to quantify the proliferative activity of pBM-MSCs, these cells were co-cultured in the presence of PF. The PF was aspirated from three euthanized healthy animals, centrifuged for 5 min at 450 x g and passed through a 0.22  $\mu\text{m}$  filter to remove

cell debris. The pBM-MSCs were seeded in DMEM medium (without phenol-red) at a density of 5000 cells/cm<sup>2</sup> in 96 well plates. Different concentrations of PF were prepared (12.5%, 25%, 50%, 75% and 100%). The CCK-8 (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added according to the manufacturer's protocol and absorbance was read at 450 nm. The viability was measured by trypan blue dye-exclusion assay. Data were statistically analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS-15 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### Phenotypic analysis of mesenchymal stem cells by flow cytometry

For flow cytometric analysis, the pBM-MSCs were cultured in the presence of PF at different concentrations (12.5%, 25%, 50%, 75% and 100%) and under standard culture conditions (10% FBS). At day 7 and 14, the cells were detached with 0.25% trypsin solution and stained with FITC-conjugated human monoclonal antibodies (mAbs) against CD90, CD105 (both cross-reactive with porcine) and porcine mAbs against CD29, CD31, CD44, CD45 and Swine Leukocyte Antigens (Class I and Class II) from Serotec (Kidlington, UK). The phenotypic analysis was performed as follows: 2x10<sup>5</sup> cells were incubated for 30 min at 4°C with appropriate concentrations of mAbs in the presence of PBS containing 2% FBS. The cells were washed and resuspended in PBS. The flow cytometric analysis was performed on a FACScalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) after acquisition of 10<sup>5</sup> events. Cells were primarily selected using forward and side scatter characteristics and fluorescence was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Isotype-matched negative control antibodies were used in all the experiments. The mean relative fluorescence intensity (MRFI) was calculated by dividing the mean fluorescent intensity (MFI) by the MFI of its negative control. Data were statistically analyzed with one-way analysis of variance (ANOVA) using SPSS-15 (SPSS, Chicago, IL, USA).

### *In vitro* assessment of superparamagnetic iron oxide labeling in pBM-MSCs

The superparamagnetic iron oxide (SPIO) nanoparticles offer an optimal signal for T2 weighted magnetic resonance images acting as contrast agents in MRI. For this, in order to improve the *in vivo* cell tracking of pBM-MSCs, these cells were magnetically labeled with increasing SPIO concentrations (Endorem, Guerbet, Paris, France). The SPIO solution was previously coated with Poly-L-Lysine (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 0.02 mg/mL (MW = 389,000 Daltons) as a facilitator agent. Both SPIO and Poly-L-Lysine were gently shaken for 30 minutes at room temperature and added to adherent cell cultures at a proportion of 1:1 in DMEM containing 10% FBS. The final concentrations in all groups were 25, 50, 100 and 200 µg/mL of SPIO. The labeling efficiency was *in vitro* determined by Prussian Blue staining.

### Superparamagnetic iron oxide detection and fluorescent labeling

After incubation with SPIO, the Prussian Blue method was used to detect SPIO particles within the cells. The *in vitro* cultured pBM-MSCs were fixed in 4% paraformaldehyde at 37°C for 30 min. After fixation, the samples were washed with PBS and incubated with equal volume of 8% hydrochloric acid and 4% potassium ferrocyanide for 20 min at room temperature. Cultures were washed with distilled water and visualized after 24h, 3d, 5d and 7d by light microscopy. The intracellular content of potassium ferrocyanide was spectrophotometrically quantified. *In vitro* cultured cells were lysed in the presence of 0.1% Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and the absorbance of the extracts was quantified at 700 nm. For the fluorescent labeling of cells, the Vybrant CM-Dil cell labelling solution (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added to normal culture media according to manufacturer's recommendations, to uniformly label cells.

### Myocardial infarction model creation

Four Large White pigs were housed in the animal facility at Minimally Invasive Surgery Centre and used for all experimental procedures. Animals were aged between 3–4 months and weighed between 30–35 kilograms. Animal care and all experimental procedures were approved by the Ethics Committee for Animal Research of the local government. Each animal was premedicated with diazepam 0.1 mg/kg, ketamine 10 mg/kg, and atropine 0.01 mg/kg intramuscularly. Intravenous hydration with normal saline was established by catheterization of the auricular vein with 18–22 gauge needles (Abbott Ireland) and maintained during procedures. Induction of anesthesia was performed intravenously with 2 mg/kg of propofol. After the pig was endotracheally intubated, it was connected to a system for anesthesia (Ohmeda Excel 210) and a mechanical ventilator Ohmeda 7800 (Ohmeda, Madison, Wis). Anesthesia was maintained with 2.0%–2.5% halothane, and blood pressure, electrocardiogram, O<sub>2</sub> saturation and end tidal CO<sub>2</sub> were monitored closely throughout the procedure. The pigs were fixed on the operating table in the supine position with cranial and caudal extension of the limbs. The thorax and upper abdomen were shaved and draped in a sterile fashion. Continuous infusion of lidocaine at rate of 1 mg/kg/h (Lidocaina Braun, Braun Medical, Barcelona, Spain) was used through the procedure. Systemic heparin (Heparina Rovi 5%, Laboratorios farmaceuticos Rovi, Madrid, Spain) was injected intravenously (150 UI/Kg) prior to percutaneous sheath placement. Under aseptic conditions, a right femoral arterial access was established using the Seldinger technique and a 7 Fr introducer sheath (Terumo, Tokyo, Japan) was placed percutaneously into the femoral artery. Under fluoroscopic guidance (Philips Mobile Digital Angiographic System-BV Pulsara, Philips Medical System, Best, The Netherlands), a 6 Fr hockey stick guiding catheter (Mach 1, Boston Scientific Corporation, Natick, MA, USA) was introduced and placed at the origin of the left coronary artery. Coronary angiograms were obtained in the 40° left anterior oblique projection to better demonstrate the length of the Left Anterior Descending artery (LAD), and a 0.0014 coronary guidewire (Hi-torque, Abbott Vascular, Santa Clara, CA, USA) was advanced inside the LAD. After measuring the diameter of the LAD immediately below the origin of the first diagonal, an over-the-wire PTCA balloon of appropriate diameter (typically 3mm, Apex OTW, Boston Scientific, Natick, MA, USA) was advanced to this location and inflated to occlude the LAD flow for 90 min. A lidocaine bolus was also administered immediately before balloon inflation and deflation. Upon balloon deflation, the coronary artery was checked for patency by repeating angiogram. Animals were maintained fully monitored under general anesthesia for 45 min after infarct induction, in order to treat any malignant arrhythmias that may ensue.

Cardiac MRI was performed before the creation of the model and 7 days post-myocardial infarction using a 1.5 T MR system (Intera 1.5T Philips Medical System, Best, The Netherlands). For *in vivo* cell tracking, cardiac MRI images were obtained at different time points for one week. All imaging was performed under general anesthesia using retrospective cardiac gating with the animal in sterna decubitus and a four elements phase array coil was placed around the animal chest. Images were acquired in the intrinsic cardiac planes: short axis, long axis and four chamber views. For measurement of ventricular function and mass breath hold balanced SSFP, cine images were obtained over the entire ventricle. For infarct size measurements, images were acquired 5–15 min after the injection of 0.2 mmol/kg of a gadolinium-based contrast agent using a breath hold 3D gradient-echo inversion-recovery sequence. MR images were analyzed for a left ventricular volume, mass, function and infarct size.



### Intrapericardial administration of pBM-MSCs in non-infarcted and infarcted porcine hearts

Each animal was pre-medicated with diazepam 0.3 mg/kg and ketamine 10 mg/kg intramuscularly. Intravenous hydration with normal saline was established by catheterization of the auricular vein with 18–20 gauge needles (Abbott, Sligo, Ireland) and maintained during procedures. Induction of anesthesia was performed intravenously with 2 mg/kg of propofol. After the pig was endotracheally intubated, it was connected to a system for anesthesia (Leon Plus, Heinen+Löwenstein). Anesthesia was maintained with 1.8%–2% sevoflurane, and blood pressure, electrocardiogram, O<sub>2</sub> saturation and end tidal CO<sub>2</sub> were monitored closely throughout the procedure. The pigs were fixed on the operating table and thorax and upper abdomen were shaved and draped in a sterile fashion. Intrapericardial injections containing 100 x 10<sup>6</sup> pBM-MSCs in 5 mL of Hypothermosol (BioLife Solutions, Inc., Owego, NY) were performed via thoracotomy using an Abbocath-T 20G catheter (Hospira, Lake Forest, IL). Once the injections were completed, the incision was closed in layers and the animals were allowed to recover. The animals were euthanized 7 days later with a lethal dose of Potassium Chloride intravenously infused under general anesthesia. The hearts were firstly examined *in situ*. Gross visual inspection was focused on possible complications associated with the procedures and potential damages to the pericardium, epicardium and surrounding structures in the mediastinum.

### *In vivo* visualization of intrapericardially delivered pBM-MSCs by magnetic resonance imaging

The pBM-MSCs were labeled with 100 µg/mL of SPIO for 24h as previously described. A total of 100 x 10<sup>6</sup> labeled pBM-MSCs cells were injected into the pericardial cavity (see previous section in Materials and Methods). To perform MRI, the animals were anesthetized with isoflurane (2–3% in medical air administered via a nose cone). Cardiac-MRI was performed using a 1.5 T MR system (Intera 1.5 T, Philips Medical Systems, Best, The Netherlands). All imaging was performed using retrospective cardiac gating, with the animal in sternal decubitus position and a four elements phase array coil was placed around the animal's chest. Images were acquired in the intrinsic cardiac planes: short axis, long axis and four chamber views. For measurements of ventricular function and mass breath hold balanced steady-state free precession, cine images were obtained over the entire ventricle. The SPIO-labeled pBM-MSCs were identified with a T2-star weighted breath hold gradient-echo sequence. The resonance images were taken before injection, immediately after the injection and at days 3, 5 and 7 post-injection.

### Tissues sampling and histology

Samples were obtained after euthanasia. Firstly, the PF was aspirated from the pericardial cavity using an Abbocath-T 20G catheter. The PF was centrifuged for 5 min at 450 x g. The pellet was frozen for subsequent DNA amplification and supernatants were passed through a 0.22 µm filter to remove cell debris for subsequent biochemical analyses. The parietal pericardium was carefully removed and samples were frozen for PCR analysis or fixed in paraformaldehyde 4% for histological analyses. The heart was carefully dissected and samples from pericardium, right and left ventricles, right and left atrium, interventricular septum and interauricular septum were frozen or fixed.

### Y chromosome PCR

For the detection of male-derived pBM-MSCs in female hearts, Y-chromosome PCR was carried out from tissue samples. DNA extraction was performed with TRI Reagent (Sigma,

St. Louis, MO, USA) according to the manufacturer's instructions. The detection of male cells in a female recipient was carried out by PCR using the Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, Ca). Amplification consisted in 40 cycles of 30 seconds at 94°C for melting, 30 seconds at 55°C for annealing and one min at 72°C for amplification. The primers 5'-ACAGAGGCCTATT CATCTCAG-3' (forward) and 5'-CTTAATGGCTAATCACGGGAAC-3' (reverse) were designed to allow the amplification of Y-chromosome specific sequences (NCBI Reference Sequence: NC\_010462.2).

### Histological examination

The animals were sacrificed at day 7 post-administration. The heart was removed, rinsed, and sliced into 1–3 cm short-axis sections for histological studies. Histological samples were fixed in 4% paraformaldehyde, paraffin-embedded and cut in 5–8µm thickness. The sections were stained for Prussian blue and eosin and histologically examined to identify the accumulation SPIO-labeled cells in myocardium and parietal pericardium. Finally, histological samples were stained for Masson Trichrome and Toluidine blue.

## Results

### Viability, proliferative behavior and phenotype of pBM-MSCs in pericardial fluid

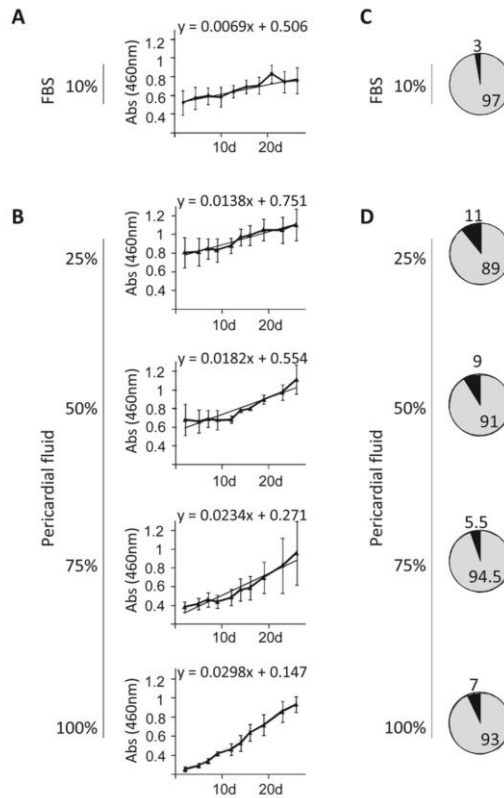
Preliminary experiments were firstly conducted to compare the biochemical composition of PF with plasma. As shown in Table 1, significant differences were found for cholesterol, phosphorus, triglycerides and total proteins, however, the rest of analyzed parameters were very similar. Once compared the biochemical composition, in order to be sure that PF is an adequate vehicle for cell administration, the viability of pBM-MSCs was assayed in the presence of different concentrations of PF. Healthy animals were euthanized and their PFs were *in vitro* cultured together with pBM-MSCs. The viability and proliferative behavior were calculated by trypan blue dye-exclusion and CCK-8 proliferation assays respectively. As shown in Fig. 1, the viability was not affected at any of the tested concentrations being comparable to control cells cultured under standard conditions (DMEM together with 10% FBS). Additionally, as the composition of PF may modify the proliferative behavior of pBM-MSCs, cell proliferation assays were performed in the presence of different concentrations of PF. These proliferation experiments were conducted using Cell Counting Kit-8 (CCK-8) and a cell growth curve was generated (slopes

**Table 1. Biochemical analysis of pericardial fluid and blood plasma (n = 3).**

	Pericardial fluid Mean ± SD	Blood plasma Mean ± SD
Total bilirubin (mg/dl)	0.03 ± 0.02	0.23 ± 0.11
Calcium (mg/dl)	7.87 ± 2.12	11.47 ± 1.33
Cholesterol (mg/dl)*	4.00 ± 1.00	81.00 ± 8.66
Creatinine (mg/dl)	2.20 ± 0.07	2.24 ± 0.09
Glucose (mg/dl)	86.67 ± 3.21	82.67 ± 13.05
Phosphorus (mg/dl)*	5.47 ± 1.36	6.49 ± 1.03
Total protein (g/dl)*	0.95 ± 0.29	5.82 ± 0.65
Triglycerides (mg/dl)*	14.33 ± 5.51	88.67 ± 38.55
Urea (mg/dl)	18.03 ± 2.96	20.20 ± 2.95

\*p ≤ 0.05 in a paired Student's t-test.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.t001

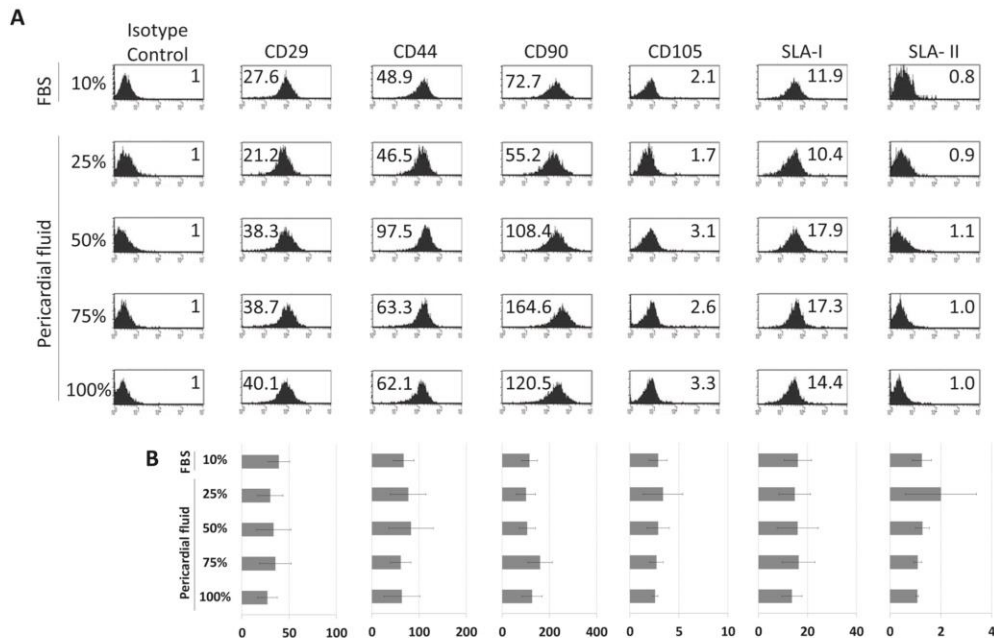


**Fig 1. Proliferative behavior and viability and of pBM-MSCs co-cultured with pericardial fluid.** The pBM-MSCs were co-cultured in the presence of pericardial fluids from three different healthy animals. (A and B) The proliferative behavior of cells was spectrophotometrically quantified at 460 nm for 26 days using a CCK-8 proliferation kit. Values shown in the graphics represent mean $\pm$ SD of 3 independently performed experiments. The slopes correspond to the proliferation rates of pBM-MSCs. An ANOVA test was performed comparing the slopes of the different experiments between groups, and no significant differences were found. (C and D) The percentage of viable cells was calculated by trypan blue dye-exclusion and the average percentage of live and dead cells is represented in grey and black respectively.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g001

from Fig. 1 show the proliferation rates). Our *in vitro* results clearly demonstrated that, the proliferative rate of pBM-MSCs was unaffected by the presence of PF. More importantly, when we compared the proliferative rates of pBM-MSCs cultured under standard conditions with those cells cultured in the presence of PF, we found that cell proliferation increased proportionally, although not significantly, to PF concentrations.

Finally, in order to confirm that the phenotype was not affected by the presence of PF, *in vitro* assays were performed using pBM-MSCs co-cultured in the presence of different PFs at different concentrations. No phenotypic differences were observed when different concentrations of PF were used (Fig. 2). These experiments were also conducted for 14 days with similar results to those at 7 days (data not shown).



**Fig 2. Effect of pericardial fluid on pBM-MSCs phenotype.** The phenotypic analysis was performed by multicolor flow cytometry. The cells were *in vitro* cultured for 7 days in the presence of Fetal Bovine Serum and in the presence of pericardial fluid at 25%, 50%, 75% and 100%. Representative histograms of four different experiments are shown (A). The expression level of Stem Cell Markers (CD29, CD31, CD44, CD90, CD105) and Swine Leukocyte Antigen Class-I and Class-II (SLA-I and SLA-II) is represented as Normalized Mean Relative Fluorescence Intensity which is calculated by dividing the Mean Fluorescent Intensity (MFI) by its isotype control. Graphic representation of mean $\pm$ SD for each marker is also provided (n = 4) (B). No significant differences were found between groups when ANOVA test was performed.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g002

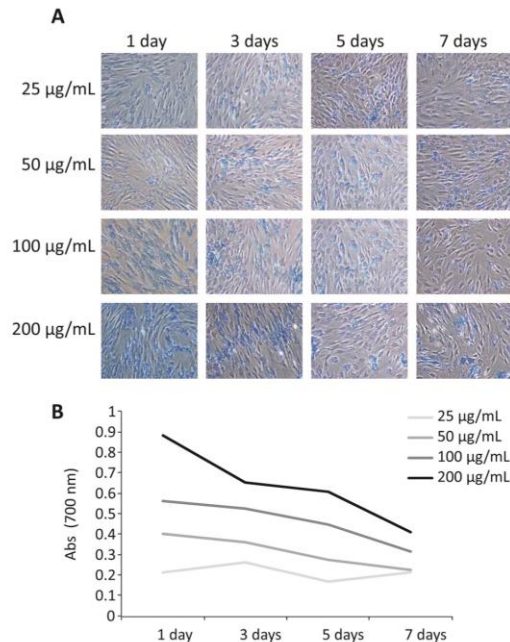
### Optimized labeling of mesenchymal stem cells for magnetic resonance imaging

The Endorem is a superparamagnetic particle which can be easily incorporated by endocytosis in MSCs for the *in vivo* cell tracking using MRI. In order to preserve a strong enough T2 signal for *in vivo* experiments preliminary *in vitro* assays were performed. The pBM-MSCs were treated with SPIO at different concentrations and intracellular SPIO was quantified at different time points. Fig. 3A shows the SPIO-labeled cells stained by the Prussian Blue solution. The microscopic images demonstrated that SPIO labeling was proportionally increased to the concentration of SPIO and decreased with time. Moreover, the intracellular SPIO was spectrophotometrically quantified (Fig. 3B) allowing us to conclude that, for an accurate *in vivo* cell tracking, MRI should be limited to 7 days at most.

### Cardiovascular magnetic resonance imaging

The *in vivo* experiments were performed in Large White pigs (n = 4) and a total of  $100 \times 10^6$  pBM-MSCs were intrapericardially administered via thoracotomy. The *in vivo* tracking of SPIO-labeled cells after intrapericardial administration was monitored using CINE-MRI (S1–S4 Videos) and cardiac-MRI imaging at different time points (S1 and S2 Figs.).





**Fig 3. Optimized labeling of pBM-MSCs for MRI.** (A) Endorem was incubated with pBM-MSCs at different concentrations (25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml and 200 µg/ml) Superparamagnetic iron oxide particles were detected by Prussian Blue-staining and observed by optical microscopy. (B) The Prussian Blue staining was spectrophotometrically quantified on pBM-MSCs. The cells were lysed with 0.1% Triton X-100 and the absorbance of the extracts was quantified at 700 nm.

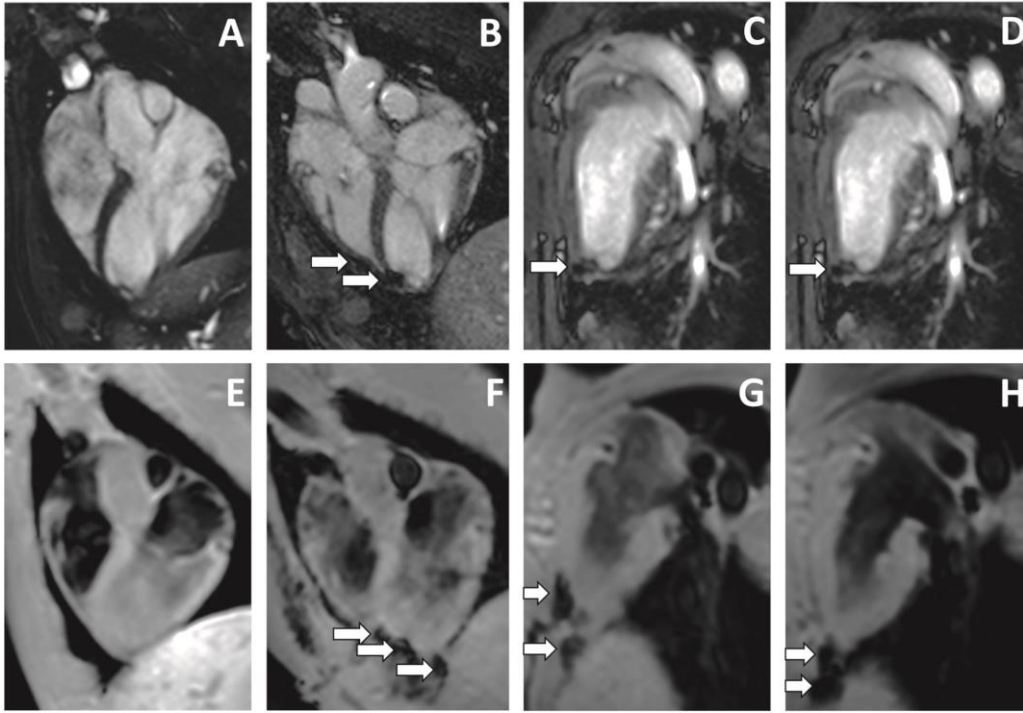
doi:10.1371/journal.pone.0122377.g003

The MRI images from non-infarcted hearts clearly demonstrated a preferential distribution of cells in the left ventricle at different time points (Fig. 4). The MRI images from infarcted heart showed that intrapericardial administration of pBM-MSCs rendered a more restricted location of cells in the left ventricle than in non-infarcted heart (Fig. 5).

Finally, it is important to note that, due to the limited sensitivity of MRI, we cannot discard the presence of administered cells in other heart locations. For this, to finely detect transferred cells in the heart, histological studies were performed after euthanasia.

### Macroscopic examination of the heart and histological localization of SPIO and fluorescent-labeled pBM-MSCs

Seven days after intrapericardial administration, the animals were euthanized and thoracic cavity was opened. A visual examination showed a normal conformation of tissues, with few pericardial adhesions to thoracic wall due to the surgical intervention. The PF was recovered before collecting the samples for histological and molecular analysis. The volume and macroscopic aspect of the fluid were normal indicating an absence of pericarditis. A biochemical analysis revealed not significant changes before and after the surgery (data not shown). Finally, the pericardium and the heart were removed and rinsed in saline serum. A detailed macroscopic evaluation was also performed but any important alteration was found on non-infarcted or infarcted hearts (Figs. 6A and 7A).

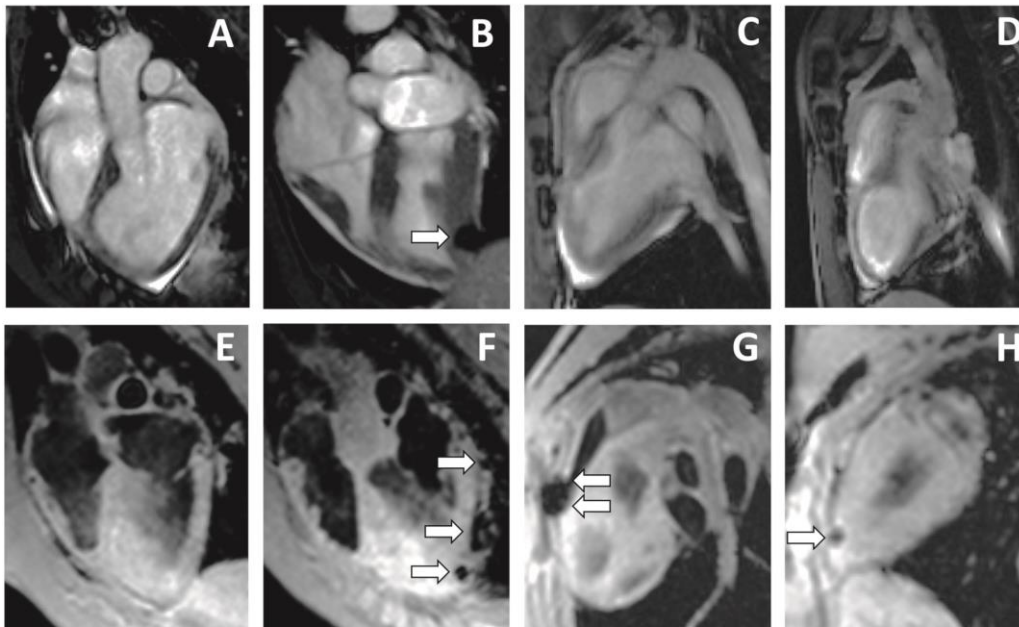


**Fig 4. *In vivo* cell tracking of intrapericardially delivered pBM-MSCs by cardiac-MRI in non-infarcted hearts.** A total of  $100 \times 10^6$  SPIO-labeled pBM-MSCs cells were injected into the pericardial cavity of healthy Large White pigs. The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chamber views (A-D) and using a T2-star gradient echo image (E-H). Images taken at day 3 post injection (B-D, F-H) are represented together with the corresponding control images (A, E) taken before injection. The arrows indicate the location of SPIO-labeled cells.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g004

For histological and molecular studies, the hearts were sliced into several sections. These sections were fixed and submerged in a Prussian Blue solution and heart slices showed positive macroscopic reactions in the epicardium and endocardium layers of the heart (Figs. 6B and 7B). The histological comparison between non-infarcted and infarcted heart corroborates the MRI findings. A preferential location of cells was observed in the left ventricle with a more diffuse distribution of cells in non-infarcted myocardium. In contrast, the cell distribution was more restricted to a small area in the infarcted myocardium.

In order to confirm the migratory behavior of transferred cells, tissue samples were collected and fixed for histological examination. For the visualization of SPIO-labeled cells, paraffin sections were stained with Prussian Blue solution and then counterstained with eosin. As shown in Figs. 6C and 7C, SPIO-labeled cells could be found at day 7 in the inner tissue after intrapericardial administration. Similar results were obtained using fluorescent-labeled cells detected by fluorescence microscopy (S3 Fig.). Moreover, histological evaluations with Masson Trichrome and Toluidine blue showed non-adverse effects in animal tissues (S4 Fig.).



**Fig 5. *In vivo* cell tracking of intrapericardially delivered pBM-MSCs by cardiac MRI in infarcted heart.** A total of  $100 \times 10^6$  SPIO-labeled pBM-MSCs cells were injected into the pericardial cavity. The MRI was performed using 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chambers view (A-D) and using a T2-star gradient echo image (E-H). Images taken at day 3 post injection (B-D, F-H) are represented together with the corresponding control images (A, E) taken before injection and one week after the infarction induction. The arrows indicate the location of SPIO-labeled cells.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g005

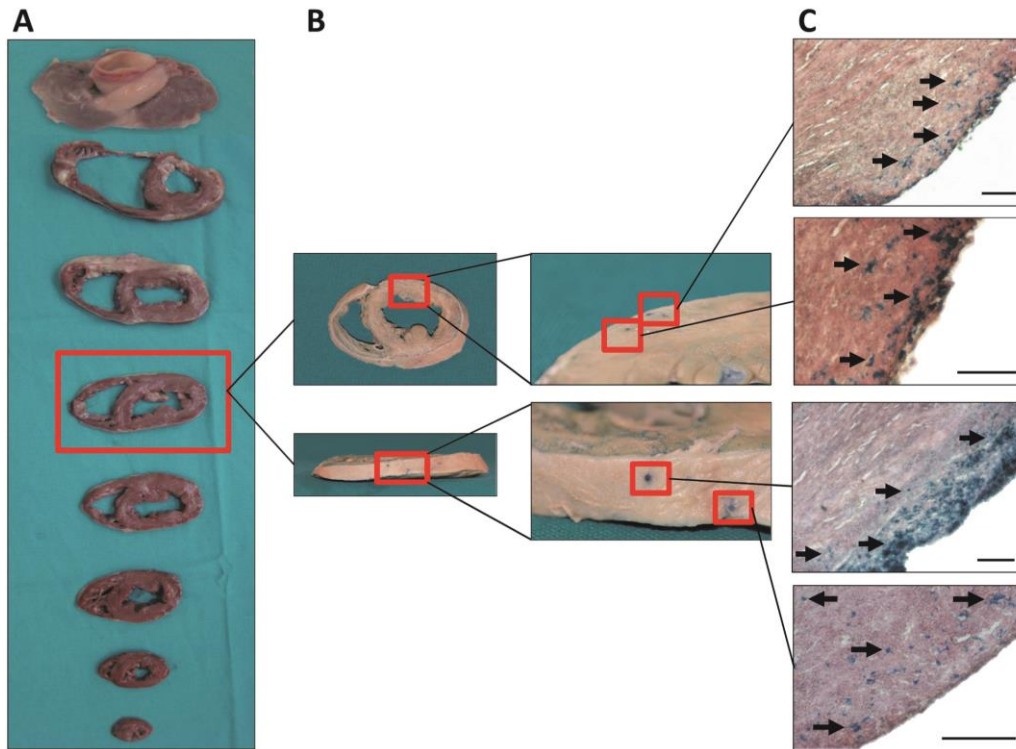
### Y chromosome detection into the female recipients

In order to determine the detection limit of the technique, preliminary experiments were performed. Samples with  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  male cells were mixed together with one million female cells and amplified by PCR. This technique showed a detection limit of 100–1000 male cells per  $10^6$  female cells (Fig. 8A). For the detection of transferred cells, the DNA from different tissues was isolated and Y chromosome amplified by PCR. As shown in Fig. 8B, the pBM-MSCs could be detected in samples from left ventricle, right atrium and right ventricle as well as in the pericardial sections surrounding the ventricles and atria. Taking into consideration that false SPIO staining from free particles could occur, the Y-chromosome amplification clearly confirmed the persistence of injected cells in the heart and pericardium after 7 days.

### Discussion

The safety and efficacy of intrapericardial therapies have been demonstrated in multiple studies [27,28] and large animal models such as pigs have been widely used for the evaluation of different compounds [24,25]. This work aimed to analyze the suitability of PF as a vehicle for MSCs administration together with the biodistribution of intrapericardially administered MSCs in a clinically relevant animal model. The swine present many similarities to the human heart and there is an increasing amount of preclinical works that can help interpreting and putting the results in context [29].





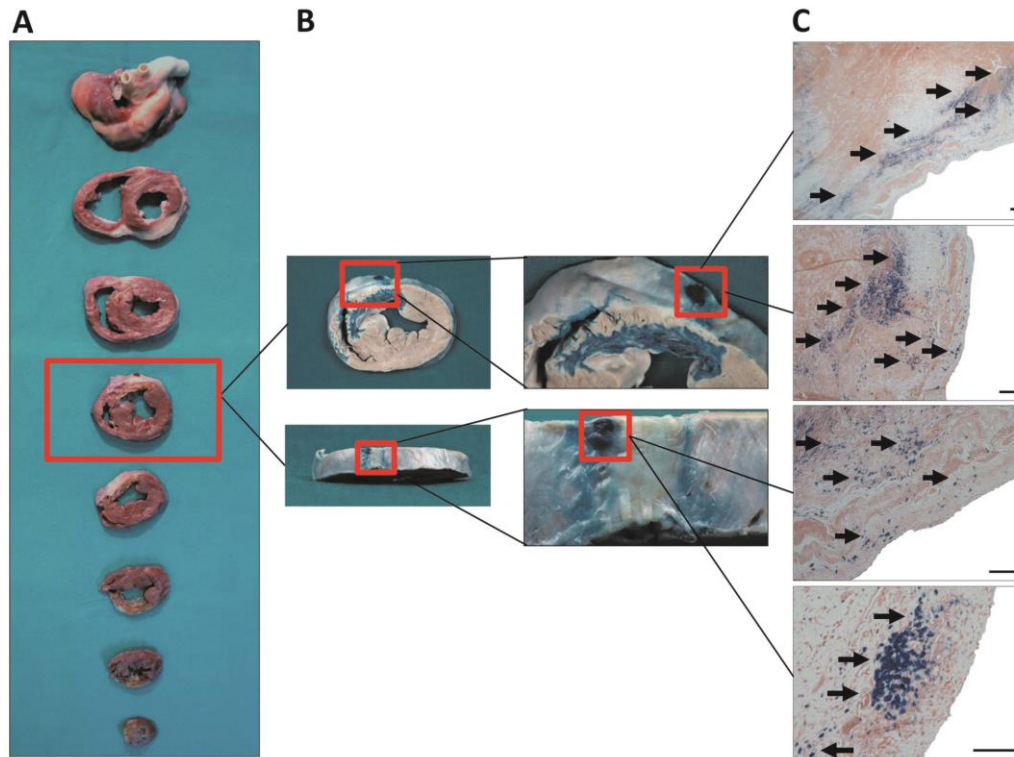
**Fig 6. Macroscopic examination and engraftment of SPIO-labeled cells in non-infarcted heart.** The SPIO-labeled pBM-MSCs were intrapericardially injected. At 7 days, heart samples were sliced into 1–3 cm short-axis sections and were then photographed (A). The heart slices were fixed in 4% formaldehyde. For the detection of SPIO-labeled cells, tissue sections were incubated with 8% hydrochloric acid and 4% potassium ferrocyanide and then with eosin. The blue color indicates the presence of SPIO within the tissue (B). Finally, for histological examination, tissue sections were paraffin-embedded and Prussian-blue/eosin staining demonstrated a preferential distribution of SPIO-labeled cells in the left ventricular myocardium (C). Scale bar: 100 $\mu$ m. Black arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells evidenced by the potassium ferrocyanide staining.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g006

At the present, bibliography shows several evidences for the successful integration of stem cells in the heart [30], being widely accepted that the administration route is one of the major factors influencing their therapeutic effect [14]. For stem cell-based therapies, the viability, survival and migratory behavior of transferred cells (especially in myocardial infarction and stroke), should be guaranteed in the target tissue [31]. In this sense, our first sets of experiments were conducted to evaluate the PF as a vehicle for stem cell delivery.

We firstly aimed to compare the biochemical profile between PF and plasma (an innocuous medium for cells growing and surviving). Our results demonstrated significant differences in the biochemical composition which is normal considering that PF is an ultrafiltrate of plasma. Moreover, the *in vitro* experiments demonstrated that PF provided an optimal viability, proliferation and long term survival of MSCs. To our knowledge, this is the first report where it has been experimentally demonstrated that PF is an optimal vehicle for MSCs.

According to these *in vitro* observations, we hypothesized that the intrapericardial administration of MSCs may retain the cells in close proximity to the injury preserving its bioactivity. Based on this hypothesis, our *in vivo* experiments were conducted in a clinically relevant

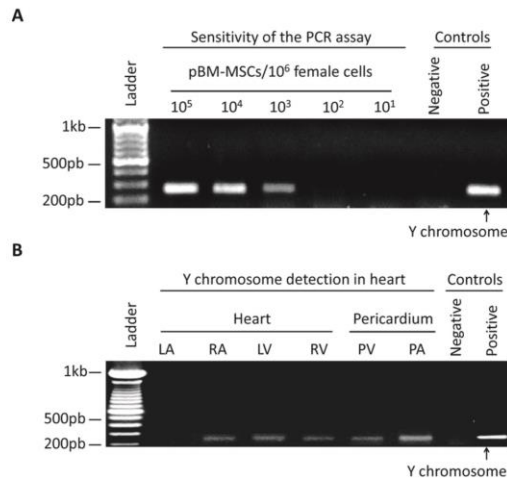


**Fig 7. Macroscopic examination and engraftment of SPIO-labeled cells in an infarcted heart.** The SPIO-labeled pBM-MSCs were intrapericardially injected one week after infarction induction. At 7 days, heart samples were sliced into 1–3 cm short-axis sections and were then photographed (A). The heart slices were fixed in 4% formaldehyde. For the detection of SPIO-labeled cells, tissue sections were incubated with 8% hydrochloric acid and 4% potassium ferrocyanide and then with eosin. The blue color indicates the presence of SPIO within the tissue (B). Finally, for histological examination, tissue sections were paraffin-embedded and Prussian-blue/eosin staining demonstrated a preferential distribution of SPIO-labeled cells in the left ventricular myocardium (C). Scale bar: 100 $\mu$ m. Black arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells evidenced by the potassium ferrocyanide staining.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g007

animal model. In these experiments, animals received a higher dose of MSCs but no inflammation, pericardial effusion or adverse adhesions were noted. Considering that safety is a major issue in cardiovascular stem cell therapy, our findings suggest that intrapericardial delivery is a safe route for MSCs transplantation. These results are in agreement with previous reports where the combined usage of MSCs and biomaterials were safely administered by this route [32,33].

The *in vivo* cell tracking by MRI clearly showed that administered cells were preferentially located surrounding the left ventricle. These results are relevant because myocardial infarction frequently involves the left ventricle [34], so this route may initially provide an optimal cell location and retention rate in the region of interest. Interestingly, previous results from our group, using intramyocardial delivery in the same animal model under similar conditions [35], showed that cell distribution and retention is comparable to that by intrapericardial administration.



**Fig 8. Y chromosome detection of intrapericardially delivered pBM-MSCs.** The pBM-MSCs from a male donor were detected in the heart by Y chromosome amplification. (A) In order to determine the sensitivity of PCR amplification, pBM-MSCs from a male donor were mixed with  $10^6$  pBM-MSCs from a female donor at the indicated ratios. Genomic DNA was extracted and subjected to PCR amplification using Y chromosome specific primers. The PCR allowed the detection of male cells with a sensitivity of 100–1000 cells per  $10^6$  female cells. (B) Female pigs were intrapericardially injected with male-derived pBM-MSCs. At day 7, the animals were euthanized and heart samples were collected for PCR analysis. As negative and positive controls, the genomic DNA from female and male pBM-MSCs cells were amplified. LA = left atrium, LV = left ventricle, RA = right atrium, RV = right ventricle, PV = pericardium on the right and left ventricles, PA = pericardium on the right and left atrium.

doi:10.1371/journal.pone.0122377.g008

It is important to note that, *in vivo* cell tracking of SPIO-labeled cells still remains controversial because free SPIO particles may cause false positives in the resonance that leads to an inaccurate analysis [36]. These false positives could be observed as a consequence of SPIO exocytosis from live cells [37]. Moreover, another commonly encountered problem is that, if cells die, magnetic particles will still be imaged by MRI and may be internalized by other cells [38]. In this work, our *in vitro* results suggest that, in preclinical settings a short-term follow-up could be feasible for at least 7 days. Moreover, in order to exclude the possibility that the totality of SPIO from MSCs could be internalized by resident phagocytic cells (i.e. macrophages), PCR analysis and histological studies were performed. The Y-chromosome amplification together with fluorescent microscopy images using fluorescent-labeled MSCs clearly demonstrated an engraftment of MSCs in the myocardium. However, although PCR amplification and fluorescent images demonstrated the presence of MSCs in the heart, we should also assume that some of the SPIO-positive cells observed in the tissue samples would also correspond to phagocytic cells [39,40].

In this work, there is a noteworthy limitation concerning to the *in vivo* efficacy of administered cells under acute myocardial infarct conditions. In this sense, *in vivo* studies are currently being conducted in a porcine model of myocardial infarct to evaluate the therapeutic effect of administered cells as well as the time-course and physiological conditions where the cells may display their beneficial effects (manuscript in preparation).

Regarding to the immunological aspects, it has been hypothesized that, the introduction of exogenous stem cells may be hampered by immune rejection [41]. In the case of intrapericardial delivery, the immune response against transferred cells could be mediated by activated



lymphocytes in the pericardial sac. In fact, the presence of such lymphocytes has been previously described in patients with different forms of heart disease [42]. For this, although MSCs possess a potent immunosuppressive function [43] we cannot discard a hypothetical immune response against transferred allogeneic MSCs and this aspect is currently under study in our laboratory.

Respecting to the hypothetical inefficient homing commonly linked to the administration of exogenous stem cells, our histological and PCR analysis have clearly confirmed the presence of transferred cells in different locations of the heart demonstrating that MSCs efficiently migrate from PF into the heart. Additionally we should also consider that, lymphatic drainage of the PF could be considered an “open door” for MSCs that may result in a systemic distribution of intrapericardially administered cells.

In conclusion, our results demonstrated that PF is an optimal vehicle for MSCs and intrapericardial administration is an optimal route for MSCs transplantation. This route has the great advantage of transferring relatively large amounts of cells avoiding the inherent risk of cell embolism linked to intracoronary administration. Moreover, in contrast to the local intramyocardial administration of cells where the underperfused myocardium makes an unfavored environment for cell survival, the intrapericardial delivery may provide an optimal environment for maintaining cell viability.

## Supporting Information

**S1 Fig. Time-course of *in vivo* cell tracking of intrapericardially delivered pBM-MSCs by cardiac-MRI in non-infarcted heart.** SPIO magnetic signal was detected by resonance for up to a week after injection. The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chamber views (A-D) and using a T2-star gradient echo image (E-H). Representative images of the MRI performed before the injection (A,E), after 3 days (B, F), 5 days (C,G) and 7 days post-injection (D, H) are shown. The arrows indicate the location of SPIO signal.  
(TIF)

**S2 Fig. Time-course of *in vivo* cell tracking of intrapericardially delivered pBM-MSCs by cardiac-MRI in an infarcted heart.** SPIO magnetic signal was detected by resonance for up to a week after injection. The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chamber views (A-D) and using a T2-star gradient echo image (E-H). Representative images of the MRI performed before the injection (A,E), after 3 days (B, F), 5 days (C,G) and 7 days post-injection (D, H) are shown. The arrows indicate the location of SPIO signal.  
(TIF)

**S3 Fig. Engraftment of fluorescent-labeled pBM-MSCs in the heart.** For the detection of Vybrant-labeled cells, tissue sections were fixed, paraffin-embedded and stained using the Masson's Trichrome Staining Protocol. The engraftment of Vybrant-labeled cells was visualized under fluorescent microscope. The A, B and C images correspond to an optical microscope image, fluorescent microscope image and merged them respectively. Scale bar: 100  $\mu$ m.  
(TIF)

**S4 Fig. Histological section in the left ventricle from animals sacrificed at day 7 post-administration.** Tissue sections were fixed, paraffin-embedded and stained using Toluidine-Blue (A, B) or the Masson's Trichrome staining protocol (C, D). The stainings were visualized at 4X (left column) and 10X (right column) objective magnification. Scale bars: 500  $\mu$ m and

100 $\mu$ m for 4X and 10X respectively.  
(TIF)

**S1 Video. Four chambers cine loop (T2\_BTFE\_BH) of non-infarcted heart at day 3 post-injection.** The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chamber views. SPIO nanoparticles signal can be observed in the region corresponding to the apex and left ventricle. White intermittent arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells.

(3GP)

**S2 Video. Long axis cine loop (T2\_BTFE\_BH) of non-infarcted heart at day 3 post-injection.** The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. SPIO nanoparticles signal can be observed in the region corresponding to the apex and left ventricle. White intermittent arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells.

(3GP)

**S3 Video. Four chambers cine loop (T2\_BTFE\_BH) of an infarcted heart at day 3 post-injection.** The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. Images were acquired in four chamber views. SPIO nanoparticles signal can be observed in the region corresponding to the apex and left ventricle. White intermittent arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells.

(3GP)

**S4 Video. Long axis cine loop (T2\_BTFE\_BH) of an infarcted heart at day 3 post-injection.** The MRI was performed using a 1.5T magnetic resonance technology. SPIO nanoparticles signal can be observed in the region corresponding to the apex and left ventricle. White intermittent arrows indicate the presence of SPIO-labeled cells.

(3GP)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RB FMSM JGC. Performed the experiments: RB VA JM AU CB VC MGL JGC. Analyzed the data: VA JM AU RB JGC. Wrote the paper: RB JGC FMSM.

## References

1. Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011; 109(8):923–940. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243147 PMID: 21960725
2. Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *Biomed Res Int.* 2013; 2013:547902. Available: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2013/547902>. doi: 10.1155/2013/547902 PMID: 23509740
3. Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4(2):145–153. doi: 10.1007/s12265-010-9246-y PMID: 21116883
4. Plant AL, Parker GC. Translating stem cell research from the bench to the clinic: a need for better quality data. *Stem Cells Dev.* 2013; 22(18):2457–2458. doi: 10.1089/scd.2013.0188 PMID: 23597110
5. Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One.* 2012; 7(10):e47559. Available: <http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0047559>. doi: 10.1371/journal.pone.0047559 PMID: 23133515
6. Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later. *Stem Cells Dev.* 2010; 19(7):1109–1120. doi: 10.1089/scd.2009.0465 PMID: 20092388

7. Hoogduijn MJ, Roemeling-van RM, Korevaar SS, Engela AU, Weimar W, Baan CC. Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther.* 2011; 22(12):1587–1591. doi: 10.1089/hum.2011.039 PMID: 21732766
8. Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med.* 2011; 18(2): 128–134. doi: 10.1016/j.molmed.2011.10.004 PMID: 22118960
9. Huang NF, Lam A, Fang Q, Sievers RE, Li S, Lee RJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium. *Regen Med.* 2009; 4(4):527–538. doi: 10.2217/rme.09.32 PMID: 19580402
10. Sanganalath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res.* 2013; 113(6):810–834. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300219 PMID: 23989721
11. Freyman T, Polin G, Osman H, Cray J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2006; 27(9):1114–1122. PMID: 16510464
12. van RJ, Rodrigo SF, Schaliq MJ, Beeres SL, Bax JJ, Atsma DE. Bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: the past and the future. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4(2):182–191. doi: 10.1007/s12265-010-9249-8 PMID: 21213093
13. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res.* 2011; 4(2):177–181. doi: 10.1007/s12265-010-9253-z PMID: 21181320
14. Fukushima S, Sawa Y, Suzuki K. Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart. *Future Cardiol.* 2013; 9(2):215–227. doi: 10.2217/fca.12.85 PMID: 23463974
15. Fukushima S, Varela-Carver A, Coppen SR, Yamahara K, Felkin LE, Lee J, et al. Direct intramyocardial but not intracoronary injection of bone marrow cells induces ventricular arrhythmias in a rat chronic ischemic heart failure model. *Circulation.* 2007; 115(17): 2254–2261. PMID: 17438152
16. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell.* 2008; 132(4): 598–611. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.038 PMID: 18295578
17. Barbash IM, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, et al. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation.* 2003; 108(7): 863–868. PMID: 12900340
18. Grieve SM, Bhandi R, Seow J, Doyle A, Turner AJ, Tomka J, et al. Microvascular Obstruction by Intracoronary Delivery of Mesenchymal Stem Cells and Quantification of Resulting Myocardial Infarction by Cardiac Magnetic Resonance. *Circ Heart Fail.* 2010; 3(3): e5–e6. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.931360 PMID: 20484192
19. Vulliet PR, Greeley M, Halloran SM, MacDonald KA, Kittleson MD. Intra-coronary arterial injection of mesenchymal stromal cells and microinfarction in dogs. *Lancet.* 2004; 363(9411): 783–784. PMID: 15016490
20. Sun F, Sanchez FM, Fernandez-Portales J, Crisostomo V, Diaz-Guemes I, Baez-Diaz C, et al. Chronic intrapericardial catheterization for repeated drug delivery: technical feasibility study in the Gottingen minipig. *J Invasive Cardiol.* 2012; 24(5):210–214. PMID: 22562914
21. Sun F, Sanchez FM, Crisostomo V, Luis L, Uson J, Maynar M. Subxiphoid access to normal pericardium with micropuncture set: technical feasibility study in pigs. *Radiology.* 2006; 238(2):719–724. PMID: 16371586
22. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Xu X, Sellke FW. Intrapericardial administration of basic fibroblast growth factor: myocardial and tissue distribution and comparison with intracoronary and intravenous administration. *Catheter Cardiovasc Interv.* 2003; 58(3):375–381. PMID: 12594706
23. Fei L, Baron AD, Henry DP, Zipes DP. Intrapericardial delivery of L-arginine reduces the increased severity of ventricular arrhythmias during sympathetic stimulation in dogs with acute coronary occlusion: nitric oxide modulates sympathetic effects on ventricular electrophysiological properties. *Circulation.* 1997; 96(11):4044–4049. PMID: 9403630
24. Xiao YF, Sigg DC, Ujhelyi MR, Wilhelm JJ, Richardson ES, Iazzo PA. Pericardial delivery of omega-3 fatty acid: a novel approach to reducing myocardial infarct sizes and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2008; 294(5):H2212–H2218. doi: 10.1152/ajpheart.91502.2007 PMID: 18326793
25. Laham RJ, Rezaee M, Post M, Novicki D, Sellke FW, Pearlman JD, et al. Intrapericardial delivery of fibroblast growth factor-2 induces neovascularization in a porcine model of chronic myocardial ischemia. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000; 292(2):795–802. PMID: 10640320
26. Rupp H, Rupp TP, Alter P, Jung N, Pankuweit S, Maisch B. Intrapericardial procedures for cardiac regeneration by stem cells: need for minimal invasive access (AttachLifter) to the normal pericardial cavity. *Herz.* 2010; 35(7):458–465. doi: 10.1007/s00059-010-3382-7 PMID: 20941468



27. Kornowski R, Fuchs S, Leon MB, Epstein SE. Delivery strategies to achieve therapeutic myocardial angiogenesis. *Circulation*. 2010; 101(4):454–458.
28. Maisch B, Pankuweit S. Current treatment options in (peri)myocarditis and inflammatory cardiomyopathy. *Herz*. 2012; 37(6):644–656. PMID: [22996288](#)
29. Crisostomo V, Maestre J, Maynar M, Sun F, Baez-Diaz C, Uson J, et al. Development of a closed chest model of chronic myocardial infarction in Swine: magnetic resonance imaging and pathological evaluation. *ISRN Cardiol*. 2013:781762. Available: <http://www.hindawi.com/journals/isrn.cardiology/2013/781762>.
30. Sharma R, Raghurir R. Stem cell therapy: a hope for dying hearts. *Stem Cells Dev*. 2007; 16(4):517–536. PMID: [17784827](#)
31. Hyun JS, Tran MC, Wong VW, Chung MT, Lo DD, Montoro DT, et al. Enhancing stem cell survival in vivo for tissue repair. *Biotechnol Adv*. 2013; 31(5):736–743. doi: [10.1016/j.biotechadv.2012.11.003](#) PMID: [23153460](#)
32. Ladage D, Turnbull IC, Ishikawa K, Takewa Y, Rapti K, Morel C, et al. Delivery of gelfoam-enabled cells and vectors into the pericardial space using a percutaneous approach in a porcine model. *Gene Ther*. 2011; 18(10):979–985. doi: [10.1038/gt.2011.52](#) PMID: [21512506](#)
33. Yang Y, Dreessen de GP, Sun J, Glogowski M, Gussakovskiy E, Kupriyanov V. MRI studies of cryoinjury infarction in pig hearts: ii. Effects of intrapericardial delivery of adipose-derived stem cells (ADSC) embedded in agarose gel. *NMR Biomed*. 2012; 25(2):227–235. doi: [10.1002/nbm.1735](#) PMID: [21774011](#)
34. Ruiz-Esparza GU, Flores-Arredondo JH, Segura-Ibarra V, Torre-Amione G, Ferrari M, Blanco E, et al. The physiology of cardiovascular disease and innovative liposomal platforms for therapy. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8:629–640. doi: [10.2147/IJN.S30599](#) PMID: [23413209](#)
35. Gomez-Mauricio RG, Acarregui A, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Gallo I, Hernandez RM, et al. A preliminary approach to the repair of myocardial infarction using adipose tissue-derived stem cells encapsulated in magnetic resonance-labelled alginate microspheres in a porcine model. *Eur J Pharm Biopharm*. 2013; 84(1): 29–39. doi: [10.1016/j.ejpb.2012.11.028](#) PMID: [23266493](#)
36. Jasmin, Torres AL, Jelicks L, de Carvalho AC, Spray DC, Mendez-Otero R. Labeling stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: analysis of the labeling efficacy by microscopy and magnetic resonance imaging. *Methods Mol Biol*. 2012; 906:239–52. doi: [10.1007/978-1-61779-953-2\\_18](#) PMID: [22791437](#)
37. Cromer Berman SM, Kshitz, Wang CJ, Orukari I, Levchenko A, Bulte JWM, et al. Cell Motility of Neural Stem Cells is Reduced after SPIO-Labeling, which is Mitigated after Exocytosis. *Magn Reson Med*. 2013; 69(1):255–262. doi: [10.1002/mrm.24216](#) PMID: [22374813](#)
38. Bull E, Madani SY, Sheth R, Seifalian A, Green M, Seifalian AM. Stem cell tracking using iron oxide nanoparticles. *Int J Nanomedicine*. 2014; 9:1641–1653. doi: [10.2147/IJN.S48979](#) PMID: [24729700](#)
39. Amsalem Y, Mardor Y, Feinberg MS, Landa N, Miller L, Daniels D, et al. Iron-oxide labeling and outcome of transplanted mesenchymal stem cells in the infarcted myocardium. *Circulation*. 2007; 116(11 Suppl):I38–I45. PMID: [17846324](#)
40. Ittrich H, Peldschus K, Raabe N, Kaul M, Adam G. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles in biomedicine: applications and developments in diagnostics and therapy. *Rofo*. 2013; 185(12):1149–1166. doi: [10.1055/s-0033-1335438](#) PMID: [24008761](#)
41. Smart N, Riley PR. The stem cell movement. *Circ Res*. 2008; 102(10):1155–1168. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.108.175158](#) PMID: [18497316](#)
42. Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994; 104(1):48–56. PMID: [7950405](#)
43. Casado JG, Tarazona R, Sanchez-Margallo FM. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. *Stem Cell Rev*. 2013; 9(2):184–189. doi: [10.1007/s12015-013-9430-y](#) PMID: [23397451](#)



## RESEARCH ARTICLE

# Intrapericardial Delivery of Cardiosphere-Derived Cells: An Immunological Study in a Clinically Relevant Large Animal Model

Rebeca Blázquez<sup>1</sup>\*, Francisco Miguel Sánchez-Margallo<sup>1</sup>\*, Verónica Crisóstomo<sup>2</sup>, Claudia Báez<sup>2</sup>, Juan Maestre<sup>2</sup>, Verónica Álvarez<sup>1</sup>, Javier G. Casado<sup>1</sup>\*\*

**1** Stem Cell Therapy Unit, 'Jesús Usón' Minimally Invasive Surgery Centre, Cáceres, Spain, **2** Endoluminal Therapy and Diagnosis, 'Jesús Usón' Minimally Invasive Surgery Centre, Cáceres, Spain

\* These authors contributed equally to this work.

\*\* jgarcia@ccmijesususon.com



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Álvarez V, et al. (2016) Intrapericardial Delivery of Cardiosphere-Derived Cells: An Immunological Study in a Clinically Relevant Large Animal Model. *PLoS ONE* 11(2): e0149001. doi:10.1371/journal.pone.0149001

**Editor:** Maria Cristina Vinci, Centro Cardiologico Monzino, ITALY

**Received:** October 7, 2015

**Accepted:** January 25, 2016

**Published:** February 11, 2016

**Copyright:** © 2016 Blázquez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported in part by one grant from GobEx (Ayuda a grupos catalogados de la Junta de Extremadura, GR15175), two grants from Junta de Extremadura to JGC (TA13042 and IB13123 co-financed by FEDER/FSE) and two grants from Redes temáticas de investigación cooperativa en salud (RD12/0042/0025 to FMSM and CB).

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

### Introduction

The intrapericardial delivery has been defined as an efficient method for pharmacological agent delivery. Here we hypothesize that intrapericardial administration of cardiosphere-derived cells (CDCs) may have an immunomodulatory effect providing an optimal microenvironment for promoting cardiac repair. To our knowledge, this is the first report studying the effects of CDCs for myocardial repair using the intrapericardial delivery route.

### Material and Methods

CDCs lines were isolated, expanded and characterized by flow cytometry and PCR. Their differentiation ability was determined using specific culture media and differential staining. 300,000 CDCs/kg were injected into the pericardial space of a swine myocardial infarcted model. Magnetic resonance imaging, biochemical analysis of pericardial fluid and plasma, cytokine measurements and flow cytometry analysis were performed.

### Results

Our results showed that, phenotype and differentiation behavior of porcine CDCs were equivalent to previously described CDCs. Moreover, the intrapericardial administration of CDCs fulfilled the safety aspects as non-adverse effects were reported. Finally, the phenotypes of resident lymphocytes and TH1 cytokines in the pericardial fluid were significantly altered after CDCs administration.

### Conclusions

The pericardial fluid could be considered as a safe and optimal vehicle for CDCs administration. The observed changes in the studied immunological parameters could exert a modulation in the inflammatory environment of infarcted hearts, indirectly benefiting the endogenous cardiac repair.

## Introduction

Clinical trials are continuously demonstrating that mesenchymal stem cells and resident cardiac stem cells are a promising cell source for regenerative therapy [1–5]. These cells fulfill the safety requirements being particularly attractive for their low immunogenicity, multipotentiality and self-renewal ability [1,6,7]. The route of administration, dose, time or cell type determine the success or failure of stem cell-based therapies and their therapeutic effect [8].

At the present, most of the preclinical studies have clearly demonstrated that the retention of transplanted cells in the heart is very low by any delivery method [9] and alternative techniques and administration routes need to be investigated to ensure the viability and differentiation potential as well as their homing and immunomodulatory capacity. Moreover, it would be desirable to guarantee the implantation of cells for a period of time enough to reach the desired therapeutic effect. In this sense, a higher retention rate may have a greater impact on cardiac repair enabling paracrine stimulation through the release of growth factors, pro-angiogenic molecules, immunomodulatory factors, proliferative and anti-apoptotic molecules.

Only a few reports address the question whether the intrapericardial delivery of adult stem cells could be a safe and effective alternative to other surgical procedures. The pericardial fluid (PF) composition is very similar to plasma and recent studies have demonstrated that it could be considered an optimal vehicle to preserve the viability, phenotype and proliferation of bone marrow-derived MSCs [10]. Moreover, in comparison to other routes, one positive aspect of pericardial delivery is that pericardial fluid has a low turnover rate that may provide a long term effect to achieve the desired therapeutic effect of stem cells.

Here we hypothesize that intrapericardial administration of cardiosphere-derived cells (CDCs) may have an immunomodulatory effect providing an optimal microenvironment for promoting cardiac repair. These CDCs have recently emerged as an effective cell type for cardiovascular cell therapy. Since the first report of cardiospheres in 2004 [11] and cardiosphere-derived cells in 2007 [12], several studies using clinically relevant large animal models have demonstrated the beneficial effect of these cells for the damaged cardiac tissue restoration. In these studies, the main administration routes assayed were the intracoronary infusion [13–15] and the intramyocardial injection [16]. Nowadays, clinical trials using CDCs are being conducted to test the efficacy of intracoronary-delivered CDCs [17–20]. To our knowledge, this is the first report studying the immunomodulatory effect of intrapericardially delivered CDCs. More importantly, animals were followed up using magnetic resonance imaging, which is the gold standard for functional cardiac evaluation.

## Materials and Methods

### Isolation of porcine cardiosphere-derived cells

All experimental protocols were approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Minimally Invasive Surgery Centre and fully complied with recommendations outlined by the local government (Junta de Extremadura) and by the Directive 2010/63/EU of the European Parliament on the protection of animals used for scientific purposes. All surgery was performed under sevoflurane anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Cardiosphere-derived cells (CDCs) were obtained from cardiac tissue explants of euthanized Large White pigs. Auricular explants (1–2 g) were washed with PBS and mechanically disrupted into 1–2 mm<sup>3</sup> fragments. These fragments were washed again to eliminate cellular debris. The tissue was then subjected to three successive enzymatic digestions with a solution of 0.2% trypsin



(Lonza) and 0.2% collagenase IV (Sigma) in PBS at 37°C for 5 min each. Digested tissue was washed with Complete Explant Medium (CEM) composed by 10% fetal bovine serum (FBS) (Sigma), 1% penicillin-streptomycin (Lonza), 2 mM L-glutamine (Lonza) and 0.2 mM 2-mercaptoethanol (Sigma) in IMDM (HyClone). Finally, explants were cultured in 90 mm Petri plates with CEM at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>.

After three weeks, tissue fragments were discarded and fibroblasts-like cells migrating from tissue explants were trypsinized and seeded into 30 mm poly-D-lysine coated plates with Cardiosphere Growing Medium (CGM), composed by 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin, 2 mM glutamine and 0.1 mM 2-mercaptoethanol in 35% IMDM and 65% DMEM-Ham's F12 (Sigma). Under these conditions, suspended cells clusters called cardiospheres are formed, and cells migrating from them are the CDCs. These cells were selected, seeded again into culture flasks with CGM and expanded at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. CDCs at passages 5 to 10 were used for intrapericardial delivery.

### Phenotypic analysis of cardiosphere-derived cells by flow cytometry

For flow cytometric analysis, porcine CDCs were detached from culture flasks with 0.25% trypsin solution and suspended in PBS containing 2% FBS. The cells were then stained with FITC-conjugated monoclonal antibodies against human CD90 (porcine crossreactive) and FITC-conjugated porcine monoclonal antibodies against CD29, CD31, CD44, CD45, CD61, CD105, CD117, Sca-1, SLA-I (Swine Leukocyte Antigen class I) and SLA-II (Swine Leukocyte Antigen class II) from Serotec. The phenotypic analysis was performed as follows:  $2 \times 10^5$  cells were incubated for 30 min at 4°C with appropriate concentrations of monoclonal antibodies. The cells were washed and resuspended in PBS. The flow cytometric analysis was performed on a FACScalibur cytometer (BD Biosciences) after acquisition of  $10^5$  events. Cells were primarily selected using forward and side scatter characteristics and fluorescence was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Isotype-matched negative control antibodies were used in all the experiments. The mean relative fluorescence intensity was calculated by dividing the mean fluorescent intensity (MFI) by the MFI of its negative control.

### Molecular characterization of cardiosphere-derived cells by RT-PCR

To analyze the expression of different markers, total RNA from CDCs was isolated. For that, 1 mL of TRI-Reagent (Sigma) was added to the 24 well plates. Cells were transferred to an Eppendorf tube, 200  $\mu$ L of chloroform were added and samples were incubated for 5–10 min at room temperature. After a centrifugation of 15 min at 12000 x g, the aqueous phase was mixed with 500  $\mu$ L of isopropanol and incubated at -80°C for 20 min to precipitate the RNA. Consecutive centrifugations and ethanol washing were made. Finally, the pellet was resuspended in DEPC-treated water.

The cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of RNA in reverse transcription reaction for 1 h at 37°C using Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen). The sequences of the PCR primers (Table 1) were designed for *Sus scrofa* by using the NCBI Primer-BLAST tool ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primerblast/)).

Conventional PCR amplification was performed using the Taq DNA Polymerase Recombinant kit (Invitrogen) in a PXE 0.2 thermocycler (Thermo). Gene expression levels were analyzed and normalized with the Gene Tools software (Synoptics Limited) using beta-actin (ACTB) as a housekeeping gene. The relative quantification was made by measuring the brightness intensity of each band using the GeneSnap software.

**Table 1. Sequences, melting temperatures, amplicon sizes and NCBI access numbers for the primers used in the PCR.**

Gene	Primers sequences	T <sub>m</sub> (°C)	Amplicon (bps)	Access number (NCBI)
<b>Stemness-related genes</b>				
KIT (v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog)	5'-GGCATCAGGGTGACTTCAAT-3'	59.93	128	NM_001044525.1
	5'-GGTGGTTGTGACATTTGCAG-3'	60.01		
NANOG (nanog homeobox)	5'-ATCCAGCTTGTCCCAAAG-3'	57.32	438	NM_001129971.1
	5'-ATTTCAATTCGCTGGTTCTGG-3'	56.40		
OCT4 (POU class 5 homeobox 1)	5'-AGGTGTTTCAGCCAAACGACC-3'	60.82	335	NM_001113060.1
	5'-TGATCGTTTGCCCTTCTGGC-3'	60.96		
<b>Early cardiac differentiation-related genes</b>				
MEF2C (myocyte enhancer factor 2C)	5'-TGATCAGCAGGCAAAGATTG-3'	59.95	112	NM_001044540.1
	5'-AGTGAGCTGACAGGGTTGCT-3'	60.06		
GATA-4 (GATA binding protein 4)	5'-TCTCGGAAGGCAGAGAGTG-3'	58.43	191	NM_214293.1
	5'-GCAGTTGGCACAGGAGAGG-3'	60.67		
<b>Hematopoietic-related gene</b>				
CD34 (CD34 molecule)	5'-GAAAACCACACCAGATGCTT-3'	58.38	164	NM_214086.1
	5'-AGGTCTGAGGCTGGACAGAA-3'	60.18		
<b>Mature cardiomyocytes-related genes</b>				
CX43 (gap junction protein, alpha 1, 43kDa)	5'-CACCAGGTGGACTGTTTCCT-3'	59.53	151	NM_001244212.1
	5'-TCTTCCCTTCACACGATCC-3'	57.24		
TNNI3 (troponin I type 3 (cardiac))	5'-ATGCCCGCGTGGACAAGGTG-3'	59.97	133	NM_001098599.1
	5'-CGCAGGGTGGGCCGCTTAAA-3'	59.97		
ACTC1 (actin, alpha, cardiac muscle 1)	5'-CTTCCAACCCACCTTCTTT-3'	60.33	120	NM_001170517.2
	5'-GTTGCAAGTCTGGTCTGGT-3'	60.16		
<b>Growth factors-related genes</b>				
VEGFA (vascular endothelial growth factor A)	5'-ATCTTCAAGCCGTCCTGTGT-3'	59.73	145	NM_214084.1
	5'-TCTCTCTATGTGCTGGCCT-3'	59.97		
IGF-1 (insulin-like growth factor 1)	5'-GACGCTCTTCAGTTCGTGTG-3'	59.62	141	NM_214256.1
	5'-CTCCAGCCTCCTCAGATCAC-3'	59.94		
IGF-1R (insulin-like growth factor 1 receptor)	5'-CAGTCTAGCACCTCCAAGC-3'	60.01	134	NM_214172.1
	5'-GTCTTCGGCCACCATACAGT-3'	60.00		
HGFL (hepatocyte growth factor-like protein homolog)	5'-GGGGACGATACTGCCTGAA-3'	59.93	109	XM_001924610.1
	5'-GTCCCTCAGTGCACATCTCA-3'	59.83		
FGFR2 (fibroblast growth factor receptor 2)	5'-AAACACGTGGAAAAGAACGG-3'	60.01	118	NM_001099924.1
	5'-TCACATTGAACAGAGCCAGC-3'	59.99		
TGFB1 (transforming growth factor, beta 1)	5'-TTAACGGGTTCAATTCTGGC-3'	59.94	145	NM_214015.1
	5'-TAGTTGGTATCCAGGGCTCG-3'	60.09		
<b>Housekeeping gene</b>				
ACTB (actin, beta)	5'-TGCGCAGAAAATGAGATGAG-3'	60.10	136	AY550069.1
	5'-CACCTCACCGTTCCAGTTT-3'	60.01		

doi:10.1371/journal.pone.0149001.t001



### Adipogenic, chondrogenic and osteogenic differentiation of porcine cardiosphere-derived cells

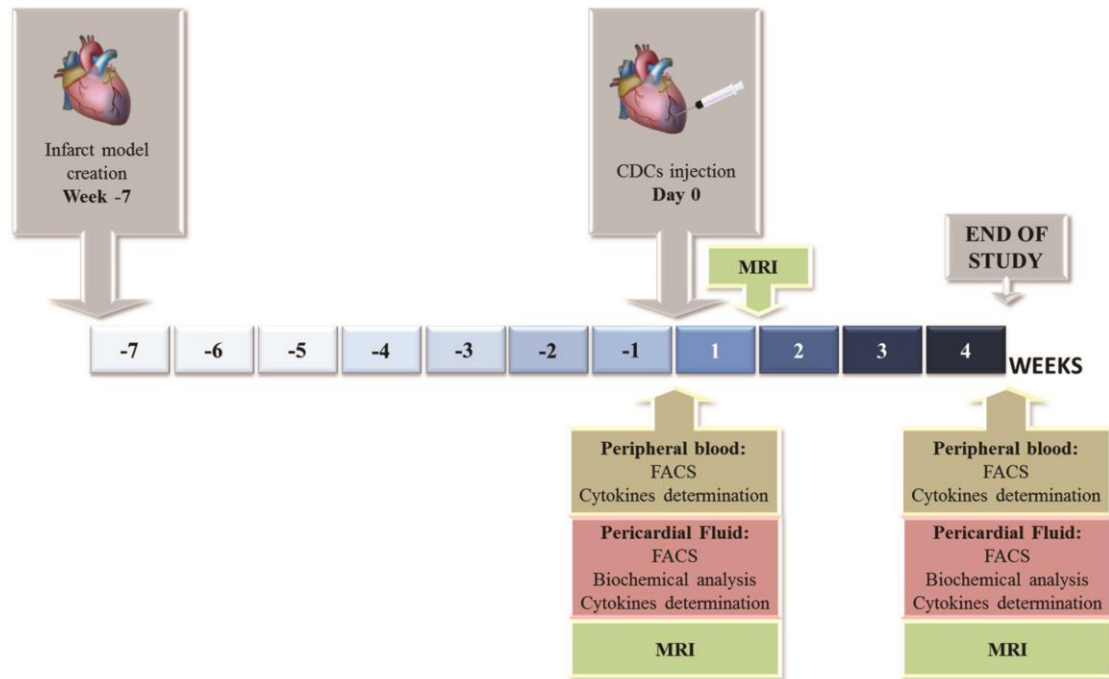
The differentiation of CDCs was performed when the cells reached 80% of confluence with media replacement every third day. Standard published protocols were used to promote osteogenic [21], adipogenic [22] and chondrogenic differentiation [23]. Oil Red O Staining was performed for adipogenic cultures, the Alcian Blue 8GX staining was performed for chondrogenic cultures and Alizarin Red S staining was performed for osteogenic differentiation. Differentiated cells were observed by optical microscopy.

### Myocardial infarction model creation

Four Large White pigs were housed in the animal facility at Minimally Invasive Surgery Centre and used for all experimental procedures. Animals were aged between 3–4 months and weighed between 30–35 kilograms. Animal care and all experimental procedures were approved by the ethics committee for animal research of the local government. All surgical procedures were performed under anesthesia, and all efforts were made to minimize suffering. Each animal was premedicated with diazepam 0.1 mg/kg, ketamine 10 mg/kg, and atropine 0.01 mg/kg intramuscularly. Intravenous hydration with normal saline was established by catheterization of the auricular vein with 18–22 gauge needles (Abbott) and maintained during procedures. Induction of anesthesia was performed intravenously with 2 mg/kg of propofol. After the pig was endotracheally intubated, it was connected to a system for anesthesia (Ohmeda Excel 210) and a mechanical ventilator Ohmeda 7800 (Ohmeda). Anesthesia was maintained with 2.0%–2.5% halothane, and blood pressure, electrocardiogram, O<sub>2</sub> saturation, and end tidal CO<sub>2</sub> were monitored closely throughout the procedure. The pigs were fixed on the operating table in the supine position with cranial and caudal extension of the limbs. The thorax and upper abdomen were shaved and draped in a sterile fashion. Continuous infusion of lidocaine at rate of 1 mg/kg/h (Braun Medical) was used through the procedure. Systemic heparin was injected intravenously (150 UI/kg) prior to percutaneous sheath placement. Under aseptic conditions, a right femoral arterial access was established using the Seldinger technique and a 7 Fr introducer sheath (Terumo) was placed percutaneously into the femoral artery. Under fluoroscopic guidance (Philips Mobile Digital Angiographic System-BV Pulsera, Philips Medical System), a 6 Fr hockey stick guiding Mach 1 catheter (Boston Scientific Corporation) was introduced and placed at the origin of the left coronary artery. Coronary angiograms were obtained in the 40° left anterior oblique projection to better demonstrate the length of the Left Anterior Descending artery (LAD), and a 0.0014 coronary Hi-torque guidewire (Abbott Vascular) was advanced inside the LAD. After measuring the diameter of the LAD immediately below the origin of the first diagonal, an over-the-wire PTCA balloon of appropriate diameter (typically 3mm) (Apex OTW, Boston Scientific) was advanced to this location and inflated to occlude the LAD flow for 90 min. A lidocaine bolus was also administered immediately before balloon inflation and deflation. Upon balloon deflation, the coronary artery was checked for patency by repeating angiogram. Animals were maintained fully monitored under general anesthesia for 45 min after infarct induction, in order to treat any malignant arrhythmias that may ensue.

### Magnetic Resonance Imaging (MRI)

Cardiac MRI was performed before the creation of the porcine infarct model, 7 weeks post-myocardial infarction (just before CDCs administration), and then at day 7 and 30 post-CDCs administration (see Fig 1), using a 1.5 T MR system (Intera 1.5T Philips Medical System). All



**Fig 1. Experimental design.** Seven weeks after infarct model creation, CDCs were intrapericardially injected. 30 days after CDCs administration, animals were euthanized. MRI was performed on days 0 (before CDCs administration), 7 and 30. On days 0 and 30, blood and pericardial fluid samples were collected for flow cytometry, biochemical analysis and cytokine determinations.

doi:10.1371/journal.pone.0149001.g001

imaging was performed under general anesthesia using retrospective cardiac gating with the animal in sterna decubitus and a four elements phase array coil was placed around the animal chest. Images were acquired in the intrinsic cardiac planes: short axis, long axis and four chamber views. For measurement of ventricular function and mass breath hold balanced SSFP, cine images were obtained over the entire ventricle. For infarct size measurements, images were acquired 5–15 min after the injection of 0.2 mmol/kg of a gadolinium-based contrast agent using a breath hold 3D gradient-echo inversion-recovery sequence. MR images were analyzed for ejection fraction, end diastolic and systolic volumes, mass and infarct size. In order to perform a robust comparison and avoid the influence of the animal's growth on the results, volume data were indexed by Body Surface Area (BSA), using the weight-based formula described by Kelley [24]. All determinations were performed by an investigator blinded to the group allocation.

### Intrapericardial administration of CDCs

Seven weeks after myocardial infarction model creation, each animal was pre-medicated with diazepam 0.3 mg/kg and ketamine 10 mg/kg intramuscularly. Intravenous hydration with normal saline was established by catheterization of the auricular vein with 18–20 gauge needles (Abbott) and maintained during procedures. Induction of anesthesia was performed intravenously with 2 mg/kg of propofol. After the pig was endotracheally intubated, it was connected

to a system for anesthesia (Leon Plus, Heinen+Löwenstein). Anesthesia was maintained with 1.8%–2% sevoflurane, and blood pressure, electrocardiogram, O<sub>2</sub> saturation, and end tidal CO<sub>2</sub> were monitored closely throughout the procedure. The pigs were fixed on the operating table and thorax and upper abdomen were shaved and draped in a sterile fashion. An injection of 300,000 CDCs/kg in 5 mL of Hypothermosol (BioLife Solutions) was performed via thoracotomy using an Abbocath®-T 20G catheter (Hospira). The incision was closed in layers and the animals were allowed to recover.

### Tissue sampling

The animals were euthanized 4 weeks post-CDCs administration by a lethal dose of potassium chloride (1–2 mmol/kg) while under deep anesthesia, as recommended by the American Veterinary Medical Association (AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals: 2013 Edition. Available at: <https://www.avma.org/kb/policies/documents/euthanasia.pdf>). The hearts were firstly examined *in situ*. Gross visual inspection was focused on possible complications associated with the procedures and potential damages to the pericardium, epicardium and surrounding structures in the mediastinum.

### Biochemical analysis of pericardial fluid and plasma

Before intrapericardial administration of CDCs, blood and pericardial fluid (PF) samples from animals were collected. The PF was aspirated from the pericardial cavity using an Abbocath®-T 20G catheter. The PF was centrifuged for 5 min at 450 x g. To determine their biochemical composition (albumin, alkaline phosphatase, total bilirubin, cholesterol, creatinine, gamma-glutamyl transferase, glucose, glutamic oxaloacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase, HDL cholesterol, LDL cholesterol, reactive C protein, total proteins, triglycerides, urea and calcium concentrations), the pellet was used for FACS analysis and the supernatants for subsequent biochemical analyses were centrifuged and passed through a 0.22 µm filter to remove cell debris. Plasma samples and PF supernatants were processed in the random access clinical analyzer Metrolab 330 (Metrolab S.A.). At day 30 after CDCs administration, these sampling and determinations were repeated and the initial and final measurements were compared.

### Cytokines analysis

The pericardial fluid supernatants and plasma samples were stored at -80°C until further processing. Cytokines levels of IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1b, IL-10, IL-12p40, IL-4, IL-6, IL-8 and TNF $\alpha$  were analyzed using the Luminex xMAP technology, a multiplexed sandwich immunoassay. The measurements were determined using the ProcartaPlex Porcine Cytokine & Chemokine Panel 1 (catalog number EPX090-60829-901) according to the manufacturer's instructions (eBioscience). The concentrations of the different cytokines were expressed as pg/mL, and calculated according to a standard curve.

### Flow cytometry analysis of peripheral blood lymphocytes and pericardial fluid cells

Peripheral blood lymphocytes (PBLs) were isolated from blood samples collected before intrapericardial administration of CDCs (7 weeks post-infarction) and before euthanasia (30 days after intrapericardial CDCs administration). PBLs were obtained by centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma) and washed twice with PBS. The PBLs were frozen and stored in liquid nitrogen. For *in vitro* experiments, cell aliquots were thawed at 37°C, added to 10 mL of



DMEM and centrifuged at 1500 rpm for 5 min to eliminate DMSO. Pellet was resuspended in PBS for immediate FACS analysis.

For flow cytometric analysis of PBLs and pericardial fluid cells, the cells were resuspended in PBS containing 2% FBS and stained with monoclonal antibodies against porcine CD3, CD4, CD8 and CD16 (Serotec). The cytometric analysis was performed as follows:  $2 \times 10^5$  cells were incubated for 30 min at 4°C with appropriate concentrations of monoclonal antibodies. The cells were washed and resuspended in PBS. The flow cytometric analysis was performed on a FACScalibur cytometer (BD Biosciences) after acquisition of  $10^5$  events. Cells were primarily selected using forward and side scatter characteristics. The percentage of CD4<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>), CD 8<sup>+</sup> T cells (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>), NK cells (CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup>) and CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD16 (CD16<sup>+</sup> on gated CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> cells) were analyzed using CellQuest software (BD Biosciences). Isotype-matched negative control antibodies were used in all the experiments.

### Statistical analysis

Data were statistically analyzed using the Mann Whitney U test for variables with no parametric distribution. All *p*-values  $\leq 0.05$  were considered statistically significant. All the statistical determinations were made using SPSS-21 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

### Results and Discussion

The appropriate route for cell administration is a fundamental step for the success of cardiovascular stem cell-based therapies. Many clinical trials are being conducted using different administration routes and several advantages or disadvantages have been attributed to any of these routes. In the clinical setting of myocardial infarction, percutaneous coronary intervention is routinely performed since early reperfusion therapy for occluded coronary arteries is the main therapeutic strategy. So, intracoronary stem cell therapy is easily and widely applied, compared to other delivery methods [25]. Actually, endoluminal strategies are especially suited for the treatment of myocardial infarct in the acute phase, which is coincident with a high expression of chemoattractants and cell adhesion molecules [26]. However, intracoronary delivery has certain disadvantages: the immediate retention of cells is low, presumably because of rapid wash out of cells. Moreover, microvascular occlusion can occur when large cells such as MSCs, or CDCs are infused [27,28]. Another option here would be the intravenous infusion, which is the most simple method for stem cell delivery, but its retention rate is very low [29].

On the other hand, intramyocardial injection has been considered to be an optimal route for cell delivery in patients with chronic myocardial ischemia which corresponds to a low expression of cell homing signals such as chemoattractants and cell adhesion molecules. This administration route appears to have a higher retention rate but there is a significant loss of transplanted cells due to myocardial contraction [30]. Moreover, intramyocardial administration into ischemic or scarred myocardium could create clusters of cells isolated from the normal architecture and therefore with limited blood supply, which could lead to poor cell survival [26]. For these reasons, different delivery routes could provide the answer to different clinical scenarios.

Intrapericardial administration could help to overcome the disadvantages of intramyocardial injection, since there is no aggression to the myocardium and the distribution of cells is homogeneous. Moreover, similarly to intramyocardial injection, this administration route would only be feasible on stable patients, and therefore not recommended in the acute setting, since it involves a surgical procedure which necessarily requires cardiovascular stability. In summary, an acute myocardial infarction model where the cells are administered at an early

stage would not be the more suited for intrapericardial administration; on the contrary a more chronic scenario may provide the ideal setting in terms of stability and safety.

Our research group has recently evaluated the biodistribution pattern of intrapericardially administered MSCs in a clinically relevant large animal model. Our studies were performed on infarcted and non-infarcted animals and *in vivo* tracking of intrapericardially administered MSCs was performed by magnetic resonance imaging (MRI). In this study, we demonstrated that intrapericardial administration is a safe route for MSCs transplantation. This route has the great advantage of transferring relatively large amounts of cells without adverse effects. Moreover, the pericardial fluid provided an optimal environment for maintaining cell viability [10].

Once demonstrated the safety and biodistribution of intrapericardially administered cells, one important question to be answered was whether or not the intrapericardial administration of stem cells could mediate a local immunomodulatory effect. In this sense, the main objective of this work has been mainly focused on the evaluation of different immunological parameters in a clinically relevant animal model of acute myocardial infarction.

Our first sets of experiments were conducted in the isolation, expansion and characterization of porcine cardiosphere-derived stem cells (CDCs). These cells were obtained from cardiac tissue explants and the stromal-like cells migrating from the explants (Fig 2A) were expanded according to standardized protocols described by the group of Marban et al. [12]. In contrast to our previous study where bone marrow derived stem cells were intrapericardially administered for the evaluation of safety and biodistribution of stem cells, here we have chosen CDCs because of their highly promising results reported from the first clinical trials. These clinical trials are currently being conducted using autologous CDCs in the setting of heart failure, either after coronary artery bypass grafting [31,32] (SCIPIO trial, NCT00474461) or after coronary stenting [17,18] (CADUCEUS trial, NCT00893360).

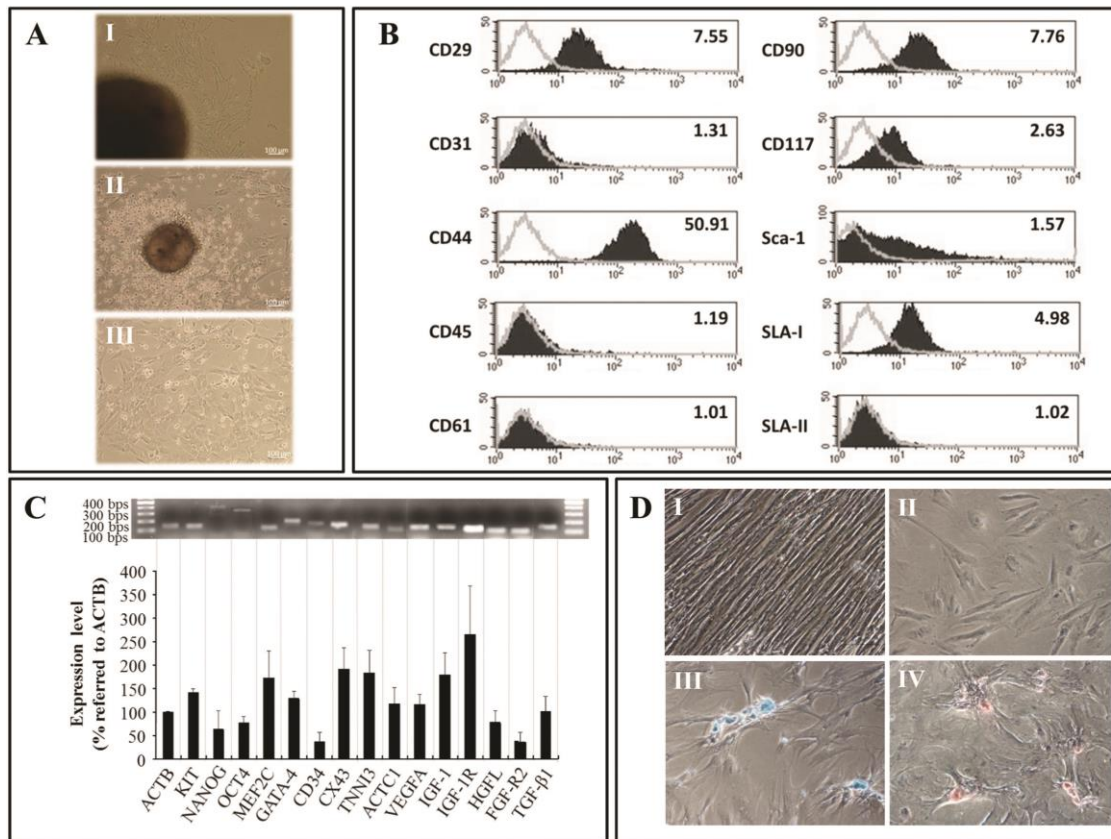
The phenotypical characterization of porcine CDCs by flow cytometry (Fig 2B), RT-PCR analysis (Fig 2C) and differentiation assays (Fig 2D) demonstrated that these cells were similar or at least equivalent to those porcine CDCs described by the group of Marban et al [12]. In the phenotypic characterization by flow cytometry they resulted positive for the expression of CD29, CD44, CD90, CD117, Sca-1 and SLA-I, and negative for the expression of CD31, CD45, CD61 and SLA-II. In the PCR analysis, they showed a positive expression of multipotential markers, early cardiac differentiation markers and mature cardiomyocytes markers, as well as different growth factors and their receptors. Finally, differentiation assay demonstrated their differentiation behaviour towards adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages.

Our porcine CDCs were *in vitro* expanded and detached from culture flasks at the day of intrapericardial administration. This allowed us to ensure the viability and the maintenance of proliferative behaviour of intrapericardially administered cells. To ensure the safety of our approach, we previously performed a pilot study in infarcted swine. The cardiac MRI did not show any evidence of adverse effects or cardiac toxicity when cells were intrapericardially administered at day 7 post-infarction (data not shown).

Non-adverse effects were noted during the surgical procedure and euthanized animals showed a normal conformation of tissues, with few pericardial adherences to thoracic wall due to the surgical intervention (data not shown). Considering that safety is a major issue in cardiovascular stem cell therapy, our findings suggest that intrapericardial delivery is a safe route for transplantation of allogenic CDCs. These results are in agreement with previous reports where the combined usage of adult stem cells and different biomaterials were safely administered by this route [33,34].

Once confirmed the safety aspects of intrapericardial administration using porcine CDCs, we aimed to compare the phenotype profile of resident lymphocytes in the pericardial fluid immediately before CDCs administration and 30 days post-administration (Fig 3). In this



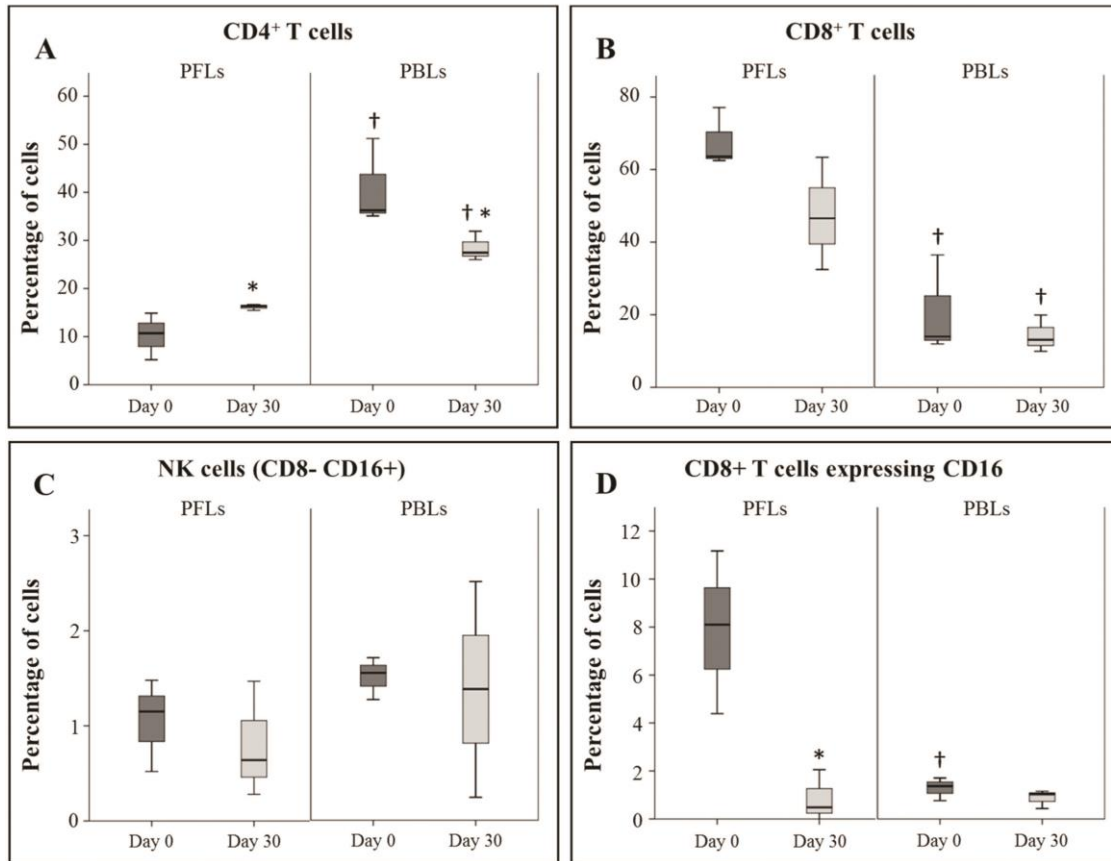


**Fig 2. Characterization of cardiosphere-derived cells.** CDCs were isolated from cardiac tissue explants of healthy pigs. The figure A shows explants in culture with some fibroblast-like cells migrating from them (A.I), cardiospheres with CDCs migrating from them (A.II) and CDCs in culture (A.III). Figure B shows the phenotypic analysis of CDCs by flow cytometry. Representative histograms together with the expression levels are shown. The expression level of cell surface markers is represented as Mean Relative Fluorescence Intensity (MRFI), which is calculated by dividing the Mean Fluorescent Intensity (MFI) (black lined histogram) by its negative control (grey lined histogram). Figure C corresponds to gene expression analysis by conventional RT-PCR. Mean  $\pm$  SD of three different experiments are shown. Data are expressed as expression percentage referred to ACTB, used as control. The relative quantification was made by measuring the brightness intensity of each band with GeneSnap software. A representative image of one of the experiments is shown above. Figure D shows the differentiation potential of CDCs. Cells were maintained for 21 days with standard medium (control) (D.I) or with specific differentiation media for adipogenic, chondrogenic and osteogenic lineages. Differentiation was evidenced by specific stainings: Oil Red O for adipocytes (D. II), Alcian Blue for chondrocytes (D.III) and Alizarin Red S for osteocytes (D.IV).

doi:10.1371/journal.pone.0149001.g002

analysis, our interest was mainly focused in the quantification of lymphocyte subpopulations and the expression of lymphocyte activation markers. The statistical comparison of pericardial fluid lymphocytes showed that the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells was significantly increased after CDCs administration (Fig 3A). However, CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells were unaffected by the intrapericardial administration of CDCs (Fig 3B and 3C). Previous reports have demonstrated an induction of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs by allogeneic administration of MSCs [35]. Our current results may indicate that the expanded subset of CD4 T cells may correspond to *in vivo* expanded Tregs, however, this hypothesis should be further confirmed by RT-PCR.





**Fig 3. Lymphocyte subsets distribution in peripheral blood and pericardial fluid.** Pericardial fluid lymphocytes (PFLs) and peripheral blood lymphocytes (PBLs) were collected before CDCs administration and 30 days post-administration for flow cytometry analysis. \* Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between different time points ( $n = 4$ ). † Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between PFLs and PBLs in the same time point ( $n = 4$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0149001.g003

The analysis of activation markers in lymphocyte subsets was focused on the expression of CD16 protein in the surface of CD8<sup>+</sup> T cells. Here we showed that, the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD16 in the pericardial fluid was significantly decreased after intrapericardial CDCs administration (Fig 3D). These CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD16 have been considered as terminally differentiated effector T cells [36] and positive for perforin as specifically described in pigs [37]. Based on these results, here we hypothesize that the increased percentage of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD16 in the pericardial fluid (measured at 7 weeks post-infarction) could be the consequence of inflammatory microenvironment linked to myocardial infarction. Moreover, the significant decrease of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD16 towards similar levels (measured at day 30 post-administration) would be the consequence of the immunomodulatory activity of CDCs exerted under inflammatory conditions [38].

In bibliography, it has been demonstrated in a large cohort of patients that activated lymphocytes with a “special immunophenotype” are frequently found in the pericardial fluid of patients undergoing open cardiac operation with different forms of heart disease [39]. Our results are in agreement with this observation. Indeed, here we found that the percentage and phenotype of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the pericardial fluid of infarcted animals is significantly different to the percentage and phenotype of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in peripheral blood (Fig 3A and 3B).

Additional biochemical parameters were studied in pericardial fluids from infarcted animals prior to CDCs administration and 30 days post-administration. Most of the biochemical parameters were unaffected by the intrapericardial administration of CDCs and significant differences were only observed in the quantification of alkaline phosphatase, creatinine, gamma-glutamyl transferase (GGT) and total proteins (Table 2). The alkaline phosphatase is present in many human tissues and has been defined as a well-known marker for bone marrow-derived MSCs and embryonic stem cells [40–42]. Possibly, the increase of alkaline phosphatase in the pericardial fluid could be interpreted as a consequence of the presence of CDCs in the pericardial fluid. Apart from alkaline phosphatase, an augmentation of total protein was also found in pericardial fluid after CDCs administration. This increase is probably due to the presence of transferred cells, or to the paracrine-released proteins from these cells. Finally, it is important to discuss the decrease of GGT observed in the pericardial fluid. The levels of GGT in serum have been used to predict coronary heart disease in a large cohort of patients, especially, a stronger association was found in subjects aged less than 60 years [43]. The GGT levels have been shown to be a predictive marker in the development of cardiovascular disease [44]. Moreover, there is a relationship between serum GGT level and coronary blood flow [45] and a clear association between this enzyme with severity of heart failure [46]. According to these clinical

**Table 2. Biochemical analysis of pericardial fluid before and after CDCs administration.**

	Pericardial fluid	
	Pre-CDCs	Post-CDCs
Albumin (g/dL)	0.84± 0.23	1.09± 0.42
Alkaline phosphatase (U/L)*	14.00± 5.29	20.67± 6.03
Total bilirubin (mg/dL)	0.03± 0.03	0.06± 0.01
Cholesterol (mg/dL)	9.67± 4.62	12.33± 6.81
Creatinine (mg/dL)*	1.35± 0.26	1.83± 0.35
GGT (U/L)*	24.33± 10.02	15.33± 6.35
Glucose (mg/dL)	91.67± 5.77	86.33± 1.53
GOT (U/L)	12.33± 2.08	13.33± 8.50
GPT (U/L)	0.00± 0.00	0.50± 0.71
HDL cholesterol (mg/dL)	5.17± 1.67	5.73± 1.79
LDL cholesterol (mg/dL)	7.49± 1.81	8.60± 4.14
CRP (mg/L)	0.39± 0.54	0.70± 0.46
Total protein (g/dL)*	1.73± 0.45	2.18± 0.60
Triglycerides (mg/dL)	5.00± 2.00	11.67± 8.14
Urea (mg/dL)	17.40± 8.62	22.53± 3.34
Calcium (mg/dL)	4.60± 1.04	5.17± 1.71

GGT: gamma-glutamyl transferase; GOT: glutamic oxaloacetic transaminase; GPT: glutamic-pyruvic transaminase; CRP: C-reactive protein.

\* $p < 0.05$  in a paired Student's *t*-test ( $n = 4$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0149001.t002

findings, and taking into account that here we quantified CGT in the pericardial fluid (not in serum), we could assume that this significant decrease could be considered as a good prognosis indicator that may reflect an improvement of heart function.

Apart from the analysis of leukocyte subsets and biochemical parameters in the pericardial fluid, here we aimed to determine the effect of intrapericardial administration of CDCs in the cytokine microenvironment. The limited availability of porcine-specific monoclonal antibodies did not provide a deep analysis of immune status in the pericardial fluid. Besides of this limitation, here we aimed to quantify a commercially available panel of TH1/TH2 cytokines in pericardial fluid and plasma samples from infarcted animals with intrapericardially administered CDCs. These samples were obtained from animals immediately before CDCs administration and 30 days post-intrapericardial administration. Again, the limited availability of porcine-specific reagents for cytokines was an important limitation and Luminex technology allowed us the quantification of only nine cytokines. The following panel of cytokines was measured: IL-1beta, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p40, IFN-alpha, IFN-gamma and TNF-alpha.

Our results demonstrated that, only four out of nine cytokines were detectable by this method. In comparison to plasma samples, the IL-12p40 was found to be less abundant in pericardial fluid. The IL-12p40 levels only showed a trend to increase ( $p = 0.06$ ) when pericardial fluids were compared (pre- and post- CDCs administration) (Fig 4A). The IL-12p40 is a component of IL-12 and IL-23, so the increase of this protein in the pericardial fluid may provide a negative feedback by competitively binding to the IL-12 receptor [47].

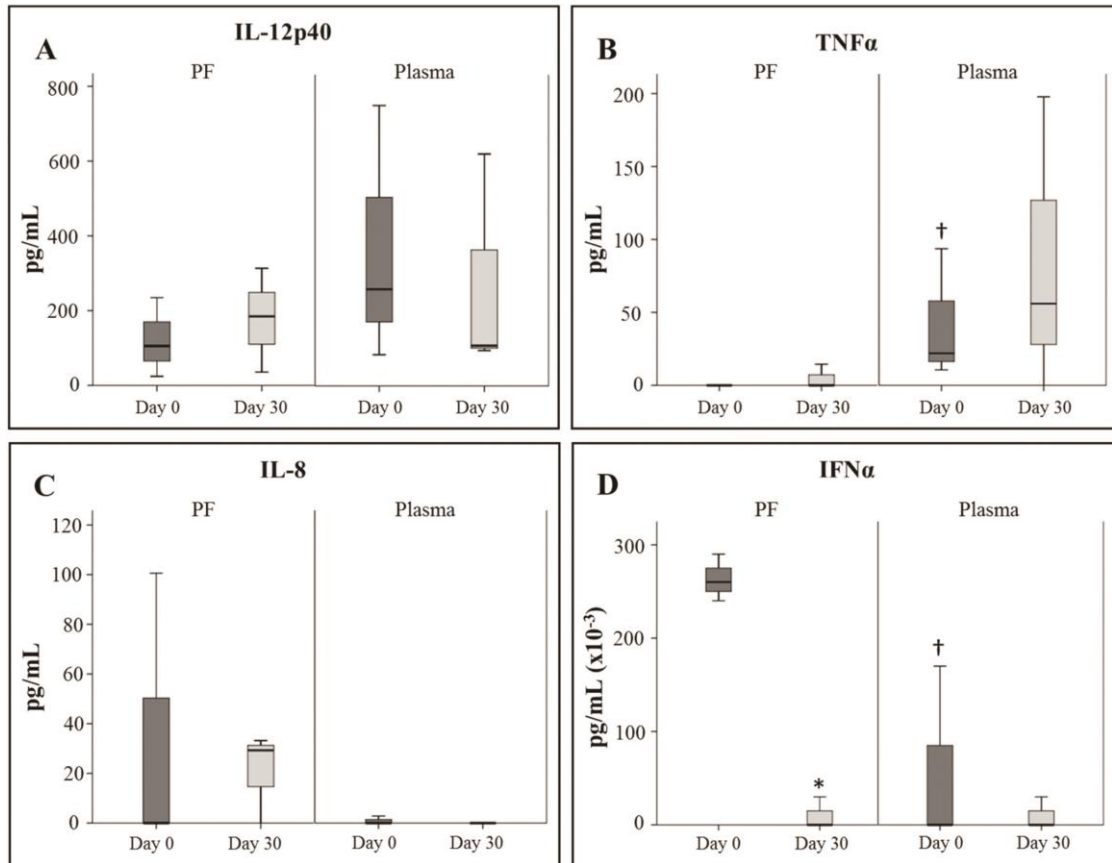
Similarly to IL-12p40, the TNF-alpha was more abundant in plasma than in pericardial fluids and no differences were found between pre- and post-administration. There were non-statistical differences when compared plasma and pericardial fluid samples (Fig 4B).

Contrarily to IL-12p40 and TNF-alpha, the IL-8 was found to be more abundant in pericardial fluid than in plasma (Fig 4C). These results are in agreement with similar studies performed in patients undergoing coronary artery surgery [48]. Moreover, considering that this chemokine has been linked to a local inflammatory process in patients with pericardial effusions [49], the presence of this chemokine could be the consequence of inflammatory response usually linked to an acute myocardial infarct [50].

Finally, our results showed a very significant difference when IFN-alpha levels were compared in pericardial fluids. Indeed, the IFN-alpha level was significantly reduced in after intrapericardial administration (Fig 4D). This cytokine is known to be secreted by fibroblasts, monocytes, macrophages, dendritic cells, natural killer but also by T cells [51] and the significant decrease of this cytokine in the pericardial sac could be the reflection of an overall improvement in terms of inflammatory activation. The association between IFN-alpha and pericarditis has been reported in clinical settings where the pericarditis was related to interferon alpha therapies [52–54].

Regarding to the evolution of cardiac function parameters, magnetic resonance imaging was performed at day 0 (7 weeks post-myocardial infarction), days 7 and 30 post-intrapericardial administration. This technique has been recently used by Malliaras et al. in porcine infarct models to evaluate stem cell therapies which confirmed the usefulness of this technique for monitoring regenerative efficacy [55]. Our results showed no significant differences among untreated animals (day 0) and treated animals in terms of cardiac parameters (Table 3 and Fig 5). Contrarily to the significant changes reported in the inflammatory status after intrapericardial administration of CDCs (both in phenotype of peripheral fluid lymphocytes and inflammatory cytokines), the absence of an improvement of cardiac function could be the consequence of using a 7 weeks infarcted animal. This model is considered as a chronic myocardial infarct model and the size and chronicity of the infarct becomes a serious obstacle to identify changes in the cardiac function. Future studies will be performed in order to adequate this





**Fig 4. Cytokines levels in pericardial fluid and plasma samples.** Cytokines levels were determined before CDCs administration and 30 days post-administration using the Luminex xMAP technology. \* Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between different time points ( $n = 4$ ). † Statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between PF and plasma in the same time point ( $n = 4$ ).

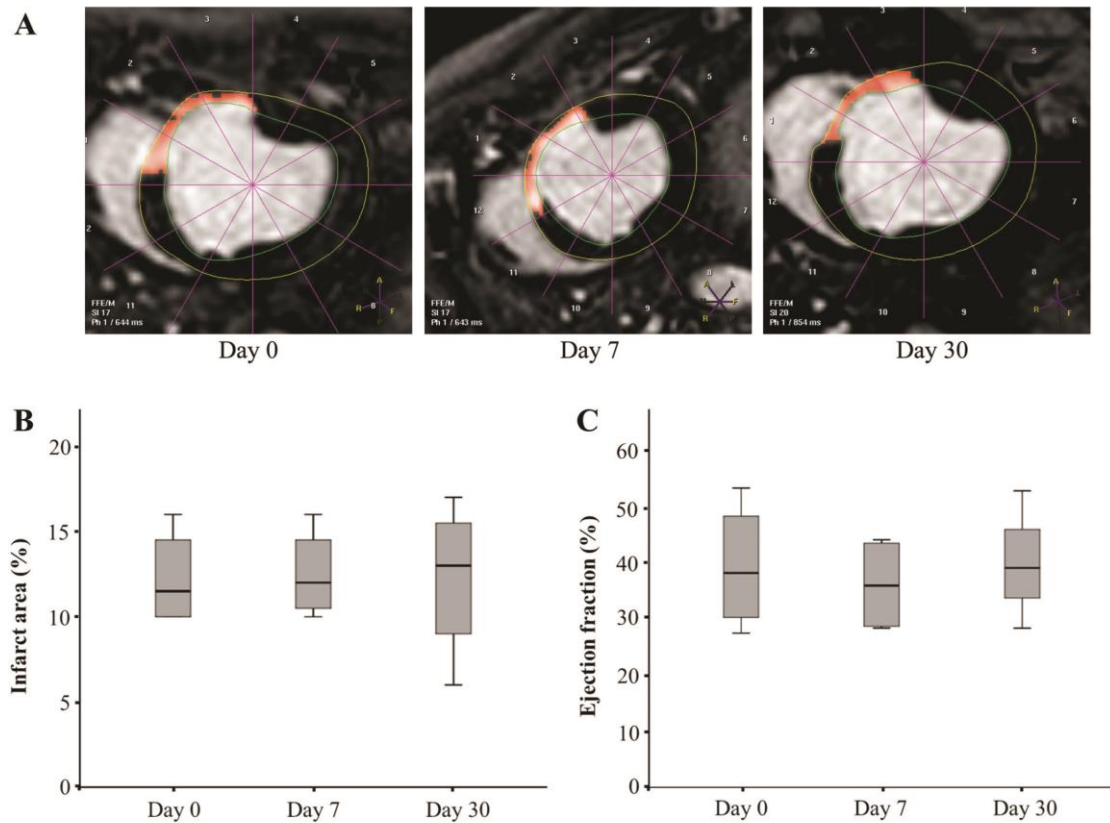
doi:10.1371/journal.pone.0149001.g004

**Table 3. Cardiac parameters calculated from MRI exams performed through the study.**

	Day 0 (pre-administration)	Day 7	Day 30
Weight (kg)	43.50± 2.65	44.75± 1.89	57.25± 3.09
EF (%)	39.40± 11.40	36.20± 8.56	40.2± 12.23
EDVi (mL/m <sup>2</sup> )	120.63± 30.69	122.18± 34.72	106.30± 21.63
ESVi (mL/m <sup>2</sup> )	75.70± 32.01	80.03± 32.24	65.18± 26.04
% Infarct	12.25± 2.87	12.5± 2.64	12.25± 4.65
Infarct mass (g)	10.18± 4.05	10.92± 4.38	8.73± 4.12

Data presented as mean ± standard deviation ( $n = 4$ ). EF: Ejection fraction. EDVi: End diastolic volume indexed to body surface area. ESVi: End systolic volume indexed to body surface area.

doi:10.1371/journal.pone.0149001.t003



**Fig 5. Cardiac magnetic resonance imaging.** Cardiac function was measured with cardiac magnetic resonance imaging. The panel A represent a representative image of the measurement of the thickness of the infarcted (septum) and healthy lateral free wall in end diastolic short axis views. B and C graphics represent the infarct area and the ejection fraction measurements, respectively, obtained on days 0 (before CDCs administration), 7 and 30. The lower boundary of the box indicates the 25th percentile and the upper boundary the 75th percentile. Bars above and below the box indicate the 90th and 10th percentiles. The line within the box marks the median. No statistically significant differences were found between groups ( $n = 4$ ).

doi:10.1371/journal.pone.0149001.g005

therapy to the chronic infarct model, which provides the ideal settings for the study of this administration route in terms of stability and safety.

### Acknowledgments

Technical and human support provided by Facility of Bioscience Applied Techniques of SAIUEX (financed by UEX, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER and FSE).

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RB FMSM JGC. Performed the experiments: RB VA JM VC CB. Analyzed the data: RB VA VC CB FMSM JGC. Wrote the paper: RB FMSM JGC.

## References

- Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011; 109: 923–940. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.111.243147](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.243147) PMID: [21960725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21960725/)
- Sheng CC, Zhou L, Hao J. Current stem cell delivery methods for myocardial repair. *BioMed Res Int*. 2013; 2013: 547902. doi: [10.1155/2013/547902](https://doi.org/10.1155/2013/547902) PMID: [23509740](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23509740/)
- Mazo M, Gavira JJ, Pelacho B, Prosper F. Adipose-derived stem cells for myocardial infarction. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4: 145–153. doi: [10.1007/s12265-010-9246-y](https://doi.org/10.1007/s12265-010-9246-y) PMID: [21116883](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21116883/)
- Lalu MM, McIntyre L, Pugliese C, Fergusson D, Winston BW, Marshall JC, et al. Safety of cell therapy with mesenchymal stromal cells (SafeCell): a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *PLoS One*. 2012; 7: e47559. doi: [10.1371/journal.pone.0047559](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0047559) PMID: [23133515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23133515/)
- Trivedi P, Tray N, Nguyen T, Nigam N, Gallicano GI. Mesenchymal stem cell therapy for treatment of cardiovascular disease: helping people sooner or later. *Stem Cells Dev*. 2010; 19: 1109–1120. doi: [10.1089/scd.2009.0465](https://doi.org/10.1089/scd.2009.0465) PMID: [20092388](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20092388/)
- Hoogduijn MJ, Roemeling-van Rhijn M, Korevaar SS, Engela AU, Weimar W, Baan CC. Immunological aspects of allogeneic and autologous mesenchymal stem cell therapies. *Hum Gene Ther*. 2011; 22: 1587–1591. doi: [10.1089/hum.2011.039](https://doi.org/10.1089/hum.2011.039) PMID: [21732766](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21732766/)
- Gebler A, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012; 18: 128–134. doi: [10.1016/j.molmed.2011.10.004](https://doi.org/10.1016/j.molmed.2011.10.004) PMID: [22118960](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22118960/)
- Huang NF, Lam A, Fang Q, Sievers RE, Li S, Lee RJ. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in fibrin augment angiogenesis in the chronically infarcted myocardium. *Regen Med*. 2009; 4: 527–538. doi: [10.2217/rme.09.32](https://doi.org/10.2217/rme.09.32) PMID: [19580402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19580402/)
- Fukushima S, Sawa Y, Suzuki K. Choice of cell-delivery route for successful cell transplantation therapy for the heart. *Future Cardiol*. 2013; 9: 215–227. doi: [10.2217/fca.12.85](https://doi.org/10.2217/fca.12.85) PMID: [23463974](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23463974/)
- Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, García-Lindo M, et al. Intrapericardial administration of mesenchymal stem cells in a large animal model: a bio-distribution analysis. *PLoS One*. 2015; 10: e0122377. doi: [10.1371/journal.pone.0122377](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122377) PMID: [25816232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25816232/)
- Messina E, De Angelis L, Frati G, Morrone S, Chimenti S, Fiordaliso F, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004; 95: 911–921. PMID: [15472116](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15472116/)
- Smith RR, Barile L, Cho HC, Leppo MK, Hare JM, Messina E, et al. Regenerative Potential of Cardiosphere-Derived Cells Expanded From Percutaneous Endomyocardial Biopsy Specimens. *Circulation*. 2007; 115: 896–908. PMID: [17283259](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17283259/)
- Johnston PV, Sasano T, Mills K, Evers R, Lee S-T, Smith RR, et al. Engraftment, differentiation, and functional benefits of autologous cardiosphere-derived cells in porcine ischemic cardiomyopathy. *Circulation*. 2009; 120: 1075–1083. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.108.816058) PMID: [19738142](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19738142/)
- Kanazawa H, Tseliou E, Malliaras K, Yee K, Dawkins JF, De Couto G, et al. Cellular postconditioning: allogeneic cardiosphere-derived cells reduce infarct size and attenuate microvascular obstruction when administered after reperfusion in pigs with acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2015; 8: 322–332. doi: [10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001484](https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001484) PMID: [25587096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25587096/)
- Suzuki G, Weil BR, Leiker MM, Ribbeck AE, Young RF, Cimato TR, et al. Global intracoronary infusion of allogeneic cardiosphere-derived cells improves ventricular function and stimulates endogenous myocyte regeneration throughout the heart in swine with hibernating myocardium. *PLoS One*. 2014; 9: e113009. doi: [10.1371/journal.pone.0113009](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113009) PMID: [25402428](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25402428/)
- Lee S-T, White AJ, Matsushita S, Malliaras K, Steenbergen C, Zhang Y, et al. Intramyocardial injection of autologous cardiospheres or cardiosphere-derived cells preserves function and minimizes adverse ventricular remodeling in pigs with heart failure post-myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2011; 57: 455–465. doi: [10.1016/j.jacc.2010.07.049](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2010.07.049) PMID: [21251587](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21251587/)
- Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Malliaras K, Thomson LE, Berman D, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells for heart regeneration after myocardial infarction (CADUCEUS): a prospective, randomised phase 1 trial. *The Lancet*. 2012; 379: 895–904.
- Malliaras K, Makkar RR, Smith RR, Cheng K, Wu E, Bonow RO, et al. Intracoronary cardiosphere-derived cells after myocardial infarction: evidence of therapeutic regeneration in the final 1-year results of the CADUCEUS trial (CARDiosphere-Derived aUTologous stem CElls to reverse ventricular dysfunction). *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63: 110–122. doi: [10.1016/j.jacc.2013.08.724](https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.08.724) PMID: [24036024](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24036024/)
- Ishigami S, Ohtsuki S, Tarui S, Ousaka D, Eitoku T, Kondo M, et al. Intracoronary autologous cardiac progenitor cell transfer in patients with hypoplastic left heart syndrome: the TICAP prospective phase 1 controlled trial. *Circ Res*. 2015; 116: 653–664. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.116.304671](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.304671) PMID: [25403163](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25403163/)



20. Smith RR, Marbán E, Marbán L. Enhancing retention and efficacy of cardiosphere-derived cells administered after myocardial infarction using a hyaluronan-gelatin hydrogel. *Biomater*. 2013; 3: e24490. doi: [10.4161/biom.24490](https://doi.org/10.4161/biom.24490) PMID: [23538511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23538511/)
21. Jaiswal N, Haynesworth SE, Caplan AI, Bruder SP. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem*. 1997; 64: 295–312. PMID: [9027589](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9027589/)
22. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284: 143–147. PMID: [10102814](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10102814/)
23. Mackay AM, Beck SC, Murphy JM, Barry FP, Chichester CO, Pittenger MF. Chondrogenic differentiation of cultured human mesenchymal stem cells from marrow. *Tissue Eng*. 1998; 4: 415–428. PMID: [9916173](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9916173/)
24. Kelley KW, Curtis SE, Marzan GT, Karara HM, Anderson CR. Body surface area of female swine. *J Anim Sci*. 1973; 36: 927–930. PMID: [4703721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4703721/)
25. Kwon Y-W, Yang H-M, Cho H-J. Cell Therapy for Myocardial Infarction. *Int J Stem Cells*. 2010; 3: 8–15. PMID: [24855535](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24855535/)
26. Wollert KC, Drexler H. Clinical Applications of Stem Cells for the Heart. *Circ Res*. 2005; 96: 151–163. PMID: [15692093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15692093/)
27. Sanganalath SK, Bolli R. Cell therapy for heart failure: a comprehensive overview of experimental and clinical studies, current challenges, and future directions. *Circ Res*. 2013; 113: 810–834. doi: [10.1161/CIRCRESAHA.113.300219](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.300219) PMID: [23989721](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23989721/)
28. Freyman T, Polin G, Osman H, Crary J, Lu M, Cheng L, et al. A quantitative, randomized study evaluating three methods of mesenchymal stem cell delivery following myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2006; 27: 1114–1122. PMID: [16510464](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16510464/)
29. Dib N, Khawaja H, Varner S, McCarthy M, Campbell A. Cell therapy for cardiovascular disease: a comparison of methods of delivery. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4: 177–181. doi: [10.1007/s12265-010-9253-z](https://doi.org/10.1007/s12265-010-9253-z) PMID: [21181320](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21181320/)
30. Van Ramshorst J, Rodrigo SF, Schaliij MJ, Beeres SLMA, Bax JJ, Atsma DE. Bone marrow cell injection for chronic myocardial ischemia: the past and the future. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011; 4: 182–191. doi: [10.1007/s12265-010-9249-8](https://doi.org/10.1007/s12265-010-9249-8) PMID: [21213093](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21213093/)
31. Bolli R, Chugh AR, D'Amario D, Loughran JH, Stoddard MF, Ikram S, et al. Cardiac stem cells in patients with ischaemic cardiomyopathy (SCIPIO): initial results of a randomised phase 1 trial. *The Lancet*. 2011; 378: 1847–1857.
32. Chugh AR, Beache GM, Loughran JH, Mewton N, Elmore JB, Kajstura J, et al. Administration of cardiac stem cells in patients with ischemic cardiomyopathy: the SCIPIO trial: surgical aspects and interim analysis of myocardial function and viability by magnetic resonance. *Circulation*. 2012; 126: S54–64. PMID: [22965994](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22965994/)
33. Ladage D, Turnbull IC, Ishikawa K, Takewa Y, Rapti K, Morel C, et al. Delivery of gelfoam-enabled cells and vectors into the pericardial space using a percutaneous approach in a porcine model. *Gene Ther*. 2011; 18: 979–985. doi: [10.1038/gt.2011.52](https://doi.org/10.1038/gt.2011.52) PMID: [21512506](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21512506/)
34. Yang Y, Dreessen de Gervai P, Sun J, Glogowski M, Gussakovskiy E, Kupriyanov V. MRI studies of cryoinjury infarction in pig hearts: ii. Effects of intrapericardial delivery of adipose-derived stem cells (ADSC) embedded in agarose gel. *NMR Biomed*. 2012; 25: 227–235. doi: [10.1002/nbm.1735](https://doi.org/10.1002/nbm.1735) PMID: [21774011](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21774011/)
35. Burr SP, Dazzi F, Garden OA. Mesenchymal stromal cells and regulatory T cells: the Yin and Yang of peripheral tolerance? *Immunol Cell Biol*. 2013; 91: 12–18. doi: [10.1038/icb.2012.60](https://doi.org/10.1038/icb.2012.60) PMID: [23146942](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23146942/)
36. Björkström NK, Gonzalez VD, Malmberg K-J, Falconer K, Alaeus A, Nowak G, et al. Elevated Numbers of FcγRIIIa+ (CD16+) Effector CD8 T Cells with NK Cell-Like Function in Chronic Hepatitis C Virus Infection. *J Immunol*. 2008; 181: 4219–4228. PMID: [18768879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18768879/)
37. Denyer MS, Wileman TE, Stirling CMA, Zuber B, Takamatsu H-H. Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of natural killer, cytotoxic T, natural killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. *Vet Immunol Immunopathol*. 2006; 110: 279–292. PMID: [16325923](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16325923/)
38. De Couto G, Liu W, Tseliou E, Sun B, Makkar N, Kanazawa H, et al. Macrophages mediate cardioprotective cellular postconditioning in acute myocardial infarction. *J Clin Invest*. 2015; 125: 3147–3162. doi: [10.1172/JCI81321](https://doi.org/10.1172/JCI81321) PMID: [26214527](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26214527/)
39. Riemann D, Wollert HG, Menschikowski J, Mittenzwei S, Langner J. Immunophenotype of lymphocytes in pericardial fluid from patients with different forms of heart disease. *Int Arch Allergy Immunol*. 1994; 104: 48–56. PMID: [7950405](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7950405/)

40. Battula VL, Trembl S, Bareiss PM, Gieseke F, Roelofs H, de Zwart P, et al. Isolation of functionally distinct mesenchymal stem cell subsets using antibodies against CD56, CD271, and mesenchymal stem cell antigen-1. *Haematologica*. 2009; 94: 173–184. doi: [10.3324/haematol.13740](https://doi.org/10.3324/haematol.13740) PMID: 19066333
41. Mornet E, Stura E, Lia-Baldini AS, Stigbrand T, Ménez A, Le Du MH. Structural evidence for a functional role of human tissue nonspecific alkaline phosphatase in bone mineralization. *J Biol Chem*. 2001; 276: 31171–31178. PMID: 11395499
42. O'Connor MD, Kardel MD, Iosifina I, Youssef D, Lu M, Li MM, et al. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008; 26: 1109–1116. doi: [10.1634/stemcells.2007-0801](https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0801) PMID: 18276800
43. Lee D-H, Silventoinen K, Hu G, Jacobs DR, Jousilahti P, Sundvall J, et al. Serum gamma-glutamyltransferase predicts non-fatal myocardial infarction and fatal coronary heart disease among 28,838 middle-aged men and women. *Eur Heart J*. 2006; 27: 2170–2176. PMID: 16772340
44. Jiang S, Jiang D, Tao Y. Role of gamma-glutamyltransferase in cardiovascular diseases. *Exp Clin Cardiol*. 2013; 18: 53–56. PMID: 24294039
45. Caliskan M, Erdogan D, Gullu H, Ciftci O, Yildirim I, Baycan S, et al. Association between serum gamma-glutamyltransferase levels and coronary microvascular function in hypertensive patients. *J Hypertens*. 2007; 25: 2497–2503. PMID: 17984672
46. Poelzl G, Eberl C, Achraimer H, Doerler J, Pachinger O, Frick M, et al. Prevalence and prognostic significance of elevated gamma-glutamyltransferase in chronic heart failure. *Circ Heart Fail*. 2009; 2: 294–302. doi: [10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.826735](https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.826735) PMID: 19808352
47. Cooper AM, Khader SA. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol*. 2007; 28: 33–38. PMID: 17126601
48. Ege T, Canbaz S, Yuksel V, Duran E. Effect of pericardial fluid pro-inflammatory cytokines on hemodynamic parameters. *Cytokine*. 2003; 23: 47–51. PMID: 12901854
49. Pankuweit S, Wädlich A, Meyer E, Portig I, Hufnagel G, Maisch B. Cytokine activation in pericardial fluids in different forms of pericarditis. *Herz*. 2000; 25: 748–754. PMID: 11200123
50. Nian M, Lee P, Khaper N, Liu P. Inflammatory Cytokines and Postmyocardial Infarction Remodeling. *Circ Res*. 2004; 94: 1543–1553. PMID: 15217919
51. Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW. Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol*. 2002; 71: 565–581. PMID: 11927642
52. Boonen A, Stockbrügger RW, van der Linden S. Pericarditis after therapy with interferon-alpha for chronic hepatitis C. *Clin Rheumatol*. 1999; 18: 177–179. PMID: 10357129
53. Gressens B, Gohy P. Pericarditis due to interferon-alpha therapy during treatment for chronic hepatitis C. *Acta Gastro-Enterol Belg*. 2004; 67: 301–302.
54. Popescu C, Arama V, Gliga S. Acute pericarditis due to pegylated interferon alpha therapy for chronic HCV hepatitis—case report. *BMC Gastroenterol*. 2011; 11: 30. doi: [10.1186/1471-230X-11-30](https://doi.org/10.1186/1471-230X-11-30) PMID: 21453456
55. Malliaras K, Smith RR, Kanazawa H, Yee K, Seinfeld J, Tseliou E, et al. Validation of contrast-enhanced magnetic resonance imaging to monitor regenerative efficacy after cell therapy in a porcine model of convalescent myocardial infarction. *Circulation*. 2013; 128: 2764–2775. doi: [10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002863](https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002863) PMID: 24061088





# Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on *in vitro* stimulated T cells

Rebeca Blazquez<sup>1</sup>, Francisco Miguel Sanchez-Margallo<sup>1</sup>, Olga de la Rosa<sup>2</sup>, Wilfried Dalemans<sup>3</sup>, Verónica Álvarez<sup>1</sup>, Raquel Tarazona<sup>4</sup> and Javier G. Casado<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson, Cáceres, Spain

<sup>2</sup> Research and Development Department, TIGenix SA, Parque Tecnológico de Madrid, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Technical Operations, TIGenix NV, Leuven, Belgium

<sup>4</sup> Immunology Unit, Department of Physiology, University of Extremadura, Cáceres, Spain

## Edited by:

Ana Maria Merino, Bellvitge Biomedical Research Institute (IDIBELL), Spain

## Reviewed by:

Maria Cristina Cuturi, INSERM, France  
Martin Johannes Hoogduijn, Erasmus Medical Center, Netherlands

## \*Correspondence:

Javier G. Casado, Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson, Ctra. N-521 Km 41.8, Cáceres 10071, Spain  
e-mail: jgarcia@cmijesususon.com

In the recent years, it has been demonstrated that the biological activity of mesenchymal stem cells (MSCs) is mediated through the release of paracrine factors. Many of these factors are released into exosomes, which are small membranous vesicles that participate in cell–cell communication. Exosomes from MSCs are thought to have similar functions to MSCs such as repairing and regeneration of damaged tissue, but little is known about the immunomodulatory effect of these vesicles. Based on an extensive bibliography where the immunomodulatory capacity of MSCs has been demonstrated, here we hypothesized that released exosomes from MSCs may have an immunomodulatory role on the differentiation, activation and function of different lymphocyte subsets. According to this hypothesis, *in vitro* experiments were performed to characterize the immunomodulatory effect of human adipose MSCs derived exosomes (exo-hASCs) on *in vitro* stimulated T cells. The phenotypic characterization of cytotoxic and helper T cells (activation and differentiation markers) together with functional assays (proliferation and IFN- $\gamma$  production) demonstrated that exo-hASCs exerted an inhibitory effect in the differentiation and activation of T cells as well as a reduced T cell proliferation and IFN- $\gamma$  release on *in vitro* stimulated cells. In summary, here we demonstrate that MSCs-derived exosomes are a cell-derived product that could be considered as a therapeutic agent for the treatment of inflammation-related diseases.

**Keywords:** exosomes, mesenchymal stem cells, immunomodulation, lymphocytes, lymphocyte activation

## INTRODUCTION

Exosomes are small membranous vesicles secreted by most cell types. These vesicles participate in cell–cell communication and their content consists of RNA, lipids, and proteins. Some of these proteins (i.e., CD9, CD63, or CD81) are ubiquitously expressed, but depending on the cell source, cell type-specific proteins can be found being responsible of their functionality. The proteins, lipids, and RNA expression of exosomes from different cells and organisms are extensively described in ExoCarta database (1).

Exosomes can be easily isolated by ultracentrifugation from *in vitro* cultured cells but different isolation protocols have been described in the literature (2). All these protocols differ from each other on the basis of particular types of research being divided as procedures for discovery, diagnostic, or preparative research (3). For a clinical-grade production of exosomes, safe technologies for large scale production are an absolute prerequisite (4).

In preclinical settings, especially in murine models, exosomes have been applied for the treatment of many different diseases such as infections (5, 6), allergies (7) as well as autoimmune diseases (8, 9). Regarding the immunomodulatory potential of these vesicles, the first *in vivo* studies were conducted by Pêche et al. using bone marrow dendritic cell-derived exosomes (10, 11). Compared to

preclinical studies, only a few clinical trials have been conducted using exosomes. Some of the first clinical trials were conducted in cancer patients using dendritic cell-derived exosomes (12) and ascites-derived exosomes (13) where the safety, tolerability, and efficacy of the treatments were demonstrated.

At the present, the therapeutic potential of exosomes derived from MSCs (Exo-MSCs) has been successfully applied in murine models for the treatment of cardiovascular diseases (14). In this sense, the proangiogenic effect described in different stem cell subsets may be the responsible of this therapeutic effect (15).

There are no differences in terms of morphological features, isolation, and storage conditions between exosomes derived from MSCs and other sources. As to the identification, exo-MSCs express not only the common surface markers of exosomes, such as CD9 and CD81, but also some adhesion molecules, including CD29, CD44, and CD73, which are expressed on the membrane of MSCs (16).

Accumulative evidences have established that, the effect of MSC transplantation is thought to be mediated in part, by a paracrine effect. Indeed, in the context of myocardial infarct it was experimentally quantified that the overall beneficial effect of paracrine mechanisms accounted between 50 and 80% (17).



Several advantages of using released factors from MSCs have been described. For example, transferred cells may die or not fully home into the site of damaged tissue whereas biological factors can be locally administered with a controlled dosage (18).

Current preclinical trials with exo-MSCs have been driven for repairing damaged tissues, but few reports have been focused on the immunomodulatory effect of these vesicles. Here, we hypothesize that exo-MSCs may have similar regulatory functions than the original MSCs source on the differentiation, activation and function of different T cell subsets (16).

Supporting this idea, previous reports have demonstrated that the immunomodulatory capacity of MSCs against NK cells (19, 20), cytotoxic T lymphocytes (21),  $\gamma\delta$  T cells (22), dendritic cells (23, 24), or invariant NKT cells (25) is mediated by a paracrine mechanism.

In order to address this hypothesis, *in vitro* experiments were performed to characterize the immunomodulatory effect of exo-MSCs on *in vitro* stimulated T cells. The phenotypic characterization of cytotoxic and helper T cells (activation and differentiation markers) together with functional assays (proliferation and IFN- $\gamma$  production) demonstrated that exo-MSCs exerted an inhibitory effect in the differentiation and activation of T cells as well as a reduced proliferation and IFN- $\gamma$  release on *in vitro* expanded T cells. In summary, our results suggest that, exo-MSCs are a cell-derived product that could be considered as an immunomodulatory therapeutic agent for the treatment of immunological diseases.

## MATERIALS AND METHODS

### HUMAN ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS ISOLATION AND EXPANSION

The human adipose mesenchymal stem cells (hASCs) were isolated from lipoaspirates obtained from human adipose tissue from healthy adult donors. Lipoaspirates were washed with PBS, and digested with collagenase type I in PBS. The digested sample was washed with 10% of fetal bovine serum (FBS), treated with ammonium chloride 160 mM, suspended in culture medium (DMEM containing 10% FBS), and filtered through a 40  $\mu$ m nylon mesh. Cells were seeded onto tissue culture flasks and expanded at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>, changing the culture medium every 7 days. Cells were passed to a new culture flask when cultures reached 90% of confluence. In addition, hASCs were tested by flow cytometry using specific surface markers being negative for CD14, CD31, CD34, CD45 and positive for CD29, CD59, CD90, and CD105 (data not shown). Cell lines from two healthy donors were used in the study. The biological samples were obtained after informed consent under the auspices of the appropriate Research and Ethics Committees.

### ISOLATION AND PURIFICATION OF EXOSOMES FROM hASCs

An enriched fraction of exosomes from hASCs (exo-hASCs) was obtained from hASCs cultured in 175 cm<sup>2</sup> flasks. When cells reached a confluence of 80%, culture medium (DMEM containing 10% FBS) was replaced by exosome isolation medium (DMEM containing 1% insulin–transferrin–selenium). The hASCs supernatants were collected every 3–4 days. Exosomes were isolated from supernatants by two successive centrifugations at 1000  $\times$  g

(10 min) and 5000  $\times$  g (20 min) at 4°C to eliminate cells and debris, followed by an ultracentrifugation at 100,000  $\times$  g for 6 h to precipitate exosomes. The pellets were resuspended in 250  $\mu$ L of PBS and stored at –20°C. Prior to *in vitro* experiments, exosomes were quantified by Bradford assays and characterized by nanoparticle tracking analysis.

### CHARACTERIZATION OF exo-hASCs

The concentration and size of purified exosomes were measured by nanoparticle tracking analysis (NanoSight Ltd, Amesbury, UK) that relates the rate of Brownian motion to particle size. Results were analyzed using the nanoparticle tracking analysis software package version 2.2. Triplicate samples were diluted 1:10 in sterile-filtered PBS and analyzed.

### BRADFORD ASSAY

Exosome concentrations were indirectly measured by protein quantification in a Bradford assay. To quantify protein concentration, 20  $\mu$ L of exosomes sample were incubated with 180  $\mu$ L of Bradford reagent (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA) at RT. Absorbance was read 5 min after at 595 nm, and protein concentration was extrapolated from a standard concentration curve of Bovine Serum Albumin.

### LYMPHOCYTES ISOLATION AND PRESERVATION

Peripheral blood lymphocytes (PBLs) from healthy donors were obtained by centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and washed twice with PBS. The PBLs were frozen and stored in liquid nitrogen. For *in vitro* experiments, cell aliquots were thawed at 37°C, added to 10 mL of RPMI 1640 and centrifuged at 1500 rpm for 5 min to eliminate DMSO. Pellet was resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% of FBS.

### IN VITRO STIMULATION OF T CELLS AND CO-CULTURE WITH EXOSOMES

To determine the immunomodulatory effect of exo-hASCs on *in vitro* stimulated PBLs, 2  $\times$  10<sup>5</sup> purified PBLs were seeded in a 96 wells plate (200  $\mu$ l per well). To stimulate PBLs, a T cell activation/expansion kit (Miltenyi Biotec Inc, San Diego, CA, USA) was used, adding 5  $\mu$ L of microbeads coated with anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 to each well. Finally, exosomes at different concentrations (4, 8, and 16  $\mu$ g/10<sup>6</sup> PBLs) were added to wells. The PBLs were cultured for 6 days. Negative controls (non-stimulated PBLs) and positive controls (stimulated PBLs without exosomes) were used in all the experiments.

### CFSE PROLIFERATION ASSAY

The proliferative behavior of T cells was quantified by carboxy-fluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution. The CFSE staining was performed before seeding, using the CFSE cell proliferation kit (Invitrogen, Eugene, OR) at a final concentration of 10  $\mu$ M for 10 min at 37°C, followed by immediate quenching with culture medium. After 6 days, *in vitro* stimulated PBLs in the presence or absence of exo-hASCs were tested for CFSE dilution by flow cytometry.

#### DIFFERENTIATION/ACTIVATION MARKERS EXPRESSION ANALYSIS ON *IN VITRO* STIMULATED PBLs

For flow cytometric analysis of *in vitro* stimulated PBLs, the cells were collected from wells after 6 days by pipetting up and down. The cells were stained with fluorescence-labeled human monoclonal antibodies against CD3 (SK7), CD4 (SK3), CD8 (SK1), CCR7 (3D12), CD45RA (L48) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). The markers expression analysis was performed as follows:  $2 \times 10^5$  cells were incubated for 30 min at 4°C with appropriate concentrations of monoclonal antibodies in the presence of PBS containing 2% FBS. The cells were washed and resuspended in PBS. The flow cytometric analysis was performed on a FAC-Scalibur cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) after acquisition of  $10^5$  events. Cells were primarily selected using forward and side scatter characteristics and fluorescence was analyzed using CellQuest software (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Isotype-matched negative control antibodies were used in all the experiments. The mean relative fluorescence intensity was calculated by dividing the mean fluorescent intensity (MFI) by the MFI of its negative control.

#### INTRACELLULAR GAMMA-INTERFERON ASSAY

For IFN- $\gamma$  assays, the PBLs were *in vitro* stimulated with the T cell activation/expansion kit (Miltenyi Biotec Inc, San Diego, CA, USA) for 6 days in the presence of exo-hASCs at  $16 \mu\text{g}/10^6$  PBLs. The PBLs were then incubated for 6 h with BD GolgiStop. PBLs were stained with PerCP-labeled anti-CD4 (SK3) and APC-labeled anti-CD8 (SK1), fixed and permeabilized using BD Cytotfix/Cytoperm fixation/permeabilization kit. Finally, cells were stained with PE-labeled anti-IFN- $\gamma$  antibody (all reagents from BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Analysis by flow cytometry was performed by measuring the frequency of IFN- $\gamma$  expression on gated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> cells.

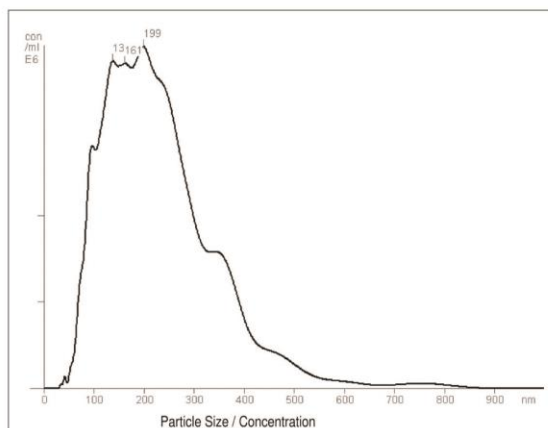
#### STATISTICAL ANALYSIS

Data were statistically analyzed using the Student's *t*-test for variables with parametric distribution. For the proliferation assay, an ANOVA with *post hoc* Bonferroni test was performed. The *p*-values  $\leq 0.10$  or  $\leq 0.05$  were considered statistically significant. All the statistical determinations were made using SPSS-21 software (SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTS

#### SIZE DISTRIBUTION AND CONCENTRATION OF exo-hASCs

An enriched fraction of exosomes was collected from hASCs by ultracentrifugation. The protein concentration of exosomes was determined by Bradford assay. Three independently performed nanoparticle tracking analysis were performed for each exosome sample to quantify size distribution and particle concentration. Firstly, the total protein concentration allowed us to quantify exosomes for *in vitro* assays. Secondly, the nanoparticle tracking analysis allowed us to characterize the released vesicles. The size of isolated vesicles ranged from 223 to 282 nm and the mean size and standard deviation was  $246.8 \pm 25.05$  nm. Representative results of exo-hASCs are displayed as a frequency size distribution graph (Figure 1). The corresponding nanoparticle tracking analysis video frame is included as Video S1



**FIGURE 1 |** Frequency size distribution graph of exo-hASCs. The nanoparticle tracking analysis was performed on exosome samples to quantify size distribution and particle concentration ( $n=6$ ). A representative graph of nanoparticle tracking analysis is shown.

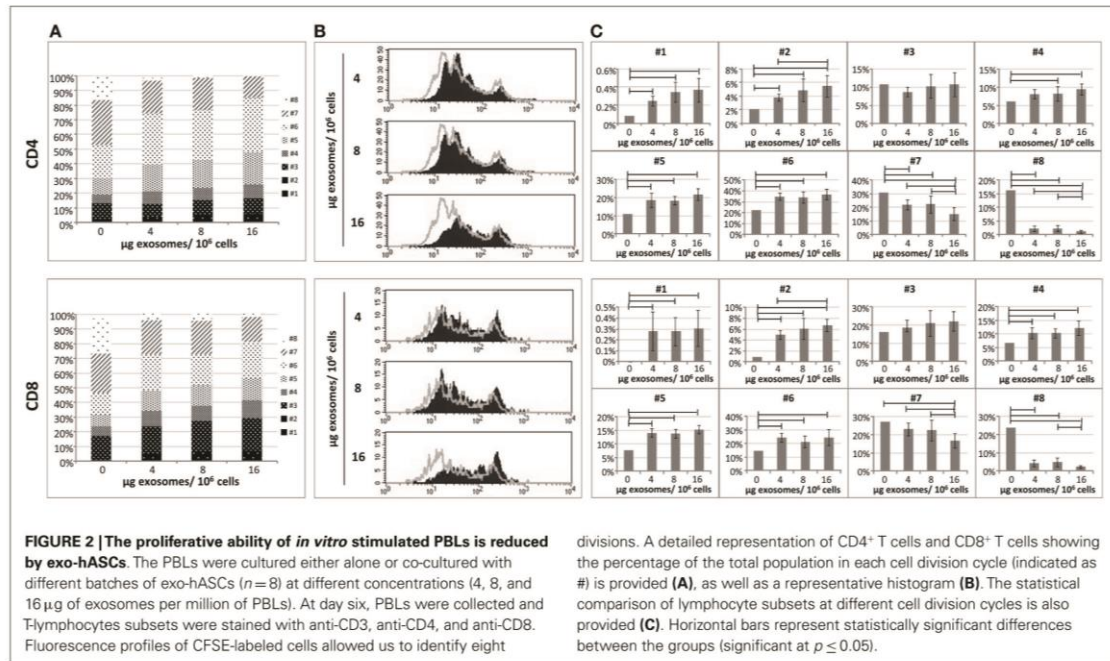
in Supplementary Material. Finally, the concentration of exosomes ( $n=6$ ) was determined by nanoparticle tracking analysis and ranged between 8.4 and  $9.7 (\times 10^9)$  particles per milliliter and the mean concentration was  $9.1 \pm 0.5 (\times 10^9)$  particles per milliliter.

#### PROLIFERATIVE ABILITY OF *IN VITRO* STIMULATED T CELLS CO-CULTURED IN THE PRESENCE OF exo-hASCs

In order to assess the biological activity of exo-hASCs, we aimed to determine their effect over the proliferation rate of lymphocyte subsets. For that, a total of  $2 \times 10^6$  PBLs were stimulated with anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 as described in Section “Materials and Methods” and co-cultured with different concentrations of exo-hASCs (4, 8, and  $16 \mu\text{g}/10^6$  PBLs) during 6 days. The proliferation ability was determined by CFSE dilution. Non-stimulated PBLs were used as negative control, and stimulated PBLs without exosomes constituted the positive control. As expected, the proliferation rate of non-stimulated PBLs was very low (data not shown) and the maximum proliferation rate was reached by stimulated PBLs without exosomes. A total of eight cell divisions were detected by CFSE fluorescence. As shown in the Figure 2A, when *in vitro* stimulated lymphocytes were cultured in the presence of different concentrations of exo-hASCs, the proliferation rate was proportionally decreased both in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. A large percentage of cells presented a low number of cell divisions, while the highest number of cell divisions was reached by a lower percentage of cells. A detailed representation showing the percentage of cells in each division cycle is provided in the Figure 2A. A representative histogram (Figure 2B) and a detailed representation showing the percentage of cells in each division cycle is also provided (Figure 2C).

Here, it can be seen how increasing concentrations of exosomes are arresting both CD4 and CD8 proliferation from eight





generations to seven. Moreover exosomes are retaining the cells in the earlier division cycles 4, 5, and 6, in where the percentage of cells are significantly higher in the presence of exosomes, however, division cycles 7 and 8 have a significantly reduced percentage of cells when higher doses of exosomes were used. The first two division cycles contain a very low percentage of T cells both in the presence or absence of exosomes indicating that the effect of the polyclonal stimulation starts after these two division cycles, nevertheless the presence of exosomes are still significantly retaining cells in these first two division cycles (although this is happening in a group of T cells below 10%). The statistical analysis showed that, significant differences were found in different division cycles either in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. Finally, the stimulation index was calculated on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells as frequencies of CFSE-low T cells among unstimulated T cells. The stimulation index of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells stimulated with anti-CD2/anti-CD3/anti-CD28 was 692.3 and 655.6, respectively. However, when PBLs were stimulated in the presence of exosomes, the stain index significantly decreased on CD4<sup>+</sup> T cells ( $589.93 \pm 39.31$ ,  $585 \pm 80.27$ ,  $529.14 \pm 58.88$  at 4, 8, and 16  $\mu\text{g}$ ) as well as in CD8<sup>+</sup> T cells ( $519.75 \pm 60.97$ ,  $488.03 \pm 107.32$ ,  $437.4 \pm 79.25$  at 4, 8, and 16  $\mu\text{g}$ ).

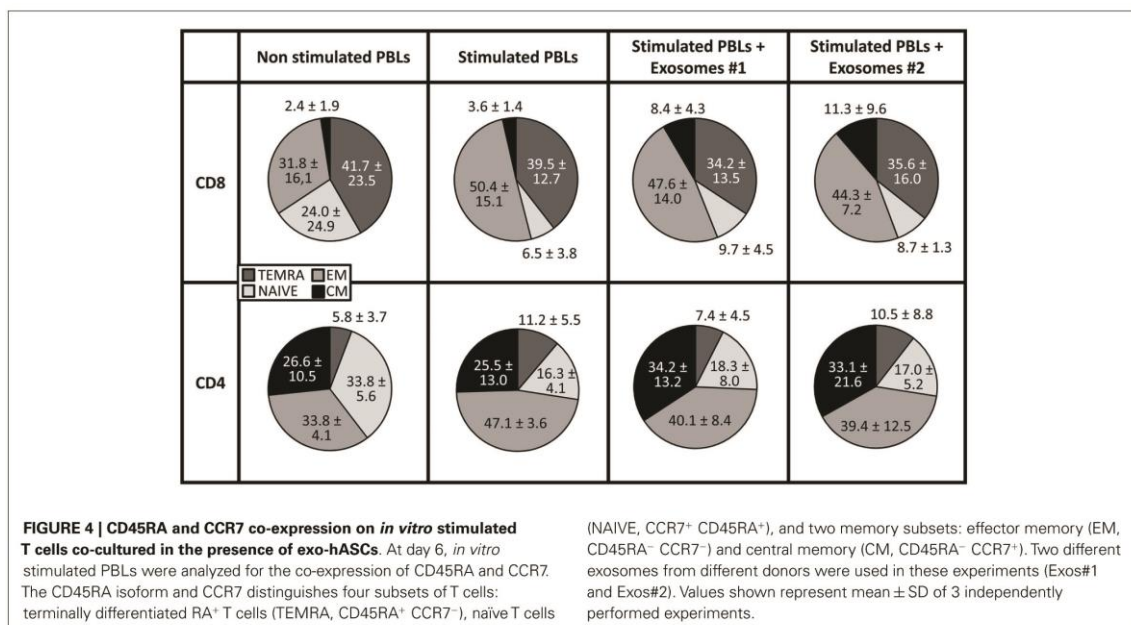
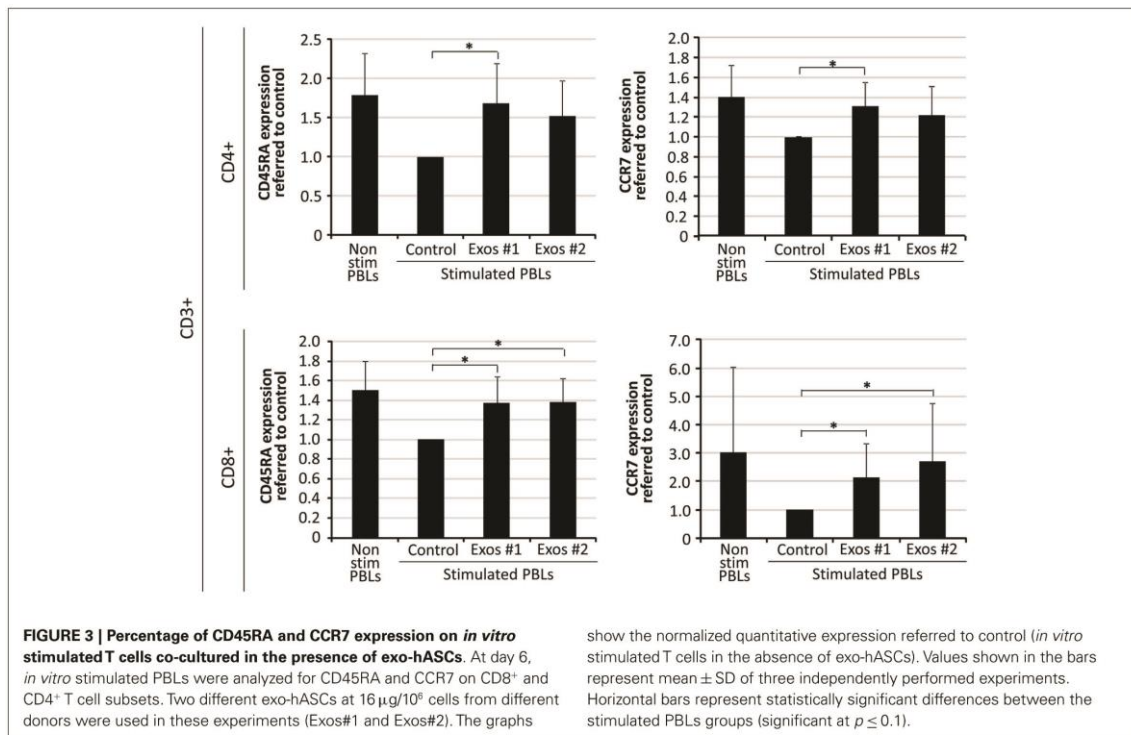
#### T CELLS SUBSETS DISTRIBUTION OF *IN VITRO* STIMULATED T CELLS CO-CULTURED IN THE PRESENCE OF exo-hASCs

The CD45RA isoform and chemokine receptor CCR7 are surface marker commonly used to identify the differentiation stages of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. In order to study the effect of exo-hASCs over lymphocyte subsets, a total of  $2 \times 10^6$  stimulated PBLs

were cultured in the presence of exo-hASCs (from two different donors) at 16  $\mu\text{g}/10^6$  PBLs. At day 6, flow cytometry was performed using a commercial antibody against CD45RA and CCR7. The quantitative expression of CD45RA and CCR7 was normalized referred to control (*in vitro* stimulated T cells in the absence of exo-hASCs). Our results showed a significant decrease CD45RA<sup>+</sup> and CCR7<sup>+</sup> cells both in the CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the positive control (stimulated PBLs). However, the loss of CD45RA and CCR7 on *in vitro* stimulated PBLs was partially compensated by the presence of exo-hASCs (Figure 3). Representative histograms are provided in Figure S1 in Supplementary Material.

In the model proposed by Lanzavecchia and Sallusto, four different stages have been defined within CD8<sup>+</sup> T cells according to the combined analysis of CD45RA and CCR7 expression, namely: naïve (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>) and at least two subset of effector-memory cells: effector-memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) and terminally differentiated effector-memory cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) (26, 27). To study the effect of exo-hASCs over this distribution, the co-expression of CD45RA and CCR7 was analyzed by flow cytometry on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets. As shown in Figure 4, although the percentage of naïve cells was not significantly modified by the presence of exo-hASCs, a significant decrease of terminally differentiated effector-memory cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>) was observed on *in vitro* stimulated CD8<sup>+</sup> T cells cultured in the presence of exo-hASCs. In the case of CD4<sup>+</sup> T cells, exo-hASCs reduced the percentage of effector-memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>) and significantly increased the percentage of central memory cells (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>+</sup>).





### IFN- $\gamma$ PRODUCTION ON *IN VITRO* STIMULATED T CELLS CO-CULTURED IN THE PRESENCE OF HUMAN ADIPOSE MESENCHYMAL STEM CELLS DERIVED EXOSOMES

The IFN- $\gamma$  is a pro-inflammatory cytokine secreted by immune cells under certain conditions of activation. There is a direct correlation between IFN- $\gamma$  secretion and the level of T cell activation. In order to determine the effect of exosomes on the secretory IFN- $\gamma$  response of T cells, PBLs were cultured in the presence and absence of exo-hASCs during 6 days and intracellular levels of IFN- $\gamma$  were determined on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets. Our results showed that, at day 6, the percentage of intracellular IFN- $\gamma$  was reduced when PBLs were cultured with exosomes, in comparison to positive control, in both T cell subsets. However, this reduction was only statistically significant on gated CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 5). These results demonstrated that exo-hASCs impaired not only the differentiation phenotype of lymphocytes but also their IFN- $\gamma$  secretion.

### DISCUSSION

The hASCs have been successfully used for the treatment of numerous diseases (28). These cells can be isolated from the adult liposuctioned tissue and efficiently expanded *in vitro* to be used as an “off-the-shelf” cellular product. At the present, there are quite a few stem cell products in the market (29) but hASCs are currently considered one of the most promising cell types for therapeutic applications that fulfill regulatory requirements.

The hASCs have immunomodulatory properties, which are directly mediated by cell–cell contact or indirectly mediated through the release of immunosuppressive factors. The release of these factors is enhanced under inflammatory conditions and results in suppression of T cell function (proliferation, differentiation, and cytotoxicity) (30), B cell functions (31), NK cell cytotoxicity (20), decrease in maturation, and activation of

dendritic cells (32) as well as an increase of regulatory T cells (33, 34).

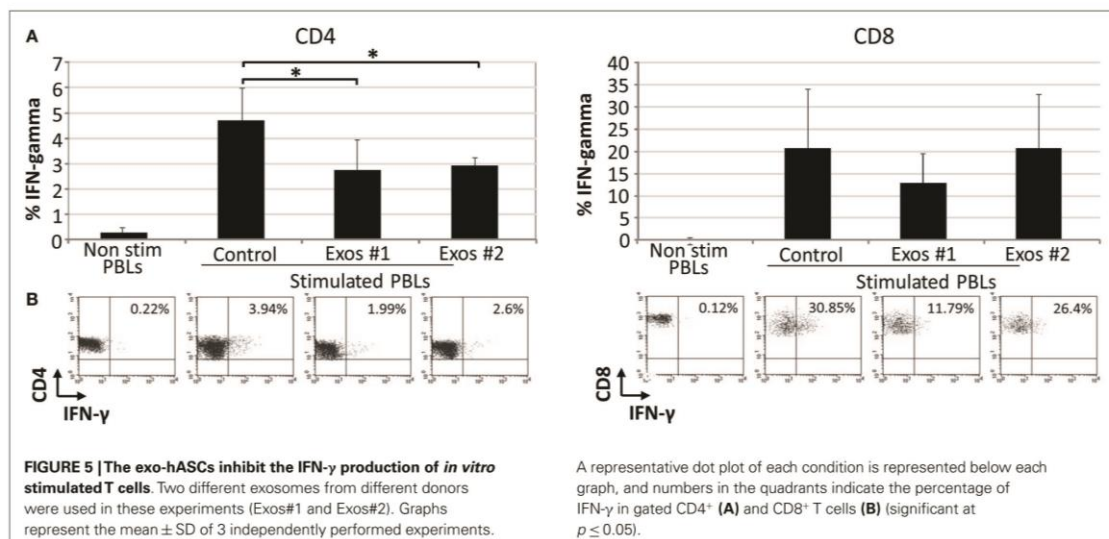
Among the released factors, the exosomes from MSCs have been considered as a promising candidate for a novel cell-free therapy. At the present, these microvesicles have been tested in pre-clinical settings for the treatment of cardiovascular diseases (35), kidney injury (36), graft-versus-host disease (37), and neurological diseases (38). In clinical settings, the exo-MSCs have been tested in graft-versus-host disease patients, which experienced improvement in symptoms for 5 months (39).

In these studies, exosomes from MSCs have demonstrated a biological effect for repairing tissue damage. From an immunological point of view, these exosomes have demonstrated immunomodulatory properties inducing peripheral tolerance (40) and modulating the immune response (41).

In this work, we aimed to investigate the immunomodulatory role of an enriched fraction of exo-hASCs on T cell subsets under *in vitro* conditions. For this purpose, the T cells were *in vitro* expanded and activated with anti-CD2, anti-CD3, and anti-CD28 that partially mimic stimulation by antigen-presenting cells (42). The immunomodulation was assessed by measuring the proliferative behavior of T cells, their differentiation toward the memory lineage and IFN- $\gamma$  secretory response.

Although this is a preliminary study, our results demonstrated that exo-hASCs significantly inhibited the proliferation of CD4 and CD8 T cells. These results are very similar to our previously published results using hASCs co-cultured with *in vitro* activated PBLs (30). Recent reports have demonstrated that TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B signaling in MSCs are required for the inhibition of T-cell proliferation (43). In this sense, future studies will be conducted to evaluate if the anti-proliferative activity of exo-hASCs could also be related with the activation of NF- $\kappa$ B.

Together with the inhibition of T cell proliferation, here we hypothesized that exo-hASCs may arrest the T cell differentiation





toward effector or memory cell phenotypes. In order to confirm this hypothesis, *in vitro* activated lymphocytes were co-cultured in the presence of exo-hASCs and the differentiation profile of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells was monitored according to co-expression of CD45RA and CCR7 molecules. The combined usage of CD45RA and CCR7 allowed us the identification of different CD8<sup>+</sup> T cell subsets (26) and CD4<sup>+</sup> T cell subsets (27): naive (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>), central memory (CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>), effector memory (CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup>), and terminally differentiated effector-memory cells (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>). Our results evidenced that exo-hASCs hamper the *in vitro* differentiation mediated by anti-CD3/CD2/CD28 stimuli. Actually, in the case of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells, exo-hASCs have an inhibitory effect in the differentiation of toward a terminally differentiated phenotype and effector-memory phenotype, respectively.

These *in vitro* results with exo-hASCs showed similarities with previous reports using MSCs and *in vitro* stimulated PBLs where the T lymphocytes showed reduced-memory responses after a tetanus toxoid boost (44). Current experiments are being conducted in a relevant animal model of T cell-mediated disease (collagen-induced arthritis experimental model for rheumatoid arthritis). Once completed, these results will give us a more complete understanding of exo-hASCs as a therapeutic agent for the control of local T cell responses.

Finally, the immunomodulatory activity of exo-hASCs was determined by measuring IFN- $\gamma$  production on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. These experiments confirmed that, similarly to *in vitro* experiments using hASCs, both in contact or separated by transwells (30), the IFN- $\gamma$  production was significantly reduced by exo-hASCs. Considering that IFN- $\gamma$  is crucial for protection against immune-mediated inflammatory disorders, we could assume that exo-hASCs could be used as ideal vehicles for a local immunosuppression. Moreover, in contrast to cell therapy, where the viability, homing, or implantation of individual cells is compromised, the usage of well-characterized exo-hASCs in a dosing regimen that can be controlled and defined in space and time could be considered an advantage (45). Additionally, several authors have reported the susceptibility of allogeneic cells to CD8<sup>+</sup> T cells and NK cells, which is an important issue for the clinical efficacy of MSCs (46). In the case of exo-hASCs, these microvesicles will not be affected by cell-mediated lysis, which is an advantage for their therapeutic effectiveness.

An important aspect to be discussed here is the role of MHC molecules on exosomes. It has been previously described by Pêche et al. that, exosomes from bone marrow dendritic cells (exo-DCs) induce regulatory responses and allograft tolerance through the presentation of donor-MHC antigens (10). These exo-DCs are positives for MHC class I, MHC class II, and co-stimulatory molecules and the *in vivo* administration of allogeneic exosomes induced tolerance (11).

Contrary to exo-DCs, the exo-hASCs are characterized by the absence of MHC class II and co-stimulatory molecules. Regarding to MHC class I, the hASCs cell lines contains very low levels of MHC class I and the expression of this molecule in exo-hASCs is still under debate. Indeed, in Exocarta (a database of exosomal proteins, <http://www.exocarta.org/>), the presence of HLA-A, HLA-B, or HLA-C has not been detected in the 939

proteins analyzed from exo-MSCs. However, the proteomic analysis of exosomes from human embryonic stem cell-derived MSCs have demonstrated the presence of HLA-A molecules in these vesicles (47).

On the other hand, considering that human clinical trials using allogeneic hASC is not causing early, aggressive immunological rejection, we could assume that allogeneic exo-hASCs from non-activated hASCs might have similar consequences. The absence of MHC class II and co-stimulatory molecules on exo-hASCs may also indicate that these vesicles have a direct inhibitory effect on T cells being independent from antigen presentation. Nevertheless, although the inhibitory effect was only tested in allogeneic setting (using exo-hASCs from clinically established hASCs), future experiments are being conducted to determine if inhibitory effect is stronger in autologous T cells.

The limitations of the study are evident as this paper has been purely focused on the *in vitro* role of exo-hASCs against *in vitro* activated T cell subsets, and future experiments should confirm these observations on *in vivo* animal models. These *in vivo* animal models will help us to define the optimal the route, dosing and frequencies of exo-hASCs administration.

In summary, this paper provides a better understanding of exo-hASCs for their future applicability in clinical practice. Moreover, in terms of immunomodulation, our *in vitro* results demonstrated a parallelism between hASCs and exo-hASCs.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Debjani Roy (TiGenix NV) for review of the manuscript. Ramon Menta, Borja del Rio and Cristina Ramirez (TiGenix S.A.U.) for technical assistance. Raquel Tarazona is a member of Inmunopatología Tumoral research group (CCV005). This work was supported in part by a grant to Rebeca Blazquez (TE12066), Javier G. Casado (TA13042), and a project to Javier G. Casado (IB13123) from GobEx cofinanced by FSE.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at <http://www.frontiersin.org/Journal/10.3389/fimmu.2014.00556/abstract>

**Supplementary Video S1 | Nanoparticle tracking analysis video frame.** A representative video of nanoparticle tracking analysis of exo-hASCs is shown.

**Supplementary Figure S1 | Percentage of CD45RA and CCR7 expression on *in vitro* stimulated T cells co-cultured in the presence of exo-hASCs.** At day 6, *in vitro* stimulated PBLs were analyzed for CD45RA and CCR7 on CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell subsets. Two different exo-hASCs at 16  $\mu$ g/10<sup>6</sup> cells from different donors were used in these experiments (Exos#1 and Exos#2). The figure shows representative histograms from the three different experiments. Percentage of positive cells is shown in each histogram.

#### REFERENCES

- Mathivanan S, Simpson RJ. ExoCarta: a compendium of exosomal proteins and RNA. *Proteomics* (2009) 9:4997–5000. doi:10.1002/pmic.200900351
- Raimondo F, Morosi L, Chinello C, Magni F, Pitto M. Advances in membranous vesicle and exosome proteomics improving biological understanding and biomarker discovery. *Proteomics* (2011) 11:709–20. doi:10.1002/pmic.201000422
- Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* (2013) 2:20360. doi:10.3402/jev.v2i0.20360



4. Kittel A, Falus A, Buzás E. Microencapsulation technology by nature: cell derived extracellular vesicles with therapeutic potential. *Eur J Microbiol Immunol* (2013) 3:91–6. doi:10.1556/EuJMI.3.2013.2.1
5. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* (2009) 27:1750–7. doi:10.1016/j.vaccine.2009.01.022
6. Kuate S, Cinatl J, Doerr HW, Uberla K. Exosomal vaccines containing the S protein of the SARS coronavirus induce high levels of neutralizing antibodies. *Virology* (2007) 362:26–37. doi:10.1016/j.virol.2006.12.011
7. Prado N, Marazuela EG, Segura E, Fernández-García H, Villalba M, Théry C, et al. Exosomes from bronchoalveolar fluid of tolerized mice prevent allergic reaction. *J Immunol* (2008) 181:1519–25. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1519
8. Cai Z, Zhang W, Yang F, Yu L, Yu Z, Pan J, et al. Immunosuppressive exosomes from TGF- $\beta$ 1 gene-modified dendritic cells attenuate Th17-mediated inflammatory autoimmune disease by inducing regulatory T cells. *Cell Res* (2012) 22:607–10. doi:10.1038/cr.2011.196
9. Yin W, Ouyang S, Li Y, Xiao B, Yang H. Immature dendritic cell-derived exosomes: a promise subcellular vaccine for autoimmunity. *Inflammation* (2013) 36:232–40. doi:10.1007/s10753-012-9539-1
10. Pêche H, Heslan M, Usal C, Amigorena S, Cuturi MC. Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation* (2003) 76:1503–10. doi:10.1097/01.TP.0000092494.75313.38
11. Pêche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant* (2006) 6:1541–50. doi:10.1111/j.1600-6143.2006.01344.x
12. Viaud S, Théry C, Ploix S, Tursz T, Lapiere V, Lantz O, et al. Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res* (2010) 70:1281–5. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3276
13. Dai S, Wei D, Wu Z, Zhou X, Wei X, Huang H, et al. Phase I clinical trial of autologous ascites-derived exosomes combined with GM-CSF for colorectal cancer. *Mol Ther* (2008) 16:782–90. doi:10.1038/mt.2008.1
14. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* (2011) 6:481–92. doi:10.2217/rme.11.35
15. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, et al. Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* (2011) 109:724–8. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.253286
16. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* (2014) 15:4142–57. doi:10.3390/ijms15034142
17. Chimenti I, Smith RR, Li T-S, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, et al. Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardioprotection-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* (2010) 106:971–80. doi:10.1161/CIRCRESAHA.109.210682
18. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol* (2013) 6:e26631. doi:10.4161/cib.26631
19. Casado JG, Tarazona R, Sanchez-Margallo FM. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. *Stem Cell Rev* (2013) 9:184–9. doi:10.1007/s12015-013-9430-y
20. de la Rosa O, Sánchez-Corraea B, Morgado S, Ramirez C, del Río B, Menta R, et al. Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev* (2012) 21:1333–43. doi:10.1089/scd.2011.0139
21. Rasmuson I, Uhlín M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* (2007) 82:887–93. doi:10.1189/jlb.0307140
22. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* (2009) 27:693–702. doi:10.1634/stemcells.2008-0687
23. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, et al. Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev* (2007) 16:719–31. doi:10.1089/scd.2007.0065
24. Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW-F, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation* (2007) 83:71–6. doi:10.1097/01.tp.0000244572.24780.54
25. Morandi F, Raffaghello L, Bianchi G, Meloni F, Salis A, Mollo E, et al. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I-restricted T-cell responses against viral or tumor-associated antigens. *Stem Cells* (2008) 26:1275–87. doi:10.1634/stemcells.2007-0878
26. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8+ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* (2003) 101:4260–6. doi:10.1182/blood-2002-11-3577
27. Okada R, Kondo T, Matsuki F, Takata H, Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4+ T cell subsets and their differentiation. *Int Immunol* (2008) 20:1189–99. doi:10.1093/intimm/dxn075
28. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. *Transfusion* (2014) 54:1418–37. doi:10.1111/trf.12421
29. Plant AL, Parker GC. Translating stem cell research from the bench to the clinic: a need for better quality data. *Stem Cells Dev* (2013) 22:2457–8. doi:10.1089/scd.2013.0188
30. de la Rosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A* (2009) 15:2795–806. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0630
31. Franquesa M, Hoogduijn MJ, Bestard O, Grinyó JM. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells on B cells. *Front Immunol* (2012) 3:212. doi:10.3389/fimmu.2012.00212
32. Liu W, Liu J, Wu J, Zhang L, Liu F, Yin L, et al. Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* (2013) 8:e55487. doi:10.1371/journal.pone.0055487
33. Engela AU, Baan CC, Peeters AMA, Weimar W, Hoogduijn MJ. Interaction between adipose tissue-derived mesenchymal stem cells and regulatory T-cells. *Cell Transplant* (2013) 22:41–54. doi:10.3727/096368912X636984
34. Engela AU, Baan CC, Dor FJ, Weimar W, Hoogduijn MJ. On the interactions between mesenchymal stem cells and regulatory T cells for immunomodulation in transplantation. *Front Immunol* (2012) 3:126. doi:10.3389/fimmu.2012.00126
35. Sahoo S, Losordo DW. Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction. *Circ Res* (2014) 114:333–44. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.300639
36. Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther* (2013) 4:34. doi:10.1186/scrt194
37. Kordelas L, Rebmann V, Ludwig A-K, Radtke S, Ruesing J, Joepner TR, et al. MSC-derived exosomes: a novel tool to treat therapy-refractory graft-versus-host disease. *Leukemia* (2014) 28:970–3. doi:10.1038/leu.2014.41
38. Xin H, Li Y, Buller B, Katakowski M, Zhang Y, Wang X, et al. Exosome-mediated transfer of miR-133b from multipotent mesenchymal stromal cells to neural cells contributes to neurite outgrowth. *Stem Cells* (2012) 30:1556–64. doi:10.1002/stem.1129
39. Ludwig A, Kordelas L, Rebmann V, Radtke S, Felderhoff-Müser U, Horn P, et al. Exosomes – from bench to bedside. *Klin Pädiatr* (2012) 224:A6. doi:10.1055/s-0032-1330775
40. Mokarizadeh A, Delirez N, Morshedi A, Mosayebi G, Farshid A-A, Mardani K. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunol Lett* (2012) 147:47–54. doi:10.1016/j.imlet.2012.06.001
41. Zhang B, Yin Y, Lai RC, Tan SS, Choo ABH, Lim SK. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells Dev* (2014) 23:1233–44. doi:10.1089/scd.2013.0479
42. Trickett A, Kwan YL. T cell stimulation and expansion using anti-CD3/CD28 beads. *J Immunol Methods* (2003) 275:251–5. doi:10.1016/S0022-1759(03)00010-3
43. Dorransoro A, Ferrin I, Salcedo JM, Jakobsson E, Fernández-Rueda J, Lang V, et al. Human mesenchymal stromal cells modulate T-cell responses through TNF- $\alpha$ -mediated activation of NF- $\kappa$ B. *Eur J Immunol* (2014) 44:480–8. doi:10.1002/eji.201343668

44. Hoogduijn MJ, Crop MJ, Peeters AM, Van Osch GJ, Balk AH, Ijzermans JN, et al. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem Cells Dev* (2007) **16**:597–604. doi:10.1089/scd.2006.0110
45. Maguire G, Friedman P, McCarthy D, Friedman R, Maniotis A. Stem cell released molecules and exosomes in tissue engineering. *Procedia Eng* (2013) **59**:270–8. doi:10.1016/j.proeng.2013.05.121
46. Crop MJ, Korevaar SS, de Kuiper R, Ijzermans JNM, van Besouw NM, Baan CC, et al. Human mesenchymal stem cells are susceptible to lysis by CD8(+) T cells and NK cells. *Cell Transplant* (2011) **20**:1547–59. doi:10.3727/096368910X564076
47. Lai RC, Tan SS, Teh BJ, Sze SK, Arslan F, de Kleijn DP, et al. Proteolytic potential of the MSC exosome proteome: implications for an exosome-mediated delivery of therapeutic proteasome. *Int J Proteomics* (2012) **2012**:971907. doi:10.1155/2012/971907

**Conflict of Interest Statement:** Olga de la Rosa and Wilfried Dalemans are full time employees of TiGenix. The other co-authors declare that the research was conducted

in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 15 July 2014; accepted: 20 October 2014; published online: 04 November 2014.

Citation: Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Álvarez V, Tarazona R and Casado JG (2014) Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Front. Immunol.* **5**:556. doi: 10.3389/fimmu.2014.00556

This article was submitted to *Immunotherapies and Vaccines*, a section of the journal *Frontiers in Immunology*.

Copyright © 2014 Blazquez, Sanchez-Margallo, de la Rosa, Dalemans, Álvarez, Tarazona and Casado. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.





## Biología Celular

# Estudio comparativo del aislamiento de exosomas derivados de células madre mesenquimales humanas para uso clínico

*Comparative study of isolated human mesenchymal stem cell derived exosomes for clinical use*

*Estudo comparativo do isolamento de exossomos derivados de células-tronco mesenquimais humanas, para uso clínico*

- Verónica Alvarez<sup>1a\*</sup>, Rebeca Blazquez<sup>1b\*</sup>, Francisco Miguel Sanchez-Margallo<sup>1c\*</sup>, Olga DelaRosa<sup>2c</sup>, Inmaculada Jorge<sup>3c</sup>, Angelo Tapia<sup>1c</sup>, Javier García Casado<sup>1c</sup>

<sup>a</sup> Medical Laboratory Technician

<sup>b</sup> MSc.

<sup>c</sup> PhD.

<sup>1</sup> Stem Cell Therapy Unit, Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson, Cáceres, España.

<sup>2</sup> Research and Development Department, TiGenix SA, Parque Tecnológico de Madrid, Madrid, España.

<sup>3</sup> Cardiovascular Proteomics Laboratory, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, España.

\* Los tres autores contribuyeron igualmente en este artículo y deben ser considerados como primeros autores. El Dr. Javier G. Casado contribuyó en la concepción, la supervisión experimental, la escritura del manuscrito y la financiación. Las Dras. Olga DelaRosa e Inmaculada Jorge realizaron el estudio de espectrometría de masa, el análisis de los datos proteómicos y la supervisión y escritura del manuscrito. El Dr. Angelo Tapia contribuyó en la supervisión experimental y elaboración del manuscrito.

Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana

Incorporada al Chemical Abstract Service.

Código bibliográfico: ABCLDL.

ISSN 0325-2957

ISSN 1851-6114 en línea

ISSN 1852-396X (CD-ROM)

## Resumen

Los exosomas son microvesículas derivadas de la exocitosis que son liberados al espacio extracelular. Las funciones de los exosomas dependen en gran medida de la célula de la cual provienen. Los exosomas derivados de células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells*, MSCs), al igual que las células de origen, poseen un enorme potencial terapéutico que favorece la regeneración tisular y reduce la inflamación. Los prometedores resultados preclínicos que emplean estos exosomas han abierto las puertas a la futura aplicación clínica de estas vesículas. El diseño de nuevos protocolos que permitan el aislamiento de exosomas para su aplicación clínica es una necesidad actual teniendo en cuenta el enorme interés que ha surgido a raíz de los prometedores resultados en ensayos preclínicos. El objetivo de este trabajo ha sido comparar, en términos de rendimiento, tamaño y pureza, diferentes métodos de aislamiento de exosomas a partir de MSCs humanas. Los resultados obtenidos demuestran que el uso de filtros concentradores para sobrenadantes de cultivos podría ser una alternativa a los protocolos convencionales basados en la ultracentrifugación. Los resultados de este trabajo permiten orientar en el diseño de protocolos para la obtención de exosomas derivados de MSCs en grado clínico.

**Palabras clave:** exosomas \* células madre mesenquimales \* aislamiento y purificación

## Summary

*Exosomes are small membranous vesicles secreted to the extracellular space by most cell types through an exocytic process. Exosomes' functions vary depending on cell source. Mesenchymal stem-cell (MSCs) derived exosomes,*

as MSCs, present a huge therapeutic potential, as they can be used in tissue regeneration and modulating inflammatory processes. The promising results obtained with these exosomes in different preclinical trials have opened the door to the future clinical application of these microvesicles. The design of new protocols for the isolation of exosomes is currently a need. The aim of this work was to compare –in terms of efficiency, size and purity– different isolation protocols for human MSCs-derived exosomes. These results demonstrate that the use of concentrator filters for MSCs supernatants could be an alternative to conventional protocols based on ultracentrifugation. The results of this work will be used to guide in the design of protocols to be applied on a clinical-grade production of exosomes.

**Keywords:** exosomes \* mesenchymal stem cells \* isolation and purification

## Resumo

Os exossomos são microvesículas derivadas após exocitose que são liberadas no espaço extracelular. As funções dos exossomos dependem, em grande medida, da célula da qual provêm. Os exossomos derivados de células-tronco mesenquimais (Mesenchymal Stem Cells, MSCs), tal como as células de origem, possuem enorme potencial terapêutico, favorecendo a regeneração ou reparo tissular e reduzindo a inflamação. Os promissores resultados pré-clínicos, utilizando estes exossomos, abriram as portas para a futura aplicação clínica destas vesículas. A criação de novos protocolos que permitam o isolamento de exossomos para a sua aplicação clínica é uma necessidade actual, levando em consideração o enorme interesse surgido em torno dos resultados promissores em ensaios pré-clínicos. O objetivo deste trabalho foi comparar, em termos de rendimento, tamanho e pureza, diferentes métodos de isolamento de exossomos a partir de MSCs humanas. Os resultados obtidos demonstram que o uso de filtros concentradores para sobrenadantes de culturas poderia ser uma alternativa aos protocolos convencionais baseados na ultracentrifugação. Os resultados deste trabalho fornecem uma orientação na criação de protocolos para a obtenção de exossomos derivados de MSCs em grau clínico.

**Palavras-chave:** exossomos \* células-tronco mesenquimais \* isolamento e purificação

## Introducción

Los exosomas son microvesículas que se originan del compartimento endosomal por fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática. Por otro lado, los términos microvesículas, ectosomas o vesículas liberadas corresponderían a partículas directamente originadas de la membrana plasmática (1). Aunque la bibliografía indica que los exosomas son partículas con un diámetro menor de 100 nm y las microvesículas partículas mayores de 100 nm, según la *International Society for Extracellular Vesicles (ISEV)*, la estricta separación por tamaño u origen aún no ha sido exactamente establecida, ni existe consenso sobre los marcadores que puedan distinguir el origen de estas vesículas (1).

Los exosomas son secretados por la mayoría de los tipos celulares y se pueden aislar tanto de sobrenadantes de células en cultivo como de diferentes fluidos biológicos (2). Se ha demostrado que los exosomas están involucrados en las relaciones intercelulares, permitiendo el intercambio de proteínas y lípidos entre las células productoras de exosomas y las células de destino (3). Estas microvesículas contienen ARN, micro-ARN y proteínas procedentes de sus células de origen, que les confieren un mecanismo de señalización importante en procesos fisiológicos, incluyendo la progresión tu-

moral, la angiogénesis y la modulación de la respuesta inmune (4–7).

Existen diferentes métodos para el aislamiento de exosomas, aunque el más extendido es la ultracentrifugación. Este método a menudo se combina con gradientes de sacarosa y requiere de un equipamiento adecuado. Existen también otros métodos que incluyen la cromatografía líquida de alta resolución (*High-Performance Liquid Chromatography, HPLC*), ultrafiltración, precipitación con polímeros e inmunoseparación basada en partículas magnéticas (1).

El uso de exosomas para el tratamiento de diferentes patologías se ha estudiado a nivel preclínico donde la seguridad, eficacia y tolerabilidad se ha demostrado ampliamente (4) (8) (9). En los últimos años, se han iniciado ensayos clínicos empleando exosomas derivados de células dendríticas para el tratamiento de pacientes con cáncer (5).

Actualmente, el potencial terapéutico de exosomas derivados de células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cells, MSCs*) para el tratamiento de patologías de origen cardiovascular se ha demostrado en modelos animales (6). En este sentido, se han empleado exosomas procedentes de médula ósea en un modelo murino de isquemia-reperfusion miocárdica resultando un efecto beneficioso sobre la reducción del daño tisular



(9). Por otro lado, también se ha demostrado el efecto proangiogénico de exosomas derivados de células madre hematopoyéticas (7).

En los últimos años se ha demostrado ampliamente que el efecto beneficioso del trasplante de MSCs viene mediado, al menos en parte, por un efecto paracrina (10). En los ensayos con modelos murinos de infarto, se ha comprobado experimentalmente que el efecto terapéutico de las MSCs (entre un 50% y un 80%) se debe a factores paracrinos (11). Por tanto, los actuales ensayos preclínicos con exosomas derivados de MSCs van dirigidos a la aplicación local de éstos para favorecer de manera directa o indirecta la reparación de tejidos. Además, el efecto inmunomodulador mediado por factores solubles se ha demostrado en células NK, linfocitos T, células  $\gamma\delta$ , dendríticas y células NKT (12–16).

En cuanto a las características morfológicas de estos exosomas, se ha demostrado recientemente que, en el caso de exosomas derivados de MSCs de origen adiposo, el tamaño de éstos es relativamente superior a otros exosomas previamente descritos (17). En el trabajo de Katsuda *et al.*, se demuestra que esta clase de exosomas presentan un tamaño entre 150 y 200 nm cuando se analizan con el método de *nanoparticle tracking analysis*. Por otro lado, estos exosomas presentan similitudes con otros exosomas aislados de otros tipos celulares (p. ej. CD9 y CD81), sin embargo, también expresan otras moléculas de adhesión entre las que se incluyen CD29, CD44 y CD73 cuya expresión también se ha detectado en la superficie de la célula de origen (18).

El objetivo de este trabajo se ha centrado en la evaluación de tres métodos de enriquecimiento y aislamiento de exosomas derivados de MSCs humanas. Esta evaluación se ha realizado comparando las diferentes metodologías en términos de rendimiento, tamaño de partícula y pureza, y considerando (o teniendo en cuenta) también otros factores como los tiempos de ensayos, uso de equipamiento y coste de materiales.

Por último, es importante indicar que los resultados que se presentan en este trabajo se han obtenido empleando células que actualmente se están administrando en ensayos clínicos (ADMIRE-CD, NCT01541579).

Por tanto, los resultados de este trabajo tienen una enorme relevancia para el diseño de protocolos de aislamiento de exosomas en grado clínico.

## Materiales y Métodos

### AISLAMIENTO, EXPANSIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO.

Las MSCs derivadas de tejido adiposo fueron aisladas de lipoaspirados humanos de donantes adultos sanos según protocolos anteriormente descritos (19). Estas células fueron obtenidas tras el consentimiento infor-

mado y bajo los auspicios de los comités de ética e investigación correspondientes. En este trabajo se utilizaron las mismas líneas celulares empleadas en la publicación de DelaRosa *et al.* (19). El informe del Comité de Bioética recogió todos los procedimientos experimentales desarrollados en el presente trabajo y el citado artículo. Para realizar el análisis inmunofenotípico de las células mediante citometría de flujo se utilizaron anticuerpos monoclonales comerciales, siendo estas células negativas para CD14, CD31, CD45 y positivas para CD29, CD59, CD73, CD90 y CD105. Los ensayos de diferenciación para comprobar la multipotencialidad de las células aisladas se realizaron cuando éstas alcanzaron un 80% de confluencia siguiendo los protocolos anteriormente descritos por Casado *et al.* Para ello se reemplazó el medio de cultivo de las expansiones por los medios de diferenciación durante 21 días (20).

### RECOLECCIÓN DE SOBRENADANTES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO.

Una vez alcanzado el 80% de confluencia en los cultivos, se lavaron los frascos de cultivo con tampón fosfato salino (*Phosphate Buffer Saline, PBS*) 1X para eliminar los restos de suero fetal bovino y se añadió DMEM con 1% penicilina/estreptomina, 1% de L-glutamina y 1% de Insulina-Transferrina y Selenito (*Insulin-Transferrin-Selenium, ITS*). Las células se incubaron con este medio durante 6 días y se recogió el sobrenadante del cultivo para posteriormente volver a añadir el mismo medio de cultivo y seguir colectando el sobrenadante. Los sobrenadantes de MSCs derivadas de tejido adiposo fueron centrifugados para eliminar los restos celulares a 1000 xg durante 10 minutos, y una segunda centrifugación a 5000 xg durante 20 minutos. Una vez centrifugados fueron filtrados empleando filtros estériles de acetato de celulosa de 0,22  $\mu$ m (Millipore).

### AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE CONCENTRADORES DE 3000 MWCO.

En este caso los concentradores usados fueron Amicon® Ultra (Merck Millipore) con un peso molecular límite (*Molecular Weight CutOff, MWCO*) de 3 kDa. Para comenzar el aislamiento se lavó el filtro; para ello se introdujeron 20 mL de PBS estéril, se centrifugó 20 minutos a 4000 xg en una Multifuge 1 L-R (Thermo) con rotor oscilante 75002005 para eliminar los posibles restos de glicerina y de azida sódica; posteriormente se eliminó el PBS de la parte superior del filtro y se echó la parte inferior del concentrador. Posteriormente se introdujeron en el tubo 15 mL de sobrenadantes de MSCs derivadas de tejido adiposo y se centrifugó a 4000 xg durante 60 minutos a 4 °C, se eliminaron los restos y se congeló el sobrenadante concentrado a -20 °C para posteriores análisis.



#### AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE CONCENTRADORES DE 50000 MWCO.

Los concentradores usados fueron Vivaspin 20 (Sartorius Stendim Biotech) con un MWCO de 50kDa. Para comenzar el aislamiento se lavó el filtro con PBS; para ello se introdujeron 20 mL de PBS estéril, se centrifugó a 5000 xg durante 20 minutos, se eliminó el PBS de la parte superior del filtro y se desechó la parte inferior del concentrador. Se añadieron 20 mL de los sobrenadantes de MSCs derivadas de tejido adiposo y se centrifugó a 5000 xg durante 40 minutos a 4 °C. Una vez centrifugados, se recogió todo el volumen resultante de la parte superior del filtro y se congeló a -20 °C para posteriores análisis.

#### AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE ULTRACENTRIFUGACIÓN.

Una vez centrifugados los exosomas para eliminar restos celulares se introdujeron 20 mL de los sobrenadantes con exosomas en tubos especiales para ultracentrifuga (Beckman Coulter) y se centrifugaron a 100000 x g durante 6 horas en una ultracentrifuga Optima L-90K, (Beckman Coulter) con rotor de ángulo fijo modelo 70.1 Ti, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado resultante en 250 µL de PBS. Para mejorar la disolución del *pellet*, se dejó toda la noche a 4 °C en agitación. Tras la disolución de todo el *pellet*, éste se congeló a -20 °C para posteriores análisis.

#### CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL MÉTODO DE BRADFORD.

La concentración de proteínas obtenida fue cuantificada mediante el método de Bradford. Brevemente, se añadieron 180 µL de reactivo de Bradford (Quick Start™ Bradford Dye Reagent, Bio-Rad) y 20 µL de muestra. Se incubó durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro de placas (Biotek, modelo Synergy™ Mx). Las absorbancias se extrapolaron a valores de concentración empleando una recta patrón de seroalbúmina bovina (*Bovine Serumalbumine*, BSA).

#### CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EXOSOMAS MEDIANTE NANOSIGHT

La concentración y el tamaño de los exosomas purificados se determinaron mediante el análisis de nanopartículas que ofrece el equipo NanoSight (NanoSight Ltd, Amesbury, UK), el cual relaciona el movimiento browniano con el tamaño de la partícula. Los resultados de esta medida se analizaron con el *software* de análisis propio del equipo (*Nanoparticle Tracking Analysis software*, versión 2.2). La configuración del equipo para dicho análisis fue la siguiente: Fotogramas procesados: 899 de 900. Fotogramas por segundo: 30. Calibración:

166nm/pixel. Desenfoque automático: Auto. Umbral de detección: 4 Multi. Tamaño mínimo esperado: Auto. Tamaño mínimo de seguimiento: 100 nm. Temperatura: 24-28 °C. Viscosidad: 0,80-0,95 cP.

#### ANÁLISIS PROTEÓMICO BASADO EN ESPECTROMETRÍA DE MASA

Para identificar y determinar de manera semicuantitativa el perfil de proteínas procedentes de los tres tipos de aislamientos, las muestras se analizaron mediante proteómica de alta resolución. La digestión de las proteínas se realizó empleando el método descrito por Bonzon-Kulichenko *et al.* Brevemente, se preparó un *pool* de 50 µg de proteínas procedentes de diferentes aislamientos de un mismo donante. Este *pool* de proteínas fue resuspendido en 75 µL de un tampón compuesto por 5% SDS, 10% glicerol, 25 mM Tris-Cl, 10 mM DTT y 0,01% azul de bromofenol a pH 6,8. Las muestras se separaron en un gel convencional de SDS-poliacrilamida. Las bandas de las proteínas se visualizaron mediante una tinción de Coomassie, se cortaron y digirieron a 37 °C con 60 ng/µL de tripsina en una relación de 5:1 proteína:tripsina (w/w) en 50 mM de bicarbonato amónico, pH 8,8 con 10% (v/v) de acetonitrilo y 0,01% (w/v) 5-ciclohexil-1-pentil-β-D maltósido (21).

Los péptidos resultantes fueron analizados por espectrometría de masa en *tándem* (LC-MS/MS) usando un sistema Easy-nLC 1000 acoplado a un *quadruple-Orbitrap hybrid mass spectrometer* (Q-Exactive, Thermo Scientific, San José, CA). La identificación de proteínas se realizó con SEQUEST (Protein Discoverer 1.3.0.339, Thermo Scientific) usando la base de datos de Swissprot (Uniprot release 2012-5). Los resultados de SEQUEST fueron validados como se describe en el trabajo de Navarro P *et al* (22).

Los resultados obtenidos, tanto de identificación de proteínas como de observación semicuantitativa fueron a continuación analizados empleando la herramienta *Gene-Ontology* (23). Esta herramienta es un recurso para obtener una clasificación sobre las funciones biológicas de las proteínas identificadas. En este trabajo se ha realizado la clasificación de las diferentes proteínas identificadas en los distintos métodos aplicando la clasificación "*Cellular Component*". Dentro de esta clasificación, se determinó el porcentaje de proteínas que según *Gene-Ontology* se clasificaban dentro del término "*Extracellular Vesicular Exosome*" (GO:0070062).

#### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para la comparación de los diferentes métodos de aislamiento de exosomas en cuanto a tamaño, número y concentración de partículas, se realizó en primer lugar un estudio de la normalidad en la distribución de las distintas variables, así como de la homogeneidad de varianzas. Tras confirmar la distribución normal y heterocedasticidad de las tres variables, condiciones inapropia-



das para aplicar el análisis de varianzas (ANOVA), se optó por realizar la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis para contrastar las medianas de los distintos grupos. En los casos en los que se obtuvo un *p*-valor significativo en esta prueba, se realizó un posterior contraste múltiple no paramétrico penalizado mediante la U de Mann-Whitney. Así, el *p*-valor considerado para cada comparación fue el obtenido tras aplicar la penalización correspondiente a la fórmula  $1-(1-p)^c$ , donde *p* es el *p*-valor original y *c* es el número de comparaciones realizadas. Todos los *p*-valores inferiores a 0,05 se consideraron significativos.

## Resultados

### CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO.

Tras realizar el análisis fenotípico de las células se comprobó que éstas expresan los marcadores de superficie de MSCs, siendo negativas para marcadores de células endoteliales y linfoides (datos no mostrados). En los ensayos de diferenciación se realizó una observación microscópica y se comprobó que las células aisladas se diferenciaron a los tres linajes, demostrando así su multipotencialidad (datos no mostrados).

### COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS EN TÉRMINOS DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS

Los volúmenes obtenidos en las centrifugaciones con los diferentes métodos de aislamiento oscilaron entre los 150 y 300  $\mu$ L finales tanto en los aislamientos mediante ultracentrifugación como en los aislamientos con filtros concentradores. El volumen resultante de los diferentes métodos de aislamiento se empleó para determinar mediante el método de Bradford la concentración de proteínas totales.

La mediana y rango intercuartílico de la concentración de proteínas obtenida con cada uno de los diferentes métodos de aislamiento de exosomas fueron de 476,24  $\mu$ g/mL (367,41  $\mu$ g/mL – 611,63  $\mu$ g/mL) para los concentradores de 3000 MWCO, 114,99  $\mu$ g/mL (57,08  $\mu$ g/mL – 228,82  $\mu$ g/mL) para los concentradores de 50000 MWCO y 82,52  $\mu$ g/mL (55,89  $\mu$ g/mL – 114,75  $\mu$ g/mL) para el método de la ultracentrifuga (Figura 1). Así, puede observarse que cuando se emplearon los concentradores de 3000 MWCO se alcanzó una concentración proteica hasta 5,8 veces mayor que en el aislamiento mediante ultracentrifugación, y más del cuádruple de la obtenida con los concentradores de 50000 MWCO, existiendo por tanto una diferencia estadísticamente significativa entre la concentración de proteínas alcanzada con los concentradores de 3000 MWCO y la obtenida mediante los otros dos métodos.

### COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS EN TÉRMINOS DE TAMAÑO DE PARTÍCULAS

Tras la cuantificación de las proteínas, se realizó una caracterización y cuantificación de las microvesículas mediante el equipo NanoSight, siendo analizadas mediante el *software* propio del equipo (*Nanoparticle Tracking Analysis software*, versión 2.2). Con este equipo, además de analizar el número de partículas se pudo cuantificar la distribución de éstas y el tamaño, permitiendo caracterizar las vesículas liberadas por las células. En la figura 2A se muestran tres imágenes representativas de los análisis realizados en los diferentes exosomas aislados con los tres métodos.

Con los tres métodos, el tamaño de las vesículas osciló entre 167 y 282 nm, con diferencias significativas en el tamaño de las partículas dependiendo del método de aislamiento. La mediana y rango intercuartílico del tamaño de las vesículas correspondientes al promedio de cada muestra fue de 181 nm (170 nm – 193,5 nm) para los concentradores de 3000 MWCO, 208,5 nm (178 nm – 229,75 nm) para los concentradores de 50000 MWCO y 239 nm (224,5 nm – 275,25 nm) para el método de la ultracentrifuga (Figura 2B). Con estos resultados se pudo comprobar que el tamaño de las partículas varía dependiendo del método de aislamiento, encontrándose partículas de menor tamaño en métodos en los que

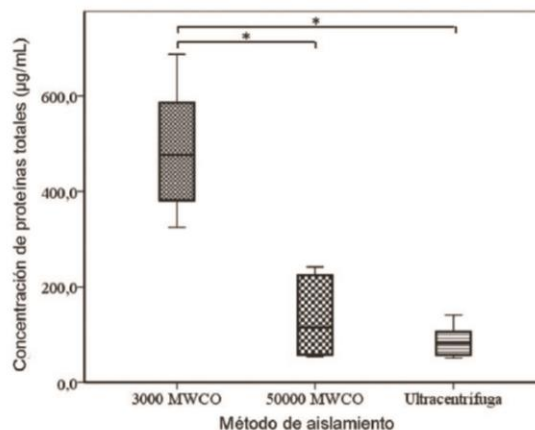


Figura 1. Medida de concentración de proteínas en exosomas aislados mediante los diferentes métodos estudiados. La proteína total de los concentrados de exosomas obtenidos con los diferentes métodos de aislamiento se determinó mediante el método de Bradford, extrapolando los valores de absorbancia a partir de una recta patrón de seroalbúmina bovina. En la gráfica se muestran las medidas obtenidas (*n*=6) a través de un diagrama de cajas, en el que la base de las cajas se corresponde al primer cuartil, y la tapa de la caja, al tercer cuartil. En el centro de la caja se encuentra la mediana. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos.

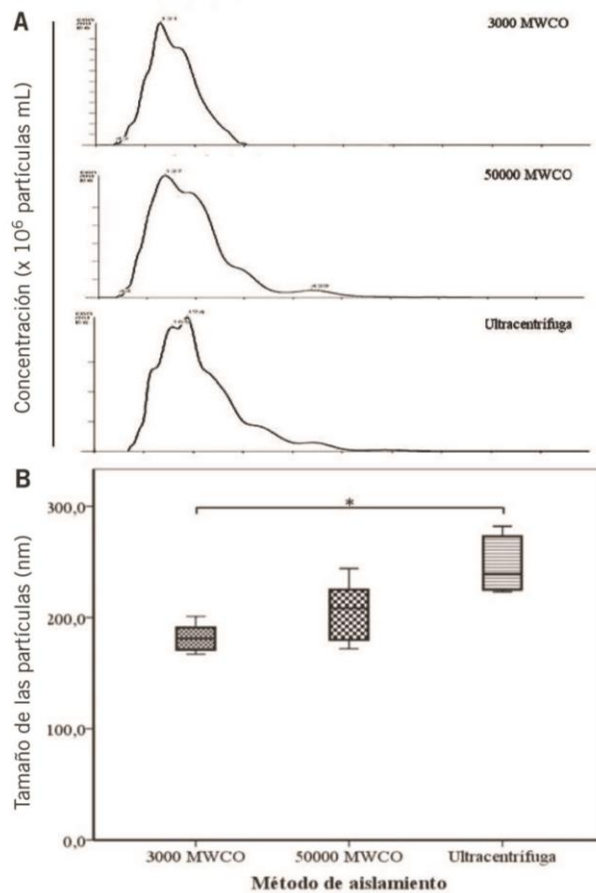


Figura 2. Determinación del tamaño de las partículas presentes en las muestras obtenidas mediante los diferentes métodos estudiados. El tamaño de las partículas presentes en los concentrados de exosomas obtenidos con los diferentes métodos de aislamiento se determinó mediante el análisis proporcionado por el software del equipo NanoSight. En la gráfica (A) se muestran las imágenes representativas del análisis obtenido del NanoSight, procedentes de una misma muestra y aisladas mediante diferentes métodos. La escala del eje X, hace referencia a 100 nm por división. La escala del eje Y representa la concentración de partículas expresadas en partículas por mL. En la gráfica (B) se muestra la representación gráfica y estadística de las medidas obtenidas ( $n=6$ ) a través de un diagrama de cajas, en el que la base de las cajas corresponde con el primer cuartil, y la tapa de la caja, con el tercer cuartil. En el centro de la caja se encuentra la mediana. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0,05$ ) entre los grupos.

el tamaño del poro también es menor. De esta forma, se observaron diferencias significativas al comparar el grupo de los concentradores de 3000 MWCO (con el que se obtuvo el tamaño de partículas más bajo) con el método de la ultracentrifugación (que arrojó los valores más elevados para el tamaño de las partículas).

#### COMPARACIÓN DE LOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS EN TÉRMINOS DE NÚMERO DE PARTÍCULAS

Se determinó, además, el número de partículas por volumen empleando el equipo NanoSight y éste osciló entre  $6,40 \times 10^9$  partículas/mL y  $15,28 \times 10^9$

partículas/mL para los diferentes grupos. La mediana y el rango intercuartílico del número de partículas fue de 13,11 partículas/mL (10,86 partículas/mL – 14,86 partículas/mL) para los concentradores de 3000 MWCO, 10,26 partículas/mL (9,54 partículas/mL – 11 partículas/mL) para los concentradores de 50000 MWCO y 9,27 partículas/mL (8,47 partículas/mL – 9,54 partículas/mL) para el método de la ultracentrifuga. En este caso, el número de partículas aisladas con los concentradores de 3000 MWCO fue significativamente más elevado que el alcanzado con la ultracentrifugación. Con los concentradores de 50000 MWCO se obtuvo un número de partículas intermedio entre los dos métodos anteriores (Figura 3).



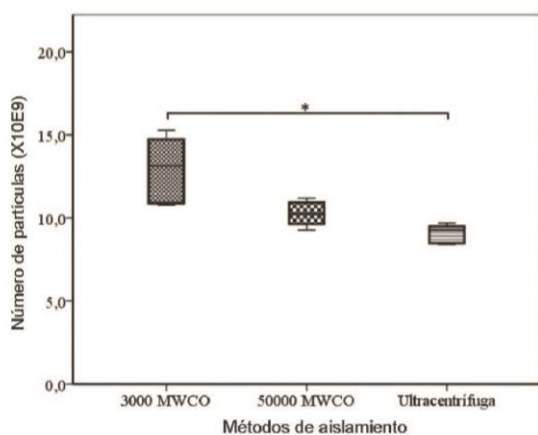


Figura 3. Determinación del número de partículas en las muestras de exosomas aislados mediante los diferentes métodos estudiados. El número de partículas presente en los concentrados de exosomas obtenidos con los diferentes métodos de aislamiento se determinó mediante el análisis proporcionado por el software del equipo NanoSight. En la gráfica se muestran las medidas obtenidas ( $n=6$ ) a través de un diagrama de cajas, en el que la base de las cajas corresponde con el primer cuartil, y la tapa de la caja, con el tercer cuartil. En el centro de la caja se encuentra la mediana. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre los grupos.

#### COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE EXOSOMAS MEDIANTE PROTEÓMICA

Los resultados obtenidos del análisis mediante proteómica permitieron identificar 345 proteínas en el caso de los aislamientos realizados con el concentrador de 3000 MWCO, un total de 307 proteínas en los aislamientos con el concentrador de 50000 MWCO y 172 proteínas en el aislamiento realizado mediante ultracentrifugación. En cada uno de los aislamientos se realizó la semicuantificación del número de péptidos correspondientes a cada una de las proteínas identificadas (resultados no mostrados). El total de las pro-

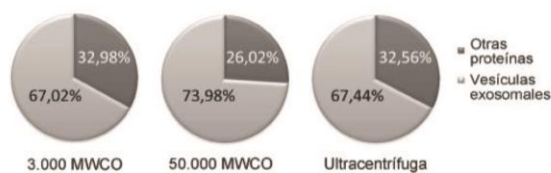


Figura 4. Caracterización proteómica del perfil proteico analizado en los diferentes concentrados de exosomas. El total de proteínas identificadas mediante espectrometría de masas fueron clasificadas empleando la herramienta informática Gene Ontology. En la gráfica se muestra, para cada uno de los métodos utilizados, el porcentaje de proteínas relacionadas con vesículas exosomales (GO:0070062) sobre el total de proteínas identificadas de cada muestra.

teínas identificadas (tomando el código de acceso de Uniprot), fue analizado con la herramienta bioinformática Gene Ontology (27). Los resultados de este análisis se centraron en determinar el porcentaje de proteínas que se clasificaban como proteínas propias de los exosomas (denominadas según Gene Ontology como *Extracellular Vesicular Exosome*). Los resultados de esta clasificación demostraron que, para el concentrador de 3000 MWCO, un 65,22% de las proteínas correspondían al grupo de proteínas relacionadas con vesículas exosomales. Empleando los concentradores de 50000 MWCO, el porcentaje fue de 73,98%. Por último, en el caso de los aislamientos mediante ultracentrifugación, el porcentaje de proteínas relacionadas con vesículas exosomales fue de 67,44% (Figura 4).

## Discusión y Conclusiones

El objetivo de este trabajo se ha centrado en la evaluación de diferentes protocolos de aislamiento de exosomas derivados de MSCs. En este trabajo se han comparado tres protocolos de aislamiento que permiten la obtención de exosomas aplicables para la práctica clínica. Concretamente, se han analizado los diferentes productos obtenidos en términos de concentración, tamaño y pureza.

En el primero de los protocolos se emplearon concentradores de 3000 MWCO. Este tipo de concentradores se ha descrito previamente para la obtención de concentrados de diferentes exosomas (24). Para el segundo de los protocolos se emplearon concentradores de 50000 MWCO los cuales se han descrito previamente para el aislamiento de exosomas tumorales (25) y procedentes de orina (26). Por último, el método de aislamiento empleando ultracentrifugación se ha descrito ampliamente para exosomas de diferente origen. El objetivo de este estudio ha sido orientar desde el punto de vista metodológico en el desarrollo de métodos de aislamiento de exosomas de MSCs para su futura aplicación clínica.

Actualmente, los resultados publicados tanto en ensayos *in vitro* como en modelos preclínicos indican que estos exosomas poseen un enorme potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades de base inmunológica y en patologías asociadas a daño tisular. Por un lado, los ensayos preclínicos en modelos de infarto agudo de miocardio han demostrado que el tratamiento con exosomas derivados de MSCs favorece la recuperación funcional del tejido cardíaco (27). Por otro lado, con respecto al papel inmunomodulador de estos exosomas, este grupo de investigación ha demostrado que poseen un efecto regulador similar al que está descrito para las propias células, con un efecto inhibitor sobre la activación, secreción y proliferación de linfocitos T (28).

Los resultados que se presentan en este trabajo indican que el uso de concentradores comerciales con un menor tamaño de poro y centrifugados a menor veloci-



dad permite la obtención de un mayor número de exosomas con menor tamaño y mayor pureza. Esta observación confirma el trabajo publicado por Cvjetkovic *et al* en el que los autores comparan la influencia del rotor y el tiempo de centrifugación para el aislamiento y purificación de microvesículas. En ese artículo se demostró que centrifugaciones demasiado largas (superiores a 4 horas), deberían evitarse para reducir la contaminación excesiva de proteínas solubles. También observaron que tiempos muy inferiores a 70 minutos son insuficientes para el aislamiento de exosomas (29). Por el contrario, el método de la ultracentrifugación para el aislamiento de exosomas, el cual es un método ampliamente utilizado en la mayoría de trabajos, da como resultado unas concentraciones más bajas y una pureza inferior. En relación con el método seleccionado para el aislamiento de exosomas con ultracentrifugación, es importante indicar que en este trabajo se ha aplicado la ultracentrifugación sin gradientes de densidad en sacarosa (normalmente se emplea una dilución de sacarosa al 30%). De acuerdo con la experiencia de los autores, el rendimiento obtenido en el aislamiento de exosomas de MSCs cuando se aplican gradientes de densidad de sacarosa al 30% es significativamente inferior que sin aplicar dicho gradiente (resultados no mostrados). Puesto que el objetivo principal de este trabajo era comparar diferentes métodos de aislamiento de exosomas para su futura aplicación clínica, se decidió descartar el método de aislamiento de ultracentrifugación en gradiente de densidad. Este método, a pesar de proporcionar un alto grado de pureza, presentaba unos rendimientos demasiado bajos para su posterior aplicación clínica. En este sentido, es interesante destacar de los resultados un aspecto como el de la pureza de las muestras obtenidas mediante ultracentrifugación. Según se puede observar en la Figura 2B, el perfil de tamaño de las vesículas aisladas mediante ultracentrifugación fue mayor de 220 nm. Estos resultados resultan llamativos si se tiene en cuenta que los sobrenadantes ultracentrifugados han sido sometidos a un proceso de filtración empleando filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Similares perfiles de tamaño se han observado en el caso de exosomas derivados de placenta aislados mediante ultracentrifugación (30). En el caso de los exosomas de placenta, se demuestra que las muestras ultracentrifugadas y previamente filtradas a 0,22  $\mu\text{m}$  daban como resultado un perfil de vesículas con tamaños superiores a 220 nm. Este grado de pureza incrementó significativamente cuando los sobrenadantes fueron sometidos a una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa, obteniéndose partículas con un tamaño de partículas entre 50 nm y 150 nm. Tanto los resultados publicados por Sarker S *et al* (30) como los publicados en el presente trabajo parecen indicar que los aislamientos realizados mediante ultracentrifugación sin gradiente de sacarosa dan como resultado una población de vesículas de tamaño heterogéneo en

comparación con los aislamientos realizados mediante un gradiente de sacarosa. Además, el hecho de que puedan ser detectadas vesículas con tamaños superiores a 0,22 micras (a pesar del prefiltrado de los sobrenadantes) podría deberse a un proceso de agregación de vesículas tras el aislamiento (31).

Un aspecto favorable del uso de concentradores en contra del uso de ultracentrífuga radica en el coste elevado de los equipos de ultracentrifugación, mientras que los protocolos en los que se emplean filtros concentradores sólo requieren centrífugas convencionales de menor coste y ampliamente disponibles en clínicas, hospitales y centros de investigación.

Por último, es importante comentar en esta discusión el creciente interés de la industria en la producción de vesículas extracelulares. Al día de hoy, tres empresas (Capricor Inc, Anosys Inc. y ReNeuron Group PLC) se están especializando en el desarrollo de terapias basadas en vesículas extracelulares aisladas de diferentes fuentes (células derivadas de cardiosferas, células madre neurales y células dendríticas). Sorprende que, a pesar del potencial terapéutico de estas vesículas, el impacto que tienen actualmente en la industria y en el desarrollo de ensayos clínicos sea aún muy limitado. Una de las razones que limitan la incorporación de las vesículas extracelulares en ensayos clínicos es la necesidad de un proceso de estandarización en el aislamiento de éstas. En este sentido, aunque la ultracentrifugación se ha considerado tradicionalmente como el método que proporciona un mayor grado de pureza en el aislamiento de exosomas, este método, desde el punto de vista industrial, es costoso en términos de tiempo y energía. Los métodos basados en la filtración podrían ser una alternativa para el procesamiento a gran escala de sobrenadantes de cultivos celulares aunque para una aplicación terapéutica este material biológico debe ser producido bajo condiciones controladas y siguiendo la normativa de buenas prácticas de manufactura (en inglés, GMP). El establecimiento de buenas prácticas de manufactura para la obtención de exosomas con métodos de filtración requiere unos controles de calidad que tengan en cuenta el tamaño de las vesículas, presencia/ausencia de marcadores bioquímicos, ausencia de contaminantes (p. ej. agregados de proteínas), esterilidad y estabilidad del producto final, métodos para optimizar el almacenamiento del producto y por último, métodos analíticos que sirvan para controlar todos los aspectos anteriormente enumerados (32).

A pesar de que el trabajo aquí presentado, al tratarse de un desarrollo experimental *in vitro*, tiene evidentes limitaciones, los autores consideran que el aspecto más interesante y novedoso de los resultados radica en el enfoque hacia una futura aplicación clínica de exosomas derivados de MSCs. Los ensayos preclínicos que se están realizando actualmente en este grupo de investigación permitirán además obtener una prueba de con-



cepto para determinar dos parámetros fundamentales en terapias avanzadas como son la seguridad y eficacia de este nuevo producto, con un importante potencial terapéutico enfocado al tratamiento en patologías asociadas a procesos inflamatorios.

#### CORRESPONDENCIA

PhD. JAVIER G. CASADO  
Stem Cell Therapy Unit  
Minimally Invasive Surgery Centre Jesus Uson  
Ctra. N-521 Km 41,8, 10071, CACERES, España.  
Correo electrónico: jgarcia@cmijesususon.com

#### AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por un contrato a Rebeca Blázquez (TE12066), un contrato a Javier G. Casado (TA13042) y un proyecto a Javier G. Casado (IB13123), financiados por el Gobierno de Extremadura y cofinanciados por el Fondo Social Europeo.

## Referencias bibliográficas

1. Witwer KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, *et al.* Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2013; 2: 20360.
2. Simpson RJ, Lim JW, Moritz RL, Mathivanan S. Exosomes: proteomic insights and diagnostic potential. *Expert Rev Proteomics* 2009; 6(3): 267–83.
3. Maguire G, Friedman P, McCarthy D, Friedman R, Maniotis A. Stem Cell Released Molecules and Exosomes in Tissue Engineering. *Procedia Eng* 2013;59: 270–8.
4. Pêche H, Renaudin K, Beriou G, Merieau E, Amigorena S, Cuturi MC. Induction of tolerance by exosomes and short-term immunosuppression in a fully MHC-mismatched rat cardiac allograft model. *Am J Transplant* 2006; 6(7): 1541–50.
5. Viaud S, Théry C, Ploix S, Tursz T, Lapierre V, Lantz O, *et al.* Dendritic cell-derived exosomes for cancer immunotherapy: what's next? *Cancer Res* 2010; 70(4): 1281–5.
6. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* 2011; 6(4): 481–92.
7. Sahoo S, Klychko E, Thorne T, Misener S, Schultz KM, Millay M, *et al.* Exosomes from human CD34(+) stem cells mediate their proangiogenic paracrine activity. *Circ Res* 2011; 109(7): 724–8.
8. Beauvillain C, Juste MO, Dion S, Pierre J, Dimier-Poisson I. Exosomes are an effective vaccine against congenital toxoplasmosis in mice. *Vaccine* 2009; 27(11): 1750–7.
9. Lai RC, Arslan F, Lee MM, Sze NSK, Choo A, Chen TS, *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res* 2010; 4(3): 214–22.
10. Sanz-Ruiz R, Fernández-Avilés F. [Stimulating factors for cardiac repair: when the ischemic myocardium asks for help]. *Med Clínica* 2012; 138(10): 435–7.
11. Chimenti I, Smith RR, Li T-S, Gerstenblith G, Messina E, Giacomello A, *et al.* Relative roles of direct regeneration versus paracrine effects of human cardiosphere-derived cells transplanted into infarcted mice. *Circ Res* 2010; 106(5): 971–80.
12. Casado JG, Tarazona R, Sanchez-Margallo FM. NK and MSCs crosstalk: the sense of immunomodulation and their sensitivity. *StemCell Rev* 2013; 9(2): 184–9.
13. DelaRosa O, Sánchez-Correa B, Morgado S, Ramírez C, del Río B, Menta R, *et al.* Human adipose-derived stem cells impair natural killer cell function and exhibit low susceptibility to natural killer-mediated lysis. *Stem Cells Dev* 2012; 21(8): 1333–43.
14. Rasmuson I, Uhlén M, Le Blanc K, Levitsky V. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes. *J Leukoc Biol* 2007; 82(4): 887–93.
15. Prigione I, Benvenuto F, Bocca P, Battistini L, Uccelli A, Pistoia V. Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and gammadelta T cells or invariant natural killer T cells. *Stem Cells* 2009; 27(3): 693–702.
16. Chen L, Zhang W, Yue H, Han Q, Chen B, Shi M, *et al.* Effects of human mesenchymal stem cells on the differentiation of dendritic cells from CD34+ cells. *Stem Cells Dev* 2007; 16(5): 719–31.
17. Katsuda T, Tsuchiya R, Kosaka N, Yoshioka Y, Takagaki K, Oki K, *et al.* Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. *Sci Rep* 2013; 3.
18. Yu B, Zhang X, Li X. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *Int J Mol Sci* 2014; 15(3): 4142–57.
19. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheño-Corvo P, Ramirez C, Menta R, *et al.* Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part* 2009; 15(10): 2795–806.
20. Casado JG, Gomez-Mauricio G, Alvarez V, Mijares J, Tarazona R, Bernad A, *et al.* Comparative phenotypic and molecular characterization of porcine mesenchymal stem cells from different sources for translational studies in a large animal model. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 147(1-2): 104–12.
21. Bonzon-Kulichenko E, Pérez-Hernández D, Núñez E, Martínez-Acedo P, Navarro P, Trevisan-Herraz M, *et al.* A robust method for quantitative high-throughput analysis of proteomes by 18O labeling. *Mol Cell Proteomics* 2011; 10(1): M110.003335.
22. Navarro P, Vázquez J. A refined method to calculate false discovery rates for peptide identification using decoy databases. *J Proteome Res* 2009; 8(4): 1792–6.
23. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, *et al.* Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 2000; 25(1): 25–9.



320 Alvarez V *et al.*

24. Hooper C, Sainz-Fuertes R, Lynham S, Hye A, Killick R, Warley A, *et al.* Wnt3a induces exosome secretion from primary cultured rat microglia. *BMC Neurosci* 2012; 13:144.
25. Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, *et al.* Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 2005; 65(12): 5238–47.
26. Alvarez ML, Khosroheidari M, KanchiRavi R, DiStefano JK. Comparison of protein, microRNA, and mRNA yields using different methods of urinary exosome isolation for the discovery of kidney disease biomarkers. *Kidney Int* 2012; 82(9): 1024–32.
27. Ibrahim AG-E, Cheng K, Marbán E. Exosomes as critical agents of cardiac regeneration triggered by cell therapy. *Stem Cell Rep* 2014; 2(5): 606–19.
28. Blazquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Alvarez V, Tarazona R, *et al.* Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front Immunol* 2014; 5: 556.
29. Cvjetkovic A, Lötval J, Lässer C. The influence of rotor type and centrifugation time on the yield and purity of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 2014; 3.
30. Sarker S, Scholz-Romero K, Perez A, Illanes SE, Mitchell MD, Rice GE, *et al.* Placenta-derived exosomes continuously increase in maternal circulation over the first trimester of pregnancy. *J Transl Med* 2014; 12: 204.
31. Lane RE, Korbie D, Anderson W, Vaidyanathan R, Trau M. Analysis of exosome purification methods using a model liposome system and tunable-resistive pulse sensing. *Sci Rep* 2015; 5: 7639.
32. James A Smith, Kelvin S. Ng., Benjamin E. Mead, Sue Dopson, Brock Reeve, James Edwards, *et al.* Extracellular Vesicles Commercial Potential As Byproducts of Cell Manufacturing for Research and Therapeutic Use [Internet]. BioProcess International. Disponible en: <http://www.bioprocessintl.com/manufacturing/cell-therapies/extracellular-vesicles-commercial-potential-as-byproducts-of-cell-manufacturing-for-research-and-therapeutic-use/>. Fecha de acceso 15 de junio de 2015.

**Recibido: 15 de diciembre de 2014****Aceptado: 16 de julio de 2015**

**ANEXO II. Otras contribuciones  
científicas • • • •**



## PUBLICACIONES

---

### ARTÍCULOS INDEXADOS EN JCR

- Vela FJ, **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Tarazona R, Mangas-Ballester MT, Cristo A, Casado JG. Evaluation of antigen-induced synovitis in a porcine model: immunological, arthroscopic and kinetic studies. *BMC Vet Res.* (En revisión).

IF (JCR) = 1.643 Q1 Veterinary Sciences (27/138)
  
- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Tarazona R, Casado JG. Comparison of mesenchymal stem cells and leukocytes from Large White and Göttingen Minipigs: Clues for stem cell-based immunomodulatory therapies. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 179:63-9. doi: 10.1016/j.vetimm.2016.08.002

IF (JCR) = 1.664 Q1 Veterinary Sciences (26/138)

Q4 Immunology (128/150)
  
- Garate A, Ciriza J, Casado JG, **Blázquez R**, Pedraz JL, Orive G, Hernandez RM. Assessment of the behavior of MSCs immobilized in biomimetic alginate microcapsules. *Mol Pharm.* 2015; 12(11):3953-62. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.5b00419

IF (JCR) = 4.342 Q1 Medicine, Research & Experimental (22/124)

Q1 Pharmacology & Pharmacy (38/253)
  
- Crisóstomo V, Báez Díaz C, Maestre J, García-Lindo M, Sun F, Casado JG, **Blázquez R**, Abad JL, Palacios I, Rodríguez-Borlado L, Sánchez-Margallo FM. Delayed administration of allogeneic Cardiac Stem Cell therapy for acute myocardial infarction could ameliorate adverse remodeling. Experimental study in swine. *J Transl Med.* 2015; 13:156. doi: 10.1186/s12967-015-0512-2

IF (JCR) = 3.694 Q1 Medicine, Research & Experimental (30/124)

**ARTÍCULOS NO INDEXADOS EN JCR**

- Crisóstomo V, Casado JG, Báez Díaz C, **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM. Review: Allogeneic cardiac stem cell administration for acute myocardial infarction. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2015; 13(3):285-99. doi: 10.1586/14779072.2015.1011621.

IF (SJR) = 0.614 Q2 Cardiology and Cardiovascular Medicine (139/337)

Q2 Internal Medicine (57/126)

- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Usón A, Tapia-Araya A, Casado JG. Aislamiento y caracterización de células madre mesenquimales de líquido sinovial para ensayos preclínicos en modelo porcino. *AETEL*. 2013; 89:38-42.

**ABSTRACTS INDEXADOS EN JCR**

- Vela FJ, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, **Blázquez R**, Álvarez V, Casado JG. Mesenchymal stem cell derived exosomes in the treatment of synovitis: proof of concept in large animal model. *New Biotech*. 2016; 33(3):409. doi:10.1016/j.nbt.2015.10.064

- Álvarez V, Sanchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Vela FJ, Tapia-Araya A, Casado JG. Isolation and purification of exosomes derived from mesenchymal stem cells for clinical use. *New Biotech*. 2016; 33(3):434-435. doi:10.1016/j.nbt.2015.10.057

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Casado JG. MSCs-coated surgical meshes for reducing postsurgical inflammation. *New Biotech*. 2016; 33(3):413. doi:10.1016/j.nbt.2015.10.076

IF = 3.199 Q2 Biochemical Research Methods (23/77)

Q2 Biotechnology & Applied Microbiology (45/161)

- Báez C, Crisóstomo V, **Blázquez R**, Blanco V, Sun F, Moreno B, Arenal A, Sánchez-Margallo FM. Cardiosphere-derived cells for the treatment of myocardial



infarction: Safety comparison of two minimally invasive cell delivery strategies.

Lab Anim. 2015; 49(3):41. doi: 10.1177/0023677215609551

IF = 1.553 Q1 Veterinary Sciences (29/138)

Q2 Zoology (50/160)

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Álvarez V, Usón A, Maestre J, García-Lindo M, Casado JG. The intrapericardial delivery provides a safe and efficient method for mesenchymal stem cell-based therapies. *J Am Coll Cardiol*. 2014; 63 (12): A85. doi: 10.1016/S0735-1097(14)60085-1  
IF = 17.759 Q1 Cardiac & Cardiovascular Systems (1/124)
- Báez C, Crisostomo V, García-Lindo M, Casado JG, **Blázquez R**, Álvarez V, Palacios I, Rodríguez-Borlado L, Sanchez-Margallo FM. Intracoronary delivery of pCSCs in a porcine animal model: MRI and histological evaluation. *Br J Surg*. 2014; 101 (Suppl.1):1-14. doi: 10.1002/bjs.9430
- **Blázquez R**, Casado JG, Jorge I, Álvarez V, Gómez-Mauricio G, Ortega-Muñoz M, Vázquez J, Sánchez-Margallo FM. Wound healing can be enhanced by mesenchymal stem cell-coated sutures: involvement of collagen release. *Br J Sur*. 2014; 101 (Suppl.1):1-14. doi: 10.1002/bjs.9430  
IF = 5.596 Q1 Surgery (7/199)
- Báez C, Crisóstomo V, García-Lindo M, Casado JG, Álvarez V, **Blázquez R**, Palacios I, Rodríguez-Borlado L, Sánchez-Margallo FM. Benefits of intracoronary delivery of pCSCs in a swine model of acute myocardial infarction. *Hum Gene Ther*. 2013; 24(12): A1-A172. doi: 10.1089/hum.2013.2513
- Casado JG, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Intrapericardial delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model: in vivo cell tracking by MRI and

histological analysis. *Hum Gene Ther.* 2013; 24(12): A1-A172. doi: 10.1089/hum.2013.2513

- **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Arenal A, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Characterization of porcine cardiosphere-derived stem cells line for preclinical studies in a large animal model leading to expand the current purposes of CDCs therapy. *Hum Gene Ther.* 2013; 24(12): A1-A172. doi: 10.1089/hum.2013.2513

IF = 4.062 Q1 Biotechnology & Applied Microbiology (28/161)

Q1 Genetics & Heredity (34/165)

Q1 Medicine, Research & Experimental (26/124)

## LIBROS

- **Blázquez R**, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Aislamiento y caracterización de células madre cardíacas porcinas para ensayos preclínicos en patología cardiovascular. Bohodón (Abey ed.). ISBN: 978-84-9296312.

## COMUNICACIONES A CONGRESOS

---

### NACIONALES

- Usón A, Ballestín A, Álvarez V, **Blázquez R**, Borrega M, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Estudio histológico de un modelo animal de colgajo libre microquirúrgico que sufre isquemia-reperfusión. 29º Congreso Nacional de Técnico Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico (AETEL). Salamanca, 20-21 mayo 2016.
- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Usón A, Casado JG. Aislamiento y caracterización de células madre endometriales humanas para la evaluación del potencial terapéutico de sus exosomas. 29º Congreso Nacional de Técnico

Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico (AETEL). Salamanca, 20-21 mayo 2016.

- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Usón A, Casado JG. Análisis comparativo de células madre mesenquimales y estudio del perfil leucocitario en sangre periférica de los modelos animales Large White y Göttingen Minipig. 29º Congreso Nacional de Técnico Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico y Técnico Superior en Anatomía Patológica y Citodiagnóstico (AETEL). Salamanca, 20-21 mayo 2016.
- Báez C, Crisóstomo V, **Blázquez R**, Blanco V, Sun F, Moreno B, Arenal A, Sánchez-Margallo FM. Cardiosphere-derived cells for the treatment of myocardial infarction: Safety comparison of two minimally invasive cell delivery strategies. I Congreso Ibérico de Ciencias del Animal de Laboratorio (XIII Congreso SECAL – III Congreso SPCAL). Cáceres, 18-20 noviembre 2015.
- **Blázquez R**, Sánchez Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, Álvarez V, Tarazona R, Casado JG. Human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes for the treatment of inflammation-related diseases: a preliminary approach. 8th Biennial Congress of the Spanish Society for Gene and Cell Therapy. San Sebastián, 4-6 noviembre 2015.
- Vela FJ, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, **Blázquez R**, Álvarez V, Casado JG. Exosomes from mesenchymal stem cell exert an antiinflammatory effect in a BSA-induced synovitis model. 8th Biennial Congress of the Spanish Society for Gene and Cell Therapy. San Sebastián, 4-6 noviembre 2015.
- Álvarez V, Sánchez Margallo FM, **Blázquez R**, Vela FJ, Casado JG. Mesenchymal stem cell derived exosomes: a comparative analysis of different isolation and pu-

rification protocols. 8th Biennial Congress of the Spanish Society for Gene and Cell Therapy. San Sebastián, 4-6 noviembre 2015.

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Tapia-Araya A, Vela FJ, Casado JG. Establecimiento de líneas de células madre mesenquimales para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares en perro. Congreso del Grupo de Especialistas Veterinarios en Traumatología y Ortopedia (GEVO) 2015. Ibiza, 29 abril – 2 mayo 2015.
- Vela FJ, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, **Blázquez R**, Álvarez V, Casado JG. Exosomas derivados de células madre mesenquimales para el tratamiento de la sinovitis: prueba de concepto en un modelo de animal grande. Congreso del Grupo de Especialistas Veterinarios en Traumatología y Ortopedia (GEVO) 2015. Ibiza, 29 abril – 2 mayo 2015.
- Tapia-Araya A, Sánchez-Margallo FM, Vela FJ, **Blázquez R**, Álvarez V, Alberdi R, Casado JG. Desarrollo de un modelo quirúrgico de lesión condral en la especie porcina para la evaluación de *scaffolds* y células madre mesenquimales. Congreso del Grupo de Especialistas Veterinarios en Traumatología y Ortopedia (GEVO) 2015. Ibiza, 29 abril – 2 mayo 2015.
- Álvarez V, Usón A, **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, Casado JG. Caracterización de células madre mesenquimales porcinas de líquido sinovial. 27º Congreso Nacional de Inmunodiagnóstico (AETEL). Córdoba, 23-24 mayo 2014.
- Usón A, Álvarez V, **Blázquez R**, Báez C, Crisóstomo V, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Localización de células madre adultas en tejido cardíaco tras su administración intrapericárdica. Congreso Nacional de Inmunodiagnóstico (AETEL). Córdoba, 23-24 mayo 2014.

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Lorenzo-Benayas MJ, de la Rosa O, Casado JG. Human adipose stem cells-derived exosomes are modulators of in vitro stimulated T-Lymphocytes. 38 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI). Badajoz, 8-10 mayo 2014.
- Casado JG, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Garcia-Lindo M, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Correlation between myocardial infarct area and TNF-alpha content in pericardial fluid: consequences on immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. 38 Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI). Badajoz, 8-10 mayo 2014.
- Báez C, Crisóstomo V, García-Lindo M, Casado JG, **Blázquez R**, Álvarez V, Palacios I, Rodríguez-Borlado L, Sánchez-Margallo FM. Intracoronary delivery of pCSCs in a porcine animal model: MRI and histological evaluation. XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ). Madrid, 21-22 noviembre 2014.
- **Blázquez R**, Casado JG, Jorge I, Álvarez V, Gómez-Mauricio G, Ortega-Muñoz M, Vázquez J, Sánchez-Margallo FM. Wound healing can be enhanced by mesenchymal stem cell-coated sutures: involvement of collagen release. XIX Congreso de la Sociedad Española de Investigaciones Quirúrgicas (SEIQ). Madrid, 21-22 noviembre 2014.

## INTERNACIONALES

- Álvarez V, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Immunological study of intrapericardial CDCs administration in a large animal model. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016.



- **Blázquez R**, Zonari A, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, Casado JG, Ferreira L. CDCs-derived extracellular vesicles for promoting cardiac regeneration: preliminary results. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, de la Rosa O, Dalemans W, Casado JG. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: proteomic analysis and immunomodulatory effects on in vitro stimulated T-lymphocytes. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016).
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Vela FJ, Álvarez V, Casado JG. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles for the treatment of synovitis: pre-clinical evaluation in an antigen-induced synovitis porcine model. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016.
- Báez C, **Blázquez R**, Moreno-Naranjo B, Crisóstomo V, Blanco V, Maestre J, García Casado J, Steendam R, Franssen O, Sánchez Margallo FM. Administration of microencapsulated Insulin-Like Growth Factor 1 or low-dose mesenchymal stem cells in the treatment of acute myocardial infarction. Comparative experimental study. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016.
- Blanco V, **Blázquez R**, Sánchez Margallo FM, Báez C<sup>1</sup>, Maestre J, Mangaballester MT, Palacios I, Steendam R, Hiemstra C, Franssen O, Crisóstomo V. Microencapsulated Insulin-Like Growth Factor 1 improves cardiac function in a swine model of acute myocardial infarction. 5th Lugano Stem Cell Meeting. Lugano (Suiza), 20-21 junio, 2016.
- Álvarez V, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Intrapericardial administration of cardiosphere-derived stem cells in a clinically relevant animal model of myocardial infarction. 13th EFSM Congress

(Congress of the European Federation of Societies for Microsurgery). Antalya (Turquía), 21-24 abril 2016.

- Ballestín A, Sánchez-Margallo FM, Abellán E, Álvarez V, **Blázquez R**, Casado JG, Calles-Vázquez MC. The effect of adipose mesenchymal stem cells on the survival of rat epigastric free flaps which suffer ischemia reperfusion injury: preliminary results. 13th EFSM Congress (Congress of the European Federation of Societies for Microsurgery). Antalya (Turquía), 21-24 abril 2016.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Casado JG. Biocompatibility of MSCs-coated surgical meshes: an *in vitro* and *in vivo* evaluation. International Society for Cellular Therapy (ISCT) Europe 2015 Regional Meeting. Sevilla, 24-26 septiembre 2015.
- Álvarez V, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Intrapericardial administration of cardiosphere-derived stem cells in a clinically relevant animal model of myocardial infarction. International Society for Cellular Therapy (ISCT) Europe 2015 Regional Meeting. Sevilla, 24-26 septiembre 2015.
- Vela FJ, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, **Blázquez R**, Álvarez V, Casado JG. Exosome-derived mesenchymal stem cells for the treatment of synovitis: proof of concept in a large animal model. International Society for Cellular Therapy (ISCT) Europe 2015 Regional Meeting. Sevilla, 24-26 septiembre 2015.
- Usón A, Tapia-Araya A, Álvarez V, **Blázquez R**, Vela FJ, Borrega M, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Histological assessment of the chondral lesion in porcine model. 6º International Congress of Histology and Tissue Engineering. Bilbao, 16-18 septiembre 2015.

- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Casado JG. Subcutaneous implantation of MSCs-coated meshes for reducing post-surgical inflammation in a murine model. 6º International Congress of Histology and Tissue Engineering. Bilbao, 16-18 septiembre 2015.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Usón A, Casado JG. MSCs-coated surgical meshes for reducing postsurgical inflammation. BAC 2015 (9th Congress of FEBiotec - Annual Congress of Biotechnology). Salamanca, 8-10 julio 2015.
- Álvarez V, Sánchez-Margallo FM, **Blázquez R**, Vela FJ, Tapia A, Casado JG. Isolation and purification of exosomes derived from mesenchymal stem cells for clinical use. BAC 2015 (9th Congress of FEBiotec - Annual Congress of Biotechnology). Salamanca, 8-10 julio 2015.
- Vela FJ, Sánchez-Margallo FM, Tapia-Araya A, **Blázquez R**, Álvarez V, Casado JG. Mesenchymal stem cell derived exosomes in the treatment of synovitis: proof of concept in large animal model. BAC 2015 (9th Congress of FEBiotec - Annual Congress of Biotechnology). Salamanca, 8-10 julio 2015.
- Crisóstomo V, Ruiz PM, Báez C, Fernández-Portales J, Pérez-David E, **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Arenal A. Stem cell therapy could modify ventricular tachycardia substrate in a porcine model of post-ischemic VT. 12th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. Madrid, 28-29 mayo 2015.
- **Blázquez R**, Tapia-Araya A, Álvarez V, Casado JG, Sánchez-Margallo FM. Development of canine adipose stem cell lines for the allogeneic treatment of osteoarticular diseases. BSAVA (British Small Animal Veterinary Association) Congress. Birmingham (Reino Unido), 9-12 abril 2015.

- **Blázquez R**, Tapia A, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Aislamiento, caracterización y expansión in vitro de células madre adiposas caninas para el tratamiento alogénico de enfermedades osteoarticulares. SOCHITOV 2014 (Primer Congreso Latinoamericano de Traumatología, Ortopedia e Imagenología Veterinaria). Santiago de Chile (Chile), 11-14 septiembre 2014.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Lorenzo-Benayas MJ, de la Rosa O, Casado JG. Immunomodulatory potential of human adipose stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. Israstem 2014. Tel-Aviv (Israel), 10-11 junio 2014.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, Celdrán D, Casado JG. Usage of surgical MSCs-coated meshes for reducing postsurgical inflammation. Israstem 2014. Tel-Aviv (Israel), 10-11 junio 2014.
- **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM, Crisóstomo V, Báez C, Álvarez V, Usón A, Maestre J, García-Lindo M, Casado JG. The intrapericardial delivery provides a safe and efficient method for mesenchymal stem cell-based therapies. American College of Cardiology (63th annual scientific session). Washington DC (EEUU), 29-31 marzo 2014.
- **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Arenal A, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Characterization of porcine cardiosphere-derived stem cells line for preclinical studies in a large animal model leading to expand the current purposes of CDCs therapy. XXIst European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid, 25-28 octubre 2013.
- Casado JG, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Intrapericardial delivery of bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model: in vivo cell tracking by MRI and

histological analysis. XXIst European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid, 25-28 octubre 2013.

- Báez C, Crisóstomo V, García-Lindo M, Casado JG, Álvarez V, **Blázquez R**, Palacios I, Rodríguez-Borlado L, Sánchez-Margallo FM. Benefits of intracoronary delivery of pCSCs in a swine model of acute myocardial infarction. XXIst European Society of Gene & Cell Therapy Congress. Madrid, 25-28 octubre 2013.
- **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Arenal A, Sánchez-Margallo FM, Casado JG. Characterization of porcine cardiosphere-derived stem cells leading to preclinical studies for post-myocardial infarction. 10th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. Madrid, 6-7 junio 2013.
- Casado JG, **Blázquez R**, Crisóstomo V, Báez C, Maestre J, Gómez-Mauricio G, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Intrapericardial administration of bone marrow mesenchymal stem cells in a porcine model: cell tracking by MRI, histology and Y-chromosome detection. 10th International Symposium on Stem Cell Therapy and Cardiovascular Innovations. Madrid, 6-7 junio 2013.

## PATENTES

---

- **Blázquez R**, Casado JG, Álvarez V, Sánchez-Margallo FM. Soporte quirúrgico con actividad biológica inmunomoduladora (P201500236). Registro 2015 (Oficina Española de Patentes y Marcas).
- De la Rosa O, Lombardo E, Dalemans W, Casado JG, **Blázquez R**, Sánchez-Margallo FM (P11834EP00). Registro 2015 (*United States Patent and Trademark Office*).





