



Memoria para optar al título de Bioquímico

**“Efecto de vesículas extracelulares pequeñas
provenientes de células endoteliales estimuladas
con Interleuquina-10 en el fenotipo desdiferenciado
de células musculares lisas vasculares A7r5
inducido por TNF- α ”**

Javiera Paz Favi Coloma

Dr. Jaime Riquelme Meléndez

Director de memoria

Dr. Mario Chiong Lay

Director de memoria

Centro Avanzado de Enfermedades Crónicas (ACCDiS)
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

2024

Agradecimientos

El desarrollo de esta memoria de título fue posible gracias al apoyo de mi familia y amigos, a quienes agradezco su incondicionalidad. Agradezco a mis amigos Sofía Clavería, Michelle Gárnica y Milan Cabezas por darme luz cuando todo se ponía oscuro con su cariño y su buen humor. A mis padres por su paciencia y comprensión durante toda esta etapa de mi vida. También agradezco a las personas del laboratorio por su amabilidad y preocupación. A mis directores de este proyecto, Dr. Mario Chiong, por su disposición y asistencia, y al Dr. Jaime Riquelme, por su preocupación, su confianza y por ayudarme a creer un poco más mis capacidades.

Financiamiento

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Remodelado y Metabolismo Vascular, Advanced Center of Chronic Diseases (ACCDiS), Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. Fue financiada por medio de los proyectos:

- FONDECYT 1231576 - Jaime Riquelme Meléndez
- FONDAP 15130011 - Sergio Lavandero González
- FONDAP 1523A0008 - Sergio Lavandero González y Andrew Geoffery Quest

Índice de contenidos

Agradecimientos.....	2
Financiamiento	2
Índice de contenidos.....	3
Índice de tablas y figuras	4
Lista de abreviaturas.....	5
Resumen	7
Abstract	9
I. Introducción.....	11
I.1. Enfermedades cardiovasculares y cambio fenotipo de células musculares lisas vasculares.....	11
I.2. Prevención del cambio fenotípico de CMLV y manejo de la inflamación para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares	12
I.3. Vesículas extracelulares como tratamiento para enfermedades cardiovasculares	15
II. Hipótesis.....	18
III. Objetivo general y objetivos específicos.....	18
IV. Materiales y métodos	18
IV.1. Cultivo celular.....	18
IV.2. Producción, aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares	19
IV.3. Obtención de las proteínas y ensayo Western blot.....	20
IV.4. Ensayo de cierre de herida.....	22
IV.5. Análisis estadístico.....	23
V. Resultados	24
V.1. Aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC	24
V.2. Efectos de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC en los marcadores de diferenciación de células A7r5.....	25
V.3. Efecto del aumento de concentración de IL-10 en la producción de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC	28
V.4. Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC en el fenotipo migratorio CMLV	29
VI. Discusión	31
VI.1. Efectos de IL-10 sobre la producción, caracterización y funcionalidad de vesículas extracelulares pequeñas producidas por HUVEC.....	31
VI.1.a Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC estimuladas con IL-10	31
VI.1.b Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC sobre la desdiferenciación inducida por TNF- α	33

VI.2. Efectos de IL-10 en la producción, características físicas y funcionalidad de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC	36
VI.2.a Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC bajo estimulación con IL-10	36
VI.2.b Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC sobre el fenotipo migratorio de células A7r5	37
VII. Conclusiones.....	39
VIII. Bibliografía	40
IX. Anexo.....	48
IX.1. Efectos del aislamiento en las características de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC	48

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para ensayo Western blot.....	21
Figura 1. Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC.....	25
Figura 2. Efectos de la VEP de HUVEC en marcadores contráctiles en la dediferenciación de células A7r5 inducida por TNF- α	27
Figura 3. Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC.....	29
Figura 4. Efectos de VEP de HUVEC sobre el fenotipo migratorio de CMLV	30
Anexo 1 Efectos del aislamiento en las características de VEP de HUVEC.....	48

Lista de abreviaturas

α -SMA: α -Actina de músculo liso.

ACV: Accidente cerebrovascular.

ARN: Ácido ribonucleico.

ASN: Análisis de seguimiento de nanopartículas

CMLV: Células musculares lisas vasculares.

DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco.

EEM: Error estándar de la media.

EGM: Medio de crecimiento para células endoteliales.

FRS: Factor de respuesta sérica.

g: Unidad de fuerza gravitacional.

hsCRP: Proteína C reactiva de alta sensibilidad.

HUVEC: Células Endoteliales de la Vena Umbilical Humana.

IL: Interleuquina.

IL-10: Interleuquina 10.

IM: Infarto del miocardio.

KLF4: factor 4 similar a Kruppel.

miARN: Micro ácido ribonucleico.

μ g: Microgramos.

μ L: Microlitros.

μ M: Micrómolar.

mL: Mililitros.

MISEV2018: Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018.

ng: Nanogramos.

nm: Nanómetros.

PBS: Amortiguador fosfato salino.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas BB.

RIPA: Amortiguador para análisis de radioinmunoprecipitación.

rpm: Revoluciones por minuto.

SFB: Suero fetal bovino.

SM22: Proteína de músculo liso 22.

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TBST: Amortiguador Tris salino 1X – Tween.

TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa.

VE: Vesículas extracelulares.

VEP: Vesículas extracelulares pequeñas.

Resumen

Las enfermedades cardiovasculares presentan la primera causa de muerte a nivel nacional y mundial. A pesar de la existencia de tratamientos, la alta tasa de reincidencia de eventos cardiovasculares sigue siendo muy alta. En estas patologías existe un remodelado del endotelio vascular, donde se produce el cambio fenotípico de las células musculares lisas vasculares (CMLV) desde un fenotipo altamente diferenciado a un grupo de fenotipos desdiferenciados y secretores. La desdiferenciación se caracteriza por una disminución en las proteínas contráctiles, y un aumento en la tasa de proliferación y migración. La inflamación se ha visto implicada en la desdiferenciación de las CMLV. Además, elevaciones en los niveles de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-18 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)) aumentan el riesgo de sufrir de eventos cardiovasculares. Ensayos clínicos enfocados en la reducción de estas citoquinas han presentado gran cantidad de efectos secundarios, por lo que el uso de interleuquina 10 (IL-10) un modulador negativo de la respuesta inmune, podría ser una alternativa. Debido a la baja efectividad de la aplicación directa de IL-10 se plantea utilizar vesículas extracelulares (VE) para potenciar su efecto. Las VE son nanopartículas rodeadas por una bicapa lipídica que actúan como forma de comunicación celular, y poseen gran heterogeneidad en cargos, tamaños y funciones. Su composición y funcionalidad dependen del tipo celular, su condición y el ambiente extracelular, siendo posible potenciar su actividad al estimular a las células secretoras de VE. Las VE de células endoteliales han mostrado un efecto preventivo en el cambio fenotípico de CMLV, e IL-10 es necesario para este efecto. Sin embargo, se desconoce si puede potenciarse mediante la exposición a IL-10. Por lo que se propone que las VE pequeñas provenientes de células endoteliales estimuladas con IL-10 previenen la desdiferenciación de células musculares lisas vasculares A7r5 inducida por TNF- α . Para esto se estimularon HUVEC con 20 y 60 ng/mL de IL-10 por 24 horas y controles. Las VE se aislaron por medio de una serie de centrifugaciones y una cromatografía de exclusión por tamaño y se caracterizaron por análisis de seguimiento de nanopartículas (ASN). El efecto preventivo de las desdiferenciación de CMLV A7r5 se evaluó por la expresión de proteínas contráctiles por Western blot y ensayo de cierre de heridas en presencia de 10 ng/mL de TNF- α . El ASN no mostró diferencias significativas de distribución de tamaño, concentración y tamaño modal entre las VE producidas por HUVEC estimuladas con IL-10 a concentraciones de 20 y 60 ng/mL respecto a las VE de HUVEC producidas en condiciones basales. De igual manera, no se presentaron diferencias en la funcionalidad de

VE de HUVEC con y sin estimulación de IL-10 en la prevención de un fenotipo desdiferenciado y migratorio inducido por TNF- α , ya que no se observaron modificaciones de los marcadores de fenotipo contráctil ni diferencias en los ensayos de cierre de heridas luego de un pretratamiento por 30 minutos con 10^8 partículas/mL de VE. En conclusión, la estimulación de HUVEC con IL-10 no afecta la producción y tamaño de VE, y que las VE aisladas de HUVEC bajo estimulación con IL-10 tienen no tienen un efecto preventivo de la desdiferenciación de las CMLV A7r5 pero si en su migración.

Abstract

Effect of small extracellular vesicles from interleukin-10-stimulated endothelial cells on TNF- α -induced A7r5 vascular smooth muscle cell dedifferentiated phenotype.

Cardiovascular diseases are the leading cause of deaths at national and worldwide level, and even with the actual therapies there is a recidivism of cardiovascular events. In these pathologies there is a vascular remodeling, where vascular smooth muscle cells (VSMC) have a phenotypic switch, from a very differentiated phenotype to a group of dedifferentiated and secretory phenotypes, the latter have a reduction of contractile proteins, higher rates of proliferation and migration. Inflammation has been implicated in dedifferentiation of VSMC, simultaneously, elevation in proinflammatory cytokines levels (IL-6, IL-18 y tumoral necrosis factor alpha (TNF- α)) increase the risk of cardiovascular events. Clinical trials with focus in reduction in these cytokines have presented a large number of side effects, hence interleukin 10 (IL-10), an immune response modulator could be an alternative. Due to the low effectiveness of direct administration of IL-10, the use of extracellular vesicles (EV) to enhance their effects is raised. EV are nanoparticles enveloped in a lipid bilayer that function as cellular communication, and have great heterogeneity of charges, sizes and functions. Their composition and functionalities depend on cellular type, cellular condition and extracellular environment, being possible to enhance their activity upon stimulating EV producing cells. EV from endothelial cells have been demonstrated as a preventing effect in the phenotypic switch of VSMC, and IL-10 is required for this effect, however, it is unknown if it is possible to amplify their activity by exposing them to IL-10. Therefore, this work proposes that small EV from human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) stimulated by IL-10 could prevent dedifferentiation of VSMC A7r5 by TNF- α . To achieve this, small EV from HUVEC stimulated by IL-10 for 24 hours, with 20 and 60 ng/mL and controls, were isolated by serial centrifugations and size exclusion chromatography. This small EV were characterized using nanoparticle tracking analysis (NTA), while the preventing effect in dedifferentiation of VSMC was evaluated by expression of contractile proteins through Western blot and wound healing assay at a concentration 10 ng/mL of TNF- α . NTA does not show significant differences in distribution size, concentration and modal size between small EV, produced by stimulated HUVEC with concentration of 20 and 60 ng/mL, and small EV from HUVEC in basal conditions. Similarly, there were not presented differences in preventing dedifferentiation and migration phenotype function induced by TNF- α between small EV from HUVEC with and without IL-10 stimulation, since the contractile phenotype

markers does not change, neither where differences between the pretreatment for 30 minutes with 10^8 particles/mL of small EV of HUVEC in both conditions in the wound healing assay. In conclusion, stimulation of HUVEC by IL-10 does not affect the production and size of small EV, and small EV from HUVEC stimulated with IL-10 have not a preventing effect in VSMC A7r5 dedifferentiation but they have in migration.

I. Introducción

I.1. Enfermedades cardiovasculares y cambio fenotipo de células musculares lisas vasculares

Las enfermedades cardiovasculares comprenden todas aquellas condiciones patológicas que afectan al corazón y a los vasos sanguíneos. Este conjunto de patologías incluye la cardiopatía coronaria, aterosclerosis, enfermedad arterial periférica, hipertensión, accidente cerebrovascular (ACV), trombosis venosa, embolismo pulmonar, infarto del miocardio (IM), cardiopatía reumática y cardiopatía congénita (World Health Organization, 2019). Este grupo de condiciones son la primera causa de muerte en Chile y el mundo, con más del 22,9% de las defunciones a nivel nacional (Departamento de Estadísticas de Información de Salud, 2024) y más del 30,4% de las defunciones a nivel mundial (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2020).

En estas condiciones los vasos sanguíneos presentan un remodelado desadaptativo. Durante condiciones fisiológicas, las células endoteliales de la túnica íntima, las células musculares lisas vasculares (CMLV) de la túnica media y el conjunto de adipocitos, tejido conectivo, fibroblastos y matriz extracelular de la túnica adventicia se encuentran en estrecha comunicación y participan en la homeostasis del sistema cardiovascular (Touyz et al., 2018). Sin embargo, frente a la exposición a cambios en fuerzas hemodinámicas, acumulación anormal de lípidos, aumento de especies reactivas de oxígeno, aumento de señales vasoconstrictoras (como angiotensina II y norepinefrina) y/o citoquinas proinflamatorias (como interleuquina (IL) 1 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α)), se induce daño en las células endoteliales y en las CMLV (Touyz et al., 2018; Basatemur et al., 2019). Mientras que a nivel del endotelio vascular ocurre la pérdida de la integridad, disminución de la secreción de moléculas vasodilatadoras y aumento de la permeabilidad; las CMLVs sufren una transdiferenciación desde un fenotipo diferenciado a una variedad de fenotipos migratorios y secretores (Xu et al., 2021; Grootaert y Bennett, 2021).

El fenotipo diferenciado se caracteriza por una morfología fusiforme, bajas tasas de proliferación y migración, además de una elevada expresión de proteínas contráctiles como α -actina de músculo liso (α -SMA), cadena pesada de la miosina 11, calponina y proteína de músculo liso 22 (SM22) (Owens et al., 2004). Los genes de estas proteínas contráctiles

están regulados por el factor de respuesta sérica (FRS) y el co-activador miocardina, requiriéndose su unión a la caja CARG ubicada en el promotor de estos genes para su expresión (Du et al., 2003). En cambio, el grupo de fenotipos secretores se caracteriza por ser desdiferenciado, con reducción de proteínas contráctiles, aumento de la migración celular, elevación en la tasa de proliferación y la secreción de citoquinas proinflamatorias, componentes de la matriz extracelular y enzimas asociadas a su remodelado (Owens et al., 2004; Grootaert y Bennett, 2021). Algunos de los fenotipos secretores incluyen a fenotipo de células espumosas, tipo macrófago, tipo adipocito, osteocondrogénico, tipo miofibroblasto y tipo célula endotelial. Esta desdiferenciación está modulada principalmente por la actividad del factor 4 similar a Kruppel (KLF4). Este ejerce una acción represora de los genes de proteínas contráctiles por medio de la unión a su elemento represor rico en G/C, la unión competitiva a FRS, reclutamiento de desacetilasas y la formación de complejos con el factor de transcripción Elk1 y FRS (Grootaert y Bennett, 2021). La modulación de este cambio fenotípico también está regulada por otros factores como micro ácidos ribonucleicos (miARN), modificaciones epigenéticas y moléculas como el factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB) y TNF- α (Grootaert y Bennett, 2021; García-Miguel et al., 2018).

A diferencia de la plasticidad que poseen las CMLV para volver a su estado diferenciado en condiciones fisiológicas luego de la reparación de heridas, la permanencia de los estímulos dañinos presentes en patologías cardiovasculares impide la recuperación del fenotipo contráctil y diferenciado (Owens et al., 2004; Manderson et al., 1989). Este grupo de fenotipos secretores ha sido descrito en aneurisma aórtica (Cao et al., 2023), hipertensión (Wynne et al., 2009), hipertensión pulmonar (Sheikh et al., 2015), y aterosclerosis. Además, participa en los procesos de calcificación vascular (Speer et al., 2009), y la formación de la placa aterosclerótica y su desestabilización, causante de eventos como infarto agudo del miocardio y ACV (Grootaert y Bennett, 2021; Basatemur et al., 2019).

I.2. Prevención del cambio fenotípico de CMLV y manejo de la inflamación para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares

Debido a que el cambio de fenotipo de las CMLV está presente en el desarrollo de distintas patologías cardiovasculares, la prevención de la desdiferenciación y proliferación

de estas células se ha estudiado para evitar el remodelado vascular. Una aplicación de esta aproximación son el uso de *stents* liberadores de fármacos, como la rapamicina, para suprimir la reestenosis posterior a angioplastias coronarias (Martin et al., 2004). Sin embargo, hay limitado conocimiento sobre si los tratamientos utilizados para patologías cardiovasculares poseen un mecanismo para evitar el cambio fenotípico de las CMLV durante su desarrollo. Aún más relevante, a pesar del uso de terapias que incluyen antagonistas β -adrenérgicos, antiplaquetarios, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y fármacos hipolipidémicos, todavía existen grupos de pacientes con niveles normales de lípidos que presentan reincidencia de eventos cardiovasculares (Tsao et al., 2023; Riaz et al., 2019). Por este motivo, continúa siendo fundamental la investigación de nuevos blancos y terapias que complementen a las estrategias actuales, previniendo o reduciendo su aparición.

La inflamación es un posible objetivo de estudio para la creación de nuevos agentes terapéuticos para tratar estas patologías. A nivel sistémico, la elevación de citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-18 y TNF- α se ha asociado con un aumento del riesgo de sufrir enfermedades como la coronariopatía (Kaptoge et al., 2013). También, la mantención de niveles de proteína C reactiva de alta sensibilidad (hsCRP) superiores a 2,0 mg/L luego de 4 semanas posterior a la realización de una intervención percutánea coronaria, se ha asociado a un mayor riesgo de sufrir infarto del miocardio, nuevas intervenciones de revascularización y muerte por enfermedad cardíaca (Kalkman et al., 2018).

Además, se han realizado distintos ensayos basándose en la reducción de la inflamación a nivel sistémico para prevenir la aparición de nuevos eventos cardiovasculares. La administración oral de 0,5 mg de colchicina, inhibidor de la polimerización de tubulina, mostró una disminución en el riesgo de sufrir eventos cardiovasculares como muerte cardiovascular, IM, ACV e intervenciones de revascularización en pacientes con enfermedad coronaria (razón de riesgo 0,69) (Nidorf et al., 2020). Por otra parte, la aplicación de anticuerpos monoclonales anti IL-1 β , Canakinumab, en pacientes con antecedentes de IM y niveles de hsCRP superiores a 2,0 mg/L mostraron una disminución de las citoquinas proinflamatorias hsCRP e IL-6, con una reducción en el riesgo de sufrir IM no fatal, ACV no fatal y muerte cardiovascular (razón de riesgo 0,88) (Ridker et al., 2017). Sin embargo, ambos estudios presentaron efectos adversos importantes que incluyen la aparición de eventos gastrointestinales, náusea, diarrea, y neumonía para el uso de colchicina, y aumento de infecciones y muertes

asociadas a infecciones o sepsis para Canakinumab (Nidorf et al., 2020; Ridker et al., 2017). A pesar de los efectos secundarios estos ensayos refuerzan la existencia de una relación entre la inflamación y las enfermedades cardiovasculares, por lo que nuevos tratamientos que promuevan una modulación de la inflamación con una menor inhibición de la actividad del sistema inmune innato podrían ser nuevas alternativas.

Una de las moléculas moduladora de la respuesta inflamatoria es la IL-10. Esta citoquina antiinflamatoria es secretada por diversas células del sistema inmune adquirido, como linfocitos T helper 2, linfocitos T reguladores, linfocitos B; y células del sistema inmune innato, como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos (Saraiva y O'Garra, 2010). La unión de esta interleuquina a las dos subunidades que conforman su receptor, ubicado en la membrana de distintas células del sistema inmune genera un cambio conformacional que activa a Janus quinasa 1 y quinasa TYK2, complejo capaz de fosforilar al transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3). Una vez fosforilados, homodímeros de STAT3 se translocan al núcleo donde promueven la expresión de múltiples genes entre los que se encuentra la proteína 3 supresora de la señalización de citocinas, que inhibe a las quinasas de proteína quinasa activadas por mitógenos, necesarias para la traslocación de factor nuclear kappa B al núcleo. (Saxton et al., 2021; Williams et al., 2004; Schülke, 2018). Esta molécula también suprime la producción de citoquinas proinflamatorias gatilladas por receptores *Toll-like*, reduce la producción de citoquinas proinflamatorias en células presentadoras de antígenos, inhibe tanto la activación como la proliferación de células T y estimula los procesos de diferenciación, supervivencia y producción de anticuerpos en las células B (Saxena et al., 2015). En los vasos sanguíneos esta interleuquina suprime la respuesta inflamatoria local durante procesos de aterogénesis, al reducir la infiltración y activación de macrófagos y células T liberadoras de citoquinas proinflamatorias que gatillan el cambio fenotípico de las CMLV y el remodelado vascular. Un estudio realizado por Verma et al. (2016) mostró que la administración de IL-10 en ratones que fueron sometidos a un daño en la arteria carótida induce la disminución de la hiperplasia de la íntima al promover la proliferación de células endoteliales, inhibir la adhesión de macrófagos a las células endoteliales y reducir la proliferación de las CMLV.

A la fecha, no existen ensayos clínicos de esta citoquina para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, la administración de IL-10 recombinante en humanos para el tratamiento de otras patologías que presentan aumento de la respuesta inmune no ha mostrado los resultados esperados. Si bien, los ensayos clínicos con IL-10

en psoriasis han tenido buenos resultados, en los ensayos para el tratamiento de enfermedad de Crohn (Colombel, 2001), esclerosis múltiple (Kwilasz et al., 2015) y artritis reumatoide (Bruijnen et al., 2018) han mostrado limitada efectividad. Estos resultados podrían ser atribuidos a la complejidad que posee la producción endógena de IL-10 en el organismo, donde grupos de células liberan esta molécula de vida media corta, causando elevaciones localizadas y temporales en distintos tejidos del cuerpo (Saxena et al., 2015). Por este motivo, estrategias que aumenten la disponibilidad de IL-10 a nivel de la pared vascular y que prevengan el cambio de fenotipo de las CMLV, podrían ser útiles como tratamiento en enfermedades cardiovasculares.

I.3. Vesículas extracelulares como tratamiento para enfermedades cardiovasculares

Una nueva estrategia para potenciar el efecto terapéutico de esta y otras moléculas son las vesículas extracelulares (VE). Estas nano-partículas corresponden a estructuras rodeadas por una bicapa lipídica que pueden contener y transportar proteínas, lípidos y ácidos nucleicos desde una célula a otra, y carecen de capacidad replicativa (de Abreu et al., 2020; Théry et al., 2018). Presentan gran heterogeneidad de tamaño, composición de membrana y cargas, y son una forma de comunicación celular ampliamente utilizada en todos los seres vivos, siendo mediadores entre las distintas células de los vasos sanguíneos en procesos fisiológicos y patológicos (de Abreu et al., 2020). De acuerdo con su biogénesis, estas estructuras suelen clasificarse en tres grandes grupos: un primer grupo son las microvesículas. Estas son partículas extracelulares con un diámetro entre los 50 y 1000 nm producidas a partir de la membrana plasmática por gemación hacia el medio extracelular. Un segundo grupo son los exosomas, con un tamaño aproximado entre 30 a 150 nm, originadas durante la maduración de cuerpos multivesiculares a endosomas por la invaginación de sus membranas plasmáticas, las que son liberadas al medio extracelular por exocitosis. Un tercer grupo son los cuerpos apoptóticos liberados por las células durante la muerte celular programada. Son un grupo de tamaños muy diversos que van de los 50 a los 5000 nm, y existe muy poca información respecto a sus cargas y funcionalidad (van Niel et al., 2018; Kakarla et al., 2020). Tanto los tamaños, como cargas y morfologías, pueden ser compartidos por estos tres grupos de VE.

Actualmente, debido a la complejidad para determinar la biogénesis y en ausencia

de marcadores definitivos para para cada tipo de partícula extracelular, se sugiere el uso de términos operacionales para su nomenclatura. Estos términos se refieren a las condiciones bajo las cuales son liberadas (condiciones de hipoxia o limitación de suero), el tipo celular del cual se liberan (como VE liberadas por células cancerosas u oncosomas), su composición bioquímica (como VE CD81+ y CD63+) y sus propiedades físicas (Théry et al., 2018). Bajo este último criterio, las VE son denominadas como medianas o grandes cuando su diámetro es superior a 200 nm, mientras que aquellas con diámetro inferior como VE pequeñas (VEP) (van Niel et al., 2018; Théry et al., 2018).

La producción, secreción y contenido de estas estructuras de las VE está determinada por el estado fisiológico, el tipo de la célula de origen y estímulos exógenos a las cuales está expuesta la célula, siendo estos factores los que determinan su función (Wiklander et al., 2019). Las VE provenientes de células progenitoras, somáticas y madres, poseen una capacidad innata para la regeneración de tejido, mostrando efectividad en modelos de IM y heridas crónicas (de Abreu et al., 2020). Parte de esta actividad estaría determinada por la presencia de IL-10, siendo observado que ratones con *knock out* para esta molécula exhiben VE pequeñas de células progenitoras endoteliales con reducción de la capacidad regenerativa de tejidos cardíacos posterior a un evento isquémico (Yue et al., 2020).

Las células endoteliales también han mostrado indicios de capacidad protectora frente a patologías cardiovasculares por medio de la prevención del cambio fenotípico de las CMLV. Por ejemplo, la secreción de VE pequeñas de células endoteliales sometidas a estrés de flujo, llevan cargas ateroprotectoras, miARN 143 y 145, que suprimen a los ARN mensajeros KLF4 y Elk1 que median la desdiferenciación de las CMLV (Hergenreider et al., 2012). Otro ejemplo, son las VEP de células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC), que han mostrado un efecto inhibitorio en la migración de CMLV de rata, línea A7r5, por citoquina proinflamatoria TNF- α , evaluado en un ensayo de cierre de herida (Zúñiga, 2022). A pesar de la creciente evidencia sobre la relación entre el fenotipo de CMLVs y VE en el desarrollo de patologías cardiovasculares, como hipertensión y restenosis, poco se ha explorado respecto al uso de estas estructuras como agentes terapéuticos en estas enfermedades (de Abreu et al., 2020). En consecuencia, es relevante ampliar la búsqueda de estrategias que utilicen el potencial de las VE, para la prevención de un fenotipo secretor dentro de las CMLVs.

Además de la actividad intrínseca de las VE de diferentes orígenes es posible aumentar su bioactividad, estabilidad, eficacia en la direccionalidad de su blanco, su biodisponibilidad, por medio de bioingeniería (de Abreu et al., 2020; Wiklander et al., 2019). Entre los mecanismos de potenciación de las VE se encuentran la inclusión de cargos a las VE secretadas mediante técnicas de permeabilización o carga exógena, y manipulación de las células secretoras de VE durante su cultivo o carga endógena. En esta segunda estrategia se utilizan modificaciones al medio de cultivo como el sometimiento a condiciones de estrés; como hipoxia, inflamación o privación de suero, o la exposición a moléculas exógenas (de Abreu et al., 2020; Wiklander et al., 2019).

Si bien la molécula antiinflamatoria IL-10 ha demostrado ser requerida para entregar propiedades regenerativas en VE de células endoteliales (Yue et al., 2020), es desconocido hasta la fecha, si es posible utilizar esta citoquina antiinflamatoria para potenciar la actividad protectora de VE de células endoteliales por medio de carga endógena. El estudio realizado por Zúñiga (2022), mostró que el tratamiento con VE producidas por HUVEC bajo estimulación de IL-10 por 24 horas a células CMLV A7r5 tiene una actividad similar a las producidas por HUVEC en estado basal en un ensayo de cierre de heridas pretratadas con TNF- α . A pesar de lo sugerido en este ensayo, no se han evaluado las posibles diferencias que podrían presentar un tratamiento preventivo con VEP producidas bajo la estimulación con esta citoquina con aquellas producidas sin este estímulo en los marcadores de diferenciación de CMLV luego de la exposición a un inductor de desdiferenciación. Tampoco se ha explorado si una concentración de IL-10 más elevada podría aumentar la efectividad de las VE de células endoteliales en la prevención de un cambio a un fenotipo migratorio en las CMLV inducido por TNF- α .

Por este motivo, este proyecto buscó evaluar el efecto de las VEP de células endoteliales tratadas con IL-10 en la prevención del cambio fenotípico de las CMLV, desde un fenotipo contráctil a uno desdiferenciado, proliferativo y secretor, inducido por un agente proinflamatorio como TNF- α . Adicionalmente, se buscó evaluar la factibilidad de potenciar su efecto terapéutico por medio de la estimulación de células endoteliales con IL-10.

II. Hipótesis

Las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de células endoteliales estimuladas con interleuquina-10 previenen la desdiferenciación de células musculares lisas vasculares A7r5 inducida por TNF- α .

III. Objetivo general y objetivos específicos

El objetivo general de este proyecto fue evaluar si el tratamiento con vesículas extracelulares pequeñas provenientes de células endoteliales estimuladas con interleuquina-10 previenen la inducción del fenotipo desdiferenciado y migratorio de células A7r5 gatillada por TNF- α .

Los objetivos específicos del presente proyecto fueron:

1. Estudiar el efecto de las vesículas extracelulares aisladas de células endoteliales estimuladas con interleuquina 10 en los niveles de proteínas contráctiles en células musculares lisas vasculares A7r5 tratadas con TNF- α .
2. Evaluar el efecto de las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de células endoteliales estimuladas con interleuquina 10 sobre la migración de las células musculares lisas vasculares A7r5 inducida por TNF- α .

IV. Materiales y métodos

IV.1. Cultivo celular

Se utilizó como modelo de CMLV la línea de aorta de rata A7r5 (ATCC, CRL-1444), y para la producción de VE endoteliales se trabajó con HUVEC (Lonza, C2519A). Ambos cultivos se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, siendo usados entre los pasajes 3-10 con el fin de evitar que las células alcancen la senescencia. Se utilizó el Medio de Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 2 mM de glutamina y suero fetal bovino (SFB) al 10% para mantener a las células A7r5, mientras que las HUVEC se cultivaron en medio especial suplementado para células endoteliales EGM-2 (EGM) BulletKit (Lonza, CC-3162). Para la realización de los pasajes celulares en A7r5 y HUVECs se utilizaron tripsina y acutasa (Sigma-Aldrich, A6964), respectivamente.

El aislamiento de VE de células endoteliales y los ensayos para evaluar el efecto en el fenotipo desdiferenciado de células A7r5 inducido por TNF- α 10 ng/mL, se realizaron luego que los cultivos alcanzarán una confluencia entre el 80% y 90%. Para el ensayo de cierre de herida, las células A7r5 se sembraron en placas de 60 mm, mientras que para la producción de VE se utilizaron frascos T75 con filtro. Con un periodo de 24 horas previas a la estimulación de CMLV con TNF- α o amortiguador fosfato salino (PBS) 1X, el medio DMEM al 10% de SFB se reemplazó por un medio DMEM suplementado al 2% de SFB.

IV.2. Producción, aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares

Las células endoteliales fueron sembradas en 3 frascos T75 con filtro hasta alcanzar una confluencia aproximada del 80%. Alcanzada esta confluencia, las células se estimularon con 20 ng/mL de IL-10, 60 ng/mL de IL-10 o PBS 1X por 24 horas. Para eliminar la presencia de otro tipo de vesículas extracelulares producidas anteriores a la estimulación e IL-10 en el medio de cultivo, transcurrido este periodo se eliminó el medio con el estímulo y se mantuvo a las células en un suero depletado de VE por 24 horas. Posteriormente, utilizando tubos de centrifuga de 50 mL los medios de cada frasco fueron recolectados.

Con la finalidad aislar VEP, se realizó la siguiente serie de centrifugaciones a una temperatura de 4°C a los medios de cultivo recolectados: 300 x g por 10 minutos para eliminar células vivas, 2000 x g por 10 minutos para eliminar células muertas y 10000 x g por 30 minutos para reducir otros tipos de VE, como microvesículas y cuerpos apoptóticos en las muestras. Posteriormente, para aumentar la concentración de VEP en las muestras, el sobrenadante obtenido se centrifugó en tubos con filtros Amicon (Merck, UFC901096D) durante 90 minutos a 5000 x g y 4°C, obteniéndose un volumen aproximado de 500 μ L de solución enriquecida en VEP. Posteriormente, se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna qEV (IZON, ICO-70), recuperándose 9 fracciones de 500 μ L. Las tres primeras fracciones fueron fusionadas y alícuotadas para su posterior caracterización, siendo estas escogidas por su mayor concentración de VEP. Todas las fracciones se almacenaron a -80°C hasta su caracterización.

Para la determinación de la concentración y del tamaño de las VEP se realizó un análisis de seguimiento de nanopartículas (ASN) utilizando un equipo NanoSight NS300 (Malvern Panalytical). En breve, se obtuvieron 3 videos de 30 segundos por medio de un microscopio óptico conectado a una cámara de video, en los que captaron la dispersión de

la luz generada por partículas en suspensión de la muestra al ser impactadas por un rayo láser. Los datos analizados corresponden al promedio de los tres videos.

IV.3. Obtención de las proteínas y ensayo Western blot

La determinación de cambios en el contenido de las proteínas contráctiles se determinó mediante ensayos de Western blot. Se sembraron placas de 60 mm con células de la línea A7r5 y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego se reemplazó el medio de cultivo con un medio DMEM al 2% de SFB durante 24 horas. Posteriormente, se realizó un pretratamiento por 30 minutos con 1×10^8 partículas/mL de VEP provenientes de HUVEC estimuladas con IL-10 20 ng/mL, VEP de HUVEC estimuladas con solución control de PBS 1X o PBS 1X, añadiéndose 10 μ M de bromodesoxiuridina para inhibir la proliferación celular. Posteriormente, se expuso a TNF- α 10 ng/mL o PBS 1X por 24 horas. Finalizado este tiempo se rotuló y almacenó a -20° cada una de las placas.

La lisis de las células se realizó en hielo con el amortiguador para análisis de radioinmunoprecipitación (RIPA) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasas (Roche) y un raspador de células, para lisar mecánicamente. El contenido de cada placa se almacenó en un tubo de polipropileno para centrifuga de 1,5 mL. Luego, las muestras se sometieron a sonicación por 5 minutos a una temperatura inferior a 7°C , seguida de una centrifugación a 14000 rpm a 4°C por 15 minutos. El sobrenadante de las muestras fue recuperado y almacenado hasta su cuantificación a -20°C .

Para la cuantificación de las proteínas se utilizó el método colorimétrico de ácido bicinconínico. Brevemente, en una microplaca de 96 pocillos se añadió a cada pocillo 1 μ L de las muestras, amortiguador RIPA como blanco o soluciones de la curva estándar de suero de albúmina bovina con 200 μ L de una preparación realizada con la solución BCA A y solución BCA B del Kit de ensayo de proteínas BCA de microplacas Pierce (Thermo Scientific, 23252) a una proporción 1:50. A continuación, la microplaca fue llevada a una estufa a 50°C durante 1 hora. La obtención de las absorbancias de cada uno de los pocillos se realizó por medio de un lector de microplacas (Promega) a una longitud de onda de 560 nm.

Con el fin de denaturar las proteínas presentes en las muestras, se adicionó amortiguador de carga 4X y se les sometió durante 5 minutos a 95°C. La separación de proteínas se realizó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% durante 100 minutos a un voltaje constante de 100 voltios, adicionando 10 µg de proteínas a cada bolsillo. Posteriormente, se realizó una transferencia semi-seca a las membranas de nitrocelulosa usando el sistema de transferencia Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, 1704150) a un amperaje constante de 2,5 amperes por 10 minutos. Luego, las membranas se bloquearon durante una hora con una solución al 5% de albúmina sérica bovina en amortiguador Tris salino 1X-Tween (TBST). Las membranas se incubaron durante la noche con los anticuerpos primarios contra SM22, α-SMA y calponina. Las concentraciones y detalles de los anticuerpos primarios utilizados se especifican en la Tabla 1.

Proteína	Peso molecular (kDa)	Especie de origen	Marca y número de catálogo	Dilución
SM22	22	Conejo	Abcam - ab14106	1:5000
Calponina	33	Conejo	Abcam - ab46794	1:36000
α-SMA	42	Ratón	Abcam - ab7817	1:150000
β-tubulina	55	Ratón	Sigma - T-0198	1:5000

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para ensayo Western blot.

Lista de anticuerpos utilizados durante los ensayos en la presente memoria de título. Se indican la proteína objetivo, el peso molecular de la proteína, la especie en la que se produjo, la marca y número de catálogo y la dilución usada.

Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBST por 5 minutos y se incubaron con anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo o ratón conjugados con peroxidasa de rábano, a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados con TBST por 5 minutos, seguido de lo cual se añadió por 1 minuto la solución con sustrato quimioluminiscente para Western blot EZ-ECL 1:1 a las membranas

con anticuerpos contra calponina y α -SMA, y solución de sustrato de máxima sensibilidad SuperSignalTM West Femto (Thermo Scientific, 34096) para las membranas con anticuerpos contra SM22. La detección de las bandas se realizó usando el equipo Odyssey Fc (LI-COR). El control de carga utilizado fue β -tubulina, siendo incubadas las membranas durante 1 hora con anticuerpo primario contra β -tubulina y secundario conjugado con peroxidasa de rabanito y, posterior a tres lavados por 5 minutos con TBST. Las membranas fueron reveladas con la solución sustrato quimioluminiscente para Western blot EZ- ECL utilizando el equipo señalado.

La determinación y digitalización de las bandas se realizó utilizando el software Image Studio 5.5.4 (LI-COR), mientras que la normalización por señal total, relativización por control de carga y normalización por el control se realizaron usando el programa Microsoft Excel.

IV.4. Ensayo de cierre de herida

Con el fin determinar si VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 tienen un impacto en el cambio a fenotipo migratorio de la línea A7r5 inducido por TNF- α se realizó un ensayo de cierre de heridas en placas de 60 mm. Una vez que las células llegaron a una confluencia del 90% el medio DMEM al 10% de SFB fue remplazado por medio al 2% de SFB, incubándose por 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego, se utilizó una punta de pipeta p200 para generar una herida en forma de línea recta que abarcó el diámetro de la placa. El medio presente durante la creación de la herida fue descartado y se adicionó medio DMEM al 2% de SFB.

A continuación, se expuso 1X10⁸ partículas/mL de VEP provenientes de HUVEC estimuladas con PBS, 1X10⁸ partículas/mL de VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 o una solución control de PBS 1X por 30 minutos como pretratamiento. Se utilizaron 10 μ M de bromodesoxiuridina para inhibir la proliferación celular en cada condición. Una vez finalizado el pretratamiento se estimularon las células con TNF- α 10 ng/mL o PBS 1X por 24 horas. Por medio de un microscopio de luz Leica LM500 (Leica Microsystems) se capturaron 5 imágenes en cada placa al momento de crear la herida y 5 transcurridas 24 horas. El procesamiento de áreas fue realizado en el programa ImageJ (National Institutes of Health). El porcentaje de cierre de herida fue calculado utilizando el promedio de las áreas sin presencia de células en las 5 imágenes.

IV.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando GraphPad Prism 8. Para evaluar datos bajo dos condiciones, posterior a una prueba de normalidad donde los datos presentaron una distribución normal, se utilizó la prueba t de Student de dos colas. Igualmente, para los datos obtenidos desde ensayos con más de dos condiciones se les realizó un test de normalidad y, luego de mostrar una distribución normal, se les aplicó un ANOVA de una vía y un post test de Tukey. Se consideraron valores $p < 0,5$ como significancia estadística y los datos se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (EEM).

V. Resultados

V.1. Aislamiento y caracterización de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC

Las vesículas extracelulares pequeñas (VEP) aisladas se produjeron en un medio de cultivo depletado de VE durante las 24 horas posteriores a la estimulación de la línea de HUVEC por 24 horas con 20 ng/mL de IL-10, o PBS 1X. El medio de cultivo celular con suero depletado de VE se utilizó para eliminar el estímulo de IL-10, al igual que VE generadas anterior a la estimulación. El aislamiento de las VEP se realizó por cromatografía de exclusión por tamaño, obteniéndose un preparado enriquecido de VEP conformado por la combinación de las tres primeras fracciones de la cromatografía.

Las VEP se evaluaron en el equipo NanoSight NS300 realizando un ASN para determinar su tamaño y concentración. En la Figura 1A se muestra que ambos grupos de preparaciones presentan una distribución de tamaño de partículas similar, con abundancia en partículas con diámetro entre los 50 nm y 200 nm, y ausencia de partículas con tamaño superior a 600 nm. Las partículas presentes en los concentrados de VEP producidas luego del estímulo con 20 ng/mL de IL-10 mostraron un tamaño modal promedio de 108,1 nm, mientras aquellos producidos con el control PBS 1X exhibieron un tamaño modal de 103,4 nm (Figura 1B). Respecto a la concentración de partículas promedio en el grupo de preparados enriquecidos con VEP de HUVEC estimuladas con IL-10, fue de $1,3 \times 10^9$ partículas/mL y para el grupo tratada con PBS 1X fue de 1×10^9 partículas/mL (Figura 1C).

La Figura 1A muestra que las partículas en los concentrados poseen un tamaño esperado para VEP, lo que sugiere que la metodología de aislamiento fue correctamente realizada. A la vez, las Figuras 1B y 1C muestra que el tamaño modal promedio y la concentración promedio no presentaron diferencias significativas entre ambos grupos de preparados. Estos resultados sugieren que tanto la producción como el tamaño modal de las VEP provenientes de HUVEC no serían afectadas por la exposición a 20 ng/mL de IL-10 por 24 horas.

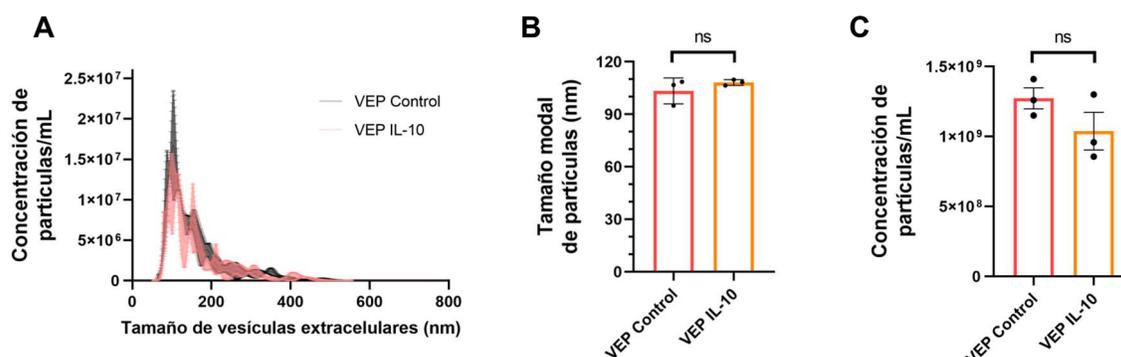


Figura 1. Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC.

Determinación de la A) distribución, B) tamaño modal y C) concentración de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC aisladas posterior a un estímulo de 24 horas con 20 ng/mL (VEP IL-10) o PBS (VEP Control). Los datos están expresados como promedio \pm EEM, $n=3$. Se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk y una prueba de t de Student, se consideraron valores $*p<0,05$ como significancia estadística, ns = no significativo.

V.2. Efectos de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC en los marcadores de diferenciación de células A7r5

Para determinar si el tratamiento con VEP aisladas de HUVEC producidas con y sin estimulación de IL-10 pueden prevenir la desdiferenciación de las células A7r5 inducida por TNF- α , se evaluaron los niveles de las proteínas contráctiles α -SMA, SM22 y calponina, marcadores de diferenciación de esta línea, por medio de ensayo de Western blot.

Las células A7r5 se incubaron en medio DMEM al 2% de SFB para sincronizar el metabolismo durante 24 horas, seguido de lo cual se realizó un pretratamiento por 30 minutos con 10 μ M de bromodesoxiuridina, inhibidor de proliferación celular, y 1×10^8 partículas/mL de VEP provenientes de HUVEC estimuladas con 20 ng/mL IL-10, 1×10^8 partículas/mL de VEP de HUVEC estimuladas con PBS 1X o una solución de PBS 1X como control. Posteriormente, las células fueron tratadas con TNF- α 10 ng/mL o PBS 1X por 24 horas.

La proteína contráctil α -SMA mostró una disminución significativa frente a la exposición con el inductor de desdiferenciación TNF- α en comparación a la condición control ($*p<0,05$). Ninguno de los pretratamientos con VEP de HUVEC previnieron la

disminución de la proteína frente al estímulo proinflamatorio (Figura 2A). Respecto a los niveles de marcador SM22, estos no mostraron diferencias luego de la exposición a TNF- α en relación con el control con PBS 1X, tampoco en los tratamientos previos con VEP de HUVEC estimuladas con IL-10, ni VEP de HUVEC en condición control (Figura 2B). De forma similar, no se observaron diferencias en los niveles de proteína calponina posterior a la exposición con TNF- α en relación con el control realizado en ausencia de VEP de HUVEC (Figura 2C). Sin embargo, en la Figura 2C se muestra que el pretratamiento por 30 minutos a VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 disminuyó los niveles de calponina respecto a control sin el estímulo proinflamatorio (* $p < 0,05$).

En conjunto, estos datos indicarían que los pretratamientos con ambos grupos de VEP de HUVEC, producidas con y sin estimulación de 20 ng/mL de IL-10, no tendrían un impacto en los marcadores de diferenciación de CMLV A7r5 frente a la exposición a TNF- α .

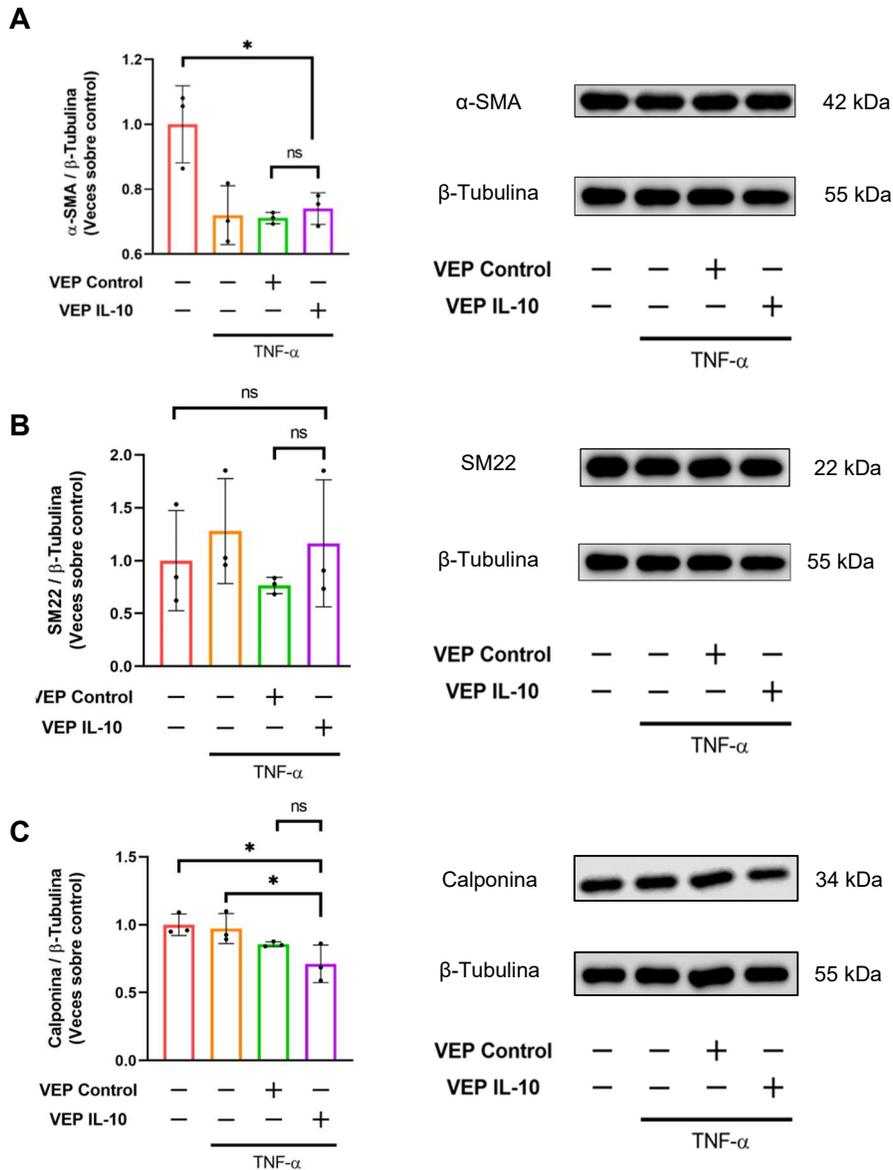


Figura 2. Efectos de la VEP de HUVEC en marcadores contráctiles en la desdiferenciación de células A7r5 inducida por TNF- α .

CMLV A7r5 fueron sometida a un pretratamiento por 24 horas con vesículas extracelulares pequeñas provenientes de HUVEC estimuladas con 20 ng/mL de IL-10 (VEP IL-10) o el control PBS 1X (VEP Control), seguida de una estimulación con el inductor de desdiferenciación TNF- α . Los niveles proteicos de (A) α -SMA, (B) SM22 y (C) calponina fueron determinados por ensayo Western blot, utilizando β -tubulina como control de carga. Se presentan los niveles de las proteínas como promedio \pm EEM, y Western blot representativo para cada proteína. $n=3$. Se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk y un ANOVA de una vía con post-test de Tukey. Se consideraron valores $*p<0,05$ como significancia estadística, ns = no significativo.

V.3. Efecto del aumento de concentración de IL-10 en la producción de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC

Con la finalidad de determinar si una mayor concentración de IL-10 impactaría en la producción y tamaño de VEP, adicionalmente a la producción de VEP en HUVEC con 20 ng/mL de IL-10, también se produjo VEP de HUVEC incubadas con una concentración de 60 ng/mL de IL-10. Simultáneamente, se preparó un control de VEP de HUVEC producidas en PBS 1X. Estas VEP se aislaron mediante una serie de centrifugaciones y una cromatografía de exclusión por tamaño a partir del medio de cultivo celular con suero depletado de VE en las 24 horas posteriores a la estimulación con IL-10.

Ambos concentrados en VEP se caracterizaron por medio de un ASN. Este análisis determinó que ambos grupos presentaron una distribución de tamaño similar, con una población mayoritaria de partículas entre los 50 y 200 nm, además de la presencia de partículas con diámetro mayor a 600 nm (Figura 3A). El tamaño modal promedio fue de 195,3 nm para el grupo de VEP producidas bajo el estímulo de IL-10, y para el grupo control con PBS 1X fue de 166,4 nm (Figura 3B). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos. En relación con la concentración promedio, se determinó que para los preparados de VEP IL-10 fue de $6,6 \times 10^8$ de partículas/mL, mientras que para el control esta fue de $9,9 \times 10^8$ partículas/mL (Figura 3C). No se presentaron diferencias significativas respecto a la concentración de ambas condiciones experimentales.

Los datos anteriores respecto a la caracterización de VEP sugieren que las partículas aisladas, en su mayoría, poseen los tamaños esperados para VEP y que una concentración de 60 ng/mL de IL-10 no produce cambios en la producción, ni el diámetro de las VEP generadas por células endoteliales.

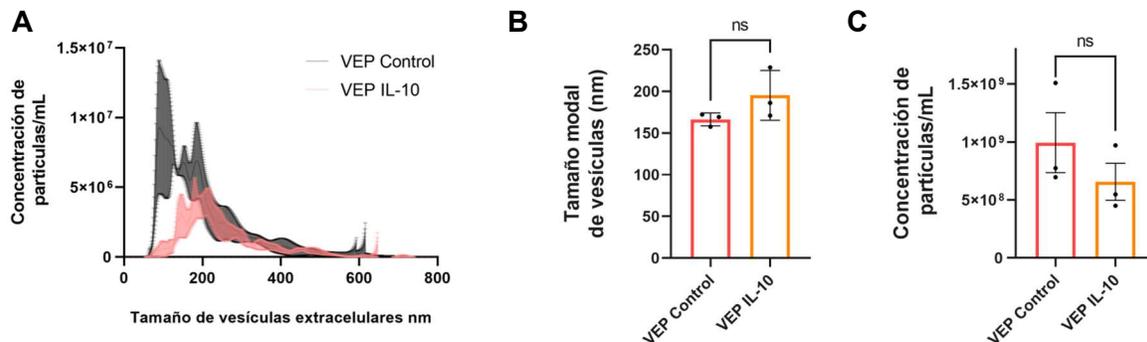


Figura 3. Caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC.

Determinación de la A) distribución, B) tamaño modal y C) concentración de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC aisladas posterior a un estímulo de 24 horas con 60 ng/mL (VEP IL-10) o PBS (VEP Control). Los datos están expresados como promedio \pm EEM, $n=3$. Se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk y una prueba de t de Student, se consideraron valores $*p<0,05$ como significancia estadística, ns = no significativo.

V.4. Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC en el fenotipo migratorio CMLV

Para determinar la capacidad preventiva de las VEP de HUVEC producidas con el estímulo de 60 ng/mL de IL-10 en el fenotipo migratorio de CMLV inducido por TNF- α , se llevó a cabo un ensayo de cierre de heridas. Se realizó una herida a una placa de 60 mm con una confluencia al 90% de A7r5, seguido de un pretratamiento con 1×10^8 partículas/mL de VEP de HUVEC estimuladas con 60 ng/mL de IL-10 o con el control PBS 1X por 30 minutos. Posteriormente, se adicionó 10 ng/mL de TNF- α -inductor del fenotipo- y se obtuvieron imágenes al inicio del ensayo y luego de 24 horas.

En la Figura 4 se evidencia una reducción significativa del porcentaje de cierre de heridas para los pretratamientos realizados con ambos grupos de VEP frente a la inducción con TNF- α , en niveles semejantes al control sin los pretratamientos. Los datos presentados en la Figura 4 indicarían que las VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 y las producidas sin estímulo tienen la capacidad de prevenir la migración de las células A7r5 inducida por TNF- α .

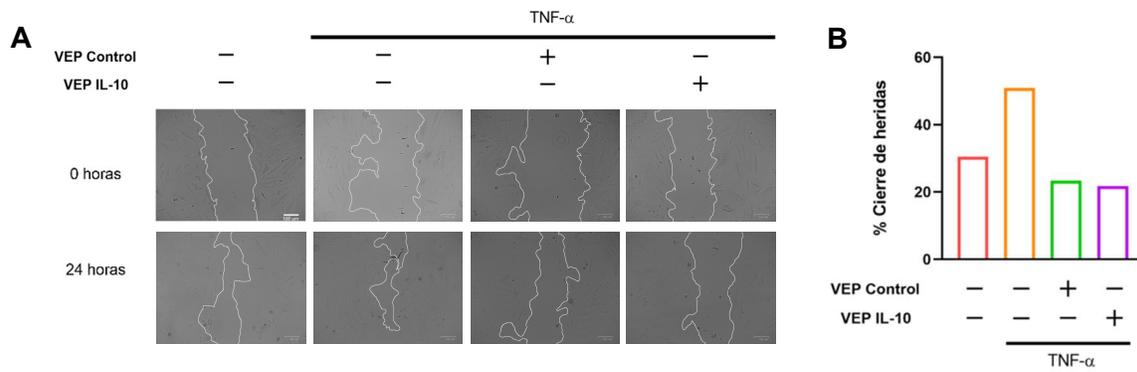


Figura 4. Efectos de VEP de HUVEC sobre el fenotipo migratorio de CMLV

A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de heridas y B) porcentaje de cierre de heridas de CMLV A7r5. Posterior a la realización de la herida, las células se pretrataron durante 30 minutos con 1×10^8 partículas/mL de VEP de HUVEC estimuladas con 60 ng/mL de IL-10 (VEP IL-10) o con el control PBS 1X (VEP Control) antes de añadir 10 ng/mL de TNF- α . Las imágenes fueron tomadas luego de realizar la herida (0 horas) y trascurridas 24 horas. No se realizó ningún análisis estadístico, $n=1$.

VI. Discusión

El presente trabajo tuvo por objetivo determinar si VEP generadas por células endoteliales HUVEC, posterior a una estimulación con la molécula antiinflamatoria IL-10, pueden generar un efecto preventivo en el cambio a un fenotipo migratorio de las CMLV. Los datos obtenidos acerca de la caracterización de VEP, distribución de tamaño, concentración y tamaño modal, indican que no hay diferencias significativas luego de estimular HUVECs con la molécula IL-10, bajo ninguna concentración usada. De igual manera, no se presentaron diferencias en la funcionalidad de VEP de HUVEC, producidas con y sin estimulación de IL-10, en la prevención de un fenotipo desdiferenciado y migratorio inducido por TNF- α , al no modificar los marcadores de fenotipo contráctil ni presentarse diferencias en el porcentaje de ensayos de cierre de heridas.

VI.1. Efectos de IL-10 sobre la producción, caracterización y funcionalidad de vesículas extracelulares pequeñas producidas por HUVEC

VI.1.a Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC estimuladas con IL-10

Para evaluar los efectos de IL-10 sobre la producción y tamaño de nanopartículas, VEP aisladas de HUVEC con una estimulación con 20 ng/mL de IL-10 y sin estimulación como control, se realizó un ASN en ambos grupos. Este análisis indicó que la distribución de los tamaños de sus nanopartículas fue similar, con una población principal de partículas con un diámetro entre los 50 nm y 200 nm. Respecto a los tamaños modales y las concentraciones, ambos grupos de VEP mostraron valores similares con tamaños entre 94,9 y 109,7 nm, y concentraciones entre $8,6 \times 10^8$ y $1,4 \times 10^9$ partículas/mL. Valores similares para la metodología de aislamiento utilizada fueron observados por Zúñiga (2022) (tamaños modales cerca de los 150 nm y concentraciones entre $6,6 \times 10^8$ y $1,3 \times 10^9$ de partículas/mL) y Herrera-Zelada et al. (2023).

Producto de la dificultad para determinar la biogénesis de estas partículas, conforme a lo señalado en *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018* (MISEV2018), en ausencia de ensayos que determinen la ruta de síntesis de las vesículas, durante el desarrollo de este trabajo se utilizó el término operacional de VEP. Lo anterior debido a que estas nanopartículas poseen un tamaño inferior a los 200 nm (Théry et al., 2018). A pesar

de las características de tamaño y concentración de partículas obtenidas por ASN, una limitación de este trabajo es la ausencia de técnicas que permitan la caracterización exhaustiva de las VE. Según lo recomendado por *International Society for Extracellular Vesicles* en MISEV2018, para la caracterización de VE es necesaria la identificación de una serie de marcadores proteicos de VE y la caracterización individual de vesículas por dos métodos complementarios distintos (Théry et al., 2018). Los marcadores deben ser: al menos una proteína asociada a la membrana (como tetraspaninas CD63 y CD81), una proteína citoplasmática encapsulada en las VE, con la capacidad de unirse a membrana (como complejos de clasificación endosomal requeridos para el transporte I, II y III), de incorporación promiscua (como tubulina o gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa) y baja cantidad de una molécula contaminante (como albumina), según las categorías 1, 2 y 3 de MISEV2018 para marcadores proteicos de EV, respectivamente. Adicionalmente, para el grupo de nanopartículas VEP se sugiere también la detección de un marcador de la categoría 4, una proteína soluble presente en otro compartimiento subcelular no endosomal, debido a que las VEP no se encuentran enriquecidas en estas proteínas, como lámina A o citocromo C (Théry et al., 2018). La evaluación de estos marcadores puede realizarse por técnicas como ensayo de inmunoadsorción enzimática, Western blot, o la detección por medio de una espectrometría de masas, al igual que por técnicas más modernas como citometría de flujo para partículas pequeñas (Théry et al., 2018; Shao et al., 2018).

Por otra parte, la caracterización individual de las VEP, realizada por un análisis basado en la propiedad de difracción de la luz de las vesículas o ASN, debería complementarse por medio de técnicas como microscopía de transmisión electrónica, microscopía electrónica de barrido o microscopía de fuerza atómica, para la captura de imágenes de alta resolución (Théry et al., 2018; Shao et al., 2018). Se espera que estas imágenes corroboren las características observadas por Zúñiga y Herrera-Zelada et al. (estructuras tipo “cup-shaped” y tamaño aproximado de 150 nm), ya que las VEP se obtuvieron y aislaron por técnicas similares, y por las semejanzas presentadas en distribución de tamaño, tamaño modal y concentración de partículas (Zúñiga, 2022; Herrera-Zelada et al., 2023).

Un aspecto interesante que destacar, es la presencia de poblaciones menores de partículas con tamaños superiores a 200 nm en las muestras analizadas por ASN. Esto debido a que a la fecha no existe ninguna técnica o conjunto de técnicas que permita un

aislamiento con alto rendimiento y especificidad, simultáneamente. Por esto, es únicamente posible obtener preparaciones enriquecidas de las VE de interés, que además poseen concentraciones minoritarias de proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otras nanopartículas de mayor tamaño, como microvesículas (Théry et al., 2018).

Durante este trabajo se escogieron técnicas de centrifugación y cromatografía de exclusión por tamaño. La primera técnica tiene como ventaja que es ampliamente usada y tiene protocolos definidos para el aislamiento de VEP. Sin embargo, requiere de largos periodos de tiempo y es laborioso (Davidson et al., 2022). La segunda técnica es relativamente económica, posee baja complejidad y es reproducible, permite separar partículas de menor tamaño de las VEP. Entre sus desventajas se encuentra el aislamiento de contaminantes de tamaño similar a las VE (Davidson et al., 2022). En conjunto, estas dos técnicas contribuyen a una mayor especificidad, al obtener soluciones ricas en VEP reducidas en contaminantes, y en otras VE de mayor tamaño, a pesar de tener un menor rendimiento (Théry et al., 2018). Este trabajo no examinó otras fracciones obtenidas desde la cromatografía de exclusión por tamaños, las que podrían entregar más información sobre posibles contaminantes y la identidad de las partículas de mayor diámetro mostradas en el ASN, siendo una limitante para este trabajo.

VI.1.b Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC sobre la desdiferenciación inducida por TNF- α

Dentro de los vasos sanguíneos, las células endoteliales presentes en la túnica íntima y las CMLV de la túnica media se encuentran en estrecha comunicación. Parte de esta estaría mediada por VE, tanto en procesos de carácter fisiológico como patológico (Hergenreider et al., 2012; de Abreu et al., 2020). Basándose en esta forma de comunicación y en antecedentes de efectos terapéuticos de VE de células endoteliales, este trabajo evaluó la actividad preventiva de VEP de HUVEC en el modelo de CMLV la línea celular A7r5 (Firulli et al., 1998).

Se realizó un pretratamiento por 30 minutos con 1×10^8 VEP de HUVEC, con y sin estimulación con 20 ng/mL de IL-10, y se evaluaron cambios en el contenido proteico de los marcadores de diferenciación de células A7r5 calponina, α -SMA y SM22, luego de 24 horas de estimulación con 10 ng/mL de TNF- α . En ninguno de los pretratamientos

realizados con VEP de HUVEC se previno la disminución de las proteínas contráctiles asociada a la exposición con TNF- α . Aún más, uno de los pretratamientos con VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 mostró una reducción de calponina frente al control sin TNF- α .

Esta citoquina proinflamatoria ha mostrado promover un fenotipo desdiferenciado y migratorio en A7r5 por un mecanismo que involucra autofagia (García-Miguel et al., 2018; Jia et al., 2006). Además, su elevación en pacientes con antecedentes de IM se asocia a un mayor riesgo de sufrir nuevos eventos cardiovasculares (Ridker et al., 2000; Kaptoge et al., 2013). Estudios anteriores que emplearon esta citoquina para evaluar desdiferenciación en A7r5, muestran resultados similares a lo observado en el presente trabajo. El estudio de García et al. (2016) indica que la exposición por 48 horas a 100 ng/mL de TNF- α en células A7r5, disminuye los niveles de las proteínas contráctiles calponina, α -SMA y SM22. Sin embargo, no se presentaron diferencias en los niveles de estos marcadores a las 24 horas (García, 2016). Por lo tanto, la ausencia de diferencias en los marcadores de diferenciación entre el control negativo y las distintas condiciones con TNF- α en este trabajo, podrían vincularse con una concentración inferior de TNF- α y/o tiempos de estimulación menores a las necesarios para observar un cambio en estos marcadores.

Debido a que el presente trabajo no puede descartar un efecto preventivo de VEP de HUVEC, producidas con y sin IL-10 en la desdiferenciación de células A7r5 sometidas a un estímulo proinflamatorio, se propone aumentar la concentraciones del estímulo proinflamatorio TNF- α (20, 50 o 100 ng/mL), al igual que incrementar el tiempo de exposición a este estímulo a 48 horas. De igual manera, también se sugiere el uso de otro agente desdiferenciador de CMLV, como la molécula PDGF-BB, un modulador del cambio fenotípico de VSMC, que ha demostrado un mayor efecto en el cambio fenotípico de A7r5 y en menores tiempos de estimulación que TNF- α (Salabei et al., 2013; García, 2016). Adicionalmente, este trabajo presenta otra limitación importante para definir un efecto preventivo de las VEP HUVEC en el cambio fenotípico de CMLV por un agente desdiferenciador, debido a que solamente evalúa proteínas contráctiles. Para superar esta limitación, se propone evaluar las tasas de proliferación celular por citometría de flujo y los niveles de expresión de colágeno I, marcador asociado a fenotipos secretores de CMLVs, por ensayos como Western blot o ELISA, de las células sometidas a un estímulo desdiferenciador (Kim y Sederstrom, 2015; García, 2016). Adicionalmente, y según lo señalado por ISEV en MISEV2018, con la finalidad de asociar correctamente los efectos de

VEP de IL-10 descartando la actividad de otras moléculas en solución, también debería ser evaluada la actividad de fracciones adicionales de la cromatografía de exclusión por tamaño (Théry et al., 2018).

En relación a la disminución de calponina, con los pretratamientos con VEP de HUVEC estimuladas con IL-10 frente al control negativo en ausencia de TNF- α , este resultado podría estar relacionado con el estado de los reactivos utilizados. Alternativamente, este cambio podría haber sido causado por las concentraciones utilizadas de TNF- α y los tiempos de exposición a esta molécula.

Otra posible causa de la ausencia de diferencias en la estimulación de HUVEC con IL-10, podría estar asociada a que esta molécula es capaz de modular la actividad de otros tipos celulares frente a estímulos dañinos, favoreciendo la mantención de un estado fisiológico en células endoteliales, lo que les permite la secreción de VE con propiedades terapéuticas. Anteriormente, se ha observado que la administración de IL-10 en aortas de ratones previene la disminución en la producción de óxido nítrico sintasa de tipo III al exponerse a TNF- α (Zemse et al., 2010). Por otro lado, la administración de 10 ng/mL de IL-10 acelera la recuperación del endotelio y la inhibición de hiperplasia en la íntima en aortas de ratón sometidos a denudación (Verma et al., 2016).

No obstante, pareciera que la actividad de IL-10 no estaría dada por cambios directos en las células endoteliales. En el estudio de Noble et al. (2000), la estimulación con concentraciones desde 10 ng/mL hasta 100 ng/mL de IL-10 en células endoteliales no previno el aumento de expresión de selectina E, molécula que permite la adhesión de neutrófilos, monocitos y células T a las células endoteliales, frente a una inducción por IL-1. La aplicación de diferentes concentraciones de IL-10, entre 0,1 a 100 ng/mL, en cocultivos de células endoteliales con monocitos redujo la expresión de selectina E inducida por IL-1. Un resultado similar fue observado por Zúñiga, donde la estimulación utilizando concentraciones de 20, 100 y 300 ng/mL de IL-10 a HUVEC senescentes no presentaron variación en los niveles de proteína selectina E (Zúñiga, 2022).

La molécula IL-10 es un conocido modulador de la respuesta inmune, teniendo un efecto inhibitorio en la síntesis de citoquinas como TNF- α , IL-1 α , IL-6 e IL-8, en monocitos y otras células presentadoras de antígenos, sumado a esto presenta una disminución en la expresión de moléculas de adhesión como selectina E en células endoteliales en presencia de otros tipos celulares como monocitos (Saraiva et al., 2020; Noble et al., 2000). En

conjunto esto podría ser sugerente de que la actividad de IL-10 no afecta directamente a las células endoteliales, sino que reduciría la inflamación en la pared vascular, evitando un cambio patológico en las células endoteliales y en las características de sus VE (Herrera-Zelada et al., 2023).

Por este motivo, puede que el uso de nuevas estrategias enfocadas a aumentar los niveles de IL-10 dentro del ambiente vascular podrían ser más efectivas que las VE en las células endoteliales estimuladas con IL-10.

VI.2. Efectos de IL-10 en la producción, características físicas y funcionalidad de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC

VI.2.a Aislamiento y caracterización de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC bajo estimulación con IL-10

Con la finalidad de determinar si la ausencia de diferencias entre la concentración, tamaño modal y funcionalidad de las VEP, producidas luego de la estimulación con IL-10 y aquellas sin el estímulo, adicionalmente al estímulo con 20 ng/mL de IL-10, se realizó un aislamiento de VEP de HUVEC estimuladas con una mayor concentración de IL-10, con su respectivo control. Las VEP aisladas de HUVEC con un estímulo de 60 ng/mL de IL-10 no mostraron diferencias a las VEP de HUVEC control sin estímulo antiinflamatorio en su distribución de tamaño, ni tamaño modal (195,3 – 166,4 nm), ni concentración ($6,6 \times 10^8$ - $9,9 \times 10^8$ partículas/mL). Mientras que las concentraciones de VEP producidas a 60 ng/mL, y su respectivo control, son similares a lo observado en las VEP producidas por HUVEC con una estimulación de 20 ng/mL, y lo reportado en otros trabajos que utilizan las mismas técnicas aislamiento, se observa una diferencia significativa en el tamaño modal de estas VEP (Zúñiga, 2022; Herrera-Zelada et al., 2023).

Las VEP aisladas de HUVEC, estimuladas con 60 ng/mL de IL-10 y sus controles, presentaron un mayor tamaño modal (Anexo 1A), al igual que una tendencia a la disminución de la concentración de partículas extracelulares, en comparación a las VEP producidas con un estímulo de 20 ng/mL (Anexo 1B). Las diferencias presentadas pueden ser atribuidas a las condiciones de almacenamientos de las VEP aisladas a 60 ng/mL. Este grupo de VEP con sus respectivos controles fueron almacenados a -80°C durante un periodo superior a 6 meses. Anteriormente, han sido reportados un aumento del diámetro

de partícula y una disminución de la concentración de VE aisladas y almacenadas a -80°C , luego de un periodo de 6 meses (Gelibter et al., 2022). Estos efectos han sido atribuidos a la fusión de las membranas que conforman las VE. Producto de rupturas por los microcristales formados durante el proceso de congelado, parte del contenido puede ser liberado, permitiendo la asociación de membranas que conforman las VE (Gelibter et al., 2022). De igual forma, este proceso también explicaría las poblaciones de tamaños superiores a 600 nm registradas por el ASN y un posible aumento de contaminantes en las muestras. De acuerdo con señalado en MISEV2018, se recomienda la captura de imágenes por medio de técnicas como microscopía electrónica, corroborar los tamaños modales obtenidos por ASN, al igual que la detección de distintas proteínas (categorías 1, 2, 3 y 4) y contaminantes en las muestras (Théry et al., 2018). También se recomienda, para mantener las características de las VEP en estudios posteriores, el almacenamiento de los medios de cultivo frente al almacenamiento de las VE aisladas, producto de que estos ambientes parecieran tener un efecto protector (Wright et al., 2022).

Adicionalmente, a pesar de que concentraciones mayores de IL-10 podría impactar en las características de las VE producidas por HUVEC, la estimulación con concentraciones elevadas de IL-10 se han visto implicadas en la muerte celular de HUVEC realizados por Zúñiga (2022), mientras que a nivel fisiológico existen indicios de que el aumento de IL-10 circulante podría contribuir a la apoptosis de células endoteliales en sepsis (Xie et al., 2021).

VI.2.b Efectos de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC sobre el fenotipo migratorio de células A7r5

Para evaluar la funcionalidad de las VEP producidas con 60 ng/mL de IL-10 se realizó un ensayo de cierre de heridas, utilizando 10 ng/mL de TNF- α y una duración de 24 horas. El porcentaje de cierre de heridas mostró una tendencia de disminuir frente al pretratamiento por 30 minutos con 10^8 de partículas/mL de VEP, producidas con y sin el estímulo de IL-10. Sin embargo, es una aproximación preliminar por cuanto se trata de un $n=1$.

Los resultados obtenidos en este ensayo, además, son similares a los observados por Zúñiga (2022) para VEP de HUVEC producidas con 20 ng/mL de IL-10, donde se muestra una disminución de la migración de células A7r5 inducida por TNF- α con un

pretratamiento de 30 minutos con estas VEP. En conjunto, estos estudios indican que concentraciones mayores de IL-10 no estarían relacionadas a un aumento de las propiedades preventivas de VEP en el cambio de fenotipo de las células A7r5.

Sin embargo, se sugiere complementar estos ensayos de migración con la aplicación de otros tipos de técnicas que evalúen la migración celular de las células A7r5, siendo un ejemplo un ensayo de migración por cámaras de Transwell, así como también confirmar los resultados utilizando otro estímulo desdiferenciador, como PDGF-BB (García, 2016). Adicionalmente, y según lo señalado por ISEV en MISEV2018, con la finalidad de asociar correctamente los efectos de VEP producidas bajo la estimulación de IL-10 descartando la actividad de otras poblaciones de VE más grandes, también deberían ser evaluadas las actividades de fracciones adicionales de la cromatografía de exclusión por tamaño (Théry et al., 2018).

VII. Conclusiones

Durante el presente trabajo se buscó determinar si la estimulación con IL-10 de HUVEC aumentaría la actividad preventiva de las VEP sobre el cambio de fenotipo en CMLV expuesto a una molécula de carácter proinflamatorio como TNF- α . Según los datos exhibidos durante esta memoria y respecto a lo contrastado con la literatura disponible, las conclusiones de este trabajo son:

- La estimulación con concentraciones de 20 ng/mL y 60 ng/mL por 24 horas de IL-10 no afecta la producción ni el tamaño de VEP en HUVEC.
- Los pretratamientos con 10^8 partículas/mL de VEP aisladas de HUVEC con y sin estimulación de 20 ng/mL de IL-10 no muestran un efecto preventivo en la desdiferenciación de A7r5 inducida por TNF- α .
- Los pretratamientos con 10^8 partículas/mL VEP aisladas de HUVEC con y sin estimulación de 60 ng/mL de IL-10 muestran una tendencia hacia la reducción en la migración celular de A7r5 expuestas a TNF- α .

Finalmente, en base a lo presentado en el presente trabajo se determina que las vesículas extracelulares pequeñas provenientes de células endoteliales estimuladas con interleuquina-10 no previenen la desdiferenciación de células musculares lisas vasculares A7r5 inducida por TNF- α .

VIII. Bibliografía

Basatemur, G. L., Jørgensen, H. F., Clarke, M. C. H., Bennett, M. R., y Mallat, Z. (2019). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Nature Reviews Cardiology*, 16(12), 727-744. <https://doi.org/10.1038/s41569-019-0227-9>

Bruijnen, S. T. G., Chandrupatla, D. M. S. H., Giovanonni, L., Neri, D., Vugts, D. J., Huisman, M. C., Hoekstra, O. S., Musters, R. J. P., Lammertsma, A. A., van Dongen, G. A. M. S., Jansen, G., Molthoff, C. F. M., y van der Laken, C. J. (2018). F8-IL10: A new potential antirheumatic drug evaluated by a PET-guided translational approach. *Molecular Pharmaceutics*, 16(1), 273–281. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00982>

Cao, G., Xuan, X., Li, Y., Hu, J., Zhang, R., Jin, H., y Dong, H. (2023). Single-cell RNA sequencing reveals the vascular smooth muscle cell phenotypic landscape in aortic aneurysm. *Cell Communication and Signaling*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01120-5>

Colombel, J.-F. (2001). Interleukin 10 (Tenovil) in the prevention of postoperative recurrence of crohn's disease. *Gut*, 49(1), 42–46. <https://doi.org/10.1136/gut.49.1.42>

Davidson, S. M., Boulanger, C. M., Aikawa, E., Badimon, L., Barile, L., Binder, C. J., Brisson, A., Buzas, E., Emanuelli, C., Jansen, F., Katsur, M., Lacroix, R., Lim, S. K., Mackman, N., Mayr, M., Menasché, P., Nieuwland, R., Sahoo, S., Takov, K., ... Sluijter, J. P. (2022). Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies: From exosomes to microvesicles. *Cardiovascular Research*, 119(1), 45–63. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvac031>

de Abreu, R. C., Fernandes, H., da Costa Martins, P. A., Sahoo, S., Emanuelli, C., y Ferreira, L. (2020). Native and bioengineered extracellular vesicles for cardiovascular therapeutics. *Nature Reviews Cardiology*, 17(11), 685-697. <https://doi.org/10.1038/s41569-020-0389-5>

Departamento de Estadísticas de Información de Salud (DEIS). (2021). *Defunciones por Causa 2021-2024 CIFRAS PRELIMINARES*. [Conjunto de datos]. En Datos abiertos. https://repositoriodeis.minsal.cl/DatosAbiertos/VITALES/DEFUNCIONES_FUENTE_DEIS_2021_2024_13012024.zip

Du, K. L., Ip, H. S., Li, J., Chen, M., Dandre, F., Yu, W., Lu, M. M., Owens, G. K., y Parmacek,

M. S. (2003). Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cell differentiation. *Molecular and Cellular Biology*, 23(7), 2425–2437. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.7.2425-2437.2003>

Firulli, A. B., Han, D., Kelly-Roloff, L., Koteliansky, V. E., Schwartz, S. M., Olson, E. N., y Miano, J. M. (1998). A comparative molecular analysis of four rat smooth muscle cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 34(3), 217–226. <https://doi.org/10.1007/s11626-998-0127-5>

García Miguel, M. (2016). Participación de la autofagia en la inducción del fenotipo sintético por TNF-[alfa] en células musculares lisas vasculares. [Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de Doctora en Bioquímica, Universidad de Chile]. Repositorio Académico de la Universidad de Chile. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/140696>

García-Miguel, M., Riquelme, J. A., Norambuena-Soto, I., Morales, P. E., Sanhueza-Olivares, F., Nuñez-Soto, C., Mondaca-Ruff, D., Cancino-Arenas, N., San Martín, A., y Chiong, M. (2018). Autophagy mediates tumor necrosis factor- α -induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7R5 cell line. *PLOS ONE*, 13(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0197210>

Gelibter, S., Marostica, G., Mandelli, A., Siciliani, S., Podini, P., Finardi, A., y Furlan, R. (2022). The impact of storage on extracellular vesicles: A systematic study. *Journal of Extracellular Vesicles*, 11(2). <https://doi.org/10.1002/jev2.12162>

Grootaert, M. O. J., y Bennett, M. R. (2021). Vascular smooth muscle cells in atherosclerosis: time for a re-assessment. *Cardiovascular Research*, 117(11), 2326-2339. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvab046>

Hergenreider, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J. G., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., Frangakis, A. S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R. A., y Dimmeler, S. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14(3), 249-256. <https://doi.org/10.1038/ncb2441>

Herrera-Zelada, N., Zúñiga-Cuevas, Ú., Ramírez-Reyes, A., Norambuena-Soto, I., Venegas-Zamora, L., Troncoso, M. F., Hernández, A., Sánchez, G., Pedrozo, Z.,

Lavandero, S., y Riquelme, J. A. (2023). Endothelial activation impairs the function of small extracellular vesicles. *Frontiers in Pharmacology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1143888>

Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). (2020). Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Cause of death or injury [Conjunto de datos]. En *Global Burden of Disease Collaborative Network*. <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results?params=gbd-api-2019-permalink/26dfc6b9f6520b1bbdbff2943352d791>

Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D. M., y Agrawal, D. K. (2006). Insulin-like growth factor-1 and tnf- α regulate autophagy through c-jun n-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunology & Cell Biology*, 84(5), 448–454. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2006.01454.x>

Kakarla, R., Hur, J., Kim, Y. J., Kim, J., y Chwae, Y. J. (2020). Apoptotic cell-derived exosomes: messages from dying cells. *Experimental & molecular medicine*, 52(1), 1–6. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0362-8>

Kalkman, D. N., Aquino, M., Claessen, B. E., Baber, U., Guedeney, P., Sorrentino, S., Vogel, B., de Winter, R. J., Sweeny, J., Kovacic, J. C., Shah, S., Vijay, P., Barman, N., Kini, A., Sharma, S., Dangas, G. D., y Mehran, R. (2018). Residual inflammatory risk and the impact on clinical outcomes in patients after percutaneous coronary interventions. *European Heart Journal*, 39(46), 4101–4108. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy633>

Kaptoge, S., Seshasai, S. R. K., Gao, P., Freitag, D. F., Butterworth, A. S., Borglykke, A., Di Angelantonio, E., Gudnason, V., Rumley, A., Lowe, G. D., Jørgensen, T., y Danesh, J. (2013). Inflammatory cytokines and risk of coronary heart disease: new prospective study and updated meta-analysis. *European Heart Journal*, 35(9), 578-589. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs367>

Kim, K. H., y Sederstrom, J. M. (2015). Assaying cell cycle status using flow cytometry. *Current Protocols in Molecular Biology*, 111(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2806s111>

Kwilasz, A. J., Grace, P. M., Serbedzija, P., Maier, S. F., y Watkins, L. R. (2015). The therapeutic potential of interleukin-10 in neuroimmune diseases. *Neuropharmacology*, 96, 55–69. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.10.020>

Manderson, J. A., Mosse, P. R., Safstrom, J. A., Young, S. B., y Campbell, G. R. (1989). Balloon catheter injury to rabbit carotid artery. I. Changes in smooth muscle phenotype. *Arteriosclerosis: An Official Journal of the American Heart Association, Inc.*, 9(3), 289–298. <https://doi.org/10.1161/01.atv.9.3.289>

Martin, K. A., Rzucidlo, E. M., Merenick, B. L., Fingar, D. C., Brown, D. J., Wagner, R. J., y Powell, R. J. (2004). The mTOR/P70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(3). <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00201.2003>

Nidorf, S. M., Fiolet, A. T. L., Mosterd, A., Eikelboom, J. W., Schut, A., Opstal, T. S. J., The, S. H. K., Xu, X.-F., Ireland, M. A., Lenderink, T., Latchem, D., Hoogslag, P., Jerzewski, A., Nierop, P., Whelan, A., Hendriks, R., Swart, H., Schaap, J., Kuijper, A. F. M., ... Thompson, P. L. (2020). Colchicine in patients with chronic coronary disease. *New England Journal of Medicine*, 383, (19), 1838–1847. <https://doi.org/10.1056/nejmoa2021372>

Noble, K. E., Harkness, D., y Yong, K. L. (2000). Interleukin 10 regulates cellular responses in monocyte/endothelial cell co-cultures. *British journal of haematology*, 108(3), 497–504. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.2000.01925.x>

Owens, G. K., Kumar, M. S., y Wamhoff, B. R. (2004). Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiological Reviews*, 84(3), 767–801. <https://doi.org/10.1152/physrev.00041.2003>

Riaz, H., Khan, S. U., Lateef, N., Talluri, S., Khan, M. S., y Desai, M. Y. (2019). Residual inflammatory risk after contemporary lipid lowering therapy. *European Heart Journal - Quality of Care and Clinical Outcomes*, 6(2), 105–111. <https://doi.org/10.1093/ehjqcco/qcz055>

Ridker, P. M., Everett, B. M., Thuren, T., MacFadyen, J. G., Chang, W. H., Ballantyne, C., Fonseca, F., Nicolau, J., Koenig, W., Anker, S. D., Kastelein, J. J. P., Cornel, J. H., Pais, P., Pella, D., Genest, J., Cifkova, R., Lorenzatti, A., Forster, T., Kobalava, Z., ... Glynn, R. J. (2017). Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease. *New England Journal of Medicine*, 377(12), 1119–1131. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1707914>

Ridker, P. M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., y Braunwald, E. (2000). Elevation of tumor necrosis factor- α and increased risk of recurrent coronary events after myocardial

infarction. *Circulation*, 101(18), 2149–2153. <https://doi.org/10.1161/01.cir.101.18.2149>

Salabei, J. K., Cummins, T. D., Singh, M., Jones, S. P., Bhatnagar, A., y Hill, B. G. (2013). PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochemical Journal*, 451(3), 375–388. <https://doi.org/10.1042/bj20121344>

Saraiva, M., Vieira, P., y O'Garra, A. (2020). Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *The Journal of experimental medicine*, 217(1), e20190418. <https://doi.org/10.1084/jem.20190418>

Saraiva, M., y O'Garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature Reviews Immunology*, 10(3), 170–181. <https://doi.org/10.1038/nri2711>

Saxena, A., Khosraviani, S., Noel, S., Mohan, D., Donner, T., y Hamad, A. R. A. (2015). Interleukin-10 paradox: A potent immunoregulatory cytokine that has been difficult to harness for immunotherapy. *Cytokine*, 74(1), 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2014.10.031>

Saxton, R. A., Tsutsumi, N., Su, L. L., Abhiraman, G. C., Mohan, K., Henneberg, L. T., Aduri, N. G., Gati, C., y Garcia, K. C. (2021). Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*, 371(6535). <https://doi.org/10.1126/science.abc8433>

Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in Immunology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00455>

Shao, H., Im, H., Castro, C. M., Breakefield, X., Weissleder, R., y Lee, H. (2018). New technologies for analysis of extracellular vesicles. *Chemical Reviews*, 118(4), 1917–1950. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00534>

Sheikh, A. Q., Misra, A., Rosas, I. O., Adams, R. H., y Greif, D. M. (2015). Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Science Translational Medicine*, 7(308). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa9712>

Speer, M. Y., Yang, H.-Y., Brabb, T., Leaf, E., Look, A., Lin, W.-L., Frutkin, A., Dichek, D., y

Giachelli, C. M. (2009). Smooth muscle cells give rise to osteochondrogenic precursors and chondrocytes in calcifying arteries. *Circulation Research*, 104(6), 733–741. <https://doi.org/10.1161/circresaha.108.183053>

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., . . . Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1), 1535750. <https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750>

Touyz, R. M., Alves-Lopes, R., Rios, F. J., Camargo, L. L., Anagnostopoulou, A., Arner, A., y Montezano, A. C. (2018). Vascular smooth muscle contraction in hypertension. *Cardiovascular Research*, 114(4), 529-539. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy023>

Tsao, C. W., Aday, A. W., Almarzooq, Z. I., Anderson, C. A. M., Arora, P., Avery, C. L., Baker-Smith, C. M., Beaton, A. Z., Boehme, A. K., Buxton, A. E., Commodore-Mensah, Y., Elkind, M. S. V., Evenson, K. R., Eze-Nliam, C., Fugar, S., Generoso, G., Heard, D. G., Hiremath, S., Ho, J. E., ... Martin, S. S. (2023). Heart disease and stroke Statistics—2023 update: A report from the American Heart Association. *Circulation*, 147(8). <https://doi.org/10.1161/cir.0000000000001123>

van Niel, G., D'Angelo, G., y Raposo, G. (2018). Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4), 213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>

Verma, S. K., Garikipati, V. N. S., Krishnamurthy, P., Khan, M., Thorne, T., Qin, G., Losordo, D. W., y Kishore, R. (2016). IL-10 Accelerates Re-Endothelialization and Inhibits Post-Injury Intimal Hyperplasia following Carotid Artery Denudation. *PLOS ONE*, 11(1), e0147615. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147615>

Wiklander, O. P. B., Brennan, M., Lötvall, J., Breakefield, X. O., y EL Andaloussi, S. (2019). Advances in therapeutic applications of extracellular vesicles. *Science Translational Medicine*, 11(492). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aav8521>

Williams, L., Bradley, L., Smith, A., y Foxwell, B. (2004). Signal transducer and activator of

transcription 3 is the dominant mediator of the anti-inflammatory effects of IL-10 in human macrophages. *The Journal of Immunology*, 172(1), 567–576. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.1.567>

World Health Organization. (2019). 11 Diseases of the circulatory system. En *International statistical classification of diseases and related health problems* (11th ed.). <http://id.who.int/icd/entity/426429380>

Wright, A., Snyder, O. L., Christenson, L. K., He, H., y Weiss, M. L. (2022). Effect of Pre-Processing Storage Condition of Cell Culture-Conditioned Medium on Extracellular Vesicles Derived from Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *International journal of molecular sciences*, 23(14), 7716. <https://doi.org/10.3390/ijms23147716>

Wynne, B. M., Chiao, C.-W., y Webb, R. C. (2009). Vascular smooth muscle cell signaling mechanisms for contraction to angiotensin II and endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension*, 3(2), 84–95. <https://doi.org/10.1016/j.jash.2008.09.002>

Xie, Z., Lin, B., Jia, X., Su, T., Wei, Y., Tang, J., Yang, C., Cui, C., y Liu, J. (2021). Enhanced IL-10 inhibits proliferation and promotes apoptosis of HUVECs through STAT3 signaling pathway in sepsis. *Histology and histopathology*, 36(11), 1179–1187. <https://doi.org/10.14670/HH-18-375>

Xu, S., Ilyas, I., Little, P. J., Li, H., Kamato, D., Zheng, X., Luo, S., Li, Z., Liu, P., Han, J., Harding, I. C., Ebong, E. E., Cameron, S. J., Stewart, A. G., y Weng, J. (2021). Endothelial Dysfunction in Atherosclerotic Cardiovascular Diseases and Beyond: From Mechanism to Pharmacotherapies. *Pharmacological Reviews*, 73(3), 924-967. <https://doi.org/10.1124/pharmrev.120.000096>

Yue, Y., Wang, C., Benedict, C., Huang, G., Truongcao, M., Roy, R., Cimini, M., Garikipati, V. N. S., Cheng, Z., Koch, W. J., y Kishore, R. (2020). Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell–Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via Integrin- Linked Kinase Enrichment. *Circulation Research*, 126(3), 315-329. <https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315829>

Yue, Y., Wang, C., Benedict, C., Huang, G., Truongcao, M., Roy, R., Cimini, M., Garikipati, V. N. S., Cheng, Z., Koch, W. J., y Kishore, R. (2020). Interleukin-10 Deficiency Alters Endothelial Progenitor Cell–Derived Exosome Reparative Effect on Myocardial Repair via

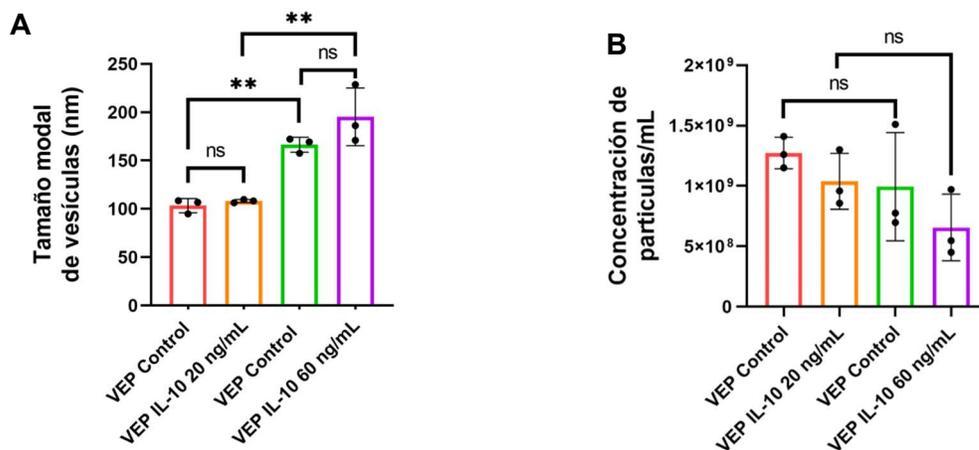
Integrin-Linked Kinase Enrichment. *Circulation Research*, 126(3), 315-329.
<https://doi.org/10.1161/circresaha.119.315829>

Zemse, S. M., Chiao, C. W., Hilgers, R. H., y Webb, R. C. (2010). Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF- α on the endothelium of murine aorta. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 299(4).
<https://doi.org/10.1152/ajpheart.00763.2009>

Zúñiga, Ú. A. (2022). Efecto de exosomas aislados de células endoteliales tratadas con Interleuquina-10 en la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes humanas [Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica área de Especialización en Toxicología y Diagnóstico Molecular, Universidad de Chile]. Repositorio Académico de la Universidad de Chile.
<https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/188925>

IX. Anexo

IX.1. Efectos del aislamiento en las características de vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC



Anexo 1 Efectos del aislamiento en las características de VEP de HUVEC

Determinación de la A) tamaño modal y B) concentración de las vesículas extracelulares pequeñas de HUVEC aisladas posterior a un estímulo de 24 horas con 20 ng/mL (VEP IL-10 20 ng/mL) y 60 ng/mL (VEP IL-10 20 ng/mL) de IL-10 o PBS (VEP Control). Las primeras dos columnas de A) y B) se almacenaron por 6 semanas y las columnas 3 y 4 se almacenaron por 6 meses. Los datos están expresados como promedio \pm EEM, $n=3$. Se realizó un test de normalidad de Shapiro-Wilk y una prueba de t de Student, se consideraron valores $**p<0,01$ como significancia estadística, $ns = no$ significativo.