

GRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

TRABAJO FIN DE GRADO

**Evaluación de vesículas extracelulares
modificadas genéticamente para el tratamiento
de la fibrosis cardiaca**

**Evaluation of Genetically Modified
Extracellular Vesicles for the Treatment
of Cardiac Fibrosis**

Autor/a: Diana Huilan Panchuelo Prieto

Director/a: Ana V. Villar Ramos

Co-director/a: Helena Soto Pérez-Cejuela

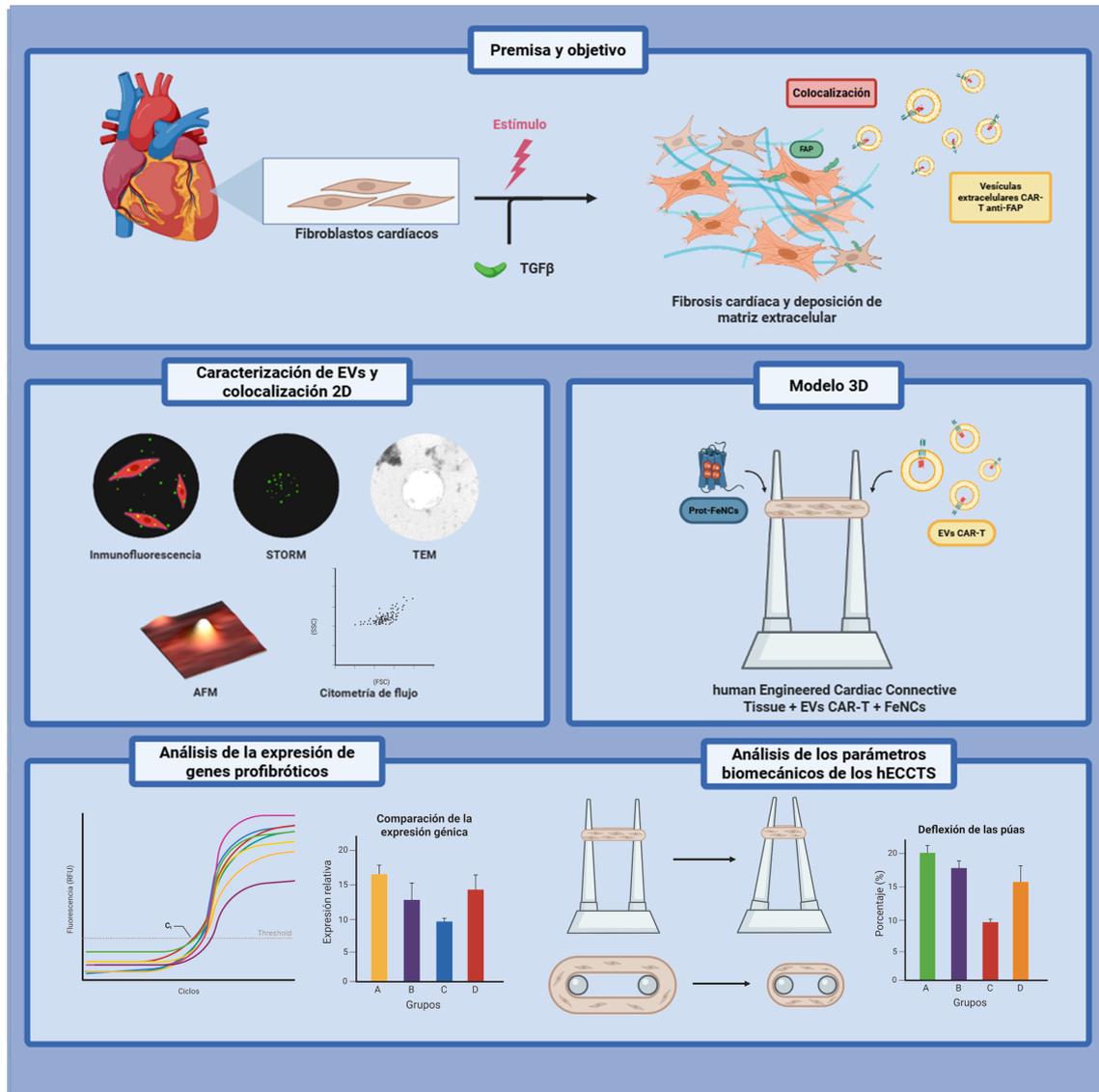
Santander, 8 Junio 2025

Índice

Título	1
Resumen Gráfico	1
Autores	1
Resumen	2
Abstract	3
Palabras Clave.....	3
Introducción	4
Resultados	8
Detección y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células HaCaT modificadas	8
Colocalización de las EVs y su diana en fibroblastos: FAP	10
Generación y caracterización de hECCTs y evaluación del potencial antifibrótico de la nanopartícula Prot-FeNCs en hECCT.....	13
Análisis de la expresión de genes profibróticos	15
Discusión	16
Metodología	16
Agradecimientos	21
Bibliografía	23
Información Suplementaria	25

Evaluación de vesículas extracelulares modificadas genéticamente como vehículos dirigidos para el tratamiento de la fibrosis cardíaca

RESUMEN GRÁFICO



AUTORES

Diana Huilan Panchuelo Prieto, Helena Soto Pérez-Cejuela, Ana V. Villar

Correspondencia: anavictoria.villar@unican.es

Evaluación del papel protector contra la fibrosis cardíaca de vesículas derivadas de células madre humanas

Diana Huilan Panchuelo Prieto^{1, 2}, Helena Soto Pérez-Cejuela^{1, 2}, Ana V. Villar^{1, 2}

¹Universidad de Cantabria, Santander, España

² Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Santander, España

* Correspondencia: anavictoria.villar@unican.es

RESUMEN

La fibrosis cardíaca es una afección secundaria a otras enfermedades cardiovasculares que afecta a millones de personas en el mundo. La falta de fármacos efectivos lleva a la necesidad de buscar terapias dirigidas. En este aspecto, las vesículas extracelulares (EVs) destacan por su biocompatibilidad y capacidad de ser cargadas con fármacos para dirigirse a tejidos concretos. En este trabajo, se han caracterizado estas estructuras nanométricas por citometría y diferentes técnicas de imagen y se han administrado sobre modelos 2D (células) y 3D (tejido conectivo cardíaco de ingeniería, hECCTs) para estudiar su especificidad sobre el tejido diana, con el fin de usarlas como biotransportadores. Un primer ensayo de encapsulación y tratamiento de hECCTs con una nanopartícula ha ofrecido resultados positivos sobre los cuales se profundizará para evaluar de forma concluyente su utilidad como terapia antifibrótica.

ABSTRACT

Cardiac fibrosis arises as a secondary condition of pathological cardiovascular diseases, affecting millions of individuals worldwide. The lack of effective pharmacological treatments highlights the need for targeted therapeutic strategies. In this context, extracellular vesicles (EVs) stand out due to their biocompatibility and their ability to be loaded with therapeutic drugs for delivery to specific tissues. In this study, these nanometric structures have been characterized by flow cytometry and various imaging techniques, and subsequently administered to both 2D (cell-based) and 3D (human Engineered Cardiac Connective Tissue, hECCTs) models to evaluate their specificity toward the target tissue, with the ultimate goal of using them as delivery vehicles. A pilot assay conducted with a nanoparticle encapsulated offered positive results, which will be further investigated to conclusively assess their potential as an antifibrotic therapy.

PALABRAS CLAVE

Vesículas extracelulares, *Extracellular Vesicles (EVs)*, *Fibroblast Activation Protein (FAP)*, *human Engineered Cardiac Tissue (hECCT)*, fibrosis cardiaca, Chimeric Antigen Receptor (CAR), Prot-FeNCs, *Transforming Growth Factor β (TGF- β)*

INTRODUCCIÓN

La fibrosis cardíaca es una condición patológica secundaria a otras enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión o el malfuncionamiento de una válvula (1). Consiste en la acumulación excesiva de matriz extracelular en el tejido cardíaco, típicamente, en el miocardio, haciendo que pierda su elasticidad y capacidad de contracción características (2).

Aunque la fibrosis está asociada a la gran mayoría de enfermedades cardíacas, que causan aproximadamente el 31% de muertes en el mundo entero (2), actualmente no tiene tratamiento (3).

En el desarrollo de la fibrosis cardíaca, es esencial la implicación de los fibroblastos cardíacos. En situación fisiológica, este tipo celular abunda en el corazón en forma de fibroblastos residentes, que tienen una función muy importante: mantener la homeostasis de la matriz extracelular (ECM, del inglés *ExtraCellular Matrix*), necesaria para la organización tridimensional de los cardiomiocitos, la distribución de las fuerzas ejercidas sobre el tejido cardíaco y la correcta conducción eléctrica a través del mismo (4). Sin embargo, tras un daño (valvulopatías, hipertensión arterial) que genera una sobrecarga de presión patológica, el corazón sufre un remodelado, y los fibroblastos se activan generando fibras que se acumulan para proteger el funcionamiento cardíaco en un proceso que se denomina fibrosis intersticial. Inicialmente, este proceso es necesario para preservar la integridad del tejido, pero la persistencia de la fibrosis a largo plazo lleva a la pérdida de elasticidad del ventrículo que, junto al proceso de hipertrofia (incremento de tamaño de los cardiomiocitos y con ello del volumen del miocardio), provocan el remodelado patológico que puede llevar a la pérdida de función cardíaca (2,4).

Durante la activación de los fibroblastos, se generan distintas subpoblaciones, que contribuyen a crear un entorno profibrótico. Dichas subpoblaciones presentan funciones determinadas como proliferación, producción de citocinas proinflamatorias y factores profibróticos o la diferenciación a miofibroblastos (4,5), que sintetizan mayor cantidad de ECM, principalmente colágeno I y III (2).

Dentro de los distintos tipos de fibroblastos activados, los miofibroblastos son un tipo celular clave en el desarrollo patológico de fibrosis. Cuando los fibroblastos cardíacos detectan estrés mecánico por sobrecarga de presión, se activan a proto-miofibroblastos, que expresan β - y γ -actina en su citoplasma. Estos proto-miofibroblastos, al ser expuestos al factor de crecimiento transformante β (TGF- β) producido por los fibroblastos en situación de estrés y otras células circundantes, se diferencian a miofibroblastos y otras subpoblaciones de fibroblastos activados realizando diversas funciones para regular la función cardíaca (2). De esta manera, se consigue, en parte, recuperar una fisiología que puede mantener la función cardíaca (6). Sin embargo, estas células tienen una capacidad de proliferación y migración alterada por lo que, después de que cese el daño, persiste la activación celular en el tejido manteniendo una producción exacerbada de matriz extracelular que puede provocar, en los casos más graves, la disfunción cardíaca y la muerte del paciente. En un corazón sano, los subtipos de fibroblastos activados presentan una reducida proporción y, se desactivan cuando es necesario para mantener la homeostasis tisular (4).

El TGF- β , mencionado anteriormente, es el principal factor desencadenante de la activación de los fibroblastos, promoviendo un aumento de señalización celular que lleva asociada la expresión de genes profibróticos, como: colágeno I (COL1A1), colágeno III

(COL3A1), fibronectina (FN), proteína de activación de fibroblastos (FAP) o actina del músculo liso α (α -SMA), principalmente; a través de su vía canónica, que incluye la activación por fosforilación de la familia de proteínas Smad2, 3 y 4 (7).

En la búsqueda de dianas terapéuticas, las proteínas de membrana cobran un papel principal por el acceso de los fármacos a ellas, siendo esto una ventaja con respecto a proteínas citoplasmáticas o nucleares.

Entre las proteínas de membrana que pueden ofrecer una diana terapéutica sobre la que actuar en la fibrosis y, cuya expresión está relacionada con la actividad de TGF- β (8), destaca FAP, una proteína que se sobreexpresa en condiciones patológicas como fibrosis cardíaca, pulmonar, cirrosis hepática o artritis, por ejemplo (9).

Concretamente, FAP es una enzima de la familia de las dipeptidil peptidasas (DPP), con función de dipeptidil peptidasa y endopeptidasa. A nivel biológico, está implicada en la modulación de la fibrinólisis que, mediante proteólisis, promueve la actividad inhibidora de la α 2-antiplasmina (α 2-AP) sobre la plasmina, enzima que proteoliza y rompe la fibrina. Así, cuando FAP está presente, se promueve la acumulación de fibrina y la formación de fibrosis (9).

Aunque FAP no se trata de una proteína específica de un tipo celular, su expresión selectiva en distintos tipos celulares como los fibroblastos ofrece la posibilidad de utilizarlo como diana.

Un sistema muy explorado actualmente para entrega selectiva son las vesículas extracelulares (EVs). Estas son un grupo heterogéneo de biotransportadores derivados de las membranas celulares. Se pueden encontrar en diversos tipos de fluidos biológicos, e intervienen en comunicación celular tanto en procesos fisiológicos como patológicos (10).

Atendiendo a su biogénesis, estas estructuras se pueden dividir principalmente en tres grandes grupos (10,11):

- **Exosomas** (30 – 120 nm). Aunque en sus inicios se utilizó el término “exosoma” para referirse a vesículas de origen desconocido derivadas de células en cultivo, actualmente se sabe que proceden del sistema endosomal tardío, concretamente los cuerpos multivesiculares, que maduran y se liberan por fusión con la membrana celular.
- **Microvesículas** (30 nm – 1 μ m). Las microvesículas, por su parte, nacen desde la membrana celular, por proyección hacia el exterior y fisión de la membrana hacia el espacio extracelular.
- **Cuerpos apoptóticos** (100 nm – 5 μ m). Proceden de células que mueren y pueden enviar señales apoptóticas a otras células (12).

Por otra parte, mediante el estudio de su composición, se ha visto que las vesículas extracelulares pueden transportar distintos tipos de biomoléculas (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) y expresar diferentes moléculas en su superficie, alterando la especificidad con la que interactúan con su entorno. Dependiendo del tipo celular que

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

las sintéticas, las proteínas de superficie que expresen serán más o menos específicas de su función celular o entorno metabólico (13).

Existe un término general para referirse a vesículas de un tamaño inferior a 200 nm: *small EVs* (sEVs), puesto que el tamaño de exosomas y microvesículas se solapa y aún es un tema controvertido la separación definida entre los dos tipos de EVs (10). Aunque esto pueda parecer una desventaja, una purificación enriquecida en sEVs es suficiente para poder experimentar su aplicación como biotransportadores. El reciente interés por estas partículas y sus ventajas sobre el uso de liposomas (estructuras artificiales esféricas de doble capa lipídica rica en fosfolípidos, que en su interior pueden transportar compuestos hidrosolubles), que ya está ampliamente extendido para muchas terapias, radica en que, al proceder las EVs de las células, poseen una corona natural de moléculas de superficie, que intervienen en la comunicación celular y confieren tropismo hacia los tejidos de destino y protección frente al sistema inmune. Adicionalmente, se pueden modificar genéticamente para que expresen proteínas de interés, como pueden ser receptores específicos, moléculas activadoras, fluoróforos o genes de resistencia (11).

En este sentido, una herramienta muy útil de modificación para dirigir células a dianas específicas es el sistema CAR-T (células T con receptores de antígenos quiméricos). En este procedimiento, las células T de un paciente son modificadas para que se dirijan a un antígeno específico (14), insertando constructos con tres partes principalmente: a) un fragmento variable de cadena única (scFv) contra un antígeno específico, b) un dominio transmembrana y c) un dominio de señalización ζ . Con el paso del tiempo, se han modificado las moléculas CAR-T para potenciar la activación de los linfocitos T, pero manteniendo los componentes mencionados (15). También existe la posibilidad de utilizar este sistema sobre otros elementos celulares, como vesículas o modificar los componentes que se incluyen en el constructo, generando proteínas que se denominan CAR-T *like*, por ser diferentes al esquema clásico.

Dado el papel clave que juega FAP en la fibrosis cardíaca y el potencial de las vesículas extracelulares como vehículos terapéuticos, en este trabajo exploramos una estrategia novedosa basada en EVs modificadas mediante una construcción génica que expresa una proteína quimérica CAR-T *like* para dirigir las específicamente a los fibroblastos activados. El objetivo principal de este trabajo es evaluar cómo estas vesículas modificadas interactúan con las células diana, analizando su posible potencial como transportador biológico, centrándonos en su unión a la diana farmacológica y sus capacidades como sistema terapéutico y, con ello, avanzar en el desarrollo de terapias más selectivas y eficaces contra la fibrosis cardíaca. A continuación, se explica el diseño experimental previo al comienzo del estudio.

Las vesículas extracelulares utilizadas, producidas en la línea celular de queratinocitos humanos inmortalizados HaCaT están modificadas mediante la administración de un plásmido viral que incluye la construcción que se describe a continuación, de tal manera que expresan en su membrana la proteína CAR-T *like*, que posee tres dominios

diferenciados: a) un scFv, correspondiente a la fracción variable de un anticuerpo anti-FAP; b) un dominio *hinge* y una fracción transmembrana, procedentes de CD63, tetraspanina específicamente localizada en las membranas de vesículas extracelulares y c) un fluoróforo, mNeptune2.5 – con una longitud de onda de emisión en el espectro del infrarrojo lejano (647 nm) – con el fin de poder observar las vesículas mediante microscopía de fluorescencia, tanto *in vitro* como por imagen *in vivo* cuando se administren en animales de experimentación cuya visualización puede realizarse mediante fluoróforos con longitudes de onda superiores a 600 nm (Sistema In Vivo *Imaging* (IVIS)). Adicionalmente, la construcción incluye una cola de seis histidinas (His-tag), de gran utilidad para el marcaje e identificación específica de las vesículas (Fig. S1A).

Una parte importante para realizar la prueba de concepto del sistema transportador es la encapsulación de fármacos. En el grupo previamente se ha conseguido con éxito encapsular un fármaco antifibrótico experimental: CTPR390 o también denominada Prot-AuNCs, que consiste en una proteína quimérica compuesta por un *scaffold* de repeticiones CTPR (*Consensus Tetratricopeptide Repeats*), un módulo de unión a Hsp90 – chaperona implicada en la potenciación de la vía TGF- β (16). Si bien las propiedades antifibróticas de esta partícula ya habían sido descritas previamente por nuestro grupo utilizando Au como marcador (16), en este estudio se utilizará una variante de dicha nanopartícula incorporando Fe (Prot-FeNCs), en sustitución de Au, para aportar una nueva propiedad de diagnóstico mediante su visualización por resonancia magnética (MRI).

RESULTADOS

Detección y caracterización de vesículas extracelulares derivadas de células HaCaT modificadas

Una vez transfectadas las células HaCaT con el vector que expresa la construcción CAR (Fig. 1A), el primer objetivo fue verificar la expresión del constructo tanto en las células como en las vesículas extracelulares (EVs) derivadas de ellas. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio, se seleccionó la línea transfectada con puromicina y se confirmó la expresión del fluoróforo mNeptune2.5, incluido en el constructo quimérico CAR, que se asocia a la membrana celular por medio de su región transmembrana correspondiente a la tetraspanina CD63, de incorporación natural en membrana (Fig. 1B).

Dichas vesículas se purificaron mediante ultracentrifugación y se analizaron por citometría de flujo, adaptando la ventana de detección al tamaño y complejidad de las partículas. La detección del fluoróforo mNeptune permitió diferencia entre EVs procedentes de células HaCaT CAR y aquellas producidas por células HaCaT wt (Fig. 1C), viendo que, aproximadamente, un 65,7% de las vesículas CAR emitían fluorescencia en el rango de mNeptune2.5, entrando en el rango de lo aceptable para esta técnica. Para la cuantificación de las vesículas, se utilizó citometría de flujo, adaptando la configuración del sistema para permitir la detección de estas estructuras (Fig. S1C).

Para una caracterización más detallada de las vesículas, se aplicaron diferentes técnicas de microscopía (Fig. 1D-F). Mediante microscopía de súper resolución STORM (*Stochastic Optical Reconstruction Microscopy*), basada en la activación estocástica de fluoróforos, se logró visualizar vesículas individuales tras realizar un ensayo de inmunofluorescencia con marcaje de CD63, y emisión del anticuerpo secundario a 647 nm (Fig. 1D). Esta técnica permitió observar localizaciones puntuales de la proteína CD63 (marcador principal de EVs) en la membrana de las vesículas.

La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se utilizó para el análisis morfológico de las EVs (Fig. 1E). Se analizaron EVs CAR y EVs CAR encapsulando la nanopartícula Prot-FeNCs y mediante tinción negativa, se observó la polidispersidad en la población de vesículas purificadas, variando su diámetro desde los 29 a los 125 nm, así como las estelas o sombras resultantes del arrastre de las partículas durante la preparación de la muestra.

Por último, se empleó microscopía de fuerza atómica (AFM) para examinar con mayor precisión la morfología y distribución de tamaños de las EVs (Fig. 1F). El análisis de múltiples imágenes permitió generar un histograma que muestra una distribución de tamaño mayoritaria entre 50 y 200 nm en las vesículas obtenidas por ultracentrifugación, en línea con observaciones previamente descritas (17,18). Asimismo, se observaron las hendiduras características en la membrana, asociadas al tipo de extracción utilizado. En cuanto a las dimensiones, se observó que el diámetro de las vesículas en el plano XY era, en promedio, de 5 a 10 veces superior a su altura medida en el eje Z, pudiendo asociarse a la desecación de la muestra durante la preparación (Fig. 1F F2) (18).

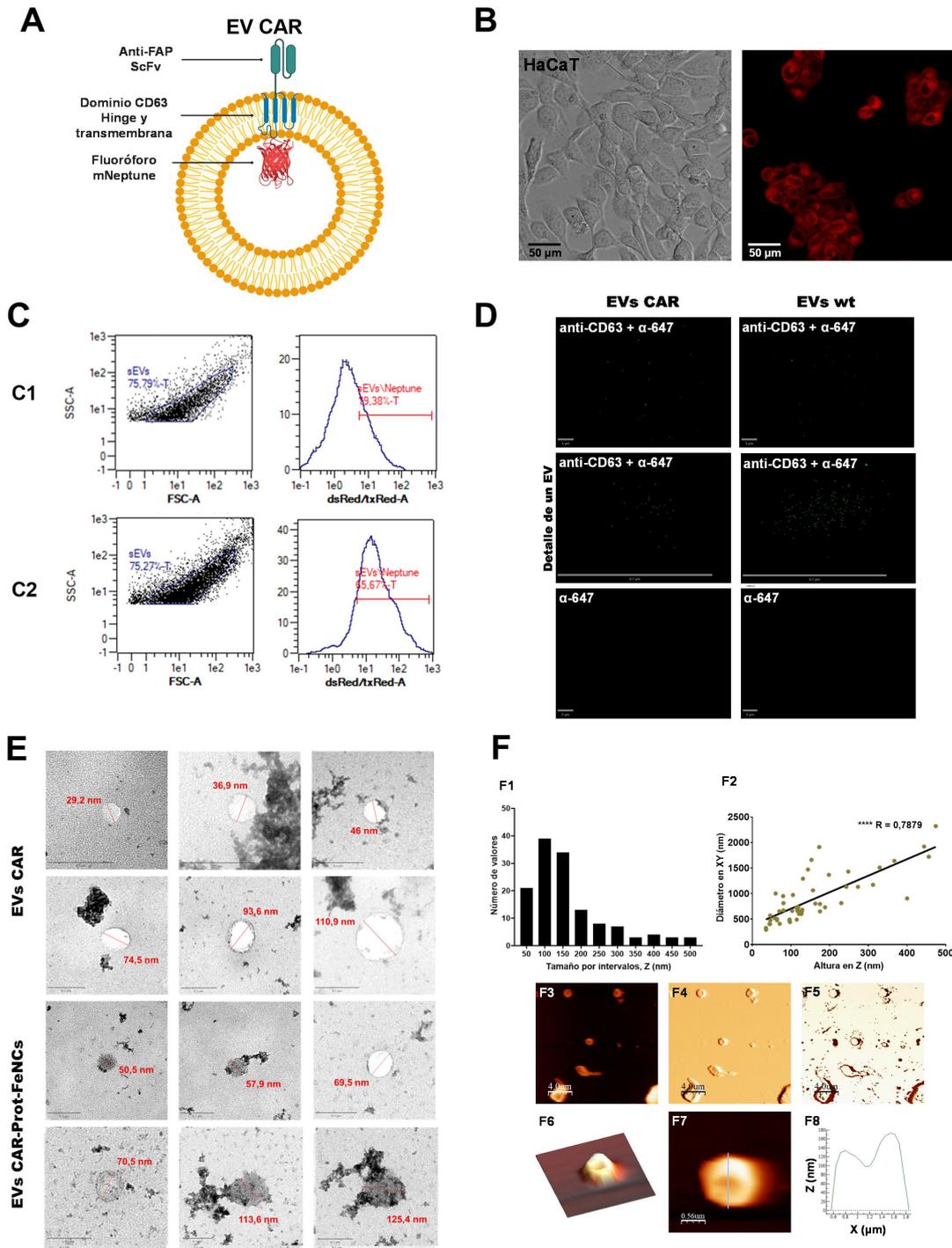


Figura 1. Caracterización de las vesículas extracelulares (EVs) CAR

(A) Diagrama esquemático de una EV describiendo el constructo introducido por transfección génica de las células. En la parte externa se encuentra un fragmento variable monocatenario contra FAP, unido a la membrana por un dominio transmembrana de CD63 y en el interior se encuentra el fluoróforo mNeptune2.5. (B) Imágenes representativas de campo claro (izquierda) y de microscopía confocal (derecha) que confirman la inserción, por visualización de mNeptune2.5 (fluorescencia en infrarrojo cercano), del constructo CAR en la línea celular HaCaT.

(C) Análisis de citometría de flujo de sEVs extraídas de HaCaT wt (C1) y HaCaT CAR (C2) por ultracentrifugación. A la dcha. se muestran los diagramas de puntos enfrentando FSC vs. SSC, dibujando en azul la ventana de detección de sEVs. A la izda. se muestra el análisis de fluorescencia roja correspondiente a mNeptune2.5, solo presente en las EVs CAR. (D) Imágenes de súper resolución obtenidas por microscopía STORM de EVs CAR (izda.) y EVs wt (dcha.). Las vesículas están marcadas mediante anticuerpo para CD63, viéndose en las imágenes puntos discretos de fluorescencia verde del anticuerpo secundario asociado, cuyo pico de emisión es a 647 nm. En la primera fila de paneles, cada punto identifica una EV individual (escala 5 μ m). En la segunda fila, cada punto identifica la fluorescencia del anticuerpo secundario de una sola molécula de CD63, por lo que se aprecia la expresión de esta tetraspanina en un EV (escala 100 nm) (ampliar la imagen para observar la señal). La tercera fila corresponde al control negativo, en el que solo se ha marcado con el anticuerpo secundario; la falta de señal indica que no existen uniones inespecíficas que den ruido de fondo. (E) Imágenes de TEM de EVs CAR y EVs CAR encapsulando la nanopartícula Prot-FeNCs en las que se puede apreciar la forma redondeada característica. La línea roja indica el diámetro de la partícula. En el caso de las EVs más electrodensas (paneles inferiores), se aprecia la “sombra” de la vesícula, al haberse levantado durante la preparación y haberse teñido su forma. (F) Análisis morfológico de EVs CAR mediante microscopía de fuerza atómica (AFM). Las muestras consisten en EVs resuspendidas en PBS 1:1000 en agua MilliQ a partir de una concentración inicial en PBS de $3,25 \times 10^4$ EVs/mL. En F1 se muestra un histograma de barras que representa la distribución de tamaños obtenida tras el análisis de 135 EVs individuales (Fig. S1B), agrupadas por intervalos con el valor medio indicado en el eje X. En F2 se muestra una gráfica de dispersión que establece una correlación positiva entre la altura y el diámetro de las EVs CAR ($n = 52$ EVs analizados, los datos no pasaron el test de normalidad de Shapiro Wilk y se analizó la correlación con el coeficiente R de Spearman, obteniendo un valor **** $p < 0,0001$). En F3 se presenta una imagen topográfica planarizada, donde los tonos oscuros indican mayor profundidad y los tonos claros zonas más elevadas; las EVs aparecen como estructuras redondeadas y, algunas de ellas, presentan una depresión central característica, asociada a la ultracentrifugación como método de extracción. En F4 se muestra la correspondiente imagen de oscilación de amplitud, que destaca los bordes de las vesículas, mientras que F5 muestra la imagen de variación de fase, en la que se diferencian las propiedades mecánicas del sustrato (más brillante) frente a las de la materia orgánica (más oscura). En F6 se incluye una reconstrucción tridimensional de una EV individual extraída de la imagen superior (borde superior izquierda), donde se observa claramente su depresión central. En F7, se muestra una imagen ampliada de la otra EV con la línea utilizada para obtener el perfil de altura (F8), permitiendo una medición precisa de la morfología en el eje Z.

Colocalización de las EVs y su diana en fibroblastos: FAP

Una vez caracterizadas las EVs, el siguiente objetivo fue evaluar su colocalización con su diana en fibroblastos: la proteína FAP. Para ello, las EVs se incubaron con fibroblastos cardiacos primarios.

En primer lugar, se intentó visualizar la fluorescencia intrínseca del fluoróforo mNeptune, cuya emisión se encuentra en el infrarrojo lejano (647 nm). Sin embargo, no se logró detectar la señal (Fig. S2A), por lo que se exploraron alternativas de marcaje.

Una de las estrategias empleadas fue la tinción directa de las vesículas con BODIPY (Fig. S2E), tintes fluorescentes disponibles con emisiones en diferentes longitudes de onda y lipofílicos que se une a membranas. Las EVs fueron teñidas antes de su incubación con los fibroblastos con BODIPY que emite a 488 nm, y se continuó con el protocolo estándar de inmunofluorescencia. No obstante, se observó que los fibroblastos presentaban autofluorescencia a 488 nm (Fig. S2B), coincidente con la longitud de onda de emisión de BODIPY, lo que impidió asociar con certeza la señal observada a las vesículas teñidas.

Para superar esta limitación, se empleó un nuevo marcaje contra CD63. Se utilizó un anticuerpo secundario con emisión en 647 nm, comprobando que estuviera fuera del rango de autofluorescencia celular (Fig. S2C). Esta estrategia permitió visualizar la señal de CD63 (Fig. 2A), aunque fue necesario comparar los resultados con un control apropiado, ya que los fibroblastos también expresan CD63 en su membrana plasmática (Fig. S2D)(19).

Con el objetivo de aumentar la especificidad del marcaje de las vesículas, se optó por el uso de un anticuerpo anti-His-tag, aprovechando que el constructo CAR incluye una cola de histidinas. Esta aproximación permitió marcar exclusivamente las vesículas, evitando el reconocimiento inespecífico de estructuras celulares. Mediante esta estrategia, se observaron señales discretas de fluorescencia, de baja intensidad, que corresponden a las EVs (Fig. 2B). Estas se localizaron tanto en el interior de las células como en la periferia de la membrana, y en algunos casos, se observó colocalización con FAP (Figura 2C).

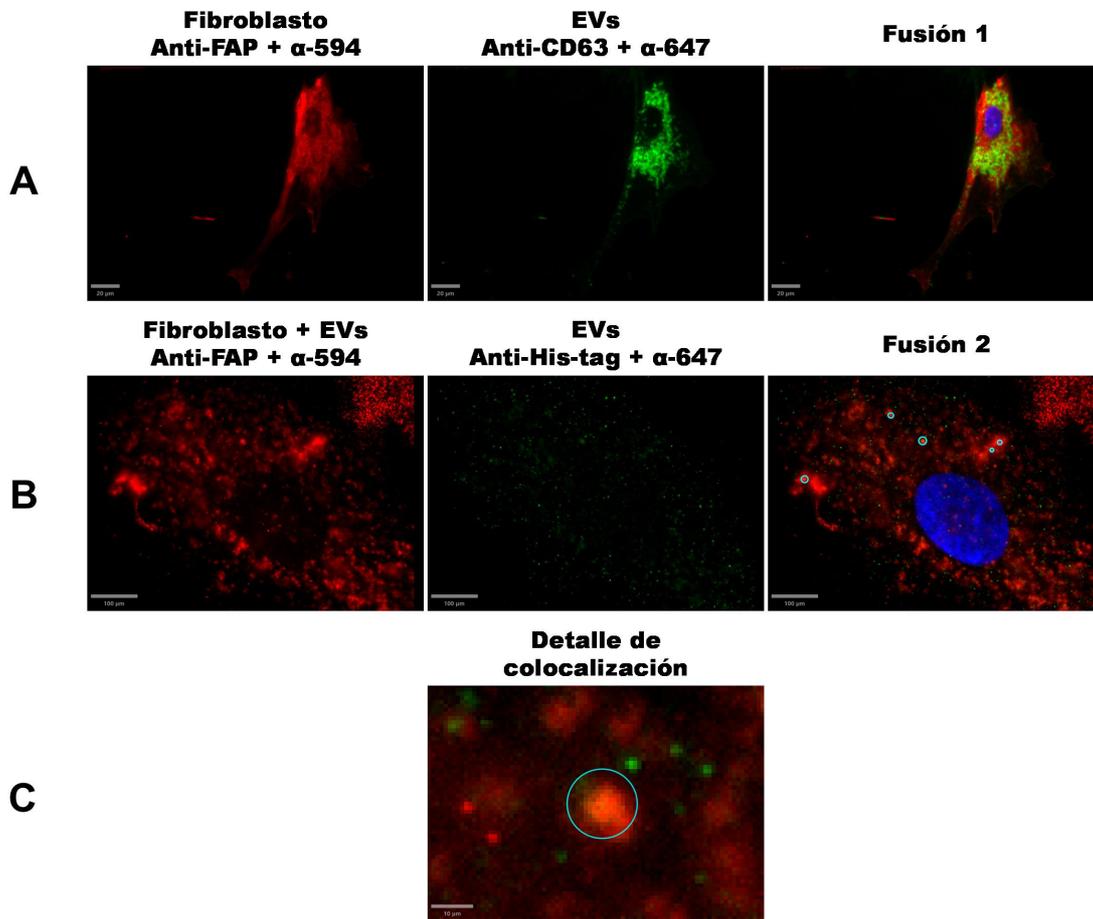


Figura 2. Imágenes de inmunofluorescencia en ensayos de colocalización entre FAP, expresado en fibroblastos y las EVs CAR

(A) Imagen representativa de un fibroblasto primario tratado con EVs CAR teñido con DAPI (azul) para la visualización del núcleo, anticuerpo anti-FAP conjugado con Alexa Fluor 594 (rojo) y BODIPY (verde; canal α -488) para la detección de vesículas extracelulares (EVs). (B) Imagen representativa de un fibroblasto primario tratado con EVs CAR teñido con DAPI (azul) para la visualización del núcleo; anticuerpo anti-FAP conjugado con Alexa Fluor 594 (rojo) y anti-CD63

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

conjugado a Alexa Fluor 647 (verde), para la detección de las EVs. En la imagen fusionada, se han señalado en azul cyan las colocalizaciones entre FAP y CD63 detectadas. **(C)** Se muestra una ampliación de la fusión 2, destacando una colocalización.

Aprovechando la capacidad de súper resolución de la microscopía STORM, se realizó un ensayo adicional marcando de nuevo CD63. Para este experimento, se trataron fibroblastos con EVs, mientras que el grupo control consistió en las células no tratadas. En las células tratadas con EVs se detectaron múltiples eventos de colocalización FAP-EVs, en contraste con un número muy reducido de eventos en las células control (Fig. 3A). Se identificaron dos tipos de colocalización: una interacción parcial, caracterizada por una superposición incompleta de las señales, y una interacción total, en la que la superposición fue completa (Fig. 3B). Ambos tipos de eventos fueron clasificados y cuantificados con el objetivo de evaluar de forma preliminar las diferencias entre condiciones (Fig. 3C).

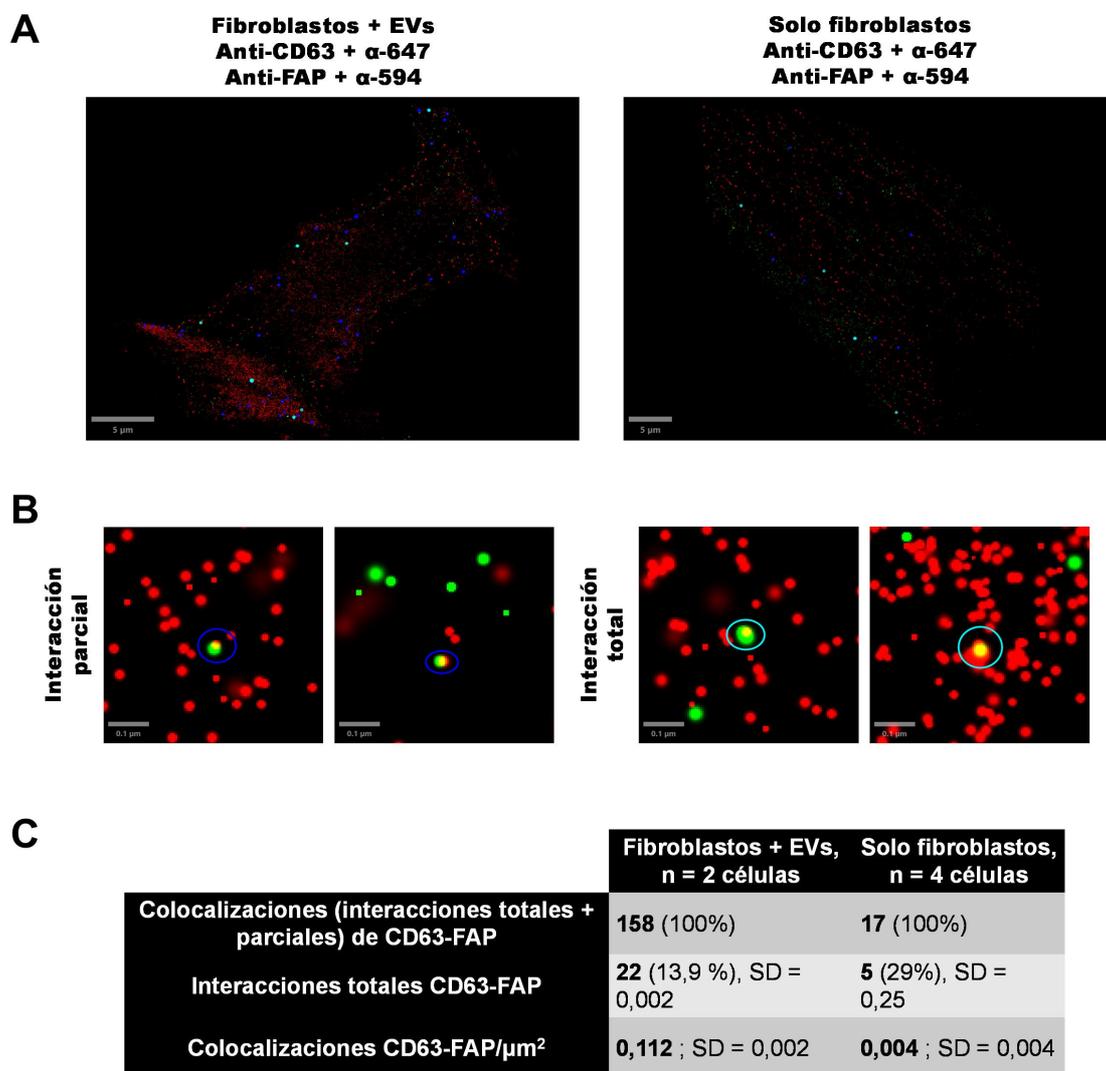


Figura 3. Imágenes representativas de STORM en un ensayo de colocalización entre FAP y EVs CAR

(A) Imágenes de STORM de fibroblastos teñidos con un anticuerpo anti-FAP conjugado con Alexa Fluor 594 (rojo) con EVs (experimento izda.) y sin EVs (control dcha.). Con círculos azul

eléctrico se señalan las colocalizaciones denominadas interacciones parciales entre FAP y la señal del anticuerpo secundario contra anti-CD63 (verde), que puede estar en la célula o en las EVs, en azul cyan se marcan las colocalizaciones denominadas como interacciones totales. **(B)** Imágenes ampliadas de los dos tipos de interacciones observadas. A la izda. se muestran interacciones parciales entre las señales y a la izda. interacciones totales, en las que una señal embebe la otra. **(C)** Tabla descriptiva que señala las diferencias entre los eventos de colocalización observados en la muestra de fibroblastos + EVs y el control ($n = 6$ células, 2 en presencia de EVs y 4 en ausencia de EVs), sin las vesículas. SD representa la desviación estándar.

Generación y caracterización de hECCTs y evaluación del potencial antifibrótico de la nanopartícula Prot-FeNCs en hECCT

Para continuar estudiando la capacidad de las vesículas CAR como sistema biológico de transporte, se exploró su uso como biotransportador de una nanopartícula terapéutica, Prot-FeNCs, similar a la previamente descrita por el grupo, CTPRAu, en la que solo cambia el metal de coordinación Au por el Fe (20). Antes de evaluar la posibilidad de encapsularla, se propuso evaluar las propiedades antifibróticas de Prot-FeNCs.

Como modelo de fibrosis de tejido cardíaco 3D, se generaron hECCTs (*human Engineered Cardiac Connective Tissue*), estructuras tridimensionales en forma de aro formadas por fibroblastos cardíacos inmortalizados y una matriz de colágeno, diseñadas para imitar propiedades biomecánicas del tejido cardíaco. Estos hECCTs fueron tratados con TGF- β a 8 ng/mL para inducir un estado profibrótico y se los administró la nanopartícula Prot-FeNCs a una concentración de 5 μ M para comprobar sus efectos antifibróticos.

Los resultados obtenidos (Fig. 4) mostraron que los hECCTs tratados Prot-FeNCs, tanto en ausencia como en presencia de TGF- β , presentaron una deflexión de las púas similar a los controles y significativamente menor que los hECCT fibróticos tratados con TGF- β . (Fig. 4A). Esto se puede apreciar de forma significativa desde el día 5 de cultivo hasta el día 13. Un detalle de la reducción de la deflexión con significancia estadística del día 13 se observa en la Fig. 4B (ANOVA de una vía; $*p < 0,05$) (Fig. 4B).

En cuanto al volumen, los hECCTs tratados con Prot-FeNCs presentaron valores significativamente mayores que aquellos tratados únicamente con TGF- β , lo que indica una relajación del tejido, e incluso que los controles, con un valor $****p < 0,0001$ (Fig. 4C). De forma análoga, el perímetro fue también significativamente mayor en los hECCTs tratados con la nanopartícula, con un valor $****p < 0,0001$ (Fig. 4D).

A continuación, probamos diferentes condiciones en otro tipo de hECCT, generados con fibroblastos cardíacos primarios, en vez de con fibroblastos cardíacos inmortalizados, incluyendo la administración de EVs (4×10^4 EVs/hECCT- dosis) y EVs encapsulando la nanopartícula por electroporación. Los hECCTs se mantuvieron durante 5 días, midiendo la deflexión diariamente y el volumen y perímetro a día 5. En la gráfica de deflexión diaria (Fig. 4E) se aprecia una tendencia similar a los resultados obtenidos anteriormente, con un fenotipo menos fibrótico en aquellos hECCTs a los que se les administró la nanopartícula. Este patrón se conservó a día 5, pero no se puede considerar significativo debido a que la n del grupo de hECCTs tratados con Prot-FeNCs es demasiado pequeña. En cuanto al volumen (Fig. 4G) y el perímetro (Fig. 4H),

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

tampoco se puede obtener una conclusión definitiva por la falta de n en la muestra de los hECCTs tratados.

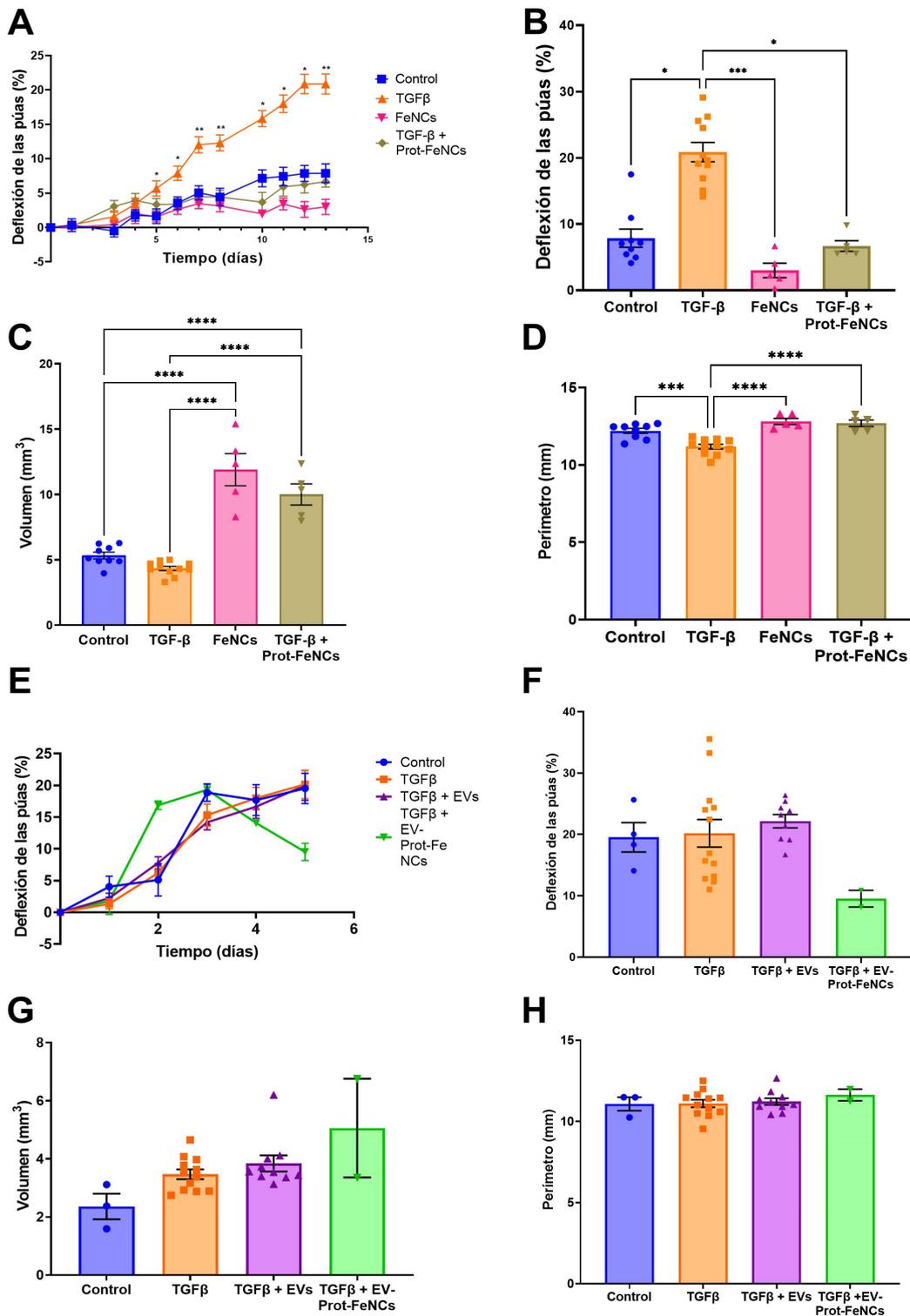


Figura 4. Resultados preliminares sobre parámetros biomecánicos de hECCTs de fibroblastos inmortalizados (A-D) y fibroblastos primarios (E-H) tratados con Prot-FeNCs (A-D) y con EVs CAR extraídas de células HaCaT (E-H)

(A) Deflexión de los polos diaria hasta 13 días de los hECCTs formados por fibroblastos inmortalizados. La deflexión se mide como la distancia entre las dos púas que sostienen el hECCT, expresada como porcentaje de contracción respecto al día 0. (B) Deflexión de las púas a día final (13) de los hECCTs de fibroblastos inmortalizados. Existen diferencias significativas entre la condición fibrótica, TGF- β , y el resto de grupos. (C) Volumen y (D) Perímetro de los hECCTs medido a día 13 (n = 5-11 por grupo). (E) Deflexión de los polos diaria hasta 5 días de los hECCTs formados por fibroblastos primarios. (F) Deflexión de las púas a día final (5) de los hECCTs de fibroblastos primarios. No existen diferencias significativas entre grupos. (G) Volumen y (H) Perímetro de los hECCTs medido a día 5 (n = 2-13 por grupo). Los datos no pasaron el test de normalidad de Shapiro-Wilk y correspondientemente se aplicó el test no paramétrico ANOVA de Welch para comparaciones múltiples. El nivel de significación se indica mediante la p (*p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005, ****p < 0.0001).

Análisis de la expresión de genes profibróticos

Además del análisis de los parámetros biomecánicos, se evaluaron posibles diferencias en la expresión de marcadores profibróticos entre los distintos grupos experimentales (Fig. 5). Para ello, los hECCTs fueron disgregados y se procedió a la extracción de RNA total, seguido de retrotranscripción a cDNA. La expresión génica relativa se analizó mediante PCR a tiempo real utilizando el método $\Delta\Delta Ct$.

Los resultados preliminares revelaron una tendencia hacia una disminución en la expresión de colágeno I A1 (COL1A1) (Fig. 5A) y fibronectina (FN) (Fig. 5B) en los hECCTs tratados con vesículas extracelulares, en comparación con los hECCTs en condiciones fibróticas. Se ampliará la n de estos ensayos preliminares para poder concluir si existen diferencias significativas tras la administración de las EVs.

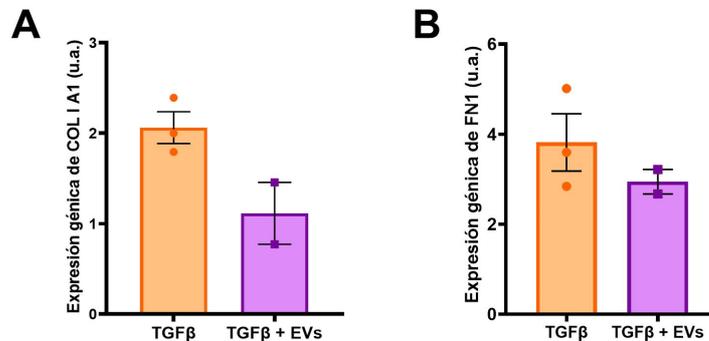


Figura 5. Gráficas de barras que muestran los resultados preliminares del análisis de la expresión de genes profibróticos en hECCTs de fibroblastos primarios tratados con EVs CAR extraídas de células HaCaT

(A) Gráfica de barras ilustrando la expresión relativa de COL1A1 entre hECCTs fibróticos (TGF- β) y hECCTs fibrótico y tratados con EVs. (B) Gráfica de barras ilustrando la expresión relativa de FN1 entre hECCTs tratados con TGF- β y hECCTs tratados con TGF- β y EVs (n = 2-3 muestras biológicas, con tres réplicas técnicas por muestra, y triplicados técnicos por réplica).

DISCUSIÓN

En el presente estudio se propuso evaluar el potencial de las vesículas extracelulares CAR (EVs CAR) como sistemas de bio transporte en el contexto de estrategias terapéuticas dirigidas a la fibrosis cardíaca. En particular, se exploró su capacidad como

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

vectores de entrega de la nanopartícula Prot-FeNCs, un candidato con propiedades antifibróticas, y su funcionalización con el constructo CAR dirigido contra la proteína asociada a fibroblastos activados (FAP).

Los resultados preliminares sugieren que las EVs dirigidas a la diana FAP podrían representar un sistema de entrega eficaz para fármacos con base proteica como es el caso de Prot-FeNC. Esta conclusión se basa en el hecho de que la combinación EV-Prot-FeNCs confirma las características antifibróticas previamente observadas de la nanopartícula de igual base proteica CTPR390 (20), como se evidencia en los parámetros biomecánicos analizados en los hECCTs. Adicionalmente, la tendencia a la baja en la expresión de genes profibróticos como COL I A1 y FN1 refuerza la hipótesis de que el sistema EV CAR puede vehiculizar la nanopartícula sin interferir en su mecanismo de acción.

Un hallazgo relevante fue la evidencia de colocalización entre las EVs CAR y su diana molecular, FAP, observada mediante inmunofluorescencia y, mediante microscopía de súper resolución STORM, que evidencia la proximidad de estructuras a nivel nanométrico. Este resultado apunta a que este sistema puede producir una mejora en la especificidad de entrega de fármacos, lo cual sería crítico para minimizar efectos secundarios y aumentar la eficacia terapéutica. El siguiente paso que se dará será estudiar la colocalización FAP – EVs de las vesículas extraídas de células HaCaT wt, con el fin de comparar la especificidad de la colocalización FAP – EVs atribuible al constructo CAR.

Asimismo, la caracterización exhaustiva de las vesículas utilizando diversas técnicas de alta o súper resolución (por ejemplo: TEM, STORM, AFM y citometría) permitió validar la naturaleza y estabilidad del sistema a nivel nanométrico, con resultados similares a estudios previos (18,21). Esta validación técnica es especialmente importante al trabajar con sistemas nanométricos, donde la pérdida de trazabilidad estructural puede afectar significativamente la reproducibilidad experimental.

A pesar de la solidez de los hallazgos iniciales, se reconoce que el número limitado de muestras biológicas en alguno de los ensayos presentados representa una limitación importante a la hora de formular una conclusión sólida y definitiva. Es necesario ampliar el número muestral para confirmar la robustez estadística de los efectos observados, tanto a nivel biomecánico en uno de los modelos, como a nivel de la expresión génica. Igualmente, resulta fundamental profundizar en la evaluación funcional de este sistema, no solo en modelos tridimensionales *in vitro*, sino también en estudios *in vivo* que permitan evaluar la biodistribución, la cinética de liberación y la eficacia terapéutica del sistema EV–Prot-FeNCs.

En conjunto, estos resultados posicionan a las EVs CAR como una plataforma prometedora para la entrega específica de agentes antifibróticos, y sientan las bases para futuros estudios en terapias avanzadas dirigidas contra la fibrosis cardíaca.

METODOLOGÍA

Cultivo estable de células

Los fibroblastos primarios se cultivaron en medio *Fibroblast Medium Plus* (FM(Plus); Innoprot), suplementado con 5% de suero fetal bovino (FBS; Innoprot), 1% suplemento de crecimiento de fibroblastos (FGS; Innoprot) y 1% solución de penicilina (10 000 U/mL) y estreptomycinina (10 000 µg/mL)(P/S Solution; Innoprot). Las células se mantuvieron a

37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El medio se cambió cada 2-3 días y se realizaron subcultivos en una proporción 1:4-1:5 cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%. Se empleó TrypLE (Gibco) para desprender las células de la placa.

Las células HaCaT, tanto *wild type* como CAR se cultivaron en *Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose* (DMEM; Sigma-Aldrich), suplementado con 10% de FBS y 1% de penicilina (10 000 U/mL) y estreptomycin (10 000 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37° en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂. El medio se cambió cada 2-3 días y se realizaron subcultivos en una proporción 1:5-1:10 cuando las células alcanzaron una confluencia del 80-90%. Se empleó TrypLE (Gibco) para desprender las células de la placa.

Obtención de EVs a partir de células HaCaT

El protocolo de obtención de sEVs (16) se divide en el cultivo de las células para la producción de sEVs y la posterior extracción de vesículas. Se extrajeron las vesículas de células HaCaT wt y CAR. Se sembraron entre 8-16 placas de 150 mm a una confluencia de $1,5 \times 10^6$ cél/placa (para las células wt) y $1,75 \times 10^6$ cél/placa (para las células CAR) con medio DMEM suplementado con 10% FBS y 1% P/S, al igual que para su cultivo habitual. Aproximadamente a las 24 h, cuando se alcanzó cerca del 35% de la confluencia, se lavó con abundante PBS y reemplazó el medio por DMEM con FBS depletado (DMEM, 10% FBS depletado de exosomas (Gibco), 1% P/S). 4 días más tarde, se recogió el medio de las placas, manteniendo por separado las condiciones.

El siguiente paso fue el aislamiento de las sEVs por ultracentrifugación. La primera centrifugación se hizo a 3220 g, 4°C, durante 30 min, para eliminar los restos celulares. Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a tubos Nalgene y se centrifugó a 10 000 g (Avanti J-26 XP, rotor JA-17), 4°C, durante 90 min, maximizando la aceleración, pero manteniendo una deceleración lenta, con el fin de que no se desprendiera el pellet. Finalmente, se volvió a centrifugar el sobrenadante a 100 000 g (Thermo Scientific Sorvall WX90), 4°C por 90 min, manteniendo una aceleración máxima (9) y una desaceleración lenta (2). El pellet obtenido de esta centrifugación corresponde a las EVs de interés, por lo que se lavó con 5 mL de PBS filtrado (filtro de 0,2 µm de tamaño de poro), volviendo a centrifugar 90 min a 100 000 g y se resuspendió el pellet obtenido en unos 200 µL de PBS filtrado para su posterior uso.

Caracterización de las EVs

La determinación del tamaño y la identidad de las EV se hizo mediante citometría de flujo, usando el MACSQuant Analyzer 10. Se ajustaron los parámetros para detectar la población de EVs, estableciendo una tasa baja de flujo (10 µL/min), activación del disparador para SSC en 4, todos los canales en escala hiperlogarítmica, y el voltaje para el FSC en 264 V y para el SSC en 219 V. Para detectar mNeptune2.5 se usó el canal Y2 (615/20 nm) en 380 V y para el BODIPY se usó el canal B1 (525/50 nm) en 320 V. El PBS filtrado usado para resuspender las muestras se usó para evaluar el ruido y la fluorescencia de fondo (16).

Encapsulación de la proteína Prot-FeNCs en las EVs

Tras la purificación de las EVs, y resuspendidas en PBS, estas se mezclaron con las Prot-FeNCs hasta un volumen final de 1 mL, incubando en agitación durante 15 min. Posteriormente, se electroporaron en 2 pulsos, a 400 V, 125 µF (Gene Pulser II

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Electroporation System, BioRad). Después se lavaron las EVs para retirar el exceso de nanopartícula no encapsulada y se resuspendieron las EVs en PBS filtrado.

Marcaje de las EVs

Las EVs CAR se marcaron con BODIPY (Invitrogen, E34251). Se incubaron las EVs y el BODIPY a 1 μ M durante 40 min a 37°C. Después, se lavó el exceso con PBS y se ultracentrifugó a 100 000 g durante 1 h.

Las vesículas también se marcaron de forma específica con anti-His-Tag (Santa Cruz Biotechnology, sc-8036), durante el protocolo de inmunofluorescencia.

Incubación, fijación e inmunofluorescencia de los fibroblastos con las EVs

Los fibroblastos se sembraron sobre cubreobjetos (VWR Avantor Science Central, grosor nº 1, \varnothing 13 mm) en una placa de 6 pocillos, a una confluencia de 70 000 o 100 000 células por pocillo. 24 h después, se añadió a una concentración de 5 ng/mL a los pocillos correspondientes. 24 h más tarde, se añadieron las EVs CAR y EVs CAR marcados con BODIPY, según correspondiera, a una concentración de 104 EVs/pocillo. Seguidamente, se retiró el medio y se lavó con PBS. Los cristales se fijaron con PFA al 4%, diluido en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente en agitación. Después se hicieron tres lavados de 5 min con PBS. Tras el último lavado, se permeabilizó con Tritón al 0,1%, diluido en PBS, durante 30 min en agitación, a temperatura ambiente. Se realizó un lavado de 5 min con PBS y se bloqueó con BSA 1% en PBS durante 45 min sin movimiento. Seguidamente, se realizaron dos lavados de 5 min con PBS.

Para el marcaje de las estructuras de interés, se usaron como anticuerpos primarios anti-His-Tag de ratón (Santa Cruz Biotechnology, sc-8036), anti-CD63 de ratón (mezcla 1:1, Santa Cruz Biotechnology, sc-5275 y suero monoclonal, cedido por el Dr. Sánchez Madrid) y anti-FAP de conejo (Thermo Fisher Scientific, PA5-51057) diluidos en BSA 0,1% en PBS a 1:500, 1:50 y 1:300, respectivamente. Se echaron 250 μ L de los anticuerpos sobre los cristales, según las diferentes condiciones y se incubaron durante 2,5 h a temperatura ambiente, manteniendo la placa en donde se encontraban los cristales en una cámara húmeda y en oscuridad. Tras la incubación, se lavó la placa tres veces con PBS y se echaron los anticuerpos secundarios: Alexa Fluor 488 anti-mouse a 1:500 (Invitrogen, A32723), Alexa Fluor 647 anti-mouse (Invitrogen, A31571) y Alexa Fluor 594 anti-rabbit (Invitrogen, A11012) a 1:1000, en solución de lavado. Se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h en cámara húmeda y en oscuridad. Después, se retiraron y se hicieron dos lavados de 5 min con PBS. Finalmente, se montaron los cristales sobre portaobjetos (VWR Avantor), adhiriéndolos con Prolong Diamond Antifade con DAPI (Invitrogen, ref. P36966).

Tras el montaje de los portaobjetos, las muestras se visualizaron en un microscopio de epifluorescencia Zeiss AxioImager M1 y se analizaron con ImageJ.

Visualización por microscopía STORM

Para la visualización de los EVs wt y CAR purificados mediante ultracentrifugación, estos se diluyeron hasta obtener una concentración de 10⁴ EVs/mL, se fijaron con PFA al 2%, diluido en PBS y se incubaron durante la noche a 4°C. Al día siguiente, se lavaron con exceso de PBS filtrado y se ultracentrifugaron a 100 000 g 1 h, a 4°C. Después, se resuspendieron en 150 μ L de PBS y se dividieron en tres condiciones para realizar la inmunofluorescencia: a) sin marcaje, b) marcados con anticuerpo primario y secundario y c) marcados con anticuerpo secundario. A aquellos que no había que marcarlos, se resuspendieron en un volumen final de 100 μ L y se conservaron a 4°C. Aquellos que

llevaban el anticuerpo 1º y 2º, se incubó el anticuerpo primario: anti-CD63 (ratón) a una proporción 1:50 en solución de bloque BSA al 0,1% durante 2 h a temperatura ambiente y con agitación ligera. El anticuerpo primario consistió en una mezcla de anti-CD63 comercial (Santa Cruz Biotechnologies, sc-5275) y suero monoclonal con anti-CD63, cedido por el Dr. Sánchez Madrid. Tras la incubación, se lavó el anticuerpo no unido con abundante PBS, ultracentrifugando a 100 000 g 1 h, a 4°C dos veces. Después, se añadió el anticuerpo secundario, Alexa Fluor 647 (mouse) a una dilución 1:500 y se incubó 30 min a temperatura ambiente, con agitación ligera y en oscuridad. Finalmente, se volvió a lavar el exceso de anticuerpo y se resuspendieron las condiciones en 100 µL. Estas muestras se enviaron a Barcelona, al Instituto de Biotecnología de Cataluña, donde la Dra. Sílvia Pujals preparó las muestras para el microscopio STORM.

Se prepararon las cámaras para los EVs uniendo un cubreobjetos de 24x24 mm y un grosor de 150 µm a un portaobjetos con cinta de doble cara en dos de sus lados. A continuación, se incubó en la cámara una mezcla de anti-CD9 y anti-CD81 a temperatura ambiente durante 10 min, cargando 35 µL cada vez, cuya función sería capturar los EVs al cargarlos. El exceso se lavó con 60 µL de PBS. Después, se introdujeron los EVs, 10-15 µL a una concentración de 104 EVs/mL y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min. Finalmente, se añadieron 60 µL del buffer GLOX y se selló la cámara con laca de uñas. Las imágenes fueron procesadas por la doctora Sílvia Pujals y analizadas con QuPath.

Para el ensayo de colocalización entre FAP y las vesículas, se sembraron 10⁴ fibroblastos primarios por placa en placas IBIDI de 35 mm, con fondo de cristal (IBIDI, ref. 81158) y se dejaron crecer 24 h. Transcurrido este tiempo, se administraron 10⁴ EVs/placa y se incubaron durante 1 h. Después se procedió a la fijación con PFA al 4% y se continuó con el protocolo habitual de inmunofluorescencia, descrito en el apartado anterior, utilizando como anticuerpos primarios anti-FAP de conejo para marcar FAP en los fibroblastos y anti-CD63 de ratón para identificar las EVs. Como anticuerpos secundarios se utilizó Alexa Fluor 594 anti-rabbit contra anti-FAP y Alexa Fluor 647 anti-mouse contra anti-CD63. Tras la incubación de los anticuerpos secundarios, las placas se lavaron con PBS, se mantuvieron hidratadas con 1 mL de PBS y se sellaron con Parafilm hasta su envío a Barcelona, donde la Dra. Sílvia Pujals tomó y procesó las imágenes. Posteriormente, estas fueron analizadas con QuPath, utilizando esta aplicación para buscar y marcar las colocalizaciones de FAP-CD63, que fueron contadas y clasificadas según su interacción: parcial o completa. Adicionalmente, se analizó la densidad de colocalizaciones FAP-CD63 por µm² de área celular analizada.

Visualización por microscopía TEM

Los EVs CAR se fijaron con PFA al 4% antes de proceder con la tinción negativa. Se colocaron 3 µL de los EVs sobre una lámina de Parafilm y sobre esta, una rejilla de níquel o cobre recubierta con formvar, con éste orientado hacia la muestra, dejando reposar 5 min a temperatura ambiente. Después, se retiró la rejilla, se quitó el exceso con papel de filtro y se colocó una gota de acetato de uranilo al 2 % durante 5 s, volviendo a retirar el exceso. Se lavó la muestra dos veces con tres gotas de agua desionizada y se secó al aire hasta su observación. Para la visualización, se utilizó un microscopio de transmisión JEOL-JEM 1011, y las imágenes se tomaron a un voltaje de aceleración de 80 kV, con magnitudes de aumento de entre 6000 y 29 000 aumentos, usando una cámara CCD de escaneo lento GatanUltraScan 100 y su software (16).

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Visualización por microscopía AFM

Para la visualización de vesículas por AFM, se diluyeron las muestras de EVs CAR, resuspendidas en PBS a una proporción 1:1000 en agua MilliQ, justo antes de la aplicación de la muestra. Se echó 1 μL sobre el porta y se dejó secar al aire unos 15 min. Para la visualización, se usó un microscopio ezAFM (NanoMagnetic Instruments), un porta de vidrio recubierto de óxido de silicio y una cantilever probe PPP-NCLR (NanoSensors), con una frecuencia de resonancia de 190 Hz y una constante de fuerza de 48 μN . Se utilizó un modo dinámico (*tapping mode*) y se mantuvo una amplitud de oscilación en torno a 2 V. Las imágenes obtenidas de topografía, amplitud y fase se analizaron con el software WSxM 4.0 Beta 10.0.

Generación de hECCTs

Todos los reactivos para la generación de tejido cardiaco conectivo humano por ingeniería (hECCT, *human Engineered Cardiac Connective Tissue*) se mantuvieron en frío, a 4°C. Primero, se preparó el DMEM 2x suplementado, que consistió en 20% mL de DMEM 10x (ThermoFisher Scientific), 20% FBS, 2% penicilina/estreptomicina (10 000 U/mL, 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), en agua esterilizada. Cada hECCT se formó a partir de una mezcla con volumen final 180 μL , de los cuales: 46,52 μL de colágeno tipo I bovino 0,3 mg/hECCT (Nutragen #5010, Advanced Biomatrix); 46,52 μL de DMEM 2x suplementado; 4 μL de NaOH 0,2 M y 82,96 μL de células a $9,056 \times 10^6$ cél/mL para poner 750 000 células por hECCT. Estas células, que fueron fibroblastos primarios o fibroblastos inmortalizados, según el experimento, se cultivaron en FM Plus suplementado y se recogieron levantándolas con tripsina, después se centrifugaron y se resuspendieron a la concentración mencionada. Primero, se añadió el DMEM 2x, después se echó el colágeno lentamente, debido a su alta viscosidad, y se mezcló con el DMEM evitando la formación de burbujas; a continuación, se añadió el NaOH, para corregir el pH, por lo que se mezcló gota a gota hasta que el color del medio viró de amarillo a rojo (pH 7,4) y, finalmente se añadieron las células, mezclando bien y evitando la formación de burbujas.

De esta mezcla, se tomaron 180 μL y se dispusieron de manera unidireccional en forma de aro en un pocillo de una placa que posee dos púas en cada pocillo, de manera que el aro ha de disponerse rodeando por fuera ambas púas, sin pasar en ningún momento entre ellas. A la hora de incubación a 37°C, se produce la primera polimerización y estructuración de la mezcla, pudiéndose ver ya la forma de aro y se añadió entonces el FM Plus suplementado (500 μL) (22).

Tras 24 h, se añadieron los tratamientos correspondientes (TGF- β 5 ng/mL u 8 ng/mL, EVs 4×10^4 o la Prot-FeNCs a 5 mM), agregándolos directamente o diluidos en medio, y volviendo a echar el tratamiento cada vez que se cambiaba el medio, cada dos días.

Análisis de parámetros físicos en hECCTs

La deflexión de las púas se midió diariamente tomando una imagen desde la vista superior de la placa, iluminando la misma con luz oscura, ya que las púas de los pocillos eran fluorescentes (Fig. S3A). Las imágenes se tomaron desde un trípode fijo, de tal manera que la cámara (Nikon D90, DX AF-S NIKKOR 18-105 mm) estuviera siempre en el mismo punto.

El análisis de las imágenes se realizó con ImageJ 1.54g, midiendo la distancia en píxeles entre las púas de forma diaria hasta llegar a los 13 días para los hECCTs de fibroblastos inmortalizados y 5 días para los fibroblastos primarios. Los datos de contracción se analizaron después con el software GraphPad Prism 9.0. Para analizar la diferencia de

contracción entre condiciones, primero se aplicó el test de normalidad de Shapiro-Wilk y posteriormente se realizó el test estadístico correspondiente: test t de Student y ANOVA de una vía, o los test no paramétricos correspondientes: test t de Welch y ANOVA de Welch, estableciendo una $\alpha=0,05$ y un valor $*p < 0.05$, $**p < 0.005$, $***p < 0.0005$, $****p < 0.0001$.

Además, el último día, se tomaron las fotos necesarias para estudiar la compactación, a través del estudio del volumen y perímetro de los hECCTs. Se fotografiaron los hECCTs desde la vista superior, introduciendo la placa bajo una lupa y estableciendo la escala con una regla; y desde ambos laterales, extrayendo las púas con el hECCT y posándolos sobre una placa con PBS (para mantener la hidratación del hECCT). Estas imágenes se procesaron con QuPath y obteniendo el área de la sección transversal (CSA) y el perímetro, se obtuvo el volumen del hECCT (Fig. S3A). Después, los datos fueron analizados con GraphPad Prism 9.0, realizando los tests correspondientes, mencionados anteriormente.

Análisis de la expresión de genes profibróticos

Se extrajo el RNA total de las células en cultivo y hECCTs con el reactivo comercial NZYol (NZYTech), siguiendo el protocolo de la casa comercial. En el primer paso de incubación con trizol, las células se incubaron con 1 mL por 5 min agitando en vórtex y los hECCTs se incubaron con 500 μ L durante 40 min, con agitación en vórtex cada 10 min, aproximadamente. Se resuspendió el RNA en 20-50 μ L de agua libre de nucleasas y se almacenó a -20°C hasta su cuantificación. La cuantificación se realizó en un Nanodrop 2000C (Thermo Fisher).

Después, se retrotranscribió el RNA a cDNA, usando el kit comercial NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso. Para realizar las PCRs a tiempo real, se diluyó el resultado directo de la retrotranscripción 1:10 en agua libre de nucleasas y se siguió el protocolo comercial de PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, nº de catálogo A25741). Los primers que se utilizaron se recogen en una tabla (Fig. S3B).

Las PCRs se realizaron en un sistema de PCR a tiempo real (StepOne, Applied Biosystems), configurando los ciclos de temperatura para comenzar a 95°C 10 min, y luego realizar 40 ciclos de 95°C durante 15 s seguido de 60°C durante un min. Las qPCRs se analizaron mediante la cuantificación relativa entre muestras, que se expresó como el cambio de expresión relativo entre la muestra y el control, correspondiente a la expresión de células sin tratar del mismo tipo celular, utilizando triplicados.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, deseo expresar mi más profundo agradecimiento a mi tutora Ana Villar, por no sólo dirigir este trabajo, sino por haberme contagiado su entusiasmo por este tema de investigación y haberme guiado desde la cercanía y la profesionalidad más absoluta. Me resulta igualmente imprescindible reconocer a mi co-directora Helena Soto, cuya implicación constante y dedicación durante mi estancia en el laboratorio han sido fundamentales para todo mi aprendizaje estos meses. Y, por último, me gustaría extender mi gratitud y admiración a todo el equipo de FIBROHEART, por acogerme con calidez y hacerme sentir parte del grupo desde el primer día, ayudándome y enseñándome siempre con una sonrisa.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

Más allá del ámbito académico, quiero dedicar esta tesis a mi madre, que lo es todo para mí y me ha empujado siempre a lograr mis metas. A mi novia, por apoyarme siempre, quererme con paciencia y sacar lo mejor de mí cada día. Y a mis amigas, por convertirse en mi familia fuera de casa y hacer de esta etapa en la universidad un recuerdo memorable.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kurose H. Cardiac Fibrosis and Fibroblasts. *Cells* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Apr 14];10(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34359886/>
2. Liu M, López de Juan Abad B, Cheng K. Cardiac fibrosis: Myofibroblast-mediated pathological regulation and drug delivery strategies. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2025 Apr 14];173:504–19. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33831476/>
3. Morfino P, Aimò A, Castiglione V, Gálvez-Montón C, Emdin M, Bayes-Genis A. Treatment of cardiac fibrosis: from neuro-hormonal inhibitors to CAR-T cell therapy. *Heart Fail Rev* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2025 Apr 14];28(2):555. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9553301/>
4. Travers JG, Kamal FA, Robbins J, Yutzey KE, Blaxall BC. Cardiac Fibrosis: The Fibroblast Awakens. *Circ Res* [Internet]. 2016 Mar 18 [cited 2025 Apr 14];118(6):1021–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26987915/>
5. Tallquist MD. Cardiac Fibroblast Diversity. *Annu Rev Physiol* [Internet]. 2020 [cited 2025 Apr 14];82:63–78. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32040933/>
6. Tarbit E, Singh I, Peart JN, Rose-Meyer RB. Biomarkers for the identification of cardiac fibroblast and myofibroblast cells. *Heart Fail Rev* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Apr 14];24(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29987445/>
7. Leask A, Abraham DJ. TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB J* [Internet]. 2004 May [cited 2025 Apr 14];18(7):816–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15117886/>
8. Krepela E, Vanickova Z, Hrabal P, Zubal M, Chmielova B, Balaziová E, et al. Regulation of Fibroblast Activation Protein by Transforming Growth Factor Beta-1 in Glioblastoma Microenvironment. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Feb 1 [cited 2025 Apr 14];22(3):1–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33494271/>
9. Hamson EJ, Keane FM, Tholen S, Schilling O, Gorrell MD. Understanding fibroblast activation protein (FAP): substrates, activities, expression and targeting for cancer therapy. *Proteomics Clin Appl* [Internet]. 2014 Jun 1 [cited 2025 Apr 14];8(5–6):454–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24470260/>
10. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2025 Apr 14];19(4):213–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29339798/>
11. Herrmann IK, Wood MJA, Fuhrmann G. Extracellular vesicles as a next-generation drug delivery platform. *Nat Nanotechnol* [Internet]. 2021 Jul 1 [cited 2025 Apr 14];16(7):748–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34211166/>
12. Jeppesen DK, Zhang Q, Franklin JL, Coffey RJ. Extracellular vesicles and nanoparticles: emerging complexities. *Trends Cell Biol* [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Apr 14];33(8):667–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36737375/>
13. Hu S, Hu Y, Yan W. Extracellular vesicle-mediated interorgan communication in metabolic diseases. *Trends in Endocrinology & Metabolism* [Internet]. 2023 Sep 1 [cited 2025 Jun 2];34(9):571–82. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043276023001133>
14. CAR T Cells: Engineering Immune Cells to Treat Cancer - NCI [Internet]. [cited 2025 Apr 14]. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/research/car-t-cells>

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025

15. Subklewe M, Von Bergwelt-Baildon M, Humpe A. Chimeric Antigen Receptor T Cells: A Race to Revolutionize Cancer Therapy. *Transfus Med Hemother* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2025 Apr 14];46(1):15–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31244578/>
16. RuizdelRio J, Guedes G, Novillo D, Lecue E, Palanca A, Cortajarena AL, et al. Fibroblast-derived extracellular vesicles as trackable efficient transporters of an experimental nanodrug with fibrotic heart and lung targeting. *Theranostics* [Internet]. 2024 [cited 2025 Jun 3];14(1):176–202. Available from: <https://www.thno.org://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>
17. Kurtjak M, Kereiče S, Klepac D, Križan H, Perčić M, Alić VK, et al. Unveiling the Native Morphology of Extracellular Vesicles from Human Cerebrospinal Fluid by Atomic Force and Cryogenic Electron Microscopy. *Biomedicines* [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Jun 3];10(6):1251. Available from: <https://www.mdpi.com/2227-9059/10/6/1251/htm>
18. Życieńska K, Pszczółkowska B, Brzozowska B, Kamiński M, Lorenc T, Olejarz W, et al. Brownian Motion Influence on AFM Exosomes' Size Measurements. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol 23, Page 10074 [Internet]. 2022 Sep 3 [cited 2025 Jun 3];23(17):10074. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/17/10074/htm>
19. Pols MS, Klumperman J. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Exp Cell Res* [Internet]. 2009 May 15 [cited 2025 Jun 3];315(9):1584–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014482708003935?via%3Dihub>
20. Aires A, Maestro D, Ruiz del Rio J, Palanca AR, Lopez-Martinez E, Llarena I, et al. Engineering multifunctional metal/protein hybrid nanomaterials as tools for therapeutic intervention and high-sensitivity detection. *Chem Sci* [Internet]. 2021 Feb 25 [cited 2025 Jun 3];12(7):2480–7. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/sc/d0sc05215a>
21. Than UTT, Guanzon D, Broadbent JA, Leavesley DI, Salomon C, Parker TJ. Differential expression of keratinocyte-derived extracellular vesicle mirnas discriminate exosomes from apoptotic bodies and microvesicles. *Front Endocrinol (Lausanne)* [Internet]. 2018 Sep 11 [cited 2025 Jun 4];9(SEP):318670. Available from: www.frontiersin.org
22. Santos GL, Meyer T, Tiburcy M, Degraeve A, Zimmermann WH, Lutz S. Fibroblast derived human engineered connective tissue for screening applications. *Journal of Visualized Experiments* [Internet]. 2021 Aug 1 [cited 2025 Jun 3];2021(174). Available from: https://www.researchgate.net/publication/354049374_Fibroblast_Derived_Human_Engineered_Connective_Tissue_for_Screening_Applications

Información Suplementaria

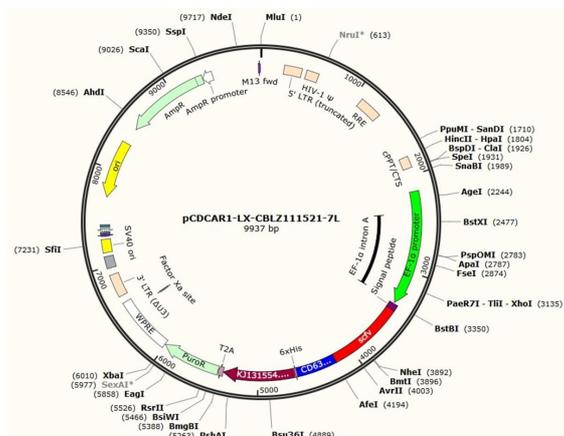
Evaluación del papel protector contra la fibrosis cardíaca de vesículas derivadas de células madre humanas

Diana Huilan Panchuelo Prieto^{1, 2}, Helena Soto Pérez-Cejuela^{1, 2}, Ana V. Villar^{1, 2}

¹Universidad de Cantabria, Santander, España

² Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Santander, España

A



B

Rango de alturas (nm)	n de EVs	Altura EVs (nm)
[25, 75]	21	40,2; 41,6; 43,9; 45,5; 45,7; 46,4; 47,4; 48,6; 50,9; 58,6; 59,1; 59,4; 60,8; 62,5; 65,5; 65,5; 65,9; 68,7; 69,7; 71,8; 73,2
[75, 125]	39	75,3; 76,9; 77,4; 77,4; 77,9; 79,7; 80,1; 80,9; 82,7; 83,1; 83,4; 88,1; 90,7; 91,1; 91,2; 92,9; 93,8; 95,9; 96,2; 97,0; 98,0; 98,8; 99,7; 100,0; 101,0; 101,8; 106,0; 107,0; 109,0; 111,0; 112,0; 112,0; 114,0; 115,0; 116,0; 122,0; 123,0; 123,0; 124,0
[125, 175]	34	126,0; 126,0; 126,0; 128,0; 128,0; 128,0; 131,0; 132,0; 134,0; 134,0; 135,0; 136,0; 138,0; 139,0; 139,0; 140,0; 140,0; 141,7; 144,7; 148,0; 153,0; 154,0; 162,0; 163,0; 164,0; 165,0; 168,0; 168,0; 170,0; 171,0; 171,0; 171,0; 174,0; 174,0
[175, 225]	13	176,0; 177,0; 178,0; 186,0; 188,0; 188,8; 195,0; 198,0; 198,0; 201,0; 204,0; 206,0; 217,0
[225, 275]	8	226,0; 227,0; 234,0; 238,0; 245,0; 264,0; 268,0; 272,0
[275, 325]	7	277,0; 283,0; 284,0; 300,0; 300,0; 301,0; 318,0
[325, 375]	3	343,0; 357,0; 368,0
[375, 425]	4	375,0; 403,0; 418,0; 419,0
[425, 475]	3	446,0; 466,0; 467,0
[475, 525]	3	489,0; 492,0; 495,0

C

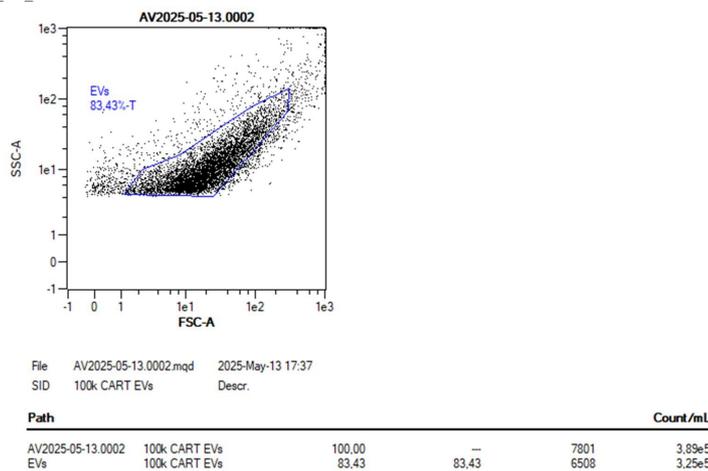


Figura S1. Información adicional sobre la caracterización de EVs CAR

(A) Diagrama sobre la configuración del plásmido introducido en las células HaCaT por transfección viral. Destacan las secuencias que codifican para la ScFv, el dominio transmembrana de CD63, el fluoróforo mNeptune2.5, el gen de resistencia a puromicina y la cola de histidinas His-tag. (B) Tabla con los datos individuales de altura (eje Z) de las 135 EVs analizadas para elaborar el histograma de la Fig. 1F. Cada intervalo incluye el valor inferior y excluye el superior, excepto en el último intervalo. (C) Cuantificación por citometría de flujo de EVs extraídas de HaCaT CAR por ultracentrifugación. Se puede observar la ventana específica para la detección de EVs, mostrando que un 83,43% de los eventos registrados corresponde a EVs.

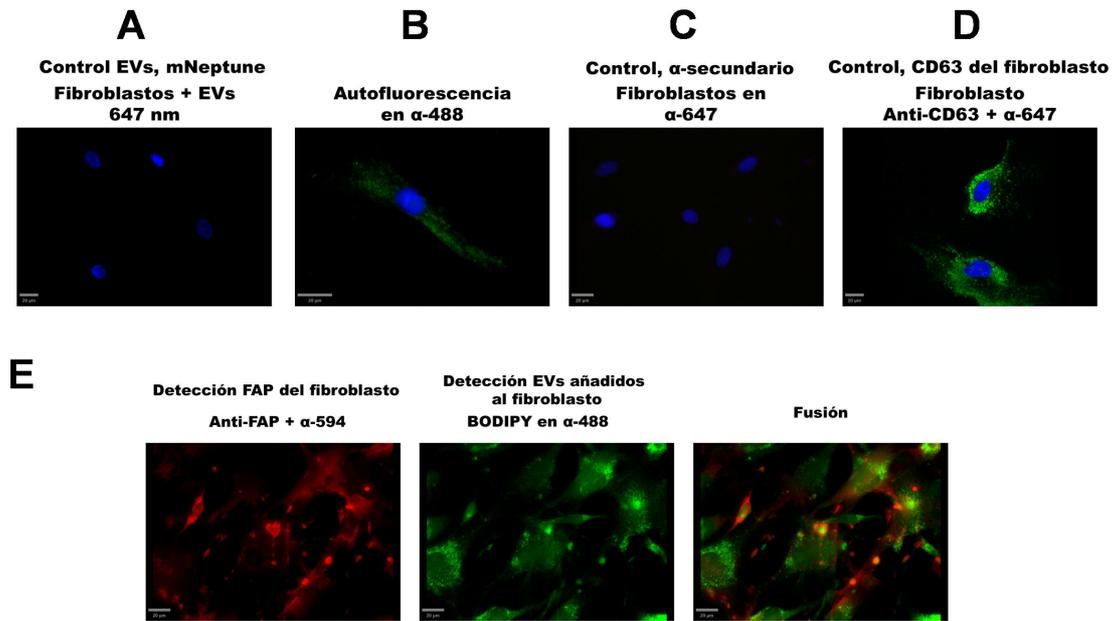
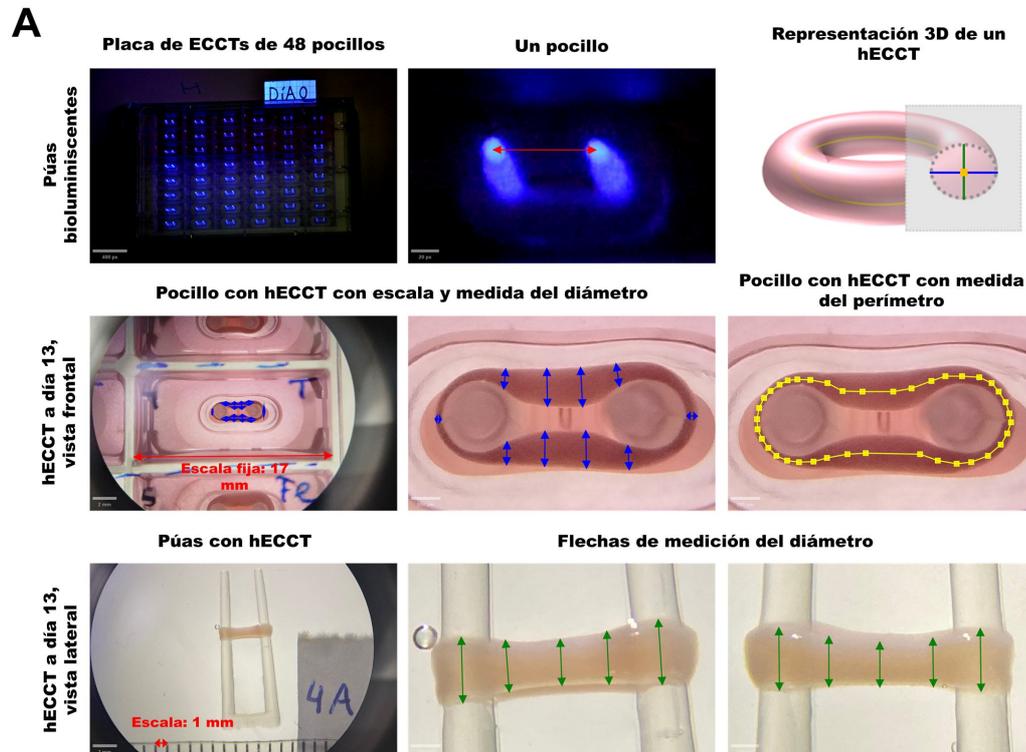


Figura S2. Imágenes de inmunofluorescencia de controles para los ensayos de colocalización entre FAP y las EVs

(A) Imagen representativa de microscopía de epifluorescencia mostrando fibroblastos tratados con EVs. El canal 647 nm fue utilizado para ver la fluorescencia de mNeptune, pero no fue posible. Con DAPI (azul) se muestran los núcleos (B) Imagen representativa de la autofluorescencia que poseen los fibroblastos en el canal 488 nm (en verde). (C) Imagen representativa de la ausencia de autofluorescencia celular en el canal 647 nm para fibroblastos. (D) Imagen representativa de fibroblastos teñidos con un anticuerpo anti-CD63 y la emisión del anticuerpo secundario asociado a 647 nm (verde). Se observa que las células expresan CD63. (E) Imagen representativa de la detección de FAP (rojo) en fibroblastos, la detección de EVs administradas en 488 nm (verde) y la fusión. La presencia de autofluorescencia en el canal de 488 nm impide interpretar de forma concluyente la colocalización entre las EVs y las células.

Trabajo de Fin de Grado

Grado en Ciencias Biomédicas · Facultad de Medicina
2024 – 2025



$$CSA = \pi \times \frac{\text{Diámetro lateral}}{2} \times \frac{\text{Diámetro superior}}{2}$$

$$\text{Volumen} = CSA \times \text{Perímetro}$$

B

GAPDH	Forward	TCTTTTGCCTCGCCAGCC
	Reverse	GTTCTCAGCCTTGACGGTGC
COL1A1	Forward	CCAGCAGATCGAGAACATCC
	Reverse	CAGAGTGGCACATCTTGAGG
FN1	Forward	CTATCACCTGTACCCACACGG
	Reverse	TCAAGCCTTCGTTGACAGAGT

Figura S3. Información adicional sobre metodología

(A) Los paneles muestran cómo se miden los parámetros físicos de los hECCTs para el cálculo de la deflexión de las púas, el perímetro y el volumen. En la fila superior se puede ver la fluorescencia de las púas y la medición de la distancia entre éstas en unidades arbitrarias. El volumen se calcula asumiendo que el hECCT es un toroide, por lo que calculando la sección transversal (CSA) y la longitud (perímetro), se puede calcular el volumen con la fórmula mostrada. La escala para calcular el volumen en mm³ se establece con el tamaño del pocillo o una regla numerada. (B) Tabla con la secuencia de primers utilizados para las PCRs a tiempo real.