

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



**"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 y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:**

***ÚRSULA ALMENDRA ZÚÑIGA CUEVAS***

**Directores de Tesis:  
Dr. Jaime Riquelme Meléndez  
Dr. Sergio Lavandero González**

**Santiago-CHILE**

**Septiembre 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Dirección de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato**

**ÚRSULA ALMENDRA ZÚÑIGA CUEVAS**

**Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Toxicología y Diagnostico Molecular y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día**

---

**Director de Tesis:**

**Dr. Sergio Lavandero**

---

**Director de Tesis:**

**Jaime Riquelme**

---

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

**Dr. Hernán Lara**

---

**Dr. Guillermo Diaz**

---

**Dr. Fernando Ezquer**

---

## Tabla de contenido

Agradecimientos.....	4
Abreviaturas .....	5
Índice Tablas.....	6
Índice Figuras.....	6
Financiamiento.....	7
Resumen.....	8
Abstract .....	10
1. Introducción .....	12
1.1. Enfermedades cardiovasculares y envejecimiento.....	12
1.2. Disfunción endotelial en enfermedades cardiovasculares. ....	12
1.3. Envejecimiento vascular: “inflamm-ageing” y senescencia endotelial.....	14
1.4. Exosomas: potenciales agentes terapéuticos en enfermedades cardiovasculares.....	15
1.5. Exosomas: potencial pro y anti-inflamatorio. ....	18
1.6. Potenciando la capacidad anti-inflamatoria de exosomas en senescencia endotelial: posible papel de la Interleuquina-10. ....	19
2. Hipótesis de trabajo .....	22
3. Objetivo general .....	22
4. Objetivo específico (OE).....	22
Evaluar <i>in vitro</i> si los exosomas aislados de células endoteliales estimuladas con Interleuquina-10 reducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes humanas. ....	22
5. Metodología .....	22
5.1. Cultivo celular.....	22
5.2. Ensayos de tinción con $\beta$ -galactosidasa .....	23
5.3. Determinación de área y perímetro celular.....	24
5.4. Microscopía Electrónica .....	25
5.5. Aislamiento, medición y cuantificación de vesículas extracelulares .....	25
5.6. Western blot.....	26
5.7. Determinación de expresión de IL-6 y CD81 .....	28
5.8. q-RT-PCR.....	28
5.9. Ensayo de cierre de herida.....	30
5.10. Análisis estadístico .....	30
6. Resultados .....	31
6.1. Caracterización del fenotipo senescente en HUVEC.....	31
6.2. Caracterización de la expresión de marcadores pro-inflamatorios en HUVEC.....	34
6.3. Determinación del efecto de IL-10 sobre células endoteliales senescentes. ....	37
6.4. Producción y caracterización de exosomas .....	41
6.5 Efecto de exosomas en células endoteliales senescentes.....	43
6.6. Efecto de exosomas en células de musculo liso.....	45
7.1. Caracterización del fenotipo senescente .....	46
7.2. Caracterización del fenotipo pro-inflamatorio .....	48
7.3. Efecto de la IL-10 sobre los marcadores estudiados.....	52
7.4. Aislamiento y caracterización de exosomas .....	54
7.5. Efecto de los exosomas sobre los marcadores estudiados.....	56
7.6. Efecto de los exosomas en células de músculo liso .....	59
8. Conclusiones.....	61
9. Otras actividades .....	62
9.1. Publicaciones .....	62
9.2. Ayudantías.....	62
10. Bibliografía.....	62

## Agradecimientos

Llegando al final de este proceso de años, es difícil agradecerle a todas y cada una de las personas que formaron parte de este capítulo de mi vida, así que en primer lugar quiero dejar un gracias general a cualquiera que lea esto y sepa que entra en esa lista de personas.

Respecto a mi desarrollo de tesis, no puedo no agradecer a mis tutores de tesis el Dr. Sergio Lavandero, por estar siempre atento y presente en el proceso y al Dr. Jaime Riquelme por ser un guía y profesor excelente, por todo el conocimiento que me ha entregado tango a nivel de laboratorio como a nivel humano, agradezco de todo corazón haber tenido la oportunidad de trabajar no solo con científicos excelentes, pero con buenas personas. Gracias al *“Team Endotelio”*, por todo el trabajo colectivo y las risas, que volvieron la tesis un proceso ameno y con buenos recuerdos.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio siempre dispuestos a resolver mis dudas y dar consejos. Un especial gracias a la Sra. Gindra, a Don Fidel, a Sebastián Leiva y a David Silva, por su infinita paciencia y buena disposición.

Gracias a mi pareja por acompañarme durante todo el proceso de tesis, finalmente lo vivimos juntos y por tanto el apoyo moral fue mutuo y necesario.

Gracias a mi familia, primero por darme la oportunidad de estudiar lo que quisiera donde quisiera y segundo por mantenerme a flote mientras lo hacía, mención honrosa al Frodo por todas esas noches que me acompañó estudiando, analizando datos y escribiendo.

Finalmente, gracias Tata. No alcanzaste a llegar a esta parte, pero me acompañaste toda la carrera. Tú le abriste el camino a esta familia para que todos seamos quienes queramos ser y tu esfuerzo, aunque no estes hoy en físico para verlo, ha dado frutos.

“Everything’s got to end sometime. Otherwise, nothing would ever get started.” -  
11<sup>th</sup> Doctor.

## Abreviaturas

IL-10	: Interleuquina-10.
HUVEC	: Human Umbilical Vein Endotelial Cells, células de vena de cordón umbilical humano.
VCAM-1	: Molécula de adhesión vascular 1.
ICAM-1	: Molécula de adhesión intercelular 1.
eNOS	: Óxido nítrico sintasa endotelial.
IL-6	: Interleuquina-6.
qRT-PCR	: Reacción en cadena polimerasa cuantitativa.
ELISA	: Enzyme-linked ImmunoSorbent assay, ensayo por inmunoadsorciónn ligado a enzimas.
CD81	: Por sus siglas en inglés, Cluster of diferenciación 81. Tetraspanina, proteína específica de exosomas.
ARN	: Ácido ribonucleico.
ARNm	: ARN mensajero.
ng/mL	: Nanogramos por mililitro.
Nm	: Nanómetro
H	: Horas
ECV(s)	: Enfermedad(es) Cardiovascular(es).
NO	: Óxido nítrico.
SASP	: Senescence-Associated Secretory phenotype, Fenotipo secretor asociado a senescencia.
VE	: Vesículas extracelulares.
MVB	: Multivesicular bodies, Cuerpos multivesiculares.
miARN	: micro ARN.
ADN	: Ácido desoxiribonucleico.
EPC	: Células progenitoras endoteliales.
LPS	: Lipopolisacárido.
KO	: Knock-out.
MSC	: Células madre mesenquimales.
M2	: Macrófagos con fenotipo anti-inflamatorio.
TNF- $\alpha$	: Factor de necrosis tumoral alpha
E-Selectina	: Molécula de adhesión de células endoteliales.
EGM-2	: Endothelial Growth Medium 2, medio de crecimiento endothelial 2.
°C	: Grados celsius.
CO <sub>2</sub>	: Dióxido de carbono.
Mm	: Milímetros.
PBS	: Buffer/Tampón fosfato salino.
BSA	: Albumina de suero bovino.
PFA	: Para-formaldehido.

RIPA	: Buffer/Tampón radio inmunoprecipitación, para lisis celular.
PDVF	: Fluoruro de polivinilideno.
mAmp	: Mili-amperes.
Min	: Minutos
TBS-T	: Tris-Base Tween.
cDNA	: ADN sintetizado mediante retro transcripción.
$\beta$ -gal	: $\beta$ -Galactosidasa.
TFAM	: Mitochondrial transcriptor factor A, factor de transcripción mitocondrial A.
NF $\kappa$ B	: Factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de células B activadas.
ExoC	: Exosomas de células control.
ExoIL-10	: Exosomas de células estimuladas con IL-10.
HAECs	: Human Aortic Endothelial Cells, células endoteliales humanas de aorta.
mtADN	: ADN mitocondrial.
ncADN	: ADN nuclear.
HMEC-1	: Células endoteliales microvasculares.

### Índice Tablas

Tabla 1. Concentración de exosomas.....	23
Tabla 2. Lista de anticuerpos.....	27
Tabla 3. Partidores para qRT-PCR.....	29

### Índice Figuras

Figura 1. Tinción $\beta$ -galactosidasa y conteo de células. ....	32
Figura 2. Niveles proteicos de ciclinas asociadas a la senescencia celular. ....	33
Figura 3. Área y perímetro celular. ....	34
Figura 4. Niveles proteicos de marcadores pro-inflamatorios y eNOS.....	35
Figura 5. Expresión de marcadores pro-inflamatorios en senescencia endotelial.	36
Figura 6. Niveles de expresión basal de genes mitocondriales.....	37

Figura 7. Efecto de IL-10 en los niveles proteicos de E-Selectina, eNOS e IL-6 en células senescentes.....	39
Figura 8. Efecto de IL-10 sobre la expresión de p65 e IL-6.....	40
Figura 9. Efecto de IL-10 sobre genes mitocondriales.....	40
Figura 10. Caracterización de exosomas/Vesículas extracelulares pequeñas.....	42
Figura 11. Efecto de los exosomas sobre la expresión de p65 e IL-6 y los niveles proteicos de IL-6.....	44
Figura 12. Efecto de los exosomas sobre la expresión de genes mitocondriales y eNOS. ....	44
Figura 13. Efecto de los exosomas sobre células A7R5. ....	45

### **Financiamiento**

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- Fondecyt de Iniciación 11181000 – Jaime Riquelme Meléndez
- FONDAP 15130011 – Sergio Lavandero González, Jaime Riquelme Meléndez
- Fondecyt 1200490 – Sergio Lavandero González

## Resumen

**Antecedentes:** El envejecimiento y la inflamación crónica de bajo grado son factores de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. También se conoce que la inflamación vascular crónica promueve la disfunción endotelial y que durante el envejecimiento se acumulan células senescentes. Estas presentan cambios fenotípicos característicos que incluyen detención del ciclo celular, alteración de sus funciones, expresión y secreción de factores pro-inflamatorios. Los exosomas (vesículas extracelulares entre 30-150 nm), forman parte de un complejo sistema de comunicación intercelular y han surgido como potenciales agentes terapéuticos en enfermedades cardiovasculares. Su contenido y funcionalidad varía dependiendo del contexto fisiológico y del tipo celular que las generan. La interleuquina-10 (IL-10) es una citoquina con potentes efectos anti-inflamatorios. Sin embargo, se desconoce si la estimulación de las células endoteliales con IL-10 puede promover la producción de exosomas que atenúan el fenotipo pro-inflamatorio asociado a endotelio senescente. **Hipótesis:** Interleuquina-10 estimula la secreción de exosomas con propiedades anti-inflamatorias en células HUVEC y reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células HUVEC senescentes. **Metodología:** Células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVEC) se replicaron hasta alcanzar un estado de senescencia. Para evaluar el establecimiento del fenotipo senescente y pro-inflamatorio, se realizó tinción de  $\beta$ -galactosidasa, medición del área y perímetro celular y se evaluó la expresión de p16, p21, VCAM-1, ICAM-1, E-selectina y eNOS por Western blot. La expresión de Interleuquina-6 (IL-6) y p65 se evaluaron por qRT-PCR. Para evaluar migración celular se realizó el ensayo de cierre de herida con células de músculo liso vascular (A7r5) tratadas con o sin TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Los exosomas de células endoteliales se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Los exosomas se caracterizaron utilizando microscopía electrónica, determinación de CD81 mediante ensayo de ELISA y medición de tamaño y concentración de partículas utilizando *Nanoparticle Tracking Analysis*. **Resultados:** La replicación continua indujo un fenotipo senescente, reflejado en un aumento en el área y perímetro celular, tinción de  $\beta$ -Galactosidasa, expresión de p16, p21 y reducción en

el contenido proteico de eNOS y e-selectina. VCAM-1 e ICAM-1 no se expresaron en células senescentes, pero los niveles de mRNA de IL-6 y p65 se encontraron aumentados en comparación al control. La estimulación de células con IL-10 en concentraciones de 20 o 100 ng/mL por 24 h no redujo la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes. El pre-tratamiento con IL-10 durante 24 h no alteró la concentración, tamaño, morfología o expresión de CD81 en exosomas producidos por células endoteliales, en comparación al control. Asimismo, el tratamiento con  $10^8$  partículas/mL por 24 h de exosomas aislados de células tratadas con y sin IL-10 tampoco disminuyeron la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes. Sin embargo, el tratamiento con  $10^8$  partículas/mL aisladas de células tratadas con o sin IL-10 por 24 h redujeron la migración de células vasculares de músculo liso inducida por TNF- $\alpha$ .

**Conclusiones:** El tratamiento por 24 h con  $10^8$  partículas/mL de exosomas, al igual que el tratamiento por 24 h con IL-10 en concentraciones de 20 o 100 ng/mL, no revierten la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes, pero reducen la migración de células vasculares de músculo liso inducida por TNF- $\alpha$ .

## Abstract

### **Effect of exosomes isolated from endothelial cells treated with Interleukin-10 on the expression of pro-inflammatory markers in human senescent endothelial cells**

**Background:** Aging and chronic low-grade inflammation are risk factors for developing cardiovascular diseases, given that chronic vascular inflammation promotes endothelial dysfunction. During aging, senescent cells accumulate, which present characteristic phenotypic changes that include cell cycle arrest, alteration of their functions, expression, and secretion of pro-inflammatory factors. Exosomes (extracellular vesicles between 30-150 nm) are part of a complex intercellular communication system and have emerged as potential therapeutic agents in cardiovascular diseases. Their content and functionality vary depending on the physiological context and the cell type that generates them. Interleukin-10 (IL-10) is a cytokine with potent anti-inflammatory effects. However, it is unknown whether stimulating endothelial cells with IL-10 can promote the production of exosomes that can attenuate the pro-inflammatory phenotype associated with senescent endothelium. **Hypothesis:** Interleukin-10 stimulates the secretion of exosomes with anti-inflammatory properties in HUVEC and reduces the expression of pro-inflammatory markers in senescent HUVEC. **Methodology:** Human umbilical cord vein endothelial cells (HUVEC) were replicated until reaching a state of senescence. To evaluate the establishment of the senescent and pro-inflammatory phenotype,  $\beta$ -Galactosidase staining, area, and perimeter measurement were performed, and the expression of p16, p21, VCAM-1, ICAM-1, e-selectin and eNOS was evaluated by Western blot. Interleukin-6 (IL-6) and p65 expression were evaluated by qRT-PCR. To assess cell migration, a wound healing assay was performed using vascular smooth muscle cells (A7r5) treated with or without TNF- $\alpha$  (10 ng/mL). Endothelial cell exosomes were isolated by size exclusion chromatography. Exosomes were characterized using electron microscopy, determination of CD81 by ELISA assay, and measurement of particle size and concentration using Nanoparticle Tracking

Analysis. **Results:** Continuous replication induced a senescent phenotype, reflected in an increase in cell area and perimeter,  $\beta$ -Galactosidase staining, expression of p16, p21, and reduction in protein content of eNOS and e-Selectin. VCAM-1 and ICAM-1 were not expressed in senescent cells, but IL-6 and p65 mRNA levels were found to be increased compared to the control. Stimulating cells with IL-10 at concentrations between 20-100 ng/mL for 24 h did not reduce the expression of pro-inflammatory markers in senescent endothelial cells. Pretreatment with IL-10 for 24 h did not alter the concentration, size, morphology, or expression of CD81 in exosomes produced by endothelial cells, compared to the control. Likewise, treatment with  $10^8$  particles/mL for 24 h of exosomes isolated from cells treated with and without IL-10 also did not decrease the expression of pro-inflammatory markers in senescent endothelial cells. However, treatment with  $10^8$  particles/mL isolated from cells treated with or without IL-10 for 24 h reduced TNF- $\alpha$ -induced migration of vascular smooth muscle cells. **Conclusions:** Treatment for 24 h with  $10^8$  particles/mL of exosomes, as well as treatment for 24 h with IL-10 at concentrations of 20-100 ng/mL, do not reverse the expression of pro-inflammatory markers in senescent endothelial cells but reduce migration of vascular smooth muscle cells induced by TNF- $\alpha$ .

## **1. Introducción**

### **1.1. Enfermedades cardiovasculares y envejecimiento**

Las enfermedades cardiovasculares (ECVs) son la primera causa de muerte a nivel mundial, con una prevalencia del 31% de las muertes anuales [1]. Corresponden a patologías que afectan el sistema cardiovascular, como el infarto del miocardio, la hipertensión arterial, la aterosclerosis, la insuficiencia cardiaca, entre otras. Los principales factores de riesgo para el desarrollo de ECVs son: presión sanguínea alta, colesterol elevado, diabetes, obesidad y sobrepeso, tabaquismo, edad avanzada y factores genéticos [1]. Hoy en día, la edad avanzada es un factor de riesgo relevante, ya que la población mayor de 60 años ha aumentado considerablemente. Se estima que entre el 2015 y el 2050, la población mayor a los 60 años aumentará de un 12 a un 22% de la población mundial total [2].

El envejecimiento ocurre debido a la acumulación de daño celular y molecular en el tiempo [2] y se caracteriza por la pérdida progresiva de integridad fisiológica, llevando a la disfunción de tejidos, órganos y sistemas, y aumentando la vulnerabilidad a la muerte. Por lo tanto, no solo es un factor de riesgo para el desarrollo de ECVs, sino también para patologías como cáncer, diabetes y enfermedades neurodegenerativas [3].

### **1.2. Disfunción endotelial en enfermedades cardiovasculares.**

El desarrollo de una ECV afecta la función de todos los tipos celulares de la vasculatura y del miocardio, como el endotelio, músculo liso, fibroblastos y cardiomiocitos. En este contexto, es importante destacar al endotelio. Esta monocapa de células adyacente al lumen de los vasos sanguíneos, se encuentra presente en todo el sistema circulatorio, desde el corazón hasta los capilares más pequeños y presenta un rol clave en la homeostasis vascular, donde la pérdida de ésta se relaciona a múltiples patologías [4]. El endotelio vascular regula el tono vascular, la hemostasis, el tráfico de hormonas, la filtración de fluidos, la fluidez de

la sangre, la producción de moléculas pro-inflamatorias, la angiogénesis, y media respuestas inmunes pro-inflamatorias [4][5].

La disfunción endotelial está caracterizada por un cambio en las funciones del endotelio, donde se reduce la capacidad vasodilatadora (asociada a la disminución de producción de óxido nítrico por el endotelio), se presenta un estado pro-inflamatorio y propiedades pro-trombóticas [6]. La inflamación y el estrés oxidativo son dos condiciones que reducen la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), alterando la función de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y consumiendo el NO disponible, de esta manera la inflamación crónica desencadena disfunción endotelial y ésta, a su vez, genera un estado pro-inflamatorio [6]. Además, la disfunción endotelial puede generarse sin la ocurrencia de una inflamación previa y es capaz por si sola de generar activación endotelial, que corresponde a una etapa temprana de inflamación en la vasculatura [4].

Esta disfunción está asociada con la mayoría de las ECVs, en ocasiones como factor de riesgo para el desarrollo de una, como consecuencia de una, o bien como ambos [7]. Por ejemplo, en la aterosclerosis, que también es un factor de riesgo para el desarrollo de ECVs, muchos de los factores que predisponen a esta enfermedad (como hipertensión arterial, diabetes, tabaquismo e hipercolesterolemia), están relacionados con disfunción endotelial o la promueven [8]. En estas condiciones, las células endoteliales presentan un fenotipo pro-inflamatorio y pro-trombótico, aumentando la expresión de moléculas de adhesión a leucocitos y citoquinas (pro-inflamatorias y proteínas quimioattractantes), que favorecen la adhesión de monocitos a la pared vascular y formación de la placa de ateroma [8].

La inflamación tiene un rol esencial en todas las etapas del desarrollo de la aterosclerosis [9], se ha descrito que el NO producido por el endotelio presenta propiedades anti-inflamatorias, pero en condiciones de disfunción endotelial, la producción y biodisponibilidad de NO se ve disminuida. Por lo que, en conjunto con

una disminución en la vasodilatación, se promueve un fenotipo endotelial pro-inflamatorio que favorece el desarrollo de aterosclerosis [10]. De esta manera, las alteraciones en la función endotelial mediada por la inflamación juegan un papel esencial en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y otras ECVs.

### **1.3. Envejecimiento vascular: “inflamm-ageing” y senescencia endotelial.**

El envejecimiento es un proceso natural que ocurre debido a la acumulación de daño en las células a medida que progresa el tiempo [2], afectando entre otros, al sistema cardiovascular y conduciendo a una mayor incidencia de ECVs, incluyendo hipertensión arterial, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis y las complicaciones asociadas a esta última, como el infarto del miocardio [11].

En organismos envejecidos o de edad avanzada se presenta un estado de inflamación sistémica crónica. A este estado se le acuñó el nombre de “inflamm-ageing” [11] y se encuentra asociado a fragilidad, discapacidad motora y cognitiva, y a la mortalidad general asociada a la edad avanzada, además de ser un factor de riesgo para la mayoría de las enfermedades crónicas degenerativas incluyendo cáncer, demencia, enfermedades renales y ECVs. Las ECVs promueven también la inflamación, potenciando aún más el vínculo entre inflamm-ageing y el desarrollo de ECVs [11].

La senescencia celular es uno de los mecanismos asociados a la aparición de inflamación crónica con la edad. La senescencia es una respuesta al estrés y daño donde las células entran a un arresto permanente del ciclo celular [12]. Estas células experimentan cambios en la expresión de genes que alteran la función celular, este proceso puede ocurrir cuando una célula se ha replicado constantemente, acumulando daños moleculares o bien cuando ha sido sometida a estrés de manera constante, lo que también genera daños moleculares. Con el paso del tiempo, el organismo acumula estas células senescentes que no logran ser eliminadas mediante apoptosis y estas promueven la aparición o transformación de más células senescentes, lo cual lleva al envejecimiento tisular [13].

Estos cambios resultan en un fenotipo pro-inflamatorio, pro-ateroesclerótico y pro-trombótico en las células endoteliales. Las células endoteliales senescentes presentan un fenotipo hipersecretor o secretor activado por senescencia (SASP, por su sigla en inglés), principalmente de moléculas pro-inflamatorias [14]. Estos cambios desencadenan finalmente el desarrollo de disfunción endotelial y si bien no todas las células endoteliales de la vasculatura experimentan senescencia al envejecer, con el tiempo se acumulan suficientes células senescentes para afectar la función de células endoteliales sanas adyacentes a ellas [12].

La desregulación del ciclo celular, estrés oxidativo, alteración en la señalización de calcio, hiperuricemia e inflamación vascular, están implicadas en el desarrollo y progresión de la senescencia endotelial [15]. El aumento de ECVs en el envejecimiento se debe en parte a la senescencia endotelial que conlleva la inflamación y disfunción vascular esto debido a la disminución de NO disponible [16,17] y al aumento de la secreción de moléculas pro-inflamatorias [18]. En este contexto, la senescencia de las células endoteliales es un proceso fisiopatológico de cambios estructurales y funcionales, incluyendo desregulación del tono vascular, aumento de la permeabilidad del endotelio, rigidez arterial, disminución de la angiogénesis y reparación vascular, reducción de la biogénesis mitocondrial en células endoteliales y disminución de la mitofagia [15]. La inflamación es común a la mayoría de las ECVs y al igual que la disfunción endotelial aumenta con la edad, es que la inflamación en el endotelio senescente es un importante blanco terapéutico para desarrollar potenciales tratamientos o prevención de ECVs, en especial para pacientes de edad más avanzada, donde estas son más prevalentes.

#### **1.4. Exosomas: potenciales agentes terapéuticos en enfermedades cardiovasculares.**

Las vesículas extracelulares (VE) son novedosos mediadores de la comunicación endocrina entre células, por cuanto presentan la capacidad de transportar proteínas y ácidos nucleicos de una célula a otra, participando así de la comunicación

endocrina intercelular [19]. Dentro de las VE encontramos a los exosomas, los cuales corresponden a vesículas extracelulares pequeñas formadas por una bicapa lipídica, cuyo tamaño fluctúa entre los 30-150 nm, estos se forman en cuerpos multivesiculares (MVB) y son liberados de las células cuando los MVB se fusionan con la membrana plasmática liberando su contenido [19].

Su acción se basa en el transporte de diferentes cargos hasta células blanco, donde el contenido de los exosomas es interiorizado mediante endocitosis o mediante su fusión con la membrana celular [19]. Se han aislado exosomas secretados de numerosas líneas celulares y de la mayoría de los fluidos corporales, incluyendo saliva, orina y plasma, lo que sugiere que son un sistema de comunicación general para todo el organismo [20].

Los exosomas pueden contener y transportar diferentes moléculas como: proteínas (por ejemplo: citoquinas, factores de transcripción, factores de crecimiento), lípidos, mRNAs, miRNAs e incluso trozos pequeños de DNA, y pueden ser incorporados selectivamente a células vecinas o distantes a la célula de donde se liberaron, reprogramando a las nuevas células recipientes, dependiendo de sus componentes [21]. Las moléculas entregadas por los exosomas pueden actuar a nivel de receptores intracelulares y nucleares, activando vías transduccionales o directamente regulando la expresión génica en las células blanco [21].

Su contenido se puede considerar representativo del estado de una célula, ya que responden al contexto fisiológico (o patológico) en el cual se encuentra dicha célula o tejido de origen del exosoma, por lo que se les ha considerado un rol como posibles biomarcadores de diferentes patologías [22]. Los exosomas están siendo investigados como potenciales vehículos para la entrega de diferentes fármacos o moléculas endógenas, al ser incorporados selectivamente por las células (disminuyendo así efectos secundarios de sus contenidos en tejidos o células no deseadas), evitando la degradación enzimática de las moléculas que transportan y evitando su reconocimiento por el sistema inmune [21]. En este sentido, comprender

como se regula la formación de exosomas, su contenido específico, su especificidad por células blanco y sus diferentes efectos dependiendo de los contextos fisiológicos es de especial interés para su futuro uso como agentes terapéuticos.

El estudio de la participación de exosomas en diversas patologías ha cobrado relevancia en los últimos años y la evidencia pre-clínica sugiere su potencial como agentes terapéuticos. En el contexto de las ECV, los exosomas pueden presentar una acción cardioprotectora. El pre-tratamiento con exosomas aislados del plasma de ratas sanas reduce la muerte celular de cardiomiocitos de rata adultos expuestos a isquemia/reperfusión *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* [23]. Posterior a estos hallazgos, se determinó que exosomas aislados de plasma de ratas sanas reducen la muerte celular de cardiomiocitos de ratas diabéticas sometidos a isquemia/reperfusión *in vitro* [24]. Cabe señalar que también los exosomas endoteliales reducen la muerte celular de cardiomiocitos de rata adulta en isquemia/reperfusión *in vitro* [25]. Además, otro estudio mostró que exosomas aislados de células progenitoras endoteliales (EPC), las cuales se utilizan como terapia pro-angiogénica y para atenuar el daño por isquemia, por si solos reducen la muerte por apoptosis de células endoteliales tratadas con el lipopolisacárido (LPS), promueven la angiogénesis y migración celular [26]. Sin embargo, exosomas aislados de EPC provenientes de un ratón knockout (KO) para el gen de interleuquina 10 (IL-10) (modelo que simula una inflamación sistémica), pierden la capacidad de generar estos efectos y en el caso de la migración, si bien pueden inducirla, la respuesta de las células es menor en comparación con las tratadas con exosomas de EPC *Wild type* [26]. Además, exosomas de EPCs de ratones KO para IL-10 presentan una capacidad protectora reducida en comparación a exosomas de EPC normales frente a un infarto del miocardio [27]. Todos estos antecedentes sugieren que el contexto fisiológico en el que se generan los exosomas afecta su funcionalidad y ellos pueden también ser utilizados como tratamiento en estados patológicos.

### **1.5. Exosomas: potencial pro y anti-inflamatorio.**

Hasta ahora, el papel anti-inflamatorio de los exosomas no ha sido explorado en profundidad. Estudios con células madre mesenquimales (MSC) derivadas de tejido adiposo indican que VE aisladas de estas células estimulan la polarización de macrófagos a su fenotipo anti-inflamatorio o de resolución de la inflamación (M2), sugiriendo potenciales efectos anti-inflamatorios [28]. También se han usado vesículas aisladas de MSC para tratar enfermedades inflamatorias pulmonares y los resultados han sido variables [29,30], pero se ha observado que, en condiciones de hipertensión pulmonar, las VE aisladas de MSC reducen la inflamación [31]. Principalmente, los estudios del papel anti-inflamatorio de exosomas y VE se han realizado en base a MSC, debido a que estas células presentan propiedades anti-inflamatorias y son utilizadas en diferentes terapias, aunque su administración presenta algunos riesgos, tales como su potencial oncogénico, contaminación con bacterias al momento de aislarse y el proceso de testeado que esto conlleva y principalmente, la optimización y estandarización de la dosis, fuente, ruta de entrega y temporalidad de un tratamiento con MSC, por lo que se están buscando alternativas más simples que su uso, como por ejemplo, el uso de VE [29].

Diferentes estímulos cambian el perfil de los exosomas, alterando su contenido, secreción y efecto. Por ejemplo, condiciones de estrés celular (como hipoxia, activación con TNF- $\alpha$  o altas concentraciones de glucosa), se ven reflejadas en el contenido de proteínas y RNA de exosomas aislados de células endoteliales [32]. También los exosomas aislados de diferentes tipos celulares cardiacos (cardiomiocitos, fibroblastos, células endoteliales, adipocitos, etc.) presentan diferentes contenidos y funciones [33].

Las células senescentes presentan un fenotipo hipersecretor de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y metaloproteinasas de matriz extracelular. Los exosomas juegan un papel importante como mediadores de los efectos de las células senescentes en su microambiente [34]. Las células endoteliales senescentes presentan una mayor producción y secreción de vesículas

extracelulares pequeñas (dentro de las que se encuentran exosomas) [35], pero no se ha determinado si presentan diferencias en su contenido y función respecto a los exosomas aislados de células endoteliales control.

Actualmente, se desconoce si exosomas aislados de células endoteliales “sanas y jóvenes” presentan propiedades anti-inflamatorias, solo se ha determinado que presentan propiedades similares a los exosomas de EPC, cuyos efectos anti-inflamatorios y cardioprotectores son conocidos [36], por lo que potencialmente podrían tener también propiedades anti-inflamatorias. Al contrario, las VE aisladas de células endoteliales estimuladas con TNF- $\alpha$ , que corresponde a un estímulo pro-inflamatorio, generan un estado pro-inflamatorio en otras células endoteliales [37]. Adicionalmente, exosomas aislados de EPC con un KO de IL-10 (pérdida de estímulo anti-inflamatorio), pierden su funcionalidad [26] y activan la vía de señalización pro-inflamatoria de NF $\kappa$ B, generando un contexto inflamatorio en la vasculatura [27]. Estos hallazgos sugieren que los exosomas de células endoteliales pueden determinar o regular el estado del endotelio, ya sea promoviendo la inflamación en respuesta a diferentes estímulos y por consiguiente disfunción endotelial, o bien, manteniendo un estado fisiológico normal del endotelio. Esta evidencia presenta la posibilidad de que al estimular células endoteliales con moléculas anti-inflamatorias, se generen exosomas con propiedades anti-inflamatorias, de la misma manera que ocurre con estímulos pro-inflamatorios. En este sentido, estos exosomas podrían ser utilizados para tratar la inflamación asociada a la senescencia endotelial, disminuyendo así el riesgo de desarrollo de aterosclerosis y otras ECVs.

#### **1.6. Potenciando la capacidad anti-inflamatoria de exosomas en senescencia endotelial: posible papel de la Interleuquina-10.**

Tomando en cuenta la relevancia de la inflamación asociada a la edad avanzada en el desarrollo de la disfunción endotelial y el riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares, es necesario buscar nuevas terapias que tengan como blanco reducir la inflamación para mejorar la función endotelial, esto debido a

que la población de edad avanzada está aumentando considerablemente en el mundo y por tanto tratar las enfermedades relacionadas a la edad, como lo son las ECVs, es clave para asegurar una mejor calidad de vida a este grupo de la población. Los exosomas podrían ser candidatos para la reducción de la inflamación en el endotelio, pero este campo se encuentra poco explorado. En dicho sentido, una potencial estrategia terapéutica podría considerar la capacidad de los exosomas de cambiar su contenido y funcionalidad en respuesta a estímulos - beneficiosos o perjudiciales- a los que se exponen las células que los originan.

Un potente estímulo anti-inflamatorio es la Interleuquina-10 (IL-10), la cual inhibe la activación de diversas células del sistema inmune, por lo cual se le atribuye el rol de limitar y terminar las respuestas inflamatorias [38]. La IL-10 regula el crecimiento y diferenciación de células del sistema inmune y de las células endoteliales [38]. La IL-10 puede recuperar la función de EPC estimuladas con TNF- $\alpha$  [39] y presenta efectos antioxidantes que reducen la activación endotelial [40]. Además, los niveles plasmáticos de IL-10 disminuyen con la edad y su disminución se asocia al aumento de los niveles circulantes de citoquinas pro-inflamatorias y, por tanto, un aumento en el riesgo a padecer eventos cardiovasculares y menos probabilidad de sobrevivirlos [41].

Por estos antecedentes, IL-10 podría ser un agente terapéutico para el tratamiento de diferentes enfermedades autoinmunes e inflamatorias y ECVs. Sin embargo, la administración sistémica de IL-10 para tratamientos de enfermedades autoinmunes no ha sido tan efectiva como se esperaba y ha presentado disímiles efectos entre el laboratorio y la clínica. Su administración requiere de una coordinación entre concentración y temporalidad con los múltiples tipos celulares que conforman el organismo [42]. Por las características anteriormente descritas, los exosomas podrían ser vehículos que transmitan las señales anti-inflamatorias de un estímulo como la IL-10 de forma efectiva.

En el contexto de las ECVs y el inflamm-ageing se ha descrito que la deficiencia de IL-10 en ratones envejecidos genera niveles mayores de disfunción endotelial, reflejado en una reducción en la capacidad de vasodilatación endotelial [43]. Asimismo, la administración de IL-10 recupera la expresión de eNOS disminuida por TNF- $\alpha$  en anillos aórticos de ratón, recuperando su vasodilatación [44]. Esta evidencia indica que la IL-10 se encuentra ligada a la regulación de la inflamación asociada al envejecimiento y aliviar la disfunción endotelial y podría ser un agente terapéutico en el tratamiento de la inflamación asociada al envejecimiento. Hasta la fecha no existe evidencia si IL-10 puede inducir la producción de exosomas que ejerzan efectos que atenúen el “inflamm-ageing” en células endoteliales senescentes. Este potencial agente terapéutico podría ser una alternativa para reducir la inflamación vascular en el contexto del envejecimiento. Por lo tanto, considerando que hasta el momento no se ha descrito si exosomas aislados de células endoteliales presentan propiedades anti-inflamatorias y se requiere expandir el conocimiento en esta área, este proyecto estudia si los exosomas aislados de células endoteliales estimuladas con IL-10 reducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes humanas.

## **2. Hipótesis de trabajo**

Interleuquina-10 estimula la secreción de exosomas con propiedades anti-inflamatorias en células HUVEC y reduce la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células HUVEC senescentes.

## **3. Objetivo general**

Determinar si los exosomas aislados de células endoteliales estimuladas con Interleuquina-10 reducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes.

## **4. Objetivo específico (OE)**

**Evaluar *in vitro* si los exosomas aislados de células endoteliales estimuladas con Interleuquina-10 reducen la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes humanas.**

## **5. Metodología**

### **5.1. Cultivo celular**

Para todos los experimentos de esta tesis se utilizaron células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC) comerciales (Número de Catálogo: C2519A, Lonza), las cuales se mantuvieron en medio de cultivo EGM-2 (Número de Catálogo: CC-3162, Lonza). Los experimentos se realizaron cuando las células alcanzaron entre el 80% al 90% de confluencia y los pasajes se realizaron con Accutase (Acutasa, Número de Catálogo: A6964-100ML, Sigma). Las células se mantuvieron en un incubador a 37° C y en un ambiente de 95% de aire y 5% CO<sub>2</sub>. Para establecer el modelo de senescencia replicativa, las células control se utilizaron entre los pasajes 3-12, mientras que las células senescentes usadas estaban entre los pasajes 18-22. Las células se sembraron en placas de 12 ó 24 pocillos, 35 mm, 60 mm, 100 mm o frascos T75 y cuando alcanzaron la confluencia deseada, se estimularon con IL-10 (217-IL, R&D Systems), TNF- $\alpha$  (210-TA-020, R&D Systems),

PBS-BSA 0,1% o  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas, dependiendo de cada diseño experimental. Para los experimentos con exosomas se utilizaron placas de 60 mm con 1 mL de medio. El volumen de exosomas utilizado corresponde al cálculo de la concentración de  $1 \times 10^8$  partículas/mL para un volumen total de 1 mL en la placa de cultivo. La siguiente tabla muestra el del volumen de partículas utilizado de cada aislamiento de vesículas para obtener la concentración de  $1 \times 10^8$  partículas/mL en 1 mL de medio de cultivo.

**Tabla 1. Concentración de exosomas.**

Número de experimento	Condición experimental	Concentración de partículas/mL	Volumen para obtener $10^8$ partículas/mL
N 1	Control	6,76 <sup>8</sup>	444
	IL-10	1,12 <sup>9</sup>	268
N 2	Control	1,28 <sup>9</sup>	234
	IL-10	1,12 <sup>9</sup>	268
N 3	Control	9,69 <sup>8</sup>	310
	IL-10	6,56 <sup>8</sup>	457
N 4	Control	9,68 <sup>8</sup>	310
	IL-10	1,08 <sup>9</sup>	278

**Tabla 1. Concentración de exosomas obtenida del aislamiento.** Se presenta la concentración de vesículas obtenidas para cada N experimental en partículas/mL según los datos entregados por el NanoSight y el volumen de vesículas utilizado para los experimentos de la tesis.

## 5.2. Ensayos de tinción con $\beta$ -galactosidasa

El fenotipo senescente de células en pasajes tardíos se determinó mediante ensayos de tinción con  $\beta$ -galactosidasa, utilizando el Kit *Senescence-Associated- $\beta$ -galactosidase staining* (#9860, Cell signaling), según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células control y senescentes se cultivaron en placas de 35 mm hasta alcanzar aproximadamente 80%-90% de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia deseada, se removió el medio de las placas, se lavaron una vez con 2 mL de PBS 1x, se agregó 1 mL de solución de fijación la cual se deja actuar por 10 min a T° ambiente. Luego, se lavaron las placas dos veces con PBS

1x y se agregó 1 mL de la solución de tinción  $\beta$ -galactosidasa, las placas fueron selladas con parafilm e incubadas a 37 °C durante la noche en una incubadora seca (sin CO<sub>2</sub>). Al día siguiente, las placas se observaron en un microscopio de luz (Leica LM500) con aumento 10x para la obtención de las imágenes y se obtuvieron imágenes de por 4 campos aleatorios por placa. El conteo de células se realizó con el programa Fiji (ImageJ).

### 5.3. Determinación de área y perímetro celular

Células control y senescentes fueron sembradas en placas de 12 pocillos con cubre objetos. Luego de 24 h, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1x y fijadas con PFA 4% durante 10 min. Luego, las células se lavaron tres veces con PBS 1x y se agregó Tritón X100 0,1 v/v por 10 min para permeabilizar las células. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1x, y se procedió a incubar con solución de bloqueo (BSA/PBS 3% p/v) durante 1 h. Se retiró la solución de bloqueo y se incubó con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) durante toda la noche en una cámara húmeda 4°C. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue recuperado, las células lavadas con PBS 1x e incubadas con el anticuerpo secundario correspondiente en una dilución de 1:100 a T° ambiente por 1 h. Junto con el anticuerpo secundario, se incubó con Rodamina Faloidina (R415 , ThermoFisher) dilución 1:300, para marcar las fibras de actina. Posterior a la incubación con el anticuerpo secundario, éste fue retirado, las células lavadas con PBS 1x e incubadas con tinción nuclear Hoechst (62249, ThermoFisher) dilución 1:500 durante dos min. Finalmente, las células volvieron a ser lavadas con PBS 1x, y se montaron en un portaobjetos con un medio de montaje hidrófilo *antifading* (DAKO, Catalog number: s3023), se esperó que se secase el medio. Las imágenes fueron obtenidas en el microscopio de fluorescencia (ZOE™, BioRad). El área y perímetro de las células fue determinado utilizando el programa Fiji (ImageJ). Por cada N experimental y condición, se promedió el área y perímetro de 100 células diferentes.

#### **5.4. Microscopía Electrónica**

La visualización de los exosomas se realizó por microscopia electrónica en un microscopio de transmisión electrónica Talos F200C G2, luego de un protocolo de marcación con solución de Uranyl. Brevemente, se agregaron 10  $\mu$ L de la muestra de exosomas en una superficie hidrofóbica con Parafilm y luego se montó en una grilla (FSF300-CU Formarv/Carbon 300 Mesh Cu) colocándola sobre la gota por 1 min. Luego, se secó con papel filtro y se incubó la rejilla con la muestra en la solución de Uranyl por 1 min, para finalmente dejarla secar por 5 min en una estufa. Posteriormente, se obtuvieron imágenes de exosomas en el microscopio.

#### **5.5. Aislamiento, medición y cuantificación de vesículas extracelulares**

Para la producción de exosomas, células en pasajes tempranos fueron cultivadas en 3 frascos T75 por condición con 10 mL de medio por cada frasco, hasta alcanzar aproximadamente un 80% de confluencia. Luego, las células fueron estimuladas por 24 h con 20 ng/mL de IL-10 o PBS 1x. Posteriormente, el medio con el estímulo fue reemplazado por 10 mL de medio de cultivo con suero depletado de exosomas, con la finalidad de que todos los exosomas aislados correspondan a los producidos por las células y no se mezclen con los presentes en el suero del medio normalmente utilizado. Luego de 24 h, se recolectó el medio de cultivo en tubos Falcón de 50 mL. Se aislaron exosomas mediante cromatografía de exclusión por tamaño, utilizando las columnas qEV (IZON). En breve, el medio de cultivo fue sometido a tres centrifugaciones de 300 g por 10 min a 4 °C, 2,000 g por 10 min a 4 °C y 10,000 g por 30 min a 4 °C, para eliminar células vivas, muertas y microvesículas del medio, respectivamente. Una vez completadas las centrifugaciones, el medio de cultivo fue centrifugado en tubos Amicon (UFC901096D, Merck) a 5,000 g y 4 °C por 90 min para concentrar la muestra. Finalmente, el concentrado (500  $\mu$ L) fue añadido a la parte superior de la columna qEV, de la cual se recuperan 9 fracciones de 500  $\mu$ L. Las tres primeras corresponden a fracciones ricas en exosomas, por lo que fueron mezcladas y alicuotadas y son las que se utilizaron para los experimentos posteriores con exosomas.

Los exosomas se cuantificaron y medidos a través de análisis de seguimiento de nanopartículas usando un equipo NanoSight NS300.

### **5.6. Western blot**

Para realizar ensayos de Western blot se extrajeron las proteínas de células control y senescentes con sus respectivos estímulos. La extracción se realizó utilizando buffer de lisis RIPA y las células se lisaron de manera mecánica utilizando una espátula. Las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm por 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante en tubos rotulados correspondientemente y las muestras se guardaron a -20°C hasta ser utilizadas.

La cantidad total de proteínas fue cuantificada mediante el ensayo “Pierce BCA protein assay kit” (23225, Thermo Scientific), según instrucciones del kit con modificaciones. Brevemente, las soluciones A y B del Kit fueron mezcladas en una relación 50:1 y se agregaron 200 µL de la mezcla a cada pocillo requerido de una placa de 96 pocillos, luego se agregó 1 µL de muestra, curva estándar o los blancos correspondientes (Agua y RIPA). Finalmente, la placa se incubó a 50 °C, cubierta de la luz y medida en el lector de absorbancia a 560 nm. Las lecturas de absorbancia se transformaron a concentración utilizando la curva estándar.

Para la electroforesis en gel de acrilamida en condiciones denaturantes, las proteínas de cada muestra se prepararon con buffer de carga 4x y cada pocillo de los geles se cargó con 20 µg de proteína o el estándar de masa molecular PageRuler (26616, ThermoFisher). Dependiendo de la masa molecular de las proteínas de interés, se prepararon geles separadores de 8%, para proteínas de alta masa molecular, o en gradiente de sacarosa (20 – 5 %), para proteínas de bajo masa molecular. Una vez cargado el gel, éste se corrió a 80 V por 2 h.

Finalizada la corrida del gel, las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PDVF) mediante electrotransferencia húmeda, la cual se realizó a 400 mA por 90 min. Una vez completada la transferencia, la membrana fue

teñida con rojo Ponceau 1x por 5 seg para confirmar la correcta transferencia de las proteínas. Posteriormente, se bloqueó la membrana con solución de bloqueo (TBS-T 1x – Leche 5%) por 1 h. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo primario correspondiente (Tabla 1) durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue retirado, la membrana lavada tres veces con TBS-T 1x e incubada con anticuerpo secundario anti-mouse o anti-rabbit, según correspondió, a T° ambiente.

Finalmente la membrana se reveló en un equipo Licor, utilizando solución de revelado EZ-ECL. La membrana se incubó en la solución de revelado por aproximadamente 1 min y luego se midió la quimioluminiscencia. En caso de ser necesario, se removieron los anticuerpos de la membrana con solución de *stripping* por 5-7 min, lavada y re-bloqueada con solución de bloqueo para comenzar una nueva incubación con anticuerpos. La densidad de pixeles se determinó mediante el programa Fiji (image J) y los datos fueron normalizados por el control de carga ( $\beta$ -Tubulina).

**Tabla 2. Lista de anticuerpos.**

Anticuerpos	Marca y número de catalogo	Origen	MW (kDa)	Dilución
VCAM-1	Santa Cruz - sc-13160	Mouse	110	1:1000
ICAM-1	Santa Cruz - sc-18353	Mouse	85-110	1:1000
eNOS	BD - 610297	Mouse	140	1:1000
p21	Abcam – ab109520	Rabbit	21	1:1000
p16	Abcam – ab108349	Rabbit	17	1:1000
$\beta$ -Tubulina	Sigma - T-0198	Mouse	50	1:5000
Anti-mouse	Calbiochem - 402335	Rabbit		1:5000
Anti-rabbit	Calbiochem - 401315	Goat		1:5000

**Tabla 2. Anticuerpos utilizados para Western blot.** Lista de todos los anticuerpos utilizados para el desarrollo de esta tesis. Se muestra los nombres del anticuerpos, su marca y numero de catálogo, origen, peso molecular estimado de la proteína y la dilución utilizada para los experimentos.

### **5.7. Determinación de expresión de IL-6 y CD81**

Para la detección del marcador de inflamación IL-6 y el marcador de exosomas CD81, se utilizó la técnica de ELISA, para cada uno se utilizó un kit específico (IL-6: Quantikine ELISA human IL-6, Número de Catálogo: D6050, R&D Systems; CD81: ELISA Human CD81 antigen, Número de Catálogo: CSB-EL004960HU, Cusabo), según las instrucciones del fabricante. Para la detección de IL-6 se utilizó el sobrenadante de las células con los diferentes estímulos y para la de CD81, se utilizó solución de las primeras tres fracciones de elución de exosomas. Cada kit difiere en su protocolo de uso pero, en términos generales, la muestra y la curva estándar fueron agregadas a la placa de ELISA, que presenta unido al fondo de los pocillos el anticuerpo primario. Se incubó por el tiempo indicado, luego se lavó e incubó con el anticuerpo secundario, se lavó nuevamente y se procedió a incubar con la solución de sustrato, que es la que da la señal detectable. Finalmente, se midió la señal en un lector de absorbancia a la longitud de onda indicada por cada kit. Los datos de absorbancia obtenidos fueron convertidos a concentración utilizando una curva con ajuste logarítmico, según las instrucciones de cada kit.

### **5.8. q-RT-PCR**

Para la determinación de marcadores pro-inflamatorios, mitocondriales, entre otros, se determinó los niveles de mRNAs mediante qRT-PCR. Las células se trataron con sus correspondientes estímulos y una vez terminado el tiempo del estímulo, se agregó TRIZOL, se sellaron las placas y se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . La extracción de RNA se realizó bajo campana de extracción con material estéril, se dejó descongelar las placas en hielo, se lisaron las células mecánicamente con la punta de la pipeta, se traspasó el lisado a tubos de microcentrifuga rotulados correspondientemente y se agregó cloroformo en una proporción 1:5 al volumen de TRIZOL, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 g por 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$  para separar las fases. A continuación, se recuperó la fase incolora en tubos con isopropanol en una proporción 1:1 con el volumen recuperado, se mezcló por inversión suavemente y se incubaron las muestras a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre 24 y 48 h.

Luego de la incubación, se centrifugaron las muestras a 12,000 g por 10 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante por volcamiento (cuidando de no perder el pellet), se añadió 1 mL de etanol frío 75% (o 95%), se centrifugó a 12,000 g por 5 min a 4°C, se eliminó el etanol por inversión, se agregó nuevamente 1 mL de etanol, se volvió a centrifugar a 12,000 g por 5 min a 4°C, se eliminó por inversión y se dejó secar el pellet a T° ambiente por aproximadamente 20 min. Una vez evaporado el alcohol, se resuspendió el RNA en agua libre de nucleasas.

Una vez extraído el RNA, este se cuantificó en un equipo nanodrop y se realizó una retrotranscripción utilizando iScript mix (Número de Catálogo: BR1708841, BioRad) para generar cDNA.

Para la realización de qPCR, el mix de reacción contiene: Mix Sybergreen (con polimerasa, cofactores y Sybergreen que es el que da la señal fluorescente medida por el equipo), agua, partidores Forward y Reverse 500 nM y 1 ng de cDNA. Los partidores utilizados para el desarrollo de esta tesis se presentan en la Tabla 2. Los datos obtenidos del PCR se procesaron en base al control de carga (18S) y con el método de la sumatoria, antes de realizarse los análisis estadísticos.

**Tabla 3. Partidores para qRT-PCR.**

Gen	Forward	Reverse
eNOS	GTGATGGCGAAGCGAGTGAA	AACTCTTGTGCTGTTCCGGC
IL-6	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG
p65	TGAACCGAAACTCTGGCAGCTG	CATCAGCTTGCGAAAAGGAGCC
TFAM	GAA CAA CTA CCC ATA TTT AAA GCT CA	GAA TCA GGA AGT TCC CTC CA
PoliCistron	CCCACCCAAGAACAGGGTTT	AATGAGGAGTAGGAGGTTGGC

**Tabla 3. Partidores para qRT-PCR.** Nombre del gen que se busca amplificar y la secuencia de los partidores Forward y Reverse utilizados. Todos los genes corresponden al homólogo humano.

### **5.9. Ensayo de cierre de herida**

Para determinar si los exosomas aislados son funcionales en modelos diferentes al de senescencia endotelial, células A7r5, correspondientes músculo liso de aorta de rata, se utilizaron en los ensayos de cierre de herida.

Las células se cultivaron en placas de 60 mm con medio de cultivo DMEM con suero FBS al 10%, hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego, se cambió este medio al medio DMEM con FBS al 2% para sincronizar el metabolismo de las células. Transcurridas 24 h después del cambio de medio, se realizó una herida en la placa con un punta de pipeta p200, trazando una línea recta a lo largo de toda la placa. Una vez realizada la herida, se cambió el medio de las células a DMEM con FBS 2% y las células se trataron con  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas o PBS 1x como control (considerando 3 mL de medio total en la placa) y 10  $\mu$ M de Brdu (Bromo-di-hidro-uridina) para inhibir la replicación celular. Luego de 30 min de pre-incubación con exosomas, las células se incubaron con TNF- $\alpha$  10 ng/mL o PBS 1x y se obtuvieron 5 imágenes por herida en zonas distintas de la placa utilizando un microscopio de luz (Leica LM500). Luego de 24 h, se obtuvieron las 5 imágenes en los mismos puntos de la placa para realizar un estimado del % de cierre de herida de cada condición experimental.

### **5.10. Análisis estadístico**

Todos los datos se analizaron con el programa GraphPad, Prism 9. Para todos los datos se realizó un test de normalidad y posteriormente, si cumplían con la normalidad, un t-test de dos colas (para datos con solo dos condiciones experimentales) o un ANOVA de una vía, con post test de Dunnet o Tukey (para datos con más de dos grupos experimentales). Los datos fueron presentados como promedio  $\pm$  SD. Se consideraron diferencias significativas \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ . \* $p \leq 0,001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ .

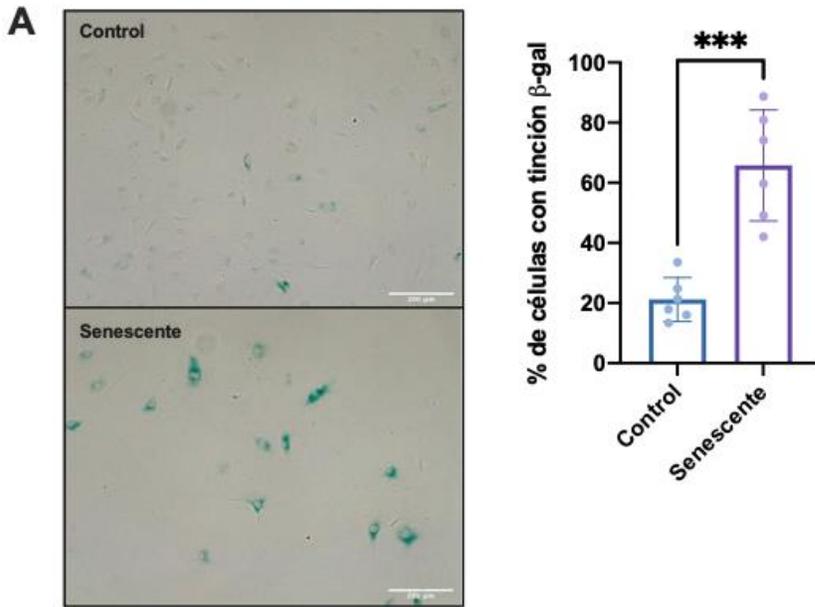
## 6. Resultados

### 6.1. Caracterización del fenotipo senescente en HUVEC

Para evaluar el potencial efecto antiinflamatorio de exosomas endoteliales, se utilizó un modelo de senescencia replicativa en células endoteliales de vena de cordón umbilical humano (HUVEC). Este modelo se basa en replicar las células mediante pasajes continuos hasta que éstas presenten cambios morfológicos y moleculares que indiquen un fenotipo senescente. Se consideró células control (jóvenes) a células entre los pasajes 3 y 12 y senescentes a aquellas entre los pasajes 18-22. Luego del pasaje 22, las células dejan de replicarse y se genera muerte celular, de manera que no es posible utilizarlas para realizar experimentos.

Para establecer el fenotipo senescente en HUVECs entre los pasajes 18-22, se realizó un ensayo de tinción con  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). Las células de pasajes tempranos y tardíos se fijaron y se realizó la tinción  $\beta$ -gal. La Figura 1 muestra que las células de pasajes tardíos presentan un color azul/celeste que corresponde a la tinción, donde el aumento de tinción con  $\beta$ -gal es estadísticamente significativo en comparación con las células control.

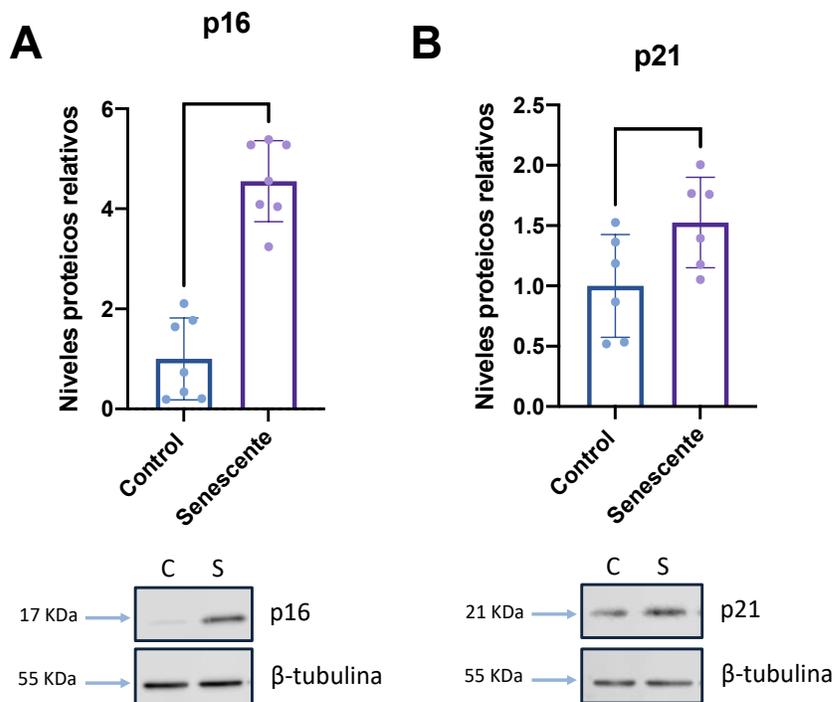
Para corroborar el arresto del ciclo celular, se midieron los niveles proteicos de las ciclinas p16 y p21 por Western blot. El aumento en la expresión de estas ciclinas se asocia a un arresto del ciclo celular y disminución de la replicación. Como se observa en la Figura 2, tanto p16 (Figura 2A) como p21 (Figura 2B) aumentan significativamente sus niveles proteicos cuando las células se encuentran en pasajes avanzados en comparación con las células control. Estos resultados sugieren nuevamente la transición hacia un fenotipo senescente en células de pasajes avanzados.



**Figura 1. Tinción β-galactosidasa y conteo de células.**

A) Imagen representativa y comparación de los niveles de tinción β-galactosidasa entre HUVEC control (P3-12) y senescentes (P18-22).. Imágenes obtenidas con microscopio óptico Leica DM500, aumento 10X, barra de escala 200 μm. Los valores presentados corresponden al promedio) ± la desviación estándar (SD) de 6 experimentos independientes (N=6). Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas,, \*\*\*p ≤ 0,001 versus control.

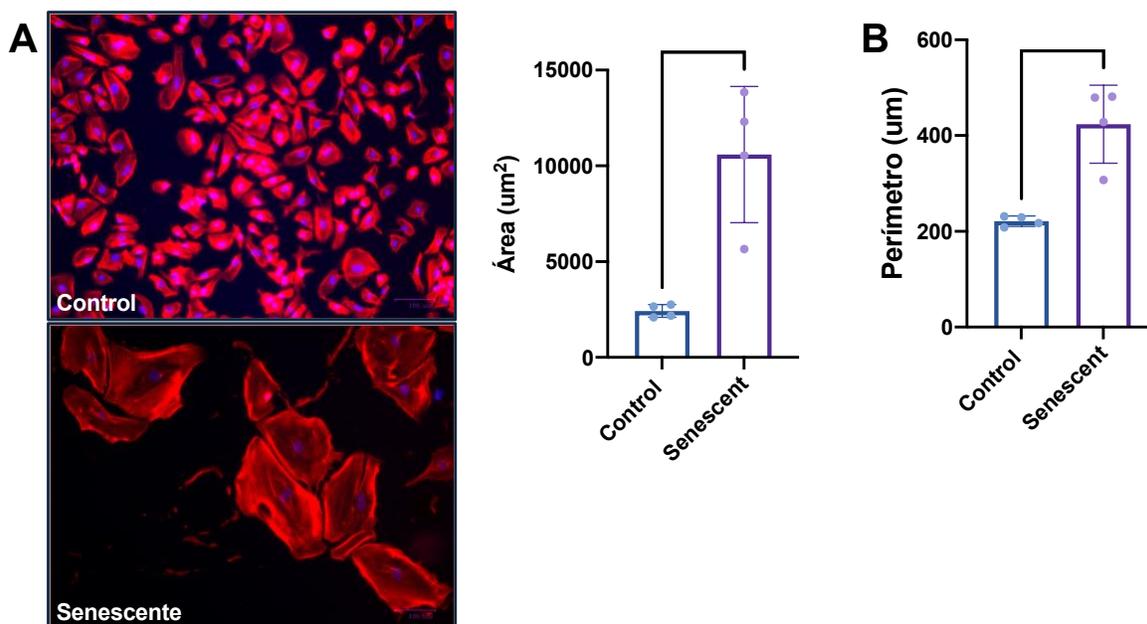
Más allá de los cambios a nivel de la replicación celular, las células senescentes presentan cambios morfológicos que permiten identificar por microscopía que han comenzado a alcanzar la senescencia. Al no ser posible delimitar adecuadamente el perímetro celular al observar las HUVEC con tinción β-gal al microscopio óptico, células de pasajes tempranos y tardíos se fijaron en cubreobjetos, tratadas con tinciones fluorescentes para su citoesqueleto y núcleo y observadas en un microscopio de fluorescencia, con la finalidad de determinar el cambio de área y perímetro de las células en el fenotipo senescente.



**Figura 2. Niveles proteicos de ciclinas asociadas a la senescencia celular.**

Determinación de los niveles proteicos relativos al control de carga ( $\beta$ -tubulina) de A) p16 y B) p21 en HUVEC control y senescentes mediante Western blot (panel superior) e imágenes representativas (panel inferior). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, A) N=6 y B) N=7. Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas, \* $p \leq 0,05$ , \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  versus control

La Figura 3 muestra imágenes representativas de células control y senescentes, donde se puede apreciar un aumento de tamaño de las células senescentes. Se cuantificó el área (Figura 3A) y perímetro (Figura 3B) celular para ambas condiciones. Se observa un aumento estadísticamente significativo del área y perímetro de las células senescentes comparadas con las células control, complementando los hallazgos de las Figuras 1 y 2 y confirmando así el fenotipo senescente.



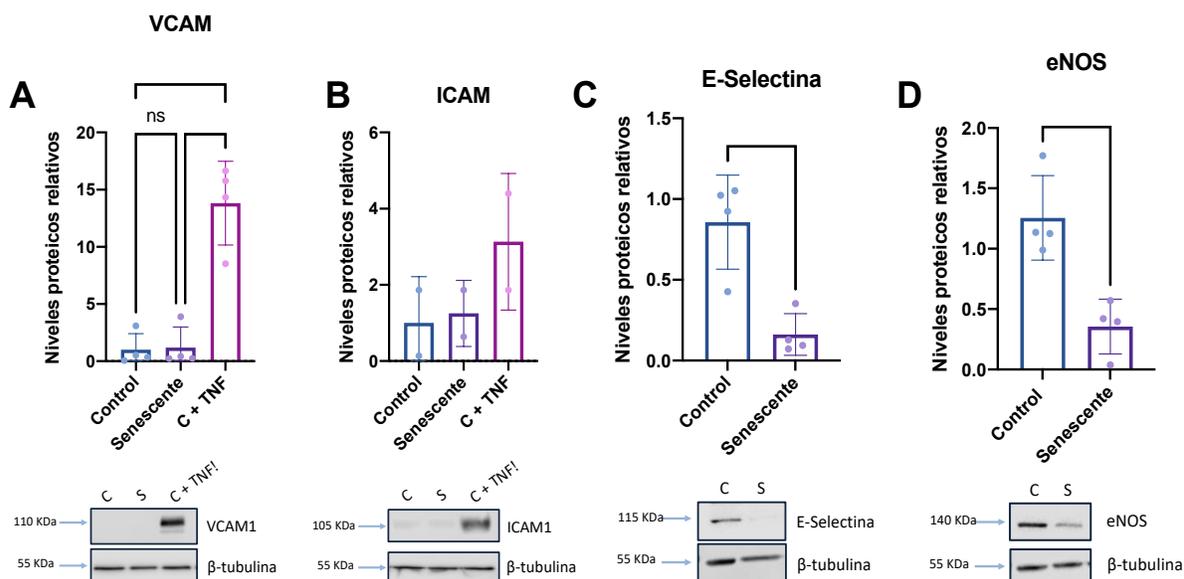
**Figura 3. Área y perímetro celular.**

Determinación e imágenes representativas del A) área y B) perímetro de HUVEC control y senescentes, mediante tinción fluorescente del citoesqueleto y obtención de imágenes con microscopio de fluorescencia ZOE. Barra de escala 100 µm. Tinción roja realizada con Rodamina-faloídina corresponde al citoesqueleto de actina de las células y tinción azul realizada con Hoestch corresponde a tinción del núcleo. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=4. Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas, \*\* $p \leq 0,01$  versus control.

## 6.2. Caracterización de la expresión de marcadores pro-inflamatorios en HUVEC

Para poder determinar si los exosomas tienen un efecto sobre la expresión de marcadores pro-inflamatorios en HUVEC senescentes, es necesario primero caracterizar la expresión de estos marcadores en células senescentes en condiciones basales. Inicialmente se evaluaron 3 marcadores pro-inflamatorios: las moléculas de adhesión VCAM-1 e, ICAM-1, moléculas cuya expresión ha sido descrita en HUVEC en estado pro-inflamatorio [18]. El contenido proteico de VCAM-1 e ICAM-1 en células control y senescentes se evaluó por Western blot. Adicionalmente, se incluyó un control positivo, que consistió en células control estimuladas con 10 ng/mL de TNF- $\alpha$  durante 24 h, debido a que esta citoquina pro-inflamatoria es un conocido inductor de VCAM-1 e ICAM-1 [45].

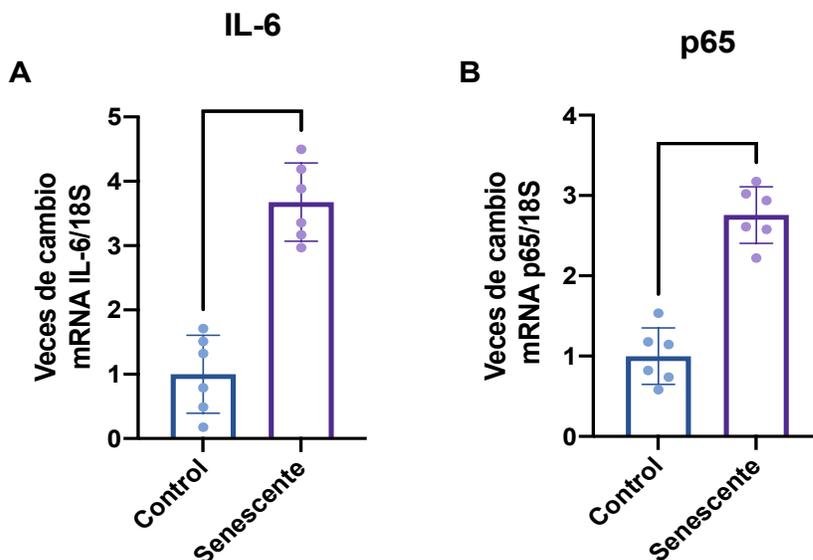
Las Figuras 4A y B muestra que TNF- $\alpha$  induce la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en HUVEC, pero estas proteínas no se expresan en células control y senescentes, lo que sugiere que su aumento no corresponde a parte del fenotipo pro-inflamatorio asociado a la senescencia endotelial en estas células. Debido a estos datos, se evaluaron los niveles proteicos de otras proteínas cuya expresión podría verse alterada en senescencia. Por lo tanto, se determinaron los cambios en los niveles de E-Selectina, otra molécula de adhesión asociada a la inflamación, y eNOS, la cual se espera, en base a lo descrito en la literatura, que disminuya su expresión en células senescentes [18], contribuyendo así a la disfunción endotelial asociada al envejecimiento [6]. En las Figuras 4C y D se presentan los niveles proteicos de E-Selectina y eNOS, respectivamente. Se observa que tanto E-Selectina como eNOS disminuyen significativamente su expresión en células senescentes, en comparación con células control.



**Figura 4. Niveles proteicos de marcadores pro-inflamatorios y eNOS.**

Determinación de los niveles proteicos relativos al control de carga de A) VCAM-1 y B) ICAM-1 mediante Western blot en HUVEC control, senescentes y tratadas con TNF- $\alpha$  10 ng/mL. Determinación de los niveles proteicos relativos al control de carga de C) E-Selectina y D) eNOS mediante Western blot en HUVEC control y senescentes. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, A) N=4, B) N=2, C) N=4, D) N=4. Análisis estadístico: A) Anova de una vía y post test de Tukey, C) y D) t-Test no pareado de dos colas, \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  versus control. Ns= no significativo.

La caracterización del fenotipo pro-inflamatorio en senescencia se complementó mediante la evaluación de la expresión a nivel transcripcional de Interleuquina 6 (IL-6), que es una citoquina pro-inflamatoria [46] y p65, que corresponde a una subunidad del NFκB, complejo proteico que regula respuestas inflamatorias a nivel celular (entre otras funciones) [47]. Los niveles de mRNA se midieron usando qRT-PCR. La Figura 5, tanto IL-6 (Figura 5A) como p65 (Figura 5B) aumentan significativamente su expresión en células senescentes respecto a las células control. Estos resultados confirman que las células senescentes presentan un fenotipo pro-inflamatorio.

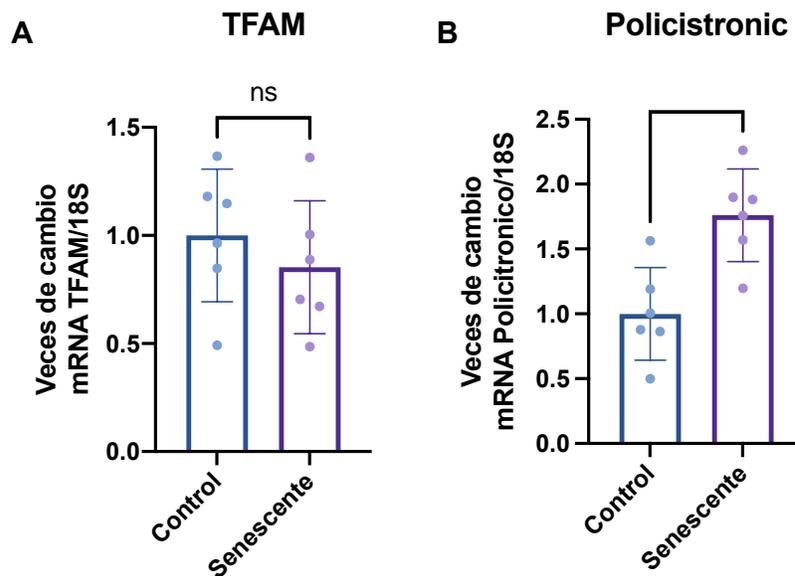


**Figura 5. Expresión de marcadores pro-inflamatorios en senescencia endotelial.**

Determinación de los niveles relativos de mRNAs de A) IL-6 y B) p65 relativo al control de carga (18S) mediante qRT-PCR en HUVEC control y senescentes. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=6. Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas, \*\*\*\* $p \leq 0,0001$  versus control.

En conjunto con los marcadores pro-inflamatorios, se evaluó la expresión de los genes mitocondriales TFAM y policistrónico, los cuales se asocian a regulación de la biogénesis mitocondrial y acumulación de mRNAs mitocondrial no procesado, respectivamente [48,49]. Se analizó la expresión de genes mitocondriales debido a que la función mitocondrial está alterada durante la senescencia celular, Su

expresión puede dar cuenta también del estado senescente celular. Además la disfunción mitocondrial se asocia a la activación de vías inflamatorias [50]. La Figura 6 muestra que solo la expresión del gen policistrónico (B) y no de TFAM (A), aumenta de manera significativa en las células endoteliales senescentes lo que indica que hay un aumento de mRNAs mitocondrial no procesado en las células endoteliales senescentes, sugiriendo que la función mitocondrial y síntesis de proteínas se ve disminuida en senescencia.



**Figura 6. Niveles de expresión basal de genes mitocondriales.**

Determinación de los niveles de mRNAs relativos al control de carga de A) TFAM y B) Policistrónico mediante qRT-PCR en HUVEC senescentes y control. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=6. Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas, \*\*p  $\leq$  0,01 versus control

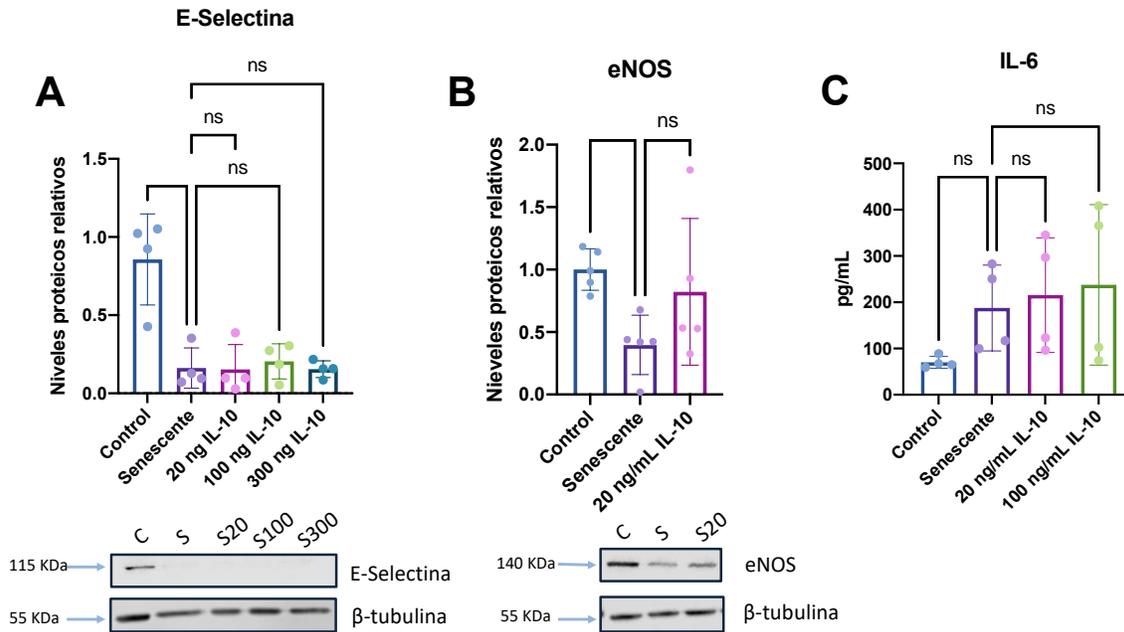
### 6.3. Determinación del efecto de IL-10 sobre células endoteliales senescentes.

Para determinar los niveles óptimos de IL-10 a utilizar para la producción de exosomas, se estimularon HUVEC senescentes por 24 h con 20, 100 y 300 ng/mL de IL-10 y PBS en el caso de los controles. Mediante Western Blot, se determinaron los niveles proteicos de E-Selectina y eNOS que, como se mostró en la Figura 4, disminuyen su expresión en células senescentes. Además, mediante un ensayo de ELISA, se determinaron los niveles de IL-6 secretada al medio extracelular.

La Figura 7A muestra los niveles proteicos de E-Selectina no se recuperan por acción de la IL-10. La concentración de 300 ng/mL de IL-10 se eliminó de los siguientes grupos experimentales, debido a que la concentración de proteínas obtenidas para los grupos con este estímulo eran consistentemente inferiores al mínimo requerido para realizar los experimentos en la mayoría de los experimentos. Es posible que esta concentración tenga algún efecto tóxico en las células e impida la obtención de muestras proteicas suficientes, razón por la cual se descartó para el resto de los experimentos.

En el caso de eNOS (Figura 7B) se observa que en senescencia, el contenido proteico de eNOS se encuentra reducido, mientras que se produce una tendencia a la recuperación de sus niveles proteicos con respecto a los niveles de las células control con el estímulo de 20 ng/mL de IL-10, sin embargo, no se evidencia una diferencia estadísticamente significativa.

Los niveles de IL-6 secretada al medio de cultivo no disminuyen luego de 24 h con ninguna de las dos concentraciones de IL-10 (Figura 7C). A estas concentraciones, IL-10 no revierten la secreción del IL-6 por parte de las células senescentes. Es importante destacar que no se conoce la vida media de la IL-6 en el medio de cultivo de HUVEC. Sin embargo, debido a las condiciones experimentales, se descarta que la ausencia de efecto de la IL-10 se deba a que la IL-6 secretada previo al estímulo no sea degradada pues, al realizar el estímulo, se administra en medio de cultivo fresco. También cabe mencionar que no se observa una diferencia significativa entre las condiciones control y senescente sin tratamiento, si bien existe una tendencia hacia un aumento significativo en la producción de IL-6.

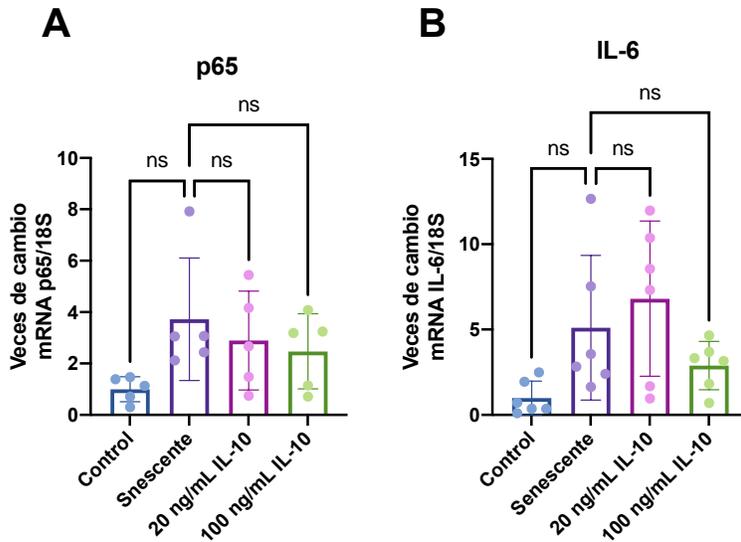


**Figura 7. Efecto de IL-10 en los niveles proteicos de E-Selectina, eNOS e IL-6 en células senescentes.**

Determinación de los niveles proteicos relativos al control de carga de A) E-Selectina, B) eNOS mediante Western blot y C) IL-6 mediante ELISA en HUVEC senescentes estimuladas por 24 h con 20, 100 y 300 ng/mL de IL-10 o PBS (para los grupos control). En el caso del ELISA, se midieron los niveles de IL-6 presentes en el sobrenadante de las células de cada grupo. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, A) N=4 B) N=5 y C) N=4. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post-test de Dunnet, \*\*\* $p \leq 0,001$ , \* $p \leq 0,05$  vs control. ns= no significativo.

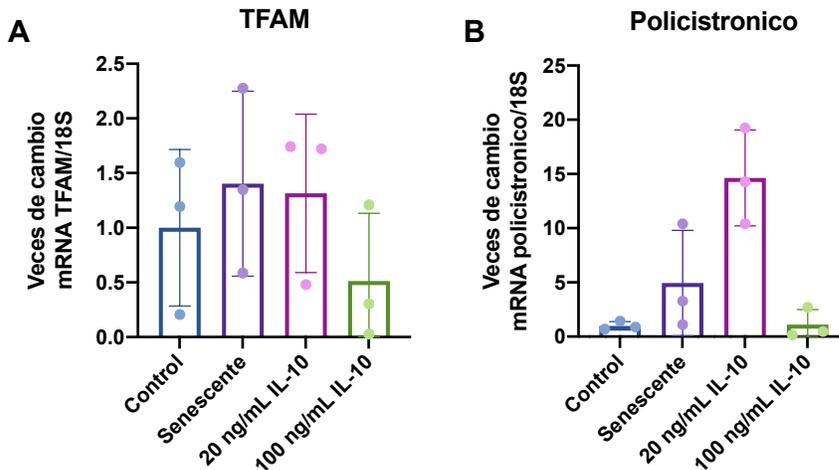
Debido a que a nivel de proteínas no se observa un efecto significativo de la IL-10 sobre la expresión de marcadores pro-inflamatorios, se evaluaron los niveles de mRNAs de IL-6 y p65 en los mismos grupos experimentales mencionados anteriormente: Control, senescente, IL-10 20 ng/mL e IL-10 100 ng/mL. En el caso de IL-6 (Figura 8A), ninguna de las concentraciones de IL-10 redujo significativamente la expresión de esta citoquina en comparación con los niveles del control senescente, aunque se observa una tendencia a disminución con el tratamiento de 100 ng/mL. Los niveles de p65 (Figura 8B) tampoco redujeron de manera significativa por acción de ninguna de las dos concentraciones de IL-10. Respecto a los genes mitocondriales, en la Figura 9 se observan los resultados de qRT-PCR de los genes TFAM (Figura 9A) y Policistrónico (Figura B). Por lo que IL-

10 no tuvo efecto sobre ninguno de los marcadores pro-inflamatorios evaluados en células endoteliales senescentes.



**Figura 8. Efecto de IL-10 sobre la expresión de p65 e IL-6.**

Determinación de los niveles de ARNm relativos al control de carga de A) p65 y B) IL-6 mediante qRT-PCR en HUVEC senescentes estimuladas por 24 h con 20 y 100 ng/mL de IL-10 o PBS (para los grupos control). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, A) N=5, B) N=6. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post-test de Dunnet, ns= no significativo.



**Figura 9. Efecto de IL-10 sobre genes mitocondriales.**

Determinación de los niveles de mRNAs relativos al control de carga de A) TFAM y B) Policistronico mediante qRT-PCR en HUVEC senescentes estimuladas por 24 h con 20 y 100 ng/mL de IL-10 o PBS (para los grupos control). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=3. No se presenta análisis estadístico.

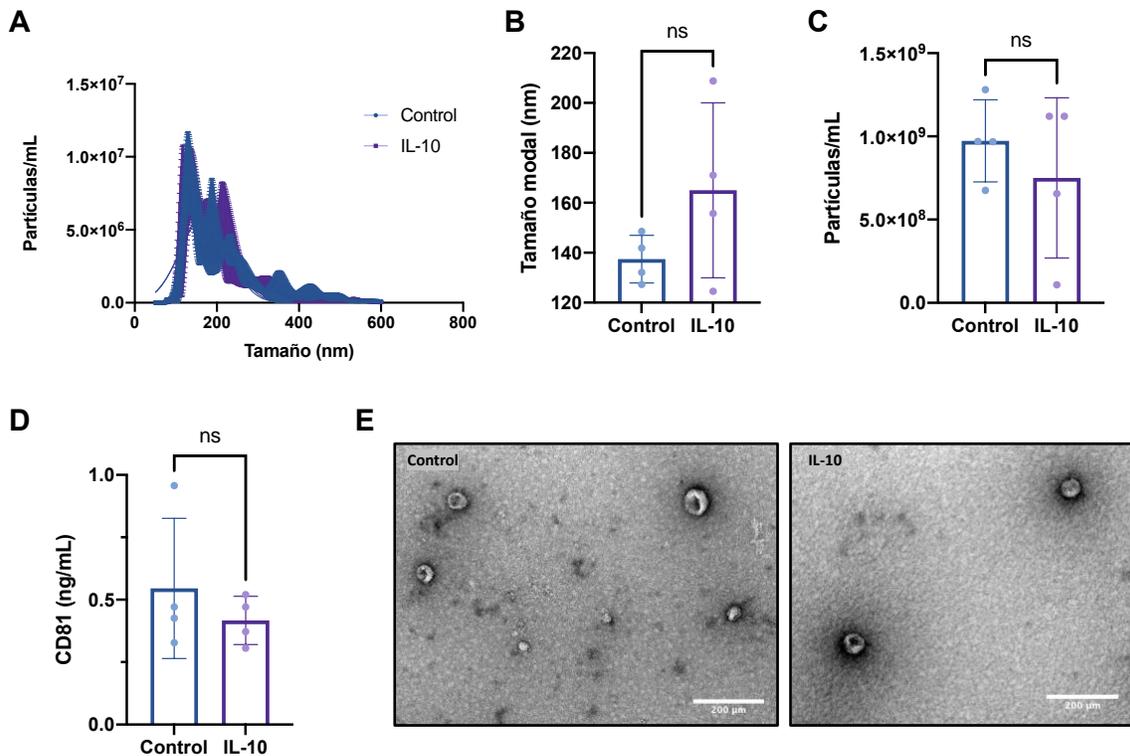
#### **6.4. Producción y caracterización de exosomas**

A pesar de que no se observaron efectos de IL-10 en células senescentes, se evaluó el efecto de exosomas aislados de células endoteliales tratadas con o sin IL-10 en la expresión de marcadores pro-inflamatorios en células endoteliales senescentes. Para este fin, primero se aislaron y caracterizaron estas vesículas extracelulares. Para descartar un efecto directo a la IL-10, células HUVEC control se estimularon con 20 ng/mL de IL-10 o PBS por 24 h y luego se cambió el medio por uno con suero depletado de exosomas por 24 h más. Posteriormente, los exosomas se aislaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño, obteniendo dos grupos: Exosomas control de células no estimuladas (Control) y Exosomas IL-10 de células estimuladas con esta interleuquina.

Las vesículas obtenidas se cuantificaron mediante el equipo NanoSight NS300. Se determinó que el tamaño de las partículas es mayor a los 50 nm y no se aislaron partículas de más de 600 nm (Figura 10A). El tamaño modal de los exosomas del grupo control es de 137,5 nm y 165 nm en el grupo IL-10, confirmando el correcto aislamiento de estos (Figura 10A y B). Debido a que no se observaron diferencias significativas, los resultados sugieren que IL-10 no afecta el tamaño de las vesículas aisladas. La concentración promedio de vesículas extracelulares pequeñas fue de  $1 \times 10^9$  partículas/mL para el grupo control y  $7 \times 10^8$  partículas/mL para el grupo IL-10 (Figura 10C). No se presentan diferencias significativas en la concentración de vesículas entre ambos grupos, lo que indica que la IL-10 no afecta la producción de vesículas extracelulares pequeñas.

Para determinar que las vesículas aisladas corresponden efectivamente a exosomas, se midieron los niveles de la tetraspanina CD81, marcador de exosomas, mediante un ensayo de ELISA. Para su determinación, se utilizaron las vesículas en solución obtenidas del aislamiento sin diluir. En la Figura 10C, se observa que tanto el grupo control, como el grupo IL-10 presentan CD81, lo que indica que ambos grupos de vesículas presentan exosomas. No se observan diferencias

significativas en la concentración de CD81 entre los grupos, lo que a su vez confirma que IL-10 no disminuye, ni aumenta la producción de exosomas en HUVEC.



**Figura 10. Caracterización de exosomas/Vesículas extracelulares pequeñas.**

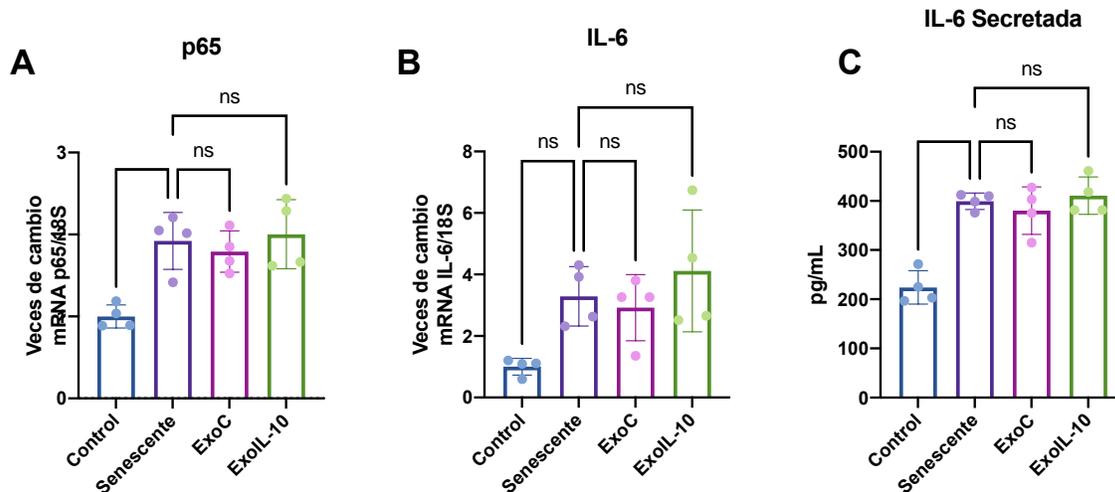
Determinación del A) Distribución y B) Tamaño y C) Concentración de las vesículas obtenidas de HUVEC control mediante NanoSight NS300. Las vesículas fueron aisladas posterior a un estímulo de 24 h con 20 ng/mL de IL-10 (IL-10) o PBS (control). D) Determinación del marcador específico de exosomas CD81 mediante ELISA para exosomas control o IL-10. E) Visualización de exosomas control y tratados con IL-10 mediante microscopía electrónica de transmisión (Barra de escala= 200 nm). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=4. Análisis estadístico: t-test no pareado de dos colas, ns= no significativo.

En conjunto, la Figura 10 indica que las vesículas aisladas cumplen con los requisitos de tamaño y un marcador específico de exosomas, por lo que se observan fracciones enriquecidas en exosomas. Estos se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión y se evidencia que presentan el tamaño esperado y característica forma “cup-shaped” (Figura 10E).

### **6.5 Efecto de exosomas en células endoteliales senescentes**

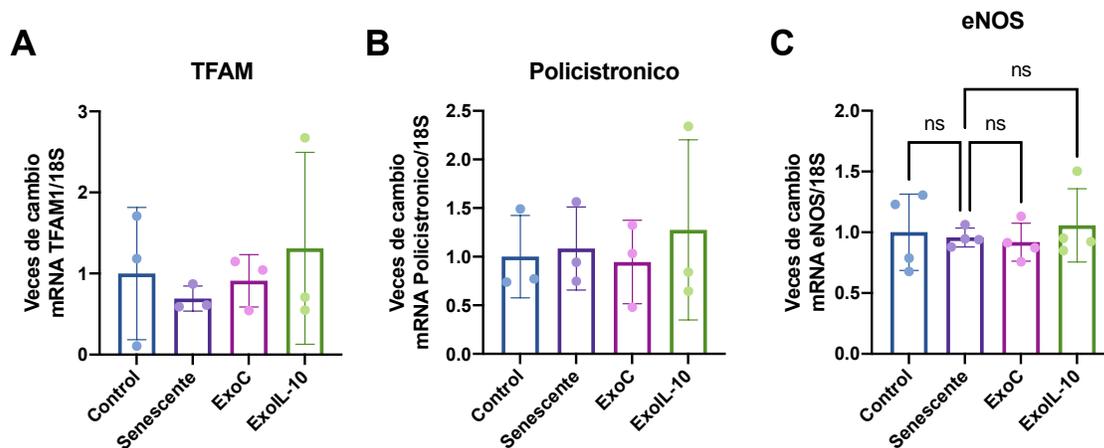
Para determinar el efecto de los exosomas sobre la expresión de marcadores pro-inflamatorios senescencia, células HUVEC senescentes se trataron con  $10^8$  partículas/mL de los exosomas control (ExoC) y aislados de células pre-tratadas con IL-10 (ExoIL-10) por 24 h e incubadas por 24 h adicionales con medio depletado de exosomas y se midieron los niveles de mRNAs de p65 e IL-6 por RT-qPCR y la producción de IL-10 mediante ELISA. Como se observa en la figura 11, ExoC y ExoIL-10 no redujeron los niveles de mRNAs de p65, ni de IL-6 aumentados en senescencia (Figuras 11A y B). Adicionalmente, los niveles proteicos de IL-6 aumentados en células senescentes, tampoco disminuyeron por acción de ninguno de los dos tipos de exosomas.

Finalmente, se evaluó el efecto de ExoC y ExoIL-10 en la expresión de mRNAs de genes mitocondriales y eNOS. La Figura 12 muestran los niveles de expresión de TFAM (Figura 12A) y Policistrónico (Figura 12B). No se observan cambios en la expresión de los genes por acción de la estimulación con exosomas de ambos grupos experimentales. Tampoco se presentan cambios en los niveles de expresión de eNOS en ninguna de las condiciones experimentales (Figura 11C). Si bien los niveles proteicos de eNOS disminuyen en senescencia, su expresión a nivel de mRNAs no disminuye. Por lo tanto, los estímulos ExoC y ExoIL-10 en la concentración y tiempo utilizados, no tiene un efecto en los niveles de expresión de los genes mitocondriales o eNOS.



**Figura 11. Efecto de los exosomas sobre la expresión de p65 e IL-6 y los niveles proteicos de IL-6.**

Determinación de los niveles de mRNAs relativos al control de carga de A) p65 y B) IL-6 mediante qRT-PCR en HUVEC senescentes estimuladas por 24 h con  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas (ExoC y ExoIL-10) o PBS (para los grupos control, C y S) y C) Niveles proteicos de IL-6 secretada al medio de cultivo de los mismos grupos experimentales, determinado por ELISA. Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=4. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post-test de Dunnet, \*\*\*\*p  $\leq 0,0001$  y \*\*p  $\leq 0,01$  versus control, ns= no significativo.

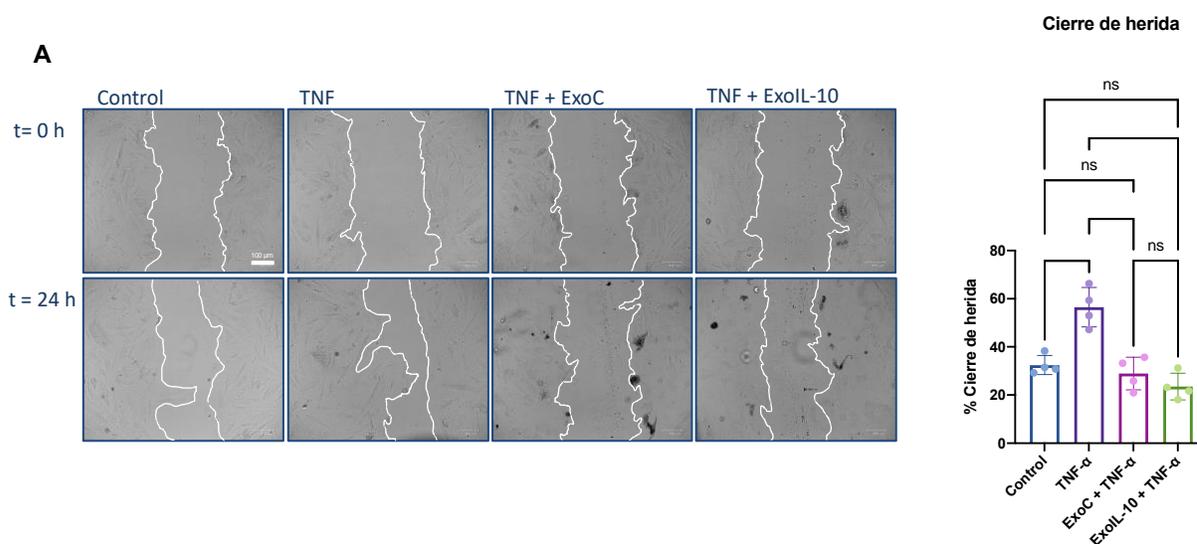


**Figura 12. Efecto de los exosomas sobre la expresión de genes mitocondriales y eNOS.**

Determinación de los niveles de mRNAs relativos al control de carga de A) TFAM, B) Policistronico y C) eNOS mediante qRT-PCR en HUVEC senescentes estimuladas por 24 h con  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas (ExoC y ExoIL-10) o PBS (para los grupos control, C y S). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, A) y B) N=3, C) N=4. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post test de Dunnet, ns= no significativo.

## 6.6. Efecto de exosomas en células de músculo liso

Para descartar que la ausencia de efecto de los exosomas sobre las células endoteliales senescentes se debía a que éstos no eran funcionales, se realizó un ensayo de migración por cierre de herida en células de músculo liso de aorta de rata (A7r5). Para este fin, células A7r5 se pre-trataron con  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas ExoC y Exo-IL-10 durante 30 min y luego se administró TNF- $\alpha$  10 ng/ml durante 24 h. Esta citoquina pro-inflamatoria induce la dediferenciación de estas células y un cambio a un fenotipo pro-migratorio. La Figura 13 muestra que tanto los ExoC como los ExoIL-10 reducen, de manera significativa, la migración, medida mediante el cierre de herida, de las células A7R5, manteniendo el cierre de herida en niveles similares a los de células no tratadas con TNF- $\alpha$ .



**Figura 13. Efecto de los exosomas sobre células A7R5.**

Determinación del efecto de los exosomas ExoC y ExoIL-10 sobre la migración y cierre de herida de células A7R5 tratadas con TNF- $\alpha$ . Las células se pre-trataron con  $1 \times 10^8$  partículas/mL de exosomas (TNF + ExoC o Exo-IL-10) durante 30 min, seguido de 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  (TNF) o PBS (Control) durante 24 h. Las imágenes fueron obtenidas luego de realizar la herida (t = 0 h) y 24 h luego de realizar la herida (t = 24 h). Los valores presentados corresponden al promedio  $\pm$  SD, N=4. Análisis estadístico: ANOVA de una vía y post test de Tukey, \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ , \*\*\*\* $p \leq 0,001$ , ns = no significativo. Barra de escala = 100  $\mu$ m, corresponde a las misma para todas las imágenes.

## **7. Discusión**

El presente trabajo estableció que células endoteliales HUVEC alcanzan la senescencia replicativa entre los pasajes 18-22, reflejado en un aumento en la expresión de la tinción  $\beta$ -galactosidasa, aumento del contenido proteico de p21 y p16, así como un aumento en su área y perímetro celular. Los hallazgos de este trabajo revelan que ICAM-1 y VCAM-1 no se expresan en HUVEC senescentes, mientras que la expresión de E-Selectina y eNOS se encuentra reducida. Adicionalmente, los niveles de los mRNAs de IL-6, p65 y Policistrónico están aumentados en senescencia. Este estudio también evidenció que en células HUVEC senescentes, IL-10 no redujo la expresión de los parámetros pro-inflamatorios evaluados. Por otra parte, la estimulación con IL-10 no alteró el tamaño, concentración, morfología ni la expresión de CD81 en exosomas aislados de células HUVEC. Finalmente, la estimulación de células endoteliales senescentes con exosomas aislados de células tratadas con o sin IL-10 no redujeron la expresión de los marcadores pro-inflamatorios evaluados en esta tesis.

### **7.1. Caracterización del fenotipo senescente**

El modelo utilizado corresponde al de senescencia replicativa en HUVEC comerciales, éstas presentan marcadores claros de senescencia como mayor expresión de p21 y p16, mayor tinción de  $\beta$ -galactosidasa y cambios morfológicos significativos, donde destaca el aumento de tamaño de la célula. Si bien se ha observado en literatura estos cambios morfológicos y en general se muestran imágenes representativas donde se señala las células senescentes [18, 51], la cuantificación del área y perímetro de las células no se ha utilizado como un parámetro para evaluar el cambio a un fenotipo senescente. Esta tesis muestra que los cambios en área y perímetro de las células senescentes pueden medirse y usarse como un marcador complementario del fenotipo senescente en HUVEC, lo cual constituye uno de los aspectos novedosos de este trabajo.

Respecto a la tinción con  $\beta$ -galactosidasa, es importante mencionar que las células control presentan aproximadamente un 20% de tinción  $\beta$ -galactosidasa, indicando

que en las células controles ya algunas presentan un cambio de fenotipo. La senescencia es un proceso progresivo y lento, donde no todas las células presentan cambios fenotípicos al mismo tiempo [52,53] y donde la comunicación entre células control y senescentes juega un rol importante en el desarrollo de senescencia de las células aledañas [13]. Además para el desarrollo de este trabajo se utilizó como parámetro de senescencia el número de pasajes pero no se cuantificó la cantidad de células sembradas por pasaje, de manera tal de registrar el número de duplicación de las células, lo cual es una limitación del presente estudio, pues permitiría calcular la tasa replicativa del cultivo. Es posible que al no utilizar este parámetro, no se haya pesquisado si algunos grupos experimentales hayan realizado menos replicaciones que otros y, por lo tanto, no hayan alcanzado la senescencia en los pasajes establecidos (18-22), lo que se refleja en que la condición senescente de algunos de los parámetros medidos en esta tesis no presentaron cambios respecto al control. Por la misma razón, también es posible que células control hayan presentado una tasa replicativa mayor y en consecuencia, hayan alcanzado la senescencia antes de los pasajes establecidos. Esto explicaría que la condición control alcance el 20% de tinción  $\beta$ -galactosidasa.

Es importante tener en cuenta que los controles no senescentes utilizados en esta tesis se encuentran entre los pasajes 7 y 10 y según indicaciones del proveedor, el fenotipo de estas no cambia hasta el pasaje 15, pero la interacción entre células, aumentos en la confluencia de la placa o estrés durante la división células, pueden generar daños tempranos que lleven a un grupo reducido de células a cambiar prematuramente su fenotipo [49,54]. Además es importante considerar que las HUVEC utilizadas corresponden a un cultivo primario comercial, donde las células deben ser aisladas y expandidas por el proveedor para generar el pool de células que será comercializado, lo que implica que aunque se trabaje en pasajes tempranos, se desconoce el pasaje en el que se encuentran y eso las hace menos comparables con pasajes tempranos de HUVEC frescas. Un estudio en HUVEC frescas aisladas de un solo cordón umbilical, indica que alrededor del pasaje 10, estas células presentan un cambio fenotípico distintivo de senescencia, a pesar de

que estas sobreviven hasta aproximadamente el pasaje 18 [52]. Además, hay trabajos donde consideran a células HUVEC comerciales senescentes desde el P15 [59], a pesar de no presentar una caracterización o marcadores indicativos de este fenotipo. En este sentido, es importante tener en cuenta que 1) las HUVEC frescas alcanzan la senescencia y presentan cambios fenotípicos en pasajes más tempranos que las HUVEC comerciales y 2) puede que algunos de los controles jóvenes utilizados ya comenzaran a cambiar su fenotipo, presentado un aumento en la tinción.

Respecto a las ciclinas p21 y p16, estas son proteínas que participan en el arresto del ciclo celular y a manera de consenso, se utilizan como marcadores de senescencia tanto células endoteliales, como en otros tipos celulares [12, 55]. En el presente trabajo se determinó que las HUVEC entre los pasajes 18-22 presentan un aumento significativo tanto de p16 como de p21. La expresión basal de p21 en células control se debe a que esta ciclina también participa en la regulación de la proliferación células en células endoteliales, donde estas presentan una inhibición de la proliferación por contacto [56], por lo que si las células control presentan una alta confluencia en la placa, es posible que los niveles de p21 aumenten como se observa en nuestros resultados.

## **7.2. Caracterización del fenotipo pro-inflamatorio**

Está descrito que las células senescentes presentan un SASP, que se asocia al aumento en la expresión y secreción de IL-6, entre otras moléculas [18]. La IL-6 es una de las principales citoquinas pro-inflamatorias del organismo y puede ser secretada por células endoteliales, promoviendo un estado pro-inflamatorio y pro-trombótico [12]. En conjunto con este fenotipo, se ha reportado un aumento en moléculas de adhesión celular como VCAM-1 e ICAM-1 en senescencia endotelial [57], a pesar de que estas no forman parte del SASP.

Esta tesis mostró que aumenta la expresión y secreción de IL-6 en HUVEC senescentes respecto a las control, lo que se condice con el fenotipo pro-

inflamatorio promovido por el SAPS endotelial en senescencia [18], pero la inducción de la expresión de VCAM-1 o ICAM-1 en las células endoteliales senescentes no se detectó. Si bien la literatura muestra que la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 aumentan cuando las células endoteliales están senescentes, esto varía considerablemente según el modelo. Se ha descrito el aumento de ICAM-1 y VCAM-1 mediante citometría de flujo en HUVEC frescas en un modelo de senescencia prematura inducida con angiotensina II [57]. Otro estudio mostró que en senescencia inducida por arginasa en HUVEC, aumentan los niveles proteicos de VCAM-1 e ICAM-1 [58]. Adicionalmente, en HUVEC con senescencia inducida por Notch1, aumenta la expresión de VCAM-1, tanto en sus niveles de mRNA, como su contenido proteico [59]. Por otra parte, en células endoteliales aórticas (HAECs) se ha descrito que cuando alcanzan senescencia replicativa, aumentan los niveles de ICAM-1 [60].

Interesantemente, las HUVEC en los pasajes 18-20, similar a lo utilizado en esta tesis, presentan un aumento de aproximadamente 5 veces en la expresión de VCAM-1 a nivel de mRNA, en células senescentes en comparación con jóvenes, pero de más de 1000 veces de cambio cuando las células senescentes son estimuladas con TNF- $\alpha$  [61], lo que indica que la expresión de esta molécula es más fácil de observar en células senescentes cuando estas son estimuladas con una molécula pro-inflamatoria. En otro estudio, también se ha observado la expresión de VCAM-1 e ICAM-1 en células endoteliales senescentes, solo posterior a un estímulo pro-inflamatorio [51]. Esto sugiere la idea de que las células senescentes, además de presentar un fenotipo pro-inflamatorio o debido a esto, son más susceptibles a estímulos pro-inflamatorios, es decir, presentan una respuesta inflamatoria mayor.

En resumen, la falta de estandarización del modelo senescente, considerando tipo celular, origen de la célula, medio de cultivo utilizado y estímulo inductor de la senescencia, genera modelos senescentes con diferentes fenotipos entre ellos, por lo que se requiere siempre caracterizar el modelo a utilizar. Otra limitación del presente estudio es la ausencia de la determinación de la expresión de VCAM-1 e

ICAM-1 mediante qRT-PCR para determinar si, a pesar que no hay cambios a nivel proteico, sí existen alteraciones a nivel de expresión de mRNA.

Considerando que en esta tesis no se utilizó un estímulo pro-inflamatorio y se busca observar qué marcadores cambian basalmente en células endoteliales que alcanzan la senescencia replicativa, se analizaron otros marcadores pro-inflamatorios. E-Selectina, otra molécula de adhesión cuya expresión es inducida en contextos inflamatorios [47] y p65, una subunidad de NF $\kappa$ B que se sabe es un regulador importante de los procesos inflamatorios a nivel celular [62]. Adicionalmente, se evaluaron los niveles proteicos de eNOS, que se sabe están disminuidos en células endoteliales senescentes, lo cual se asocia a una disminución de la síntesis de NO y promueve el progreso de la senescencia y la disfunción endotelial asociada [58]. Inesperadamente, E-Selectina disminuyó sus niveles proteicos en senescencia, a pesar de ser una molécula que aumenta su expresión frente a estímulos pro-inflamatorios en células endoteliales. Estos resultados concuerdan con lo ya descrito en un estudio que muestra la disminución progresiva de E-Selectina en HUVEC, a medida que aumentan los pasajes celulares [63] y por lo tanto, no se puede utilizar como un marcador del fenotipo pro-inflamatorio, pero sí como un marcador de la senescencia en HUVEC. Respecto a p65, esta aumenta su expresión relativa a nivel de su mRNA en senescencia, en comparación con células jóvenes, lo que concuerda con la activación de la vía NF $\kappa$ B en senescencia, promoviendo el fenotipo pro-inflamatorio [18, 62].

Respecto a eNOS, su expresión disminuye en senescencia, aunque no desaparece por completo. Estos datos conciden con lo descrito en la literatura, por cuanto otros modelos de HUVEC y HAECS senescentes muestran una disminución en su expresión [64,65]. La Figura 11 muestra que los niveles del mRNA de eNOS no disminuyen en senescencia, por lo que los cambios a nivel proteico se deben probable y principalmente a un aumento en su degradación. Además, durante la senescencia endotelial aumenta la producción/actividad de inhibidores de la eNOS, como la Arginasa en sus isoformas I y II, y la NADPH oxidasa (aumento en la

producción de anión superóxido) y se promueve su desacoplamiento, lo que la mantiene en un estado inactivo [58, 62, 66]. Los niveles proteicos y actividad de la eNOS también disminuyen en contextos de inflamación crónica o estímulos pro-inflamatorios potentes [44].

En conjunto con el aumento en la expresión de IL-6 y p65, se determinó que la disminución de eNOS también se asocia a la senescencia endotelial. Además de estos marcadores, se determinó el cambio en el nivel de expresión de los genes mitocondriales TFAM y el Policistrónico, asociados a la biogénesis mitocondrial y acumulación de mRNA mitocondrial no procesado, respectivamente [48,49]. Durante la senescencia celular, se presenta disfunción mitocondrial asociada a una disminución en la biogénesis mitocondrial y mitofagia y debido a esto, se acumulan mitocondrias defectuosas en la células, promoviendo el estrés oxidativo y daño celular, aparte de un metabolismo energético reducido [50][52]. A nivel del mRNA se observó que TFAM no cambia sus niveles en senescencia y por lo tanto, si es que participa en la disminución de la biogénesis mitocondrial asociada al envejecimiento celular, no sería a través de un aumento en su expresión. En esta tesis no se observa si su interacción con el DNA mitocondrial cambia, por lo que no se puede descartar su participación mediante otros mecanismos. Un aumento en la expresión de TFAM incrementa la biogénesis mitocondrial en HUVEC [48] y que su interacción con el DNAm<sub>t</sub> varía en el envejecimiento y otros contextos fisiológicos, donde los niveles de interacción de TFAM con el mt-RNA no solo se asocian a su rol como factor de transcripción, sino también a funciones estructurales e *histone-like*, que afecta la compactación del DNA y por lo tanto, su transcripción y replicación [67].

El policistrónico presenta un aumento de su expresión en senescencia, lo que es indicativo de un aumento en la cantidad del mRNA mitocondrial no procesado a nivel celular [49]. Este resultado se condice con el estudio que observó que HUVEC que alcanzaron senescencia replicativa, presentan un aumento en la expresión del mRNA de policistrónico, en comparación con HUVEC de pasajes tempranos [49]. Este cambio puede estar relacionado con múltiples factores, como un aumento en

la transcripción de mt-RNA por requerimiento mitocondrial, una deficiencia del procesamiento del mt-RNA o una estabilización del transcrito en las células senescentes [49]. Como se ha descrito, en condiciones de senescencia celular, las mitocondrias se encuentran disfuncionales y la mitofagia se ve impedida, por lo que se acumulan mitocondrias disfuncionales [50]. En dicho contexto, para determinar si el aumento en el policistrónico no procesado se debe a un aumento del número de copias del DNAm<sub>t</sub> o bien a los daños mitocondriales presentes en senescencia, sería necesario analizar la razón de número de copias de mtDNA/ncDNA, si este aumenta, se asociaría con el aumento de policistrónico, mientras que si no aumenta, el incremento de policistrónico estaría explicado por alguna de las otras posibles razones.

### **7.3. Efecto de la IL-10 sobre los marcadores estudiados**

Las células fueron tratadas con 20, 100 y 300 ng/mL de IL-10 por 24 h, se utilizaron 3 concentraciones debido a que no existen trabajos donde HUVEC senescentes hayan sido tratadas con IL-10. La concentración de 300 ng/mL es la más alta reportada en literatura para evaluar función endotelial. Específicamente, se trataron anillos aórticos de rata y se midió el efecto sobre la capacidad vasodilatadora del endotelio [44]. En el caso de esta tesis se descartó para la mayoría de los experimentos, debido a que el rendimiento proteico obtenido era muy bajo como para realizar experimentos posteriores al estímulo. Al basarse en literatura, esta concentración se utilizó para tratar un tejido completo y no un solo tipo celular y es posible que esta concentración pudiera tener un efecto citotóxico en el modelo de trabajo, aspecto que no fue evaluado.

A nivel proteico, IL-10 no recuperó los niveles de E-Selectina, eNOS o IL-6 secretada a niveles similares al control. Respecto a E-Selectina, era esperable pues IL-10 es un estímulo con potentes efectos anti-inflamatorios [38]. Respecto a eNOS tampoco hubo recuperación en su expresión. En el caso de una inflamación inducida con TNF- $\alpha$  en anillos aórticos, los niveles proteicos de la eNOS disminuyen.

Respecto a la expresión de la eNOS se ha descrito que el tratamiento con IL-10 (300 ng/mL) recupera los niveles proteicos de eNOS a nivel del tejido completo [44]. A nivel de células endoteliales hay estudios que muestran que el tratamiento de HUVEC con IL-10 (2 ng/mL) por 24 h aumentan significativamente los niveles proteicos de eNOS [68]. Estos datos indican que IL-10 induce el restablecimiento de los niveles de eNOS en células endoteliales, por lo que se esperaba que ella restaurara la expresión de eNOS en las células endoteliales senescentes. Sin embargo, existen reportes de que IL-10 actúa a nivel del endotelio pero que no hay literatura respecto a su efecto sobre las células endoteliales senescentes y que éstas no respondan al estímulo. Resta por evaluar distintos tiempos y concentraciones de IL-10, o bien un modelo diferente, así como la interacción entre distintos tipos celulares en los anillos aórticos podrían facilitar la acción antiinflamatoria de IL-10, en comparación con el modelo celular *in vitro* usado en este trabajo.

Respecto a la IL-6 secretada, IL-10 no disminuyó su secreción al medio celular. La concentración de IL-10 circulante disminuye en adultos mayores de 50 años junto con un aumento en los niveles de IL-6 circulantes y del riesgo cardiovascular [68]. En ratones viejos knockout (KO) para el gen de IL-10, los niveles de IL-6 circulantes aumentaron [69] y, por tanto, se concluye que la IL-10 regula la expresión de IL-6 en envejecimiento y sus aumentos se asocian a la disminución de la IL-10 asociada al envejecimiento. En el presente estudio, IL-10 no disminuyó los niveles de IL-6 inducidos en senescencia y se puede especular que la acción de otras células, además de las endoteliales, sería necesaria para coordinar una respuesta inmune anti-inflamatoria [68,69]. También se requeriría variar las condiciones experimentales y utilizar células senescentes que no estén en pasajes tan avanzados y no se encuentren muy dañadas y con cambios fenotípicos muy drásticos como para revertir su estado de inflamación. Como se discutió anteriormente, la adquisición del estado senescente y sus cambios fenotípicos y metabólicos son paulatinos [52,53]. Una vez alcanzada la senescencia, ocurren

cambios epigenéticos que pueden influir la expresión de genes y funcionamiento celular [61].

IL-10 tampoco redujo los niveles de expresión de p65. IL-10 atenúa la inflamación en parte, al inhibir la activación de la vía  $\text{NF}\kappa\text{B}$ , lo que a su vez impide la activación del I $\kappa$ B o la interacción del  $\text{NF}\kappa\text{B}$  con el DNA [38], pero no necesariamente a nivel de la síntesis o degradación p65. Además, a similitud de IL-6, es posible que los efectos no sean observables en células de pasajes tan avanzados o en las condiciones experimentales utilizadas. Se desconocen las temporalidades en que se mantiene el efecto de la IL-10. Se han descrito cambios transcripcionales inducidos por IL-10 en células endoteliales con estímulos de hasta 18 h [70], por lo que probar temporalidades previas a las 24 h post estimulación podría tener efectos diferentes. Es n el caso de la expresión de p65 e IL-6, como también en los niveles de IL-6 secretada al medio, no se observó una diferencia significativa entre las condiciones control y senescentes que validen el experimento para hacer una comparación con el efecto de la IL-10 debido a la variabilidad en los datos. Esto puede haber ocurrido debido a que, como se discutió anteriormente, algunos grupos experimentales no hayan alcanzado la senescencia en los pasajes establecidos. En dicho contexto, es fundamental que futuros experimentos consideren un registro de la tasa de replicación de los cultivos a manera de asegurar que las condiciones senescentes hayan, en efecto, reducido su tasa replicativa.

#### **7.4. Aislamiento y caracterización de exosomas**

Los exosomas se aislaron de HUVEC jóvenes/control con y sin tratamiento de IL-10 por 24 h. Ambos grupos presentaron tamaños modales similares alrededor de los 150 nm y las concentraciones entre los  $6,6 \times 10^8$  –  $1,3 \times 10^9$ , sin diferencias significativas entre ambos grupos. Además, las vesículas aisladas de células endoteliales tratadas con o sin IL-10 presentaron la forma característica “*cup-shaped*” descrita en la literatura [35], como fue evidenciado por microscopía electrónica. El pre-tratamiento con IL-10 (20 ng/mL) por 24 h no afecta el tamaño, la producción o morfología de exosomas que son secretados por las células

endoteliales. La distribución de tamaños de las vesículas, la fracción rica en exosomas aislada en este estudio, contiene otras vesículas de mayor tamaño. A la fecha, aún no existe una metodología que permita la completa purificación de exosomas [71]. Esta limitación también sugiere la necesidad de evaluar otras poblaciones de vesículas extracelulares, como las microvesículas, para confirmar que los efectos observados son exclusivos de exosomas y no de otras poblaciones de vesículas.

La tetraspanina CD81, marcador específico de exosomas [72], se determinó por ELISA, debido a que el rendimiento de aislamiento de exosomas no permite obtener una cantidad suficiente de proteínas para determinarlo por Western blot. Se observó que ambos grupos de vesículas aisladas presentan el marcador, lo que indica que hay exosomas presentes en las muestras y la concentración de CD81 en ambas condiciones es similar, esto confirma que el tratamiento con IL-10 no afecta la cantidad de exosomas producidos/secretados por las células, aunque se debe tener en cuenta que para el caso de este experimento no se utilizaron controles negativos como PBS 1x solo o una fracción del aislamiento por columnas que en teoría no contenga exosomas. Estos datos fortalecerían el resultado obtenido, donde se espera que estos controles negativos presenten valores muy bajos de CD81 o este sea indetectable, para así descartar que los valores obtenidos no sean un valor basal debido a la sensibilidad de la técnica. En el caso de este trabajo, es importante mencionar que, según los lineamientos para el estudio de vesículas extracelulares, falta evaluar otros 2 marcadores de vesículas extracelulares distintos a las tetraspaninas. Además, estas guías también establecen la necesidad de realizar controles negativos de exosomas, para descartar la presencia de contaminación celular [73].

Es importante señalar que los actuales métodos para aislamiento de exosomas presentan distintas ventajas y desventajas. Existen técnicas de aislamiento con mejor rendimiento de obtención de vesículas, como la ultra-centrifugación, pero que presentan menor especificidad al momento del aislamiento quedando una mezcla

con otras partículas de similar tamaño a los exosomas [74]. El aislamiento por columnas de exclusión de tamaño tiene la desventaja de aislar vesículas desde volúmenes limitados, entregando muestras que además quedan menos concentrada al eluir por la columna [74]. El aislamiento mediante columnas de exclusión por tamaño presenta múltiples ventajas que lo vuelven uno de los métodos más usados para el aislamiento de exosomas. En primer lugar, estas columnas tienen como ventaja ser fáciles de manejar, es una técnica poco compleja, no requiere equipamiento especializado, es una técnica relativamente poco costosa en comparación con otras, permite separar proteínas pequeñas que puedan quedar en solución de la muestra de interés, es una técnica reproducible, eficiente y que mantiene la funcionalidad de las vesículas para uso posterior [74,75,76]. Alternativamente, una mezcla de técnicas podría permitir un aislamiento más puro, pero que afectará el rendimiento del aislamiento al realizar más de un tratamiento a las vesículas en solución.

Actualmente no existe técnica que purifique completamente exosomas. De hecho, existe todavía discusión entre si se debe o no utilizar el término exosomas, en vez de vesículas extracelulares pequeñas, al obtener siempre poblaciones mixtas de vesículas y debido a la falta de consenso respecto a qué es un exosoma [77]. Para términos de esta tesis, los exosomas se consideran vesículas extracelulares pequeñas (30-150 nm) procedentes de cuerpos multivesiculares, al haberse determinado marcadores positivos de exosomas y su observación por microscopía electrónica. Se utilizó este término a pesar de no contar con marcadores negativos que puedan garantizar la pureza de la extracción y presencia de otras vesículas, lo que representa una de las limitaciones de este trabajo.

### **7.5. Efecto de los exosomas sobre los marcadores estudiados**

Se evaluó el efecto de los exosomas aislados sobre la expresión de IL-6, p65, TFAM, Policistrónico y eNOS. El tratamiento con exosomas no redujo la expresión de ninguno de los dos marcadores pro-inflamatorios, ni tampoco los niveles de IL-6 secretada por las células. Es posible que las células senescentes se encuentren

demasiado dañadas para responder a los estímulos utilizados [52,53,61]. Los exosomas de células endoteliales microvasculares (HMEC-1) pueden reducir la senescencia en este mismo tipo de células (HMEC-1), al prevenir el arresto del ciclo celular [78], por lo que podría esperarse que exosomas de células HUVEC tuvieran este mismo efecto en células con senescencia prematura o células que estén en proceso de cambio al fenotipo senescente. En esta tesis se trabajó con senescencia replicativa, considerando aproximadamente un 80% de las células totales senescentes como parámetro para realizar los experimentos. En este punto la mayoría de las células ya presentan cambios fenotípicos antes de realizar los experimentos y podría ser que el arresto del ciclo celular esté demasiado establecido para que los exosomas puedan revertirlo. Sin embargo, no se puede descartar el efecto sobre la reversión del fenotipo senescente, utilizando concentraciones y tiempos de incubación diferentes. Es posible que debido al daño celular acumulado en la senescencia replicativa, las células no incorporen las vesículas. En este sentido, se podrían realizar ensayos de incorporación de vesículas, donde éstas se generen con un marcaje fluorescente en proteínas específicas de su síntesis como CD63 o CD81. Este experimento permitiría determinar la presencia de estas vesículas en las células receptoras para determinar si los exosomas fueron incorporados en condiciones senescentes, en comparación con células control, que se ha reportado que sí son capaces de responder a estímulos con exosomas provenientes de HUVEC [35].

Por otra parte, puede que se requieran también de otros tipos celulares que participan del proceso anti-inflamatorio para reducir la expresión de los marcadores observados en este estudio. Por ejemplo, exosomas aislados de MSC reducen la respuesta inflamatoria en modelos *in vivo*, mejorando así la función del endotelio mediante la reducción en la activación de células inmunes, en lugar de actuar directamente en células endoteliales [79].

Otro punto importante a discutir es la concentración de exosomas utilizada,  $10^8$  partículas/mL. Esta concentración se ha utilizado en estudios de cardioprotección,

donde esta concentración de vesículas procedentes de las mismas células HUVEC, sin ningún estímulo, reducen la muerte celular de cardiomiocitos de rata adulta sometidos a hipoxia/re-oxigenación [24]. Sin embargo, es posible que en el caso de diferentes tipos celulares, como el de las células endoteliales, estas requieran concentraciones mayores de vesículas para observar un efecto.

Un estudio previo mostró que las células HUVEC senescentes producen más exosomas, en comparación a células control. Además, estos exosomas mostraron ser funcionales, pues promovieron la migración en HUVEC jóvenes/control. Por lo tanto, aparentemente, los exosomas de células senescentes pueden actuar sobre células jóvenes, pero los resultados de esta tesis sugieren que los exosomas de células endoteliales jóvenes no tienen un efecto sobre células endoteliales senescentes. Sin embargo, cabe mencionar que el estudio que determinó la migración inducida por exosomas de células endoteliales control y senescentes, generaron este efecto en HUVEC jóvenes/control, solo en concentraciones sobre los  $5 \times 10^{10}$  partículas/mL [35]. Existe evidencia que los exosomas de otros tipos celulares, como las MSC reducen la senescencia en HUVEC [80]. Este efecto se observó en la senescencia prematura inducida por estrés oxidativo pero no con senescencia replicativa. En este sentido, en caso de que los rendimientos de aislamiento de exosomas lo permitan, se deberían evaluar concentraciones más altas de exosomas para estimular las células y determinar si generan algún efecto. Asimismo, es importante reiterar que otra limitación de este estudio fue no evaluar el efecto de las vesículas en distintas temporalidades, es decir, más y menos de 24 h. En dicho contexto, no se puede descartar que las vesículas tengan un efecto temprano y transitorio o un efecto que requiera al menos 48 h.

Es posible que el uso de exosomas de otros tipos celulares disminuya la inflamación asociada a la senescencia en células endoteliales. En este sentido se puede destacar a las células progenitoras endoteliales (EPC), que comparten múltiples funciones con las células endoteliales vasculares, pero además presentan propiedades anti-inflamatorias. Exosomas aislados de EPC tienen la capacidad de

recuperar y aumentar los niveles proteicos de la eNOS en células endoteliales cerebrales jóvenes y senescentes [81], también se ha mencionado que promueven la angiogénesis y tienen propiedades anti-inflamatorias *in vivo* e *in-vitro* [82], por lo que exosomas de este tipo celular podrían ser una alternativa para reducir la inflamación asociada a la senescencia. Es importante destacar que exosomas aislados de EPC y HUVEC presentan funcionalidades similares para promover la angiogénesis y migración en células endoteliales [36]. Aunque no se han comparado en base a su potencial antiinflamatorio, es posible que compartan algunas características. Futuros estudios deberían apuntar a determinar si exosomas de células endoteliales tratadas con IL-10 tienen o no un efecto en células no senescentes, pero en un estado pro-inflamatorio, de manera tal que establecer si la senescencia genera un daño irreversible en la célula, o las vesículas no ejercen un efecto antiinflamatorio. Estos estudios deberían extenderse a exosomas de células endoteliales sin estímulos que potencien la anti-inflamación, para dilucidar si estas vesículas presentan por si solas un potencial anti-inflamatorio, de manera similar a la de las vesículas producidas por EPC [82].

#### **7.6. Efecto de los exosomas en células de músculo liso**

Para determinar si los exosomas aislados en esta tesis eran funcionales en contextos pro-inflamatorios, se realizaron ensayos de cierre de herida en células musculares lisas de aorta de rata. Las células se trataron con TNF- $\alpha$  y con los ExoC y ExoIL-10. Se observó que los exosomas tanto control como de medio condicionado con IL-10 redujeron la migración de células A7R5 inducida por TNF- $\alpha$ , lo que sugiere que estas vesículas son funcionales y contrarrestan el efecto de esta citoquina pro-inflamatoria.

Se escogió el modelo de células musculares lisas ya que este tipo celular se encuentra en contacto directo y estrecho con el endotelio vascular y cuya función es parcialmente regulada por este último [84]. Si bien no es un modelo de envejecimiento, el TNF- $\alpha$  promueve remodelado vascular cardiaco patológico asociado a un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, e induce la desdiferenciación celular en el músculo liso, promoviendo un fenotipo por-migratorio

y proliferativo, en lugar de un fenotipo contráctil asociado a una célula muscular diferenciada [85]. Se observó que tanto las vesículas de células endoteliales tratadas con IL-10, como las de células sin tratar frenaron la migración de células tratadas con TNF- $\alpha$ . Es posible que estas vesículas frenen la desdiferenciación celular inducida por TNF- $\alpha$ , aunque el mecanismo aún se desconoce. Para confirmar que la reducción en la migración de células sea debido a una disminución de la desdiferenciación celular, se deben medir marcadores de proteínas contráctiles y de matiz extracelular asociadas al cambio fenotípico mencionado [85]. Adicionalmente, para determinar si existe alguna diferencia entre ambas poblaciones de exosomas, se deberían probar diferentes concentraciones de vesículas para estimular las células musculares, mayores y menores y determinar si existe alguna diferencia significativa en su efecto. Otra posibilidad es generar vesículas con concentraciones mayores de IL-10 y determinar si estas vesículas presentan efectos diferentes a los ExoC.

## 8. Conclusiones

- La senescencia replicativa en HUVEC aumentó la tinción  $\beta$ -galactosidasa en aproximadamente el 80% de las células, aumentó los niveles proteicos de p16, p21, así como el área y perímetro celular y disminuyó de los niveles proteicos de eNOS y E-Selectina.
- La senescencia replicativa de HUVEC se asoció con un aumento en la expresión de IL-6 y p65 y la secreción de IL-6, y un aumento del mRNA mitocondrial no procesado, sugerido por un aumento en los niveles de Policistrónico.
- El tratamiento con IL-10 no redujo la expresión de los marcadores IL-6, p65, TFAM, Policistrónico, ni la secreción de IL-6 o los niveles proteicos de eNOS en HUVEC senescentes.
- El pre-tratamiento con IL-10 (20 ng/mL) no cambió la morfología, concentración, tamaño modal o expresión de CD81 en los exosomas aislados de HUVEC estimuladas, en comparación con los exosomas de HUVEC no estimuladas.
- El tratamiento con exosomas ( $10^8$  partículas/mL por 24 h) aislados de HUVEC control pre-estimuladas con o sin 20 ng/mL de IL-10 no cambió la expresión de los marcadores pro-inflamatorios IL-6 y p65, ni la secreción de IL-6 y no cambió la expresión de TFAM, Policistrónico o eNOS en HUVEC senescentes.
- El tratamiento con exosomas ( $10^8$  partículas/mL por 24 h) aislados de HUVEC control pre-estimuladas con o sin IL-10 (20 ng/mL), reduce de manera significativa la migración de células A7r5 tratadas con TNF- $\alpha$ .

Por lo tanto, el presente estudio muestra que los exosomas aislados de células endoteliales tratadas con IL-10, no reducen la expresión de parámetros pro-inflamatorios en senescencia endotelial, pero si son funcionales y reducen el potencial migratorio de células musculares lisas tratadas con TNF- $\alpha$ .

## 9. Otras actividades

### 9.1. Publicaciones

N. Herrera-Zelada, **U. Zuñiga-Cuevas**, A. Ramirez-Reyes, S. Lavandero, y J. A. Riquelme, “**Targeting the endothelium to achieve cardioprotection**”. *Front. Pharmacol.*, vol. 12, 2021, doi: 10.3389/fphar.2021.636134.

Díaz-Vesga, M.\*, **Zuñiga-Cuevas, Ú.\***, Ramírez-Reyes, A., Herrera-Zelada, N., Palomo, I., Bravo-Sagua, R., & Riquelme, J. (2021). Potential therapies to protect the aging heart against ischemia/reperfusion injury. *Frontiers In Cardiovascular Medicine*, 8. doi: <https://doi.org/10.3389/fcvm.2021.770421>

### 9.2. Ayudantías

- **Genética molecular** (CIBQ3220-1). Segundo semestre 2020, segundo semestre 2021.
- **Genética molecular de eucariontes** (CIBQ4119-1). Primer semestre 2020, primer semestre 2021, primer semestre 2022.
- **Fisiología celular** (CIBQ2109-1). Primer semestre 2020.

## 10. Bibliografía

- [1] World Health Organization: WHO. (2017, mayo 17). Cardiovascular diseases (CVSs) Recuperado 20 de marzo de 2022, de [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- [2] World Health Organization: WHO. (2018, febrero 5). Ageing and health. 2020, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health>
- [3] López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, 153(6), 1194-1217.
- [4] Liao, J. K. (2013). Linking endothelial dysfunction with endothelial cell activation. *The Journal of clinical investigation*, 123(2), 540-541.

- [5] Michiels, C. (2003). Endothelial cell functions. *Journal of cellular physiology*, 196(3), 430-443.
- [6] Venugopal, S. K., Devaraj, S., Yuhanna, I., Shaul, P., & Jialal, I. (2002). Demonstration that C-reactive protein decreases eNOS expression and bioactivity in human aortic endothelial cells. *Circulation*, 106(12), 1439-1441.
- [7] Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G., & Nishigaki, I. (2013). The vascular endothelium and human diseases. *International journal of biological sciences*, 9(10), 1057.
- [8] Stojanović, S. D., Fiedler, J., Bauersachs, J., Thum, T., & Sedding, D. G. (2020). Senescence-induced inflammation: an important player and key therapeutic target in atherosclerosis. *European Heart Journal*.
- [9] Libby, P., Ridker, P. M., & Maseri, A. (2002). Inflammation and atherosclerosis. *Circulation*, 105(9), 1135-1143.
- [10] Landmesser, U., Hornig, B., & Drexler, H. (2004). Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, 109(21\_suppl\_1), II-27.
- [11] Liberale, L., Montecucco, F., Tardif, J. C., Libby, P., & Camici, G. G. (2020). Inflamm-aging: the role of inflammation in age-dependent cardiovascular disease. *European Heart Journal*.
- [12] Mehdizadeh, M., Aguilar, M., Thorin, E., Ferbeyre, G., & Nattel, S. (2021). The role of cellular senescence in cardiac disease: Basic biology and clinical relevance. *Nature Reviews Cardiology*, 1-15.
- [13] Pantsulaia, I., Ciszewski, W. M., & Niewiarowska, J. (2016). Senescent endothelial cells: potential modulators of immunosenescence and ageing. *Ageing research reviews*, 29, 13-25.
- [14] Erusalimsky, J. D. (2009). Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *Journal of Applied Physiology*, 106(1), 326-332.
- [15] Jia, G., Aroor, A. R., Jia, C., & Sowers, J. R. (2019). Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1865(7), 1802-1809.
- [16] Bochenek, M. L., Schütz, E., & Schäfer, K. (2016). Endothelial cell senescence and thrombosis: Ageing clots. *Thrombosis research*, 147, 36-45.

- [17] Rossman, M. J., Gioscia-Ryan, R. A., Santos-Parker, J. R., Ziemba, B. P., Lubieniecki, K. L., Johnson, L. C., ... & Seals, D. R. (2021). Inorganic nitrite supplementation improves endothelial function with aging: translational evidence for suppression of mitochondria-derived oxidative stress. *Hypertension*, 77(4), 1212-1222.
- [18] Ting, K. K., Coleman, P., Zhao, Y., Vadas, M. A., & Gamble, J. R. (2021). The aging endothelium. *Vascular Biology*, 3(1), R35-R47.
- [19] Colombo, M., Raposo, G., & Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annual review of cell and developmental biology*, 30, 255-289.
- [20] Lawson, C., Vicencio, J. M., Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2016). Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *Journal of Endocrinology*, 228(2), R57-R71.
- [21] Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & bioscience*, 9(1), 19.
- [22] Yellon, D. M., & Davidson, S. M. (2014). Exosomes: nanoparticles involved in cardioprotection?. *Circulation research*, 114(2), 325-332.
- [23] Vicencio, J. M., Yellon, D. M., Sivaraman, V., Das, D., Boi-Doku, C., Arjun, S., ... & Multhoff, G. (2015). Plasma exosomes protect the myocardium from ischemia-reperfusion injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(15), 1525-1536.
- [24] Davidson, S. M., Riquelme, J. A., Takov, K., Vicencio, J. M., Boi-Doku, C., Khoo, V. & Yellon, D. M. (2018). Cardioprotection mediated by exosomes is impaired in the setting of type II diabetes but can be rescued by the use of non-diabetic exosomes in vitro. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(1), 141-151.
- [25] Davidson, S. M., Riquelme, J. A., Zheng, Y., Vicencio, J. M., Lavandero, S., & Yellon, D. M. (2018). Endothelial cells release cardioprotective exosomes that may contribute to ischaemic preconditioning. *Scientific reports*, 8(1), 1-9.
- [26] Yue, Y., Garikipati, V. N. S., Verma, S. K., Goukassian, D. A., & Kishore, R. (2017). Interleukin-10 deficiency impairs reparative properties of bone marrow-

- derived endothelial progenitor cell exosomes. *Tissue Engineering Part A*, 23(21-22), 1241-1250.
- [27] Yue, Y., Wang, C., Benedict, C., Huang, G., Truongcao, M., Roy, R., ... & 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.
- [28] Sicco, C. L., Reverberi, D., Balbi, C., Ulivi, V., Principi, E., Pascucci, L., ... & Pozzobon, M. (2017). Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles as mediators of anti-inflammatory effects: Endorsement of macrophage polarization. *Stem cells translational medicine*, 6(3), 1018-1028.
- [29] Monsel, A., Zhu, Y. G., Gudapati, V., Lim, H., & Lee, J. W. (2016). Mesenchymal stem cell derived secretome and extracellular vesicles for acute lung injury and other inflammatory lung diseases. *Expert opinion on biological therapy*, 16(7), 859-871.
- [30] Gennai S, Monsel A, Hao Q, Park J, Matthay MA, Lee JW: Microvesicles Derived From Human Mesenchymal Stem Cells Restore Alveolar Fluid Clearance in Human Lungs Rejected for Transplantation. *Am J Transplant* 2015, 15:2404-2412.
- [31] Lee C, Mitsialis SA, Aslam M, Vitali SH, Vergadi E, Konstantinou G, Sdrimas K, Fernandez-Gonzalez A, Kourembanas S: Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2012, 126:2601-2611.
- [32] de Jong, O. G., Verhaar, M. C., Chen, Y., Vader, P., Gremmels, H., Posthuma, G., ... & van Balkom, B. W. (2012). Cellular stress conditions are reflected in the protein and RNA content of endothelial cell-derived exosomes. *Journal of extracellular vesicles*, 1(1), 18396.
- [33] Xu, M. Y., Ye, Z. S., Song, X. T., & Huang, R. C. (2019). Differences in the cargos and functions of exosomes derived from six cardiac cell types: a systematic review. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 1-11.
- [34] Takasugi, M. (2018). Emerging roles of extracellular vesicles in cellular senescence and aging. *Aging cell*, 17(2), e12734.

- [35] Riquelme, J., Takov, K., Santiago-Fernández, C., Rossello, X., Lavandero, S., Yellon, D., & Davidson, S. (2020). Increased production of functional small extracellular vesicles in senescent endothelial cells. *Journal Of Cellular And Molecular Medicine*, 24(8), 4871-4876.
- [36] Hu, H., Jiang, C., Li, R., & Zhao, J. (2019). Comparison of endothelial cell-and endothelial progenitor cell-derived exosomes in promoting vascular endothelial cell repair. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(7), 2793.
- [37] Hosseinkhani, B., Kuypers, S., van den Akker, N., Molin, D. G., & Michiels, L. (2018). Extracellular vesicles work as a functional inflammatory mediator between vascular endothelial cells and immune cells. *Frontiers in immunology*, 9, 1789.
- [38] Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19(1), 683-765.
- [39] Wang, Y., Chen, Q., Zhang, Z., Jiang, F., Meng, X., & Yan, H. (2015). Interleukin-10 overexpression improves the function of endothelial progenitor cells stimulated with TNF- $\alpha$  through the activation of the STAT3 signaling pathway. *International journal of molecular medicine*, 35(2), 471-477.
- [40] Huet, O., Laemmel, E., Fu, Y., Dupic, L., Aprico, A., Andrews, K. L., ... & Chindusting, J. P. (2013). Interleukin 10 antioxidant effect decreases leukocytes/endothelial interaction induced by tumor necrosis factor  $\alpha$ . *Shock*, 39(1), 83-88.
- [41] Suryana, K., Wita, W., Widiana, I. G. R., Suastika, K., & Sutirtaya, I. W. P. (2017). Low IL-10 plasma levels, high IL-6/IL-10 ratio and matrix metalloproteinase-9 (mmp-9) associated with high cardiovascular events in acute coronary syndrome. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(3), 1229-1238.
- [42] Saxena, A., Khosraviani, S., Noel, S., Mohan, D., Donner, T., & 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.

- [43] Sikka, G., Miller, K. L., Steppan, J., Pandey, D., Jung, S. M., Fraser III, C. D., ... & Barouch, L. A. (2013). Interleukin 10 knockout frail mice develop cardiac and vascular dysfunction with increased age. *Experimental gerontology*, 48(2), 128-135.
- [44] Zemse, S. M., Chiao, C. W., Hilgers, R. H., & Webb, R. C. (2010). Interleukin-10 inhibits the in vivo and in vitro adverse effects of TNF- $\alpha$  on the endothelium of murine aorta. *American Journal of Physiology*, 299(4), H1160-H1167.
- [45] Sawa, Y., Sugimoto, Y., Ueki, T., Ishikawa, H., Sato, A., Nagato, T., & Yoshida, S. (2007). Effects of TNF- $\alpha$  on leukocyte adhesion molecule expressions in cultured human lymphatic endothelium. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 55(7), 721-733.
- [46] Hedayat, M., Mahmoudi, M. J., Rose, N. R., & Rezaei, N. (2010). Proinflammatory cytokines in heart failure: double-edged swords. *Heart failure reviews*, 15(6), 543-562.
- [47] Rahman, A., Kefer, J., Bando, M., Niles, W. D., & Malik, A. B. (1998). E-selectin expression in human endothelial cells by TNF- $\alpha$ -induced oxidant generation and NF- $\kappa$ B activation. *American Journal of Physiology*, 275(3), L533-L544.
- [48] Yao, K., Zhang, W. W., Yao, L., Yang, S., Nie, W., & Huang, F. (2016). Carvedilol promotes mitochondrial biogenesis by regulating the PGC-1/TFAM pathway in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). *Biochemical and biophysical research communications*, 470(4), 961-966.
- [49] Bianchessi, V., Vinci, M. C., Nigro, P., Rizzi, V., Farina, F., Capogrossi, M. C., ... & Lauri, A. (2016). Methylation profiling by bisulfite sequencing analysis of the mtDNA Non-Coding Region in replicative and senescent Endothelial Cells. *Mitochondrion*, 27, 40-47.
- [50] Korolchuk, V. I., Miwa, S., Carroll, B., & Von Zglinicki, T. (2017). Mitochondria in cell senescence: is mitophagy the weakest link?. *EBioMedicine*, 21, 7-13.
- [51] Coleman, P. R., Chang, G., Hutas, G., Grimshaw, M., Vadas, M. A., & Gamble, J. R. (2013). Age-associated stresses induce an anti-inflammatory senescent phenotype in endothelial cells. *Aging (Albany NY)*, 5(12), 913.

- [52] Yi, S., Lin, K., Jiang, T., Shao, W., Huang, C., Jiang, B., ... & Lin, D. (2020). NMR-based metabolomic analysis of HUVEC cells during replicative senescence. *Aging (Albany NY)*, 12(4), 3626.
- [53] Chan, M., Yuan, H., Soifer, I., Maile, T. M., Wang, R. Y., Ireland, A., ... & Hendrickson, D. G. (2022). Novel insights from a multiomics dissection of the Hayflick limit. *Elife*, 11, e70283.
- [54] Unterluggauer, H., Hütter, E., Voglauer, R., Grillari, J., Vöth, M., Bereiter-Hahn, J., ... & Jendrach, M. (2007). Identification of cultivation-independent markers of human endothelial cell senescence in vitro. *Biogerontology*, 8(4), 383-397.
- [55] Chen, J. (2006). Huang X, Halicka D, Brodsky S, Avram A, Eskander J, Bloomgarden NA, Darzynkiewicz Z, Goligorsky MS. Contribution of p16INK4a and p21CIP1 pathways to induction of premature senescence of human endothelial cells: permissive role of p53. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 290, H1575-H1586.
- [56] Akimoto, S., Mitsumata, M., Sasaguri, T., & Yoshida, Y. (2000). Laminar shear stress inhibits vascular endothelial cell proliferation by inducing cyclin-dependent kinase inhibitor p21 Sdi1/Cip1/Waf1. *Circulation Research*, 86(2), 185-190.
- [57] Romero, A., San Hipólito-Luengo, Á., Villalobos, L. A., Vallejo, S., Valencia, I., Michalska, P., ... & Peiró, C. (2019). The angiotensin-(1-7)/Mas receptor axis protects from endothelial cell senescence via klotho and Nrf2 activation. *Aging Cell*, 18(3), e12913.
- [58] Zhu, C., Yu, Y., Montani, J. P., Ming, X. F., & Yang, Z. (2017). Arginase-I enhances vascular endothelial inflammation and senescence through eNOS-uncoupling. *BMC Research Notes*, 10(1), 1-8.
- [59] Wieland, E., Rodriguez-Vita, J., Liebler, S. S., Mogler, C., Moll, I., Herberich, S. E., ... & Fischer, A. (2017). Endothelial Notch1 activity facilitates metastasis. *Cancer cell*, 31(3), 355-367.
- [60] Minamino, T., Miyauchi, H., Yoshida, T., & Komuro, I. (2003). Endothelial cell senescence in human atherosclerosis: role of telomeres in endothelial dysfunction. *Journal of Cardiology*, 41(1), 39-40.

- [61] Honda, S., Ikeda, K., Urata, R., Yamazaki, E., Emoto, N., & Matoba, S. (2021). Cellular senescence promotes endothelial activation through epigenetic alteration, and consequently accelerates atherosclerosis. *Scientific reports*, 11(1), 1-11.
- [62] Csiszar, A., Wang, M., Lakatta, E. G., & Ungvari, Z. (2008). Inflammation and endothelial dysfunction during aging: role of NF- $\kappa$ B. *Journal of applied physiology*, 105(4), 1333-1341.
- [63] Noonan, D. M., Vannini, N., Pfeffer, U., Lorusso, G., & Albini, A. (2008). Endothelial cell aging and apoptosis in prevention and disease: E-selectin expression and modulation as a model. *Current pharmaceutical design*, 14(3), 221-225.
- [64] Bernardini, D., Ballabio, E., Mariotti, M., & Maier, J. A. (2005). Differential expression of EDF-1 and endothelial nitric oxide synthase by proliferating, quiescent and senescent microvascular endothelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1745(2), 265-272.
- [65] Lee, H. Y., Zeeshan, H. M. A., Kim, H. R., & Chae, H. J. (2017). Nox4 regulates the eNOS uncoupling process in aging endothelial cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 113, 26-35.
- [66] Toda, N. (2012). Age-related changes in endothelial function and blood flow regulation. *Pharmacology & therapeutics*, 133(2), 159-176.
- [67] Picca, A., & Lezza, A. M. S. (2015). Regulation of mitochondrial biogenesis through TFAM–mitochondrial DNA interactions: useful insights from aging and calorie restriction studies. *Mitochondrion*, 25, 67-75.
- [68] Cattaruzza, M., Słodowski, W., Stojakovic, M., Krzesz, R., & Hecker, M. (2003). Interleukin-10 induction of nitric-oxide synthase expression attenuates CD40-mediated interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(39), 37874-37880.
- [69] Suryana, K., Wita, W., Widiana, I. G. R., Suastika, K., & Sutirtaya, I. W. P. (2017). Low IL-10 plasma levels, high IL-6/IL-10 ratio and matrix metalloproteinase-9 (Mmp-9) associated with high cardiovascular events in

- acute coronary syndrome. *Biomedical and Pharmacology Journal*, 10(3), 1229-1238.
- [70] Kinzenbaw, D. A., Chu, Y., Peña Silva, R. A., Didion, S. P., & Faraci, F. M. (2013). Interleukin-10 protects against aging-induced endothelial dysfunction. *Physiological reports*, 1(6), e00149.
- [71] Li, X., Fang, P., Sun, Y., Shao, Y., Yang, W. Y., Jiang, X., ... & Yang, X. (2020). Anti-inflammatory cytokines IL-35 and IL-10 block atherogenic lysophosphatidylcholine-induced, mitochondrial ROS-mediated innate immune activation, but spare innate immune memory signature in endothelial cells. *Redox biology*, 28, 101373.
- [72] van Niel, G., Carter, D. R., Clayton, A., Lambert, D. W., Raposo, G., & Vader, P. (2022). Challenges and directions in studying cell–cell communication by extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1-14.
- [73] Ibrahim, A., & Marbán, E. (2016). Exosomes: fundamental biology and roles in cardiovascular physiology. *Annual review of physiology*, 78, 67-83.
- [74] Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., ... & Jovanovic-Talisman, T. (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.
- [75] Davidson, S. M., Boulanger, C. M., Aikawa, E., Badimon, L., Barile, L., Binder, C. J., ... & Sluijter, J. P. (2022). Methods for the identification and characterization of extracellular vesicles in cardiovascular studies—from exosomes to microvesicles. *Cardiovascular Research*.
- [76] Lobb, R., & Möller, A. (2017). Size exclusion chromatography: a simple and reliable method for exosome purification. In *Extracellular Vesicles* (pp. 105-110). Humana Press, New York, NY.
- [77] Sidhom, K., Obi, P. O., & Saleem, A. (2020). A review of exosomal isolation methods: is size exclusion chromatography the best option?. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6466.

- [78] Witwer, K. W., & Théry, C. (2019). Extracellular vesicles or exosomes? On primacy, precision, and popularity influencing a choice of nomenclature. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1648167.
- [79] van Balkom, B. W., De Jong, O. G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P. M., ... & Verhaar, M. C. (2013). Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 121(19), 3997-4006.
- [80] Teng, X., Chen, L., Chen, W., Yang, J., Yang, Z., & Shen, Z. (2015). Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(6), 2415-2424.
- [81] Xiao, X., Xu, M., Yu, H., Wang, L., Li, X., Rak, J., ... & Zhao, R. C. (2021). Mesenchymal stem cell-derived small extracellular vesicles mitigate oxidative stress-induced senescence in endothelial cells via regulation of miR-146a/Src. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 1-15.
- [82] Zhang, C., Wang, J., Ma, X., Wang, W., Zhao, B., Chen, Y., ... & Bihl, J. C. (2018). ACE2-EPC-EXs protect ageing ECs against hypoxia/reoxygenation-induced injury through the miR-18a/Nox2/ROS pathway. *Journal of cellular and molecular medicine*, 22(3), 1873-1882.
- [83] Zeng, C. Y., Xu, J., Liu, X., & Lu, Y. Q. (2021). Cardioprotective roles of endothelial progenitor cell-derived exosomes. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 8, 717536.
- [84] Lilly, B. (2014). We have contact: endothelial cell-smooth muscle cell interactions. *Physiology*, 29(4), 234-241.
- [85] García-Miguel, M., Riquelme, J. A., Norambuena-Soto, I., Morales, P. E., Sanhueza-Olivares, F., Nuñez-Soto, C., ... & Chiong, M. (2018). Autophagy mediates tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced phenotype switching in vascular smooth muscle A7r5 cell line. *PLoS One*, 13(5), e0197210.