



## Stem cells and their exosomes as an advanced therapy to treat incisional hernia: proof of concept in a murine model

**Title in Spanish:** *Células madre y sus exosomas como terapia avanzada para tratar la hernia incisional: prueba de concepto en modelo murino*

Rebeca Blázquez<sup>1,2</sup>, Francisco Miguel Sánchez-Margallo<sup>1,2</sup>, Verónica Álvarez<sup>1</sup>, Alejandra Usón<sup>1</sup>, Federica Marinaro<sup>1</sup>, Javier G. Casado<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Terapia Celular, Centro de Cirugía de Mínima Invasión 'Jesús Usón', Cáceres, España. <sup>2</sup>CIBER de Enfermedades Cardiovasculares, Madrid, España.

**ABSTRACT:** An incisional hernia constitutes a tissue protrusion through a traumatic or surgical scar in the abdominal wall. Frequently, the treatment of the incisional hernia, as well as other types of hernia, involves the implantation of a surgical mesh to reinforce the weakened tissue. However, an exacerbated inflammatory response is commonly developed after this implantation, having serious consequences for the patient. Considering the immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells (MSCs) and their exosomes (exo-MSCs), in this study we proposed that the administration of these two therapeutic products, together with fibrin sealants that are frequently used to fix surgical meshes, could have a beneficial biological and therapeutic effect that could help to modulate the inflammatory response and improve the success of the surgical mesh implantation. The results obtained in this work showed, in a murine model of incisional hernia, that exo-MSCs reduce M1 inflammatory macrophages infiltration and that there is a predominance of Th2-related cytokines in the surrounding tissue of MSCs or exo-MSCs treated meshes, favoring the macrophage polarization towards a M2 anti-inflammatory phenotype. This study concludes that mesh fixation with fibrin sealants co-administered with MSCs or exo-MSCs would have a beneficiary effect on the treatment of incisional hernia in terms of reduction of the inflammatory response and modulation of the foreign body reaction.

**RESUMEN:** Una hernia incisional consiste en una protrusión de tejido a través de una cicatriz traumática o quirúrgica en la pared abdominal. El tratamiento de este y de otros tipos de hernias pasa frecuentemente por la implantación de una malla quirúrgica para reforzar el tejido debilitado. Sin embargo, a menudo se produce una respuesta inflamatoria exacerbada que desemboca en diferentes complicaciones, teniendo consecuencias graves para el paciente. Considerando el potencial inmunomodulador de las células madre mesenquimales (MSCs) y de sus exosomas (exo-MSCs), en este estudio planteamos que la administración de ambos productos terapéuticos, conjuntamente con los selladores de fibrina que se utilizan frecuentemente para la fijación de las mallas quirúrgicas, podría ejercer un efecto biológico y terapéutico que ayudara a controlar esa respuesta inflamatoria y mejorarla, por tanto, el éxito del tratamiento con mallas quirúrgicas. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron, en un modelo murino de hernia incisional, que los exo-MSCs reducen la infiltración de macrófagos inflamatorios M1 y que existe una predominancia de citoquinas relacionadas con la respuesta Th2, y con ello, con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio, en el tejido circundante a las mallas en las que se vehicularon MSCs o sus exosomas. Este estudio concluye que la fijación de mallas quirúrgicas con selladores de fibrina combinados con MSCs o exo-MSCs tendría un efecto beneficioso en el tratamiento de la hernia incisional, en términos de reducción de la respuesta inflamatoria y modulación de una reacción exacerbada frente a un cuerpo extraño.

\*Corresponding Author: jgarcia@ccmijesususon.com

Received: March 19, 2018 Accepted: March 20, 2018

Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 39-51

Language of Manuscript: Spanish

## 1. INTRODUCCIÓN

Una hernia incisional se define como una protrusión de tejido, generalmente peritoneo, a través de una cicatriz traumática o quirúrgica en la pared abdominal, y que puede contener o no una víscera abdominal y/u otros tejidos (1). La hernia incisional se presenta de manera frecuente como una complicación de la cirugía abdominal, constituyendo una importante fuente de morbilidad (2). Para su tratamiento, se utilizan a menudo mallas quirúrgicas, las cuales resultan también efectivas para la reparación de prolapsos de órganos, el tratamiento de la incontinencia urinaria por esfuerzo y el cierre de grandes heridas. La gran mayoría de estas prótesis está constituida por materiales sintéticos como polipropileno, poliéster o politetrafluoretileno (PTFE), que pueden encontrarse o no en combinación con otros materiales como titanio, ácidos grasos omega-3 o hialuronato (3).

La fijación de estas mallas a los tejidos puede realizarse mediante sutura, grapas, “*tacks*” (4) o pegamentos quirúrgicos tipo cianocrilato (5). Los selladores de fibrina comenzaron a usarse en 1909 y, en las dos últimas décadas, ha sido ampliamente descrito su uso para la fijación de mallas quirúrgicas, demostrándose que este procedimiento no incrementa los riesgos asociados a la hernia inguinal. De hecho, disminuye el riesgo en comparación con métodos de fijación que penetran en el tejido. Además, se ha evidenciado una disminución tanto de la morbilidad posoperatoria como de la duración de la estancia hospitalaria (6). Otros estudios en los que se utilizaron selladores de fibrina para la fijación de mallas mostraron disminución del dolor crónico en comparación con la fijación mediante suturas, así como menores tiempos quirúrgicos (7). En cuanto a la comparación con los “*tacks*” quirúrgicos, la mayoría de los estudios publicados sugieren también una disminución del dolor (8). Por último, se ha demostrado una buena neovascularización e integración en el tejido en modelo de hernia incisional de rata usando selladores de fibrina, en comparación con grapas quirúrgicas (9).

Además de las propiedades adhesivas de los selladores de fibrina, el papel biológico de los coágulos de fibrina se ha estudiado desde diferentes perspectivas. En modelos *in vivo* de anastomosis en colon se demostró la presencia de neutrófilos infiltrados en los selladores de fibrina (10) y en experimentos *in vitro* se ha evidenciado que la composición de estos coágulos de fibrina tienen un efecto significativo en la migración de neutrófilos y que influyen en el proceso de cicatrización (11).

En los últimos años, los selladores de fibrina se han utilizado con éxito en combinación con células para aplicaciones relacionadas con la ingeniería tisular (12). Así, se ha descrito su uso como vehículo de fibroblastos dérmicos en el tratamiento de heridas crónicas (13) y como soporte para la implantación de diferentes tipos de células madre (14–18) en distintos ámbitos como la neuroprotección (14), regeneración nerviosa (15), reparación ósea (16), reparación osteocondral (17), cicatrización (18) o reparación del miocardio tras un

infarto (19).

Recientemente, nuestro grupo de investigación demostró, utilizando un modelo murino, que las mallas quirúrgicas recubiertas de células madre mesenquimales (MSC, *mesenchymal stem cells*) inducen un ambiente antiinflamatorio que reduce los procesos inflamatorios exacerbados comúnmente observados tras la implantación de estas mallas (20). Basándonos en este primer trabajo, y teniendo en cuenta el papel de los selladores de fibrina como vehículo para la administración de células madre, en el presente estudio quisimos evaluar el efecto biológico y terapéutico de las MSCs vehiculadas en selladores de fibrina y en el contexto de la hernia incisional. Además, dado que el efecto terapéutico de las MSCs está mediado en gran medida por un efecto paracrino, hemos incluido los exosomas derivados de estas células, propuestos como principales responsables de este efecto (21), como producto terapéutico en este estudio. Así, planteamos además una terapia libre de células, que ofrece múltiples ventajas frente a las terapias celulares, relacionadas principalmente con la estandarización del producto terapéutico.

En este estudio se han evaluado diferentes parámetros: histología, infiltración leucocitaria, y análisis de expresión génica en el lugar de implantación de las mallas de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la remodelación tisular. En resumen, en este trabajo mostramos que la fijación de mallas quirúrgicas con selladores de fibrina combinados con MSCs o sus exosomas podría tener un efecto beneficioso para el tratamiento de las hernias incisionales en términos de reducción de la respuesta inflamatoria y control de la reacción a cuerpo extraño.

## 2. MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1. Aislamiento y expansión de las células madre mesenquimales murinas

Las MSCs murinas se aislaron a partir de la médula ósea de fémures de tres ratones eutanasiados de entre 2 y 6 meses de edad. La suspensión celular obtenida se pasó por filtros de 40 µm y las células mononucleares se aislaron mediante centrifugación en Histopaque-1077 (Sigma, St. Louis, MO, USA). Tras lavarse dos veces con tampón fosfato (PBS, *Phosphate Buffered Solution*), las células se resuspendieron en DMEM con un 10% de suero fetal bovino (FBS, *Fetal Bovine Serum*), y se sembraron en frascos de cultivo, manteniéndose a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Tras 48 horas en cultivo, las células no adherentes se eliminaron, mientras que las células que permanecieron adheridas se cultivaron en un 80-90% de confluencia, momento en el que se despegaron con una solución al 0.25% de tripsina (Lonza Walkersville, Inc., Walkersville, MD, USA) para así sembrarlas en un nuevo frasco a una densidad de 5 000 – 6 000 células/cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo se cambió cada 3-4 días. Se utilizaron células en pases 10-15 para los experimentos *in vivo*.

## 2.2. Análisis fenotípico de las células madre mesenquimales murinas

El análisis fenotípico de las MSCs murinas se realizó mediante citometría de flujo. Para ello,  $2 \times 10^5$  células se marcaron con anticuerpos monoclonales frente a CD29, CD44, CD90, CD105, MHC clase I y MHC clase II, y se incubaron durante 30 min a 4°C con la concentración apropiada de anticuerpo en presencia de PBS con 2% de FBS. Las células se lavaron y se resuspendieron en PBS. El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA) tras la adquisición de  $10^5$  eventos.

Las células viables se seleccionaron de acuerdo a sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC) y se analizaron con el *software* CellQuest (BD Biosciences, CA, USA). El nivel de expresión de cada marcador se expresó como la intensidad de fluorescencia relativa media (MRFI, *Mean Relative Fluorescence Intensity*), que se calculó dividiendo la intensidad de fluorescencia media (MFI, *Mean Fluorescence Intensity*) por la MFI de su control negativo. Los valores de MRFI menores de 2 se consideraron negativos (-), los valores positivos fueron aquellos comprendidos entre 2 y 10 (+), y los fuertemente positivos, aquellos cuyo valor estaba entre 10 y 100 (++)

## 2.3. Potencial de diferenciación de las células madre mesenquimales murinas

Los ensayos de diferenciación se llevaron a cabo cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia. Se utilizaron protocolos estándar para promover la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica de las células. Para ello, las células se cultivaron durante 21 días con medios específicos de diferenciación (Gibco Life Sciences, Rockville, MD, USA), que eran reemplazados cada tres días. Transcurrido este tiempo, las células se fijaron y se tiñeron con Oil Red O, Alcian Blue y Alizarin Red S para evidenciar la diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica respectivamente. Las células diferenciadas se observaron mediante microscopía óptica.

## 2.4. Aislamiento y purificación de los exosomas derivados de células madre mesenquimales

Los exosomas derivados de células madre mesenquimales (exo-MSCs) se obtuvieron a partir de MSCs murinas de médula ósea cultivadas en frascos de 175 cm<sup>2</sup>. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80%, el medio de cultivo (DMEM con 10% FBS) se reemplazó por medio de aislamiento de exosomas (DMEM con 1% de insulina-transferrina-selenio). Los sobrenadantes se recogieron cada 3-4 días. Para eliminar las células muertas y los detritus celulares, los sobrenadantes se centrifugaron a 1 000 x g durante 10 min y a 5 000 x g durante 20 min a 4°C, y se pasaron a través de un filtro de 0.22 µm. Aproximadamente 15 ml de estos sobrenadantes se ultrafiltraron mediante concentradores Amicon® Ultra de 3 kDa de límite de peso molecular (Merck-Millipore, MA, USA), centrifugándolos durante 60 min a 4 000 x g y obteniendo 200-300 µl de sobrenadantes concentrados que se almacenaron a -20°C.

## 2.5. Caracterización de los exosomas derivados de células madre mesenquimales

Antes de realizar los ensayos *in vivo*, los sobrenadantes concentrados se caracterizaron mediante cuantificación de proteína total, citometría de flujo y análisis de rastreo de nanopartículas.

La concentración de exosomas se determinó, en primer lugar, de manera indirecta mediante cuantificación de proteína total a través de un ensayo Bradford. Para cuantificar la concentración de proteína, 20 µl de la muestra de exosomas se incubaron con 180 µl de reactivo Bradford (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) a temperatura ambiente. Tras 5 min, se determinó la absorbancia a 595 nm, y la concentración de proteína de las muestras se extrapoló a partir de una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina.

Para el análisis mediante citometría de flujo, los exosomas se conjugaron con microesferas de 4 µm de látex (Aldehyde/Sulfate latex beads, Molecular probes, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Brevemente, 5 µg de exosomas se incubaron durante toda la noche a 4°C con 10 µl de microesferas, se añadieron 110 µl de glicina 1M y, tras 30 min de incubación, las muestras se centrifugaron, lavaron y resuspendieron en un volumen final de 0.5 ml de PBS con 0.5% BSA. Estas microesferas recubiertas de exosomas se incubaron durante 30 min a 4°C con anticuerpos monoclonales murinos anti-CD9 (BD Biosciences, San José, CA, USA). Tras esta incubación, las muestras se lavaron y resuspendieron en PBS con 0.5% BSA. El análisis por citometría de flujo se llevó a cabo en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, San José, CA, USA).

Finalmente, la concentración y el tamaño de las partículas de los concentrados se midieron mediante análisis de rastreo de nanopartículas (NanoSight Ltd, Amesbury, Reino Unido), que relaciona la tasa de movimiento browniano con el tamaño de la partícula. Los resultados se analizaron con la versión 2.2 del *software* de análisis de rastreo de nanopartículas.

## 2.6. Preparación del sellador de fibrina y combinación con las células madre mesenquimales y sus exosomas

El sellador de fibrina se preparó a partir de trombina (500 IU/ml) y fibrinógeno (80 mg/ml). Estos componentes se mezclaron a un ratio 1:1 utilizando un aplicador de doble jeringa. Cada malla se fijó con un volumen total de 400 µl del sellador.

Para la combinación con MSCs, las células se despegaron de los frascos de cultivo con una solución de tripsina al 0.25%, se contaron y se ajustaron a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/ml. Un total de  $1.6 \times 10^6$  células en 400 µl de DMEM se mezclaron con trombina (500 IU/ml) a un ratio 1:1. La suspensión células se mezcló a continuación con fibrinógeno (80 mg/ml) a un ratio 1:1 utilizando un aplicador de doble jeringa que permitió la mezcla de ambos componentes. Para la fijación de las mallas se usó un volumen de 400 µl de la solución final ( $4 \times 10^5$  células).

La viabilidad de las MSCs en el sellador de fibrina se midió en términos de actividad metabólica a través de un ensayo CCK-8 siguiendo las instrucciones del fabricante (Sigma, St. Louis, MO, USA). Brevemente, las MSCs se combinaron con el sellador de fibrina y se mantuvieron en cultivo durante dos días en DMEM. Como control negativo, se utilizaron MSCs en condiciones de cultivo estándar. Además, la morfología celular de las MSCs en combinación con el sellador de fibrina se examinó mediante microscopía óptica.

Para la combinación del sellador de fibrina con exo-MSCs, los concentrados de exosomas se descongelaron lentamente antes de combinarse con la solución de fibrina. Un total de 200  $\mu$ l de exosomas (medidos en proteína total) a 20 000  $\mu$ g/ml se mezclaron con trombina (500 IU/ml) a un ratio 1:1 y esta solución se mezcló con fibrinógeno (80 mg/ml) a un ratio 1:1. Por último, ambas diluciones se mezclaron usando un aplicador de doble jeringa. Para la fijación de cada malla se usó un volumen de 400  $\mu$ l de la solución final (4 000  $\mu$ g de proteínas exosomales).

### 2.7. Modelo de hernia incisional y procedimientos quirúrgicos

Los cuidados de los animales y todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética y Experimentación Animal del Centro de Cirugía de Mínima Invasión, y se desarrollaron de acuerdo a las recomendaciones del gobierno local. Para la realización de este estudio se utilizó un total de 16 ratones ICR con edad de 3-5 meses y de 35-40 g de peso. Los animales se dividieron en cuatro grupos: en el primer grupo (n=4), las mallas quirúrgicas se fijaron con puntos simples (SUT); en el segundo grupo (n=4), se fijaron con sellador de fibrina (SF); en el tercer grupo (n=4), las mallas se fijaron con el sellador de fibrina en combinación con MSCs (SF+MSCs), y en el cuarto grupo (n=4), con el sellador de fibrina en combinación con los exo-MSCs (SF+exos).

El modelo murino de hernia incisional se desarrolló a partir de un modelo animal previamente descrito (22). Los animales se premedicaron con 2 mg/kg de meloxicam (Metacam®, Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, Alemania) y 0.06 mg/kg de buprenorfina (Buprex®, Schering-Plough, NJ, USA) por vía intraperitoneal y los procedimientos se desarrollaron bajo anestesia inhalatoria inducida en una cámara con isoflurano al 3% y mantenida con isoflurano al 1.5-2.0% a través de una máscara inhalatoria. El flujo de oxígeno se mantuvo a 0.5-1.0 l/min durante todo el procedimiento.

Una vez anestesiados, el abdomen fue rasurado y lavado con una solución yodada. Se realizó una incisión de 0.7-0.8 cm de longitud en cada uno de los lados del abdomen, y se retiró un fragmento compuesto por tejido muscular y aponeurosis de 0.6 cm de diámetro bajo cada una de las incisiones. A continuación, se implantaron mallas de polipropileno (Assumesh, Assut Europe, Roma, Italia) de 1cm<sup>2</sup> en el espacio preperitoneal sobre cada uno

de los defectos creados. Estas mallas se fijaron según lo indicado anteriormente para cada grupo. Por último, las incisiones cutáneas se cerraron con 4-5 puntos simples de sutura absorbible monofilamento de polidioxanona (PDSII™, Ethicon, Johnson & Johnson, NJ, USA).

Durante los tres primeros días tras la cirugía, los animales recibieron 10 mg/ml de paracetamol (Apiretal®, ERN, Barcelona, España) en el agua de bebida y 0.1 mg/kg de buprenorfina inyectada vía subcutánea cada 12 horas. Siete días tras la cirugía, los animales fueron eutanasiados en una cámara de CO<sub>2</sub>.

### 2.8. Determinaciones histológicas

Tras la eutanasia de los animales, se retiraron las mallas implantadas y se realizaron los diferentes análisis *post mortem*. Para el estudio histológico, una de las dos mallas implantadas en cada animal, junto con la piel y la capa muscular-aponeurótica, se fijó en paraformaldehído al 4%, se embebieron en parafina y se cortaron en láminas de 5-8  $\mu$ m de espesor. Para la visualización de las muestras, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson.

### 2.9. Estudio fenotípico del infiltrado leucocitario

La malla restante en cada animal se dividió en dos, y para el estudio fenotípico del infiltrado de leucocitos, una de estas dos partes se sumergió en PBS y las células adheridas se despegaron mediante una solución de tripsina al 0.25%. Las células recuperadas se incubaron durante 30 min a 4°C con la concentración apropiada de anticuerpos monoclonales murinos en PBS con 2% de FBS. Las células se marcaron con anti-CD45 murino conjugado con PerCP (Miltenyi Biotec), anti-B220 murino conjugado con PE (Miltenyi Biotec) y anti-Ly6C murino conjugado con FITC (Miltenyi Biotec). A continuación, se lavaron y se resuspendieron en PBS. El análisis por citometría de flujo se realizó en un citómetro FACScalibur (BD Biosciences, CA, USA) tras la adquisición de 10<sup>5</sup> eventos.

Se determinó el porcentaje de células leucocitarias (CD45<sup>+</sup>) del total de células infiltradas y, dentro de ellas, la expresión de Ly6C sirvió para diferenciar las subpoblaciones de macrófagos M1 (alta expresión de Ly6C) y M2 (baja expresión de Ly6C). Asimismo, se determinó la subpoblación de linfocitos B activados, correspondiente a las células B220<sup>+</sup>/Ly6C<sup>+</sup>, dentro de la población de células leucocitarias.

### 2.10. Análisis de expresión génica

La mitad restante de la segunda malla implantada en cada animal se utilizó para el análisis de expresión génica. Para ello, se aisló el ARN total de las células adheridas a la malla mediante TRI-Reagent (Sigma, St. Louis, MO, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc se sintetizó a partir del ARNm mediante una reacción de transcripción inversa utilizando la transcriptasa inversa Superscript III (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Para la amplificación por PCR se utilizaron *kits* comerciales de expresión génica, todos ellos de Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc. Los genes

analizados fueron IL-4 (ID: 16189), IL-13 (ID: 16163), Arg-1 (ID: 11846), iNOS (ID: 18126), MCP1 (ID: 20296), MIP-1 $\alpha$  (ID: 20302), Opn (ID: 20750), Wt1 (ID: 22431), Efemp1 (ID: 216616), Col1a1 (ID: 12842) y Col3a1 (ID: 12825).

La qRT-PCR se llevó a cabo utilizando sondas TaqMan en el equipo 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific Inc.). Los productos de PCR se cuantificaron mediante el cálculo de  $2^{-\Delta Ct}$ . Todas las muestras (n=4 por grupo) se analizaron separadamente utilizando el gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, ID: 14433) como *housekeeping*.

### 2.11. Análisis estadístico

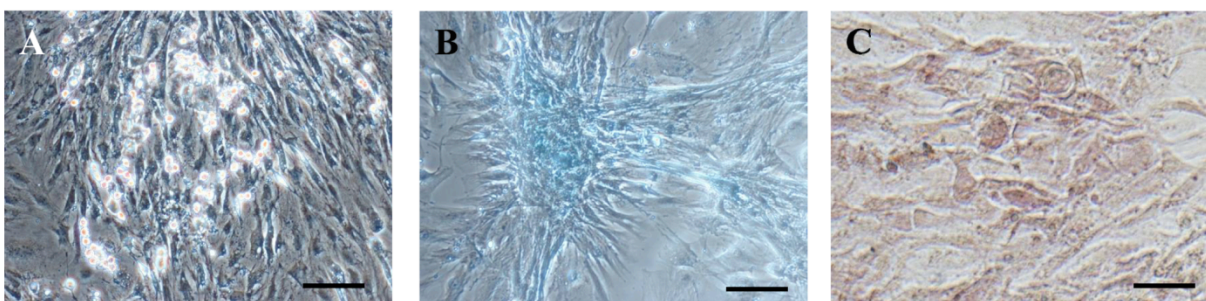
Los datos se analizaron con el *software* SPSS-21 (SPSS, Chicago, IL, USA) mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey cuando se encontraron diferencias significativas, en el caso de variables

paramétricas. Para variables no paramétricas, se llevó a cabo el test de Kruskal-Wallis, seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn cuando se encontraron diferencias significativas entre grupos. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar (SD, *standard deviation*). Todos los valores de  $p \leq 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Fenotipo y capacidad de diferenciación de las células madre mesenquimales murinas

El análisis mediante citometría de flujo de los diferentes marcadores de superficie de las MSCs murinas derivadas de médula ósea mostraron un perfil fenotípico CD29<sup>+</sup>/CD44<sup>+</sup>/CD90<sup>+</sup>/CD105<sup>+</sup>/MHC-I<sup>+</sup>/MHC-II<sup>-</sup> (Tabla 1). Además, el ensayo de diferenciación adipogénica, condrogénica y osteogénica permitió demostrar la multipotencialidad de las células (Figura 1).



**Figura 1. Multipotencialidad de las MSCs murinas derivadas de médula ósea.** Diferenciación adipogénica (A), condrogénica (B) y osteogénica (C) de las MSCs murinas cultivadas durante 21 días con medios específicos de diferenciación. Las diferenciaciones adipogénica, condrogénica y osteogénica se evidenciaron mediante tinción con Oil Red O, Alcian Blue y Alizarin Red S, respectivamente, y visualización mediante microscopía óptica. Escala: 100  $\mu$ m.

**Tabla 1. Perfil de expresión de los diferentes marcadores de superficie analizados mediante citometría de flujo en las MSCs murinas.**

Marcador	CD29	CD44	CD90	CD105	MHC-I	MHC-II
MRFI*	++	++	++	+	++	-

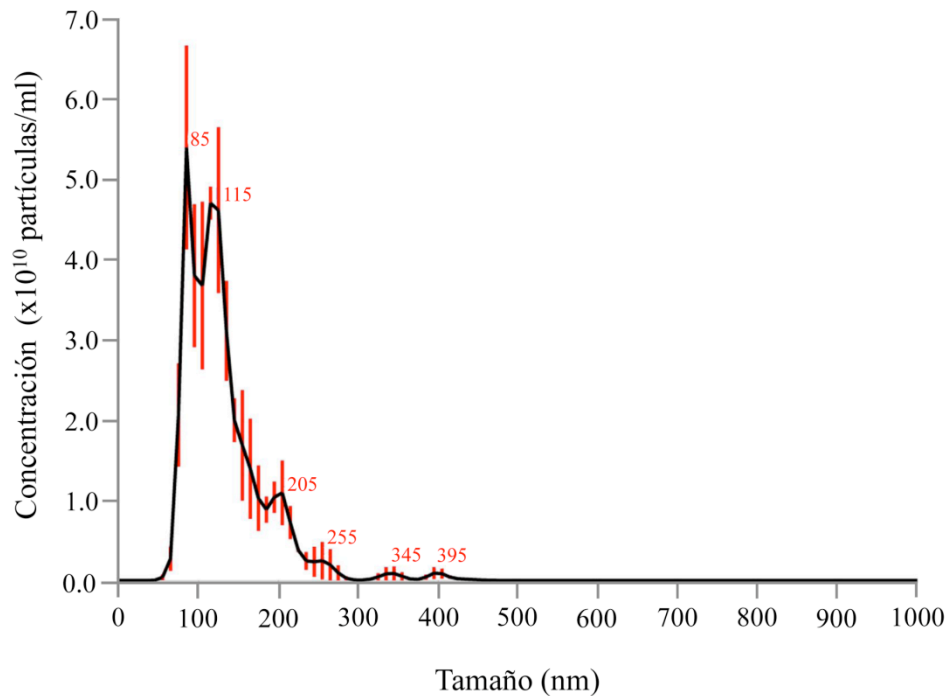
\*MRFI  $\leq 2$  (-), 2 - 10 (+), 10 - 100 (++)

### 3.2. Caracterización del concentrado de exomas aislado a partir de las células madre mesenquimales murinas

Los sobrenadantes del cultivo de las MSCs, enriquecidos hasta 50 veces, se caracterizaron mediante cuantificación de proteína total, análisis de rastreo de nanopartículas y citometría de flujo.

La determinación de proteína total en estos concentrados mediante ensayo de Bradford resultó en valores de 20 000  $\mu$ g/ml. En cuanto al análisis mediante

citometría de flujo, se encontró una expresión positiva del marcador exosomal CD9 (MRFI=4.63). Finalmente, en el análisis de rastreo de nanopartículas se obtuvo un tamaño medio de las partículas de 131.6 $\pm$ 52.2 nm. En cuanto a su concentración, esta fue de 3.96 $\times 10^{11}$  $\pm$ 1.02 $\times 10^{10}$  partículas/ml. La representación detallada del tamaño de partículas frente a su concentración se muestra en la Figura 2.



**Figura 2. Representación gráfica de la distribución del tamaño y la concentración de las partículas presentes en el concentrado de exosomas, obtenida mediante análisis de rastreo de nanopartículas.**

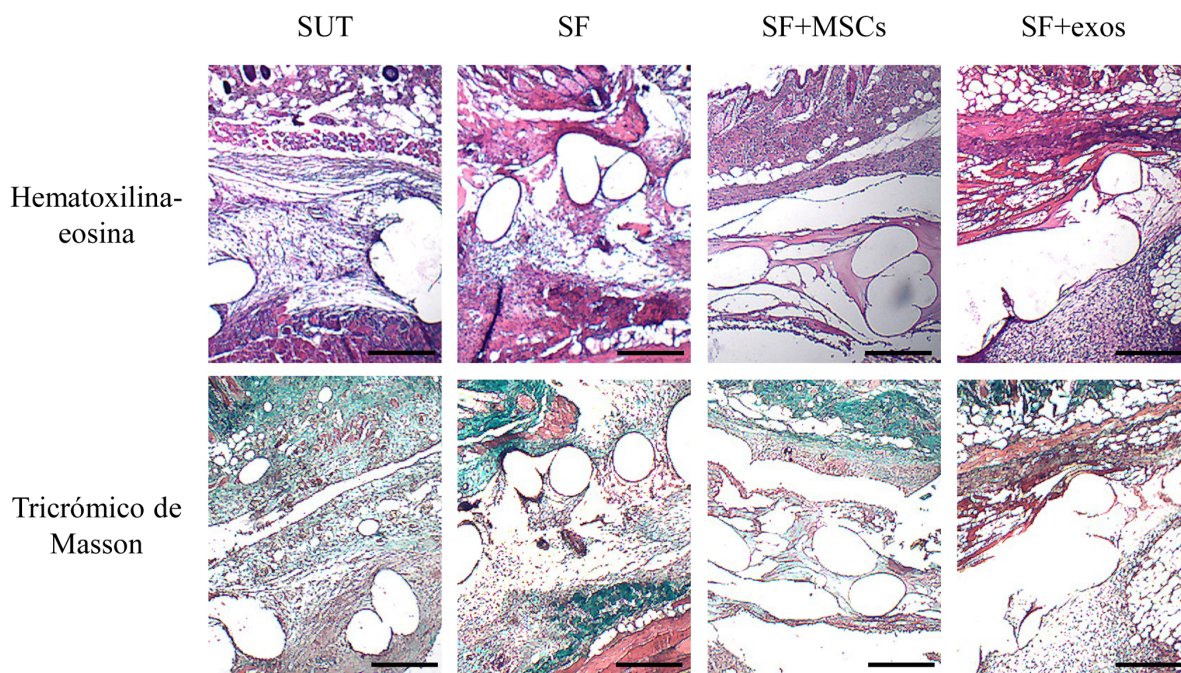
### 3.3. Evaluación histológica del infiltrado celular en el tejido adyacente al lugar de implantación de las mallas

Los cortes histológicos realizados tras extraer una de las mallas implantadas junto con el tejido adyacente a la misma se evaluaron tras realizar las tinciones con hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson mediante observación bajo microscopía óptica.

Los resultados obtenidos mostraron un incremento de la infiltración linfocitaria en el grupo SF. Sin embargo, no

se evidenciaron diferencias cuando se comparó este grupo con los grupos SF+MSCs ni SF+exos. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos en términos de hemorragia, necrosis o neovascularización. La tinción con tricrómico de Masson reveló la ausencia de cambios significativos en los depósitos de colágeno alrededor de las mallas implantadas. La Figura 3 muestra campos representativos de las muestras histológicas analizadas.





**Figura 3. Histología de la zona de implantación de las mallas y el tejido adyacente.** Tras la eutanasia de los animales 7 días después de la implantación de las mallas, una de ellas fue extraída junto con la piel y la capa muscular y peritoneo adyacentes, fijada en paraformaldehído al 4%, embebida en parafina y cortada en láminas de 5-8  $\mu\text{m}$  de espesor. Las preparaciones histológicas se tiñeron con hematoxilina-eosina y con tricrómico de Masson. Las imágenes muestran campos representativos de las muestras evaluadas. Escala: 100 $\mu\text{m}$ .

#### 3.4. Evaluación del fenotipo de los linfocitos infiltrados en el lugar de implantación de las mallas quirúrgicas

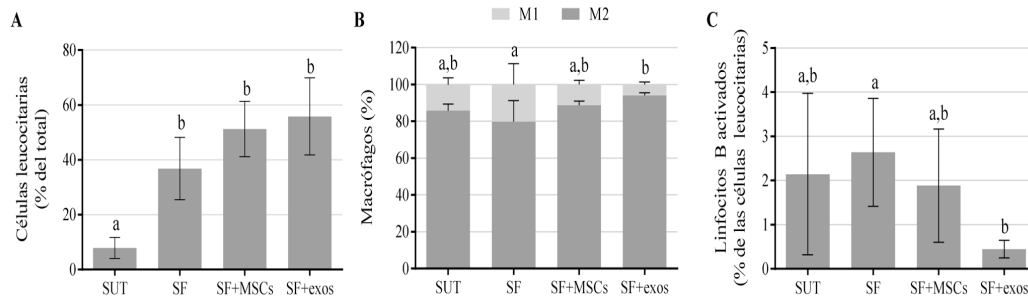
Para obtener datos adicionales sobre la naturaleza celular de los infiltrados localizados en el tejido adyacente al lugar de implantación de las mallas quirúrgicas, y con el fin de lograr una evaluación más objetiva de estos parámetros que la realizada mediante evaluación histológica, se llevó a cabo la identificación y caracterización de diferentes poblaciones celulares en estos infiltrados mediante citometría de flujo. Para ello, el infiltrado celular se separó mecánicamente de la malla, a la que se encontraba adherido, y se tripsinizó. La suspensión celular se marcó con anticuerpos anti-CD45, anti-Ly6C y anti-B220. Se cuantificó el porcentaje de células leucocitarias ( $\text{CD45}^+$ ), macrófagos M1 ( $\text{CD45}^+/\text{Ly6C}$  alto) macrófagos M2 ( $\text{CD45}^+/\text{Ly6C}$  bajo) y linfocitos B activados ( $\text{CD45}^+/\text{B220}^+/\text{Ly6C}^+$ ). Una vez terminado el análisis, se realizó la comparación estadística entre grupos.

Los resultados mostraron que el porcentaje de células leucocitarias (células  $\text{CD45}^+$  del total de células que conformaban el infiltrado) se incrementó

significativamente en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos en comparación con el grupo SUT (Figura 4A).

El balance entre las subpoblaciones de macrófagos M1 y M2 se analizó, en primer lugar, seleccionando las células conforme a sus características de tamaño y granularidad (FSC/SSC) y a la expresión de CD45. Dentro de esta población, la expresión de Ly6C se utilizó para identificar los dos fenotipos de macrófagos. El análisis estadístico reveló una disminución significativa en el porcentaje de macrófagos M1, predominantemente inflamatorios, en el grupo SF+exos en comparación con el grupo SF. Del mismo modo, en el grupo con exomas se apreció conjuntamente un aumento significativo en el porcentaje de macrófagos M2, de características antiinflamatorias, al compararlo con el grupo SF (Figura 4B).

De modo similar a los macrófagos M2, la población de linfocitos B activados, identificadas como células  $\text{B220}^+/\text{Ly6C}^+$  dentro de la población de células  $\text{CD45}^+$ , disminuyó significativamente en el grupo SF+exos en comparación con el grupo SF (Figura 4C).



**Figura 4. Determinación mediante citometría de flujo de diferentes poblaciones celulares infiltradas en el tejido.** Se identificó y caracterizó el porcentaje de células leucocitarias infiltradas en el tejido alrededor de la malla implantada (A), el porcentaje de macrófagos M1/M2 (B) y el porcentaje de linfocitos B activados (C). Las gráficas representan la media±SD de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey para variables con distribución paramétrica (porcentaje de células leucocitarias). Para variables no paramétricas (macrófagos M1 y M2, y porcentaje de linfocitos B activados), se llevó a cabo un test de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn para evidenciar las diferencias entre grupos concretos. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

### 3.5. Análisis de expresión génica en el lugar de implantación de las mallas quirúrgicas y en el tejido adyacente

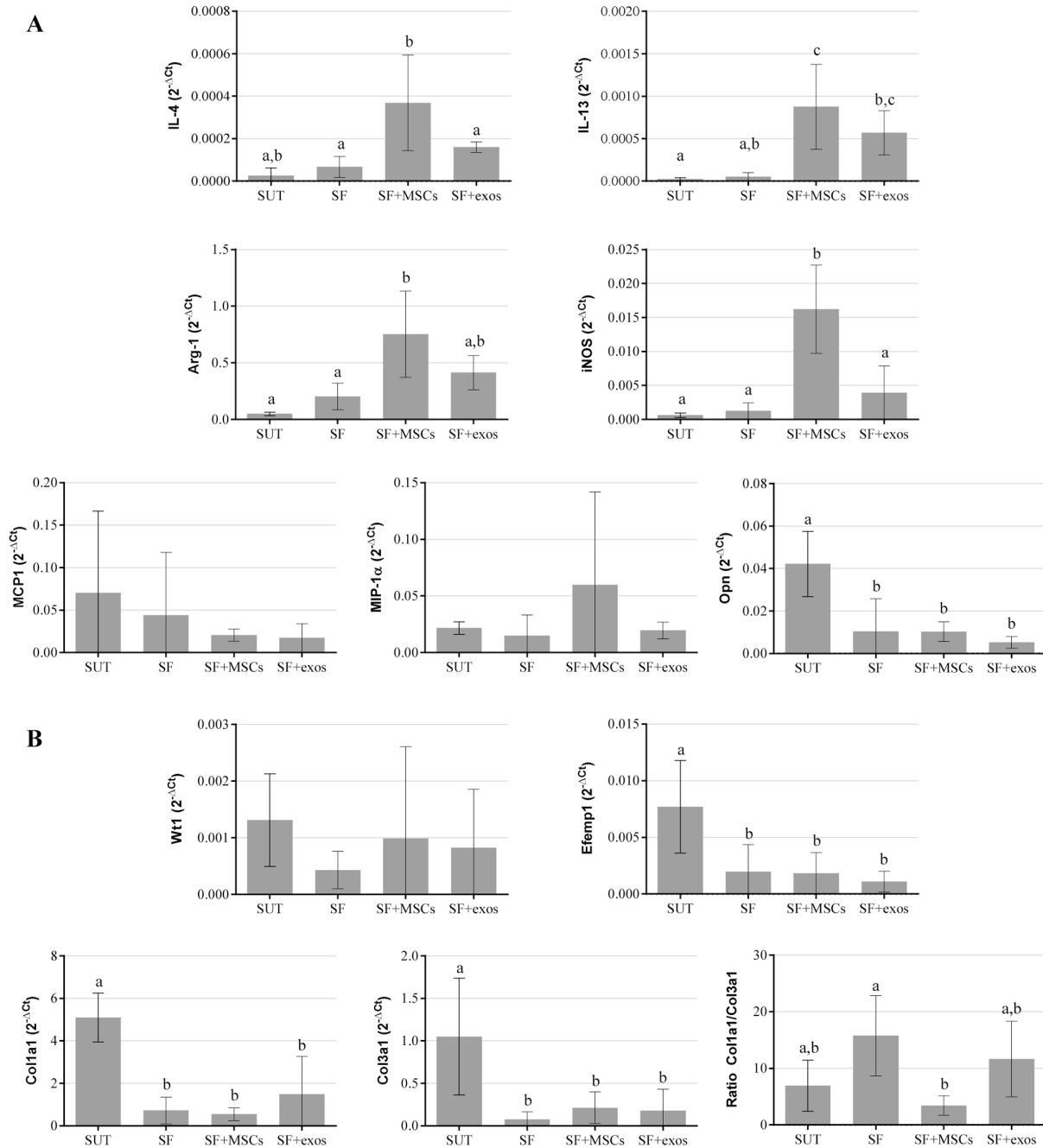
Las mallas quirúrgicas extraídas tras 7 días desde su implantación fueron procesadas para extraer el ARN total y la expresión génica se analizó mediante qRT-PCR. Se analizó una amplia variedad de genes relacionados con la respuesta inflamatoria (IL-4, IL-13, Arg-1, iNOS, MCP1, MIP-1 $\alpha$  y Opn) así como de genes relacionados con la remodelación tisular (Wt1, Efemp1, Colla1 y Col3a1).

En cuanto al primer grupo de genes analizados, los relacionados con la respuesta inflamatoria, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la expresión de los genes MCP1 y MIP-1 $\alpha$ . Sin embargo, se observó un aumento significativo en la expresión de IL-4, IL-13, Arg-1 e iNOS en el grupo SF+MSCs en comparación el grupo SF. Además, este aumento resultó

también significativo al compararlo con el grupo SF+exos en el caso de la IL-4 e iNOS. Para IL-13, Arg-1 e iNOS, el aumento de expresión en el grupo SF+MSCs fue también estadísticamente significativo al compararlo con el grupo SUT. En el caso de la Opn, se observó una disminución significativa en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos en comparación con el grupo SUT (Figura 5A).

En relación al grupo de genes implicados en la remodelación tisular, se observó una disminución significativa en la expresión de Efemp1, Colla1 y Colla3 en los grupos SF, SF+MSCs y SF+exos al compararlos con el grupo SUT. El ratio entre la expresión de Colla1 y Col3a1 disminuyó significativamente en el grupo SF+MSCs en comparación con el grupo SF. Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de Wt1 (Figura 5B).





**Figura 5. Expresión génica en el lugar de implantación de las mallas y en el tejido adyacente de los diferentes genes analizados.** Después de 7 días desde la implantación de las mallas, se aisló el ARN total del tejido adherido a las mallas implantadas, se retrotranscribió el ARNm y el ADNc se amplificó mediante qRT-PCR. Los productos de PCR se cuantificaron mediante el cálculo de  $2^{-\Delta Ct}$  utilizando GAPDH como housekeeping. Las gráficas representan la media $\pm$ SD de 4 experimentos independientes. Los datos se analizaron estadísticamente mediante ANOVA de un factor seguido del test de Tukey. Las letras diferentes denotan diferencias estadísticamente significativas ( $p \leq 0.05$ ).

#### 4. DISCUSIÓN

El uso de las mallas quirúrgicas sintéticas se introdujo en el tratamiento de las hernias hace aproximadamente cinco décadas. La implantación de estas mallas proporciona un soporte adicional que refuerza los tejidos debilitados o dañados en los diferentes tipos de hernias. En

el caso de las hernias incisionales, así como en otros tipos de hernias, tras la implantación de estas mallas se producen, de manera relativamente frecuente, diferentes efectos adversos que provocan dolor e incomodidad en el paciente. Por ello, se ha trabajado en el desarrollo de nuevos materiales y diseños para la fabricación de las

mallas que permitan reducir la reacción inflamatoria adversa, el dolor crónico o la erosión (23). En los últimos años, los avances en la fabricación de las mallas se han centrado en la biocompatibilidad de los materiales y en mejorar los mecanismos que permiten el remodelado tisular y la trans migración de células del hospedador (24). Además, se han probado clínicamente diferentes recubrimientos de las mallas de polipropileno para reducir la reacción a cuerpo extraño e incrementar la biocompatibilidad (25,26). Recientemente, la combinación de mallas quirúrgicas con células madre adultas ha sido probada por este grupo en condiciones preclínicas, demostrando un efecto antiinflamatorio mediado a través de la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 prorrregenerativo (20). También se han reportado otros estudios en los que se han utilizado MSCs en combinación con mallas quirúrgicas para la reparación de tendón (27) y, en el contexto de las hernias, se han utilizado MSCs autólogas vehiculadas en soportes descellularizados en modelo de hernia inguinal en conejo (28).

Por otra parte, los métodos de fijación de las mallas quirúrgicas son también un asunto de debate. Actualmente, entre los métodos más usados se encuentran la sutura, las grapas, los “*tacks*”, los pegamentos quirúrgicos, o la combinación de varios de ellos, y se han llevado a cabo diferentes estudios para comparar algunos de estos métodos entre sí (29,30).

En este trabajo quisimos evaluar el papel del sellador de fibrina como método de fijación de las mallas y, además, como vehículo para la administración de células madre adultas y sus exosomas en el contexto de las hernias incisionales. Estos selladores de fibrina se han utilizado anteriormente como soporte para la implantación de células madre en múltiples escenarios relacionados con la ingeniería tisular (12) y más específicamente, en la reparación osteocondral (31) y el infarto de miocardio (19).

Nuestros primeros ensayos *in vitro* sirvieron para expandir y caracterizar las MSCs murinas derivadas de médula ósea, demostrando la expresión de marcadores característicos de estas líneas, así como su capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes. Además, los ensayos preliminares realizados para optimizar la combinación de las células con el sellador de fibrina revelaron que la composición de este último debe ser testada cuidadosamente de forma previa a su uso como vehículo de células madre. En nuestro caso, fue necesario ajustar el pH del fibrinógeno y la trombina entre 6.5 y 7.5 para mantener la viabilidad celular (datos no mostrados). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ho *et al.*, quienes observaron que las soluciones de trombina y fibrinógeno pueden alterar la tasa de proliferación de MSCs humanas (32).

Los siguientes experimentos se centraron en aislar y caracterizar la fracción enriquecida de exosomas derivados de las MSCs murinas de médula ósea. La concentración, tamaño y expresión del marcador de exosomas CD9 se determinaron mediante análisis seguimiento de

nanopartículas y citometría de flujo, demostrando que el protocolo de aislamiento permite la obtención de estas microvesículas de manera simple y reproducible para ser usadas como producto terapéutico. De hecho, la caracterización de nuestros exosomas arrojó resultados similares a los reportados en publicaciones previas, obtenidos a partir de MSCs humanas y porcinas (33,34).

Los ensayos *in vivo* se realizaron en un modelo murino de hernia incisional utilizando instrumental microquirúrgico. Aunque el modelo de hernia incisional ha sido previamente descrito en cerdo, conejo y rata, el modelo murino ofrece diferentes ventajas con respecto a los primeros, especialmente en términos de disponibilidad de reactivos y consumibles de laboratorio para los análisis posteriores. Para estudiar la respuesta inflamatoria producida a nivel local e identificar las poblaciones celulares infiltradas, se llevó a cabo una evaluación histológica de los tejidos adyacentes al lugar de implantación de las mallas, así como un análisis más preciso de las poblaciones celulares mediante citometría de flujo. Por último, se analizó la expresión de diferentes genes relacionados con la respuesta inflamatoria, la polarización de macrófagos y el remodelado tisular en esa misma zona.

El análisis anatomopatológico de las mallas quirúrgicas y su tejido adyacente tras 7 días desde su implantación reveló una infiltración de células leucocitarias en dicha zona cuando se utilizó el sellador de fibrina, independientemente de su combinación con MSCs o sus exosomas. Otros estudios previos han mostrado también un incremento de la infiltración de leucocitos en las redes de fibrina (35) sujetas a una regulación por factores quimiotácticos como los fibrinopéptidos, fibronectina o trombina enzimáticamente activa (36). También en un estudio en el que se analizaban selladores de fibrina como método de fijación de mallas quirúrgicas se reportó que dicha sustancia desencadenó una fuerte respuesta inflamatoria junto con una reacción fibrosa (37). En este punto, es importante tener en cuenta que la reacción inflamatoria observada en nuestro estudio podría tener también un componente relacionado con una posible reacción alérgica contra la fibrina y fibrinógeno humanos en el modelo animal, que ha sido también descrita en un estudio previo (38) en el que, además, se puntualizaba que la respuesta inflamatoria puede resultar beneficiosa desde el punto de vista de la implantación de las mallas, ya que favorecería la incorporación de tejido. De hecho, el refuerzo proporcionado por estos materiales no se produce por la propia malla en sí, sino por la producción de tejido alrededor de sus fibras (39).

Tras la evaluación histológica de los tejidos, el análisis mediante citometría de flujo del infiltrado inflamatorio corroboró los hallazgos histológicos, mostrando un incremento de células leucocitarias (CD45<sup>+</sup>) en todos los grupos en los que la malla se fijó con el sellador de fibrina. El análisis de la polarización de macrófagos reveló un descenso significativo de los macrófagos de fenotipo M1, junto con un incremento de los M2, cuando se

administraron exosomas, en comparación con la administración del sellador de fibrina solo. El efecto de los exosomas derivados de MSCs en la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 prorrregenerativo ha sido descrito previamente en un modelo murino de daño muscular (40) y, además, otros estudios han evidenciado también las propiedades inmunomoduladoras de estos exosomas en condiciones *in vitro* frente a linfocitos T activados (33), en modelos animales de sinovitis (34) y en enfermedades cardiovasculares (41). Por último, en relación al efecto de los exosomas derivados de MSCs sobre las células B, hay estudios que muestran su capacidad para inhibir la activación de estos linfocitos *in vitro* (42,43), lo que coincide con nuestros resultados *in vivo*, en los que se observa un descenso significativo de los linfocitos B activados caracterizados como CD45+/B220+/Ly6C+ (44) en los tejidos en los que las mallas se fijaron con sellador de fibrina y exosomas, en comparación con aquellos que únicamente llevaban sellador de fibrina.

Para realizar una caracterización más profunda de la respuesta inflamatoria, se realizó un análisis de la expresión de diferentes genes en el tejido adyacente a las mallas implantadas. Nuestros resultados mostraron un incremento significativo de las citoquinas TH2 IL-4 e IL-13 en los animales en los que el sellador de fibrina se administró junto a MSCs o exo-MSCs. Ambas citoquinas se asocian a la polarización de macrófagos desde un fenotipo M1 hacia M2 (45). Además, considerando que la expresión divergente de Arg-1 e iNOS se ha relacionado frecuentemente con los fenotipos M2 y M1, respectivamente (46), consideramos conveniente estudiar también la expresión de estos dos genes. La expresión de Arg-1 se vio significativamente incrementada en el grupo que recibió MSCs, en comparación con los grupos donde las mallas se fijaron con suturas o con el sellador de fibrina. Además, los niveles de expresión de iNOS se encontraron muy por debajo de los de Arg-1 en todos los grupos. Por último, se apreciaron diferencias significativas en la expresión de Opn, una proteína secretada por los macrófagos, entre otras células, y responsable del desequilibrio Th1/Th2 hacia Th1 (47). En concreto, esta proteína disminuyó significativamente en todos los grupos con sellador de fibrina, en comparación con el grupo en el que las mallas se fijaron con suturas. Tanto los resultados de la expresión de Arg-1 e iNOS como los de Opn, por tanto, son consistentes con la polarización de macrófagos hacia M2, sugerida también por los niveles de expresión de las citoquinas IL-4 e IL-13.

Los resultados del análisis de las poblaciones celulares infiltradas junto con el estudio de la expresión de genes relacionados con la inflamación muestran que, aunque no se observó una disminución de la respuesta inflamatoria en términos de células CD45<sup>+</sup> –una respuesta que, como se mencionó anteriormente, podría ser beneficiosa para la incorporación de tejido–, existe una modulación de esta respuesta hacia un perfil prorrregenerativo y menos agresivo, lo que podría suponer un riesgo menor de

desarrollar una respuesta exacerbada en la reacción a cuerpo extraño, sin disminuir, a su vez, la capacidad de incorporar nuevo tejido para reforzar la zona dañada.

Por último, el análisis de la expresión de los genes mayoritarios de colágeno tipo I y colágeno tipo III mostró una disminución significativa de ambos en todos los grupos en los que se empleó el sellador de fibrina, en comparación con el grupo en el que se emplearon suturas. Además, el ratio entre los colágenos tipo I y tipo III mostró un descenso significativo en el grupo con MSCs en comparación con el grupo en el que se empleó únicamente el sellador de fibrina. Teniendo en cuenta que la formación de las hernias y su recurrencia se asocia con una disminución del ratio entre los colágenos tipo I y tipo III (48), estos resultados podrían indicar que la fijación de las mallas con el sellador de fibrina podría incrementar la resistencia biomecánica de las mallas quirúrgicas al tener fibras de colágeno más gruesas en el tejido adyacente.

## 5. CONCLUSIONES

En un modelo *in vivo* de hernia incisional en ratón se ha demostrado que los selladores de fibrina pueden emplearse como vehículo para la administración de MSCs y de sus exosomas en el contexto de la fijación de mallas quirúrgicas. La identificación histológica y celular de los leucocitos infiltrados demuestra que los exo-MSCs reducen la infiltración de macrófagos inflamatorios M1. Por último, el análisis de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria corroboró esta observación, mostrando una predominancia de citoquinas relacionadas con la respuesta Th2, y con ello, con la polarización de macrófagos hacia un fenotipo M2 antiinflamatorio, en el tejido circundante a las mallas en las que se vehicularon MSCs o sus exosomas.

## 6. CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe ningún conflicto de intereses.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Los experimentos *in vitro* se desarrollaron en la ICTS Nanbiosis (Unidad 14: *Cell Therapy* del CCMIJU). La caracterización de exosomas se llevó a cabo en la ICTS Nanbiosis (Unidad 6: *Biomaterial Processing and Nanostructuring Unit*). Los experimentos *in vivo* se desarrollaron en la ICTS Nanbiosis (Unidad 22: *Animal housing* del CCMIJU). El Servicio de técnicas aplicadas a la biociencia del SAIUEx (financiado por la UEx, Junta de Extremadura, MICINN, FEDER y FSE) proporcionó apoyo técnico y humano en el desarrollo de este estudio.

Este trabajo ha sido financiado en parte por el CIBER-CV (CB16/11/00494), una ayuda de la Junta de Extremadura (Ayuda a grupos catalogados de la Junta de Extremadura, GR15175), dos ayudas de la Junta de Extremadura a JGC (TA13042 y IB16168 cofinanciadas por FEDER/FSE) y una ayuda del ISCIII a JGC (CP17/00021) cofinanciada por ERDF/ESF, “*Investing in your future*”. Las entidades financiadoras no intervinieron en el diseño del estudio, recogida de datos y su análisis, decisión de publicación ni

preparación del manuscrito.

## 8. REFERENCIAS

1. Arap A, Francisco J, Sierra G, Carlos J. Hernia incisional: definición, diferencia con la evisceración, clasificación, diagnóstico positivo y diferencial, profilaxis y tratamiento. *Rev Cuba Cir* 2011; 50(3): 388–400.
2. Schulz SM, Uherek PF, Mejias GP. Hernia incisional. *Cuad Cir* 2003; 17(1): 103–11.
3. Brown C, Finch J. Which mesh for hernia repair? *Ann R Coll Surg Engl* 2010; 92(4): 272–8.
4. Claus CMP, Rocha GM, Campos ACL, *et al.* Prospective, randomized and controlled study of mesh displacement after laparoscopic inguinal repair: fixation versus no fixation of mesh. *Surg Endosc* 2016; 30(3): 1134–40.
5. Garcia-Vallejo L, Couto-Gonzalez I, Concheiro-Coello P, *et al.* Cyanoacrylate surgical glue for mesh fixation in laparoscopic total extraperitoneal hernia repair. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2014; 24(3): 240–3.
6. Fortelny RH, Petter-Puchner AH, Glaser KS, Redl H. Use of fibrin sealant (Tisseel/Tissucol) in hernia repair: a systematic review. *Surg Endosc* 2012; 26(7): 1803–12.
7. Sanders DL, Waydia S. A systematic review of randomised control trials assessing mesh fixation in open inguinal hernia repair. *Hernia* 2014; 18(2): 165–76.
8. Powell BS, Voeller GR. Current developments in hernia repair; meshes, adhesives, and tacking. *Surg Technol Int* 2010; 20: 175–81.
9. Petter-Puchner AH, Fortelny R, Mittermayr R, *et al.* Fibrin sealing versus stapling of hernia meshes in an onlay model in the rat. *Hernia* 2005; 9(4): 322–9.
10. van der Ham AC, Kort WJ, Weijma IM, *et al.* Effect of fibrin sealant on the healing colonic anastomosis in the rat. *Br J Surg* 1991; 78(1): 49–53.
11. Hanson AJ, Quinn MT. Effect of fibrin sealant composition on human neutrophil chemotaxis. *J Biomed Mater Res.* 2002; 61(3): 474–81.
12. Ahmed TAE, Dare EV, Hincke M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14(2): 199–215.
13. Cox S, Cole M, Tawil B. Behavior of human dermal fibroblasts in three-dimensional fibrin clots: dependence on fibrinogen and thrombin concentration. *Tissue Eng* 2004; 10(5–6): 942–54.
14. Barbizan R, Castro MV, Barraviera B, *et al.* Influence of delivery method on neuroprotection by bone marrow mononuclear cell therapy following ventral root reimplantation with fibrin sealant. *PloS One* 2014; 9(8): e105712.
15. Reichenberger MA, Mueller W, Hartmann J, *et al.* ADSCs in a fibrin matrix enhance nerve regeneration after epineurial suturing in a rat model. *Microsurgery* 2016; 36(6): 491–500.
16. Hao C, Wang Y, Shao L, *et al.* Local Injection of Bone Mesenchymal Stem Cells and Fibrin Glue Promotes the Repair of Bone Atrophic Nonunion In Vivo. *Adv Ther* 2016; 33(5): 824–33.
17. Manunta AF, Zedde P, Pilicchi S, *et al.* The use of embryonic cells in the treatment of osteochondral defects of the knee: an ovine in vivo study. *Joints* 2016; 4(2): 70–9.
18. Mehanna RA, Nabil I, Attia N, *et al.* The Effect of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Their Conditioned Media Topically Delivered in Fibrin Glue on Chronic Wound Healing in Rats. *BioMed Res Int* 2015; 2015: 846062.
19. Roura S, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Fibrin, the preferred scaffold for cell transplantation after myocardial infarction? An old molecule with a new life. *J Tissue Eng Regen Med* 2017; 11(8): 2304–13.
20. Blázquez R, Sánchez-Margallo FM, Álvarez V, *et al.* Surgical meshes coated with mesenchymal stem cells provide an anti-inflammatory environment by a M2 macrophage polarization. *Acta Biomater* 2016; 31: 221–30.
21. Lai RC, Chen TS, Lim SK. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease. *Regen Med* 2011; 6(4): 481–92.
22. Biondo-Simões MLP, Moura PAP, Colla K, *et al.* Inflammatory reaction and tensile strength of the abdominal wall after an implant of polypropylene mesh and polypropylene/poliglecaprone mesh for abdominal wall defect treatment in rats. *Acta Cir Bras* 2014; 29 Suppl 1: 45–51.
23. Klosterhalfen B, Klinge U, Schumpelick V. Functional and morphological evaluation of different polypropylene-mesh modifications for abdominal wall repair. *Biomaterials* 1998; 19(24): 2235–46.
24. Barski D, Gerullis H, Georgas E, *et al.* Coating of mesh grafts for prolapse and urinary incontinence repair with autologous plasma: exploration stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int* 2014; 2014: 296498.
25. Gerullis H, Georgas E, Eimer C, *et al.* Coating with autologous plasma improves biocompatibility of mesh grafts in vitro: development stage of a surgical innovation. *BioMed Res Int* 2013; 2013: 536814.
26. Junge K, Rosch R, Klinge U, *et al.* Titanium coating of a polypropylene mesh for hernia repair: effect on biocompatibility. *Hernia* 2005; 9(2): 115–9.
27. Schon LC, Gill N, Thorpe M, *et al.* Efficacy of a mesenchymal stem cell loaded surgical mesh for tendon repair in rats. *J Transl Med* 2014; 12: 110.
28. Zhang Y, Zhou Y, Zhou X, Zhao B, Chai J, Liu H, *et al.* Preparation of a nano- and micro-fibrous decellularized scaffold seeded with autologous mesenchymal stem cells for inguinal hernia repair. *Int J Nanomedicine*. 2017 Feb 21;12:1441–52.

29. Wassenaar E, Schoenmaeckers E, Raymakers J, *et al.* Mesh-fixation method and pain and quality of life after laparoscopic ventral or incisional hernia repair: a randomized trial of three fixation techniques. *Surg Endosc* 2010; 24(6): 1296–302.
30. Chatzimavroudis G, Kalaitzis S, Voloudakis N, *et al.* Evaluation of four mesh fixation methods in an experimental model of ventral hernia repair. *J Surg Res* 2017; 212: 253–9.
31. Berninger MT, Wexel G, Rummeny EJ, *et al.* Treatment of osteochondral defects in the rabbit's knee joint by implantation of allogeneic mesenchymal stem cells in fibrin clots. *J Vis Exp* 2013; (75): e4423.
32. Ho W, Tawil B, Dunn JCY, Wu BM. The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure. *Tissue Eng* 2006; 12(6): 1587–95.
33. Blázquez R, Sanchez-Margallo FM, de la Rosa O, Dalemans W, *et al.* Immunomodulatory Potential of Human Adipose Mesenchymal Stem Cells Derived Exosomes on in vitro Stimulated T Cells. *Front Immunol* 2014; 5: 556.
34. G Casado J, Blázquez Durán R, Vela FJ, *et al.* Mesenchymal stem cells derived exosomes: immunomodulatory evaluation in an antigen-induced synovitis porcine model. *Front Vet Sci* 2017; 4: 39.
35. Wolberg AS. Determinants of fibrin formation, structure, and function. *Curr Opin Hematol* 2012; 19(5): 349–56.
36. Laurens N, Koolwijk P, de Maat MPM. Fibrin structure and wound healing. *J Thromb Haemost* 2006; 4(5): 932–9.
37. Topart P, Vandenbroucke F, Lozac'h P. Tisseel versus tack staples as mesh fixation in totally extraperitoneal laparoscopic repair of groin hernias: a retrospective analysis. *Surg Endosc* 2005; 19(5): 724–7.
38. Katkhouda N, Mavor E, Friedlander MH, *et al.* Use of fibrin sealant for prosthetic mesh fixation in laparoscopic extraperitoneal inguinal hernia repair. *Ann Surg* 2001; 233(1): 18–25.
39. Zogbi L. The Use of Biomaterials to Treat Abdominal Hernias. En: Pignatello R, Ed. *Biomaterials Applications for Nanomedicine* (Internet). InTech 2011 (2017 Sep 23). Disponible en (<http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/the-use-of-biomaterials-to-treat-abdominal-hernias>).
40. Lo Sicco C, Reverberi D, Balbi C, *et al.* Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles as Mediators of Anti-Inflammatory Effects: Endorsement of Macrophage Polarization. *Stem Cells Transl Med* 2017; 6(3): 1018–28.
41. Suzuki E, Fujita D, Takahashi M, *et al.* Stem cell-derived exosomes as a therapeutic tool for cardiovascular disease. *World J Stem Cells* 2016; 8(9): 297–305.
42. Cosenza S, Toupet K, Maumus M, *et al.* Mesenchymal stem cells-derived exosomes are more immunosuppressive than microparticles in inflammatory arthritis. *Theranostics* 2018; 8(5): 1399–410.
43. Di Trapani M, Bassi G, Midolo M, *et al.* Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Sci Rep* 2016; 6: 24120.
44. Wrammert J, Källberg E, Agace WW, Leanderson T. Ly6C expression differentiates plasma cells from other B cell subsets in mice. *Eur J Immunol* 2002; 32(1): 97–103.
45. Abumaree MH, Al Jumah MA, Kalionis B, *et al.* Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev* 2013; 9(5): 620–41.
46. Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest* 2012; 122(3): 787–95.
47. Rittling SR. Osteopontin in macrophage function. *Expert Rev Mol Med* 2011; 13: e15.
48. Henriksen NA, Yadete DH, Sorensen LT, *et al.* Connective tissue alteration in abdominal wall hernia. *Br J Surg* 2011; 98(2): 210–9.