

Revisión

Uso terapéutico de las vesículas extracelulares en insuficiencia renal aguda y crónica

Jordi Rovira ^{a,b}, Fritz Diekmann ^{a,b,c,*}, Josep M. Campistol ^{a,b,c} y María José Ramírez-Bajo ^a

^a Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), Centre de Recerca Biomèdica CELLEX, Fundació Clínic per la Recerca Biomèdica (FCRB), Barcelona, España

^b Laboratori Experimental de Nefrologia i Trasplantament (LENIT), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, España

^c Departamento de Nefrología y Trasplante Renal, Institut Clínic de Nefrologia i Urologia (ICNU), Hospital Clínic, Barcelona, España

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 24 de febrero de 2016

Aceptado el 28 de abril de 2016

On-line el 25 de julio de 2016

Palabras clave:

Vesículas extracelulares
Insuficiencia renal aguda y crónica
Terapia regenerativa

R E S U M E N

En la década de los 90 se descubrió un nuevo sistema de comunicación célula-célula, que consiste en la liberación de vesículas cargadas con partículas bioactivas (proteínas, mRNA, miRNA, metabolitos, etc.) en el espacio extracelular. Este tipo de comunicación se ha conservado durante la evolución, hecho que justificaría que la mayoría de los tipos celulares puedan generarlas. Estas vesículas extracelulares (VE) pueden regular diversos procesos fisiológicos, así como el desarrollo y progresión de enfermedades. En los últimos años se ha extendido el estudio de las VE generadas principalmente por células madre adultas o embrionarias, células sanguíneas, células del sistema inmune y nervioso, así como células tumorales. El análisis de VE en fluidos corporales ha sido utilizado como herramienta de diagnóstico en cáncer y recientemente para distintas enfermedades renales. Sin embargo, en esta revisión pretendemos analizar la importancia, función y posible aplicación clínica de las VE generadas por células madre en enfermedades renales y en trasplantes.

© 2016 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury

A B S T R A C T

A new cell-to-cell communication system was discovered in the 1990s, which involves the release of vesicles into the extracellular space. These vesicles shuttle bioactive particles, including proteins, mRNA, miRNA, metabolites, etc. This particular communication has been conserved throughout evolution, which explains why most cell types are capable of

Keywords:

Extracellular vesicles
Acute and chronic renal injury
Regenerative therapy

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: fdiekman@clinic.ub.es (F. Diekmann).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.nefro.2016.04.006>

0211-6995/© 2016 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

producing vesicles. Extracellular vesicles (EVs) are involved in the regulation of different physiological processes, as well as in the development and progression of several diseases. EVs have been widely studied over recent years, especially those produced by embryonic and adult stem cells, blood cells, immune system and nervous system cells, as well as tumour cells. EV analysis from bodily fluids has been used as a diagnostic tool for cancer and recently for different renal diseases. However, this review analyses the importance of EVs generated by stem cells, their function and possible clinical application in renal diseases and kidney transplantation.

© 2016 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Nefrología.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introducción

La aplicación de terapias celulares para frenar la progresión de enfermedades renales es una aproximación muy prometedora debido a su capacidad inmunomoduladora y regenerativa¹⁻⁵. El efecto protector de células madre mesenquimales (MSC) no es debido a su transdiferenciación, sino al impacto de su actividad en el tejido dañado¹. Sin embargo, antes de llegar a la práctica clínica de rutina existen una serie de aspectos de seguridad que deben ser analizados con más detenimiento: la posibilidad de rechazo inmunológico del receptor, la estabilidad genética de las células, la mala diferenciación a largo término y la probabilidad de transferencia viral⁶⁻⁸. Por ello, se ha impulsado el estudio de los mecanismos de acción asociados a su capacidad protectora y regenerativa para diseñar una terapia alternativa libre de células. Así, se describió que el secretoma o medio condicionado de las MSC puede ejercer el mismo efecto protector que las MSC sobre los daños tisulares y contribuir a la inmunomodulación del estado inflamatorio⁹⁻¹³. El análisis del medio condicionado puso de relevancia la presencia de factores de crecimiento, citocinas y de vesículas extracelulares (VE). Estas últimas pueden transferir proteínas, lípidos y material genético a las células residentes en el tejido dañado. Las VE contribuyen activamente a la capacidad terapéutica de las MSC y, en particular, a la reprogramación de las células residentes mediante la transferencia horizontal de mRNA y miRNA^{9,14-25}. Tras demostrarse que las VE poseen la misma capacidad terapéutica que las MSC, se está promoviendo a las VE como terapia libre de células por su mayor seguridad sanitaria²⁶.

La comunicación célula-célula mediante VE es un mecanismo que se ha conservado a lo largo de la evolución tanto en células eucariotas como en procariontes²⁷. Desde su descubrimiento hace 30 años²⁸, se ha demostrado que las VE son producidas por una gran variedad de tipos celulares: células sanguíneas, dendríticas, endoteliales y epiteliales, células del sistema nervioso, células madre adultas y embrionarias e incluso células tumorales.

Las VE están formadas por una membrana lipídica y pueden transmitir señales biológicas reguladoras mediante la transferencia de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, mRNA, miRNA, DNA mitocondrial y DNA genómico que regulan diversos procesos fisiológicos, así como en el desarrollo y progresión de enfermedades²⁹⁻³⁴. En el contexto fisiológico, todas las células pueden producir VE como mecanismo

habitual de comunicación paracrina/endocrina, si bien en el momento en que tiene lugar un daño la producción de VE se ve aumentada y el contenido vesicular modificado para alertar a las células adyacentes, progenitoras y del sistema inmunitario. Todo ello, para intentar restablecer la homeostasis del tejido dañado. Solamente las células progenitoras y las MSC pueden generar VE con capacidad protectora o regeneradora intrínseca.

En cuanto a la progresión de enfermedades, se ha demostrado que el microambiente define el contenido de las VE. Concretamente en la arterioesclerosis, las células del endotelio vascular sometidas a un ambiente de estrés mediado por calcio generan VE que promueven la mineralización del tejido³⁵.

En el contexto tumoral, se ha postulado que las células progenitoras al sufrir mutaciones pueden ser el origen de las *cancer stem cell*³⁶, las cuales producen VE implicadas en el desarrollo y progresión del tumor. Estas VE promueven angiogénesis³⁷, permiten escapar de la inmunovigilancia³⁸, inducen la eliminación de moléculas terapéuticas que activan la apoptosis³⁹ y participan activamente en la degradación de la matriz extracelular necesaria en la metástasis⁴⁰. Actúan como efectores paracrina/endocrino transportando moléculas bioactivas entre las células del microambiente, o bien, de forma remota mediante su transporte en fluidos biológicos⁴¹.

El origen y tamaño de las VE nos permite diferenciar entre exosomas (EX) y microvesículas (MV) (fig. 1). Los EX son vesículas de tamaño pequeño (70-150 nm) y tienen un origen endosomal, por consiguiente, su membrana está enriquecida con colesterol, ceramidas y esfingolípidos, y su contenido corresponde al existente en el compartimento endosomal. En cambio, las MV tienen un tamaño mayor (150-1.000 nm), se generan como resultado de evaginaciones de la membrana plasmática y su composición depende del tipo celular del que proceden^{42,43} (tabla 1). Las VE pueden actuar mediante 3 mecanismos (fig. 2): I) Activando una vía de señalización de la célula diana por su adhesión con elevada especificidad en la superficie de la célula diana (sin fusión de membrana), mediante las moléculas de adhesión y los receptores presentes en la superficie celular⁴⁴. II) Transfiriendo mRNA, miRNA, proteínas y moléculas de señalización, mediante la fusión de la membrana⁴⁵. III) Incorporando su contenido mediante endocitosis en las células diana y procesado de su contenido en el compartimento endosomal⁴⁶.

En la actualidad, las VE se están usando como biomarcadores en orina de diferentes enfermedades renales e incluso para el rechazo del injerto renal⁴⁷⁻⁵⁰. Sin embargo, el objetivo de

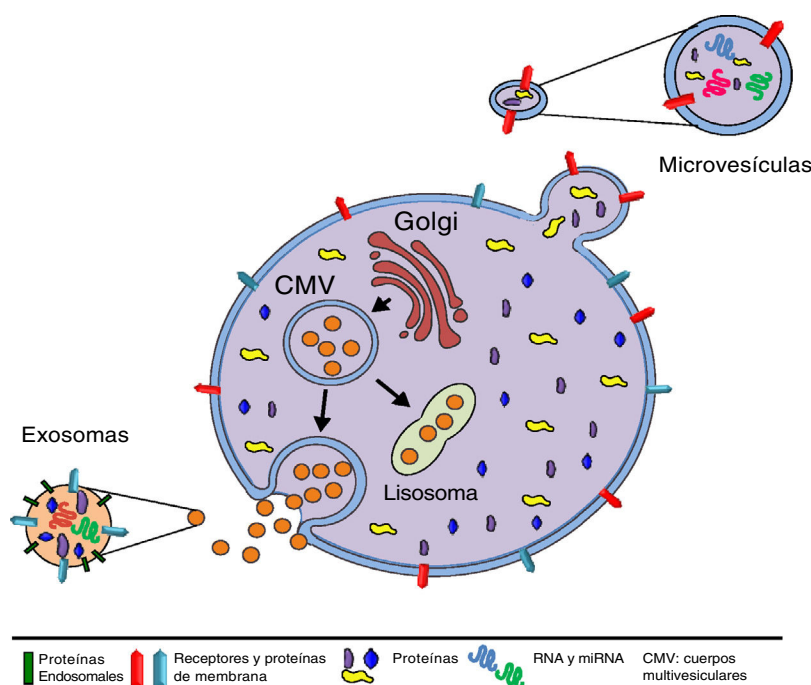


Figura 1 – Origen y composición de las vesículas extracelulares.

Tabla 1 – Características de las vesículas extracelulares

	Exosomas	Microvesículas
Tamaño en nm	70-150	150-1.000
Composición lipídica	Poca exposición de fosfatidilserina. Ácido lisobifosfatídico. Colesterol y ceramida	Elevada exposición de fosfatidilserina. Colesterol
Marcadores proteicos	Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9	Selectinas, integrinas, CD40, metaloproteinasas
Origen	Cuerpo multivesicular	Membrana plasmática
Mecanismos de secreción	Exocitosis del cuerpo multivesicular	Evaginación de la membrana plasmática
Composición	Proteínas, mRNA y miRNA	Proteínas, mRNA y miRNA

esta revisión es analizar la importancia, función y posible aplicación de las VE en enfermedades renales como terapia alternativa o bien terapia complementaria al uso de los inmunosupresores en el caso del trasplante renal. Por ello, analizaremos diferentes modelos *in vitro* e *in vivo* de daño renal en los que las VE procedentes de MSC han inducido regeneración^{15,51-57}.

Insuficiencia renal aguda

La insuficiencia renal aguda (IRA) se caracteriza por una pérdida en horas o días de la función excretora renal, con la acumulación de productos del metabolismo nitrogenado como la creatinina y la urea. Aunque las causas son controvertidas, las más comunes son una lesión por isquemia

y reperfusión (I/R) o la exposición a agentes nefrotóxicos que conducen a una necrosis tubular aguda. Estos insultos a nivel tubular conllevan la generación de mediadores inflamatorios que promueven la vasoconstricción y favorecen el proceso inflamatorio acompañado de la infiltración de neutrófilos secretores de especies reactivas de oxígeno, proteasas y mieloperoxidasas que agravan el daño renal. La IRA se considera una de las mayores causas de morbilidad en los pacientes hospitalizados, por ello hay tantos estudios que buscan biomarcadores que permitan un diagnóstico precoz, o bien que establezcan nuevas terapias^{1,58-60}.

El efecto protector y regenerativo de las MSC en modelos animales de la IRA está ampliamente documentado, sin embargo, en los últimos años han surgido importantes evidencias que demuestran que su efecto protector se debe a la acción paracrina y no a la posible transdiferenciación^{1,9,17-25}. Este efecto paracrina incluye una acción proliferativa, anti-apoptótica e inmunomoduladora. Concretamente, en el contexto del órgano dañado se genera un microambiente rico en citocinas como el interferón gamma (IFN γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), que estimulan las MSC e inducen la secreción de diferentes factores tróficos, de crecimiento, citocinas y VE⁶¹⁻⁶³.

El efecto protector de las VE se ha analizado en varios modelos de IRA en animales de experimentación: daño renal inducido por glicerol^{15,16,64,65}, cisplatino⁵⁴, gentamicina⁵⁵, I/R^{52,66-70}, obstrucción unilateral del uréter⁷¹ y nefrectomía 5/6 a 7 días poscirugía⁷² (tabla 2). Estos modelos de IRA se caracterizan por presentar daño tubular con un elevado componente inflamatorio asociado a un incremento del infiltrado intersticial, apoptosis y necrosis tubular. Este microambiente induce la selección de las VE del mismo modo que sucede con las MSC. La acumulación de VE a nivel tisular podría verse favorecida por el aumento de la permeabilidad que presentan

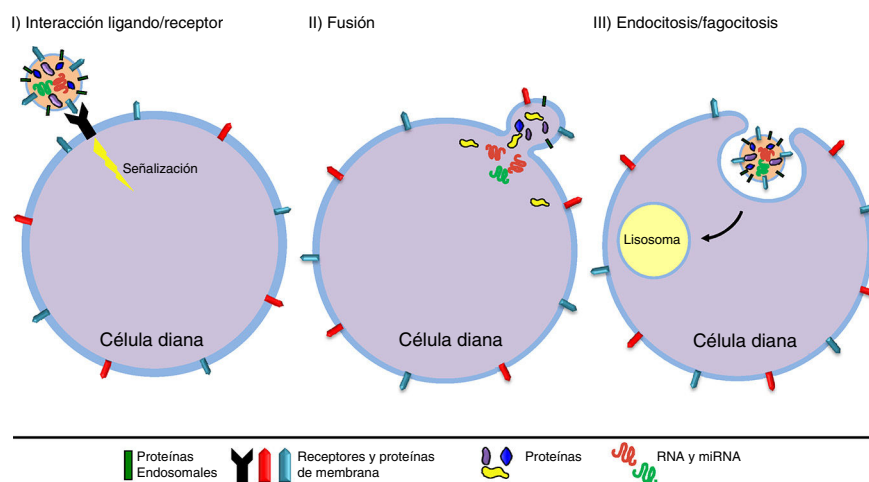


Figura 2 – Mecanismos de actuación de las vesículas extracelulares.

los tejidos dañados⁶⁴. La internalización de la VE depende de la presencia de receptores celulares (CRCX4) y de las moléculas de adhesión (CD44 y CD29), estas últimas localizadas tanto en las membranas de las VE como en las MSC²¹. Las VE más extensamente estudiadas han sido las generadas por las células humanas mesenquimales de médula ósea (BM-MS),

pero también se han llevado a cabo estudios con VE de otros orígenes como las células madre humanas de hígado, células madre mesenquimales de sangre de cordón umbilical, células humanas mesenquimales procedentes de la gelatina de Wharton, células progenitoras endoteliales circulantes (EPC) y células madre mesenquimales derivadas del riñón. Todas

Tabla 2 – Resumen de los modelos animales de insuficiencia renal aguda donde se aplica una terapia con VE

Modelo	Origen celular de las VE	Tipo de VE	Vía de administración	Capacidad terapéutica	Referencia
Glicerol	BM-MS	MV	Intravenosa	Recuperación morfológica y funcional mediante transferencia de mRNA y miRNA	16
	HLSC	MV	Intravenosa	Disminución de la necrosis y la proliferación tubular	65
	BM-MS	MV	Intravenosa	Recuperación morfológica y funcional	64
	BM-MS	MV	Intravenosa	Inducción de la proliferación	15
Isquemia-reperfusión	EPC	EX	Intravenosa	Disminución del efecto apoptótico y proinflamatorio	70
	BM-MS	MV	Intravenosa	Presencia de transcritos proangiogénicos	
	BM-MS	MV	Intravenosa	Inducción de la proliferación e inhibición de la apoptosis. Efecto proangiogénico	68
	WJ-MS	MV	Intravenosa	Inducción de la proliferación e inhibición de la apoptosis	69
	UCB-MS	MV	Intravenosa	Efecto antiinflamatorio	67
Cisplatino	EPC	MV	Intravenosa	Modulación de las células T.	66
	BM-MS	MV	Intravenosa	Inducción de la proliferación, inhibición de la apoptosis y del infiltrado leucocitario. Efecto proangiogénico	52
	UCB-MS	EX	Inyección en la capsula renal	Disminución de la apoptosis, necrosis de las células tubulares y estrés oxidativo	73
Gentamicina	BM-MS	MV	Intravenosa	Mejoría de la función renal y de la supervivencia	54
	BM-MS	EX	Intravenosa	Inducción de la proliferación e inhibición de la apoptosis y de la necrosis. Efecto antiinflamatorio	55
Obstrucción unilateral del uréter	BM-MS	MV	Intravenosa	Disminución del infiltrado linfocitario, inflamación tubular y necrosis	71
Nefrectomía 5/6	BM-MS	MV	Intravenosa	Disminución de la fibrosis, infiltrado linfocitario intersticial y disminución o ausencia de atrofia tubular	72

Tabla 3 – Ensayos clínicos realizados con células madre para tratar la insuficiencia renal aguda

Patología	Número Trial	Título	Tipo celular	Estado actual
Insuficiencia renal aguda	NCT01275612	MSC in cisplatin-induced acute renal failure in patients with solid organ cancers (CIS/MSO8)	MSC	Seleccionando
Insuficiencia renal aguda	NCT00733876	Allogeneic multipotent stromal cell treatment for acute kidney injury following cardiac surgery	BM-MSO	Completo
Insuficiencia renal aguda	NCT01602328	A study to evaluate the safety and efficacy of AC607 for the treatment of kidney injury in cardiac surgery subjects (ACT-AKI)	AC607 Allogeneic BM-MSO	Terminado
Hipertensión renovascular	NCT02266394	Hypoxia and inflammatory injury in human renovascular hypertension	MSC	Seleccionando

estas VE aceleran la recuperación del daño renal agudo de la misma manera que lo hacen las células productoras. Esta renoprotección se caracteriza por una mejora de los parámetros bioquímicos renales, con la disminución de las concentraciones de los niveles de nitrógeno ureico en sangre y de la creatinina en suero, y una mejora de las lesiones histológicas.

Los mecanismos de acción de las VE se han analizado en diferentes modelos *in vitro* que incluyen el uso de células epiteliales tubulares renales, células endoteliales y células mononucleares de sangre periférica. En todos ellos se ha observado que las VE dan lugar a una disminución de la expresión de moléculas inflamatorias, estimulan la proliferación e inhiben la apoptosis. El análisis proteómico de la MV derivadas de hUCB-MSO demostró la presencia de proteínas que ejercen un efecto protector del epitelio endotelial y tubular. Concretamente, hallaron galectina-1 y 3, mediadores en la regulación que ejercen las MSO sobre las células T, 2 marcadores de MSO, CD73 y CD90, asociados con su capacidad inmunosupresora y algunos elementos de la vía de complemento como el CD59, C5, C3 y C4A. Además, apolipoproteínas como ApoA2, ApoA4 y ApoC3, que se ha visto que tienen un efecto protector en el endotelio vascular en diversas condiciones patológicas, y proteínas transportadoras de lípidos como SCP2 y FABP6⁶⁷. Este contenido proteico se ve modificado radicalmente si las células reciben un estímulo proinflamatorio (IFN γ), que reduce considerablemente la capacidad protectora de las MV⁶⁷.

El daño oxidativo, característico de la enfermedad renal inducida por la administración de cisplatino, se ve reducido por la acción de los EX de hUCB-MSO, que disminuyen la formación de productos oxidativos, 8-HdG y MDA, e incrementan los niveles de GSH. A su vez, los EX promueven la proliferación celular al activar ERK1/2⁷³.

El daño agudo induce la apoptosis en la célula tubular renal. Para estudiar el impacto de las VE sobre la apoptosis se han utilizado los cultivos de células epiteliales tubulares renales en presencia de cisplatino. Las MV de BM-MSO detienen la activación de genes relacionados con la parada del ciclo celular como GADD45A, de la apoptosis como Bcl-10, CASP-1, CASP-8, LTA, TP73 y CASP-10 y disminuyen la expresión de genes antiapoptóticos como Bcl2, Bcl-XL, Akt1 y TRAF2. Además, se observa un aumento de la síntesis de factores renoprotectores como el factor de crecimiento del hepatocito y la proteína estimulante de los macrófagos. El mRNA de estos factores no forma parte del contenido de las MV, lo que indica que la

activación de las vías metabólicas que desencadena un fenotipo regenerativo debe inducirse por factores proteicos^{15,54}.

Además del contenido proteico, el material genético (mRNA y miRNA) incluido en las VE también puede modificar los patrones de expresión normales de las células residentes mediante su transferencia horizontal⁷⁴. En el caso de las MV derivadas de las células madre mesenquimales del riñón, presencia de mRNA codificante para el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF-A), el factor de crecimiento insulínico tipo 1 y el factor básico de crecimiento del fibroblasto estimulan las células endoteliales promoviendo la angiogénesis⁶⁸, mientras que el estudio de las MV derivadas de EPC denota que la presencia de miR-126 y miR-296 son clave para estimular la angiogénesis. El análisis del transcriptoma de las MSO y sus MV puso de relevancia la presencia de transcritos relacionados con la diferenciación celular, el control de la transcripción, proliferación y de la regulación del sistema inmune. También se observaron transcritos relacionados con la oxidación de los ácidos grasos, glucólisis, gluconeogénesis y de la generación de cuerpos cetónicos, procesos fundamentales para la citoprotección de las células tubulares renales en procesos como la IRA¹⁶. La ratificación de la importancia de los mRNA y miRNA sobre el efecto protector de las VE se ha demostrado mediante distintas estrategias: usando ribonucleasas para eliminar todo el mRNA y miRNA, deplecionando específicamente los miR-126 y el miR-296 con miRNA antagonistas, o bien deplecionando todos los miRNA mediante la eliminación de los genes Dicer o Drosha, esenciales para la producción y maduración de los miRNA, en las células generadoras de EV¹⁴⁻¹⁶.

Actualmente hay varios estudios clínicos en marcha o a punto de iniciarse que pretenden indagar sobre la eficacia y seguridad de la aplicación de las MSO en pacientes con insuficiencia renal aguda (tabla 3). Sin embargo, el uso de VE para solventar enfermedades renales agudas humanas todavía no se ha iniciado.

Enfermedad renal crónica

El incremento de la prevalencia de la enfermedad renal crónica en la población adulta hace muy necesario identificar terapias que frenen o reviertan su progresión hasta el fallo renal terminal.

Tabla 4 – Ensayos clínicos realizados con células madre para tratar la enfermedad renal crónica

Enfermedad	Número Trial	Título	Tipo celular	Estado actual
Enfermedad renal crónica	NCT02195323	(BM-MSK) in patients with chronic kidney disease (CKD)	Autologous BM-MSK	Completo
Enfermedad renal crónica	NCT01876017	Safety and efficacy of BMMNC in patients with chronic renal failure	BM-mononuclear stem cell (BM-MNC)	Desconocido
Enfermedad renal crónica	NCT01453816	Study to assess the safety and effects of autologous adipose-derived stromal cells delivered in patients with renal failure	Autologous adipose-MSK	Desconocido
Poliquistosis renal-enfermedad renal crónica	NCT02166489	Mesenchymal stem cells transplantation in patients with chronic renal failure due to polycystic kidney disease	MSK	Completo
Nefropatía diabética-enfermedad renal crónica	NCT02585622	Novel stromal cell therapy for diabetic kidney disease	Novel stromal cell	Todavía no ha empezado la selección

Las MSC se han utilizado en distintos modelos animales en los que se simula la enfermedad renal crónica: modelos de masa renal reducida (nefrectomía 5/6)^{2,3,75-78}, poliquistosis renal⁵, nefropatía diabética^{79,80}, inducción de glomerulosclerosis por adriamicina⁴, estenosis aterosclerótica⁸¹ o el modelo de enfermedad renal crónica inducida por cisplatino⁸². En el caso del modelo de nefrectomía 5/6, en todos los estudios las BM-MSK mejoran la función renal y reducen la fibrosis. Esta mejoría está asociada a una reducción de la progresión de la glomerulosclerosis^{2,3,75} y de la expresión de interleucina-6 (IL-6) y TNF α , mientras que la expresión de IL-4 e IL-10 se ve aumentada⁷⁶. También se observa una reducción de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular, p21 y del antígeno nuclear de células en proliferación⁷⁷, y la formación de nuevo epitelio mediante la activación de Pax-1, factor básico de crecimiento del fibroblasto, la proteína morfogénica del hueso (BMP-7) y Tie-2⁷⁸. En el modelo de poliquistosis renal en rata, se ha demostrado que las BM-MSK permiten la mejora de la densidad vascular y, por consiguiente, la función renal⁵. En distintos estudios en los que se analiza la nefropatía diabética, la administración de BM-MSK de origen murino o humano ha demostrado la reversión de la hiperglucemia y glucosuria inducida por la administración de estreptozotocina^{79,80}. En el modelo de inducción de glomerulosclerosis por adriamicina, las MSC pueden desplazarse hasta el riñón dañado y proveer de factores de supervivencia que preservan la viabilidad de los podocitos mientras reducen la inflamación y esclerosis glomerular⁴. En el modelo de estenosis aterosclerótica en la arteria renal inducida en cerdo, se observa un daño renal crónico caracterizado por una extensa inflamación, apoptosis, estrés oxidativo, pérdida de microvasculatura, fibrosis y glomerulosclerosis. La administración de MSC de tejido adiposo tras una angioplastia transluminal percutánea renal permite mejorar la función renal a través de la revascularización del riñón⁸¹. En el modelo de enfermedad renal crónica inducida por cisplatino en primates no humanos se ha demostrado que el uso preventivo de las BM-MSK autólogas permite retrasar la progresión de la fibrosis intersticial, pero no es capaz de revertir el daño establecido⁸².

En clínica se ha visto que la administración de 3 dosis de BM-MSK alogénicas a un paciente con glomerulosclerosis focal y segmentaria recurrente tras el trasplante renal permitió frenar la proteinuria y mantener una función renal estable, y evitar el tratamiento convencional que implicaba plasmaféresis semanal⁸³.

La existencia de todos estos hallazgos y muchos otros han dado información suficiente para que se empiecen a realizar ensayos clínicos para evaluar la eficacia y seguridad de las MSC (tabla 4).

En los últimos años algunos grupos han demostrado extensamente el efecto positivo de las VE en modelos de insuficiencia renal aguda, sin embargo, su aplicación en modelos crónicos ha sido nula. Los únicos estudios para analizar el impacto de las VE en el daño crónico han consistido en la prolongación del seguimiento de un modelo de daño agudo en animales tratados mediante I/R donde se ha observado que las VE producidas por EPC, así como aquellas producidas por BM-MSK, simulan el efecto de las MSC y previenen el daño agudo y también el crónico inducido por la I/R^{14,52}. Según estos estudios, los micro-RNA —miR-126 y miR-296— son responsables del buen resultado de las VE de EPC¹⁴, mientras que el contenido de RNA de las VE producidas por BM-MSK es el responsable de la activación de las células diana⁵².

Fallo renal terminal: terapia celular y sus derivados

La progresiva pérdida de función renal en la enfermedad renal crónica terminal se asocia a la activación del sistema inmune, marcada por una inflamación renal y sistémica. En dicha inflamación se observa activación del sistema del complemento, monocitos, macrófagos y quimiocinas⁸⁴. El trasplante es la mejor terapia sustitutiva para prolongar la supervivencia de los pacientes con enfermedad renal crónica terminal, pero el daño isquémico es una de las causas del retraso de la función del injerto, el cual se ha asociado a un incremento de episodios de rechazo agudo y a la reducción de la supervivencia

del injerto a largo plazo⁸⁵. Los factores de riesgo más importantes para la progresiva pérdida de función renal en riñones trasplantados son el daño por I/R y la proteinuria⁸⁶. A pesar de las nuevas estrategias inmunosupresoras, los resultados a largo plazo no han mejorado en la última década, debido al desarrollo de disfunción crónica del injerto y a la mortalidad de los pacientes con injertos funcionales. Esta última es, principalmente, por causas cardiovasculares y neoplasias malignas⁸⁷⁻⁹¹.

El uso prolongado de los inmunosupresores conlleva efectos secundarios leves que en algunos casos puede contribuir a la aparición de enfermedades más graves, entre ellas, diabetes y neoplasias. Por ello, es necesaria la búsqueda de terapias alternativas que permitan reducir el uso de inmunosupresores e, idealmente, induzcan la tolerancia del injerto. En ese sentido, el uso de MSC o bien de células reguladoras ha sido un punto de partida muy interesante. En distintos estudios con animales de experimentación se ha demostrado el efecto beneficioso de las terapias celulares en el trasplante renal, que evita el daño inducido por I/R, la fibrosis intersticial, atrofia tubular y el rechazo agudo^{92,93}.

Actualmente hay varios ensayos clínicos para testar la eficacia y seguridad de las terapias celulares en el trasplante renal, incluyendo células reguladoras y células madre de distintos orígenes (tabla 5).

El uso de las VE en los modelos experimentales de trasplante renal es muy anecdótico hasta el momento. Solo hay un estudio en el que se analiza el papel de las VE isogénicas producidas por BM-MSK, las cuales consiguen reducir la respuesta innata mediante la reducción de células *natural killer* infiltradas en el injerto, así como una reducción de TNF α ; sin embargo, no consiguen suprimir la respuesta inmune adaptativa⁹⁴. En ese sentido, la ayuda a la investigación que nos concedió la Sociedad Española de Nefrología en 2014 nos va a permitir analizar el impacto de las BM-MSK isogénicas y alogénicas, así como sus VE en el modelo de trasplante renal en rata.

Limitaciones del uso de las vesículas extracelulares en la clínica

Toda terapia basada en VE humanas se considerará medicamento biológico por contener una o más sustancias activas hechas o derivadas de una célula viva, y se someterá a las regulaciones de Europa, de Estados Unidos de América, Australia y Japón. Estas VE seguirán los estándares de seguridad para tejidos y células por tener en común con la fuente de origen su complejidad, composición y acción biológica. Sin embargo, teniendo en cuenta la relevancia de los resultados obtenidos a partir de los modelos animales, se asume que las terapias basadas en las VE no están incluidas en la definición de nuevos fármacos experimentales de elevado riesgo. Para la fabricación de dicha terapia es necesario contar con infraestructura, tecnología y un sistema de gestión de calidad para el cumplimiento de las normas GMP y GLP que tenga en cuenta la seguridad del donante y del receptor. Durante los estudios clínicos en fase inicial se monitorizarán la seguridad, la toxicidad y la inmunogenicidad de dicha terapia. Y será en estudios clínicos más avanzados (fase II-IV) en los que se estudiará la

eficacia y los efectos adversos de las VE autógenas o alogénicas que darán soporte a la traslación de dicha terapia a la clínica⁹⁵.

Si bien el uso de las VE producidas por células progenitoras o MSC está logrando un éxito nada despreciable en modelos preclínicos agudos, todavía hay algunas preguntas sin respuesta que tendrán que ser abordadas antes de introducir terapias derivadas de estas observaciones en el ámbito hospitalario. ¿Qué componente o cóctel de compuestos de las VE es responsable del efecto regenerativo? ¿Cómo tiene lugar la biodistribución de las VE y su tropismo hacia las células tubulares epiteliales? En cuanto a la producción, la reducida secreción por parte de las células productoras, la compleja caracterización del contenido y la presentación de antígenos HLA en superficie son sus principales escollos. El reconocimiento de alo-HLA puede ser un gran inconveniente de la terapia con VE, pero se están buscando estrategias para generar VE sin HLA o bien producirlas de forma sintética. La producción sintética de VE con un contenido ajustado a las necesidades (miRNA, mRNA, proteínas) que no sean reconocidas por el sistema inmune del paciente será el objetivo final.

Desarrollo de vesículas sintéticas para su uso clínico

La producción de VE artificiales o sintéticas pasa por el uso de liposomas, micropartículas o nanopartículas compuestas por polímeros biodegradables como el ácido poli(láctico-co-glicólico) (PLGA)⁹⁶⁻⁹⁸, o colágeno⁹⁹, itoh¹⁰⁰ o dextrano¹⁰¹⁻¹⁰³. Las vesículas sintéticas nos permitirán controlar mejor la liberación de los compuestos y el direccionamiento hacia los tejidos dañados, reducir los efectos secundarios e incrementar su biodisponibilidad para finalmente aumentar la calidad de vida del paciente¹⁰⁴. Concretamente, los liposomas son el sistema más aceptado por su biocompatibilidad y biodegradación, gran solubilidad, elevada vida media, liberación selectiva en el lugar de acción y capacidad para resistir la acción de agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, hasta el momento tienen baja especificidad, si bien hay estudios en los que se desarrollan liposomas sensibles a la temperatura, pH, luz, campo eléctrico o campo magnético, así como el acoplamiento de ligandos y anticuerpos a su membrana¹⁰⁵.

La producción a gran escala de liposomas y su formulación para la clínica también presenta varios inconvenientes: la inestabilidad, toxicidad después de administraciones repetitivas y activación del complemento^{106,107}. A pesar de estos inconvenientes, se han desarrollado varios sistemas de liberación de fármacos basados en liposomas que están en etapa preclínica, ensayos clínicos y algunos aprobados como tratamiento en clínica, concretamente en el campo de la quimioterapia^{108,109}. A pesar de todos estos avances, el diseño de nuevas formulaciones liposómicas requiere estudios profundos tanto *in vitro* como *in vivo* para llevar a cabo los estudios preclínicos antes de su transferencia a la clínica.

Actualmente, nuestro grupo, junto a 3 centros europeos, está inmerso en el proyecto EV Stem Injury financiado a través del programa «FP7-PEOPLE-2013-IAPP-Marie Curie Action: Industry-Academia Partnerships and Pathways». Este proyecto incluye 2 enfoques diferentes para la producción de VE:

Tabla 5 – Ensayos clínicos realizados con terapia celular para tratar el trasplante renal

Patología	Número Trial	Título	Tipo celular	Estado actual
Trasplante renal	NCT02085629	Mreg (The ONE Study)	Donor M reg (Mreg-UKR)	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02129881	TregUK (The ONE Study)	Autologous regulatory T Cell Product	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02371434	nTreg Trial (The ONE Study)	Autologous CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ natural regulatory.T cells	Inclusión por invitación
Trasplante renal	NCT02091232	T-regulatory cells in kidney transplant recipients (The ONE Study)	T regulatory cell	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02244801	darTreg (The ONE Study)	Donor-alloantigen-reactive regulatory T Cell	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02252055	ATDC Trial (ONEatDC)	Autologous tolerogenic dendritic cells (ATDCs)	Seleccionando
Trasplante renal	NCT01446484	Treatment of children with kidney transplants by injection of CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ T cells to prevent organ rejection	CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{low} FoxP3 ⁺ T regulatory cells injection	Desconocido
Trasplante renal	NCT02560220	MIC cell therapy for individualized immunosuppression in living donor kidney transplant recipients	Mitomycin C-induced PBMC	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02057965	Mesenchymal stromal cell therapy in renal recipients	Autologous BM-MSc	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02176434	Pilot feasibility study of combined kidney and hematopoietic stem cell transplantation to cure end-stage renal disease	Hematopoietic stem cell	Seleccionando
Trasplante renal o hepático	NCT01429038	Infusion of third-party mesenchymal stem cells after renal or liver transplantation. A phase I-II, open-label, clinical study	Third party MSC	Seleccionando
Trasplante renal	NCT00658073	Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells for kidney allografts	Autologous MSC	Completo
Trasplante renal	NCT02387151	Neptune	Allogeneic MSC	Seleccionando
Trasplante renal	NCT02565459	MSC in renal recipients to induce tolerance in recipients of kidney transplants from deceased donors	Third-party BM-MSc	Seleccionando
Tolerancia	NCT00183248	Pilot study using donor stem cells and campath-1H to induce renal transplant tolerance (ITN022ST)	Donor BM-stem cells	Completo
Tolerancia	NCT00752479	MSC and kidney transplant tolerance	MSC under basiliximab/low dose RATG	Terminado
Tolerancia	NCT02012153	aMSC to induce tolerance in living-donor kidney transplant recipients	Autologous MSC	Seleccionando
Rechazo crónico	NCT02563340	Effect of BM-MSc on chronic AMR after kidney transplantation	BM-MSc	Todavía no ha empezado la selección
Función retardada	NCT02563366	Effect of BM-MSc on early graft function recovery after DCD kidney transplant	BM-MSc	Todavía no ha empezado la selección
Función retardada	NCT02561767	Effect of BM-MSc in DCD kidney transplantation	BM-MSc	Todavía no ha empezado la selección

biológicas y sintéticas. Con el fin de explorar el efecto renoprotector de las VE, se evaluará su potencia y eficacia en modelos *in vitro* e *in vivo* de la lesión renal aguda y crónica.

Conceptos clave

- Las vesículas extracelulares son un sistema de comunicación entre células que comporta la transferencia de material proteico y genético.
- Existen distintos tipos de vesículas extracelulares en función de su origen y tamaño.
- Las células madre progenitoras y sus vesículas extracelulares presentan el mismo potencial terapéutico.
- El uso de vesículas extracelulares evitaría el riesgo de la mala diferenciación que supone el uso de células madre indiferenciadas.
- El potencial renoprotector de las vesículas extracelulares ha sido extensamente estudiado en modelos agudos, pero es necesario profundizar en su aplicación en modelos crónicos y de trasplante renal.
- El estudio del contenido de las vesículas extracelulares es imprescindible para concretar el componente o cóctel de componentes con efecto renoprotector.
- La fabricación de vesículas sintéticas con una composición más controlada y una capacidad terapéutica equivalente a las biológicas hará posible su futura aplicación en la práctica clínica diaria.

Conflicto de intereses

Los autores de este trabajo declaran la no existencia de conflicto de interés.

Agradecimientos

Los investigadores del LENIT forman parte de la REDinREN (RD12/0021/0028) del Instituto de Salud Carlos III-Ministerio de Ciencia e Innovación, cofinanciada por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) «Una manera de hacer Europa».

JMC recibió una ayuda a la investigación de la S.E.N. en 2014.

Este trabajo se ha desarrollado en el Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona, España.

BIBLIOGRAFÍA

1. Togel F, Hu Z, Weiss K, Isaac J, Lange C, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005;289(1):F31-42.
2. Caldas HC, Fernandes IM, Gerbi F, Souza AC, Baptista MA, Ramalho HJ, et al. Effect of whole bone marrow cell infusion in the progression of experimental chronic renal failure. *Transplant Proc.* 2008;40(3):853-5.
3. Choi S, Park M, Kim J, Hwang S, Park S, Lee Y. The role of mesenchymal stem cells in the functional improvement of chronic renal failure. *Stem Cells Dev.* 2009;18(3):521-9.
4. Zoja C, Garcia PB, Rota C, Conti S, Gagliardini E, Corna D, et al. Mesenchymal stem cell therapy promotes renal repair by limiting glomerular podocyte and progenitor cell dysfunction in adriamycin-induced nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;303(9):F1370-81.
5. Franchi F, Peterson KM, Xu R, Miller B, Psaltis PJ, Harris PC, et al. Mesenchymal stromal cells improve renovascular function in polycystic kidney disease. *Cell Transplant.* 2015;24(9):1687-98.
6. Jeong JO, Han JW, Kim JM, Cho HJ, Park C, Lee N, et al. Malignant tumor formation after transplantation of short-term cultured bone marrow mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction and diabetic neuropathy. *Circ Res.* 2011;108(11):1340-7.
7. Kunter U, Rong S, Boor P, Eitner F, Muller-Newen G, Djuric Z, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1754-64.
8. Wang Y, Han ZB, Song YP, Han ZC. Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. *Stem Cells Int.* 2012;2012:652034.
9. Bi B, Schmitt R, Israilova M, Nishio H, Cantley LG. Stromal cells protect against acute tubular injury via an endocrine effect. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(9):2486-96.
10. Li W, Li P, Hua Q, Hou J, Wang J, Du H, et al. The impact of paracrine signaling in brain microvascular endothelial cells on the survival of neurons. *Brain Res.* 2009;1287:28-38.
11. Van Koppen A, Joles JA, van Balkom BW, Lim SK, de Kleijn D, Giles RH, et al. Human embryonic mesenchymal stem cell-derived conditioned medium rescues kidney function in rats with established chronic kidney disease. *PLoS One.* 2012;7(6):e38746.
12. Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005;105(4):1815-22.
13. Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, et al. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med.* 2009;41(5):315-24.
14. Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 2012;82(4):412-27.
15. Bruno S, Grange C, Deregibus MC, Calogero RA, Saviozzi S, Collino F, et al. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles protect against acute tubular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(5):1053-67.
16. Collino F, Bruno S, Incarnato D, Dettori D, Neri F, Provero P, et al. AKI recovery induced by mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles carrying microRNAs. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2349-60.
17. Humphreys BD, Bonventre JV. Mesenchymal stem cells in acute kidney injury. *Annu Rev Med.* 2008;59:311-25.
18. Morigi M, Imberti B, Zoja C, Corna D, Tomasoni S, Abbate M, et al. Mesenchymal stem cells are renoprotective, helping to repair the kidney and improve function in acute renal failure. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(7):1794-804.
19. Morigi M, Introna M, Imberti B, Corna D, Abbate M, Rota C, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. *Stem Cells.* 2008;26(8):2075-82.
20. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Fonsato V, Romanazzi GM, Camussi G. Mesenchymal stem cells contribute to the renal repair of acute tubular epithelial injury. *Int J Mol Med.* 2004;14(6):1035-41.
21. Herrera MB, Bussolati B, Bruno S, Morando L, Mauriello-Romanazzi G, Sanavio F, et al. Exogenous mesenchymal stem cells localize to the kidney by means of CD44 following acute tubular injury. *Kidney Int.* 2007;72(4):430-41.

22. Lange C, Tögel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, et al. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. *Kidney Int.* 2005;68(4):1613-7.
23. Meirelles Lda S, Fontes AM, Covas DT, Caplan AI. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2009;20(5-6):419-27.
24. Bassi EJ, de Almeida DC, Moraes-Vieira PM, Camara NO. Exploring the role of soluble factors associated with immune regulatory properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* 2012;8(2):329-42.
25. Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol.* 2015;6:560.
26. Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: Toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther.* 2015;23(5):812-23.
27. Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006;20(9):1487-95.
28. Harding C, Heuser J, Stahl P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: Demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol.* 1984;35(2):256-63.
29. Majka M, Kijowski J, Lesko E, Gozdick J, Zupanska B, Ratajczak MZ. Evidence that platelet-derived microvesicles may transfer platelet-specific immunoreactive antigens to the surface of endothelial cells and CD34+ hematopoietic stem/progenitor cells—implication for the pathogenesis of immune thrombocytopenias. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007;45(1):27-32.
30. Rustom A, Saffrich R, Markovic I, Walther P, Gerdes HH. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science.* 2004;303(5660):1007-10.
31. Sherer NM, Mothes W. Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 2008;18(9):414-20.
32. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007;9(6):654-9.
33. Guescini M, Guidolin D, Vallorani L, Casadei L, Gioacchini AM, Tibollo P, et al. C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res.* 2010;316(12):1977-84.
34. Balaj L, Lessard R, Dai L, Cho YJ, Pomeroy SL, Breakefield XO, et al. Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nat Commun.* 2011;2:180.
35. Kapustin AN, Chatrou ML, Drozdov I, Zheng Y, Davidson SM, Soong D, et al. Vascular smooth muscle cell calcification is mediated by regulated exosome secretion. *Circ Res.* 2015;116(8):1312-23.
36. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006;355(12):1253-61.
37. Paggetti J, Haderk F, Seiffert M, Janji B, Distler U, Ammerlaan W, et al. Exosomes released by chronic lymphocytic leukemia cells induce the transition of stromal cells into cancer-associated fibroblasts. *Blood.* 2015;126(9):1106-17.
38. Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P, et al. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002;195(10):1303-16.
39. Antonyak MA, Li B, Boroughs LK, Johnson JL, Druso JE, Bryant KL, et al. Cancer cell-derived microvesicles induce transformation by transferring tissue transglutaminase and fibronectin to recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(12):4852-7.
40. Ginestra A, La Placa MD, Saladino F, Cassara D, Nagase H, Vittorelli ML. The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness. *Anticancer Res.* 1998;18(5A):3433-7.
41. Camussi G, Deregius MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 2010;78(9):838-48.
42. Thery C, Zitvogel L, Amigorena S. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(8):569-79.
43. Muralidharan-Chari V, Clancy J, Plou C, Romao M, Chavrier P, Raposo G, et al. ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.* 2009;19(22):1875-85.
44. Clayton A, Turkes A, Dewitt S, Steadman R, Mason MD, Hallett MB. Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: The role of integrins. *Faseb J.* 2004;18(9):977-9.
45. Mittelbrunn M, Gutierrez-Vazquez C, Villarroya-Beltri C, Gonzalez S, Sanchez-Cabo F, Gonzalez MA, et al. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011;2:282.
46. Fevrier B, Raposo G. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16(4):415-21.
47. Dear JW, Street JM, Bailey MA. Urinary exosomes: A reservoir for biomarker discovery and potential mediators of intrarenal signalling. *Proteomics.* 2013;13(10-11):1572-80.
48. Salih M, Zietse R, Hoorn EJ. Urinary extracellular vesicles and the kidney: Biomarkers and beyond. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2014;306(11):F1251-9.
49. Gamez-Valero A, Lozano-Ramos SI, Bancu I, Lauzurica-Valdemoros R, Borrás FE. Urinary extracellular vesicles as source of biomarkers in kidney diseases. *Front Immunol.* 2015;6:6.
50. Krause M, Samoilenko A, Vainio SJ. Exosomes as renal inductive signals in health and disease, and their application as diagnostic markers and therapeutic agents. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3:65.
51. Camussi G, Deregius MC, Tetta C. Paracrine/endocrine mechanism of stem cells on kidney repair: Role of microvesicle-mediated transfer of genetic information. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(1):7-12.
52. Gatti S, Bruno S, Deregius MC, Sordi A, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(5):1474-83.
53. Biancone L, Bruno S, Deregius MC, Tetta C, Camussi G. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrol Dial Transplant.* 2012;27(8):3037-42.
54. Bruno S, Grange C, Collino F, Deregius MC, Cantaluppi V, Biancone L, et al. Microvesicles derived from mesenchymal stem cells enhance survival in a lethal model of acute kidney injury. *PLoS One.* 2012;7(3):e33115.
55. Reis LA, Borges FT, Simoes MJ, Borges AA, Sinigaglia-Coimbra R, Schor N. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells repaired but did not prevent gentamicin-induced acute kidney injury through paracrine effects in rats. *PLoS One.* 2012;7(9):e44092.
56. Borges FT, Reis LA, Schor N. Extracellular vesicles: Structure, function, and potential clinical uses in renal diseases. *Braz J Med Biol Res.* 2013;46(10):824-30.
57. Fang DY, King HW, Li JY, Gleadle JM. Exosomes and the kidney: Blaming the messenger. *Nephrology (Carlton).* 2013;18(1):1-10.

58. Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Acute kidney injury. *Lancet*. 2012;380(9843):756-66.
59. Zuk A, Bonventre JV. Acute kidney injury. *Annu Rev Med*. 2016;67:293-307.
60. Klausner JM, Paterson IS, Goldman G, Kobzik L, Rodzen C, Lawrence R, et al. Postischemic renal injury is mediated by neutrophils and leukotrienes. *Am J Physiol*. 1989;256 5 Pt 2:F794-802.
61. DelaRosa O, Lombardo E, Beraza A, Mancheno-Corvo P, Ramirez C, Menta R, et al. Requirement of IFN-gamma-mediated indoleamine 2,3-dioxygenase expression in the modulation of lymphocyte proliferation by human adipose-derived stem cells. *Tissue Eng Part A*. 2009;15(10):2795-806.
62. Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, et al. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*. 2008;2(2):141-50.
63. English K, Barry FP, Field-Corbett CP, Mahon BP. IFN-gamma TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol Lett*. 2007;110(2):91-100.
64. Grange C, Tapparo M, Bruno S, Chatterjee D, Quesenberry PJ, Tetta C, et al. Biodistribution of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in a model of acute kidney injury monitored by optical imaging. *Int J Mol Med*. 2014;33(5):1055-63.
65. Herrera Sanchez MB, Bruno S, Grange C, Tapparo M, Cantaluppi V, Tetta C, et al. Human liver stem cells and derived extracellular vesicles improve recovery in a murine model of acute kidney injury. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(6):124.
66. Cantaluppi V, Biancone L, Figliolini F, Beltramo S, Medica D, Deregibus MC, et al. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells enhance neoangiogenesis of human pancreatic islets. *Cell Transplant*. 2012;21(6):1305-20.
67. Kilpinen L, Impola U, Sankkila L, Ritamo I, Aatonen M, Kilpinen S, et al. Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. *J Extracell Vesicles*. 2013:2013.
68. Choi HY, Moon SJ, Ratliff BB, Ahn SH, Jung A, Lee M, et al. Microparticles from kidney-derived mesenchymal stem cells act as carriers of proangiogenic signals and contribute to recovery from acute kidney injury. *PLoS One*. 2014;9(2):e87853.
69. Zou X, Zhang G, Cheng Z, Yin D, Du T, Ju G, et al. Microvesicles derived from human Wharton's Jelly mesenchymal stromal cells ameliorate renal ischemia-reperfusion injury in rats by suppressing CX3CL1. *Stem Cell Res Ther*. 2014;5(2):40.
70. Burger D, Vinas JL, Akbari S, Dehak H, Knoll W, Gutsol A, et al. Human endothelial colony-forming cells protect against acute kidney injury: Role of exosomes. *Am J Pathol*. 2015;185(8):2309-23.
71. He J, Wang Y, Lu X, Zhu B, Pei X, Wu J, et al. Micro-vesicles derived from bone marrow stem cells protect the kidney both in vivo and in vitro by microRNA-dependent repairing. *Nephrology (Carlton)*. 2015;20(9):591-600.
72. He J, Wang Y, Sun S, Yu M, Wang C, Pei X, et al. Bone marrow stem cells-derived microvesicles protect against renal injury in the mouse remnant kidney model. *Nephrology (Carlton)*. 2012;17(5):493-500.
73. Zhou Y, Xu H, Xu W, Wang B, Wu H, Tao Y, et al. Exosomes released by human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced renal oxidative stress and apoptosis in vivo and in vitro. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(2):34.
74. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20(5):847-56.
75. Lee SR, Lee SH, Moon JY, Park JY, Lee D, Lim SJ, et al. Repeated administration of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improved the protective effects on a remnant kidney model. *Ren Fail*. 2010;32(7):840-8.
76. Semedo P, Correa-Costa M, Cenedeze MA, Avancini Costa Malheiros DM, dos Reis MA, Shimizu MH, et al. Mesenchymal stem cells attenuate renal fibrosis through immune modulation and remodeling properties in a rat remnant kidney model. *Stem Cells*. 2009;27(12):3063-73.
77. Alexandre CS, Volpini RA, Shimizu MH, Sanches TR, Semedo P, di Jura VL, et al. Lineage-negative bone marrow cells protect against chronic renal failure. *Stem Cells*. 2009;27(3):682-92.
78. Villanueva S, Ewertz E, Carrion F, Tapia A, Vergara C, Cespedes C, et al. Mesenchymal stem cell injection ameliorates chronic renal failure in a rat model. *Clin Sci (Lond)*. 2011;121(11):489-99.
79. Ezquer FE, Ezquer ME, Parrau DB, Carpio D, Yanez AJ, Conget PA. Systemic administration of multipotent mesenchymal stromal cells reverts hyperglycemia and prevents nephropathy in type 1 diabetic mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2008;14(6):631-40.
80. Lee RH, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, et al. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(46):17438-43.
81. Eirin A, Zhu XY, Krier JD, Tang H, Jordan KL, Grande JP, et al. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells improve revascularization outcomes to restore renal function in swine atherosclerotic renal artery stenosis. *Stem Cells*. 2012;30(5):1030-41.
82. Moghadasali R, Hajinasrollah M, Argani H, Nassiri SM, Najarasl M, Sodeifi N, et al. Autologous transplantation of mesenchymal stromal cells tends to prevent progress of interstitial fibrosis in a rhesus Macaca mulatta monkey model of chronic kidney disease. *Cytotherapy*. 2015;17(11):1495-505.
83. Belingheri M, Lazzari L, Parazzi V, Groppali E, Biagi E, Gaipa G, et al. Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for the stabilization of focal segmental glomerulosclerosis. *Biologicals*. 2013;41(6):439-45.
84. Goncalves GM, Castoldi A, Braga TT, Camara NO. New roles for innate immune response in acute and chronic kidney injuries. *Scand J Immunol*. 2011;73(5):428-35.
85. Shoskes DA, Cecka JM. Deleterious effects of delayed graft function in cadaveric renal transplant recipients independent of acute rejection. *Transplantation*. 1998;66(12):1697-701.
86. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006;117(3):1024-33.
87. Meier-Kriesche HU, Li S, Gruessner RW, Fung JJ, Bustami RT, Barr ML, et al. Immunosuppression: Evolution in practice and trends, 1994-2004. *Am J Transplant*. 2006;6 5 Pt 2:1111-31.
88. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. 2004;351(26):2715-29.
89. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med*. 2003;349(24):2326-33.
90. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LYC, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and

- recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* 1999;341(23):1725-30.
91. Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med.* 2005;352(13):1371-3.
92. Franquesa M, Herrero E, Torras J, Ripoll E, Flaquer M, Goma M, et al. Mesenchymal stem cell therapy prevents interstitial fibrosis and tubular atrophy in a rat kidney allograft model. *Stem Cells Dev.* 2012;21(17):3125-35.
93. Cao Z, Zhang G, Wang F, Liu H, Liu L, Han Y, et al. Protective effects of mesenchymal stem cells with CXCR4 up-regulation in a rat renal transplantation model. *PLoS One.* 2013;8(12):e82949.
94. Koch M, Lemke A, Lange C. Extracellular vesicles from MSC modulate the immune response to renal allografts in a MHC disparate rat model. *Stem Cells Int.* 2015;2015:486141.
95. Lener T, Gimona M, Aigner L, Borger V, Buzas E, Camussi G, et al. Applying extracellular vesicles based therapeutics in clinical trials - an ISEV position paper. *J Extracell Vesicles.* 2015;4:30087.
96. Lee SC, Shea M, Battle MA, Kozitza K, Ron E, Turek T, et al. Healing of large segmental defects in rat femurs is aided by RhBMP-2 in PLGA matrix. *J Biomed Mater Res.* 1994;28(10):1149-56.
97. Phillips FM, Turner AS, Seim HB 3rd, MacLeay J, Toth CA, Pierce AR, et al. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. *Spine J.* 2006;6(5):500-6.
98. Wei G, Jin Q, Giannobile WV, Ma PX. The enhancement of osteogenesis by nano-fibrous scaffolds incorporating rhBMP-7 nanospheres. *Biomaterials.* 2007;28(12):2087-96.
99. Wang YJ, Lin FH, Sun JS, Huang YC, Chueh SC, Hsu FY. Collagen-hydroxyapatite microspheres as carriers for bone morphogenetic protein-4. *Artif Organs.* 2003;27(2):162-8.
100. Itoh S, Kikuchi M, Koyama Y, Takakuda K, Shinomiya K, Tanaka J. Development of a hydroxyapatite/collagen nanocomposite as a medical device. *Cell Transplant.* 2004;13(4):451-61.
101. Chen FM, Zhao YM, Sun HH, Jin T, Wang QT, Zhou W, et al. Novel glycidyl methacrylated dextran (Dex-GMA)/gelatin hydrogel scaffolds containing microspheres loaded with bone morphogenetic proteins: Formulation and characteristics. *J Control Release.* 2007;118(1):65-77.
102. Chen FM, Wu ZF, Sun HH, Wu H, Xin SN, Wang QT, et al. Release of bioactive BMP from dextran-derived microspheres: A novel delivery concept. *Int J Pharm.* 2006;307(1):23-32.
103. Jo W, Jeong D, Kim J, Cho S, Jang SC, Han C, et al. Microfluidic fabrication of cell-derived nanovesicles as endogenous RNA carriers. *Lab Chip.* 2014;14(7):1261-9.
104. Bessa PC, Balmayor ER, Azevedo HS, Nurnberger S, Casal M, van Griensven M, et al. Silk fibroin microparticles as carriers for delivery of human recombinant BMPs. Physical characterization and drug release. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010;4(5):349-55.
105. Zhang H, Wang G, Yang H. Drug delivery systems for differential release in combination therapy. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011;8(2):171-90.
106. Bozzuto G, Molinari A. Liposomes as nanomedical devices. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:975-99.
107. Kooijmans SA, Vader P, van Dommelen SM, van Solinge WW, Schiffelers RM. Exosome mimetics: A novel class of drug delivery systems. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:1525-41.
108. Lohr JM, Haas SL, Bechstein WO, Bodoky G, Cwiertka K, Fischbach W, et al. Cationic liposomal paclitaxel plus gemcitabine or gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: A randomized controlled phase II trial. *Ann Oncol.* 2012;23(5):1214-22.
109. Mross K, Niemann B, Massing U, Drevs J, Unger C, Bhamra R, et al. Pharmacokinetics of liposomal doxorubicin (TLC-D99; Myocet) in patients with solid tumors: An open-label, single-dose study. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004;54(6):514-24.