



1 Artículo

2 Evaluación en un modelo de tormenta de citoquinas in vivo de 3 la seguridad y eficacia de la administración intravenosa de PRS 4 CK STORM (medio condicionado estandarizado obtenido por 5 cocultivo de monocitos y células estromales mesenquimales).

6 Juan Pedro Lapuente^{1, *}, Gonzalo Gómez¹, Joaquín Marco-Brualla², Pablo Fernández¹, Paula Desportes³, Jara
7 Sanz³, Mario García-Gil⁴, Fernando Bermejo^{5,6}, Juan V. San Martín⁷, Alicia Algaba⁸, Juan Carlos De Gregorio¹,
8 Daniel Lapuente¹, Almudena De Gregorio¹, Belén Lapuente¹, Sergio Gómez¹, y María de la Viñas Andrés¹ &
9 Alberto Anel^{2, *}

10 ¹ R4T Laboratorios de Investigación de Biología Molecular y Celular, Hospital de Fuenlabrada, Madrid. 28942,
11 España. jplapuente@yahoo.es (J.P.L.); gonzalog628@gmail.com (G.G.); pablo.fv@outlook.com (P.F.);
12 jcdegregorio@gmail.com (G.C.D.G.); daniel_lapuente_hernandez@yahoo.es (D.L.); almudenadegregorio@gmail.com (A.D.G.); belelapu@gmail.com (B.L.); sergocast@gmail.com (S.G.) v.andres@livingcells.org (M.D.L.V.A.)

13 ² Grupo Inmunidad, Cáncer y Células Madre, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza. 50009, España.
14 joaquin_marco_91@hotmail.com (J.M.B.); anel@unizar.es (A.A.)

15 ³ Instalación GMP, Peaches Biotech, Madrid. 28050, España. paula_phisiup@hotmail.com
16 ⁴ Servicio de Farmacia, Hospital de Fuenlabrada, Madrid. 28942, España. mgarciagil@salud.madrid.org

17 ⁵ Servicio de Digestivo, Hospital de Fuenlabrada, Madrid. 28942, España. fernando.bermejo@salud.madrid.org

⁶ Departamento de Medicina, Universidad Rey Juan Carlos, Fuenlabrada, Madrid. 28942, España.

⁷ Departamento de Medicina Interna, Hospital de Fuenlabrada, Madrid. 28942, España. juanvictor.san@salud.madrid.org

⁸ Departamento de Ensayos Clínicos, Hospital de Fuenlabrada, Madrid. 28942, España. alicia_algaba@hotmail.com

*Correspondencia : autoría principal compartida. anel@unizar.es (A. Anel); jplapuente@yahoo.es (J.P.L.).

Citación: Lapuente, J.P.; Marco-Brualla, J.; Fernández, P., Gómez, G.; Desportes, P.; Sanz, J.; García-Gil, M.; Bermejo, F.; San Martín, J.V.; Algaba, A., DeGregorio, J.C., Lapuente, D., DeGregorio, A., Lapuente, B., Gómez, S., Andrés, M.d.l.V., Anel, A. Evaluación en un modelo de tormenta de citoquinas in vivo de la seguridad y eficacia de la administración intravenosa de PRS CK STORM (medio condicionado estandarizado obtenido por cocultivo de monocitos y células estromales mesenquimales). *Biomedicinas* 2022, 10, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Editor académico: Nombre Apellido
Recibida: fecha
Aceptado: fecha
Publicado: fecha

Nota del editor: MDPI se mantiene neutral con respecto a las reclamaciones jurisdiccionales en los mapas publicados y las afiliaciones institucionales.



Copyright: © 2022 por los autores. Presentado para su posible publicación en acceso abierto bajo los términos y condiciones de la licencia Creative Commons

Resumen: Nuestro grupo de investigación viene desarrollando una serie de fármacos biológicos producidos mediante técnicas de cocultivo de macrófagos M2-polarizados con diferentes células tisulares primarias y/o células estromales mesenquimales (MSC), generalmente procedentes de la grasa, para producir efectos antiinflamatorios y antifibróticos, evitando la sobreexpresión de citoquinas proinflamatorias por parte del sistema inmune innato, en un momento dado. Uno de estos productos es el fármaco PRS CK STORM, un medio condicionado por macrófagos alógenos M2-polarizados, procedentes del cocultivo de dichos macrófagos M2 con MSC de la grasa, cuya composición, seguridad in vitro y eficacia hemos estudiado. En el presente trabajo publicamos los resultados obtenidos en cuanto a seguridad (farmacodinámica y farmacocinética) y eficacia de la aplicación intravenosa de este fármaco biológico en un modelo murino de tormenta de citoquinas asociado a procesos infecciosos severos, entre ellos el asociado a COVID-19.

Los resultados demuestran la seguridad y la alta eficacia de PRS CK STORM como fármaco intravenoso para prevenir y tratar la tormenta de citoquinas asociada a procesos infecciosos de cualquier tipo, incluido el COVID-19.

Palabras clave: PRS CK STORM, tormenta de citoquinas, células madre mesenquimales, macrófagos M2, cocultivo, crosstalk, secretoma, inflamación.

46

47

1. Introducción

48

49

50

51

52

El término tormenta de citoquinas se refiere a un aumento profuso de citoquinas, quimioquinas, factores de crecimiento e interferones, lo que provoca una inflamación grave y severa que, debido a su gravedad, puede poner en peligro la vida debido a un fallo multiorgánico o, en el mejor de los casos, provocar un daño tisular irreparable debido a la fibrosis [1,2,3].

53

54

55

56

57

58

59

Estas tormentas de citoquinas asociadas a procesos infecciosos graves representan un grave problema mundial, ya que se trata de una condición potencialmente mortal. Para apreciar la gravedad de esta condición, basta con recordar que la incidencia anual estimada actual de los procesos sépticos, basada en los datos de los países industrializados solamente, se estima actualmente en 48,9 millones de casos, que matan a unos 19,4 millones de personas en todo el mundo cada año, lo que representa el 19,7% de la mortalidad mundial [4,5].

60

61

62

63

64

65

66

Las tormentas de citoquinas se han asociado a multitud de enfermedades infecciosas y no infecciosas [6]. Se ha informado de la asociación de tormentas de citoquinas con diversas patologías, como la enfermedad de injerto contra huésped [7], las infecciones de diversos agentes causales, como bacterias [8], virus [9] u hongos [10], las enfermedades autoinmunes [11] o incluso la pancreatitis aguda [12]. Mención especial merece la tormenta de citoquinas asociada a la infección por SARS-COV-2 que tantas muertes causó en la pandemia COVID-19 [13].

67

68

69

70

71

72

73

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

87

88

89

En el caso concreto de la tormenta de citoquinas asociada a un proceso infeccioso, la inflamación comienza cuando las células tipo macrófago del sistema inmunitario innato reconocen los estímulos derivados del patógeno a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (PRR), reconociendo estructuras denominadas patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) [14,15,16]. Además de estos estímulos, otros provendrán de estructuras automoleculares derivadas del daño causado a los tejidos y células, que se conocen como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs) [17,18,19,20,21]. Todo este proceso generará una cascada de producción de citoquinas proinflamatorias cuya función principal es regular la duración e intensidad de la respuesta inmune al patógeno [22]. Así, la tormenta de citoquinas se caracteriza básicamente por una producción exagerada de mediadores solubles proinflamatorios y profibróticos (especialmente IL-1 β , IL-6 y TNF- α), junto con una reacción inmunopatológica aberrante, que implica una descoordinación entre el sistema inmune innato y adaptativo, con una sobreactivación del sistema inmune innato, siendo los principales actores celulares los macrófagos, las células dendríticas, los monocitos, los neutrófilos y los linfocitos T [23,24,25,26]. Debido a esta tormenta de citoquinas, se desencadena una situación de hiperinflamación multiorgánica que suele afectar principalmente al pulmón y al páncreas, entre otros órganos, y que suele desembocar en un síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) y/o en una lesión pulmonar aguda (LPA), que puede provocar un fallo multiorgánico. Sin embargo, aunque es bien conocida la asociación del aumento de los niveles de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias y profibróticas con el aumento de los niveles de morbilidad y mortalidad tras un proceso infeccioso, todavía no disponemos de un fármaco adecuado para tratar la tormenta de citoquinas [27].

90

91

92

Dada la variabilidad que observamos en nuestra anterior publicación en los ensayos *in vitro*, donde estudiamos la seguridad y la eficacia *in vitro* de nuestro fármaco en un modelo para estudiar la reactividad de las PBMC de diferentes donantes a la estimula-

93 ción con LPS, decidimos en la presente investigación utilizar la línea celular estandari-
94 zada THP-1 para repetir estos ensayos, antes de la aplicación in vivo.

95 Posteriormente, basándonos en los resultados anteriores de las investigaciones in
96 vitro publicadas por nuestro grupo de que la comunicación intercelular entre los mono-
97 citos/macrófagos y las células implicadas en la regeneración de los tejidos, como las cé-
98 lulas estromales mesenquimales (MSC) y las células tisulares primarias, es esencial para
99 la regeneración de los tejidos y la recuperación de la homeostasis, Dado que esta comu-
100 nicación intercelular impulsa una respuesta inmunomoduladora antiinflamatoria en los
101 procesos de resolución de la inflamación, aplicamos el secretoma de cocultivo de
102 monocitos y células madre mesenquimales (en adelante PRS CK STORM) en un modelo
103 murino de tormenta de citoquinas asociado a procesos infecciosos graves, como la CO-
104 VID-19 grave u otras infecciones, con el fin de evaluar, en primer lugar, su seguridad y,
105 en segundo lugar, su eficacia.

106 Creemos que la aplicación de PRS CK STORM, un medio condicionado estandari-
107 zado procedente de un cocultivo de macrófagos M2 con MSCs, en el que teóricamente
108 estarán presentes todos los factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas que pro-
109 ducen de forma natural los macrófagos M2 y las MSCs, asociados a la inmunidad innata,
110 respetando las relaciones pleiotrópicas naturales, con un perfil de citoquinas immuno-
111 moduladoras que se espera tengan una potente acción antiinflamatoria, podría aplicarse
112 en la prevención y control de las tormentas de citoquinas asociadas a procesos infeccio-
113 sos, como el asociado a la COVID-19 u otros tipos de infecciones.

114 2. Materiales y métodos

115 2.1. Obtención del medicamento PRS CK STORM

116 Para el desarrollo del experimento, se necesitan materias primas para crear el fár-
117 maco PRS CK STORM que se utilizará en el modelo animal. El proceso general se resume
118 en la Figura 1 y el protocolo detallado del proceso de fabricación se describe en nuestro
119 último artículo publicado en Biomolecules [28].

120 2.2. Cultivo de células mesenquimales

121 Las muestras de tejido adiposo se obtuvieron de un donante sano durante una ab-
122 dominoplastia rutinaria con el consentimiento informado del paciente y se aislaron, cul-
123 tivaron y caracterizaron en la fábrica de terapia celular avanzada de Histocell en Bilbao,
124 siguiendo los protocolos descritos previamente por Nieto-Aguilar et al. en 2011 [29] y
125 Carriel et al. en 2013 [30]. Se cultivaron hasta el pase 4 y se sembraron en placas de 6 po-
126 cillos a una densidad de 50.000 células/pocillo. Para el recuento se utilizó un contador
127 automático, BioRad TC-20 (BioRad, Hercules, CA, USA).

128 2.3. Recogida de monocitos

129 La muestra de partida fue una bolsa de sangre total procedente de una donación en
130 el Hospital Universitario de Fuenlabrada. Se diluyó a la mitad con suero fisiológico y se
131 realizó un gradiente de densidad con 20 ml de Ficoll-Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich, St
132 Louis, MS, USA) y 25 ml de la sangre diluida. Las bandas obtenidas por centrifugación a
133 400g durante 30 minutos, sin freno, se lavaron un total de 4 veces con solución salina.
134 Entre el segundo y el tercer lavado, se utilizó un tampón de lisis para eliminar los eritro-
135 citos aún presentes en la muestra, dejándola actuar durante 5 minutos. Por último, se
136 sembraron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) en frascos de cultivo de
137 175 cm² a razón de 3x10⁸ células/frasco con medio de cultivo CTS AIM-V sin rojo de fenol
138 (Gibco-BRL, Grand Island, NY, EE.UU.) complementado con glutamina estable al 1%
139 (Dipeptiven®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemania). Tras 2 horas de incubación a
140 37°C y 5% de CO₂, los monocitos se seleccionaron adhiriéndose al plástico de cultivo y se
141 obtuvieron mediante raspadores celulares después de lavar la superficie con solución
142
143

144 salina para eliminar los linfocitos presentes en la muestra. Se sembraron en insertos
145 Transwell® (Falcon, PET, 1µM de tamaño de poro) (Corning, Corning, NY, USA) para
146 placas de 6 pocillos con un tamaño de poro de 1µm, a una densidad de 2x10⁶ célu-
147 las/inserto.

149 2.4. Cocultivo de monocitos/MSCs

150 La siembra de monocitos se cambió al medio de cultivo de monocitos
151 (CTS-AIM-V™, Gibco-BRL, Waltham, MA, EE.UU.), con 2 ml por pozo, y se colocaron
152 insertos vacíos en los pozos, con una pequeña cantidad de medio para ajustar sus pro-
153 piedades de membrana porosa y se incubaron de nuevo durante 15 minutos. Por último,
154 se sembraron monocitos en un volumen final de 1,5 ml, complementados con M-CSF
155 (R&D Systems, Minneapolis, MN, EE.UU.) a una concentración final de 10 ng/ml.

157 2.5. Recogida y acondicionamiento de sobrenadantes

158 Cada 3-4 días, se recogieron los sobrenadantes de los cocultivos, se centrifugaron a
159 1800 G durante 10 minutos y a 4°C, se decantaron para eliminar los pellets de células y se
160 almacenaron a -80°C. Se realizaron un total de 6 recolecciones, alcanzando los 23 días de
161 cocultivo. Una vez obtenidas todas las muestras parciales, se descongelaron a tempera-
162 tura ambiente, se mezclaron y se esterilizaron por filtración con filtros de 0,22µm (Merck
163 KGaA, Darmstadt, Alemania). El producto final se acondicionó en las dosis previstas
164 para su uso. Una parte de las dosis preparadas se sometió a concentración, utilizando
165 tubos Vivaspin (Sartorius, Göttingen, Alemania), capaces de concentrar líquidos. La
166 centrifugación se realizó a 4°C para mantener las propiedades de las biomoléculas pre-
167 sentes durante el tiempo necesario para lograr la concentración deseada. De este modo, el
168 sobrenadante concentrado se ajustó a una concentración de 2,5 x y 5 x del producto ori-
169 ginal diluyendo con el medio de cultivo utilizado (CTS-AIM-V™, Gibco-BRL, Waltham,
170 MA, EE.UU.), que es el que se utiliza para el PRS CK STORM.

144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171

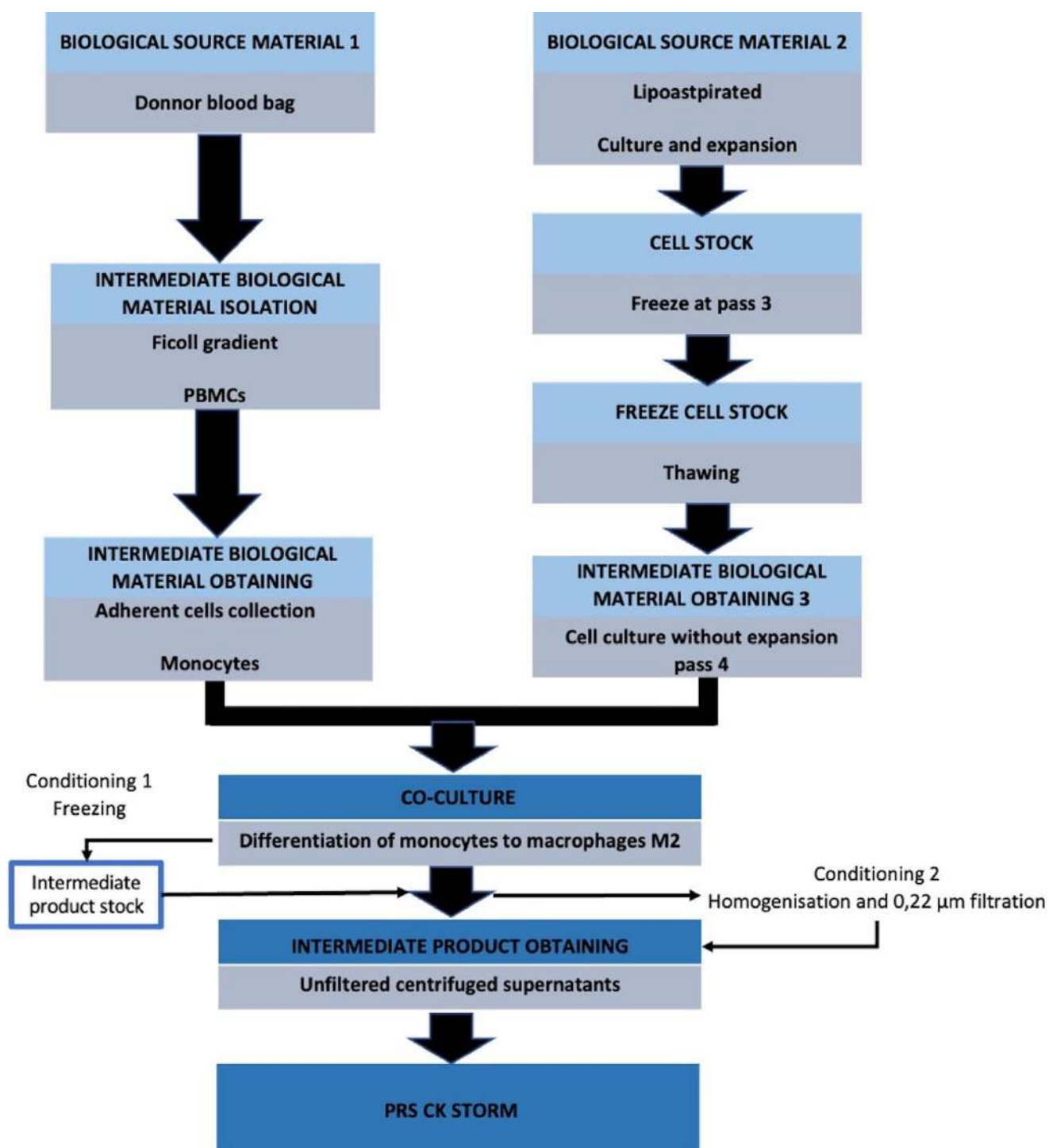


Figura 1: Descripción esquemática del proceso de producción del medio condicionado alogénico derivado de macrófagos tipo M2 y enriquecido con MSCs [28].

2.6. Caracterización del secretoma

Para la cuantificación del secretoma de ambos tipos celulares y del cocultivo, se cuantificaron 30 factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas mediante un ensayo ELISA o Multiplex (ProcartaPlex 45 PLEX, Invitrogen, Grand Island, NY, EE.UU.) siguiendo estrictamente las instrucciones del fabricante. Para las determinaciones se utilizó un lector de placas Luminex Labscan 100 (Luminex Corporation, Austin, Texas, EE.UU.). Las moléculas cuantificadas por Multiplex fueron las siguientes MIP1- α , SD-1 α , IL-27, LIF, IL-2, IL-4, IL-5, IP-10, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, PIGF-1, Eotaxina, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-31, IL-1Ra, SCF, RANTES, IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , HGF, MIP-1 β , IFN-c,

172

173

174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184 MCP-1, IL-9, VEGF-D, TNF- β , NGF- β , BDNF, GRO- α , IL-1 α , IL-23, IL15, IL-18, IL-21,
185 FGF-2, IL-22, PDGF-BB, VEGF-A, TIMP-1 y MMP-3. Para la cuantificación de IGF-1,
186 TIMP-1 y MMP1 se utilizó una técnica ELISA de doble sándwich según las instrucciones
187 del fabricante (kit DuoSet ELISA, R&D, Minneapolis, MN, EE.UU.) y la cuantificación se
188 determinó utilizando un lector de placas iMark (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.), y las
189 absorciones se midieron a 450 y 570 nm.

191 2.7. Modelo de inflamación *in vitro* de THP-1

192 La línea celular THP-1 se cultivó y se diferenció en macrófagos para generar mo-
193 delos *in vitro* de bioseguridad y eficacia. Las células monocíticas THP-1 (CellLineService,
194 cat. No.:300356) se cultivaron y expandieron utilizando RPMI 1640 (Lonza, Basile, Suiza)
195 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Corning, Nueva York, EE.UU.), 1%
196 de penicilina/estreptomicina (FBS) (Corning, Nueva York, EE.UU.) y 10% de penicili-
197 na/estreptomicina (FBS) (Corning, Nueva York, EE.UU.), 1% de penicilina/estreptomicina
198 (P/S) (Lonza, Basile, Suiza), 1 mM de piruvato sódico (Lonza, Basile, Suiza) y 1% de
199 aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachu-
200 setts, EE.UU.), en adelante medio THP-1. Las células se mantuvieron a una densidad de
201 1×10^6 células/ml para garantizar un crecimiento adecuado y un fenotipo estable. 48 horas
202 antes de los estímulos de LPS, las células se diferenciaron en macrófagos en reposo uti-
203 lizando forbol 12-mitriato 13-acetato (PMA) (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri,
204 EE.UU.) a 5ng/ml en medio THP-1, como se describe en el protocolo utilizado por Park et
205 al. en 2007 [31]. Tras este proceso de diferenciación, las células se utilizaron para nuestros
206 experimentos. Todos los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de
207 5% de CO₂ y 98% de humedad relativa.

208 En primer lugar, para comprobar la seguridad *in vitro*, se realizó un ensayo de tipo
209 MTT en células THP-1 transformadas en macrófagos adaptando el método de Chen et al.
210 en 2016 [32]. Las células THP-1 diferenciadas se lavaron tres veces con 0,2 mL de medio
211 THP-1 templado sin PMA y se dejaron reposar durante 30 minutos antes de los estímulos
212 de LPS. Tras el cambio de medio celular, las células se trataron con 10ng/mL de LPS
213 (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, EE.UU.) en medio RPMI 1640 y se trataron con 100 μ L
214 de PRS CK STORM o el control definido anteriormente añadiendo medio THP-1 tem-
215 plado para obtener 200 μ L de cultivo celular por pocillo. Tres pocillos se sembraron con
216 células THP-1m solamente, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con LPS a
217 una concentración de 10ng/mL, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con
218 LPS a una concentración de 10ng/mL y PRS CK STORM a una dosis baja, tres se sem-
219 braron con células THP-1m estimuladas con LPS a una concentración de 10ng/mL y PRS
220 CK STORM a una dosis media, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con
221 LPS a una concentración de 10ng/ml y PRS CK STORM a una dosis alta y, finalmente,
222 como controles, tres se sembraron con células THP-1m estimuladas con LPS a una con-
223 centración de 10ng/ml e hidrocortisona a 10 μ g/ml (Sigma-Aldrich, Burlington, MA,
224 USA). Las diferentes concentraciones crecientes de PRS CK STORM se calcularon en
225 función del contenido de TIMP-1 en el medio condicionado (bajo a 594,86pg de TIMP-1
226 total, medio a 1189,72pg de TIMP-1 y alto a 5948,6pg de TIMP-1). Tras la incubación de
227 todos los cultivos durante 96 horas, se añaden 10 μ l/pocillo de una solución acuosa
228 (5mg/ml) de azul de tetrazolio (Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). La solución de
229 MTT/azul de tetrazolio se incubó durante 4 horas a 37°C, 5% de CO₂, después de la in-
230 cubación las placas se centrifugan a 600g, durante 7 minutos para precipitar las células y
231 los cristales de formazán, y después de retirar el medio los cristales de formazán se solu-
232 bilizan añadiendo 200 μ L/pocillo de DMSO. Las placas se incuban a 37°C durante 10
233 minutos y se agitan a 250rpm utilizando un agitador de placas (JP Selecta, Abrera, Cata-
234 luña, España). Los resultados se obtienen midiendo la absorbancia de cada pocillo a 570
235 nm en un lector de placas iMark (BioRad, Hercules, California, USA).

236 A continuación, se generó el modelo de inflamación *in vitro* diferenciando 1×10^6
237 células/ml de THP-1 en fase de crecimiento exponencial a macrófagos en reposo en placas

de 12 pocillos (Nunc, Thermo Fisher, Waltham, MA EE.UU.) (volumen final de 1ml) y, tras 48 h de pretratamiento con PMA, las células THP-1m se lavaron tres veces con 0,5 ml de medio THP-1 atemperado sin PMA y se dejaron incubar durante 30 min antes del estímulo de LPS. Una vez en reposo, las células se trataron con 10ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.) en medio RPMI 1640 y PRS CK STORM a una dosis baja, ya que ésta era la dosis a la que el producto en investigación (PEI) había mostrado el mejor perfil de bioseguridad in vitro. El medio se precalentó a temperatura ambiente o se templó el medio THP-1. El volumen final de cada pocillo fue de 1 ml con una densidad de siembra de células THP-1m de 1×10^6 células/ml (3 pocillos). Se utilizaron como controles tres pozos sembrados de la misma manera y con la misma densidad celular pero tratados con hidrocortisona a $10 \mu\text{g/ml}$ (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.). Tras 5 horas de estimulación, se recogieron los sobrenadantes y se congelaron a -80°C para el análisis de citoquinas, en el que se estudiaron las variaciones en la secreción de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, como principales mediadores de la respuesta al lipopolisacárido. Todas las condiciones experimentales se ensayaron por triplicado para garantizar una solidez estadística suficiente.

2.8. Ensayo de seguridad y eficacia in vivo

En primer lugar, para comprobar la seguridad (farmacodinámica y farmacocinética) de PRS CK STORM, se utilizó un total de 15 ratones macho Balb/c como modelo animal. Este experimento se realizó en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA, Zaragoza, España), bajo las recomendaciones europeas de ética animal y aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación Animal del centro de investigación (Anexo 1). Los ratones fueron estabulados en grupos de cinco durante al menos una semana antes del experimento, a temperatura y humedad constantes y con un ciclo día/noche de 12 horas, con acceso a comida y agua ad libitum. Los ratones se dividieron en tres grupos de 5 animales, cada uno de los cuales fue tratado con una dosis diferente (baja, media o alta) y un número diferente de administraciones, desde una dosis única hasta 5 dosis al día:

Tabla 1. Descripción de los 3 grupos de animales y de las dosis administradas con 5 citoquinas/factores de crecimiento representativos.

Grupo	Número de animales	#	Dosis	Dosis (pg/ml +/-20%)	Dosis absoluta administrada (pg/+ 20%)
1	5	16-20	Bajo	IL-1Ra (14998pg/ml) TIMP (14871pg/ml) IL-10 (0,06pg/ml) HGF (211pg/ml) IGF-1 (419pg/ml)	IL-1Ra (1499pg) TIMP (1487pg) IL-10 (0,006pg) HGF (21pg) IGF-1 (42pg)
2	5	21-25	Medio	IL-1Ra (28996pg/ml) TIMP (29743pg/ml) IL-10 (0,12pg/ml) HGF (423pg/ml) IGF-1 (838pg/ml)	IL-1Ra (2899pg) TIMP (2974pg) IL-10 (0,012pg) HGF (42pg) IGF-1 (84pg)
3	5	26-30	Alta	IL-1Ra (57992pg/ml) TIMP (59485pg/ml) IL-10 (0,24pg/ml) HGF (845pg/ml) IGF-1 (1675pg/ml)	IL-1Ra (5799pg) TIMP (5948pg) IL-10 (0,024pg) HGF (84pg) IGF-1 (167pg)

La elección de estas dosis se basó en la caracterización del lote utilizado de PRS CK STORM fabricado con fines de investigación y teniendo en cuenta, tanto la composición

de citoquinas, como la actividad biológica aceptable observada in vitro. Las tres dosis se seleccionaron para las pruebas de seguridad in vivo en ratones en función de la cantidad absoluta de TIMP-1 (considerada como citoquina antiinflamatoria con una presencia cuantitativamente relevante en PRS CK STORM). En todos los casos, la PRS CK STORM se obtuvo en el laboratorio de Células Vivas (Hospital Universitario de Fuenlabrada, Madrid), a partir del medio condicionado de macrófagos M2 alogénicos humanos, cocultivados ex vivo con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano. La caracterización completa del lote de PRS CK STORM puede encontrarse en la Información Suplementaria (SI) (Tabla S1). El lote original se utilizó como "Dosis alta" en este experimento. La "Dosis Media" y la "Dosis Baja" se prepararon diluyendo la Dosis Alta a 1/2 o 1/4, respectivamente, en tampón fosfato salino (PBS).

El programa de trabajo para la experimentación con animales fue el siguiente:

- Día 0 (0h en los gráficos): Antes de la administración de PRS CK STORM, se extrajeron unos 300 µl de sangre total de la vena submandibular de todos los ratones. De estas muestras, se eligieron al azar 7/15 (# 16, 17, 22, 23, 25, 26 y 27) del resto 8/15 (# 18, 19, 20, 21,24,28, 29 y 30), y se separaron para su posterior análisis; las muestras 7/15 para la determinación bioquímica (ver figura 4) y las muestras 8/15 para el análisis de citoquinas (ver figura 5).
- Día 1 (0h): Se decidió separar la extracción de sangre de la administración de PRS CK STORM en días separados, para no angustiar demasiado a los animales. Como tanto el Día 0 como el 1 son puntos de tiempo justo antes de las inyecciones de PRS CK STORM, ambos se consideran como "0h". A todos los ratones se les administró un volumen de 100 µl de PRS CK STORM por vía intraperitoneal (IP), en sus dosis correspondientes (Dosis nº1).
- Día 2 (24h): Se sacrificó el primer ratón de cada grupo (nº 16, 21 y 26). De estos ratones se extrajeron al menos 700 µl de sangre total por punción cardíaca. Al resto de los animales (cuatro ratones por grupo) se les administró PRS CK STORM por inyección IP, a sus dosis correspondientes (Dosis nº2).
- Día 3 (48h): Se sacrificó el segundo ratón de cada grupo (nº 17, 22 y 27). De estos ratones se extrajeron al menos 700 µl de sangre total por punción cardíaca. Al resto de los animales (tres ratones por grupo) se les administró PRS CK STORM por inyección IP, a sus dosis correspondientes (Dosis nº3).
- Día 4 (120h): Se sacrificó el tercer ratón de cada grupo (nº 18, 23 y 28). De estos ratones se extrajeron al menos 700 µl de sangre total por punción cardíaca. Al resto de los animales (dos ratones por grupo) se les administró PRS CK STORM por inyección IP, a sus dosis correspondientes (Dosis nº4).
- Día 5 (144h): Se sacrificó el cuarto ratón de cada grupo (nº 19, 24 y 29). De estos ratones se extrajeron al menos 700 µl de sangre total por punción cardíaca. Al resto de los animales (un ratón por grupo) se les administró PRS CK STORM por inyección IP, a sus dosis correspondientes (Dosis nº5).
- Día 6 (168h): Se sacrificó el último ratón de cada grupo (nº 20, 25 y 30). Se extrajeron al menos 700 µl de sangre total de estos ratones por punción cardíaca.

La administración de las 3 primeras dosis fue consecutiva y transcurrieron 72h entre las dosis 3 y 4. En efecto, las administraciones 4 y 5 se reanudaron a las 120 y 144h, respectivamente, de la primera administración (Día 1, 0h). Además, todos los animales que recibieron la 5ª administración fueron sacrificados a las 168h (24h después de la última administración). La Tabla 2 muestra un resumen de la distribución de los animales, la dosis y el número de administraciones cuando fueron sacrificados:

Tabla 2: Distribución de los animales, dosis, tiempo y número de administraciones cuando fueron sacrificados. (*: Tiempo desde la hora 0 en que se realizó la primera administración. En todos los casos, los ratones fueron sacrificados 24h después de su última administración).

Dosis	1 adm.	2 adm.	3 adm.	4 adm.	5 adm.
Tiempo de sacrificio	24h	48h	120h	144h	168h
Bajo	#16	#17	#18	#19	#20
Medio	#21	#22	#23	#24	#25
Alta	#26	#27	#28	#29	#30
n	3	3	3	3	3

Cada día, tras la obtención de las muestras de sangre, se extraía de ellas el suero, que se utilizaba como material para los siguientes análisis. Las muestras de suero extraídas de la sangre se utilizaron para los siguientes análisis:

1. Análisis de seguridad: Se determinaron los siguientes parámetros bioquímicos se midieron los niveles de ácido biliar, albúmina, alanina aminotransferasa (ALT), bilirrubina, colesterol, fosfatasa alcalina, γ -glutamyl transferasa y nitrógeno ureico en sangre utilizando un analizador químico VetScan VS2 (protocolo Comprehensive Diagnostic Profile #500-0038 Abaxis, Union City, CA, EE.UU.) (Anexo 2), de todas las muestras del Día 1 al 6 y de 7/15 muestras del Día 0, elegidas al azar (# 16, 17, 22, 23, 25, 26 y 27). Este análisis también se realizó en el centro de animales de CIBA.
2. Análisis farmacodinámico: se cuantificó la presencia de varias citoquinas murinas. Se determinaron el HGF, el TNF- α , la IL-12 p70, la IL-1 β , la IL-6, la IL-10, el IFN- γ y el TIMP-1 en todas las muestras recogidas de todos los animales del día 1 al 6 (véase la tabla 2) y en 8/15 muestras del día 0, elegidas al azar (nº 18, 19, 20, 21,24,28, 29 y 30). Las determinaciones se realizaron mediante ensayos MULTIPLEX (Mouse Premixed Multi-Analyte Kit; Número de catálogo LXSAMSM) en el Anexo 3 en el Departamento de Citometría y Clasificación Celular, en CIBA.
3. Análisis farmacocinético: se cuantificó la presencia de varias citoquinas humanas: HGF, TNF- α , IL-12 p70, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ e IL-1RA en todas las muestras del día 1 al 6 (24 horas después de la última administración de IMP). Las determinaciones se realizaron mediante los ensayos MULTIPLEX (Human Premixed Multi-Analyte Kit; número de catálogo LXSAMHM) en el Anexo 4, también en el Departamento de Clasificación Celular y Citometría, en CIBA.

Para el segundo experimento, la prueba de eficacia, se utilizaron un total de 35 ratones C57/BL6. Toda la experimentación con ratones se llevó a cabo en el animalario del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA, Zaragoza, España), bajo las recomendaciones europeas de ética animal y previamente aprobadas por el Comité Ético de Experimentación Animal del centro de investigación (ver Anexo 5). Los ratones fueron estabulados en grupos de cinco durante al menos una semana antes del experimento, a temperatura y humedad constantes y con un ciclo día/noche de 12 horas, con acceso a comida y agua ad libitum.

Para realizar el modelo experimental de daño pulmonar agudo e inflamación por sepsis, se utilizó el modelo experimental descrito por Stephens et al. en 2015 [33]. Para este modelo, se administró a ratones C57BL/6 de 8-10 semanas de edad, hembras y machos, 5 mg/kg de lipopolisacárido bacteriano (LPS) (Sigma L4130, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, EE.UU.), en 50 μ l de solución fisiológica por vía retroorbital. Este tipo de administración de LPS es necesario porque la inyección intravenosa o intraperitoneal de LPS, que suele ir acompañada de altas concentraciones plasmáticas de citoquinas inflamatorias, hipotensión e hipotermia (Lewis et al., 2016) [34], hace que la supervivencia en los

366 ratones disminuía bruscamente después de 24 horas debido al choque de sepsis, espe-
 367 cialmente en el caso de la inyección intravenosa (Fang et al., 2018; Starr et al., 2010) [35,36].
 368 Para esta técnica, se utilizaron agujas de insulina de calibre 27,5 y jeringas de 0,5 pulgadas
 369 Terumo U-100 (Shibuya-ku, Tokio, Japón) y se recomienda que los volúmenes inyectados
 370 no superen los 150µl. Como la aguja se colocó en el espacio retrobulbar, los ratones tu-
 371 vieron que ser anestesiados con isoflurano inhalado y una gota de anestésico oftálmico
 372 (solución oftálmica de clorhidrato de proparacaína al 0,5%, Alcon Laboratories, Friburgo,
 373 Suiza) en el ojo que recibió la inyección. Para reducir la posible angustia de los ratones
 374 debida al LPS, se administró clorhidrato de buprenorfina en agua a la dosis establecida de
 375 0,056mg/ml. Los tratamientos se administraron diariamente durante 4 días consecutivos,
 376 y consistieron en:

- 377
- 378 • El mismo lote de PRS CK STORM utilizado en el experimento de seguridad in vivo,
 379 se utilizó en este experimento de eficacia, y su caracterización completa se puede
 380 encontrar en la Información Suplementaria (SI) (Tabla S1). Después de la caracte-
 381 rización en el laboratorio de Células Vivas (Hospital Universitario de Fuenlabrada,
 382 Madrid), este lote fue congelado en un congelador a -80°C, y enviado en hielo seco
 383 antes de ser utilizado en este experimento. El lote original presentaba una concen-
 384 tración de TIMP-1 de 59485,27pg/ml. Tras la centrifugación en tubos Vivaspin de
 385 15ml (12400 MW) durante 80 min, 3600 G a 4°C, se alcanzó una concentración 5x, es
 386 decir 297426pg/ml. Dado que los resultados del estudio de seguridad mostraron que
 387 el PRS CK STORM fue bien tolerado en las 3 dosis probadas administradas por vía
 388 intravenosa, la dosis alta de este estudio (5948pg de TIMP-1) fue elegida como la
 389 dosis media para este estudio de eficacia in vivo, con dos dosis adicionales proba-
 390 das, una más baja (media/2, 2380pg de TIMP-1) y otra más alta (media x 2, 11897pg
 391 de TIMP-1). Estas dosis se prepararon diluyendo la dosis alta a 1/2 o 1/4, respecti-
 392 vamente, en tampón fosfato salino (PBS). Véase en la Tabla 1 el cálculo de las dosis
 393 absolutas de TIMP-1 para un volumen administrado de 40 µl) En todos los casos, el
 394 PRS CK STORM se inyectó por vía intravenosa. Para evitar la sobreinflamación
 395 prematura por LPS, la primera dosis se inyectó 24 horas antes de la administración
 396 de LPS como pretratamiento, y el siguiente tratamiento se inyectó el día de la gene-
 397 ración del modelo y cada 24 horas a partir de entonces.
- 398 • Vehículo del fármaco: consiste en el medio de cultivo donde se recogió el PRS CK
 399 STORM, que se denominará "medio de monocitos" (CTS-AIM-V™, Gibco-BRL,
 400 Waltham, MA, EE.UU.) y también se inyectó por vía intravenosa.
- 401 • Gold Standard: este tratamiento consiste en un fármaco clásico utilizado contra el
 402 proceso de inflamación, Kineret® (Anakinra, o antagonista de la IL-1RA, Swedish
 403 Orphan Viovitrum AB, Estocolmo, Suecia) a 149,25mg/ml, administrado por vía
 404 oral, con la ayuda de una sonda intragástrica.

405

406 Diseño experimental: 35 ratones fueron divididos en siete grupos de 5 animales,
 407 cada uno de los cuales recibió diferentes tratamientos, como se explica en la Tabla 3:

408

409 **Tabla 3:** Descripción de los grupos de animales, LPS y tratamiento administrado. En el caso
 410 de PRS CK STORM, utilizando 5 citoquinas/factores de crecimiento representativos.
 411 (*administración oral).

412

Grupo	Número de animales	#	Nombre del grupo	Tratamiento (diario durante 4 días)	Volu- men inyec- tado (µl)	Dosis absoluta admin- istrada +/- 20%.	LPS (5mg/Kg) (Sí/No)
-------	--------------------	---	------------------	-------------------------------------	----------------------------	--	----------------------

1	5	1-5	Controlar	Ninguno	-	-	No
2	5	6-10	Vehículo de la droga	Medio de monocitos	40	-	No
3	5	11-15	LPS + PRS _{low}	PRS _{low}		TIMP-1 (2380pg)	Sí
4	5	16-20	Medio LPS + PRS	PRS _{medio}	40		Sí
5	5	21-25	LPS + PRS _{high}	PRS _{high}	40	TIMP-1 (5948pg)	Sí
6	5	26-30	LPS	Ninguno	40	TIMP-1 (11897pg)	Sí
7	5	31-35	LPS + Gold Standard	Kineret®.	-	-	

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428

429

430

431

432

433

434

435

436

437

438

439

440

441

442

443

444

445

446

447

448

449

El horario de trabajo para la experimentación con animales se realizaba todas las mañanas a las 9 horas, en era el siguiente:

- Día -1: 24 horas antes de la inyección de LPS, se administró a los ratones correspondientes medio de monocitos, PRS CK STORM (dosis baja, media o alta) o Gold Standard. Como se ha explicado anteriormente, este pretratamiento se realizó para intentar evitar la sobreinflamación prematura por LPS (Dosis n°1).
- Día 0: A cada grupo se le inyectó su respectivo tratamiento (medio de monocitos, PRS bajo, PRS medio, PRS alto, ninguno o Gold Standard) (Dosis n°2). Inmediatamente después, los ratones correspondientes fueron inyectados retro orbitalmente con LPS. Para mitigar el malestar derivado del LPS, se administró una dosis de clorhidrato de buprenorfina (Buprecare®, Leonvet, León, España) por vía subcutánea (0,15mg/ratón en 0,1 ml) en dichos ratones tras la inyección de LPS.
- Día 1: Se extrajeron unos 200µl de sangre total de la vena submandibular de todos los ratones y se obtuvo suero de ellos antes de administrar el tratamiento. A los animales de los grupos portadores de LPS también se les administró clorhidrato de buprenorfina y su respectivo tratamiento (medio de monocitos, PRS bajo, PRS medio, PRS alto, ninguno o Gold Standard) (Dosis n°3).
- Día 2: Al igual que el día anterior, se extrajeron unos 200µl de sangre total de la vena submandibular de todos los ratones, excepto del grupo Control, y se obtuvo suero de ellos, antes de administrar el tratamiento. A los animales de los grupos portadores de LPS también se les administró clorhidrato de buprenorfina y su respectivo tratamiento (medio de monocitos, PRS bajo, PRS medio, PRS alto, ninguno o Gold Standard) (Dosis n°4).
- Día 3: Todos los ratones fueron sacrificados. Se extrajo sangre total por punción cardíaca (500-800µl) y se obtuvo suero de ellos. Además, se realizaron necropsias y se recogieron hígado, corazón, bazo, pulmones y riñones de los animales. La mitad de cada órgano se congeló y se mantuvo a -80°C, mientras que la otra mitad se conservó en formaldehído (4% v/v en agua estéril).

Durante y después de la finalización del experimento, los ratones y las muestras recogidas de ellos se utilizaron para los siguientes análisis:

1. Evaluaciones de eficacia:

1.1. Pruebas de Irwin y mediciones de temperatura: los ratones fueron supervisados regularmente para detectar cualquier posible alteración en su comportamiento o confort derivada de los tratamientos y/o la manipulación. Basándose en el manuscrito de (Mathiasen & Moser, 2018) [37], se confeccionó un Test de Irwin en una Tabla y se utilizó como plantilla. Por lo tanto, la Prueba de Irwin se realizó cada Día del procedimiento experi-

450 mental en todos los ratones, inmediatamente antes de las administraciones de tratamien-
451 to. Se midió la temperatura de los ratones mediante una sonda rectal en tres momentos
452 diferentes: inmediatamente antes de las inyecciones de LPS, 20 minutos después de las
453 inyecciones de LPS y 48 horas después de la administración de LPS.

454 1.2. Tiempo desde la exposición al CO₂ hasta la muerte: cuando los ratones fueron
455 sacrificados en el día 3, la resistencia de los animales a la exposición al CO₂ hasta su
456 muerte se clasificó en tres grupos claros: menos de 30 segundos, 30-60 segundos y más de
457 60 segundos.

458 1.3. Observaciones macroscópicas de los órganos en la necropsia: tras el sacrificio de
459 los animales y la extracción de sangre, se realizaron necropsias y se detectaron y fotogra-
460 fiaron los hallazgos relevantes en los órganos (Anexo 6).

461 1.4. Estudio histológico: Tanto los órganos congelados (-80°C) como los conservados
462 en formaldehído fueron enviados al laboratorio de Living Cells para su estudio histopa-
463 tológico (Anexo 7).

- 464
- 465 2. Evaluaciones de eficacia: Análisis de seguridad: Se determinaron los siguientes pa-
466 rámetros bioquímicos Se midieron los niveles de albúmina, fosfatasa alcalina, ala-
467 nina aminotransferasa, amilasa, bilirrubina, nitrógeno ureico en sangre, creatinina,
468 globulina, proteína total, glucosa, calcio, fósforo, sodio y potasio, utilizando un ana-
469 lizador químico VetScan VS2 (protocolo Comprehensive Diagnostic Profile
470 #500-0038 Abaxis, Union City, CA, USA) (Anexo 2), de todas las muestras sólo a
471 partir del Día 3, exceptuando algunos animales que murieron prematuramente antes
472 del final del experimento. Este análisis se realizó también en el animalario del CIBA.
- 473 3. Análisis farmacodinámico: se cuantificó la presencia de varias citoquinas murinas.
474 Los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, TIMP-1 y MMP-3 se determinaron me-
475 diante ensayos Multiplex (MILLIPLEX MAP Cat: MCYTOMAG-70K, Merck KGaA,
476 Darmstadt, Alemania) (Anexo 8-10) en el Departamento de Clasificación Celular y
477 Citometría, en CIBA. El TNF- α , la IL-1 β , la IL-6 y la IL-10 se midieron en todas las
478 muestras del día 1 al día 3, pero el TIMP-1 y la MMP-3 sólo en algunas muestras del
479 día 3 debido a la limitación del volumen del suero.
- 480 4. Análisis farmacocinético: se cuantificó la presencia de varias citoquinas humanas de
481 nuestro PEI. También se determinaron los niveles de IFN- α 2, IL-1 β , IL-1RA, IL-6 y
482 TNF- α mediante ensayos Multiplex (Human Cytokine/Chemokine/Growth Factor
483 Panel a Magnetic Bead Panel Cat. # HCYTA-60K, Merck KGaA, Darmstadt, Alema-
484 nia) (Anexo 11) en el Departamento de Clasificación Celular y Citometría, en el
485 CIBA. Una vez más, debido a la falta de muestras, especialmente de los Días 1 y 2,
486 este análisis sólo se realizó con algunas de las muestras del Día 3.

487 2.9. Estadísticas

488 Los ensayos de MTT y de liberación de citoquinas, así como el análisis de citoquinas
489 de los sobrenadantes de cultivo y los diferentes parámetros bioquímicos se sometieron a
490 análisis estadísticos. El análisis estadístico se realizó con Excel (Microsoft, Albuquerque,
491 Nuevo México, EEUU). Todas las estadísticas se calcularon con datos realizados en expe-
492 rimentos independientes por triplicado. Se realizó la prueba ANOVA para determinar las
493 diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales estudiados
494 utilizando el software GraphPad Prism versión 8.4.0 para Mac OS X (GraphPad Software,
495 San Diego, California, EE.UU.) para realizar los cálculos. El nivel de significación estadís-
496 tica se fijó en $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Caracterización del PRS CK STORM

El análisis de la composición del PRS CK STORM demuestra un claro perfil antiinflamatorio e inmunomodulador frente a una potencial tormenta de citoquinas, como se muestra en la tabla 4, que recoge los resultados del perfil comparativo de citoquinas entre tres lotes de producción diferentes del PRS CK STORM.

Tabla 4. Lote de antiinflamatorios PRS CK STORM (datos expresados como la suma de los porcentajes que representan la suma de las cantidades de cada una de las citoquinas nombradas en pg/ml con respecto a la suma total de todas las citoquinas estudiadas en su composición).

BATCH	CK ANTIINFLAMATORIO (TIMP-1, IGF-1, IL-10, IL-1RA)	CK PROINFLAMATORIO (IL-1, IL-6, IL-18, TNF-α, IFN-γ, IL-17)
PRS CK STORM	99,420 %	0,041 %

La caracterización completa del lote que se fabricó se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Valores medios de las moléculas estudiadas. Los valores se muestran en picogramos por mililitro.

MIP-1α	SDF-1α	IL-27	LIF	IL-1β	IL-2	IL-4	IL-5
81,32 (SD 14,56)	247,56 (SD 46,78)	< 21,41	20,78 (SD 1,23)	< 2,16	< 7,21	< 10,49	< 9,90
IP-10	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	PIGF-1	Eotaxin	IL-12 p70
13,87 (SD 1,67)	403,78 (SD 34,56)	< 0,99	268,45 (SD 29,81)	1,99 (SD 0,56)	< 1,71	2,56 (SD 0,34)	< 4,71
IL-13	IL-17A	IL-31	IL-1Ra	SCF	RANTES	IFN-γ	GM-CSF
< 3,58	< 2,27	< 9,21	63389,96	< 3,58	< 2,27	< 9,21	63389,96
TNF-α	HGF	MIP-1β	IFN-α	MCP-1	IL-9	VEGF-D	TNF-β
12,89 (SD 0,78)	371,56 (SD 54,67)	132,87 (SD 23,12)	< 0,45	2876,34 (SD 345,12)	< 2,89	< 0,79	< 5,69
NGF-β	EGF	BDNF	GRO-α	IL-1α	IL-23	IL-15	IL-18
< 6,14	< 1,78	< 0,34	10,21	< 0,61	< 6,14	< 1,78	< 0,34
IL-21	FGF-2	IL-22	PDGF-BB	VEGF-A	TIMP-1	MMP-3	MMP-1
< 6,37	< 2,72	< 18,07	14,87	< 6,37	< 2,72	< 18,07	14,87

3.2. Diferenciación de las células THP-1 a macrófagos

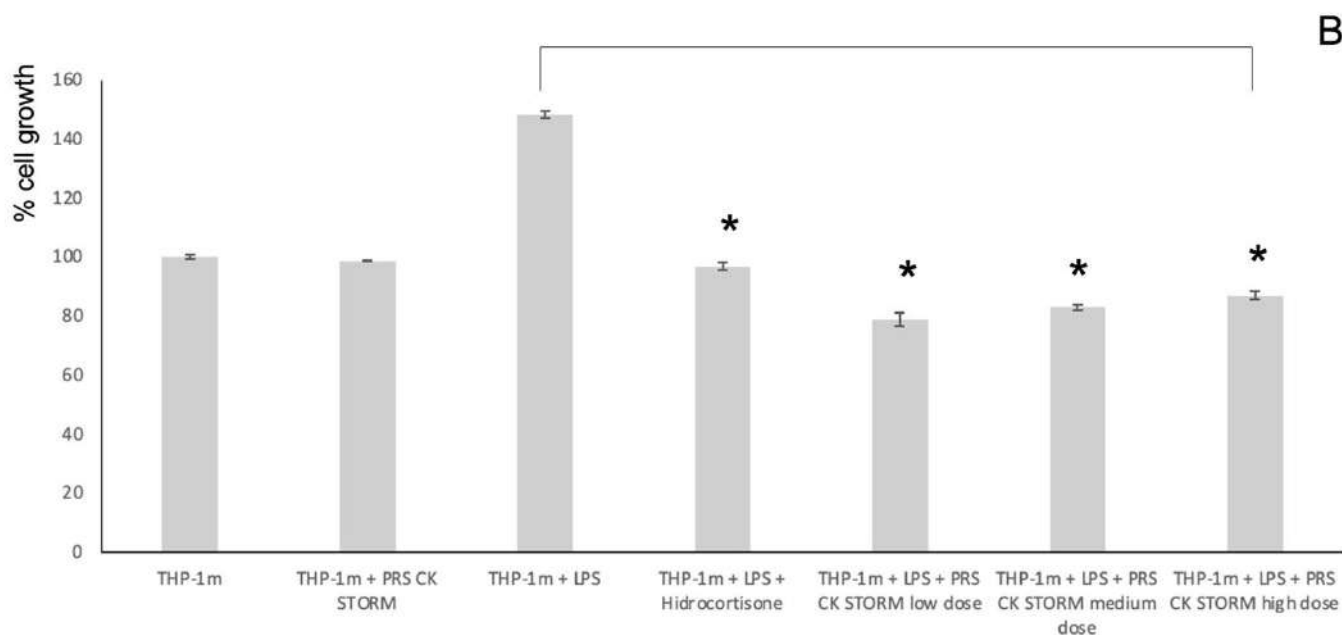
Las células tras 48 horas de estimulación con PMA (5ng/ml) ganan adherencia al medio de cultivo y adoptan una morfología como la de los macrófagos. Tras 24 horas de cultivo, el número de células en suspensión disminuye y el número de células adheridas al plástico aumenta, lo que es un signo de diferenciación exitosa. Después de 48 horas, aproximadamente el 90% de las células se adhieren al plástico y se utilizan en el modelo experimental.

3.3. Ensayos de MTT y bioactividad in vitro en macrófagos derivados de THP-1

En primer lugar, se analizaron los resultados del ensayo MTT con células THP-1 previamente estimuladas con PMA durante 48 horas para promover su adhesión al

519
520

plástico y la expresión de receptores innatos y helper. Los resultados se muestran en la figura 2.



521

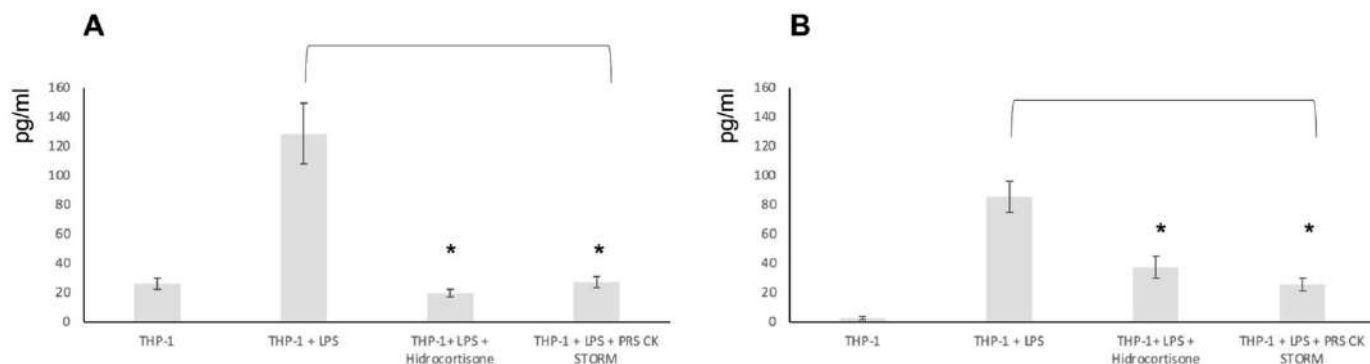
522

523
524
525

Figura 2. Ensayo MTT con macrófagos derivados de la línea THP-1(THP-1m), que se analizaron en tres experimentos independientes con dos réplicas de la técnica analítica. Las barras de error indican la desviación estándar entre muestras. Los asteriscos representan un valor $p < 0,05$

526
527
528
529
530

En segundo lugar, una vez seleccionada la dosis baja como posible dosis terapéutica para el experimento in vivo, se analizaron los resultados del modelo de inflamación in vitro realizado sobre células THP-1 previamente estimuladas con PMA durante 48 horas para promover su adhesión al plástico y la expresión de receptores innatos y auxiliares, y estimuladas con LPS. Los resultados se muestran en la figura 3.



531

532
533
534
535
536
537

Figura 3. Liberación de citoquinas proinflamatorias a partir de células THP-1 diferenciadas a macrófagos (THP-1m) en el modelo de inflamación in vitro. Las THP-1m fueron estimuladas con LPS del mismo modo que las PBMC utilizadas en estudios anteriores. Los gráficos muestran las pg/ml de cada uno de los factores estudiados. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de 3 experimentos independientes analizados por duplicado. Los asteriscos representan un valor $p < 0,05$.

Como puede verse en la figura 3, las células son sensibles a los estímulos del LPS y el fármaco PRS CK STORM estudiado demuestra un potente efecto antiinflamatorio, al mismo nivel que la hidrocortisona soluble utilizada como control.

3.4. Prueba de seguridad *in vivo*

En primer lugar, se analizaron los resultados del ensayo MTT con células THP-1 previamente estimuladas con PMA durante 48 horas para promover su adhesión al plástico y la expresión de receptores innatos y helper. Los resultados se muestran en la figura 2.

3.4.1. Comportamiento y confort de los animales.

Durante el transcurso del experimento, los ratones fueron supervisados, para garantizar su bienestar y evaluar las alteraciones que pudieran producirse tras la administración de PRS CK STORM. El panel de puntuación se encuentra en la Tabla 6 y se interpreta de la siguiente manera: cada aspecto recogido en el panel tiene un número determinado (primera columna). Si algún ratón presenta una de esas características, se puntúa con ese número. Se calcula la cantidad total y, en función de la puntuación, se puede extraer una conclusión (ver Puntuación total al final del panel).

Tabla 6. Panel de puntuación de la supervisión de los ratones utilizados en la experimentación animal.

PANEL DE PUNTUACIÓN. PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN DE RATONES				
Número de animal ID	16-19, 21-22, 25-29 (antes del tratamiento)	20, 23, 24, 30 (antes del tratamiento)	16-30 (durante el tratamiento)	
Índice de condición corporal	PUN-			TUACIÓN
Normal	0	0	0	0
15-20% de disminución	10			
>20% de disminución (**)	19			
Respuesta a la Manipulación				
Normal	0	0		0
Aumento/disminución leve	2		2	
Muy aumentado/disminuido, agresivo	5			
Comportamiento y apariencia				
Agresividad hacia otros animales	1	0	1	0
Esteretipos	3	0	0	0
Piloerección	3	0	0	0
Piloerección y ligera hemorragia nasal	5	0	0	0

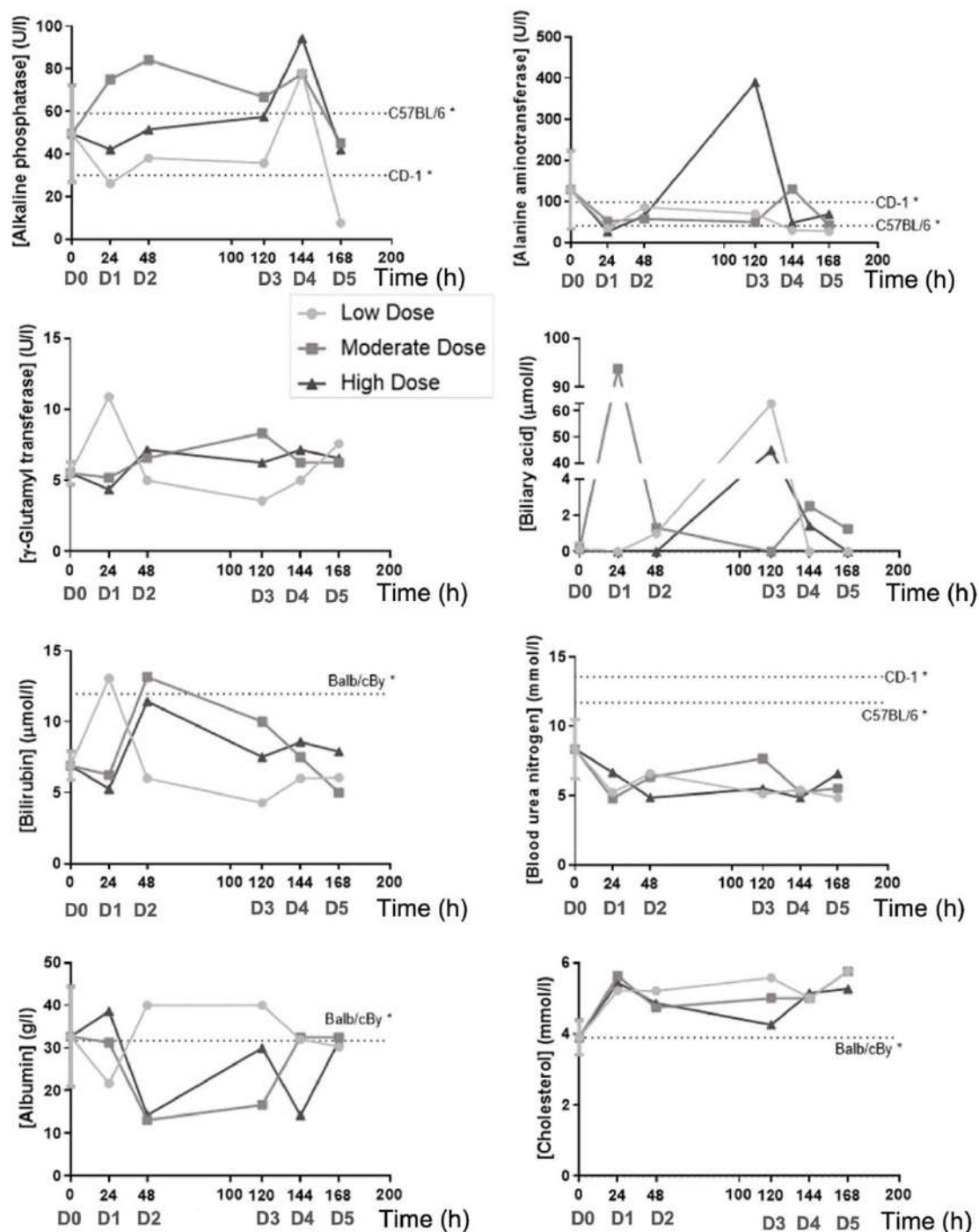
Espalda encorvada	10	0	0	0
Convulsiones, diarrea, coma (**)	19	0	0	0
Automutilaciones (**)	19	0	0	0
Dificultad respiratoria grave (**)	19	0	0	0
Pérdida de sangre significativa >20% (**)	19	0	0	0
Deydración severa (**)	19	0	0	0
Zona de extracción de sangre				
Ligera inflamación	7	0	0	0
Necrosis / lesión ulcerosa (**)	19	0	0	0
PUNTUACIÓN TOTAL		0	3	0

Puntuación: 0-4: normal; 5-9: aumentar la frecuencia de las revisiones de los animales; 10-18: consultar al veterinario; >18: sacrificio obligatorio (**).

556
557
558
559
560
561
562

3.4.2. Determinaciones bioquímicas

Las determinaciones bioquímicas (análisis de seguridad) se muestran en la figura 4. En consecuencia, no se calcularon diferencias estadísticas. Los valores exactos del perfil se muestran en la Información complementaria (SI) (Tabla S2).



563

564
565
566
567
568
569
570
571

Figura 4. Perfil bioquímico de las enzimas hepáticas. Se extrajeron muestras de sangre de 7 de los 15 ratones desde el Día 0 (antes del tratamiento), y de cada uno de ellos en su respectivo punto experimental (ver Metodología). Posteriormente, se utilizaron sus sueros para cuantificar los niveles de ácido biliar, albúmina, alanina aminotransferasa, bilirrubina, colesterol, fosfatasa alcalina, γ -transferasa de glutamilo y nitrógeno ureico en sangre, utilizando un analizador químico VetScan VS2. El tiempo = 0h se representa como la media +/- SD de 7 muestras. D0-5 indica el número de dosis ya administradas en esos ratones en cada punto de tiempo. *Los datos de referencia se extrajeron de: Laboratory Animal Medicine, 3rd Edition (Elsevier, 2015) [38].

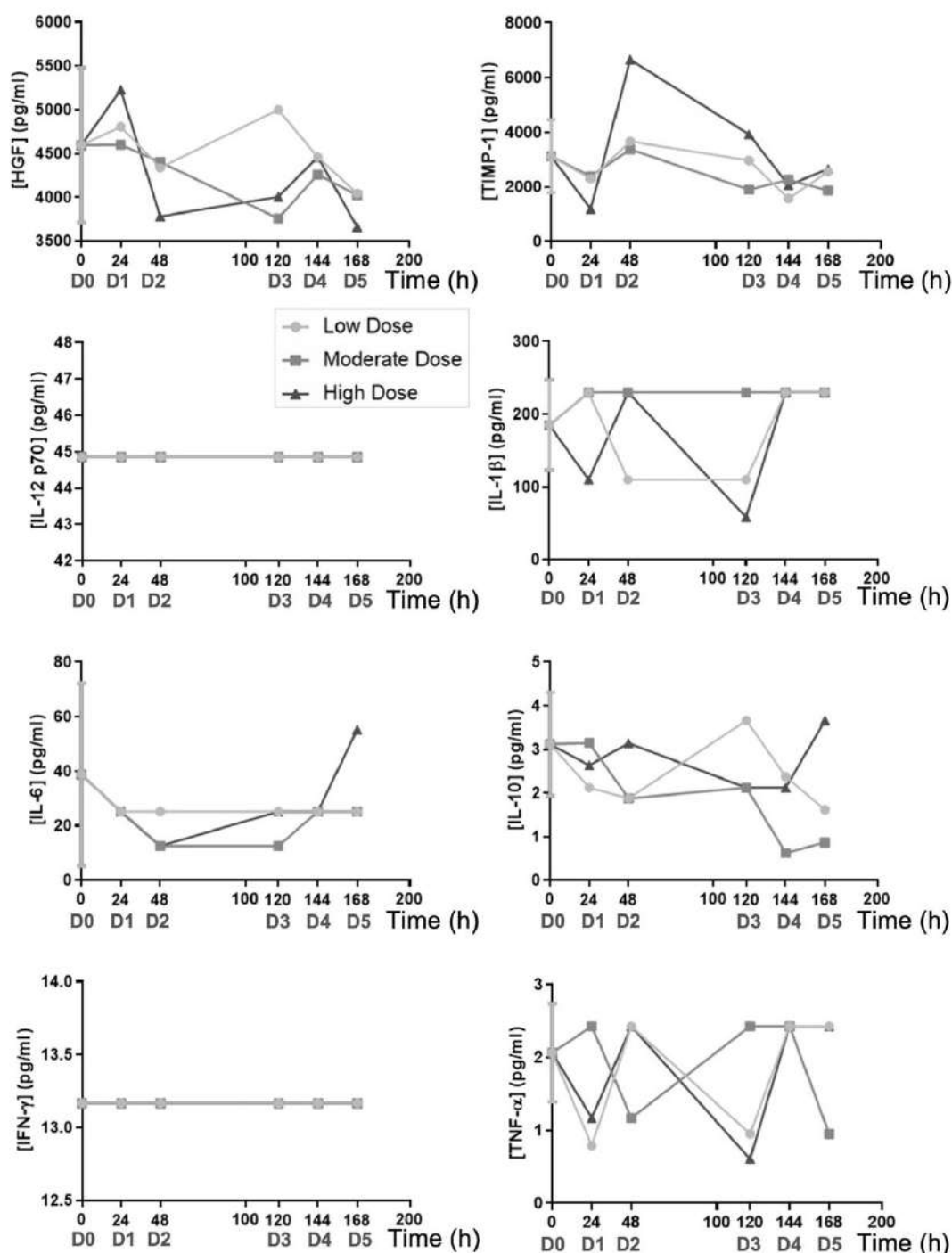
572
573
574

3.4.3. Análisis de citoquinas.

El efecto del tratamiento con PRS CK STORM sobre varias citoquinas murinas relevantes (efecto farmacodinámico) y citoquinas humanas (efecto farmacocinético) se

575
576
577
578
579
580
581
582
583
584

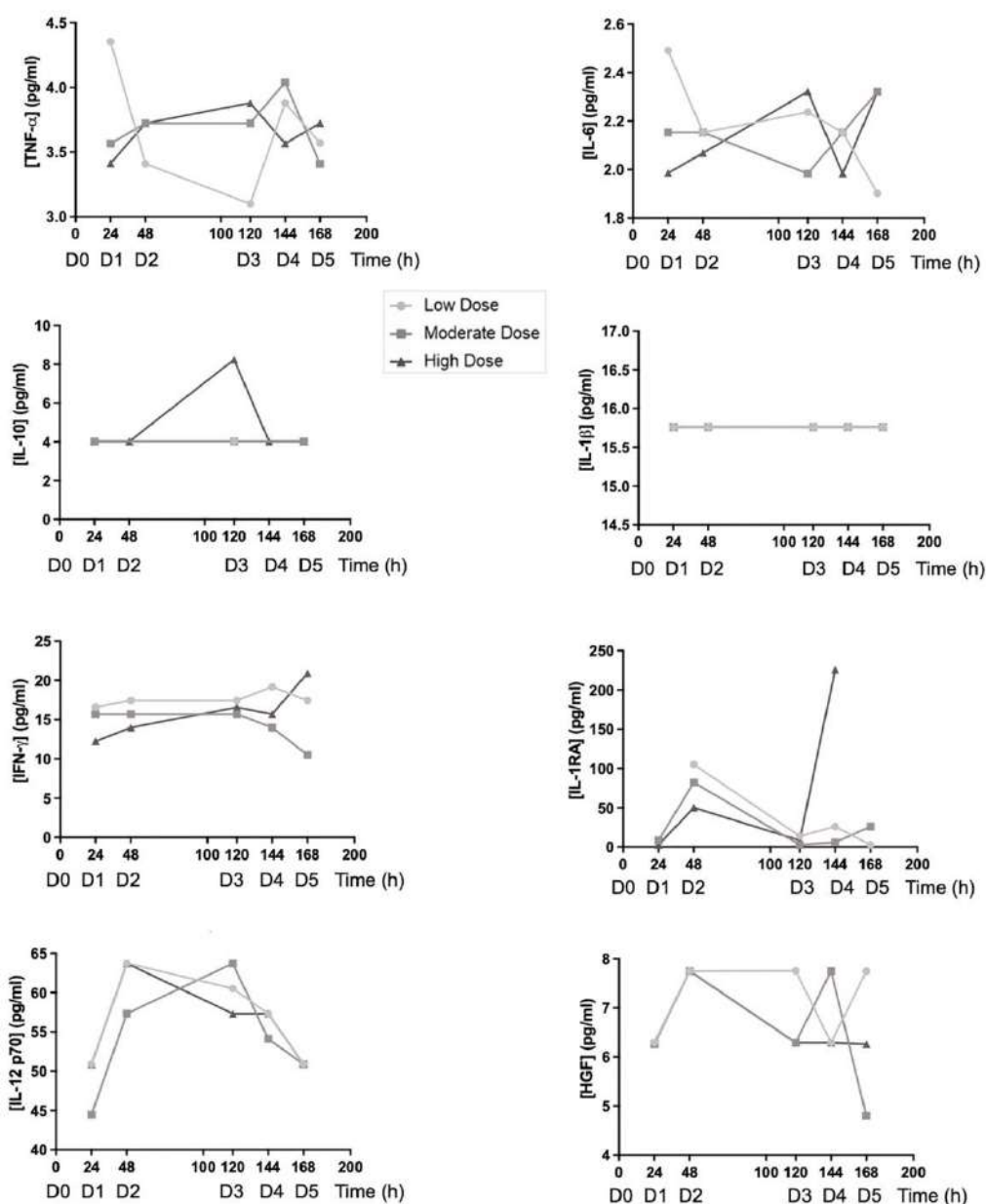
evaluó mediante ensayos multiplex. Como ya se explicó en la sección de materiales y métodos, ocho de las quince muestras del Día 0 se seleccionaron al azar como valores de referencia para las mediciones de citoquinas murinas (protocolo en el Anexo 3). Para las citoquinas humanas (Pharma, como el tratamiento aún no había comenzado, el ensayo se descartó en ese punto experimental (antes de la dosis) (protocolo en el Anexo 4). Estos dos ensayos se realizaron en el Departamento de Clasificación Celular y Citometría, CIBA. Aparte de las muestras de $t = 0h$, y al igual que el análisis de seguridad, los ratones se distribuyeron de forma que hubiera un ratón en cada punto de tiempo y concentración de dosis ($n=1$), por lo que no se calcularon diferencias estadísticas. A partir de estos valores, se elaboraron gráficos para las citoquinas murinas (Figura 5) y humanas (Figura 6).



585

586
587
588
589
590
591
592

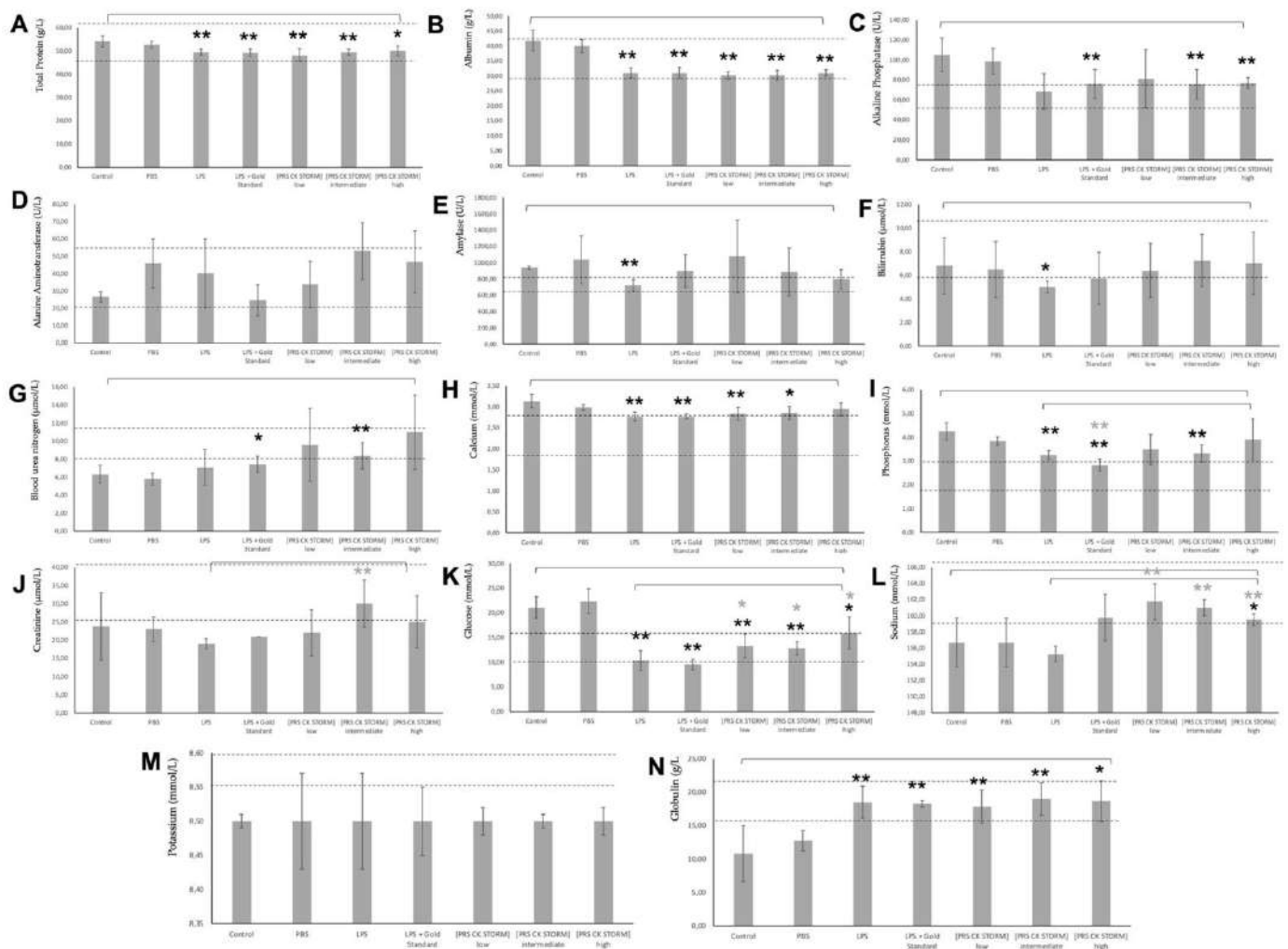
Figura 5. Análisis de citoquinas murinas. Se extrajeron muestras de sangre de 8 de los 15 ratones desde el día 0 (antes del tratamiento), y de cada uno de ellos en su respectivo punto experimental (ver Metodología). Posteriormente, se utilizaron sus sueros para cuantificar los niveles de TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , IFN- γ , IL-1Ra, IL-12 p70 y HGF humanos, mediante ensayos multiplex. D0-5 indica el número de dosis ya administradas en esos ratones en cada punto de tiempo. El tiempo = 0 h se representa como la media +/- SD de 8 muestras. La información complementaria está disponible en la Tabla S3: Valores de las citoquinas murinas analizadas por ensayo multiplex.



593
594
595
596
597
598
599
600
601

Figura 6. Análisis de citoquinas humanas. Se extrajeron muestras de sangre de 8 de los 15 ratones desde el día 0 (antes del tratamiento), y de cada uno de ellos en su respectivo punto experimental (ver Metodología). Posteriormente, se utilizaron sus sueros para cuantificar los niveles de HGF, TNF- α , IL-12 p70, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ y TIMP-1 de ratón, mediante ensayos multiplex. D0-5 indica el número de dosis ya administradas a esos ratones en cada punto de tiempo. El tiempo = 0 h se representa como la media +/- SD de 8 muestras. La información complementaria está disponible en la Tabla S4: Valores de las citoquinas humanas analizadas por el ensayo multiplex.

3.5. Prueba de eficacia *in vivo*



618

619

620

621

622

623

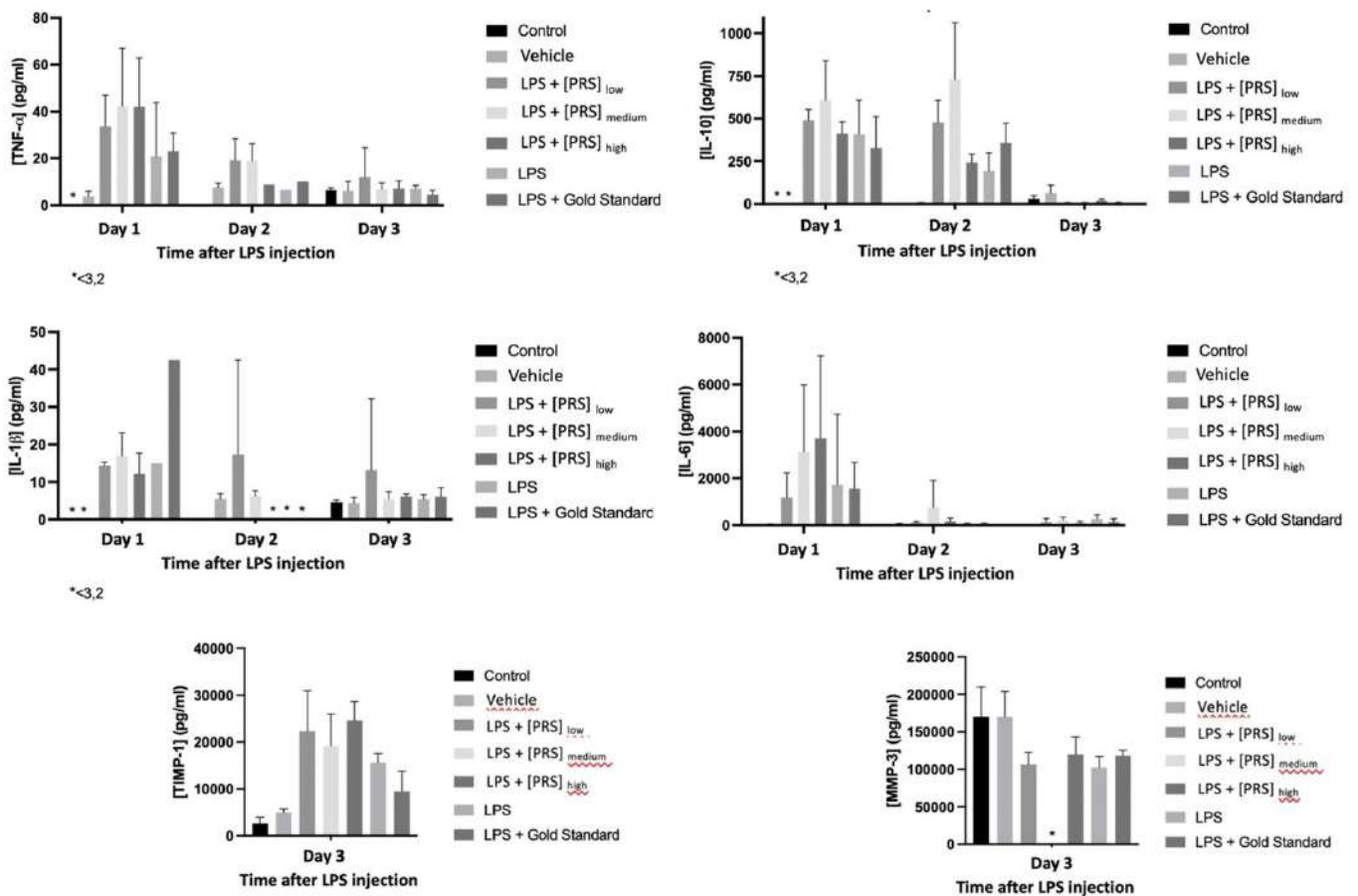
624

625

626

Figura 7. Análisis de citoquinas humanas. Se extrajeron muestras de sangre de 8 de los 15 ratones desde el Día 0 (antes del tratamiento), y de cada uno de ellos en su respectivo punto experimental (ver Metodología). Posteriormente, se utilizaron sus sueros para cuantificar los niveles de HGF, TNF- α , IL-12 p70, IL-1 β , IL-6, IL-10, IFN- γ y TIMP-1 de ratón, mediante ensayos multiplex. D0-5 indica el número de dosis ya administradas a esos ratones en cada punto de tiempo. El tiempo = 0 h se representa como la media +/- SD de 8 muestras.

La figura 8 muestra la evolución de los valores obtenidos para las citoquinas murinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-3, IL-10 y TIMP-1) a lo largo del tratamiento.



627

628

629

630

631

632

633

Figura 8. Valores séricos de las diferentes citoquinas murinas 1, 2 y 3 días después del tratamiento expresados en pg/ml como media de los valores de los 5 ratones de cada uno de los grupos experimentales. Evolución de las citoquinas murinas. Los asteriscos (*) indican una concentración inferior a 3,2pg/ml, el límite de detección del ensayo.

La figura 9 muestra la evolución de los valores obtenidos para las citoquinas humanas (IFN- α 2, IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL-1Ra) a lo largo del tratamiento.

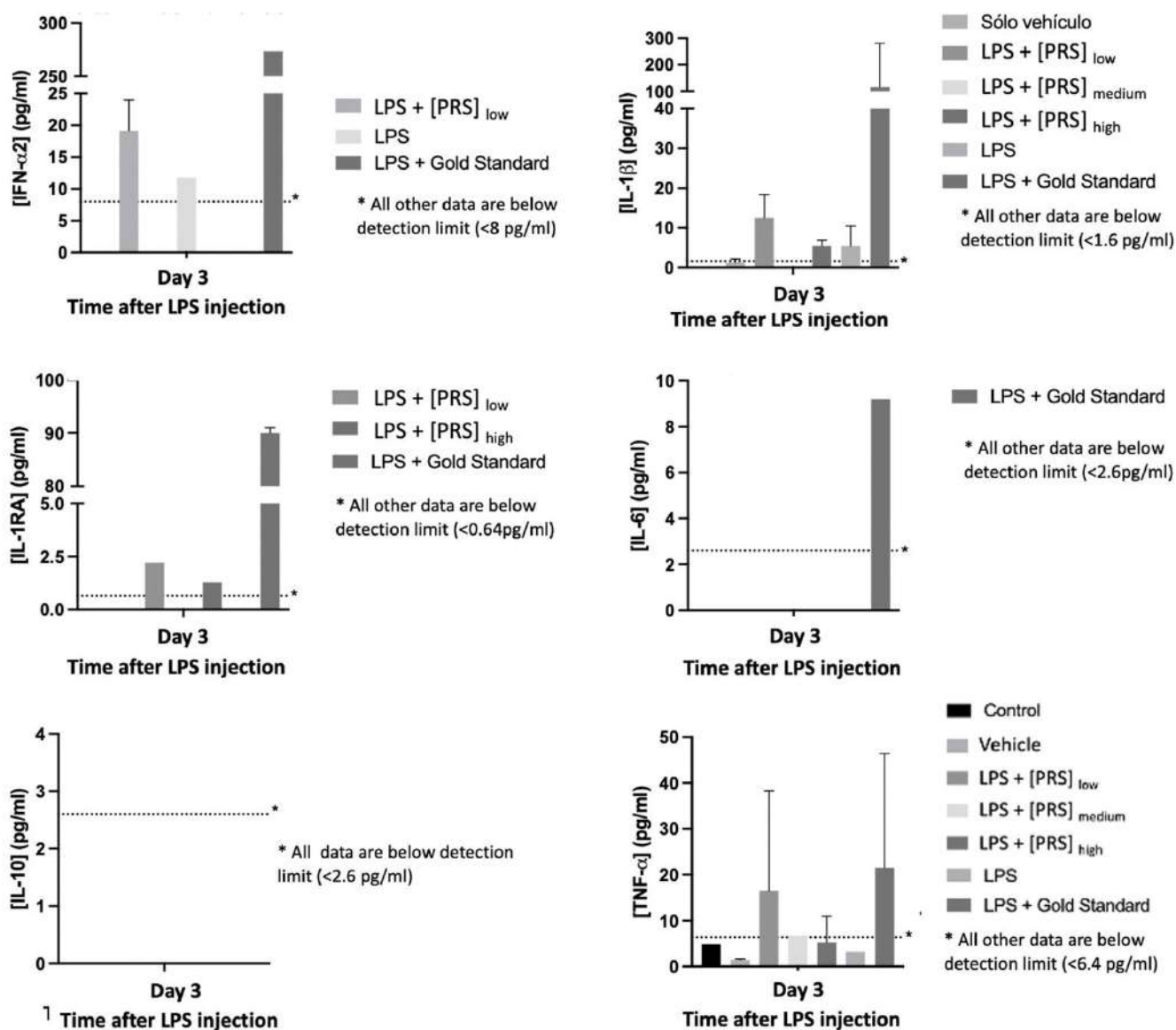


Figura 9. Valores séricos de las diferentes citoquinas humanas 1, 2 y 3 días después del tratamiento expresados en pg/ml como media de los valores de los 5 ratones de cada uno de los grupos experimentales. Evolución de las citoquinas murinas. Los asteriscos (*) indican una concentración inferior al límite de detección del ensayo.

Por último, el análisis histopatológico de las muestras obtenidas de diversos órganos de los ratones tras la necropsia mostró un engrosamiento intersticial parcheado del pulmón en la mayor parte de la muestra en el tratamiento con LPS, mientras que, a medida que aumentaba la concentración del fármaco de prueba (PRS CK STORM), el daño observado se invertía hasta el punto de que no había ningún daño pulmonar en los tratados con dosis altas. Se observaron ligeros daños en el hígado y el bazo, que los fármacos también revirtieron. En cuanto al corazón y al riñón, no se detectaron hallazgos patológicos (imágenes no mostradas). La tabla 8 muestra la información obtenida de las diferentes secciones histológicas.

Tabla 8. Resumen de los principales acontecimientos observados en las secciones histológicas de los diferentes órganos a estudiar. Las casillas con - significan que no se observó ninguna afectación patológica.

634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650

Grupo	LUNG	CORA-ZÓN	HÍGADO	RIÑONES	SPLEEN
Grupo de control	1*	1*	1*	1*	1*
Grupo LPS	2*	1*	6*	1*	9*
Grupo Anakinra	3*	1*	7*	1*	9*
PRS CK STORM _{Low} Dosis	4*	1*	8*	1*	1*
PRS CK STORDosis media	5*	1*	7*	1*	1*
PRS CK STORM _{High} Dosis	1*	1*	1*	1*	1*

1*: Imagen compatible con la normalidad; 2*: Infiltrados inflamatorios que engrosan los intersticios alveolares en más del 60% de la sección histológica; 3*: Infiltrados inflamatorios que engrosan los intersticios alveolares en más del 50% de la sección histológica; 4*: Infiltrados inflamatorios que engrosan los intersticios alveolares en el 30% de la sección histológica; 5*: Infiltrados inflamatorios que engrosan los intersticios alveolares en el 20% de la sección histológica; 6*: Dilatación clara de los espacios entre los sinusoides hepáticos; 7*: Ligera dilatación de los espacios entre los sinusoides hepáticos; 8*: Vena del lóbulo central con capilares sinusoidales dilatados; 9*: Ligera desorganización de las pulpas esplénicas.

La figura 10 muestra ejemplos de las secciones pulmonares estudiadas en los diferentes grupos del experimento.

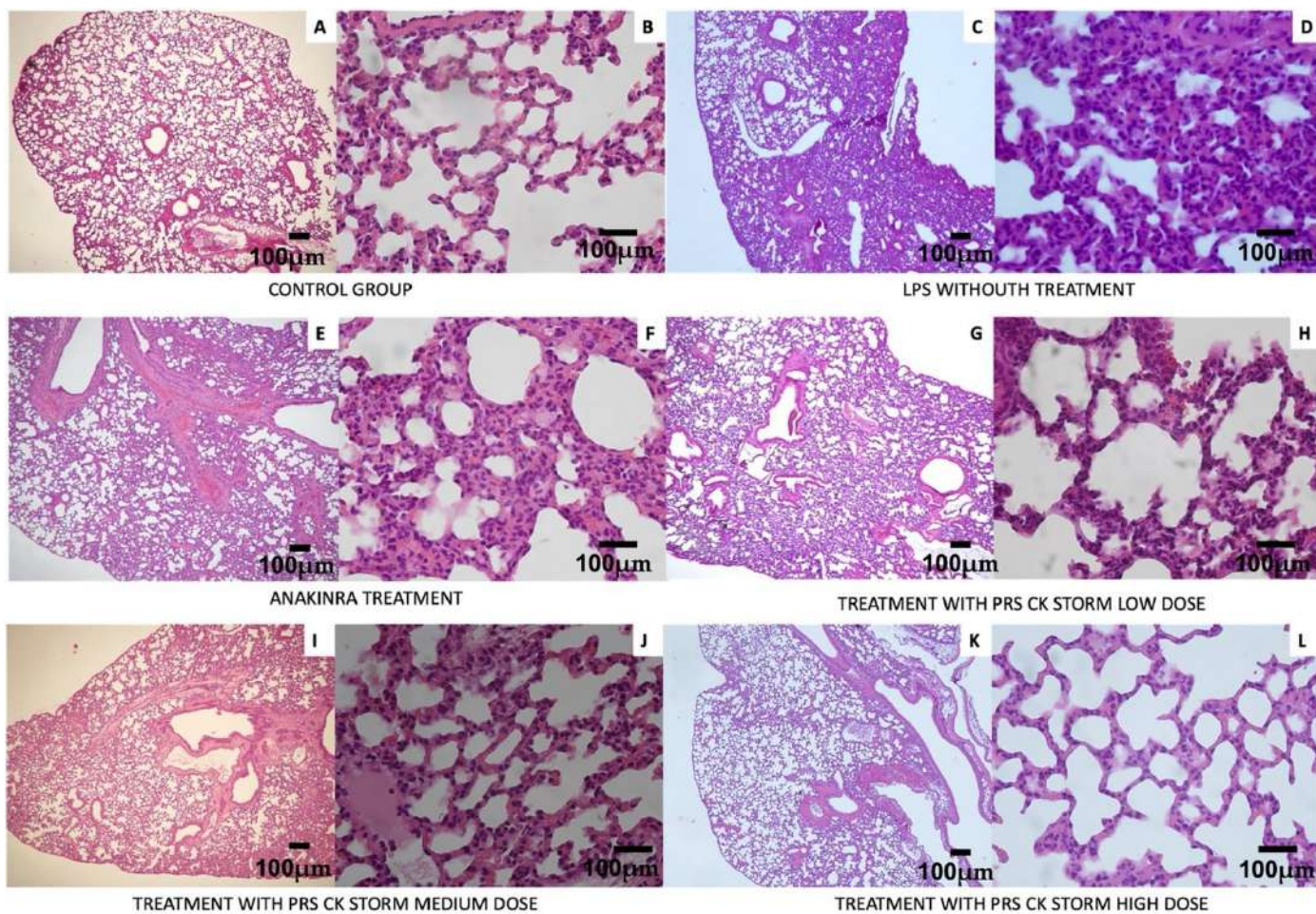


Figura 10. Estudio anatomopatológico del pulmón en los diferentes grupos de ratones del experimento. En el grupo tratado con la dosis más alta de nuestro medio condicionado, el aspecto del pulmón es muy similar al del grupo de control no tratado.

4. Discusión

666 El fármaco de prueba PRS CK STORM fue producido por cocultivo sin contacto di-
667 recto de macrófagos M2 con MSCs en condiciones similares a las GMP en la fábrica de
668 terapia celular avanzada de HistoCell.

669 La caracterización multiplex de los lotes de PRS CK STORM para citoquinas, qui-
670 mioquinas y factores de crecimiento muestra que todos los que tienen un papel proin-
671 flamatorio están por debajo de los límites de detección [42], excepto la IL-6 y la IL-8, que
672 se consideran citoquinas duales con respecto a la respuesta inmunitaria, es decir, según el
673 contexto en el que actúen, pueden ser pro o antiinflamatorias [43]. Varios autores han
674 demostrado que para definir el carácter pro o antiinflamatorio de una mezcla de cito-
675 quinas y factores de crecimiento, lo más importante es definir las proporciones entre ellos
676 [44,45,46,47]. En este sentido, el análisis de los ratios PRS CK STORM mostrados en la
677 tabla 1 muestra un claro perfil antiinflamatorio, siendo el ratio de citoquinas proinfla-
678 matorias (IL-1, IL-6, IL-18, TNF- α , IFN- γ , IL-17) frente a las antiinflamatorias (TIMP-1,
679 IGF-1, IL-10, IL-1RA) de 0,00042.

680 Los ensayos in vitro para demostrar la eficacia potencial (ensayo de bioactividad) y
681 la seguridad (ensayo tipo MTT) se consideran de gran importancia para el futuro desa-
682 rrollo de este fármaco, ya que productos similares emplean con éxito una estrategia de
683 mezcla de medios condicionados de diferentes donantes para obtener uno o varios lotes
684 homogéneos a partir de componentes muy heterogéneos [48] y permitirán establecer las
685 condiciones de calidad y seguridad tanto para la fabricación como para la liberación del
686 producto. La línea celular THP-1 utilizada en este estudio no muestra originalmente
687 sensibilidad a 100ng/ml de LPS según nuestra propia experiencia (datos no mostrados) y
688 las descripciones en la literatura [31]. Estas células ganan sensibilidad al LPS cuando se
689 diferencian a macrófagos con la adición de PMA al medio de cultivo. Tras la diferencia-
690 ción, adquieren características de macrófago (THP-1m) y comienzan a expresar mayores
691 niveles de receptores de membrana capaces de detectar LPS (datos no mostrados). Esta
692 línea celular nos permite estudiar las respuestas de un tipo celular muy similar a los
693 macrófagos humanos residentes en los tejidos, no presentes en la población de PBMC,
694 con muy poca variabilidad y un fenotipo muy estable. La utilización de la línea celular
695 THP-1 [49] frente a las PBMC utilizadas por nuestro grupo en otro estudio supone una
696 gran ventaja en el método, ya que, como se puede observar en los resultados, aunque las
697 respuestas de IL-1 β varían y son menores en THP-1 en comparación con las PBMC, las
698 respuestas de TNF- α se mantienen casi idénticas, con prácticamente la misma liberación,
699 evitando posibles reacciones cruzadas de eosinófilos o mastocitos presentes en las PBMC
700 que puedan alterar los niveles de IL-1 β y/o TNF- α al alza. El estudio de estos mediadores
701 inflamatorios y no de otros relacionados con la respuesta inmune se debe a que estos son
702 los principales y primeros factores secretados por las PBMC cuando son estimuladas en
703 una reacción de inmunidad innata en primera instancia ante un estímulo de un patógeno.
704 Estos factores, IL-1 β y TNF- α , tienen una amplia gama de funciones que van desde la
705 proliferación celular hasta la inducción de la apoptosis [50]. También se encuentran al
706 final de las vías de señalización utilizadas para generar la inflamación en nuestro modelo;
707 la IL-1 β se secreta cuando se activa el inflamasoma y la caspasa 1 convierte la pro-IL-1 β
708 inactiva en IL-1 β bioactiva y secretable, mientras que el TNF- α se libera de la
709 membrana celular cuando se activa la vía del factor nuclear kappa-beta (NF- κ B) [51].
710 Estas dos citoquinas, aunque no son las únicas responsables de la inflamación, son ca-
711 paces de proporcionar una buena visión de la respuesta inflamatoria derivada del estí-
712 mulo LPS, ya que son los principales factores estudiados por la mayoría de los grupos de
713 investigación que realizan este tipo de modelización [52,53,54].

714 Los resultados mostrados en la figura 2 del ensayo MTT de seguridad demuestran
715 que cualquiera de las dosis de PRS CK STORM puede ser utilizada en el ensayo in vivo,
716 ya que todas ellas muestran una reducción estadísticamente significativa en la reducción

717 del formazán, aunque es la dosis baja de PEI la que parece mostrar un mayor nivel de
718 reducción. Por lo tanto, se decidió utilizar esta dosis para probar la posible eficacia in vi-
719 tro, resultado que se muestra en la figura 3.

720 Respecto al ensayo de seguridad in vivo, el test de Irwin (Tabla 6) muestra que cua-
721 tro de los quince ratones manifestaron un ligero aumento de su resistencia a la manipu-
722 lación y a la agitación antes del inicio del tratamiento. A medida que se desarrollaba el
723 procedimiento, este comportamiento desapareció, y ningún ratón presentó ningún tipo
724 de alteración hasta el final del experimento. Estas observaciones sugieren que el trata-
725 miento con PRS CK STORM no induce ningún efecto secundario, al menos a nivel ma-
726 croscópico, a las dosis experimentales utilizadas. En el mismo experimento, se observó
727 que la dosis moderada indujo un aumento de la fosfatasa alcalina tras la primera inyec-
728 ción, que se mantuvo en la segunda dosis, pero no se evidenció ninguna relación entre el
729 nivel de dosis o el número de administraciones con el aumento, y su concentración volvió
730 a los valores normales al final del tratamiento (tiempo = 0h). También se observó un pico
731 en los valores de fosfatasa alcalina estándar después de la cuarta inyección cuando se
732 utilizó PRS CK STORM a dosis bajas y altas; sin embargo, también volvieron a la norma-
733 lidad después de la quinta inyección y los valores finales se mantuvieron normales (Fi-
734 gura 4). En cuanto a la alanina aminotransferasa, se detectó un único aumento (cuatro
735 veces por encima de los valores estándar) en un solo ratón tras la tercera inyección de
736 PRS CK STORM a dosis altas. A pesar de ello, el aumento observado volvió rápidamente
737 al rango normal y se mantuvo durante el resto del tratamiento (Figura 4), descartando de
738 nuevo una posible dependencia de la dosis. Finalmente, no se encontraron variaciones en
739 la concentración de γ -Glutamil Transferasa; por lo tanto, esta enzima no parece verse
740 afectada por la administración de PRS CK STORM (Figura 4). Por lo tanto, a partir de
741 estos datos se puede concluir que PRS CK STORM no afecta al hígado, ya que los picos
742 únicos detectados parecen ser aislados y no dependientes de la dosis. Además, en todos
743 estos casos, ya sea tras las dos primeras dosis o tras el intervalo de tiempo (48-120h), to-
744 dos los ratones recuperan rápidamente sus valores estándar y, al final del experimento,
745 incluso en los ratones inyectados cinco veces con este fármaco, todos los valores se nor-
746 malizan. El ácido biliar sí parece aumentar, tras la primera inyección en las dosis mode-
747 radas, y la tercera inyección en las otras dos concentraciones; sin embargo, como antes, se
748 trata de picos únicos que se resuelven al día siguiente y, al final del experimento, se
749 mantienen en el rango estándar (Figura 4). La bilirrubina aumentó ligeramente después
750 de la primera (dosis baja) o segunda (dosis moderada y alta) administración, pero de
751 nuevo, los aumentos volvieron rápidamente a la normalidad y se mantuvieron bajos
752 hasta el final (Figura 4). El nitrógeno ureico en sangre no mostró ninguna variación a lo
753 largo del experimento (Figura 4). En cuanto a la albúmina, que es una proteína de fase
754 aguda negativa, no cambió con la dosis baja de PRS CK STORM, pero se pudo detectar
755 un aumento tras la segunda inyección en las otras dos concentraciones (Figura 4). Inde-
756 pendentemente de esto, los ratones normalizaron sus valores al final. En el caso del co-
757 lesterol hubo un aumento moderado, pero no pareció ser demasiado relevante para la
758 salud y el bienestar de los ratones (Figura 4). En cuanto a las citoquinas murinas (resul-
759 tados farmacodinámicos), empezando por las citoquinas antiinflamatorias, más concre-
760 tamente el HGF y el TIMP-1, no fueron indiferentes al tratamiento con PRS CK STORM,
761 ya que se detectó un aumento y posterior estabilización (Figura 5). Esto fue especialmente
762 claro en el caso de TIMP-1, donde se observó un aumento del orden de 2,5 tras la admi-
763 nistración de la dosis alta de PRS CK STORM (sólo en la dosis alta, tras la segunda in-
764 yección). A pesar de ello, los valores de ambas proteínas disminuyeron tras el intervalo
765 de 72h sin tratamiento y, en el punto final, se normalizaron (Figura 5). En conjunto, esto
766 podría ser relevante, ya que sugiere que los ratones pueden iniciar un mecanismo anti-
767 inflamatorio y reparador que podría resolver el aumento de las transaminasas. En cuanto
768 a la citoquina antiinflamatoria restante, la IL-10, hubo pocas variaciones a lo largo del
769 experimento (figura 5). La IL-1 β no varió con respecto a los valores del día 0 (incluso

770 hubo una disminución en el cuarto tratamiento cuando se utilizó la dosis alta de PRS CK
771 STORM, pero volvió a los estándares) (Figura 5). La misma interpretación puede apli-
772 carse a la IL-12 p70 y a la IL-6 (el aumento aparente de la IL-6 observado el último día con
773 la dosis más alta seguía estando dentro de los valores de referencia) (Figura 5). En par-
774 ticular, el IFN- γ y el TNF- α , ambos considerados marcadores proinflamatorios o de pér-
775 dida de homeostasis, junto con la IL-1 β , estuvieron siempre por debajo del límite de de-
776 tección y no aumentaron tras el tratamiento con PRS CK STORM (Figura 5). En cuanto a
777 las citoquinas humanas (resultados farmacodinámicos), se evidenció que la concentra-
778 ción de TNF- α era apenas detectable al inicio y se mantuvo prácticamente inalterada a lo
779 largo del experimento (Figura 6), coincidiendo con los niveles basales de PRS CK STORM
780 (Tabla S1). Lo mismo ocurrió con el HGF y la IL-6 (figura 6), cuyas concentraciones fue-
781 ron inferiores a las de la línea de base de PRS CK STORM (tabla S1) y de sus homólogos
782 murinos (figura 5). En el caso de IFN- γ , IL-10 e IL-1 β , sus concentraciones eran muy bajas
783 y, en la mayoría de las muestras, estaban por debajo del límite de detección. Así, a pesar
784 de ser aparentemente más altas que sus valores de referencia de caracterización PRS CK
785 STORM (véanse tanto la figura 6 como la tabla 5), sus concentraciones eran casi indetec-
786 tables y presumiblemente inalteradas. En cuanto a la IL-12 p70, aunque parecía aumentar
787 para todas las dosis, finalmente se resolvieron y disminuyeron a las concentraciones de
788 referencia, lo que sugiere que esta citoquina se elimina finalmente del cuerpo sin más
789 complicaciones (Figura 6). Por último, en el caso del receptor antiinflamatorio IL-1RA,
790 aunque inicialmente se observó un pico inusual en todas las dosis, su concentración
791 disminuyó en gran medida a partir del día 1 de tratamiento, cayendo por debajo de los
792 valores de referencia al final del experimento (Figura 6).

793 Respecto al ensayo de eficacia in vivo, el modelo experimental empleado utiliza el
794 LPS como agente causante del daño pulmonar agudo, provocando una tormenta de ci-
795 toquinas en el organismo de los ratones como la que se produce en cualquier infección
796 pulmonar, como por ejemplo ocurre en la enfermedad de COVID-19. La prueba de Irwin
797 (véase la tabla 7) mostró una reducción estadísticamente significativa de la temperatura
798 corporal en los ratones tratados con LPS. De hecho, la temperatura media basal pasó de
799 aproximadamente 36,3°C a 24°C tras la estimulación con LPS. Esto hizo necesario colocar
800 a todos los animales en una manta térmica para preservar su vida. Esto no se hizo en el
801 grupo del patrón oro, lo que puede haber contribuido a la temperatura media más baja
802 del grupo. En todos los grupos tratados con LPS, se produjo un ligero aumento de la in-
803 clinación, una ligera diarrea y la consiguiente deshidratación de los animales, que fue
804 leve en todos los grupos tratados con PRS CK STORM, y más intensa en el grupo tratado
805 con Anakinra. Por otra parte, se observó un ligero aumento de la piloerección en el grupo
806 tratado con dosis bajas de PRS CK STORM y en el grupo tratado con LPS solo, que fue
807 mayor en el grupo tratado con Anakinra. Se observaron temblores leves y una disminu-
808 ción significativa de la actividad exploratoria, así como de la reactividad general, tanto en
809 el grupo tratado con LPS solo como en el tratado con Anakinra. Esto no se observó en
810 ninguno de los grupos tratados con PRS CK STORM. De los 35 animales del estudio,
811 cuatro de ellos murieron en algún momento intermedio, como se muestra en la tabla 3. Al
812 día siguiente de la administración, murieron los ratones 12 y 32, que presentaban una
813 gastritis grave en la necropsia. El segundo día después de la administración, murieron los
814 ratones 27 (la necropsia mostró claros signos de inflamación pulmonar con gastritis gra-
815 ve) y 32 (la necropsia mostró ligeros signos de inflamación pulmonar). La prueba de Ir-
816 win mostró que PRS CK STORM atenúa notablemente los efectos perjudiciales de la
817 tormenta de citoquinas asociada a la administración de LPS, que es como la que se pro-
818 duce durante una fase aguda grave de un proceso infeccioso, como ocurre en COVID-19.
819 Los perfiles bioquímicos de los ratones y las ratas están mal descritos en la literatura, y
820 varían mucho entre sexos y cepas, así como entre las distintas fuentes consultadas, lo que
821 complica el análisis de los datos. La mayoría de las proteínas y metabolitos analizados
822 siguen la misma tendencia, independientemente del grupo experimental observado. En

823 cuanto a la albúmina (figura 6B), la principal proteína presente en la sangre, se observa
824 una disminución de la misma en todos los grupos a los que se les administró LPS, lo que
825 concuerda con lo descrito por Ballmer et al. en 1994 [55], ya que la hipoalbuminemia se
826 produce cuando el organismo sufre una sepsis por infección. En relación con esto está la
827 disminución de la proteína total (figura 6A), ya que una disminución de la albúmina
828 conducirá a una disminución de la proteína total porque está en concentraciones muy
829 altas. La disminución observada para la glucosa (figura 6K) podría explicarse por la
830 presencia de IGF-1 en el fármaco administrado, que emula a la insulina y aumenta la
831 captación de glucosa por los tejidos [56], así como por la presencia de otros azúcares en el
832 secretoma que componen el PRS CK STORM que podrían interactuar, disminuyendo los
833 niveles de glucosa basales. El aumento de la globulina (figura 4N) también puede expli-
834 carse por el LPS, ya que estas proteínas aumentan en situaciones inflamatorias. Además,
835 dentro del amplio grupo de las globulinas, destaca el aumento de las inmunoglobulinas
836 en presencia de LPS [57]. El resto de los parámetros se mantienen sin modificaciones
837 significativas entre los diferentes tratamientos (figuras 4C, 4D, 4E, 4F, 4G, 4H, 4I, 4J), lo
838 que sugiere que todos están dentro de la normalidad. En el caso del potasio (figura 4M),
839 no se ha podido determinar su concentración porque todos superan el límite de detección
840 del programa utilizado, por lo que no es posible determinar si su valor se modifica al
841 inducir el LPS y el tratamiento farmacológico.

842 En cuanto a los resultados farmacodinámicos y farmacocinéticos, se monitorizaron
843 los niveles de las siguientes citoquinas, tanto murinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, MMP-3, IL-10
844 y TIMP-1) como humanas (IFN- α 2, IL-10, IL-1 β , IL-6, TNF- α e IL1Ra), para evaluar el
845 efecto del fármaco de PRS CK STORM, que demostró su potencial terapéutico al inhibir
846 la producción de citoquinas proinflamatorias, al tiempo que aumentaba la producción de
847 citoquinas antiinflamatorias como la IL-10, cuya función reside en su capacidad para in-
848 hibir la síntesis de estas citoquinas proinflamatorias. La figura 7 muestra la evolución de
849 estas citoquinas murinas detectadas en los sueros de los ratones en cada uno de los días
850 de tratamiento. A la vista de estos resultados, se puede deducir que la estimulación con
851 lipopolisacárido bacteriano (LPS) puede inducir la respuesta inflamatoria esperada,
852 siendo más pronunciada en la fase más aguda, al día siguiente de la administración del
853 tratamiento, y disminuyendo con el tiempo. En el grupo de control y en el vehículo no se
854 observaron citoquinas proinflamatorias, lo que confirma que el LPS es el causante de esta
855 respuesta. En el grupo tratado con Anakinra (estándar de oro), se observó una disminu-
856 ción significativa de la concentración de todas las citoquinas proinflamatorias murinas
857 estudiadas (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Cabe señalar aquí que el ratón número 32, que murió el
858 día 2 del experimento, registró niveles muy elevados de IL-1 β el día 1 (42,53pg/ml), lo
859 que podría justificar su muerte un día después. Esto es sorprendente, ya que la Anakinra
860 es un antagonista del receptor de la interleucina-1 (IL-1). También llama la atención en la
861 figura 8 los elevados niveles de IL-1 β humana y de IL-1Ra registrados en 31 del mismo
862 grupo el día del experimento. En este caso los niveles de IL-1Ra podrían explicarse por el
863 mismo tratamiento recibido (Anakinra), ya que se observó el mismo aumento en el ratón
864 33, pero en este último los niveles de IL-1 β el día 3 fueron bajos, ocurriendo lo contrario
865 en el ratón 31 donde se observó un gran aumento de IL-1 β humana. Esto podría deberse a
866 un fenómeno de reactividad cruzada. El tratamiento con PRS CK STORM a las diferentes
867 concentraciones ensayadas también provoca una considerable disminución de los niveles
868 de citoquinas proinflamatorias murinas a lo largo del tiempo, especialmente a la dosis
869 alta, como puede verse en la figura 7. Aunque, en general, parece que tanto el tratamiento
870 con dosis altas de PRS CK STORM como el tratamiento con el patrón de oro Anakinra
871 parecen controlar la tormenta de citoquinas, en el grupo de dosis altas de PRS CK
872 STORM el nivel medio de TIMP-1 murino en el día 3 del experimento era de
873 24551,55pg/ml, mientras que el mismo nivel medio en el grupo de Anakinra era sólo de
874 9441,99pg/ml, siendo los valores medios de MMP-3 murinos en ambos grupos muy si-
875 milares. Esto podría estar relacionado con las observaciones anatomopatológicas (véanse

la tabla 8 y la figura 9) observadas en estos grupos, ya que el grupo tratado con Anakinra mostraba lesiones en el pulmón, el hígado y el bazo muy similares a las observadas en el grupo de sólo LPS, informando de infiltrados inflamatorios que engrosaban el intersticio alveolar en el 50% de la sección pulmonar, así como de lesiones inflamatorias leves tanto en el hígado como en el bazo, mientras que no se observaron lesiones pulmonares en el grupo tratado con altas dosis de PRS CK STORM (se puede encontrar más información en el anexo 6 y 7 de los materiales suplementarios). Otra observación importante a este respecto, que la histopatología confirmó a posteriori, fue el hecho de que se cronometraron los segundos que tardaron los ratones en morir en la cámara de CO₂ (una media de 118sg para los ratones tratados con altas dosis de PRS CK STORM, frente a una media de 27sg para los ratones tratados con Anakinra). El TIMP-1 es una molécula inhibidora que regula las metaloproteinasas de la matriz (MMP) y las metaloproteinasas desintegradoras (ADAM y ADAMTS) [58], regulando a la baja las metaloproteinasas (MMP) y desempeñando así un papel crucial en la composición de la matriz extracelular (MEC), favoreciendo la regeneración de los tejidos y frenando los procesos de cicatrización fibrótica [59]. Por otro lado, también cabe destacar que tanto en el grupo tratado con altas dosis de PRS CK STORM como en el grupo tratado con Anakinra, los niveles de IL-1 β disminuyeron en el día 3 hasta los mismos niveles medios (6,1pg/ml). Está claro que al ser Anakinra un antagonista del receptor de IL-1, esta disminución es una consecuencia directa de su mecanismo de acción [60,61], pero en el caso de la dosis alta de PRS CK STORM, el contenido de IL-1Ra es mucho menor que en el caso de Anakinra (784947pg total frente a 5x10⁹pg total, respectivamente), por lo que los efectos antiinflamatorios observados por la acción de PRS CK STORM, pueden no deberse a la acción directa de su contenido en IL-1Ra, sino que posiblemente se deban a una acción combinada del conjunto de moléculas que contiene sobre diferentes puntos de varias cascadas metabólicas vinculadas a los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), produciendo efectos citoprotectores, antiapoptóticos y regenerativos del tejido, regulando a la baja la producción de fibrosis [48,62,63]. Nuestro grupo está actualmente inmerso en el estudio del mecanismo de acción del PRS CK STORM, así como en los ensayos de toxicología en condiciones GMP, necesarios para llevar el PEI a los ensayos clínicos en humanos.

Por lo tanto, parece que la dosis alta de PRS CK STORM puede ser útil en la prevención y el tratamiento de la tormenta de citoquinas asociada a procesos infecciosos severos, como el asociado a COVID-19, ya que los datos analizados sugieren que a esta dosis podría prevenir el agravamiento vital asociado, a la vez que evitaría la aparición de fibrosis en los tejidos afectados por la inflamación.

5. Conclusiones

Los resultados muestran que la PRS CK STORM está compuesta por un secretoma con un claro perfil antiinflamatorio, antifibrótico y regenerativo. El uso de células THP-1m en los métodos presentados en el presente estudio como pruebas para comprobar la bioseguridad y el potencial antiinflamatorio de PRS CK STORM hace que estas pruebas sean reproducibles y fiables, y deberían implementarse como herramientas de control de calidad en los procesos de producción de diferentes medios condicionados. PRS CK STORM a dosis elevadas ha demostrado una gran capacidad, no sólo para reducir la inflamación aguda en las tormentas de citoquinas asociadas a infecciones severas mediante la inmunorregulación de la actividad del sistema inmune innato y la mejora de su coordinación con la inmunidad adaptativa, sino también su eficacia como fármaco antifibrótico, evitando las consecuencias negativas a medio y largo plazo de los fenómenos inflamatorios agudos.

En conjunto, los resultados sugieren que las altas dosis de PRS CK STORM, secretoma del cocultivo de macrófagos M2 con MSCs, pueden convertirse en un fármaco bio-

lógico seguro y eficaz para prevenir y tratar la tormenta de citoquinas asociada a procesos infecciosos graves, como el asociado a COVID-19.

6. Patentes

Este trabajo de investigación ha dado lugar a la patente PCT/EP2020/059365 "Composición para la regeneración de tejidos, método de producción y usos de la misma".

Materiales suplementarios: La siguiente información de apoyo puede descargarse en: www.mdpi.com/xxx/s1, Tabla S1: Caracterización molecular del lote de PRS CK STORM utilizado en esos experimentos; Tabla S2: Valores del perfil bioquímico de los sueros de los ratones; Tabla S3: Valores de las citoquinas murinas analizadas por el ensayo multiplex; Tabla S4: Valores de las citoquinas humanas analizadas por ensayo multiplex.

Contribuciones de los autores: Todos los autores contribuyeron a la concepción y diseño del estudio. La preparación del material, la recogida de datos y el análisis fueron realizados por Juan Pedro Lapuente, Joaquín Marco-Brualla, Gonzalo Gómez, Paula Desportes, Jara Sanz, Pablo Fernández, Marco García-Gil, Fernando Bermejo, Juan V. San Martín, Alicia Algaba, Daniel Lapuente, Almudena De Gregorio, Belén Lapuente y Sergio Gómez. El primer borrador del manuscrito fue escrito por Juan Pedro Lapuente y Alberto Anel, y todos los autores comentaron las versiones anteriores del manuscrito. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final.

Financiación: Este trabajo fue apoyado por Peaches Biotech/R4T y por la subvención B31_20R del Gobierno de Aragón.

Declaración de la Junta de Revisión Institucional: El estudio de seguridad se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por la Dirección General de Calidad y Seguridad Alimentaria del Gobierno de Aragón (Ref. PI43/20; EudraCT: 2020-0001557-46), tras haber obtenido la aprobación del Comité Ético Asesor de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Anexo 1). El estudio de eficacia se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por la Dirección General de Calidad y Seguridad Alimentaria del Gobierno de Aragón (Ref. PI04/21; EudraCT: 2020-0001557-46), tras haber obtenido la aprobación del Comité Ético Asesor de Experimentación Animal de la Universidad de Zaragoza (Anexo 5).

Declaración de consentimiento informado: Se obtuvo el consentimiento informado de todos los donantes que participaron en el estudio.

Declaración de disponibilidad de datos: Los conjuntos de datos generados y/o analizados durante el presente estudio están disponibles a través de los autores correspondientes previa solicitud razonable.

Agradecimientos: En esta sección puede reconocer cualquier apoyo prestado que no esté cubierto por las secciones de contribución del autor o de financiación. Esto puede incluir el apoyo administrativo y técnico, o las donaciones en especie (por ejemplo, los materiales utilizados para los experimentos).

Conflictos de intereses: los autores declaran que no tienen conflictos de intereses financieros o personales que puedan influir de forma inapropiada en la realización de esta investigación.

Bibliografía

1. Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Tormenta de citoquinas y patogénesis de la enfermedad de sepsis. *Semin Immunopathol* 39 (5) (2017) 517-528.
2. Harrison C. Calmando la tormenta de citoquinas. *Nature Reviews Drug Discovery* 9 (5) (2010) 360-361.
3. Ragab D., Salah Eldin H., Taeimah M., Khattab R., Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Frontiers in Immunology* 11 (1446) (2020).
4. Fleischmann C., Scherag A., Adhikari N.K., Hartog C.S., Tsaganos T., Schlattmann P., Angus D.C., Reinhart K.; International Forum of Acute Care Trialists. Evaluación de la incidencia y mortalidad global de la sepsis tratada en el hospital. Current Estimates and Limitations. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016 Feb 1;193(3):259-72.
5. Rudd K.E., Johnson S.C., Agesa K.M., Shackelford K.A., Tsoi D., Kievlan D.R., et al. Incidencia y mortalidad por sepsis a nivel mundial, regional y nacional, 1990-2017: análisis para el Estudio de la Carga Global de la Enfermedad. *Lancet*. 2020 Jan 18;395(10219):200-211.

6. Gu J., Han B., Wang J. COVID-19: Manifestaciones gastrointestinales y posible transmisión fecal-oral. *Gastroenterology*. 2020 May;158(6):1518-1519.
7. Xiao F., Tang M., Zheng X., Li Y., Li X., Shan H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology*. 2020 May;158(6):1831-1833.e3.
8. Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Tormenta de citoquinas y patogénesis de la enfermedad de la sepsis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):517-528.
9. Liu Q., Zhu P. (Trastornos linfoproliferativos asociados al virus EB y tormenta de citoquinas). *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2013 Apr;21(2):498-502.
10. Tiab M., Mechinaud F., Harousseau J.L. Haemophagocytic syndrome associated with infections. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*. 2000 Jun;13(2):163-78.
11. Grom A.A., Horne A., De Benedetti F. Síndrome de activación de macrófagos en la era de la terapia biológica. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 May;12(5):259-68.
12. Makhija R., Kingsnorth A.N. Tormenta de citoquinas en la pancreatitis aguda. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2002;9(4):401-10.
13. Hu B., Huang S., Yin L. La tormenta de citoquinas y COVID-19. *J Med Virol*. 2021 Jan;93(1):250-256.
14. Himanshu K., Taro K., Shizuo A. Pathogen Recognition by the Innate Immune System. *International Reviews of Immunology* (2011) 30 (1): 16-34.
15. Taro K., Shizuo A. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity* (2011) 34 (5): 637-650.
16. Komal D., Manoj B., Gourango B., Atul B., Sangita B. TLRs/NLRs: Shaping the landscape of host immunity. *International Reviews of Immunology* (2011) 37 (1): 3-19.
17. Root-Bernstein R. Synergistic Activation of Toll-Like and NOD Receptors by Complementary Antigens as Facilitators of Autoimmune Disease: Revisión, modelo y predicciones novedosas. *Int. J. Mol. Sci*. 2020, 21, 4645.
18. Hosseini A.M., Majidi J., Baradaran B., Yousefi M. Toll-Like Receptors in the Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Adv. Pharm. Bull*. 2015, 5, 605-614.
19. Dabbagh K.; Lewis D.B. Receptores tipo Toll y respuestas T-helper-1/T-helper-2. *Curr. Opin. Infect. Dis*. 2003, 16, 199-204.
20. Tikhvatulin A.I., Gitlin I.I., Shchelyakov D.V., Artemicheva N.M., Burdelya L.G., Shmarov M.M., et al. La estimulación combinada del receptor Toll-Like 5 y NOD1 potencia fuertemente la actividad de NF- κ B, lo que resulta en una mejora de las reacciones inmunitarias innatas y la resistencia a la infección por *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect. Immun*. 2013, 81, 3855-3864.
21. Moreira L.O., Zamboni D.S. NOD1 and NOD2 Signaling in Infection and Inflammation. *Front. Immunol*. 2012, 3, 328.
22. Kumar V. Toll-like receptors in sepsis-associated cytokine storm and their endogenous negative regulators as future immunomodulatory targets. *Int Immunopharmacol*. 2020 Dec;89(Pt B):107087.
23. Chousterman B.G., Swirski F.K., Weber G.F. Tormenta de citoquinas y patogénesis de la enfermedad de la sepsis. *Semin Immunopathol*. 2017 Jul;39(5):517-528.
24. Tseng Y.T., Sheng W.H., Lin B.H., Lin C.W., Wang J.T., Chen Y.C., et al. (2011). Causas, síntomas clínicos y resultados de las enfermedades infecciosas asociadas a la linfocitosis hemofagocítica en adultos taiwaneses. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection*, 44(3), 191-197.
25. Cascio A., Pernice L. M., Barberi G., Delfino D., Biondo C., Beninati C., et al. (2012). Linfocitosis hemofagocítica secundaria en zoonosis. Una revisión sistemática. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 16, 1324-1337.
26. Singh Z.N., Rakheja A., Yadav T.P., Shome J. (2005). Infection-associated haemophagocytosis: The tropical spectrum. *Clinical and Laboratory Haematology*, 27(5), 312-315.
27. Teijaro J.R. Tormentas de citoquinas en las enfermedades infecciosas. *Semin Immunopathol* (2017) 39:501-503.
28. Lapuente J.P., Blázquez-Martínez A., Marco-Brualla J., Gómez G., Desportes P., Sanz J., Fernández P., García-Gil M., Bermejo F., San Martín J.V., Algaba A., De Gregorio J.C., Lapuente D., De Gregorio A., Lapuente B., Andrés M.d.l.V., Anel A. Cytokine Profile and Anti-Inflammatory Activity of a Standardized Conditioned Medium Obtained by Coculture of Monocytes and Mesenchymal Stromal Cells (PRS CK STORM). *Biomolecules*. 2022; 12(4):534. <https://doi.org/10.3390/biom12040534>
29. Nieto-Aguilar R., Serrato D., Garzón I., Campos A., Alaminos M. Capacidad de diferenciación pluripotencial de las células madre humanas derivadas del tejido adiposo en un nuevo andamio de fibrina-agarosa. *J Biomater Appl*. 2011 Mar;25(7):743-68.
30. Carriel V., Garrido-Gómez J., Hernández-Cortés P., Garzón I., García-García S., Sáez-Moreno J.A., et al. Combinación de hidrogeles de fibrina-agarosa y células madre mesenquimales derivadas de la adiposa para la regeneración de nervios periféricos. *J Neural Eng*. 2013 Apr;10(2):026022.
31. Park E.K., Jung H.S., Yang H.I., Yoo M.C., Kim C., Kim K.S. Se requiere una diferenciación optimizada de THP-1 para la detección de respuestas a estímulos débiles. *Inflamm Res*. 2007 Jan;56(1):45-50.
32. Chen S., Sugiyama K., Inamura M., Tanaka S., Onda K., Yin H., et al. Efectos de la insulina en la farmacodinámica de los fármacos inmunosupresores contra las células mononucleares de sangre periférica activadas por mitógenos. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2016 Oct;38(5):372-8.

- 1037 33. Stephens R.S., Johnston L., Servinsky L., Kim B.S., Damarla M. El inhibidor de la tirosina quinasa imatinib previene la le-
1038 sión pulmonar y la muerte después de LPS intravenoso en ratones. *Physiol Rep.* 2015 Nov;3(11):e12589.
- 1039 34. Lewis A.J., Seymour C.W., Rosengart M.R. Modelos murinos actuales de sepsis. *Surg Infect (Larchmt).* 2016
1040 Aug;17(4):385-93.
- 1041 35. Fang H., Liu A., Chen X., Cheng W., Dirsch O., Dahmen U. La gravedad de la lesión inflamatoria inducida por LPS se
1042 asocia negativamente con la masa funcional del hígado tras la inyección de LPS en un modelo de rata. *J Inflamm (Lond).*
1043 2018 Nov 15;15:21.
- 1044 36. Starr M.E., Ueda J., Takahashi H., Weiler H., Esmon C.T., Evers B.M., Saito H. La vulnerabilidad dependiente de la edad a
1045 la endotoxemia está asociada a la reducción de los factores anticoagulantes proteína C activada y trombomodulina. *Blood.*
1046 2010 Jun 10;115(23):4886-93.
- 1047 37. Mathiasen J.R., Moser V.C. The Irwin Test and Functional Observational Battery (FOB) for Assessing the Effects of Com-
1048 pounds on Behavior, Physiology, and Safety Pharmacology in Rodents. *Curr Protoc Pharmacol.* 2018 Dec;83(1):e43.
- 1049 38. Anderson L.C., Fox J.G., Otto G.M., Pritchett-Corning K.R., Whary M.T. Medicina de animales de laboratorio. Elsevier,
1050 2015. 3ª edición.
- 1051 39. Serfilippi L.M., Pallman D.R., Russell B. Valores de referencia de la química clínica y la hematología del suero en pobla-
1052 ciones de ratones albinos de tres proveedores de uso común y en dos cepas consanguíneas de ratones albinos. *Contemp*
1053 *Top Lab Anim Sci.* 2003 May;42(3):46-52.
- 1054 40. Fernández I., Peña A., Del Teso N., Pérez V., Rodríguez-Cuesta J. Parámetros de bioquímica clínica en ratones C57BL/6J
1055 tras la extracción de sangre de la vena submandibular y del plexo retroorbital. *J Am Assoc Lab Anim Sci.* 2010
1056 Mar;49(2):202-6.
- 1057 41. Mazzaccara C., Labruna G., Cito G., Scarfò M., De Felice M., Pastore L., et al. Intervalos de referencia relacionados con la
1058 edad de los principales parámetros bioquímicos y hematológicos en las cepas de ratón C57BL/6J, 129SV/EV y C3H/HeJ.
1059 *PLoS One.* 2008;3(11):e3772.
- 1060 42. Opal S.M., DePalo V.A. Citoquinas antiinflamatorias. *Chest.* (2000);117(4).
- 1061 43. Parsons A.M., Ciombor D.M., Liu P.Y., Darling E.M. Regenerative Potential and Inflammation-Induced Secretion Profile of
1062 Human Adipose-Derived Stromal Vascular Cells Are Influenced by Donor Variability and Prior Breast Cancer Diagnosis.
1063 *Stem Cell Rev Rep.* (2018) Aug;14(4):546-557.
- 1064 44. Cataldi C., Mari N.L., Lozovoy M.A.B., Martins L.M.M., Reiche E.M.V., Maes M. et al. Perfiles de citoquinas proinflama-
1065 torias y antiinflamatorias en la psoriasis: uso como biomarcadores de laboratorio y predictores de la enfermedad. *Inflamm*
1066 *Res.* 2019 Jul;68(7):557-567.
- 1067 45. Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P., Skoutelis A. Perfil de citoquinas pro- versus anti-inflamatorias en pacientes con
1068 sepsis grave: un marcador para el pronóstico y las futuras opciones terapéuticas. *J Infect Dis.* 2000 Jan;181(1):176-80.
- 1069 46. Miranda T.S., Heluy S.L., Cruz D.F., Da Silva H.D.P., Feres M., Figueiredo L.C., et al. Las proporciones de citoquinas
1070 proinflamatorias y antiinflamatorias en el suero de pacientes con periodontitis crónica con y sin diabetes tipo 2 y/o hábito
1071 de fumar. *Clin Oral Investig.* 2019 Feb;23(2):641-650.
- 1072 47. Kilic T., Ural D., Ural E., et al. Relación entre los ratios de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias y el pronóstico a
1073 largo plazo en pacientes con síndrome coronario agudo sin elevación del ST. *Heart.* 2006;92(8):1041-1046.
- 1074 48. Beer L., Zimmermann M., Mitterbauer A., et al. Análisis del secretoma de las células mononucleares de sangre periférica
1075 apoptóticas: Impacto de las proteínas liberadas y los exosomas para la regeneración de tejidos. *Sci Rep.* (2015);5.
- 1076 49. Bosshart H., Heinzelmann M. Las células THP-1 como modelo de monocitos humanos. *Ann Transl Med.* 2016
1077 Nov;4(21):438.
- 1078 50. Kany S., Vollrath J.T., Relja B. Citoquinas en la enfermedad inflamatoria. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 28;20(23):6008.
- 1079 51. Barnes P.J., Karin M. Nuclear factor-kappa β : a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J*
1080 *Med.* 1997 Abr 10;336(15):1066-71.
- 1081 52. Launay D., Dutoit-Lefevre V., Faure E., Robineau O., Hauspie C., Sobanski V., et al. Efecto de la anakinra in vitro e in vivo
1082 sobre la producción de citoquinas en el síndrome de Schnitzler. *PLoS One.* 2013;8(3):e59327.
- 1083 53. Martínez F.O., Sica A., Mantovani A., Locati M. Activación y polarización de macrófagos. *Front Biosci* 2008;13:453-61.
- 1084 54. Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., et al. La inmunosupresión mediada por células madre mesen-
1085 quimales se produce a través de la acción concertada de quimioquinas y óxido nítrico. *Cell Stem Cell.* 2008 Feb
1086 7;2(2):141-50.
- 1087 55. Ballmer P.E., Ochsenbein A.F., Schütz-Hofmann S. La tasa de escape transcápilar de albúmina se correlaciona positiva-
1088 mente con la concentración de albúmina en plasma en la enfermedad inflamatoria aguda pero no en la crónica. *Metabo-*
1089 *lism.* 1994 Jun;43(6):697-705.
- 1090 56. Clemmons D.R. Implicación del factor de crecimiento similar a la insulina-I en el control de la homeostasis de la glucosa.
1091 *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Dec;6(6):620-5.
- 1092 57. Gaffin S.L., Badsha N., Vorster B.J. Propiedades de la gammaglobulina anti-lipopolisacárido humana: especificidad y
1093 efectos protectores. *Vox Sang.* 1985;48(5):276-83.
- 1094 58. Brew K., Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional
1095 diversity. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Jan;1803(1):55-71.

- 1096 59. Brew K., Dinakarpanian D., Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Bio-*
1097 *chim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.
- 1098 60. Fleischmann R.M., Tesser J., Schiff M.H., Schechtman J., Burmester G.R., Bennett R., et al. Seguridad del tratamiento pro-
1099 longado con anakinra en pacientes con artritis reumatoide. *Ann Rheum Dis*. 2006 Aug;65(8):1006-12.
- 1100 61. So A., De Smedt T., Revaz S., Tschopp J. A pilot study of IL-1 inhibition by anakinra in acute gout. *Arthritis Res Ther*.
1101 2007;9(2):R28.
- 1102 62. Lichtenauer M., Mildner M., Hoetzenecker K., Zimmermann M., Podesser B.K., Sipos W., et al. El secretoma de las células
1103 apoptóticas de la sangre periférica (APOSEC) confiere citoprotección a los cardiomiocitos e inhibe la remodelación tisular
1104 tras un infarto agudo de miocardio: un estudio preclínico. *Basic Res Cardiol*. 2011 Nov;106(6):1283-97.
- 1105 63. Ankersmit H.J., Hoetzenecker K., Dietl W., Soleiman A., Horvat R., Wolfsberger M., et al. Las células mononucleares de
1106 sangre periférica apoptóticas cultivadas con radiación regeneran el miocardio infartado. *Eur J Clin Invest*. 2009
1107 Jun;39(6):445-56.
1108