

ESTUDIO DE VESÍCULAS EXTRACELULARES PROVENIENTES
DE CÉLULAS MESENQUIMALES EQUINAS PARA SU
IMPLEMENTACIÓN EN TERAPIAS REGENERATIVAS

Tesis de Licenciatura

para optar por el título de

LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

de la

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN MARTÍN

Presentación por

Mercedes Florencia Vautier

Dirección: Dra. Carolina Blüguermann

Co-dirección: Dr. Adrián Mutto

Lugar de trabajo: Laboratorio de Biotecnologías Aplicadas a la Reproducción y
Mejoramiento Genético Animal. Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB). San
Martín, Buenos Aires.

Fecha de Presentación: 16.03.2023

RESUMEN

Las lesiones musculoesqueléticas son el tipo de lesión más frecuente que sufren los animales de competencia. Debido a la naturaleza crónica y degenerativa de las lesiones, en la mayoría de los casos no logran volver a competir. Dentro de las alternativas terapéuticas más novedosas se encuentra el uso de células madre mesenquimales. Estas células son multipotentes y de fácil obtención a partir de diversos tejidos adultos. Aunque originalmente se consideró que su potencial terapéutico residía en su capacidad de reemplazar las células muertas o dañadas, y de esta manera restaurar el tejido, actualmente se ha demostrado que su efecto terapéutico ocurre como resultado de un efecto parácrino que ejercen en su entorno. El mismo consiste en la liberación de diversas moléculas contenidas en pequeñas vesículas extracelulares, como los exosomas y las microvesículas. Los avances presentes hasta el momento han demostrado el potencial terapéutico de estas vesículas en diversas patologías en distintos modelos animales, pero dentro de la medicina veterinaria aún no existen trabajos que reporten protocolos estandarizados de purificación y dosis de administración específicas. Una terapia libre de células basada en la aplicación de vesículas extracelulares presentaría importantes ventajas desde el punto de vista de la logística de transporte y almacenamiento de las muestras, entre otros aspectos. Nuestro laboratorio cuenta con un servicio de derivación y banco de células mesenquimales equinas para su aplicación en terapias regenerativas, por lo que nos resultó relevante evaluar un potencial abordaje que permita un mayor aprovechamiento de estas células y optimización del agente terapéutico. De esta manera, el presente trabajo plantea la hipótesis de que la presencia de vesículas extracelulares extraídas de células mesenquimales aumenta la capacidad proliferativa y regenerativa de fibroblastos equinos cultivados *in vitro*. Los resultados aquí presentados permiten confirmar que fue posible purificar vesículas extracelulares mediante un protocolo de sucesivas centrifugaciones. Las vesículas se caracterizaron respecto a sus tamaños, de entre 50 a 200 nm, y se detectaron según marcadores de superficie específicos como TSG-101 y Anexina II. Se observó también la transferencia de vesículas a fibroblastos en cultivo en dosis de 0,5, 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Además, fue posible medir en ensayos funcionales *in vitro* los efectos de su aplicación en una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se observó que la adición de vesículas extracelulares al medio de cultivo aumentaba la capacidad migratoria de las células y se evaluó de manera preliminar su efecto en la proliferación celular. Los resultados aquí presentados indican que vesículas extracelulares provenientes de células mesenquimales son capaces de ser incorporadas por fibroblastos equinos y tendrían un efecto beneficioso en la migración y proliferación celular.

ÍNDICE GENERAL

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	Relevancia clínica: salud equina en animales de alta competencia	3
1.1.1	Patología y tratamiento	3
1.2	El potencial terapéutico de la medicina regenerativa	4
1.2.1	Abordajes terapéuticos	5
1.3	El rol de las Células Madre Mesenquimales	8
1.3.1	Características y propiedades	8
1.3.2	Consideraciones durante la terapia celular	9
1.3.3	Mecanismo de acción y respuesta	10
1.4	Un nuevo paradigma <i>cell-free</i> : vesículas extracelulares	12
1.4.1	Clasificación	12
1.4.2	Antecedentes de trabajo	14
1.5	Antecedentes en nuestro laboratorio	15
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1	Hipótesis	17
2.2	Objetivo general	17
2.3	Objetivos específicos	17
3	MATERIALES Y MÉTODOS	19
3.1	Aislamiento y cultivo de Ad-MSC	19
3.2	Obtención de vesículas extracelulares	19
3.3	Microscopía electrónica	21
3.4	Cuantificación proteica	21
3.5	Western Blot	21
3.6	Transferencia de vesículas	22
3.7	Ensayo de migración celular	22
3.8	Procesamiento de imágenes	23
3.9	Capacidad proliferativa celular	26

Índice general

4	RESULTADOS	27
4.1	Derivación de Ad-MS2C	27
4.2	Microscopía Electrónica	28
4.3	Cuantificación proteica	31
4.4	Caracterización mediante Western Blot	32
4.5	Transferencia de vesículas	33
4.6	Ensayo de migración celular	36
4.7	Capacidad proliferativa celular	38
5	DISCUSIÓN	41

ABREVIATURAS

- Ad-MSC: células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo.
ACS: suero autólogo condicionado.
APS: solución proteica autóloga.
BCA: ácido bicinconínico.
BM-MSC: células madre mesenquimales derivadas de médula ósea.
Bregs: células B regulatorias.
BSA: sero-albúmina bovina.
CB: *cracking buffer*.
DC: células dendríticas.
DMEM: medio de cultivo *Dulbecco Minimum Essential Medium*.
ESC: células madre embrionarias.
ESCRT: complejo de sorting endosomal requerido para el transporte.
ILV: vesículas intraluminales.
IMC: índice de masa corporal.
iPSC: células madre pluripotentes inducidas.
ISCT: Sociedad Internacional de Terapia Celular.
ISEV: Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares.
MHC: complejo mayor de histocompatibilidad.
MSC: células madre mesenquimales.
MVB: cuerpos multivesiculares.
NTA: análisis de *tracking* de nanopartículas.
PBS: *phosphate-buffered saline*.
PEG: polietilenglicol.
PRP: plasma rico en plaquetas.
RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa y en tiempo real.
SFB: suero fetal bovino.
TEM: microscopía electrónica de transmisión.
Th_{1/2}: T-*helper* 1/2.
Tregs: células T regulatorias.
VE: vesículas extracelulares.

I INTRODUCCIÓN

I.1. RELEVANCIA CLÍNICA: SALUD EQUINA EN ANIMALES DE ALTA COMPETENCIA

Los caballos representan un enorme valor como animales deportivos y de compañía. En nuestro país, los deportes ecuestres, como el salto y el polo, cuentan con una gran popularidad y su práctica ha obtenido un prestigio altamente reconocido debido a la enorme cantidad de equinos criados localmente que se destacan en diferentes campeonatos internacionales cada año. Esto le ha permitido a la industria hípica nacional tener un valor agregado y un impacto económico significativo en el país. Según datos del Ministerio de Agricultura, Argentina es el tercer productor mundial de caballos de carrera y el primer productor de caballos de polo, lo que refleja la calidad y el prestigio de los equinos nacionales [1].

La salud equina es una de las principales preocupaciones para la industria, ya que el costo por lesiones y enfermedades en animales deportivos en todo el mundo alcanza los miles de millones de dólares cada año. Los tipos y la ubicación anatómica de las lesiones varían entre disciplinas deportivas, niveles de competición y edad, pero en todos los casos las lesiones articulares y musculoesqueléticas son de las más frecuentes [2]. Por ejemplo, en el polo, estudios revelaron que las lesiones más frecuentes son las de tendón (76.5 %; CI 67.3–85.8), cojera (8.6 %; CI 2.5–14.8) o dolores de menudillo (3.7 %; CI 0.0–7.8), entre otras [3]. Éstas pueden ocurrir como resultado de un trauma, como una caída o un accidente, o pueden ser causadas por un desgaste excesivo durante el entrenamiento y competencia de los animales. Además, también priman otro tipo de condiciones como la osteoartritis, tendinitis, enfermedades articulatorias y distintos tipos de fracturas [4].

I.1.1. PATOLOGÍA Y TRATAMIENTO

Las enfermedades y lesiones musculoesqueléticas están generalmente asociadas con síntomas dolorosos que pueden ser leves y requerir un tiempo de recuperación relativamente corto, o pueden ser graves y requerir un tratamiento específico y prolongado [5]. La inflamación, por ejemplo, es uno de los factores identificados que influyen en el balance entre regeneración, fibrosis local o fibrosis diseminada, siendo esta última la que finaliza en patologías prolonga-

das debido a la mala cicatrización, lo cual limita la regeneración [6]. En particular, las lesiones en tendones y ligamentos son las de mayor relevancia clínica en la mayoría de las disciplinas deportivas, principalmente por su pobre capacidad de cicatrización y la consecuente tendencia a desarrollar trastornos crónicos o de naturaleza degenerativa [2]. Esto implica que, en una gran cantidad de casos, los animales no pueden volver a entrenar ni competir o deben esperar largos períodos de tiempo para hacerlo. Incluso, en los casos más graves, puede resultar necesario acudir a la eutanasia [7]. Numerosas investigaciones han demostrado que los problemas ortopédicos son el principal motivo de pérdida de capacidad de entrenamiento y muerte en caballos atléticos [8–11], siendo responsables de más del 70 % de los días perdidos de entrenamiento tanto en caballos de salto como de carrera [12].

Las terapias disponibles actualmente para que el animal vuelva a entrenar luego de una lesión se limitan, en general, a la terapia kinesiológica después de una correcta hidratación, hielo y vendaje [4], y en algunos casos se emplean anti-inflamatorios no esteroideos. Sin embargo, estas opciones terapéuticas brindan soluciones a corto plazo, en donde el tejido reparado no tiene las mismas características de elasticidad y fuerza que el tejido original, y por ende concluyen en una elevada tasa de recurrencia de las lesiones. De hecho, la cicatrización parcial de la lesión finaliza generalmente en una fibrosis difícil de tratar, debido a una sobre-acumulación de componentes de la matriz extracelular [13]. Es por esto que en la medicina veterinaria existe una búsqueda activa por alternativas terapéuticas que le permitan al animal regenerar el tejido dañado, reducir el tiempo de recuperación y mejorar su calidad de vida en general.

1.2. EL POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LA MEDICINA REGENERATIVA

La medicina regenerativa es una disciplina que emerge a partir de la medicina traslacional para suplir los mecanismos naturales de reparación del organismo. Es decir, busca establecer intervenciones terapéuticas que faciliten la restauración de un órgano o tejido para el cual los mecanismos endógenos de reparación pueden no ser suficientes, ya sea por falta de células progenitoras en organismos de edad avanzada, o debido a la baja capacidad regenerativa intrínseca de algunos tejidos [14]. De esta manera, la medicina regenerativa tiene como objetivo reestablecer la funcionalidad de tejidos u órganos que han sufrido un daño por enfermedad o injuria o simplemente por desgaste acorde con la edad del individuo [12].

Las diversas aplicaciones de este campo han permitido el desarrollo de nuevas tecnologías que utilizan métodos biológicos para promover la auto-reparación, causando un impacto directo en el desarrollo de la biotecnología. Es así que actualmente se incluyen técnicas como la ingeniería de tejidos, el uso de células madre, factores de crecimiento, entre otras [15]. Muchas

de estas terapias todavía se encuentran en desarrollo o evaluación debido a que aún es necesario validar su seguridad y eficacia, sumado a la necesidad de contar con un marco regulatorio correspondiente. Aún así, la medicina regenerativa se plantea como una alternativa potencialmente superadora a las metodologías actuales que, en la mayoría de los casos, no resultan satisfactorias.

1.2.1. ABORDAJES TERAPÉUTICOS

Existe una amplia variedad de terapias contempladas dentro de la regeneración de tejidos, tanto para la salud humana como para la salud animal, que en general se pueden clasificar en terapias celulares y terapias libres de células. Entre las terapias celulares se encuentran aquellas que utilizan células vivas como elemento terapéutico, ya sea mediante el uso de células madre o mediante la obtención y el cultivo de células específicas para su posterior implantación en el organismo [16]. En esta clase de terapia, uno de los enfoques más populares y efectivos es el plasma rico en plaquetas (PRP), una solución de plasma sanguíneo que contiene una concentración relativamente alta de plaquetas, células que tienen un papel importante en la coagulación de la sangre y en la recuperación de tejidos dañados debido a su alto contenido de factores de crecimiento [17]. Por otro lado, las terapias libres de células se basan en el uso de factores de crecimiento, biomateriales o dispositivos que favorecen la regeneración de tejidos sin necesidad de aportar células externas [18]. Por ejemplo, el suero autólogo condicionado (ACS) y la solución proteica autóloga (APS) son dos propuestas muy similares al PRP pero libres de componentes celulares. Para estas terapias, la muestra de sangre del paciente se somete a un proceso de purificación y concentración de proteínas y factores de crecimiento contenidas en las plaquetas, de manera que no existe una aplicación directa de estas células [19,20]. Otro ejemplo es la combinación de biomateriales con células autólogas o alógenas. En este sentido, los parches dérmicos son los más empleados ya que incluso existen versiones comerciales *off-the-shelf* para ser implantadas. Este tipo de tecnología puede actuar de dos maneras: 1) aportando simplemente un biomaterial que impida la cicatrización incorrecta y, por lo tanto, dé tiempo al tejido a que se regenere adecuadamente; o 2) aportando el biomaterial junto con células capaces de repoblar la región dañada [21].

En general, cada una de estas terapias se enfoca en distintos aspectos del proceso de reparación del tejido a tratar, y su elección depende de muchos factores, como la localización y la extensión de la lesión, el tipo de tejido dañado, el estado general del paciente y las características de la terapia en cuestión. Todas las opciones terapéuticas pueden utilizarse simultáneamente para un mismo tratamiento o en combinación con otras (incluso aunque no estén contempladas dentro de la medicina regenerativa) para mejorar los resultados y acelerar el proceso de recuperación.

CÉLULAS MADRE

Las células madre se caracterizan en general por su capacidad de autorenovación y diferenciación a distintos tipos celulares tanto *in vitro* como *in vivo* [22]. Estas células son las responsables del desarrollo y regeneración de los órganos y tejidos de un individuo. Debido a sus características, se han convertido en una herramienta fundamental dentro de la medicina regenerativa. En los últimos años, su estudio y aplicación ha crecido enormemente debido a su acción terapéutica comprobada en diferentes patologías, desde daños tisulares hasta enfermedades degenerativas o desórdenes inmunitarios [23].

Existen múltiples tipos de células madre según sus niveles de potencia y la fuente a partir de la cual se obtienen. Las más conocidas son las células madre embrionarias (ESC, por su sigla en inglés), las células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por su sigla en inglés) y las células madre mesenquimales (MSC, por su sigla en inglés), representadas en la Figura 1. Las ESCs son células derivadas del macizo celular interno de un blastocisto preimplantatorio. Derivadas originalmente en la década del 80 a partir de embriones murinos, actualmente se han logrado derivar líneas de ESC de numerosas especies, incluyendo al humano, conejo, oveja, cerdo, caballo y bovinos [15]. Por el contrario, las iPSCs se generan *in vitro* a partir de la reprogramación de células somáticas mediante la sobreexpresión de factores de transcripción presentes durante el desarrollo embrionario temprano [24]. A diferencia de los tipos celulares descritos previamente, las MSC se clasifican como células madre adultas, ya que se derivan a partir de diferentes tejidos de un organismo adulto, como la piel, el tejido adiposo, la médula ósea, el cerebro, el corazón, los vasos sanguíneos, el músculo esquelético, el intestino, el hígado, los riñones o los órganos reproductivos [25]. La función fisiológica de estas células en el organismo es la de mantener la homeostasis tisular, favorecer la recuperación del tejido en caso de daño, entre otras [26].

Las ESCs y las iPSCs se clasifican como células pluripotentes, lo que significa que pueden originar derivados de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las MSC, por otro lado, se clasifican como células multipotentes y por lo tanto presentan un potencial de diferenciación más restringido, pudiendo diferenciarse únicamente a tipos celulares derivados del mesodermo [27].

El potencial de diferenciación que presentan los distintos tipos de células madre es el motivo por el cual se convirtieron en una novedosa alternativa terapéutica. Originalmente se planteó su uso en terapias de reemplazo celular, es decir, se consideraba que al inyectar las células madre en un sitio dañado, debido a su potencial, éstas se diferenciarían a las células perdidas producto de la lesión, reemplazando así el tejido dañado [22]. Sin embargo, luego se demostró que la exposición de estas células a un ambiente patológico no necesariamente permitía que reciban las señales adecuadas para llevar a cabo un proceso de diferenciación al tipo celular de interés. Las MSC, particularmente, demostraban tener un efecto beneficioso y regenerativo en los sitios

tratados [28] y, por lo tanto, surgieron otras hipótesis acerca de sus beneficios terapéuticos. Se comenzó a considerar que estas células podían cumplir un rol inmunomodulador en el ambiente inflamatorio de la herida, o que podían influenciar la migración y activación de células propias del individuo [29].

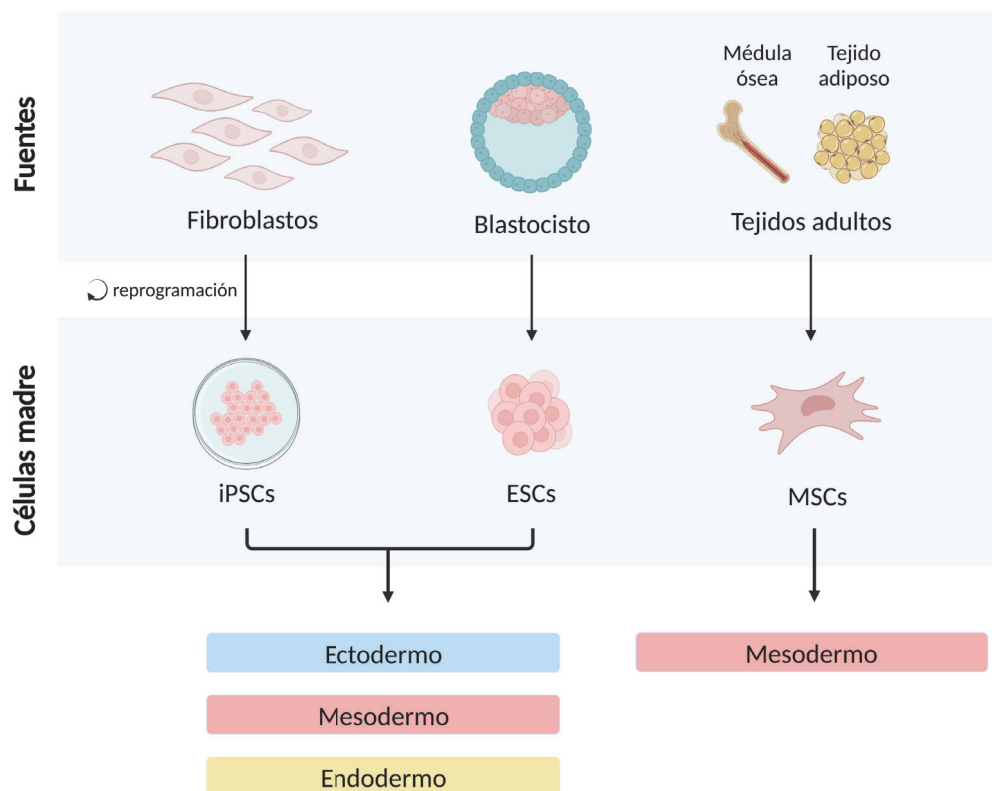


Figura 1: Distintos tipos de células madre según la fuente a partir de la cual se obtienen, y detalle de los linajes celulares a los cuales pueden diferenciarse.

Existen además otros factores a considerar en la elección del tipo celular a emplear en una terapia. El uso de ESCs, por ejemplo, aún presenta limitaciones debido al acceso limitado a los embriones, las consideraciones bioéticas (dependiendo de la especie a tratar) y el alto riesgo que implica su potencial teratogénico [30]. Las iPSCs, en cambio, cuentan con la ventaja de tener mayor accesibilidad y menores restricciones éticas al no requerir embriones para su derivación [15]. Sin embargo, al igual que las ESC, presentan potencial teratogénico y, además, existen trabajos que han demostrado que a medida que se expanden *in vitro*, su estabilidad genética puede disminuir [31]. Actualmente la alternativa más ampliamente utilizada involucra el uso de MSC. Al presentar un potencial de diferenciación más restringido, no acarrea riesgos teratogénicos para el individuo, y su obtención a partir de diversos tejidos adultos les confiere una aplicabilidad con protocolos mucho más simples y seguros.

1.3. EL ROL DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

1.3.1. CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES

Las MSC fueron descritas por primera vez en 1970 como una población morfológicamente similar a los fibroblastos y con capacidad de adherencia al plástico. Los investigadores aislaron estas células a partir de médula ósea (denominándolas BM-MSc) y descubrieron que podían diferenciarse luego en osteocitos. Además, observaron que las MSC podían secretar factores de crecimiento hematopoyéticos y distintos tipos de citoquinas [32]. Más tarde, se descubrió que las MSC podían ser aisladas de otros tejidos adultos, como el cordón umbilical y la placenta. Luego se demostró que con la correcta estimulación, estas células podían diferenciarse en varios tipos celulares además de los osteocitos, como los adipocitos y los condrocitos [33].

En la actualidad, las MSC se encuentran altamente caracterizadas en numerosas especies. En 2006, el Comité de Células Madre Mesenquimales y Tisulares de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT, por su sigla en inglés) publicó criterios mínimos para la identificación de una célula como MSC [34]. El ISCT recomienda que las MSC, para ser clasificadas como tales, deben demostrar potencial de diferenciación en osteoblastos, adipocitos y condrocitos *in vitro*, ser adherentes al plástico y tener capacidad de formar colonias. Además, más del 95 % de la población celular debe expresar constitutivamente los marcadores de superficie CD73, CD90 y CD105, bajo determinación mediante citometría de flujo, y menos del 2 % debe expresar el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase IIa, marcadores de células B como CD79 o CD19, y marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34 o CD11b [35]. Cabe destacar, sin embargo, que actualmente no se ha reportado ningún marcador de superficie único capaz de identificar células *in vitro* e *in vivo* que cumplan con los criterios mínimos de MSC provenientes de diversas fuentes tisulares. Se han informado una serie de marcadores candidatos posiblemente relacionados con la naturaleza multipotente de las MSC *in vitro*, como Stro-1, SSEA-4, CD271 y CD146, pero aún no se han establecido concluyentemente debido a las grandes diferencias en su expresión en células de diversas fuentes, probablemente debido a la influencia de diferentes factores durante el cultivo [36, 37].

Las MSC se encuentran presentes en diversos tejidos adultos, por lo que pueden ser aisladas y cultivadas *in vitro* con relativa facilidad. Sin embargo, en la mayoría de los casos se requiere de una intervención quirúrgica para la obtención del tejido a utilizar [38]. Además, las MSC aisladas de diferentes tejidos muestran ciertas diferencias en su capacidad de amplificación *in vitro* o potencial de diferenciación, lo que influye en su posterior aplicabilidad [39, 40]. Por lo tanto, la selección de una fuente de células adecuada para su uso clínico debe considerar cuestiones logísticas, prácticas y funcionales [41]. Si bien las células derivadas de médula ósea presentan buenas cualidades en términos de capacidad replicativa y potencial de diferenciación, su obtención requiere prácticas no solamente invasivas sino con un alto riesgo asociado [42].

Particularmente en equinos, la obtención de médula suele realizarse a partir de una punción del esternón, práctica que resulta muy riesgosa debido a su cercanía con la cavidad pericárdica. Es por esto que el tejido adiposo resulta una de las fuentes más convenientes actualmente para la obtención de MSC (en este caso denominadas Ad-MS, por su sigla en inglés) debido a su fácil obtención y abundancia [43]. Sumado a esto, diferentes trabajos han demostrado que las Ad-MS alcanzan la senescencia más tarde [25, 44] y tienen una mayor capacidad de proliferación y migración [45, 46] en comparación con las BM-MS. Las Ad-MS también han demostrado ser más activas en la producción autócrina de algunos factores de crecimiento e inmunomoduladores a igual número de células que las BM-MS [47, 48].

1.3.2. CONSIDERACIONES DURANTE LA TERAPIA CELULAR

Las MSC en terapia celular pueden ser aplicadas de manera sistémica o localizada según el tipo de tejido u órgano a tratar. En particular, el tratamiento para lesiones musculoesqueléticas generalmente implica la administración de células mediante una inyección local en el sitio dañado. Además, las células empleadas pueden o no haber tenido pasos de expansión *in vitro*. Esto dependerá de la cantidad de células necesarias para un tratamiento, lo cual a su vez dependerá de la patología a tratar y el modo de administración. Por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades de la sangre como la leucemia, donde se emplean MSC derivadas de cordón umbilical, la dosis se calcula como millones de células por kilogramo del paciente, por lo que el número de células obtenidas a partir de la extracción puede no ser suficiente para el tratamiento [49]. La expansión *in vitro* permite obtener una población celular más grande y homogénea [36], pero puede resultar costosa y requiere numerosos controles de calidad para determinar que el proceso es seguro. Otro factor a tener en cuenta es que la utilidad terapéutica de las MSC puede ser mediante tratamientos autólogos o alogénicos. La terapia autóloga implica que las células empleadas en el tratamiento fueron derivadas del propio paciente. En la mayoría de las ocasiones esto no resulta conveniente debido a que los pasos de expansión *in vitro* pueden llevar varios días o semanas y, dependiendo de la patología, puede ser necesario contar con células listas para ser utilizadas en el momento agudo de la lesión. Por ejemplo, su aplicación en el tratamiento de accidentes cerebrovasculares ha demostrado mayor eficacia cuando se trata en el momento agudo de la lesión [50], por lo que no sería posible un tratamiento autólogo en estos casos. Por ello, el uso alogénico de MSC resulta una mejor alternativa. Este tipo celular posee una baja inmunogenicidad [51], por lo que sería posible realizar un trasplante celular entre dos organismos distintos de una misma especie. Sin embargo, varios informes han demostrado que las MSC alogénicas tienen la capacidad de inducir respuestas inmunes humoral y celular *in vivo*, especialmente en sitios de inflamación, y por lo tanto no son completamente inmunológicamente privilegiadas [52–54]. De todas formas, se ha demostrado que el enfoque es seguro y tan efectivo como la terapia autóloga [55]. El alotrasplante es muy útil especialmente en organis-

mos de edad avanzada y/o en pacientes con comorbilidades, donde las MSC autólogas pueden tener un potencial regenerativo y terapéutico reducido [56,57]. Además, este abordaje permite armar un banco de células de manera preventiva y contar, de esta manera, con dosis listas para ser empleadas cuando sea necesario.

Existen numerosos factores intrínsecos a cada individuo que influyen directamente en la funcionalidad de las MSC, incluyendo la edad, el sexo, el índice de masa corporal (IMC), el origen del tejido adiposo, o el estado de comorbilidad del donante. La capacidad de auto-renovación de las células madre parece disminuir con la edad [58]. Este fenómeno está asociado con la disminución de la expresión de genes responsables del mantenimiento de la integridad genómica y del remodelado del cromatina, lo que conlleva una función atenuada y riesgo de transformaciones neoplásicas [59]. Además, se ha demostrado que la edad afecta negativamente el potencial osteogénico y mejora el potencial adipogénico de las MSC [60], lo que sugiere una expresión diferencial de factores de crecimiento durante la senescencia celular. Se sabe que las MSC provenientes de individuos de edad avanzada expresan niveles más altos de citoquinas proinflamatorias, lo que afecta su capacidad para responder a lesiones [61]. También se ha demostrado que el origen a partir del cual se obtiene el tejido adiposo del cual se derivan las MSC puede afectar el perfil expresión génica y la capacidad de diferenciación de las MSC [62]. Por último, las condiciones de aislamiento y de cultivo de las células pueden afectar la tasa de proliferación, la diferenciación y la función parácrina de las MSC [63–65], por lo que resulta fundamental tener en consideración todos estos factores para lograr la mayor eficiencia y eficacia en terapias regenerativas basadas en el uso de MSC.

1.3.3. MECANISMO DE ACCIÓN Y RESPUESTA

La función fisiológica de las MSC es mantener la homeostasis tisular. Esto es válido no solo para los tejidos en los cuales residen estas células, sino también para tejidos lejanos, en donde ante una situación de injuria las células se dirigen hasta este sitio para colaborar con la respuesta regenerativa [66–68]. Básicamente, la liberación de señales quimiotácticas tras el daño tisular provoca que las MSC migren [69], ingresen al sistema vascular y se desplacen sobre la superficie endotelial apical. El endotelio comienza a expresar localmente ligandos que permiten la extravasación de las células, las cuales extienden filopodios para poder atravesar el espacio intraluminal [70], y la migración finaliza cuando las MSC han alcanzado el tejido blanco, donde actuarán restaurando la funcionalidad del mismo [67]. Esta capacidad de migrar y actuar en diferentes tipos de lesiones fue lo que motivó las investigaciones y su aplicación en terapias regenerativas.

Aunque se ha demostrado que las terapias celulares basadas en MSC presentan efectos positivos en diversos modelos de enfermedades, también se descubrió que estas células cuentan con una baja capacidad de injertarse en cantidades significativas o por períodos de tiempo sufi-

cientos como para explicar los resultados en términos de reemplazo del tejido. En este sentido, se ha planteado la posibilidad de que los efectos beneficiosos de las MSC pueden ser mediados por mecanismos distintos a la diferenciación celular y la sustitución de células dañadas o perdidas [28]. Luego se comprobó que el principal efecto beneficioso de las MSC es su capacidad de promover la viabilidad y la proliferación celular a través de señales parácrinas e interacciones entre las células. Esta respuesta mediada por las MSC está condicionada por las señales que estas células reciben de su microambiente circundante, como las citoquinas inflamatorias [71] o los factores de hipoxia [72].

Las MSC son capaces de regular el sistema inmune de manera de reducir la inflamación en el lugar de la lesión o enfermedad luego de recibir un estímulo adecuado. Dentro de los efectos fisiológicos que generan, se destaca su perfil antiinflamatorio/inmunoregulador (tipo 2). Básicamente, ocurre un aumento en la proporción de linfocitos T helper 2 (Th2) por sobre la de linfocitos T helper 1 (Th1), lo cual conlleva un nuevo perfil de citoquinas antiinflamatorias [73]. También se suprime la actividad y proliferación de células T y B y se estimulan las Tregs y Bregs, las cuales tienen propiedades inmunosupresoras que proporcionan tolerancia inmunológica [74–76]. Asimismo, se suprime la migración y maduración de las células dendríticas (DC), diferenciándolas a DC tolerogénicas [77], y se promueve la polarización de monocitos a macrófagos tipo 2 [78]. Finalmente, en cuanto a las células *Natural Killer*, las MSC también presentan una alta capacidad inhibitoria de la proliferación de este tipo celular [79]. Estos cambios se producen a través de una sinergia de mecanismos dependientes del contacto celular y de factores solubles.

En general, se cree que el perfil inmunogénico que caracteriza a las MSC les confiere un perfil seguro para su uso en terapias de trasplante [80]. A pesar de esto, y como se mencionó con anterioridad, existen trabajos que establecen que estas células no son inmunológicamente privilegiadas, sino que solamente tienen un menor potencial inmunogénico en comparación con otros tipos de células alogénicas [52]. Muchos de los efectos inmunológicos anteriormente descriptos fueron estudiados utilizando sobrenadantes derivados de células inmunitarias estimuladas con MSC, por lo cual se destaca un rol importante de los factores solubles en la inmunomodulación mediada por MSC [81].

A partir de estudios en animales de infarto de miocardio [82] y lesiones pulmonares [83], los cuales demostraron que el medio de cultivo condicionado por MSC producía efectos terapéuticos similares al del uso de las células mesenquimales, fue impulsada la idea de que sería el secretoma de las MSC el que cumpliría un rol esencial en promover la regeneración de un tejido dañado. El uso potencial del secretoma, que incluye pequeñas moléculas como factores de crecimiento, citoquinas, quimioquinas y la liberación de vesículas extracelulares (VE), permitiría contar con una alternativa más segura que el uso de las MSC. A diferencia del uso de células vivas, este abordaje tendría un menor efecto inmunogénico debido a una menor expresión de

proteínas transmembrana, como los complejos MHC. Además, permitiría una mayor practicidad en el manejo de las muestras en cuanto a su transporte y almacenamiento. Todas estas consideraciones permiten establecer un nuevo paradigma terapéutico libre de componentes celulares [84, 85].

1.4. UN NUEVO PARADIGMA *CELL-FREE*: VESÍCULAS EXTRACELULARES

Gran parte de los efectos parácrinos descritos para las MSC dependen de una amplia variedad de moléculas que se encuentran contenidas en pequeñas VE. La carga contenida en estas vesículas es variable e incluye proteínas, ARNm, miARN y muchas otras moléculas capaces de participar en distintas vías de señalización celular [86].

1.4.1. CLASIFICACIÓN

Las VE son una familia heterogénea de vesículas de membrana que se secretan al espacio extracelular en la gran mayoría de las células. Aunque cuentan con una apariencia similar, rangos de tamaños que se solapan entre sí y marcadores de superficie en común, es posible clasificarlas según su biogénesis en tres principales categorías: cuerpos apoptóticos, microvesículas y exosomas (Figura 2). Como se mencionó previamente, estas vesículas pueden transportar distintas moléculas, entre las que se incluyen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, y su contenido puede variar ampliamente según el tipo celular y las condiciones en que se encuentren las células. Como resultado, su composición general determinará su función posterior en el microentorno celular [87].

Los cuerpos apoptóticos son estructuras que se generan a partir de una célula apoptótica. Pueden tener entre 50 nm y 5 μ m de diámetro, y están compuestos por fragmentos de la membrana plasmática y otros contenidos intracelulares liberados durante la muerte celular programada, como enzimas y ácidos nucleicos [88]. Son las primeras vesículas conocidas dentro de esta familia pero, en general, no representan una población mayoritaria dentro de las vesículas circulantes [89].

Por otro lado, tanto los exosomas como las microvesículas son generadas por vías similares, relacionadas al tráfico intracelular. Las microvesículas presentan un tamaño de entre 50 a 500 nm principalmente, y se forman por el mecanismo de exocitosis a partir de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular [90]. Los exosomas, por otro lado, son vesículas más pequeñas que presentan un diámetro de entre 50 a 150 nm aproximadamente. Son producidos en el sistema endo-lisosomal mediante un proceso de invaginación de la membrana de un endosoma, por el cual se forman estructuras llamadas cuerpos multivesiculares (MVB). Estos compar-

timentos contienen múltiples vesículas intraluminales (ILV), los precursores de los exosomas, cada uno con distintas biomoléculas en su interior. La ubiquitina cumple un rol fundamental en la selección de esas moléculas. Esta es una proteína que normalmente actúa como señal para transportar proteínas de membrana y/o elementos celulares dañados a los lisosomas para su degradación, pero también funciona como molécula señal en la membrana del endosoma para clasificar la carga exosomal [91]. Los MVB luego pueden fusionarse con lisosomas para degradar su contenido, o fusionarse con la membrana plasmática para secretar sus ILV en forma de exosomas al medio extracelular [92]. La comunicación entre células mediada por VE depende de la incorporación de éstas por parte de una célula vecina a través de diferentes mecanismos [87]. Pueden ser internalizadas por endocitosis mediada por caveolas o *lipid rafts*, por macropinocitosis o por fagocitosis mediado o no por proteínas como la clatrina, y así vuelven a ser incorporadas a endosomas. También pueden fusionar su membrana directamente con la membrana plasmática, liberando así su material intraluminal en el citosol [90, 93].

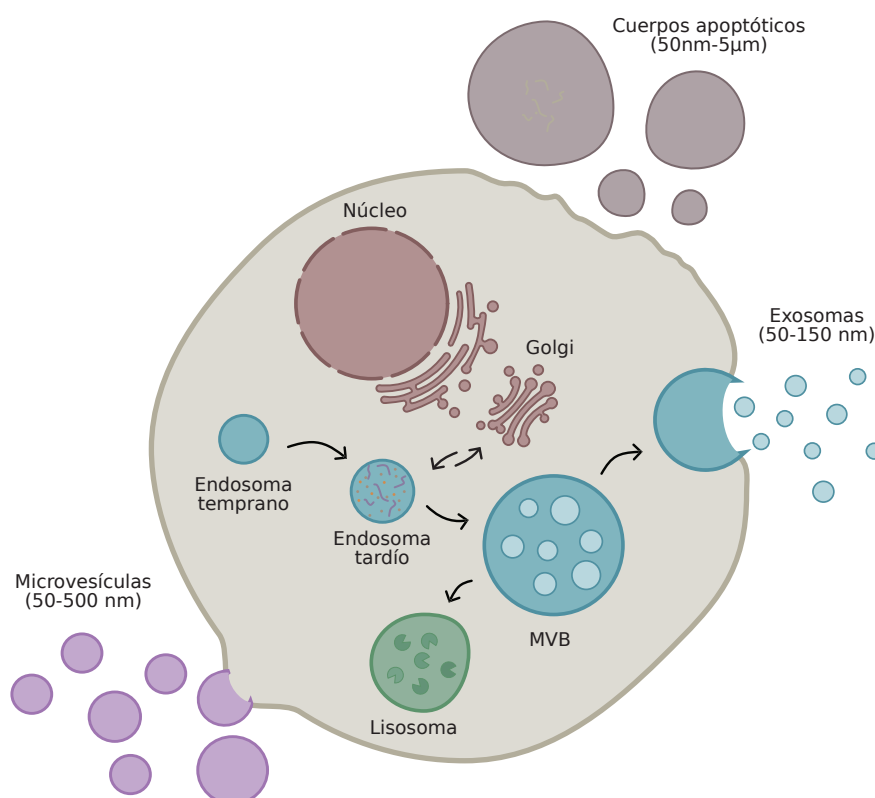


Figura 2: Biogénesis de vesículas extracelulares dentro de una célula. Los exosomas se originan a partir de MVB. A su vez, los MVB son generados por la maduración de endosomas e invaginación de sus membranas, donde se forman ILV. El MVB puede seguir un camino secretorio, fusionándose con la membrana plasmática y liberando las ILV en forma de exosomas, o puede seguir un camino degradativo fusionándose con lisosomas. Las microvesículas son generadas a partir de un mecanismo de exocitosis, en el cual se forman brotes a partir de la membrana plasmática hacia el espacio extracelular. Los cuerpos apoptóticos son generados durante la muerte celular programada.

1.4.2. ANTECEDENTES DE TRABAJO

El empleo de vesículas extracelulares todavía es un campo emergente dentro de la medicina regenerativa. No existen protocolos establecidos para su obtención e identificación, ni existe un consenso acerca de la manera más eficiente de trabajar con estas vesículas de manera *in vitro* e *in vivo*. Por lo tanto, existe un gran abanico de posibilidades y herramientas para su manipulación y posterior administración.

OBTENCIÓN

Las VE se pueden obtener a partir del medio de cultivo condicionado por las células cultivadas *in vitro* o a partir de muestras complejas de un organismo como la orina, el plasma sanguíneo u otros fluidos. Aunque existen alternativas en estudio para poder conservar mejor las propiedades biofísicas de estas partículas [94], el protocolo estándar de obtención de las VE involucra sucesivas centrifugaciones [95]. Sin embargo, la obtención de los distintos subtipos de VE por separado a partir de este método puede resultar dificultoso [96]. Si no se incluyen métodos específicos de purificación para separar una población exclusivamente exosomal o de microvesículas, por ejemplo el uso de gradientes de densidad, y si su origen subcelular no es debidamente demostrado, la Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV, por su sigla en inglés) recomienda que se emplee la nomenclatura de VE a la totalidad del contenido subcelular obtenido mediante los protocolos clásicos de purificación [97].

IDENTIFICACIÓN

Aunque la generación de los diferentes subtipos de VE ocurre en sitios distintos dentro de la célula, generalmente están involucrados mecanismos intracelulares y maquinarias de clasificación comunes en su biogénesis. En muchos casos, estos mecanismos compartidos dificultan la posibilidad de distinguir entre las diferentes subpoblaciones de vesículas. No se han identificado aún proteínas que puedan ser empleadas como marcadores inequívocos de una u otra población de vesículas, ni tampoco proteínas que cubran todo el espectro de VE.

Para determinar una población exosomal, por ejemplo, la mayoría de los trabajos emplean marcadores como ALIX o TSG-101. Estas son proteínas específicas asociadas con el complejo de *sorting* endosomal requerido para el transporte (ESCRT) [98], involucrado en la biogénesis de los exosomas. TSG-101, particularmente, es capaz de unirse a proteínas ubiquitinadas y las distribuye en las ILV de los MVB [91]. De todas formas, algunos trabajos han demostrado que el complejo ESCRT también podría estar relacionado con la generación de microvesículas [99], por lo que su detección no indicaría necesariamente la presencia exclusiva de exosomas. Sumado a esto, los exosomas también pueden ser generados por una vía independiente al complejo

ESCRT [90], motivo por el cual estas vesículas podrían no ser detectadas con estos marcadores aún estando presentes.

Por otro lado, varias proteínas de la familia de la Anexina suelen considerarse también marcadores de distintas VE por su rol en todo tipo de procesos relacionados con el sistema de membranas de la célula [100]. En particular, la Anexina II es una proteína involucrada en el tráfico intracelular y necesaria en el proceso de formación de MVB a partir de endosomas mediante la regulación mecánica de la membrana, sin tener una implicancia directa en la invaginación de la misma [101]. Se ha demostrado también que tiene un rol en la selección de microARNs dentro de las vesículas [102]. Nuevamente, este marcador pueda encontrarse tanto en exosomas como en microvesículas.

APLICACIONES

Numerosos grupos han confirmado la actividad terapéutica de las VE para tratamiento de infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y fibrosis hepática en modelos animales [103]. Otros estudios además han demostrado que, en heridas cutáneas, las VE logran activar la deposición de colágeno y elastina de los fibroblastos [104], y estimular la proliferación celular [105], la migración y la angiogénesis [106,107], promoviendo así la adecuada regeneración del epitelio. Además se observó que el uso de VE previno la formación de cicatrización aberrante [108]. Las VE derivadas de MSC también demostraron ser inmunológicamente activas, ya que pueden inducir la supresión de la respuesta inmune, la tolerancia inmunológica y la regulación de la inmunidad celular de maneras análogas a las anteriormente mencionadas para las MSC [109].

Sin embargo, un factor importante a considerar es que la determinación de las dosis de VE empleadas en los ensayos funcionales se encuentra explicitada en muy pocos trabajos. Aunque las estrategias de dosificación más comúnmente utilizadas son la concentración de proteínas totales o la cantidad de partículas mediante *Nanoparticle Tracking Analysis* (NTA), la mayoría de las publicaciones no especifica los valores obtenidos ni empleados en sus ensayos, lo que dificulta la reproducibilidad de los resultados. De hecho, un análisis acerca de los protocolos empleados en el estudio de VE ha reportado que un 50 % de los trabajos presentes realizaron la cuantificación de VE mediante cantidad total de proteína, un 18 % mediante NTA y un 21 % no reportaron que hayan cuantificado mediante ningún método [110]. De todas formas, los avances en todo tipo de situaciones terapéuticas indican que existe un claro efecto beneficioso mediante la aplicación de VE extraídas de MSC.

1.5. ANTECEDENTES EN NUESTRO LABORATORIO

Actualmente, nuestro laboratorio cuenta con un servicio de derivación y banco de MSC de equinos, caninos y felinos que son empleadas en diversos tratamientos de patologías en estas

especies. Las células equinas han sido validadas en trabajos anteriores en cuanto a su capacidad multipotente y expresión de marcadores específicos [III]. Algunos de los resultados obtenidos con su aplicación contemplan el tratamiento de fracturas, lesiones de tendones y ligamentos y laminitis severa en esta especie [II2–II5].

Si bien el tratamiento con MSC ha demostrado ser efectivo en distintas patologías relacionadas al sistema musculo-esquelético, consideramos que contar con una terapia libre de componentes celulares permitiría no solo aumentar la eficiencia de la terapia, sino además simplificar los procedimientos de aplicación y logística de transporte de las muestras. De esta manera, en el presente trabajo de tesis nos propusimos la obtención, caracterización y validación del efecto regenerativo *in vitro* de VE obtenidas a partir de MSC equinas derivadas de tejido adiposo para su potencial aplicación en una terapia regenerativa *in vivo* en el futuro.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. HIPÓTESIS

La presencia de VE provenientes de MSC aumenta la capacidad proliferativa y regenerativa de fibroblastos equinos cultivados *in vitro*.

2.2. OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar VE obtenidas a partir de Ad-MSC y evaluar su efecto sobre la proliferación y migración de fibroblastos equinos *in vitro*.

2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un protocolo de obtención de VE a partir de muestras de Ad-MSC.
2. Caracterizar las VE morfológicamente y bioquímicamente respecto a su tamaño y expresión de marcadores específicos de superficie.
3. Realizar ensayos funcionales *in vitro* empleando VE como suplemento en el medio de cultivo:
 - Evaluar la transferencia de las VE a fibroblastos equinos en cultivo.
 - Evaluar la capacidad de migración de fibroblastos en presencia y ausencia de VE en el medio de cultivo en ensayos de migración celular.
 - Evaluar la capacidad proliferativa de fibroblastos en presencia y ausencia de VE en el medio de cultivo.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE AD-MSC

Las células mesenquimales empleadas en esta tesis fueron derivadas a partir de tejido adiposo equino. Las muestras fueron gentilmente cedidas por la médica veterinaria Luciana Benedetti, quien fue la responsable de realizar las intervenciones quirúrgicas necesarias para su obtención. La muestra fue recolectada y transportada a temperatura ambiente en medio DMEM suplementado con antibióticos. Una vez en el laboratorio las muestras se pesaron y, dentro del flujo laminar, se lavaron con PBS. A continuación, se realizó la digestión mecánica empleando tijeras en un primer paso y luego dos hojas de bisturí. Luego, el tejido se incubó en una placa de Petri con la enzima colagenasa tipo I (1 mg/ml; Gibco) durante 40-60 minutos a 37°C, con intervalos de agitación cada 10 minutos. Finalmente, se inhibió la acción de la enzima mediante el agregado de medio DMEM F12 suplementado con SFB al 20 %, se trasvasó a un Falcon de 50 ml y se centrifugó 12 minutos a 1500 rpm. Se descartaron las dos fases superiores conteniendo los adipocitos flotantes, la enzima y el medio. Para lavar el tejido conectivo adherido sobre la fracción estromal-vascular depositada en la base del tubo y liberar una mayor cantidad de células, se lavó todo el pellet con PBS pasándolo al menos 6 veces por una pipeta serológica de 10 ml. Luego se lo pasó por un *cell strainer* de 100 µm y después por uno de 40 µm, evitando en lo posible colocar al tejido conectivo en el *strainer*. Por último, se centrifugó nuevamente a 1200 rpm por 5 minutos para recuperar las células, las cuales fueron cultivadas en 1 o 2 pocillos (dependiendo de la cantidad inicial de tejido adiposo) de una placa de 6 pocillos con 2 ml de medio completo (DMEM F12, 20 % SFB, PenStrep 100 unidades/ml, Aminoácidos No Esenciales 10 mM, L-Glutamina 2mM) por pocillo. Las mismas se mantuvieron en una incubadora gaseada a 37°C y 5 % CO₂. Se realizaron cambios de medio cada 48-72 horas. Las células fueron subcultivadas utilizando tripsina 0,25 % cada vez que alcanzaban 80 % de confluencia.

3.2. OBTENCIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES

Con el fin de seleccionar el mejor método para la obtención de VE a partir de sobrenadante de cultivo de MSC, se realizaron tres protocolos distintos de aislamiento. En todos los casos, las células fueron cultivadas hasta el pasaje 4-5 dependiendo de su viabilidad. Una vez alcanzado

el 70-90 % de confluencia en el pasaje final, se lavaron dos veces con PBS y se reemplazó el medio de cultivo completo por un medio de cultivo DMEM F12 en ausencia de SFB. Los tres protocolos empleados se describen a continuación.

■ PROTOCOLO A: FILTRACIÓN Y ULTRACENTRIFUGACIONES

En este protocolo, luego de cultivar las células 72 horas en un medio libre de suero o suplementado con 0,5 % de BSA, se colectó el medio condicionado y se realizó una centrifugación inicial a 2000 g por 20 minutos para retirar restos de *debris* celular. Luego, se realizó una segunda centrifugación a 10000 g por 30 minutos y al sobrenadante obtenido se lo filtró utilizando una membrana de 0,22 micrones (PES, 0,22 μm , Millipore). Posteriormente, se realizó una ultracentrifugación a 100.000 g por 90 minutos a 4°C. Por último, se retiró el sobrenadante de manera de dejar aproximadamente 1 cm de altura sobre el pellet, se lo resuspendió en PBS y se repitió la ultracentrifugación en iguales condiciones. El pellet obtenido finalmente se resuspendió en PBS, se alicuotó y se conservó a -20°C hasta su uso.

■ PROTOCOLO B: KIT DE EXTRACCIÓN

En este protocolo se empleó un kit de aislamiento de exosomas totales (Total Exosome Isolation, ThermoFisher, Nro. Cat. 4478359) siguiendo las especificaciones del fabricante. Brevemente, luego de cultivar las células 12 horas en un medio libre de suero, se colectó el medio condicionado, se centrifugó a 2000 g por 20 minutos para retirar el *debris* celular, y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. Allí se agregaron 0,5 volúmenes del reactivo de aislamiento de exosomas totales y se incubó overnight a 4°C. Luego se centrifugó a 10000 g por una hora a 4°C, se descartó el sobrenadante, y se resuspendió en PBS el pellet conteniendo a las VE. Por último se alicuotó en PBS y se conservó a -20°C hasta su uso.

■ PROTOCOLO C: ULTRACENTRIFUGACIONES

En este protocolo se recolectó el medio sin suero condicionado por las MSC por entre 48 a 72 horas (dependiendo del estado y viabilidad de las células). El medio fue centrifugado empleando el mismo esquema descrito en el primer protocolo (A) pero se omitió el paso intermedio de filtración. De igual manera, el pellet obtenido se resuspendió en 50-100 μl de PBS y se conservó a -20°C hasta su uso.

En todos los casos, posterior a la colecta del medio condicionado se determinó el número de células totales.

3.3. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Se analizaron alícuotas de 20 μl de cada uno de los tres protocolos por microscopía electrónica de transmisión (TEM). Esto se llevó a cabo en el Instituto de Biología Celular y Neurociencia “Prof. E. de Robertis” - UBA - CONICET utilizando un equipo Zeiss EM 109T. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído y tratadas con acetato de uranilo para contrastarlas.

3.4. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Para determinar la cantidad de proteína presente en las muestras de VE obtenidas, se evaluaron los métodos de Lowry, Bradford, ácido bicinónico (BCA), micro-BCA y Nanodrop. Finalmente se optó por el método de Bradford. Para este método realizamos una curva estándar de BSA de entre 4 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ y se realizaron diluciones al medio de las muestras a evaluar empleando PBS. El ensayo se realizó en placas de 96 pocillos, sembrando 10 μl por pocillo. Luego se agregaron 200 μl de reactivo de Bradford diluido al quinto en cada pocillo e inmediatamente se hicieron las lecturas de OD a 595 nm. La medición se hizo por triplicado para cada muestra.

3.5. WESTERN BLOT

Se realizaron ensayos de Western Blot para la detección de proteínas específicas presentes en las muestras de VE obtenidas. Se emplearon lisados celulares de MSC como control negativo (dilución 1/10). Se tomaron entre 5 y 7 μg de proteína total de las alícuotas de VE y se llevaron a un volumen final de entre 40 y 65 μl con *Cracking Buffer* (CB). Todas las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos. Se sembraron 10 μl del lisado y la totalidad de las muestras de VE en un gel de SDS-PAGE con 10 % de acrilamida en el gel separador y 5 % en el gel de *stacking*. Las condiciones de corrida fueron 90 minutos a voltaje constante (100V). Inmediatamente después se realizó una transferencia semiseca a una membrana de nitrocelulosa a 15V durante 50 minutos. El proceso fue realizado en un *Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell* de BioRad, embebiendo previamente el gel y la membrana en Buffer de Transferencia (0,3 % Tris Base, 1,2 % Glicina, 20 % Metanol). Posteriormente se realizó un *immunoblot*, para lo cual la membrana fue bloqueada durante una hora con TBS - Tween 0,1 % - leche 1 % y posteriormente se incubó *overnight* con los anticuerpos primarios correspondientes: Anti-TSG-101 (producido en ratón, dilución 1/500, invitrogen, Nro. Cat. MA1-23296) y Anti-Anexina II (producido en ratón, dilución 1/500, BD Biosciences, Nro. Cat. 610069). Luego se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS - Tween 0,1 % y se incubó la membrana durante 1 hora con un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a IRDye 800CW (dilución 1/20000, $\lambda=800$). Final-

mente, se realizaron dos lavados con TBS - Tween 0,1 % y uno con TBS de 5-10 minutos cada uno. El revelado de la membrana se realizó utilizando el equipo Odyssey.

3.6. TRANSFERENCIA DE VESÍCULAS

Para la tinción de las VE se empleó un kit comercial del colorante lipofílico PKH67 (Sigma Aldrich, Nro. Cat. MIDI67). Se siguieron los pasos determinados por las especificaciones del fabricante adaptados a la tinción de microvesículas. Para ello, se tomaron 0,25; 1 y 2,5 μg de vesículas resuspendidas en PBS y se les agregó 100 μl de diluyente C. En paralelo, se realizó una dilución 1/100 del colorante fluorescente PKH67 en otros 100 μl de diluyente C. Luego se mezclaron rápidamente las VE y el colorante en un mismo tubo y se incubó por 5 minutos. Se cortó la tinción por el agregado de BSA 1 % y se incubó por 1 minuto. A continuación, se procedió a una ultracentrifugación a 100.000 g por 90 minutos a 4°C y se resuspendió el pellet obtenido en PBS, el cual se volvió a ultracentrifugar en las mismas condiciones. Finalmente se resuspendió el pellet en 100 μl de PBS. Como controles negativos se emplearon 100 μl de PBS teñido con PKH67 y PBS sin teñir. Para descartar que restos del colorante pudieran estar teñiendo VE presentes en el medio de cultivo, se tomaron a su vez 100 μl del sobrenadante de la segunda ultracentrifugación y se emplearon como control (control sobrenadante). A todas estas alícuotas de 100 μl se les agregó 400 μl de medio completo. Las concentraciones finales de las VE teñidas resultaron de 0,5, 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Para la co-incubación de las VE teñidas con los fibroblastos, se cultivaron fibroblastos equinos en una placa de 4 pocillos sobre un cubreobjetos pre-tratado con poli-L-lisina, a una densidad de siembra de 25000 células/ cm^2 . A las 24 horas se cambió el medio en los distintos pocillos por los tratamientos correspondientes. El pocillo tratado se consideró como aquel que recibió medio completo con el agregado de 100 μl de VE teñidas, mientras que los controles fueron los mencionados previamente (medio completo + 100 μl de PBS teñido/sin teñir y medio completo + 100 μl de sobrenadante de ultracentrifugación). 24 horas después de iniciada la co-incubación, se removió el medio, se fijaron las células con PFA 4 % y se montaron los portaobjetos circulares de cada pocillo para su posterior observación en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 80i upright).

Las imágenes de microscopía fueron obtenidas con el láser de 470 nm (al 20 % de intensidad). Las mismas fueron analizadas empleando el *software* ImageJ [116].

3.7. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

Se cultivaron fibroblastos equinos en pasajes 2 o 3 en una placa de 24 pocillos con medio completo. Una vez alcanzado el 100 % de confluencia, se retiró el medio y se lavó con PBS, y

se realizó en cada uno de los pocillos un *scratch* o herida en la monocapa utilizando un tip de 200 μl . Luego, en la base del pocillo del lado de afuera de la placa, se trazaron dos líneas con rotulador para definir la franja del corte que sería analizada. Se agregó medio DMEM suplementado con 1 % SFB como condición control, y el mismo medio suplementado con VE a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como condición de tratamiento. Para evaluar la migración celular, se tomaron imágenes del corte en la franja rotulada en las horas 0, 12, 16, 20 y 24 posteriores al inicio del tratamiento. Las mismas fueron tomadas utilizando un adaptador de teléfono celular ajustado al ocular del microscopio. Para cada una de las fotografías se midió el área libre de células correspondiente al corte en la zona delimitada, y de esta manera se definió el avance de la migración celular según la condición. El ensayo fue realizado por triplicado. Se aplicó un test de *Student* sobre los valores promedio de la condición tratada y control a cada hora para el análisis estadístico de los resultados.

3.8. PROCESAMIENTO DE IMÁGENES

El análisis de las imágenes del ensayo de migración celular fue realizado comparativamente mediante un *plug-in* de ImageJ y un algoritmo desarrollado en Python con el fin de elegir uno de los dos métodos.

IMAGEJ

El procesamiento mediante ImageJ consistió en el empleo de un *plug-in* desarrollado específicamente para esta clase de ensayo [117]. El mismo detecta la región libre de células de una imagen y otorga automáticamente los valores de área y ancho promedio del corte en píxeles. Para poder emplearlo, primero, las imágenes debieron ser recortadas una por una dentro de la aplicación, de manera de dejar fuera la parte de la imagen en la que se observa el rotulador que delimita la franja del corte a analizar.

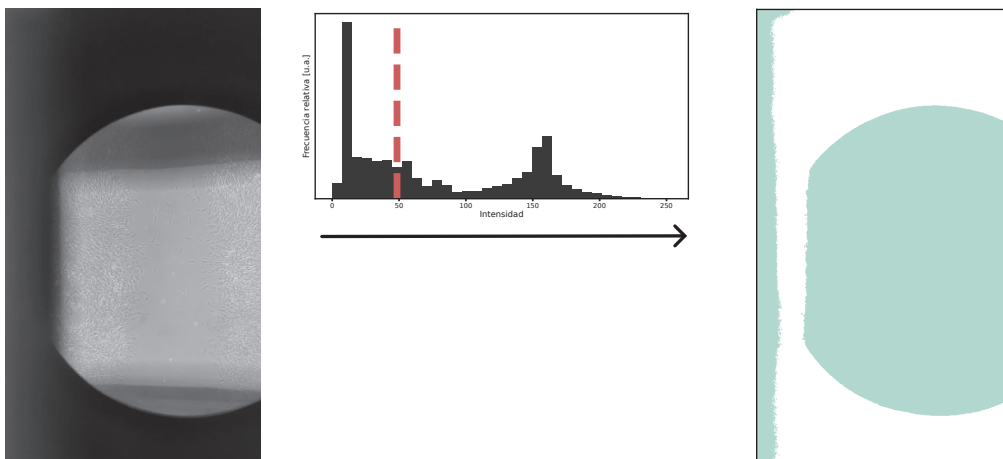
PYTHON

El procesamiento con Python fue realizado mediante el desarrollo de un algoritmo específico para este análisis. Brevemente, este algoritmo consistió en llevar todas las imágenes a blanco y negro y distinguir la región correspondiente al campo visual del microscopio respecto al fondo negro del resto de la imagen. Una vez delimitada la región del campo visual para cada imagen, se escogió dentro del mismo una sección rectangular de dimensiones idénticas en cada una que contenga al corte. Allí se identificó el área libre de células del corte aplicando un algoritmo que mide la entropía de la imagen, en donde la región libre de células se distingue por tener una menor entropía.

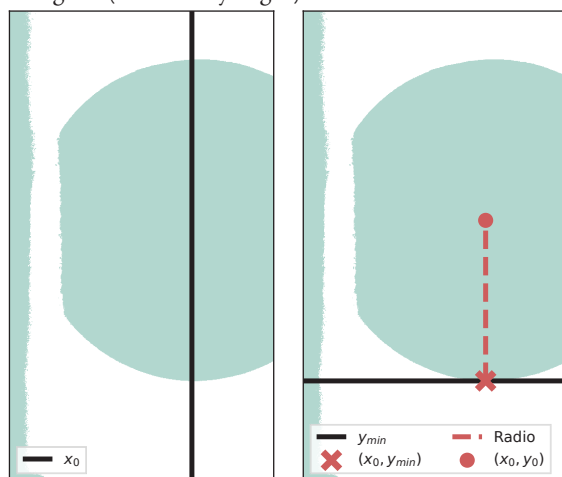
El detalle de este procesamiento se representa en la Figura 3. Consistió, en primer lugar, en disminuir la saturación de las imágenes al máximo. Luego, para definir la región circular que delimita lo que se observa en el campo visual del microscopio, se realizó un histograma de luminosidad de cada imagen. En este histograma se buscó un mínimo local (señalado en la Figura 3a), que corresponde con un tono intermedio entre negro y blanco (0 y 250, respectivamente) que no se visualiza en toda la imagen. Una vez escogido este mínimo local, se lo utilizó como valor umbral para separar en una nueva imagen con 2 colores contrastantes lo que se observa en el campo visual del microscopio del fondo negro. En nuestro caso, todos los tonos por encima del valor umbral se distinguieron con blanco, y los tonos por debajo, con verde.

Luego, se buscó en esta nueva imagen la columna con más píxeles que tengan el color de la región interna del círculo (en este ejemplo, verde). Esta columna corresponde al X_0 del centro del círculo (indicado en la Figura 3b, ver para los pasos siguientes). Al sumar la cantidad de píxeles de color verde en esta columna y dividir este número por dos, se pudo obtener el valor del radio del círculo. Como paso siguiente, sobre la columna del X_0 se buscó la fila del Y_{min} (la primera fila, de abajo hacia arriba, que contiene un píxel de color verde). A este punto (X_0, Y_{min}) se le sumó un valor de radio, y así se obtiene el Y_0 y por ende la ubicación del centro del círculo (X_0, Y_0).

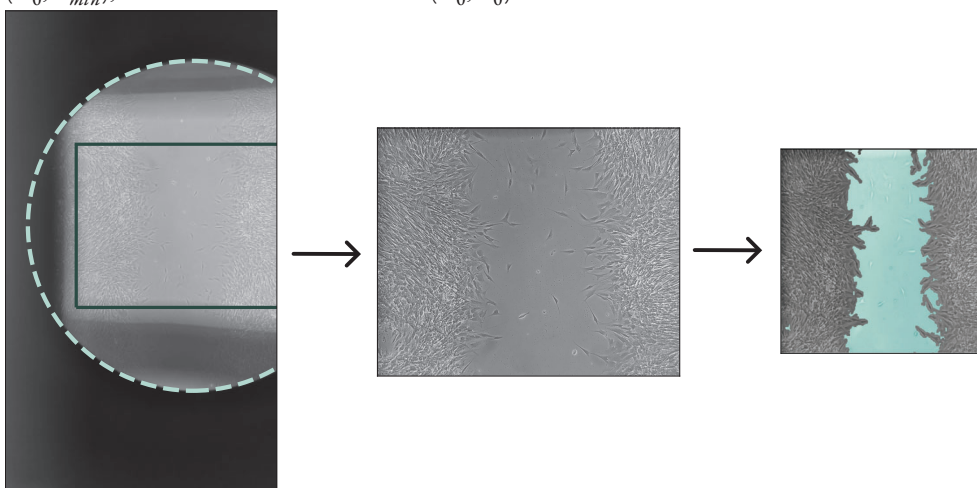
Una vez determinado el radio y el (X_0, Y_0) de cada una de estas imágenes, se regresó a la imagen original de cada una sin saturación. Allí, se trazó el contorno de la región del campo visual (ver Figura 3c) a partir de la suma de un valor de radio en toda una circunferencia a partir del (X_0, Y_0). Dentro de la circunferencia de cada imagen, se trazó un rectángulo en el medio que contenga a la región del corte. Este rectángulo fue de igual tamaño en todas las imágenes. El último paso fue, dentro de esta región rectangular, aplicar una función de Python que analice la entropía de la imagen. Una vez delimitada la región con menor entropía, correspondiente al área libre de células (pintada en verde en la Figura 3c), se pudo determinar su área en píxeles.



(a) Paso 1: delimitación de la región correspondiente al campo visual del microscopio, a partir de un histograma de intensidad sobre la imagen original (en blanco y negro).



(b) Paso 2: detección del centro del círculo. El X_0 corresponde a la columna con mayor cantidad de píxeles en color verde. La mitad del número total de píxeles verdes en dicha columna corresponde al radio. El Y_{min} corresponde a la primera fila de la columna del X_0 en donde se encuentra un píxel de color verde. Con la suma de un radio en (X_0, Y_{min}) , se obtiene el centro del círculo (X_0, Y_0) .



(c) Paso 3: delimitación del área libre de células. El contorno de la región del campo visual se obtiene a partir de la suma de un radio en toda una circunferencia a partir del (X_0, Y_0) . Dentro del contorno, se selecciona un área rectangular de tamaño determinado. Sobre esa área se aplica un análisis de entropía de la imagen que determina el área libre de células.

Figura 3: Paso a paso acerca del funcionamiento del algoritmo desarrollado en Python.

3.9. CAPACIDAD PROLIFERATIVA CELULAR

Con el objetivo de determinar el tiempo de duplicación de los fibroblastos equinos, se sembraron estas células en pasaje 4 en una placa de 24 pocillos con medio completo. Las mismas se contaron cada día, por triplicado, durante 9 días y se construyó una curva de crecimiento celular. El tiempo de duplicación (DT) fue determinado mediante la ecuación

$$DT = T \frac{\ln 2}{\ln(X_c/X_b)},$$

donde X_c y X_b son los valores promedio de células totales de dos días de la fase exponencial de la curva, y T es el tiempo, en horas, entre estos dos días.

Por otro lado, con el fin de evaluar cambios en el crecimiento de fibroblastos equinos ante un tratamiento con VE, se sembraron fibroblastos equinos en pasaje 4 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 6500 células por pocillo. El cultivo se realizó por triplicado para cada una de las condiciones: control y tratado. Luego de 24 horas se agregó medio DMEM 1% SFB para la condición control, y el mismo medio suplementado con VE a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ para la condición tratado. El medio de ambas condiciones fue cambiado en el día 4. Se contaron la cantidad de células totales por pocillo del día 1 al día 7. Para cada condición se construyó una curva de crecimiento celular.

4 RESULTADOS

4.1. DERIVACIÓN DE AD-MSC

El protocolo de derivación empleado durante este trabajo de tesis nos permitió obtener células a partir de tejido adiposo que fueron capaces de formar colonias homogéneas, adherentes al plástico y similares morfológicamente a fibroblastos, todas características de las MSC. Se derivaron un total de 13 muestras de 5 a 30 gramos de tejido adiposo equino (Figura 4) y además se emplearon 4 muestras que eran parte del banco de células previamente derivadas del laboratorio. De las 13 muestras derivadas, obtuvimos células viables y con alto potencial replicativo a partir de 6 de ellas. Cabe destacar que no notamos diferencias en el rendimiento entre las muestras derivadas y las que se encontraban criopreservadas en el laboratorio.

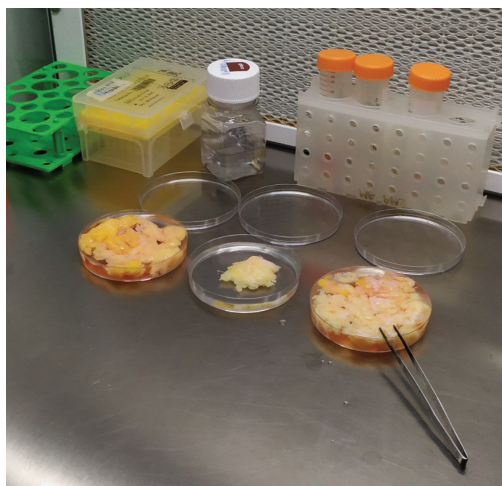


Figura 4: Muestras de tejido adiposo equino previo a ser disgregadas mecánicamente.

En la Figura 5 se pueden observar células obtenidas de tres muestras distintas. Las imágenes fueron tomadas en pasaje 4 o 5, previo al cambio de medio para iniciar el protocolo de obtención de VE provenientes de MSC.

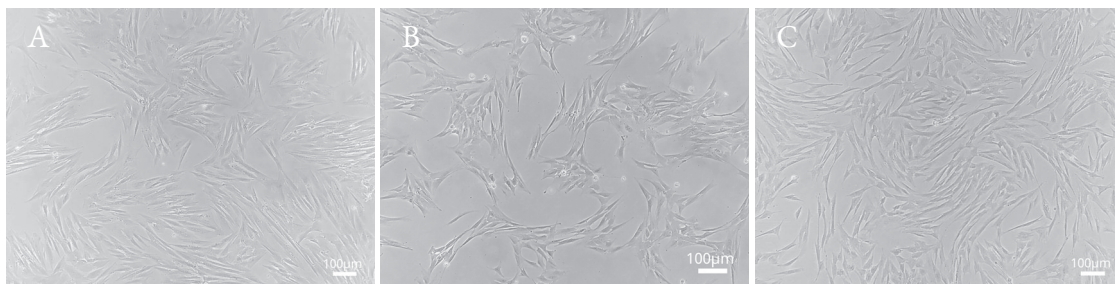


Figura 5: Ad-MSC equinas obtenidas a partir de la derivación de distintas muestras de tejido adiposo. Magnificación: 100x. Escala aproximada.

4.2. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las muestras de VE obtenidas mediante los diferentes protocolos (A, B y C; descritos en la sección Materiales y Métodos) fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión a fin de evaluar el tamaño de las vesículas obtenidas. En las Figuras 6–8 se observan imágenes representativas de las diferentes poblaciones obtenidas. En general, en todos los casos se observaron vesículas en un rango de tamaño de 50 a 200 nm de diámetro.

La mayoría de los protocolos de obtención de VE a partir de sobrenadantes de cultivo aconsejan el uso de medio sin suero fetal bovino (SFB), de manera de poder distinguir las VE provenientes de las células de interés respecto de las que puedan estar presentes en el suero. Sin embargo, como las Ad-MSC normalmente se cultivan en medios suplementados con 10 a 20 % de SFB, consideramos que el cambio abrupto a un medio sin suero podía ser detrimental para las MSC. Por lo tanto, con el primer protocolo evaluado decidimos distinguir la obtención de VE a partir de medio suplementado con 10 % BSA (en reemplazo del SFB) o en ausencia total de suero. Finalmente, no observamos diferencias en la viabilidad celular, por lo que se descartó el protocolo con BSA en el medio de cultivo.

En las muestras provenientes del protocolo que se basó en sucesivas centrifugaciones y filtración (protocolo A, Figura 6) se observaron muestras relativamente limpias y se hallaron principalmente partículas que podrían corresponderse con vesículas de alrededor de 50 nm de diámetro. Aunque este tamaño se encuentra dentro del rango indicado para los exosomas, existen reportes que indican que si solo se visualizan partículas de este diámetro no se puede afirmar que la muestra corresponda a exosomas o a otros tipos de nanopartículas [118]. Por lo tanto, descartamos el uso de este protocolo.

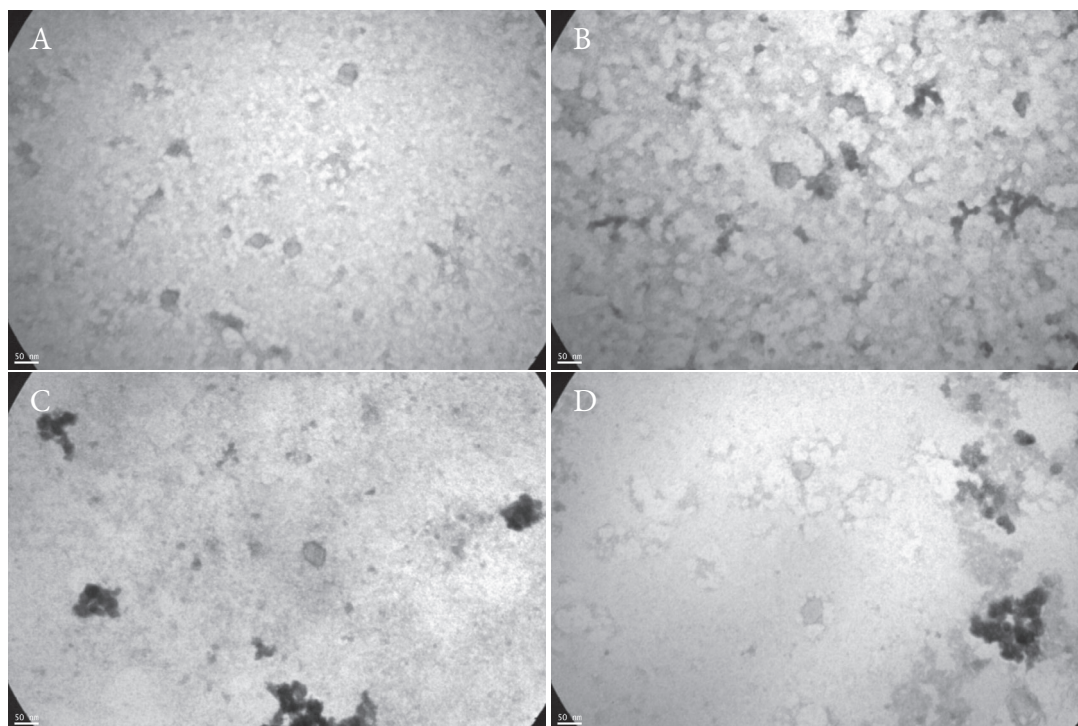


Figura 6: Fotografías tomadas mediante TEM a partir de alícuotas del protocolo A. Escala: 50 nm.

En las muestras procesadas utilizando el kit comercial de obtención de exosomas (protocolo B, Figura 7) obtuvimos una gran cantidad de precipitados que en principio parecerían ser proteínas. Debido a que la purificación mediante este método está basada en una precipitación con polietilenglicol (PEG) [119], en muestras con baja concentración de exosomas o VE (como son las provenientes de sobrenadante) puede ocurrir la formación de agregados de vesículas por la presencia de restos del reactivo en el pellet, o la precipitación de proteínas presentes en el medio de cultivo en conjunto con la población vesicular. Si bien no determinamos cuál era el caso, por estas razones y por la calidad de las muestras decidimos descartar este método de obtención.

Por último, se observó que mediante el protocolo de obtención de VE basado en sucesivas centrifugaciones (protocolo C, Figura 8) obtuvimos muestras relativamente limpias y similares a las obtenidas mediante el protocolo A. Además, a partir de este método obtuvimos una población de partículas que podrían corresponderse a vesículas de entre 50 nm (Figura 8A), hasta más de 100 nm (Figura 8C). También se observó un gran número de partículas que superan los 200 nm (Figura 8B), a diferencia del protocolo A. Consideramos que este protocolo nos permitió obtener una mayor diversidad de VE en cuanto a sus tamaños y con escasos precipitados. Por lo tanto, fue el protocolo adoptado para procesar todas las muestras empleadas en el presente trabajo.

4 Resultados

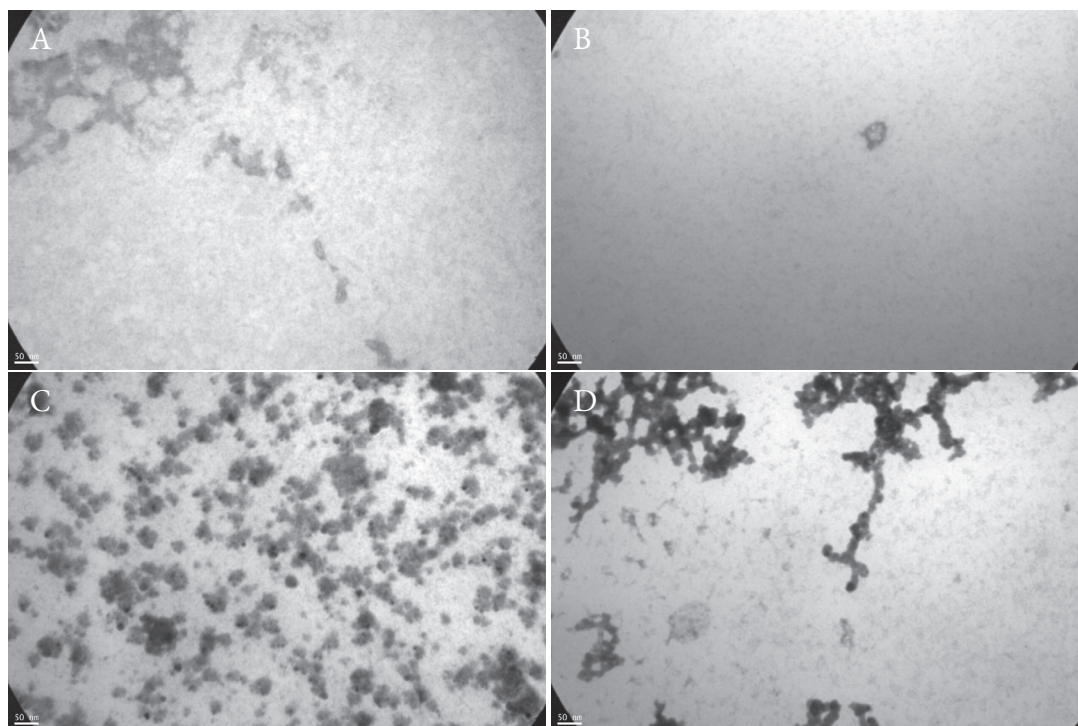


Figura 7: Fotografías tomadas mediante TEM a partir de alícuotas del protocolo B. Escala: 50 nm.

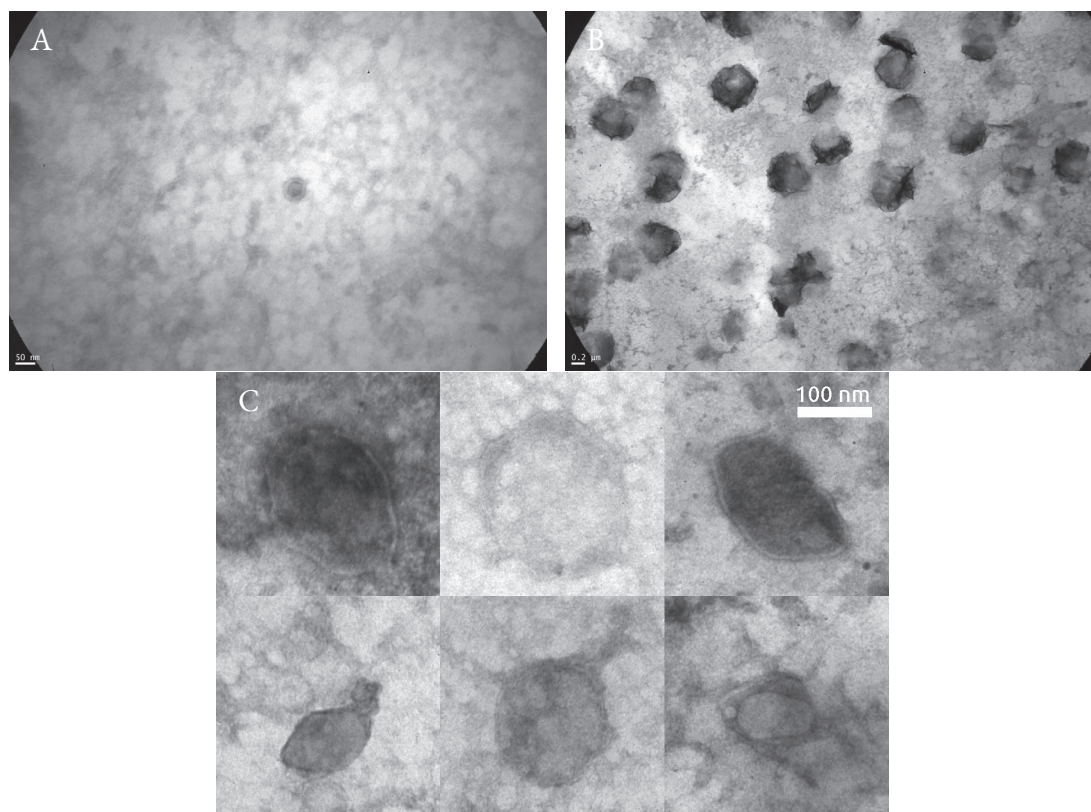


Figura 8: Fotografías tomadas mediante TEM a partir de alícuotas del protocolo C. A) Escala: 50 nm.
B) Escala: 0,2 μm. C) Escala: 100 nm.

4.3. CUANTIFICACIÓN PROTEICA

Con el fin de contar con una herramienta para determinar la concentración/dosis con la cual trabajaríamos en los posteriores ensayos funcionales, realizamos la cuantificación de proteínas totales de cada muestra. Para ello evaluamos diferentes protocolos comúnmente utilizados en la cuantificación de proteínas, como la medición mediante Nanodrop, ensayo de Lowry, ensayo de Bradford, BCA y MicroBCA. A excepción del ensayo de Bradford, el resto de los métodos evaluados no otorgaron resultados consistentes entre las réplicas. Además, salvo por el uso de Nanodrop, la mayoría de ellos requieren volúmenes grandes de muestra para realizar la medición. Cabe destacar también que al querer evaluar las muestras provenientes del protocolo A mediante el ensayo de Lowry, se observó la formación de un precipitado que imposibilitó la medición de las muestras. Esto es relativamente común para este método de cuantificación, el cual sufre interferencias por muchas sustancias comunes como el NH_4^+ , Tris-HCl, carbohidratos o agentes reductores varios [120]. Por estos motivos, decidimos cuantificar todas las muestras mediante el método de Bradford, el cual otorgó resultados que se adecúan a lo esperado e inclusive, debido a los volúmenes empleados, nos permitió realizar mediciones por triplicado sin agotar las muestras. Desde este punto nos referiremos a las dosis de masa o concentración de proteína empleadas en los ensayos como dosis de VE.

Como paso siguiente, quisimos evaluar si era posible estimar la cantidad de proteínas totales únicamente a partir del dato de la cantidad de células al momento de colectar el medio condicionado. De esta manera, podríamos evitar el paso de cuantificación y maximizar el uso de la muestra. Para ello, se calcularon los valores normalizados de proteínas totales por la cantidad de células a partir de las cuales derivaron esas muestras. En la Tabla 4.1 se muestran los resultados obtenidos. Se indican los valores de la cuantificación de las muestras mediante el método de Bradford, la cantidad de células de cada muestra a partir de la cual se purificaron VE, y la normalización de las proteínas obtenidas por cantidad de células.

Células (millones)	Proteínas ($\mu\text{g/ml}$)	Proteínas/Células
12	54	4,5
20	36	1,8
28	12	0,4
28	123	4,4
29	75	2,6
40	218	5,5
48	77	1,6
66	120	1,8

Tabla 4.1: Columna 1: número de células totales, en millones. Columna 2: proteínas totales, en $\mu\text{g/ml}$. Columna 3: cantidad de proteína obtenida por millón de células.

Se puede observar a simple vista en los datos normalizados que no existe una relación lineal entre estos valores. Debido a que no son valores constantes, se puede confirmar que no es posible estimar un rango de cantidad de proteínas totales que obtenemos de una muestra de VE tan solo conociendo el número de células totales al momento de colectar la muestra. Por ende, resulta necesario proceder con el paso de cuantificación para todas las muestras que se purifiquen.

4.4. CARACTERIZACIÓN MEDIANTE WESTERN BLOT

Con el fin de detectar la presencia de proteínas específicas de VE, se realizaron ensayos de Western Blot empleando anticuerpos anti-TSG 101 y anti-Anexina II (Figura 9). Para ello, se sembraron 5 y 7 μg de VE por calle que corresponda a VE purificadas.

En primer lugar, se logró detectar la presencia de la proteína TSG-101, de 46 kDa de peso molecular [121] (calle B, Figura 9). Sin embargo, también observamos un pegado inespecífico en esta calle evidenciado por la presencia de dos bandas de menor tamaño, una entre 30 y 40 kDa, y otra entre 40 y 50 kDa, justo debajo de la banda que correspondería a TSG-101. Además, se observó una gran proporción de pegado inespecífico del anticuerpo en la muestra correspondiente al lisado celular (calle A) y, en menor medida, expresión de la proteína de interés. Es importante destacar que los anticuerpos empleados no fueron desarrollados específicamente para la especie con la cual estamos trabajando, por lo cual la marcación inespecífica puede resultar esperable.

Por otro lado, también se detectó la presencia de Anexina II, de 38,6 kDa de peso molecular [122], mediante una banda localizada entre los 30 y 40 kDa (Calle D, Figura 9). Si bien no observamos pegado inespecífico del anticuerpo en esta calle, sí lo notamos en la calle correspondiente al lisado celular (calle E), aunque en menor medida que para TSG-101.

En conjunto, estos resultados indicarían que mediante los protocolos de colección y purificación empleados logramos aislar VE.

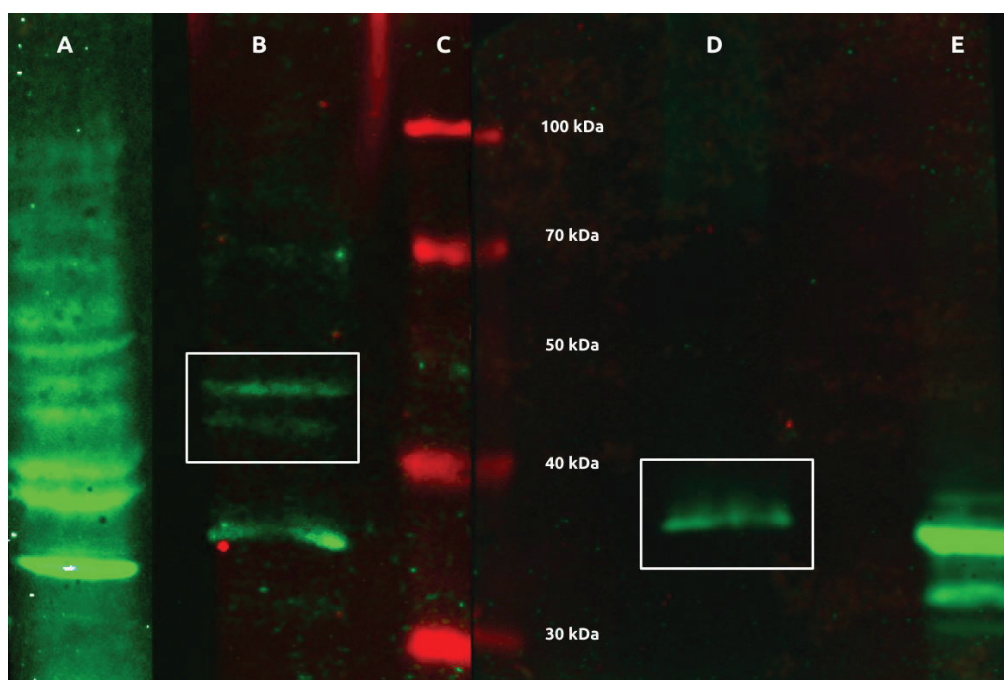


Figura 9: Western Blot de las VE aisladas a partir de sobrenadante de cultivo. Se emplearon anticuerpos anti-TSG 101 y anti-Anexina II y se utilizó un lisado celular como control negativo. Calle A: lisado celular incubado con anti-TSG 101. Calle B: muestra incubada con anti-TSG 101. Calle C: *marker*. Calle D: muestra incubada con anti-Anexina II. Calle E: lisado celular incubado con anti-Anexina II.

4.5. TRANSFERENCIA DE VESÍCULAS

Como mencionamos previamente en la introducción, las VE pueden actuar como mediadores de la señalización entre las células. Con el objetivo de evaluar si las vesículas purificadas eran capaces de ser incorporadas por fibroblastos equinos en cultivo, y de definir una concentración de tratamiento para los ensayos subsiguientes, decidimos co-incubar con estas células a VE previamente teñidas con un marcador fluorescente y observar el resultado al microscopio. En este ensayo se emplearon distintas concentraciones de VE (0,5, 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) para evaluar la transferencia de las mismas.

Se puede observar en las Figuras 10 a 12 que las células presentaron una marcación fluorescente en sus membranas y, en algunos casos, un patrón puntillado en el citoplasma. Esto indicaría que las vesículas pudieron ser incorporadas tanto por un mecanismo de fusión de membranas como por endocitosis o macropinocitosis. Observamos también que la marcación resultaba más intensa en los fibroblastos a mayor concentración de VE empleada.

4 Resultados

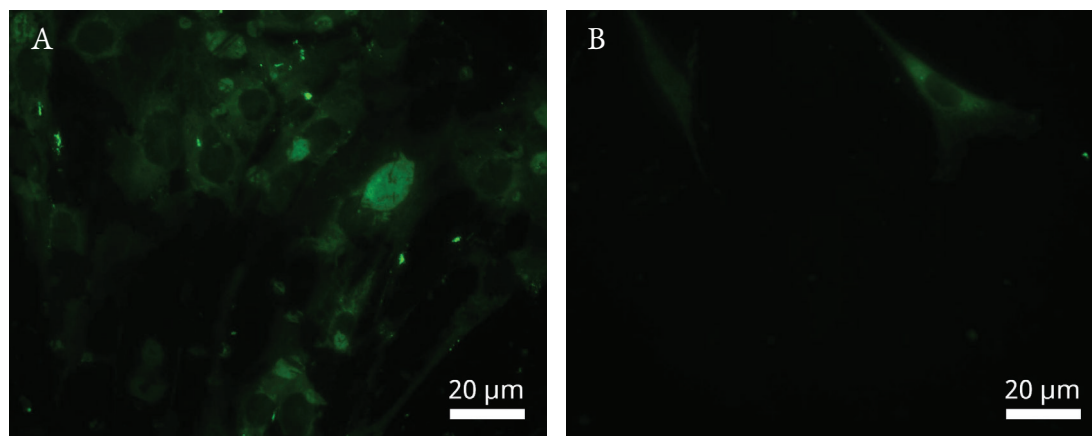


Figura 10: Transferencia de vesículas en una dosis de tratamiento de 0,5 µg/ml. Magnificación: 600x. Tiempo de exposición: 600 ms. A) Células co-cultivadas con VE teñidas. B) Control de PBS.

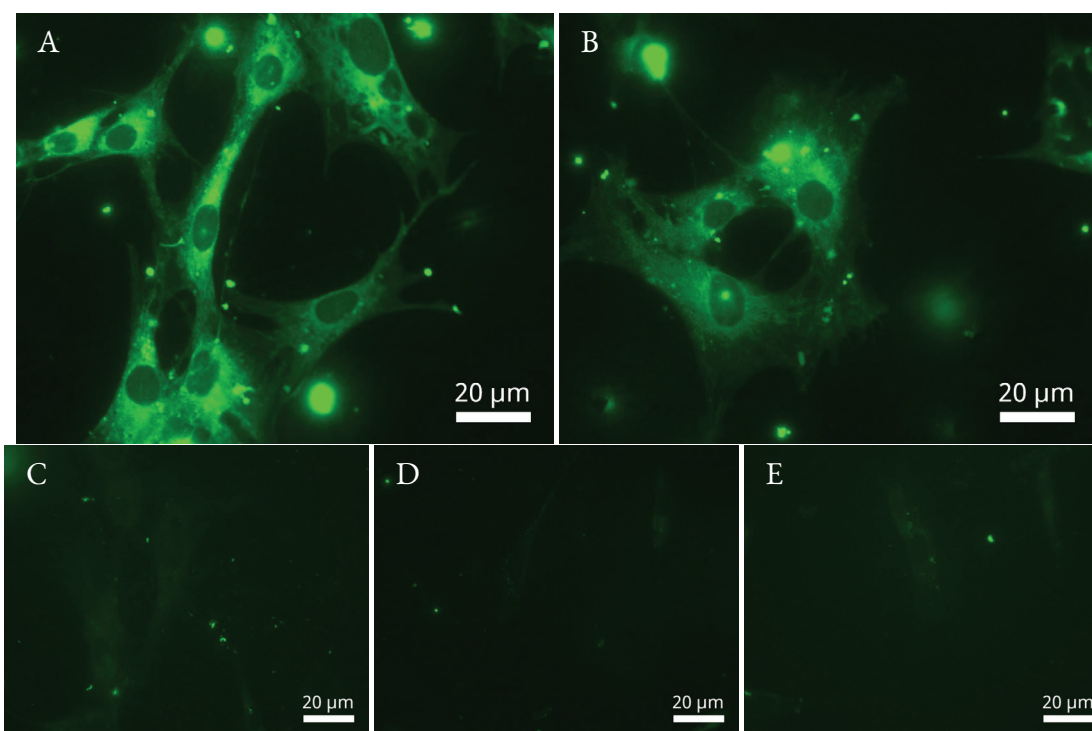


Figura 11: Transferencia de vesículas en una dosis de tratamiento de 2 µg/ml. Este ensayo fue realizado con dos poblaciones de VE distintas. Magnificación: 600x. Tiempo de exposición: 100 ms. A) y B) Células co-cultivadas con VE teñidas. C) Control de sobrenadante. D) Control de PBS teñido. E) Control de PBS.

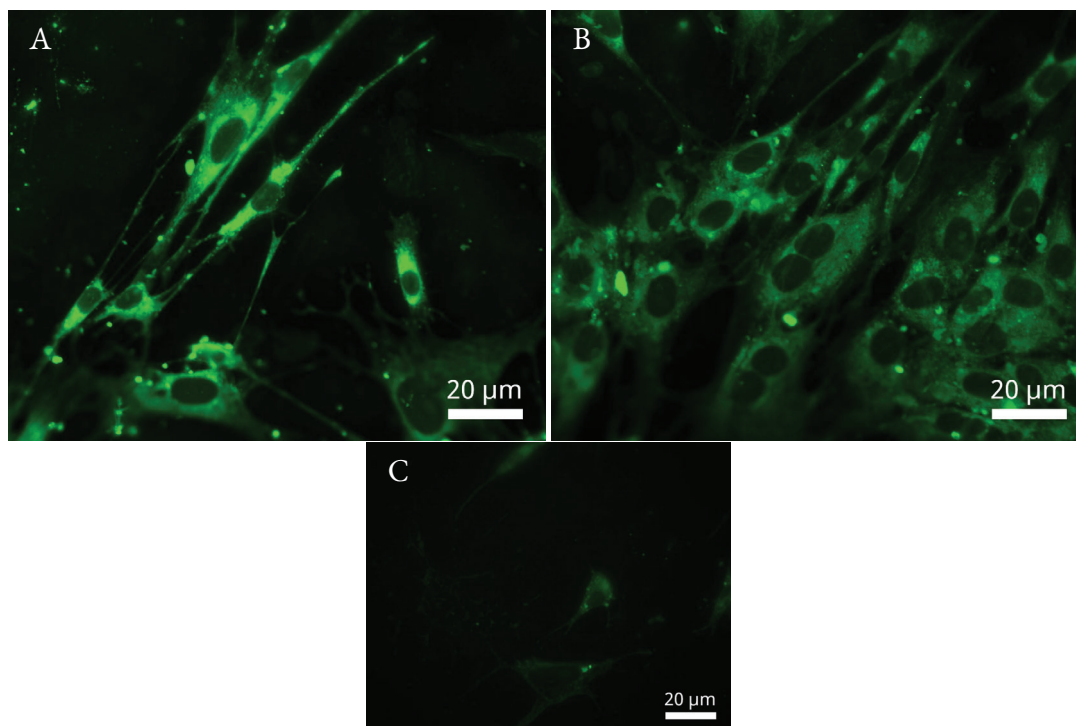


Figura 12: Transferencia de vesículas en una dosis de tratamiento de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Magnificación: 600x. Tiempo de exposición: 600 ms. A) y B) Células co-cultivadas con VE teñidas. C) Control de PBS.

Uno de los controles que realizamos consistió en la co-incubación con las células del sobrenadante del lavado post-tinción de VE, donde observamos una marcación tenue (Figura 11C). Esto indicaría que restos de exceso del colorante empleado permanecen en el sobrenadante de la ultracentrifugación. Un fenómeno similar se observó en los controles negativos empleando PBS (Figuras 10B, 11E, 12C) y PBS “teñido” (PBS incubado con el colorante y tratado de igual manera que la muestra de VE, Figura 11D), para los cuales también se observa una fluorescencia muy tenue en comparación a lo observado para las muestras tratadas con VE teñidas. En el control de PBS teñido y el de sobrenadante también observamos un gran número de cristales o pequeñas partículas teñidas. Esto coincide con reportes previos en este tipo de ensayos [123], que indican la importancia de realizar este tipo de controles para validar lo observado en las muestras tratadas.

En resumen, mediante el presente ensayo observamos que las VE se incorporan a las células y que el nivel de fluorescencia observada se correspondía con la concentración de VE empleada, ya que resultó menor para 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y mayor para 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Considerando que el protocolo de tinción involucra dos pasos de ultracentrifugación en los cuales puede ocurrir la pérdida de parte de la muestra, decidimos fijar nuestra concentración de trabajo para los ensayos subsiguientes en 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

4.6. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

El ensayo de migración celular o *wound healing* consiste en realizar una herida en una monocapa celular y observar a tiempos fijos cómo el área libre de células se cubre. Con el fin de registrar los cambios a lo largo del tiempo, se fueron tomando fotografías a distintos tiempos para una misma zona. A partir de estas imágenes se calcula el área libre de células, para lo cual se evaluaron dos maneras de medirlo. El primer método consistió en emplear un *plug-in* de ImageJ desarrollado específicamente para este tipo de ensayo (Figura 13A) y el segundo en el desarrollo de un algoritmo de Python (Figura 13B).

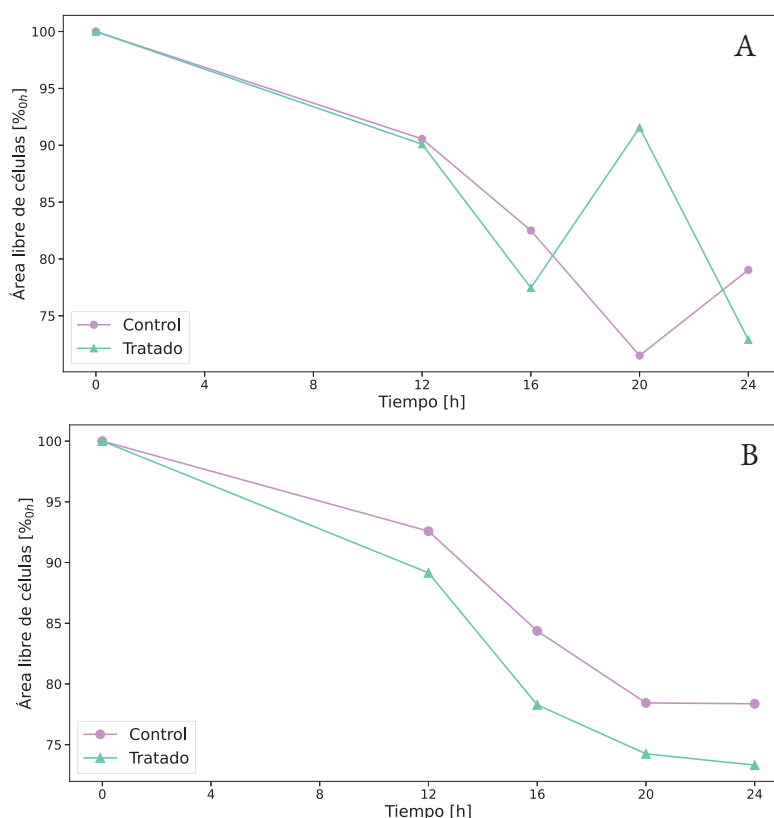


Figura 13: Área libre de células en función del tiempo. Dosis de tratamiento de $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($n=1$). Los valores del área se presentan porcentualmente, normalizados por el área libre de células en el tiempo 0. Las determinaciones de área libre de células se realizaron mediante dos métodos distintos para comparar su eficacia. A) Medición mediante un *plug-in* de ImageJ. B) Medición mediante un algoritmo de Python.

Observamos que los resultados analizados mediante el *software* ImageJ no se condicen con lo observado en las imágenes crudas. Al evaluar el análisis de cada una de las imágenes se puede visualizar que esta herramienta toma grandes regiones que no se corresponden con áreas libres de células (Figura 14). Esto puede optimizarse definiendo parámetros como el valor umbral imagen por imagen, pero vuelve el análisis más lento y operador-dependiente. Este tipo de errores pudieron ser salvados mediante el algoritmo de Python, ya que logramos que tome

regiones más acertadas para cada una de las imágenes. Incluso, al no haber necesidad de recortar las imágenes previamente ni de analizarlas y anotar los valores otorgados del área una por una, el algoritmo de Python es mucho más eficiente y permite un análisis más veloz de las imágenes. Esta herramienta nos permite calcular el área de todo un set de datos (distintas horas) de una condición (tratado/control) y construye la curva correspondiente de manera automática. Por este motivo, decidimos analizar las imágenes obtenidas con el algoritmo de Python. Se puede observar en la Figura 15 un ejemplo de la detección del área libre de células que realiza este algoritmo para una muestra tratada y una control en todas las horas registradas.

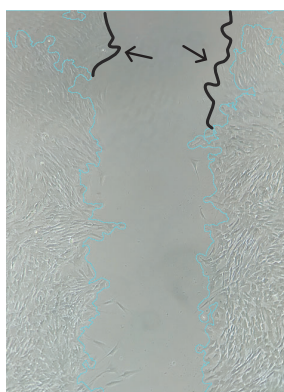


Figura 14: Detección del área libre de células, en celeste, con el *plug-in* de ImageJ. Se indican en la parte superior de la imagen, en negro, dónde se encuentran los límites reales del área libre de células.

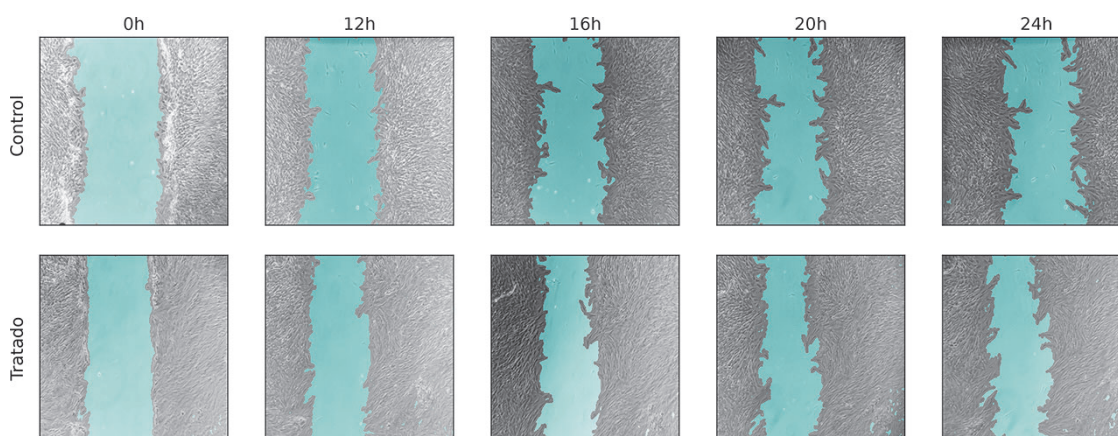


Figura 15: Imágenes analizadas mediante Python de un ensayo de migración celular para una de las condiciones control y una de las tratadas.

Finalmente, el ensayo de migración celular fue realizado por triplicado con una dosis de $1 \mu\text{g/ml}$. Se presentan en la Figura 16 los resultados de la migración celular en la condición tratada y la condición control. En principio, se puede observar que aquellas muestras tratadas con una dosis de $1 \mu\text{g/ml}$ de VE logran cubrir el área libre de células antes que las muestras no tratadas (control). Particularmente las diferencias significativas se hallaron a las 16 horas post inicio del

4 Resultados

tratamiento. Debido a que determinamos que los fibroblastos equinos presentan un tiempo de duplicación de 24 ± 2 horas (datos presentados en la siguiente sección), a partir de las 20 horas es difícil discernir entre un efecto producto de la proliferación y/o migración, lo que explicaría por qué no se observaron diferencias a las 20 y 24 horas post inicio del tratamiento.

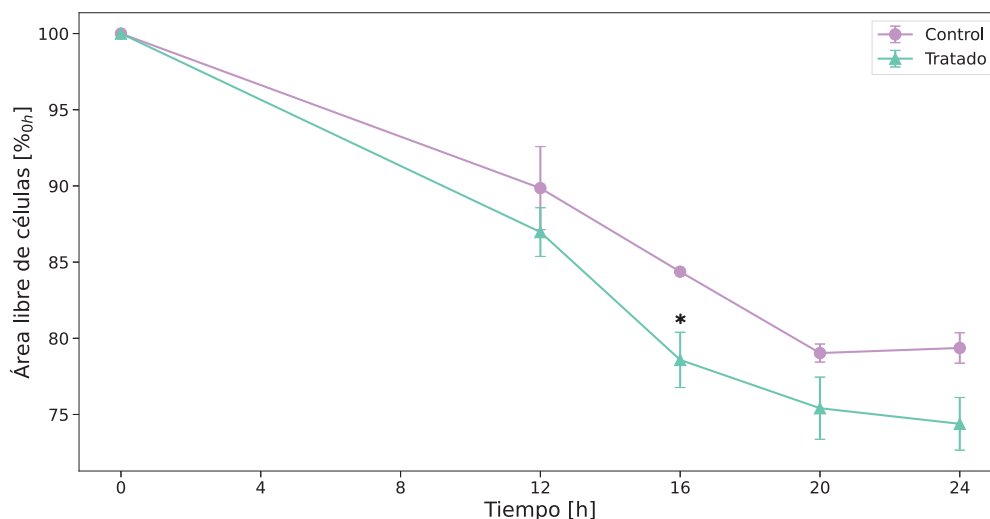


Figura 16: Área libre de células en función del tiempo. Dosis de tratamiento de $1 \mu\text{g/ml}$ ($n=3$). Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar. Los valores del área se presentan porcentualmente, normalizados por el área libre de células en el tiempo 0. Con * se señalan los horarios en los que la diferencia entre ambas condiciones es significativa ($p < 0.05$).

4.7. CAPACIDAD PROLIFERATIVA CELULAR

En primer lugar, se realizó una curva de crecimiento de fibroblastos equinos en condiciones normales de cultivo, es decir, con medio completo. A partir de esta curva, representada en la Figura 17, se estimó el tiempo de duplicación de las células. Al tomar como días correspondientes a la fase exponencial a los días 2, 3 y 4, obtuvimos un valor de tiempo de duplicación de 24 ± 2 horas.

Luego se construyó una curva de crecimiento con el objetivo de evaluar posibles diferencias en la capacidad proliferativa celular de los fibroblastos ante un tratamiento con VE. La misma se ve representada en la Figura 18. Si bien existe una importante dispersión en los datos tomados para cada condición, representado por sus respectivas desviaciones estándar, la curva de crecimiento de células tratadas con una dosis de $1 \mu\text{g/ml}$ de VE parecería indicar un mayor crecimiento que las células en la condición control. No obstante, este ensayo se realizó con una sola muestra de VE, por lo que los resultados observados son tan solo preliminares. De esta manera, debemos ampliar el set de datos para lograr concluir sobre el efecto de las VE en la proliferación de los fibroblastos.

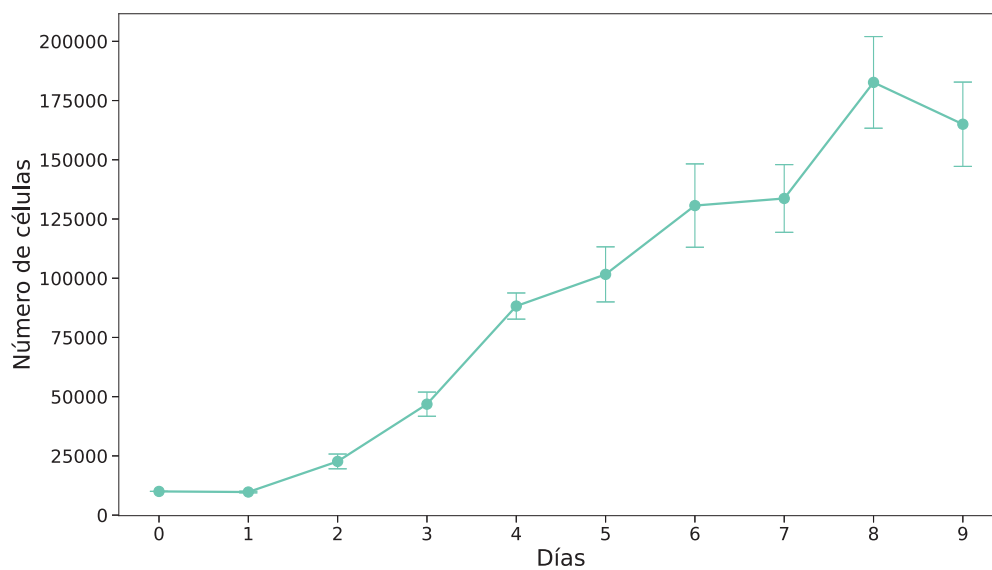


Figura 17: Curva de crecimiento celular con fibroblastos equinos en medio completo. $n=1$. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar.

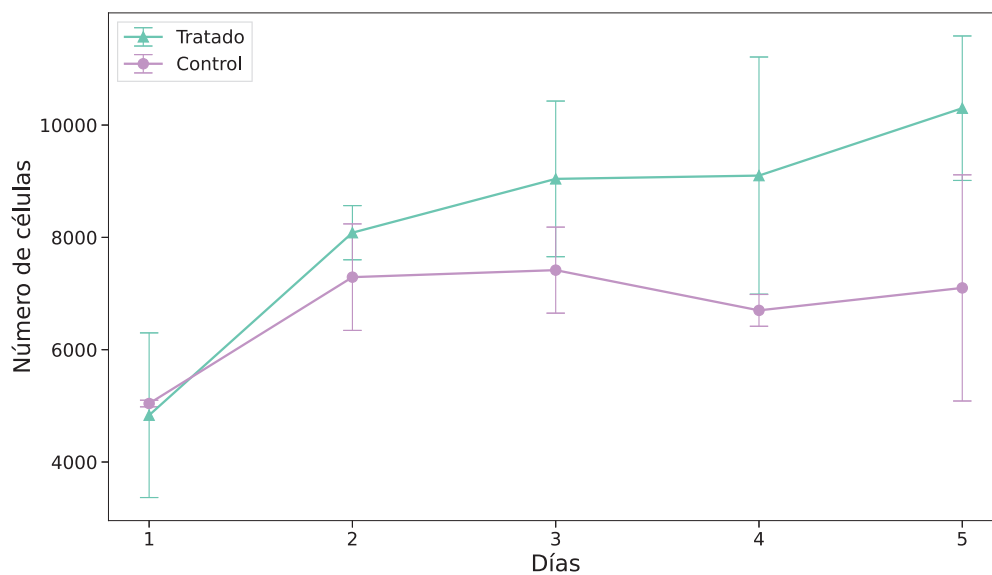


Figura 18: Curva de crecimiento celular. Dosis de tratamiento de $1 \mu\text{g/ml}$. $n=1$. Los datos se presentan como el promedio \pm desviación estándar.

5 DISCUSIÓN

Argentina es considerada el mayor productor-exportador de equinos de la raza Polo Argentino, por lo que esta industria representa un impacto altamente positivo para el desarrollo económico de nuestro país. Una de las principales complicaciones para los animales empleados en los deportes ecuestres de alto rendimiento son las lesiones musculoesqueléticas [2], las cuales pueden ocurrir como resultado de una caída o accidente, o por el propio desgaste del entrenamiento y la competencia. Las alternativas terapéuticas actuales para el tratamiento de estas patologías son limitadas y por lo tanto existe una alta demanda de nuevos tratamientos.

La mayoría de las terapias que se encuentran disponibles actualmente brindan soluciones a corto plazo, con una alta tasa de recurrencia de las lesiones y en la mayoría de los casos los animales no logran volver a la competencia. La medicina regenerativa propone, en su lugar, nuevos tipos de terapias basados en el uso de células madre, que permiten la regeneración de los tejidos dañados y recuperación completa del animal. Dentro de los distintos tipos de células madre, las mayores candidatas a ser empleadas son las MSC debido a su fácil obtención y expansión *in vitro*, su naturaleza multipotente y su seguridad en términos teratogénicos [29].

Si bien ya hace varios años que se han demostrado los efectos beneficiosos del uso de MSC en terapias regenerativas, la hipótesis respecto al mecanismo de acción de las mismas ha cambiado a lo largo del tiempo. En principio, se consideraba el uso de MSC como una terapia de reemplazo celular, es decir que tras la aplicación local de estas células en una herida o lesión, éstas eran capaces de diferenciarse e integrarse al tejido dañado. Sin embargo, actualmente se considera que el potencial regenerativo de las MSC está basado en un efecto parácrino [67]. Las células mesenquimales secretan pequeñas vesículas extracelulares, de entre 50 a 500 nm, que contienen factores de crecimiento, miARNs y otros tipos de biomoléculas que actuarían sobre el tejido dañado promoviendo la regeneración del mismo [103]. Estas vesículas pueden ser aisladas del cultivo *in vitro* de estas células y por lo tanto ser aplicadas de manera directa en el tejido a tratar. De esta forma, se podría establecer una nueva clase de terapia libre de células que potencialmente resultaría más eficiente y facilitaría la aplicación de las muestras, su logística, entre otros aspectos.

Dentro de la medicina veterinaria, y en particular en los equinos, la administración de VE es un área emergente de investigación y ya se han reportado resultados prometedores en cuanto a sus potenciales efectos. Sin embargo, son escasos los trabajos en los que se detalla la determina-

ción de las dosis de VE. Aunque muchos de ellos informan la metodología empleada, no son claros los valores obtenidos ni empleados en sus ensayos, lo que dificulta la reproducibilidad de los resultados.

Nuestro laboratorio cuenta con un servicio de derivación de MSC equinas a partir de tejido adiposo para su aplicación en terapias regenerativas. En este contexto, y con el objetivo a largo plazo de contar con una terapia libre de células, en el presente trabajo de tesis se plantea la **hipótesis** de que **la presencia de VE secretadas por Ad-MSC aumenta la capacidad proliferativa y regenerativa de fibroblastos equinos cultivados *in vitro***. Con ese fin, aislamos y caracterizamos VE obtenidas a partir de Ad-MSC en cultivo, y evaluamos su efecto en distintos ensayos funcionales *in vitro* empleando dosis debidamente especificadas.

En primer lugar, empleamos un protocolo desarrollado en nuestro laboratorio para la obtención de MSC a partir de muestras de tejido adiposo equino. A partir del mismo, obtuvimos células viables para nuestros experimentos que a su vez presentaron características morfológicas correspondientes a MSC. Este protocolo ha sido anteriormente validado en cuanto a la caracterización de las células obtenidas según expresión de marcadores específicos mediante PCR y diferenciación a distintos linajes [111]. De las 13 muestras derivadas de entre 5 a 30 gramos de tejido adiposo, se obtuvieron células a partir de 6 de ellas. Esto pudo deberse, por ejemplo, a la edad del animal donante, característica asociada a una mayor senescencia de las MSC [58]. Otro aspecto a considerar es el tipo de muestra recibida, dado que si bien la mayoría de las muestras provinieron al laboratorio como se detalló en Materiales y Métodos, también se han recibido donaciones de matadero o animales particulares. Notamos también que tuvimos un rendimiento muy superior con las muestras con mayor contenido de hematocitos, es decir cuando se procesaban muestras de grasa con mayor irrigación, que con aquellas que contenían únicamente grasa subcutánea. Esta observación se correlaciona con lo reportado previamente acerca de la localización de los nichos de MSC en diferentes tejidos. Numerosos trabajos establecen que el nicho de MSC está ubicado en sitios perivasculares [124], o incluso sugieren que los propios pericitos corresponden a MSC por su perfil de expresión y características en cultivo [125]. Esto explicaría por qué las MSC pueden encontrarse en casi todos los órganos irrigados por vasos sanguíneos, y además por qué cuentan con la propiedad de migración mediante la cual pueden llegar a sitios lejanos de donde residen en el organismo para colaborar con la respuesta regenerativa [66].

A continuación, escogimos las condiciones de cultivo para las Ad-MSC a partir de las cuales íbamos a obtener las VE. Para ello, basándonos en trabajos previos [126–128], determinamos emplear células en pasaje 4-5 y a una confluencia de entre 70 a 90 %. Una vez establecidas las condiciones de cultivo, logramos poner a punto un protocolo para la purificación de vesículas a partir del medio de cultivo condicionado por el cultivo de Ad-MSC. Para ello, evaluamos tres protocolos distintos según lo reportado en bibliografía para distintas especies, incluyendo

la equina [94, 118, 128–131]. Las muestras purificadas se compararon mediante un análisis por TEM. En primer lugar, notamos un índice de precipitación de proteínas muy alto al utilizar el kit comercial, probablemente debido al método de precipitación basado en el empleo de PEG que incluye [119] y, por lo tanto, esta opción fue descartada como método para purificar las VE. Luego se compararon los resultados observados entre los protocolos de centrifugaciones, los cuales diferían únicamente por un paso de filtración a 0,22 μm . En el protocolo A, que incluyó un paso de filtración, se observaron principalmente vesículas de 50 nm, mientras que con el otro se observó una gran diversidad de VE que están entre los 50 y los 200 nm, con una apariencia similar a la reportada en trabajos previos [94, 126, 131, 132]. Por este motivo, principalmente, seleccionamos el protocolo que consiste en sucesivas centrifugaciones sin pasos de filtración de por medio. Un aspecto a considerar es que notamos que los rendimientos disminuyen significativamente al sumar pasos de ultracentrifugación, por lo que es importante ser excesivamente cuidadoso durante los pasos de lavado y resuspensión de las ultracentrifugaciones para evitar tener que repetirlos. Esta pérdida de vesículas se ha reportado anteriormente por Nigro y colaboradores, quienes también han sumado otros factores que influyen en el rendimiento de purificación, como el tipo de rotor empleado, la variación en los tiempos de centrifugación y los cambios de temperatura [133]. Además, en el mismo trabajo se destacó que los primeros pasos de centrifugación son cruciales en el rendimiento final de vesículas obtenidas. Estas cuestiones conllevan a que numerosos trabajos consideren que otras metodologías más sofisticadas son mejores para la purificación de VE, como la ultrafiltración tangencial [134]. Sin embargo, si bien pudimos observar que las muestras obtenidas no son completamente puras y se pueden generar agregados proteicos o de las propias vesículas, debido a su accesibilidad, el protocolo de ultracentrifugaciones es actualmente el *gold-standard* en la purificación de VE. Esto no descarta, de todas maneras, que ante futuras aplicaciones *in vivo* sea necesario añadir pasos para mejorar el procesamiento *downstream* de las muestras.

Como se mencionó anteriormente, mediante un análisis por TEM pudimos observar la obtención de una población de VE de diverso tamaño, partiendo de los 50 nm hasta superar los 0,2 μm . En cuanto a las partículas más pequeñas, de diámetro aproximado de 50 nm, no es posible distinguir si se tratan de exosomas o de otros tipos de nanopartículas según reportes anteriores [118]. Sumado a esto, para validar que las partículas observadas eran efectivamente VE, realizamos ensayos de Western Blot para detectar dos marcadores específicos de superficie, TSG-101 y Anexina II. Ambas proteínas están involucradas en los procesos de biogénesis de distintos tipos de vesículas, como en la selección de su contenido o el movimiento de las membranas [91, 100], y han sido ampliamente empleadas en la caracterización de VE previamente [100, 102, 106, 128]. En la Figura 9 demostramos que las VE aisladas presentan las proteínas TSG-101 y Anexina II en las calles B y D, respectivamente. Sin embargo, para TSG-101 observamos además una marcación inespecífica que puede deberse a que los anticuerpos empleados no

son específicos de la especie equina. Por este motivo, la concentración de anticuerpo empleada (1/500) es mas elevada que lo recomendado, reforzándose así la marcación inespecífica obtenida. Esto es un problema habitual para aquellos grupos de trabajo que trabajamos en especies domésticas y silvestres, para las cuales no se han desarrollado aún anticuerpos específicos [129]. Cabe aclarar, a su vez, que no fue posible confirmar que las muestras obtenidas sean completamente puras y libres de otros componentes celulares ya que no contábamos con un anticuerpo control para detectar proteínas del citoesqueleto, por ejemplo, que podrían haber decantado junto con la población vesicular. Sin embargo, dado que en las imágenes de TEM observamos que se obtuvieron muestras relativamente limpias o libres de grandes cantidades de otros componentes, consideramos que el protocolo de purificación seleccionado era adecuado para continuar con el desarrollo del trabajo.

Como paso siguiente, cuantificamos las muestras obtenidas mediante el método de Bradford. Este método permite la cuantificación mediante la unión del colorante Coomassie G250 a las proteínas. Si bien evaluamos diferentes métodos para cuantificar las muestras, seleccionamos este ya que los resultados entre las réplicas técnicas fueron consistentes y nos permitía emplear volúmenes muy pequeños para la cuantificación. Este último factor nos resultó de alta relevancia debido a que nuestro volumen total de muestra rondaba entre los 50 y 100 μ l (independientemente del número total de células a partir del cual se purificaron las VE). Mientras que para cuantificar por otros protocolos se requería el uso de entre el 20 a 50 % de muestra, con el método de Bradford podíamos emplear solo de un 5 a 10 % para cada réplica. Si bien los estándares establecen que lo ideal para determinar la cantidad de partículas en una muestra es realizar una cuantificación mediante NTA [97], que se basa en la dispersión de luz de partículas en movimiento *Browniano*, aún no contamos con acceso a esta tecnología en nuestro país. Es por esto, y en base a lo reportado previamente por otros grupos de investigación, que consideramos emplear la cuantificación de proteínas totales de manera alternativa [106,128,130,131]. Cabe destacar que en la mayoría de los trabajos no se indica un valor de cuantificación de VE o proteína total, y aquellos que indican una dosis lo hacen en relación al número de células a partir de los cuales se derivó la muestra [130]. Sin embargo, en este trabajo demostramos que, al menos mediante los métodos de purificación empleados, no existe una relación lineal entre los millones de células cultivadas y la cantidad de proteína total (como indicador de VE) obtenida a partir de las mismas (Tabla 4.1). También destacamos que es necesario contar con al menos 25 millones de células por muestra para lograr obtener una cantidad significativa de proteína para realizar los ensayos subsiguientes.

Para determinar la concentración de trabajo para los ensayos funcionales, a continuación decidimos realizar un ensayo de tinción de vesículas con un marcador lipofílico, PKH67, y posterior co-incubación con fibroblastos equinos en cultivo. De esta manera, observamos la transferencia de las VE a las células, ya que las mismas se tiñen de un verde fluorescente y pue-

den ser evidenciadas dentro de las células por tinción de la membrana o como un puntillado en el citoplasma. Esto indica que las vesículas podrían ser incorporadas tanto por fusión de membranas como por mecanismos como la macropinocitosis [87]. Evaluamos tres concentraciones distintas de VE, de 0,5, 2 y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. En los tres casos observamos que las células presentaron fluorescencia en sus membranas al ser comparadas con la condición control, y que la misma crecía a la par del aumento de concentración de VE. Trabajos previos han reportado el empleo de este marcador en diversas dosis de VE, de 7,5 mg [106], 1,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [135], o sin especificar la concentración [128, 130, 136], obteniendo resultados similares a los presentados aquí. Cabe aclarar que al emplear la concentración de 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ se observaron campos en los que la fluorescencia fue muy similar a la observada para la condición control, lo cual coincide con lo previamente reportado a 0,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [135]. Es importante destacar que, al igual que otros trabajos, notamos que en los controles se observaron numerosos cristales provenientes de la solución de tinción en algunos de los campos observados en el microscopio [123]. Es por esto que uno de los controles sumados durante el desarrollo de este trabajo fue el que incluyó el sobrenadante de tinción, que nos permitió evaluar la presencia de remanentes del colorante en el sobrenadante de lavado de las VE teñidas, y podría estar generando tinciones no específicas. Se observó que la fluorescencia fue muy similar a la de los controles de PBS, por lo que podemos inferir que la tinción en las células se dio exclusivamente por las vesículas teñidas. A partir de estos resultados decidimos emplear la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en los ensayos subsiguientes. Si bien esta concentración no fue evaluada puntualmente (observamos que 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ no fue suficiente y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ saturaba la marca), decidimos emplearla de modo de maximizar la cantidad de muestra.

Considerando que tanto la migración como la proliferación celular son dos parámetros fundamentales a evaluar en los ensayos de regeneración tisular, en el presente trabajo decidimos evaluar estos efectos mediante el tratamiento de fibroblastos equinos con VE. En primer lugar, evaluamos la migración celular de fibroblastos *in vitro* en un ensayo de migración celular. Observamos que al suplementar el medio de cultivo con una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VE, el área libre de células disminuyó en mayor medida que la situación control. Los resultados para cada uno de los tratamientos fueron representados mediante una normalización a sus respectivas horas iniciales (hora 0) de manera de minimizar las posibles diferencias que pueden darse en las mediciones por variaciones en el corte realizado para cada caso. Para el análisis estadístico, se compararon las condiciones control-tratado en cada hora registrada y normalizada a su hora 0, y notamos que únicamente a las 16 horas se encontró una diferencia significativa entre los tratamientos. Uno de los motivos por los cuales podríamos explicar que no se mantiene esta diferencia para las 20 y 24 horas después de iniciado el tratamiento es que establecimos un tiempo de duplicación de 24 ± 2 horas para los fibroblastos equinos. Por lo tanto, a medida que nos acercamos al tiempo de la duplicación de las células, no es posible distinguir si los efectos observados están dados por un efecto de migración o de proliferación celular. Consideramos

que los tiempos del ciclo celular fueron reanudados al momento en el que se hizo el *scratch* y se tomaron las primeras imágenes del experimento (hora 0) debido a que en este momento el cultivo era una monocapa confluyente, donde las células muy probablemente presentaban inhibición por contacto. Se ha reportado con anterioridad que este ensayo mostró una diferencia notoria en la capacidad migratoria de las células tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VE [106]. No obstante, allí trabajaron en condiciones distintas, como el empleo de PBS como control en lugar del mismo medio suplementado con SFB pero sin VE. En otros trabajos, aunque también notaron diferencias, nuevamente no se especifica con qué concentración se trabajó [131], por lo que los resultados no son reproducibles. Con la información obtenida a partir de este ensayo, nosotros podemos establecer que en principio una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en el medio resulta beneficiosa para la migración celular. Cabe destacar también que para el análisis de las imágenes correspondientes a este experimento, desarrollamos un algoritmo en Python que permitió un análisis más rápido, eficiente e independiente del operador que las herramientas empleadas en otros trabajos. Con este algoritmo fue posible incluso realizar un análisis a partir de imágenes tomadas con un teléfono celular debido a que no contamos con la disponibilidad de un microscopio con sistema de adquisición de imágenes al momento de realizar el ensayo, lo cual destaca también su versatilidad.

Por otro lado, para evaluar la capacidad proliferativa de las células se realizaron curvas de crecimiento. En primera instancia, se realizó una curva en condiciones normales de cultivo con el fin de poner a punto la técnica y establecer el tiempo de duplicación basal de los fibroblastos equinos, el cual fue de 24 ± 2 horas. Luego, se realizaron nuevas curvas de crecimiento para evaluar posibles cambios en las células ante un tratamiento con una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de VE suplementada en el medio de cultivo. Los resultados preliminares obtenidos parecerían indicar que los fibroblastos tienen una mayor tasa replicativa. Sin embargo, las réplicas técnicas de los días, tanto para la condición tratada como la control, mostraron una dispersión muy grande. Además, este ensayo no pudo ser repetido debido a una limitación en la obtención de más muestras, por lo que no se puede concluir si el resultado observado es representativo de lo que ocurre realmente ante un tratamiento con VE. Como trabajo futuro, este ensayo debería repetirse con la misma dosis al menos 3 veces con muestras de diferentes individuos, de manera de comparar mediante un test estadístico pertinente si la tasa proliferativa de los fibroblastos se favorece con el tratamiento. Además, sería ideal obtener una masa suficiente de VE para repetir el ensayo en una superficie como la que se empleó en la curva inicial, de puesta a punto, debido a que observamos que las células en esta condición presentaron una mejor adherencia y fue posible construir una curva de más días de duración. Observamos en trabajos anteriores en células satelitales humanas que se evaluaron dosis de 12,5 y 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, con efectos notorios en esta última [126], o también sobre células endoteliales con una dosis única de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ [128]. Otros trabajos han reportado ensayos utilizando fibroblastos humanos de pacientes diabéticos,

en donde se evaluaron las dosis de 0,1, 1 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y se observó una mayor tasa proliferativa de manera dosis-dependiente [106]. Se puede destacar a partir de esto que el rango de concentraciones en el cual se ensaya este tipo de actividad en las células es muy amplio, y que por ende no existe un valor pre-establecido a partir del cual partir para notar diferencias. Sumado a esto, uno de los objetivos de este trabajo era realizar un *pool* de las células empleadas, aislar su ARN total y comparar mediante RT-qPCR la expresión de genes específicos de ciclo celular, en particular de *c-Myc*, ciclina A1 y ciclina D2. Debido a que no contamos con las muestras necesarias para repetir el ensayo de proliferación celular, esta medición no fue posible de realizar. Trabajos anteriores en equinos han realizado ensayos similares para evaluar el efecto en un contexto inflamatorio de VE co-cultivadas con condrocitos [130]. En humanos, por otro lado, se evaluó sobre células satelitales tratadas para observar cambios en su diferenciación [126], o sobre fibroblastos de pacientes con comorbilidades en donde se estudiaron los mismos genes que nosotros tomamos como objetivo y en los que notaron cambios significativos [106]. El objetivo final de este procedimiento era evaluar si, en caso de confirmar que hubo un aumento en la cantidad de células tratadas por día, esto se debía a un incremento en la expresión de genes que regulan el ciclo celular y que consecuentemente disminuirían el tiempo de duplicación celular, como lo reportado previamente en el estudio en células humanas de Shabbir y colaboradores. Por este motivo, este ensayo queda pendiente para futuros experimentos para corroborar así los cambios que podrían observarse en la curva de crecimiento.

En resumen, en el presente trabajo logramos optimizar un protocolo de obtención de VE, caracterizarlas en base a su morfología y expresión de marcadores específicos y obtener resultados preliminares acerca de los efectos de su aplicación en una dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en la capacidad proliferativa y migratoria *in vitro* de fibroblastos equinos. Sería interesante repetir los ensayos funcionales realizados con una mayor cantidad de réplicas biológicas para obtener resultados concluyentes y representativos, y también hacerlo con dosis crecientes de VE y evaluar un efecto de dosis-respuesta como se realizó en otras especies [106, 126]; sin embargo, no fue posible debido a la limitante de muestras totales y la cantidad de proteína total que logramos purificar de cada uno de los sobrenadantes de cultivo.

En conclusión, los resultados aquí presentados parecerían indicar que las VE tienen un efecto positivo en la migración, y si bien resta por evaluar la capacidad proliferativa celular, estas vesículas continúan siendo potenciales candidatas para su uso en terapias regenerativas. No obstante, para poder observar cambios que resulten significativos en este tipo de terapias, aún es necesario optimizar los protocolos de purificación de manera de aumentar los rendimientos de VE obtenidas. Una potencial aplicación *in vivo* demandaría cantidades de VE superiores a las empleadas en los ensayos *in vitro*, y además, aún no están definidas las maneras en las que podrían administrarse. Por ejemplo, para tratamientos a base de MSC en lesiones musculoesqueléticas de equinos, las dosis convencionales son de 5 millones de células [112–115]. Sin

embargo, con los resultados de este trabajo observamos que no existe una relación lineal entre los millones de células y la concentración de VE obtenida, por lo que no se puede establecer una relación directa para determinar las dosis de VE a administrar en estos casos. Para otras patologías y especies, las dosis de MSC se determinan, en cambio, según kilogramo del paciente o tamaño de la lesión. En definitiva, cualquiera sea el modo de administración seleccionado, será necesario un incremento en la concentración y diversidad de VE obtenidas, ya sea aumentando la cantidad de MSC a partir de las cuales se parte, teniendo especial cuidado en que estas provengan de individuos jóvenes y sanos, o evaluando y escogiendo condiciones de cultivo que aumenten significativamente su secreción de VE al medio de cultivo.

Los resultados obtenidos en esta tesina podrían tener importantes implicancias en terapias regenerativas en equinos y en otras especies de interés dentro de la medicina veterinaria. Los hallazgos obtenidos hasta el momento son prometedores y sugieren que las VE son potenciales candidatas para su uso en la regeneración de tejidos. Además, el estudio del efecto de las VE a dosis determinadas es un paso importante para considerar su aplicación *in vivo*. En definitiva, esta investigación representa un avance significativo en la comprensión de las VE y su posible uso en la medicina veterinaria, lo que podría tener un impacto positivo en la salud y el bienestar animal.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Ministerio de Agricultura de Argentina. Equinos. <https://www.argentina.gob.ar/senasa/programas-sanitarios/cadenaanimal/equinos>, última consulta: diciembre 2022.
- [2] Paul René van Weeren and Willem Back. Musculoskeletal disease in aged horses and its management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 32(2):229–247, August 2016.
- [3] C. M. Inness and K. L. Morgan. Polo pony injuries: player-owner reported risk, perception, mitigation and risk factors. *Equine Veterinary Journal*, 47(4):422–427, July 2014.
- [4] Céline Robert. Veterinary aspects of training and racing endurance horses. In *Equine Sports Medicine and Surgery*, pages 1083–1106. Elsevier, 2014.
- [5] Michela Mocchi, Silvia Dotti, Maurizio Del Bue, Riccardo Villa, Elia Bari, Sara Per-teghella, Maria Luisa Torre, and Stefano Grolli. Veterinary regenerative medicine for musculoskeletal disorders: Can mesenchymal stem/stromal cells and their secretome be the new frontier? *Cells*, 9(6):1453, June 2020.
- [6] Arianna Ferrini, Molly M. Stevens, Susanne Sattler, and Nadia Rosenthal. Toward re-generation of the heart: Bioengineering strategies for immunomodulation. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 6, March 2019.
- [7] R.C. Whitton, M.A. Jackson, A.J.D. Campbell, G.A. Anderson, T.D.H. Parkin, J.M. Morton, and L.A. Boden. Musculoskeletal injury rates in thoroughbred racehorses following local corticosteroid injection. *The Veterinary Journal*, 200(1):71–76, April 2014.
- [8] Andrea Bertuglia, Michela Bullone, Federica Rossotto, and Mauro Gasparini. Epidemiology of musculoskeletal injuries in a population of harness standardbred racehorses in training. *BMC Veterinary Research*, 10(1):11, 2014.
- [9] A. Egenvall, C.A. Tranquille, A.C. Lönnell, C. Bitschnau, A. Oomen, E. Hernlund, S. Montavon, M.A. Franko, R.C. Murray, M.A. Weishaupt, van R. Weeren, and

- L. Roepstorff. Days-lost to training and competition in relation to workload in 263 elite show-jumping horses in four european countries. *Preventive Veterinary Medicine*, 112(3-4):387–400, November 2013.
- [10] L. B. JEFFCOTT, P. D. ROSSDALE, J. FREESTONE, C.J. FRANK, and P. F. TOWERS-CLARK. An assessment of wastage in thoroughbred racing from conception to 4 years of age. *Equine Veterinary Journal*, 14(3):185–198, July 1982.
- [11] Peter H.L. Ramzan and Lorraine Palmer. Musculoskeletal injuries in thoroughbred racehorses: A study of three large training yards in newmarket, UK (2005–2007). *The Veterinary Journal*, 187(3):325–329, March 2011.
- [12] Iris Ribitsch, Gil Lola Oreff, and Florian Jenner. Regenerative medicine for equine musculoskeletal diseases. *Animals*, 11(1):234, January 2021.
- [13] Benoît Usunier, Marc Benderitter, Radia Tamarat, and Alain Chapel. Management of fibrosis: The mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem Cells International*, 2014:1–26, 2014.
- [14] Fa-Ming Chen, Yi-Min Zhao, Yan Jin, and Songtao Shi. Prospects for translational regenerative medicine. *Biotechnology Advances*, 30(3):658–672, May 2012.
- [15] Edward H. Ntege, Hiroshi Sunami, and Yusuke Shimizu. Advances in regenerative therapy: A review of the literature and future directions. *Regenerative Therapy*, 14:136–153, June 2020.
- [16] Ella Buzhor, Lucy Leshansky, Jacob Blumenthal, Hila Barash, David Warshawsky, Yaron Mazor, and Ronit Shtrichman. Cell-based therapy approaches: the hope for incurable diseases. *Regenerative Medicine*, 9(5):649–672, September 2014.
- [17] Davood Mehrabani, Jerard Seghatchian, and Jason P. Acker. Platelet rich plasma in treatment of musculoskeletal pathologies. *Transfusion and Apheresis Science*, 58(6):102675, December 2019.
- [18] Ketki Holkar, Anuradha Vaidya, Prasad Pethe, Vaijayanti Kale, and Ganesh Ingavle. Biomaterials and extracellular vesicles in cell-free therapy for bone repair and regeneration: Future line of treatment in regenerative medicine. *Materialia*, 12:100736, August 2020.
- [19] Hamid Rahmatullah Bin Abd Razak, Daniel Chew, Zepur Kazezian, and Anthony M.J. Bull. Autologous protein solution: a promising solution for osteoarthritis? *EFORT Open Reviews*, 6(9):716–726, September 2021.

- [20] Peter Wehling, Christopher Evans, Jana Wehling, and William Maixner. Effectiveness of intra-articular therapies in osteoarthritis: a literature review. *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease*, 9(8):183–196, June 2017.
- [21] Muhammad Suhaeri, Mi Hee Noh, Ji-Hoi Moon, In Gul Kim, Seung Ja Oh, Sang Su Ha, Jong Ho Lee, and Kwideok Park. Novel skin patch combining human fibroblast-derived matrix and ciprofloxacin for infected wound healing. *Theranostics*, 8(18):5025–5038, 2018.
- [22] George Kolios and Yuben Moodley. Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration*, 85(1):3–10, December 2012.
- [23] Mbobda Defo Marius Joel, Jintao Yuanz, Jingyan Wang, Yongmin Yan, Hui Qian, Xu Zhang, Wenrong Xui, and Fei Mao. Msc: immunoregulatory effects, roles on neutrophils and evolving clinical potentials. *American Journal of Translational Research*, 11(6):3890–3904, June 2019.
- [24] Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda, and Shinya Yamanaka. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131(5):861–872, November 2007.
- [25] Dah-Ching Ding, Woei-Cherng Shyu, and Shinn-Zong Lin. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplantation*, 20(1):5–14, February 2011.
- [26] Gianluca Sampogna, Salman Yousuf Guraya, and Antonello Forgione. Regenerative medicine: Historical roots and potential strategies in modern medicine. *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 3(3):101–107, September 2015.
- [27] Carlos Ambrosio, Helena Zomer, Atanásio Vidane, and Natalia Gonçalves. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives. *Stem Cells and Cloning: Advances and Applications*, page 125, September 2015.
- [28] Jeffrey L. Spees, Ryang Hwa Lee, and Carl A. Gregory. Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Research & Therapy*, 7(1), August 2016.
- [29] Makram Merimi, Rania El-Majzoub, Laurence Lagneaux, Douâa Moussa Agha, Fatima Bouhtit, Nathalie Meuleman, Hassan Fahmi, Philippe Lewalle, Mohammad Fayyad-Kazan, and Mehdi Najar. The therapeutic potential of mesenchymal stromal cells for regenerative medicine: Current knowledge and future understandings. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, August 2021.

- [30] Vladislav Volarevic, Bojana Simovic Markovic, Marina Gazdic, Ana Volarevic, Nemanja Jovicic, Nebojsa Arsenijevic, Lyle Armstrong, Valentin Djonov, Majlinda Lako, and Miodrag Stojkovic. Ethical and safety issues of stem cell-based therapy. *International Journal of Medical Sciences*, 15(1):36–45, 2018.
- [31] Michael Xavier Doss and Agapios Sachinidis. Current challenges of iPSC-based disease modeling and therapeutic implications. *Cells*, 8(5):403, April 2019.
- [32] A. J. Friedenstein, R. K. Chailakhjan, and K. S. Lalykina. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. *Cell Proliferation*, 3(4):393–403, October 1970.
- [33] Shihua Wang, Xuebin Qu, and Robert Chunhua Zhao. Clinical applications of mesenchymal stem cells. *Journal of Hematology: Oncology*, 5(1), April 2012.
- [34] M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F.C Marini, D.S. Krause, R.J. Deans, A. Keating, D.J. Prockop, and E.M. Horwitz. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4):315–317, 2006.
- [35] Philippe Bourin, Bruce A. Bunnell, Louis Casteilla, Massimo Dominici, Adam J. Katz, Keith L. March, Heinz Redl, J. Peter Rubin, Kotaro Yoshimura, and Jeffrey M. Gimble. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the international federation for adipose therapeutics and science (IFATS) and the international society for cellular therapy (ISCT). *Cytotherapy*, 15(6):641–648, June 2013.
- [36] Feng-Juan Lv, Rocky S. Tuan, Kenneth M.C. Cheung, and Victor Y.L. Leung. Concise review: The surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 32(6):1408–1419, May 2014.
- [37] Eckhard Alt, Yasheng Yan, Sebastian Gehmert, Yao-Hua Song, Andrew Altman, Sang-Gehmert, Daynene Vykoukal, and Xiaowen Bai. Fibroblasts share mesenchymal phenotypes with stem cells, but lack their differentiation and colony-forming potential. *Biology of the Cell*, 103(4):197–208, April 2011.
- [38] Imran Ullah, Raghavendra Baregundi Subbarao, and Gyu Jin Rho. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2), April 2015.

- [39] Rhiannon Nancarrow-Lei, Pouya Mafi, Reza Mafi, and Wasim Khan. A systemic review of adult mesenchymal stem cell sources and their multilineage differentiation potential relevant to musculoskeletal tissue repair and regeneration. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 12(8), November 2017.
- [40] Kourosch C. Elahi, Gerd Klein, Meltem Avci-Adali, Karl D. Sievert, Sheila MacNeil, and Wilhelm K. Aicher. Human mesenchymal stromal cells from different sources diverge in their expression of cell surface proteins and display distinct differentiation patterns. *Stem Cells International*, 2016:1–9, 2016.
- [41] JUNE SEOK HEO, YOUJEONG CHOI, HAN-SOO KIM, and HYUN OK KIM. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(1):115–125, November 2015.
- [42] J. Martí, E. Antón, and C. Valentí. Complications of bone marrow biopsy. *British Journal of Haematology*, 124(4):557–558, January 2004.
- [43] Lucie Bacakova, Jana Zarubova, Martina Travnickova, Jana Musilkova, Julia Pajorova, Petr Slepicka, Nikola Slepickova Kasalkova, Vaclav Svorcik, Zdenka Kolska, Hooman Motarjemi, and Martin Molitor. Stem cells: their source, potency and use in regenerative therapies with focus on adipose-derived stem cells – a review. *Biotechnology Advances*, 36(4):1111–1126, July 2018.
- [44] Lauren E. Kokai, Kacey Marra, and J. Peter Rubin. Adipose stem cells: biology and clinical applications for tissue repair and regeneration. *Translational Research*, 163(4):399–408, April 2014.
- [45] Marta Barba, Claudia Cicione, Camilla Bernardini, Fabrizio Michetti, and Wanda Lattanzi. Adipose-derived mesenchymal cells for bone regeneration: State of the art. *Bio-Med Research International*, 2013:1–11, 2013.
- [46] Zhilai Zhou, Yinhai Chen, Hui Zhang, Shaoxiong Min, Bo Yu, Bing He, and Anmin Jin. Comparison of mesenchymal stromal cells from human bone marrow and adipose tissue for the treatment of spinal cord injury. *Cytotherapy*, 15(4):434–448, April 2013.
- [47] Sarah Tzu-Feng Hsiao, Azar Asgari, Zerina Lokmic, Rodney Sinclair, Gregory James Dusting, Shiang Yong Lim, and Rodney James Dilley. Comparative analysis of paracrine factor expression in human adult mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose, and dermal tissue. *Stem Cells and Development*, 21(12):2189–2203, August 2012.

- [48] Sara M. Melief, Jaap Jan Zwaginga, Willem E. Fibbe, and Helene Roelofs. Adipose tissue-derived multipotent stromal cells have a higher immunomodulatory capacity than their bone marrow-derived counterparts. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(6):455–463, May 2013.
- [49] Oren Levy, Rui Kuai, Erika M. J. Siren, Deepak Bhare, Yuka Milton, Nabeel Nissar, Michael De Biasio, Martina Heinelt, Brock Reeve, Reza Abdi, Meshael Alturki, Mohanad Fallatah, Abdulaziz Almalik, Ali H. Alhasan, Khalid Shah, and Jeffrey M. Karp. Shattering barriers toward clinically meaningful MSC therapies. *Science Advances*, 6(30), jul 2020.
- [50] Yuchen Zhang, Najun Dong, Huanle Hong, Jingxuan Qi, Shibo Zhang, and Jiao Wang. Mesenchymal stem cells: Therapeutic mechanisms for stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5):2550, feb 2022.
- [51] Kevin McIntosh, Sanjin Zvonic, Sara Garrett, James B. Mitchell, Z. Elizabeth Floyd, Lora Hammill, Amy Kloster, Yuan Di Halvorsen, Jenny P. Ting, Robert W. Storms, Brian Goh, Gail Kilroy, Xiyang Wu, and Jeffrey M. Gimble. The immunogenicity of human adipose-derived cells: Temporal changes in vitro. *STEM CELLS*, 24(5):1246–1253, May 2006.
- [52] James A Ankrum, Joon Faii Ong, and Jeffrey M Karp. Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nature Biotechnology*, 32(3):252–260, February 2014.
- [53] Gordana Raicevic, Redouane Rouas, Mehdi Najar, Patrick Stordeur, Hicham Id Boufker, Dominique Bron, Philippe Martiat, Michel Goldman, Michel T. Nevessignsky, and Laurence Lagneaux. Inflammation modifies the pattern and the function of toll-like receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology*, 71(3):235–244, March 2010.
- [54] G. Pachón-Peña, G. Yu, A. Tucker, X. Wu, J. Vendrell, B.A. Bunnell, and J.M. Gimble. Stromal stem cells from adipose tissue and bone marrow of age-matched female donors display distinct immunophenotypic profiles. *Journal of Cellular Physiology*, 226(3):843–851, December 2010.
- [55] Sanne Johanna Jansen of Lorkeers, Joep Egbert Coenraad Eding, Hanna Mikaela Vesterrinen, Tycho Ids Gijsbert van der Spoel, Emily Shamiso Sena, Henricus Johannes Duckers, Pieter Adrianus Doevendans, Malcolm Robert Macleod, and Steven Anton Jozef Chamuleau. Similar effect of autologous and allogeneic cell therapy for ischemic heart disease. *Circulation Research*, 116(1):80–86, January 2015.

- [56] Olivia S. Beane, Vera C. Fonseca, Leroy L. Cooper, Gideon Koren, and Eric M. Darling. Impact of aging on the regenerative properties of bone marrow-, muscle-, and adipose-derived mesenchymal stem/stromal cells. *PLoS ONE*, 9(12):e115963, December 2014.
- [57] Francesca Cianfarani, Gabriele Toietta, Giuliana Di Rocco, Eleonora Cesareo, Giovanna Zambruno, and Teresa Odorisio. Diabetes impairs adipose tissue-derived stem cell function and efficiency in promoting wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 21(4):545–553, April 2013.
- [58] Huan Chen, Ousheng Liu, Sijia Chen, and Yueying Zhou. Aging and mesenchymal stem cells: Therapeutic opportunities and challenges in the older group. *Gerontology*, 68(3):339–352, June 2021.
- [59] Stuart M Chambers, Chad A Shaw, Catherine Gatz, C. Joseph Fisk, Lawrence A Dornhoffer, and Margaret A Goodell. Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biology*, 5(8):e201, July 2007.
- [60] MiJung Kim, ChanWha Kim, Yu Suk Choi, MinHwan Kim, ChanJeoung Park, and Yousin Suh. Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development*, 133(5):215–225, May 2012.
- [61] Martha L. Bustos, Luai Huleihel, Maria G. Kapetanaki, Christian L. Lino-Cardenas, Lyle Mroz, Bryon M. Ellis, Bryan J. McVerry, Thomas J. Richards, Naftali Kaminski, Nayra Cerdenes, Ana L. Mora, and Mauricio Rojas. Aging mesenchymal stem cells fail to protect because of impaired migration and antiinflammatory response. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(7):787–798, April 2014.
- [62] Mimmi Patrikoski, Bettina Mannerström, and Susanna Miettinen. Perspectives for clinical translation of adipose stromal/stem cells. *Stem Cells International*, 2019:1–21, May 2019.
- [63] Ziyad Alharbi, Christian Oplander, Sultan Almakadi, Andrea Fritz, Michael Vogt, and Norbert Pallua. Conventional vs. micro-fat harvesting: How fat harvesting technique affects tissue-engineering approaches using adipose tissue-derived stem/stromal cells. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*, 66(9):1271–1278, September 2013.
- [64] Dae Seong Kim, Myoung Woo Lee, Young Jong Ko, Yong Hoon Chun, Hyung Joon Kim, Ki Woong Sung, Hong Hoe Koo, and Keon Hee Yoo. Cell culture density affects the proliferation activity of human adipose tissue stem cells. *Cell Biochemistry and Function*, 34(1):16–24, January 2016.

- [65] Panithi Sukho, Jolle Kirpensteijn, Jan Willem Hesselink, Gerjo J. V. M. van Osch, Femke Verseijden, and Yvonne M. Bastiaansen-Jenniskens. Effect of cell seeding density and inflammatory cytokines on adipose tissue-derived stem cells: an in vitro study. *Stem Cell Reviews and Reports*, 13(2):267–277, January 2017.
- [66] Mujib Ullah, Daniel D. Liu, and Avnesh S. Thakor. Mesenchymal stromal cell homing: Mechanisms and strategies for improvement. *iScience*, 15:421–438, May 2019.
- [67] Ying Wang, Xiaodong Chen, Wei Cao, and Yufang Shi. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, 15(11):1009–1016, October 2014.
- [68] Yanhong Li, Di Zhang, Ling Xu, Lin Dong, Ji Zheng, Yikong Lin, Jiefang Huang, Yanyun Zhang, Yu Tao, Xingxing Zang, Dajin Li, and Meirong Du. Cell–cell contact with proinflammatory macrophages enhances the immunotherapeutic effect of mesenchymal stem cells in two abortion models. *Cellular & Molecular Immunology*, 16(12):908–920, February 2019.
- [69] Franziska Nitzsche, Claudia Müller, Barbara Lukomska, Jukka Jolkonen, Alexander Deten, and Johannes Boltze. Concise review: MSC adhesion cascade—insights into homing and transendothelial migration. *Stem Cells*, 35(6):1446–1460, April 2017.
- [70] Gonzalo Jimenez-Puerta, Juan Marchal, Elena López-Ruiz, and Patricia Gálvez-Martín. Role of mesenchymal stromal cells as therapeutic agents: Potential mechanisms of action and implications in their clinical use. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2):445, February 2020.
- [71] Rossana Domenis, Adriana Cifù, Sara Quaglia, Cinzia Pistis, Massimo Moretti, Annalisa Vicario, Pier Camillo Parodi, Martina Fabris, Kayvan R. Niazi, Patrick Soon-Shiong, and Francesco Curcio. Pro inflammatory stimuli enhance the immunosuppressive functions of adipose mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Scientific Reports*, 8(1), September 2018.
- [72] Se Yun Kwon, So Young Chun, Yun-Sok Ha, Dae Hwan Kim, Jeongshik Kim, Phil Hyun Song, Hyun Tae Kim, Eun Sang Yoo, Bum Soo Kim, and Tae Gyun Kwon. Hypoxia enhances cell properties of human mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 14(5):595–604, July 2017.
- [73] Lianhua Bai, Donald P. Lennon, Valerie Eaton, Kari Maier, Arnold I. Caplan, Stephen D. Miller, and Robert H. Miller. Human bone marrow-derived mesenchy-

- mal stem cells induce th2-polarized immune response and promote endogenous repair in animal models of multiple sclerosis. *Glia*, 57(11):1192–1203, August 2009.
- [74] Wei Ge, Jifu Jiang, Jacqueline Arp, Weihua Liu, Bertha Garcia, and Hao Wang. Regulatory t-cell generation and kidney allograft tolerance induced by mesenchymal stem cells associated with indoleamine 2, 3-dioxygenase expression. *Transplantation*, 90(12):1312–1320, December 2010.
- [75] Jung Hwa Ko, Hyun Ju Lee, Hyun Jeong Jeong, Mee Kum Kim, Won Ryang Wee, Sun ok Yoon, Hosoon Choi, Darwin J. Prockop, and Joo Youn Oh. Mesenchymal stem/stromal cells precondition lung monocytes/macrophages to produce tolerance against allo- and autoimmunity in the eye. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1):158–163, December 2015.
- [76] M. Franquesa, F. K. Mensah, R. Huizinga, T. Strini, L. Boon, E. Lombardo, O. Dela-Rosa, J. D. Laman, J. M. Grinyó, W. Weimar, M. G. H. Betjes, C. C. Baan, and M. J. Hoogduijn. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells abrogate plasma-blast formation and induce regulatory b cells independently of t helper cells. *Stem Cells*, 33(3):880–891, February 2015.
- [77] Karen English, Frank P. Barry, and Bernard P. Mahon. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters*, 115(1):50–58, January 2008.
- [78] Patricia Luz-Crawford, Farida Djouad, Karine Toupet, Claire Bony, Marcella Franquesa, Martin J. Hoogduijn, Christian Jorgensen, and Danièle Noël. Mesenchymal stem cell-derived interleukin 1 receptor antagonist promotes macrophage polarization and inhibits b cell differentiation. *Stem Cells*, 34(2):483–492, December 2015.
- [79] Grazia Maria Spaggiari, Andrea Capobianco, Heba Abdelrazik, Flavio Becchetti, Maria Cristina Mingari, and Lorenzo Moretta. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin e2. *Blood*, 111(3):1327–1333, February 2008.
- [80] Arnold I. Caplan. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine. In *Principles of Regenerative Medicine*, pages 219–227. Elsevier, 2019.
- [81] Angelika Schmidt, Xing-Mei Zhang, Rubin N Joshi, Shasina Iqbal, Casper Wahlund, Susanne Gabrielsson, Robert A Harris, and Jesper Tegnér. Human macrophages induce CD4 foxp3 regulatory t cells via binding and re-release of TGF- β . *Immunology & Cell Biology*, 94(8):747–762, May 2016.

Bibliografia

- [82] Massimiliano Gnechi, Huamei He, Olin D Liang, Luis G Melo, Fulvio Morello, Hui Mu, Nicolas Noiseux, Lunan Zhang, Richard E Pratt, Joanne S Ingwall, and Victor J Dzau. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by akt-modified mesenchymal stem cells. *Nature Medicine*, 11(4):367–368, April 2005.
- [83] Arnaud Goolaerts, Nadia Pellan-Randrianarison, Jérôme Larghero, Valérie Vanneaux, Yurdagül Uzunhan, Thomas Gille, Nicolas Dard, Carole Planès, Michael A. Matthay, and Christine Clerici. Conditioned media from mesenchymal stromal cells restore sodium transport and preserve epithelial permeability in an in vitro model of acute alveolar injury. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, 306(11):L975–L985, June 2014.
- [84] Helena Kupcova Skalnikova. Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie*, 95(12):2196–2211, December 2013.
- [85] Vijay Bhaskar Reddy Konala, Murali Krishna Mamidi, Ramesh Bhonde, Anjan Kumar Das, Radhika Pochampally, and Rajarshi Pal. The current landscape of the mesenchymal stromal cell secretome: A new paradigm for cell-free regeneration. *Cytotherapy*, 18(1):13–24, January 2016.
- [86] Nina Heldring, Imre Mäger, Matthew J.A. Wood, Katarina Le Blanc, and Samir E.L. Andaloussi. Therapeutic potential of multipotent mesenchymal stromal cells and their extracellular vesicles. *Human Gene Therapy*, 26(8):506–517, August 2015.
- [87] Raghu Kalluri and Valerie S. LeBleu. The biology, function and biomedical applications of exosomes. *Science*, 367(6478), February 2020.
- [88] Thomas Hartjes, Serhii Mytnyk, Guido Jenster, Volkert van Steijn, and Martin van Royen. Extracellular vesicle quantification and characterization: Common methods and emerging approaches. *Bioengineering*, 6(1):7, January 2019.
- [89] Graça Raposo and Willem Stoorvogel. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology*, 200(4):373–383, February 2013.
- [90] Guillaume van Niel, Gisela D'Angelo, and Graça Raposo. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(4):213–228, January 2018.
- [91] Jana Janockova, Lucia Slovinska, Denisa Harvanova, Timea Spakova, and Jan Rosocha. New therapeutic approaches of mesenchymal stem cells-derived exosomes. *Journal of Biomedical Science*, 28(1), May 2021.

- [92] Willem Stoorvogel, Monique J. Kleijmeer, Hans J. Geuze, and Graça Raposo. The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic*, 3(5):321–330, May 2002.
- [93] Mathilde Mathieu, Lorena Martin-Jaular, Grégory Lavieu, and Clotilde Théry. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature Cell Biology*, 21(1):9–17, January 2019.
- [94] Manish Dash, Kanagaraj Palaniyandi, Satish Ramalingam, S. Sahabudeen, and N.S. Raja. Exosomes isolated from two different cell lines using three different isolation techniques show variation in physical and molecular characteristics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1863(2):183490, February 2021.
- [95] Felix Royo, Clotilde Théry, Juan M. Falcón-Pérez, Rienk Nieuwland, and Kenneth W. Witwer. Methods for separation and characterization of extracellular vesicles: Results of a worldwide survey performed by the ISEV rigor and standardization subcommittee. *Cells*, 9(9):1955, August 2020.
- [96] Marcel I. Ramirez, Maria G. Amorim, Catarina Gadelha, Ivana Milic, Joshua A. Welsh, Vanessa M. Freitas, Muhammad Nawaz, Naveed Akbar, Yvonne Couch, Laura Makin, Fiona Cooke, Andre L. Vettore, Patricia X. Batista, Roberta Freezor, Julia A. Pezuk, Lívia Rosa-Fernandes, Ana Claudia O. Carreira, Andrew Devitt, Laura Jacobs, Israel T. Silva, Gillian Coakley, Diana N. Nunes, Dave Carter, Giuseppe Palmisano, and Emmanuel Dias-Neto. Technical challenges of working with extracellular vesicles. *Nanoscale*, 10(3):881–906, 2018.
- [97] Clotilde Théry, Kenneth W Witwer, Elena Aikawa, Maria Jose Alcaraz, Johnathon D Anderson, Ramarosan Andriantsitohaina, Anna Antoniou, Tanina Arab, Fabienne Archer, Georgia K Atkin-Smith, D Craig Ayre, Jean-Marie Bach, Daniel Bachurski, Hossein Baharvand, Leonora Balaj, Shawn Baldacchino, Natalie N Bauer, Amy A Baxter, Mary Bebawy, Carla Beckham, Apolonija Bedina Zavec, Abderrahim Benmoussa, Anna C Berardi, Paolo Bergese, Ewa Bielska, Cherie Blenkiron, Sylwia Bobis-Wozowicz, Eric Boilard, Wilfrid Boireau, Antonella Bongiovanni, Francesc E Borràs, Steffi Bosch, Chantal M Boulanger, Xandra Breakefield, Andrew M Breglio, Meadhbh Á Brennan, David R Brigstock, Alain Brisson, Marike LD Broekman, Jacqueline F Bromberg, Paulina Bryl-Górecka, Shilpa Buch, Amy H Buck, Dylan Burger, Sara Busatto, Dominik Buschmann, Benedetta Bussolati, Edit I Buzás, James Bryan Byrd, Giovanni Camussi, David RF Carter, Sarah Caruso, Lawrence W Chamley, Yu-Ting Chang, Chihchen Chen, Shuai Chen, Lesley Cheng, Andrew R Chin, Aled Clayton, Stefano P Clerici, Alex Cocks, Emanuele Cocucci, Robert J Coffey, Anabela Cordeiro da Silva, Yvonne

Couch, Frank AW Coumans, Beth Coyle, Rossella Crescitelli, Miria Ferreira Criado, Crislyn D'Souza-Schorey, Saumya Das, Amrita Datta Chaudhuri, Paola de Candia, Eliezer F De Santana, Olivier De Wever, Hernando A del Portillo, Tanguy Demaret, Sarah Deville, Andrew Devitt, Bert Dhondt, Dolores Di Vizio, Lothar C Dieterich, Vincenza Dolo, Ana Paula Dominguez Rubio, Massimo Dominici, Mauricio R Dourado, Tom AP Driedonks, Filipe V Duarte, Heather M Duncan, Ramon M Eichenberger, Karin Ekström, Samir EL Andaloussi, Celine Elie-Caille, Uta Erdbrügger, Juan M Falcón-Pérez, Farah Fatima, Jason E Fish, Miguel Flores-Bellver, Andrés Försönits, Annie Frelet-Barrand, Fabia Fricke, Gregor Fuhrmann, Susanne Gabrielsson, Ana Gámez-Valero, Chris Gardiner, Kathrin Gärtner, Raphael Gaudin, Yong Song Gho, Bernd Giebel, Caroline Gilbert, Mario Gimona, Ilaria Giusti, Deborah CI Goberdhan, André Görgens, Sharon M Gorski, David W Greening, Julia Christina Gross, Alice Gualerzi, Gopal N Gupta, Dakota Gustafson, Aase Handberg, Reka A Haraszti, Paul Harrison, Hargita Hegyesi, An Hendrix, Andrew F Hill, Fred H Hochberg, Karl F Hoffmann, Beth Holder, Harry Holthofer, Baharak Hosseinkhani, Guoku Hu, Yiyao Huang, Veronica Huber, Stuart Hunt, Ahmed Gamal-Eldin Ibrahim, Tsuneya Ikezu, Jameel M Inal, Mustafa Isin, Alena Ivanova, Hannah K Jackson, Soren Jacobsen, Steven M Jay, Muthuvel Jayachandran, Guido Jenster, Lanzhou Jiang, Suzanne M Johnson, Jennifer C Jones, Ambrose Jong, Tijana Jovanovic-Talisman, Stephanie Jung, Raghu Kalluri, Shinichi Kano, Sukhbir Kaur, Yumi Kawamura, Evan T Keller, Delaram Khamari, Elena Khomyakova, Anastasia Khvorova, Peter Kierulf, Kwang Pyo Kim, Thomas Kislinger, Mikael Klingeborn, David J Klinke, Mirosław Kornek, Maja M Kosanović, Árpád Ferenc Kovács, Eva-Maria Krämer-Albers, Susanne Krasemann, Mirja Krause, Igor V Kurochkin, Gina D Kusuma, Sören Kuypers, Saara Laitinen, Scott M Langevin, Lucia R Languino, Joanne Lannigan, Cecilia Lässer, Louise C Laurent, Gregory Lavieu, Elisa Lázaro-Ibáñez, Soazig Le Lay, Myung-Shin Lee, Yi Xin Fiona Lee, Debora S Lemos, Metka Lenassi, Aleksandra Leszczynska, Isaac TS Li, Ke Liao, Sten F Libregts, Erzsébet Ligeti, Rebecca Lim, Sai Kiang Lim, Aija Linē, Karen Linnemannstöns, Alicia Llorente, Catherine A Lombard, Magdalena J Lorenowicz, Ákos M Lörincz, Jan Lötvall, Jason Lovett, Michelle C Lowry, Xavier Loyer, Quan Lu, Barbara Lukomska, Taral R Lunavat, Sybren LN Maas, Harmeet Malhi, Antonio Marcilla, Jacopo Mariani, Javier Mariscal, Elena S Martens-Uzunova, Lorena Martin-Jaular, M Carmen Martinez, Vilma Regina Martins, Mathilde Mathieu, Suresh Mathivanan, Marco Maugeri, Lynda K McGinnis, Mark J McVey, David G Meckes, Katie L Meehan, Inge Mertens, Valentina R Minciocchi, Andreas Möller, Malene Møller Jørgensen, Aizea Morales-Kastresana, Jess Morhayim, François Mullier, Maurizio Muraca, Luca Musante, Veronika Mussack, Dillon C Muth, Kathryn H Myburgh, Tanbir Najrana, Muhammad Nawaz, Irina Na-

zarenko, Peter Nejsum, Christian Neri, Tommaso Neri, Rienk Nieuwland, Leonardo Nimrichter, John P Nolan, Esther NM Nolte 't Hoen, Nicole Noren Hooten, Lorraine O'Driscoll, Tina O'Grady, Ana O'Loghlen, Takahiro Ochiya, Martin Olivier, Alberto Ortiz, Luis A Ortiz, Xabier Osteikoetxea, Ole Østergaard, Matias Ostrowski, Jaesung Park, D. Michiel Pegtel, Hector Peinado, Francesca Perut, Michael W Pfaffl, Donald G Phinney, Bartijn CH Pieters, Ryan C Pink, David S Pisetsky, Elke Pogge von Strandmann, Iva Polakovicova, Ivan KH Poon, Bonita H Powell, Ilaria Prada, Lynn Pulliam, Peter Quesenberry, Annalisa Radeghieri, Robert L Raffai, Stefania Raimondo, Janusz Rak, Marcel I Ramirez, Graça Raposo, Morsi S Rayyan, Neta Regev-Rudzki, Franz L Ricklefs, Paul D Robbins, David D Roberts, Silvia C Rodrigues, Eva Rohde, Sophie Rome, Kasper MA Rouschop, Aurelia Rughetti, Ashley E Russell, Paula Saá, Susmita Sahoo, Edison Salas-Huenuleo, Catherine Sánchez, Julie A Saugstad, Meike J Saul, Raymond M Schiffelers, Raphael Schneider, Tine Hiorth Schøyen, Aaron Scott, Eriomina Shahaj, Shivani Sharma, Olga Shatnyeva, Faezeh Shekari, Ganesh Vilas Shelke, Ashok K Shetty, Kiyotaka Shiba, Pia R-M Siljander, Andreia M Silva, Agata Skowronek, Orman L Snyder, Rodrigo Pedro Soares, Barbara W Sódar, Carolina Soekmadji, Javier Sotillo, Philip D Stahl, Willem Stoorvogel, Shannon L Stott, Erwin F Strasser, Simon Swift, Hidetoshi Tahara, Muneesh Tewari, Kate Timms, Swasti Tiwari, Rochelle Tixeira, Mercedes Tkach, Wei Seong Toh, Richard Tomasini, Ana Claudia Torrecilhas, Juan Pablo Tosar, Vasilis Toxavidis, Lorena Urbanelli, Pieter Vader, Bas WM van Balkom, Susanne G van der Grein, Jan Van Deun, Martijn JC van Herwijnen, Kendall Van Keuren-Jensen, Guillaume van Niel, Martin E van Royen, Andre J van Wijnen, M Helena Vasconcelos, Ivan J Vechetti, Tiago D Veit, Laura J Vella, Émilie Velot, Frederik J Verweij, Beate Vestad, Jose L Viñas, Tamás Visnovitz, Krisztina V Vukman, Jessica Wahlgren, Dionysios C Watson, Marca HM Wauben, Alissa Weaver, Jason P Webber, Viktoria Weber, Ann M Wehman, Daniel J Weiss, Joshua A Welsh, Sebastian Wendt, Asa M Wheelock, Zoltán Wiener, Leonie Witte, Joy Wolfram, Angeliki Xagorari, Patricia Xander, Jing Xu, Xiaomei Yan, María Yáñez-Mó, Hang Yin, Yuana Yuana, Valentina Zappulli, Jana Zarubova, Vytautas Žėkas, Jian ye Zhang, Zezhou Zhao, Lei Zheng, Alexander R Zheutlin, Antje M Zickler, Pascale Zimmermann, Angela M Zivkovic, Davide Zocco, and Ewa K Zuba-Surma. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the international society for extracellular vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7(1):1535750, November 2018.

- [98] Eduard Willms, Henrik J. Johansson, Imre Mäger, Yi Lee, K. Emelie M. Blomberg, Mariam Sadik, Amr Alaarg, C.I. Edvard Smith, Janne Lehtiö, Samir EL Andaloussi,

Bibliografia

- Matthew J.A. Wood, and Pieter Vader. Cells release subpopulations of exosomes with distinct molecular and biological properties. *Scientific Reports*, 6(1), March 2016.
- [99] James H Hurley. <scp>ESCRT</scp>s are everywhere. *The EMBO Journal*, 34(19):2398–2407, August 2015.
- [100] Dennis K. Jeppesen, Aidan M. Fenix, Jeffrey L. Franklin, James N. Higginbotham, Qin Zhang, Lisa J. Zimmerman, Daniel C. Liebler, Jie Ping, Qi Liu, Rachel Evans, William H. Fissell, James G. Patton, Leonard H. Rome, Dylan T. Burnette, and Robert J. Coffey. Reassessment of exosome composition. *Cell*, 177(2):428–445.e18, April 2019.
- [101] N. Mayran. Annexin II regulates multivesicular endosome biogenesis in the degradation pathway of animal cells. *The EMBO Journal*, 22(13):3242–3253, July 2003.
- [102] Keitaro Hagiwara, Takeshi Katsuda, Luc Gailhouste, Nobuyoshi Kosaka, and Takahiro Ochiya. Commitment of annexin a2 in recruitment of microRNAs into extracellular vesicles. *FEBS Letters*, 589(24PartB):4071–4078, nov 2015.
- [103] Donald G. Phinney and Mark F. Pittenger. Concise review: MSC-derived exosomes for cell-free therapy. *Stem Cells*, 35(4):851–858, March 2017.
- [104] Jieyuan Zhang, Junjie Guan, Xin Niu, Guowen Hu, Shangchun Guo, Qing Li, Zongping Xie, Changqing Zhang, and Yang Wang. Exosomes released from human induced pluripotent stem cells-derived MSCs facilitate cutaneous wound healing by promoting collagen synthesis and angiogenesis. *Journal of Translational Medicine*, 13(1), February 2015.
- [105] Bin Zhang, Mei Wang, Aihua Gong, Xu Zhang, Xiaodan Wu, Yanhua Zhu, Hui Shi, Lijun Wu, Wei Zhu, Hui Qian, and Wenrong Xu. HucMSC-exosome mediated-wnt4 signaling is required for cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 33(7):2158–2168, May 2015.
- [106] Arsalan Shabbir, Audrey Cox, Luis Rodriguez-Menocal, Marcela Salgado, and Evangelos Van Badiavas. Mesenchymal stem cell exosomes induce proliferation and migration of normal and chronic wound fibroblasts, and enhance angiogenesis in vitro. *Stem Cells and Development*, 24(14):1635–1647, July 2015.
- [107] Massimiliano Gnecci, Zhiping Zhang, Aiguo Ni, and Victor J. Dzau. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation Research*, 103(11):1204–1219, November 2008.

- [108] Shuo Fang, Chen Xu, Yuntong Zhang, Chunyu Xue, Chao Yang, Hongda Bi, Xijing Qian, Minjuan Wu, Kaihong Ji, Yunpeng Zhao, Yue Wang, Houqi Liu, and Xin Xing. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cell-derived exosomal MicroRNAs suppress myofibroblast differentiation by inhibiting the transforming growth factor- β /SMAD2 pathway during wound healing. *Stem Cells Translational Medicine*, 5(10):1425–1439, July 2016.
- [109] Jacopo Burrello, Silvia Monticone, Chiara Gai, Yonathan Gomez, Sharad Kholia, and Giovanni Camussi. Stem cell-derived extracellular vesicles and immune-modulation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 4, August 2016.
- [110] Johann Mar Gudbergsson, Kasper Bendix Johnsen, Martin Najbjerg Skov, and Meg Duroux. Systematic review of factors influencing extracellular vesicle yield from cell cultures. *Cytotechnology*, 68(4):579–592, oct 2015.
- [111] Luciana Benedetti. Equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: cell growth characteristics and differentiation potential. Presentación de Póster en International Federation for Adipose Therapeutics and Science, 2010.
- [112] Luciana Benedetti. Utilización de células madre de tejido adiposo como alternativa para el tratamiento de fractura de tercer tarsal en un equino s.p.c. Presentación de Póster en Asociación Argentina de Veterinaria Equina, 2012.
- [113] Luciana Benedetti. Manejo de lesiones de tendones y ligamentos con células madre de tejido adiposo en 44 equinos. Presentación de Póster en Asociación Argentina de Veterinaria Equina, 2014.
- [114] Luciana Benedetti. Reporte de dos casos de laminitis severa tratados con células madre alógenas de tejido adiposo. Presentación de Póster en Asociación Argentina de Veterinaria Equina, 2015.
- [115] Luciana Benedetti. Treatment of five short bone articular fractures cases with allogeneic mesenchymal stem cells as unique therapy. Presentación de Póster en Asociación Brasileña de Terapias Celulares y Genéticas, 2015.
- [116] Johannes Schindelin, Ignacio Arganda-Carreras, Erwin Frise, Verena Kaynig, Mark Longair, Tobias Pietzsch, Stephan Preibisch, Curtis Rueden, Stephan Saalfeld, Benjamin Schmid, Jean-Yves Tinevez, Daniel James White, Volker Hartenstein, Kevin Eliceiri, Pavel Tomancak, and Albert Cardona. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7):676–682, June 2012.

- [117] Alejandra Suarez-Arnedo, Felipe Torres Figueroa, Camila Clavijo, Pablo Arbeláez, Juan C. Cruz, and Carolina Muñoz-Camargo. An image j plugin for the high throughput image analysis of in vitro scratch wound healing assays. *PLOS ONE*, 15(7):e0232565, July 2020.
- [118] Clotilde Théry, Sebastian Amigorena, Graça Raposo, and Aled Clayton. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current Protocols in Cell Biology*, 30(1), mar 2006.
- [119] E. I. Yakubovich, A. G. Polischouk, and V. I. Evtushenko. Principles and problems of exosome isolation from biological fluids. *Biochemistry (Moscow), Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 16(2):115–126, jun 2022.
- [120] Chang-Hui Shen. Quantification and analysis of proteins. In *Diagnostic Molecular Biology*, pages 187–214. Elsevier, 2019.
- [121] Yu-Shiuan Lin, Yin-Ju Chen, Stanley N. Cohen, and Tzu-Hao Cheng. Identification of TSG101 functional domains and p21 loci required for TSG101-mediated p21 gene regulation. *PLoS ONE*, 8(11):e79674, November 2013.
- [122] Katherine A Hajjar and Suba Krishnan. Annexin II. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 9(5):128–138, July 1999.
- [123] Pia Pužar Dominkuš, Matjaž Stenovec, Simona Sitar, Eva Lasič, Robert Zorec, Ana Plemenitaš, Ema Žagar, Marko Kreft, and Metka Lenassi. PKH26 labeling of extracellular vesicles: Characterization and cellular internalization of contaminating PKH26 nanoparticles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1860(6):1350–1361, jun 2018.
- [124] Catherine M Kolf, Elizabeth Cho, and Rocky S Tuan. *Arthritis Research & Therapy*, 9(1):204, 2007.
- [125] Carolina Blughermann, Ling Wu, Frank Petrigliano, David McAllister, Santiago Miriuka, and Denis A. Evseenko. Novel aspects of parenchymal-mesenchymal interactions: from cell types to molecules and beyond. *Cell Biochemistry and Function*, 31(4):271–280, jan 2013.
- [126] Seong-Eun Byun, Changgon Sim, Yoonhui Chung, Hyung Kyung Kim, Sungmoon Park, Do Kyung Kim, Seongmin Cho, and Soonchul Lee. Skeletal muscle regeneration by the exosomes of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Current Issues in Molecular Biology*, 43(3):1473–1488, oct 2021.

- [127] Stefano Capomaccio, Katia Cappelli, Cinzia Bazzucchi, Mauro Coletti, Rodolfo Gialletti, Franco Moriconi, Fabrizio Passamonti, Marco Pepe, Stefano Petrini, Samanta Mecocci, Maurizio Silvestrelli, and Luisa Pascucci. Equine adipose-derived mesenchymal stromal cells release extracellular vesicles enclosing different subsets of small RNAs. *Stem Cells International*, 2019:1–12, mar 2019.
- [128] Weizong Wang, Yixin Zhao, Huilin Li, Yujiao Zhang, Xiaomeng Jia, Cong Wang, Pengju Zhu, Jiangrong Wang, and Yinglong Hou. Exosomes secreted from mesenchymal stem cells mediate the regeneration of endothelial cells treated with rapamycin by delivering pro-angiogenic microRNAs. *Experimental Cell Research*, 399(1):112449, feb 2021.
- [129] Robert Soukup, Iris Gerner, Sinan Gültekin, Hayeon Baik, Johannes Oesterreicher, Johannes Grillari, and Florian Jenner. Characterisation of extracellular vesicles from equine mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(10):5858, May 2022.
- [130] William Edward Hotham, Charlotte Hannah Thompson, Karin Newell, Lin Szu-Ting, and Frances Henson. The isolation and characterisation of equine bone marrow stem cell derived extracellular vesicles – evidence of an anti-inflammatory action on chondrocytes. feb 2020.
- [131] Luisa Pascucci, Giulio Alessandri, Cecilia Dall'Aglio, Francesca Mercati, Paola Coliolo, Cinzia Bazzucchi, Sara Dante, Stefano Petrini, Giovanni Curina, and Piero Ceccarelli. Membrane vesicles mediate pro-angiogenic activity of equine adipose-derived mesenchymal stromal cells. *The Veterinary Journal*, 202(2):361–366, November 2014.
- [132] L. Pascucci, C. Dall'Aglio, C. Bazzucchi, F. Mercati, M.G. Mancini, A. Pessina, G. Alessandri, M. Giammarioli, G. Brunati, S. Dante, and P. Ceccarelli. Horse adipose-derived mesenchymal stromal cells constitutively produce membrane vesicles: a morphological study. *Histology and Histopathology*, (30):549–557, March 2015.
- [133] Annamaria Nigro, Annamaria Finardi, Marzia M. Ferraro, Daniela E. Manno, Angelo Quattrini, Roberto Furlan, and Alessandro Romano. Selective loss of microvesicles is a major issue of the differential centrifugation isolation protocols. *Scientific Reports*, 11(1), feb 2021.
- [134] Reka Agnes Haraszti, Rachael Miller, Matteo Stoppato, Yves Y. Sere, Andrew Coles, Marie-Cecile Didiot, Rachel Wollacott, Ellen Sapp, Michelle L. Dubuke, Xuni Li, Scott A. Shaffer, Marian DiFiglia, Yang Wang, Neil Aronin, and Anastasia Khvorova.

Bibliografia

Exosomes produced from 3d cultures of MSCs by tangential flow filtration show higher yield and improved activity. *Molecular Therapy*, 26(12):2838–2847, dec 2018.

- [135] Mehdi Dehghani, Shannon M. Gulvin, Jonathan Flax, and Thomas R. Gaborski. Systematic evaluation of PKH labelling on extracellular vesicle size by nanoparticle tracking analysis. *Scientific Reports*, 10(1), jun 2020.
- [136] Hong-Xu Chen, Fu-Chao Liang, Ping Gu, Bian-Ling Xu, Hong-Jun Xu, Wen-Ting Wang, Jia-Yang Hou, Dong-Xiao Xie, Xi-Qing Chai, and Sheng-Jun An. Exosomes derived from mesenchymal stem cells repair a parkinson's disease model by inducing autophagy. *Cell Death & Disease*, 11(4), apr 2020.

Este manuscrito corresponde a la versión final de la tesis de licenciatura titulada “Estudio de vesículas extracelulares provenientes de células mesenquimales equinas para su implementación en terapias regenerativas”.

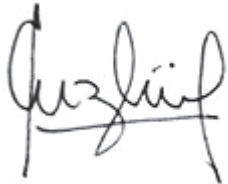
Autora: Mercedes Florencia Vautier

Firma:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MV' with a horizontal line through it.

Directora: Dra. Carolina Blüguermann

Firma:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'C. Blüguermann'.