



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Programa de Doctorado en Ciencias Veterinarias

**PRE-CONDICIONAMIENTO *in vitro* DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS  
DE TEJIDO ADIPOSO EQUINO, COMO HERRAMIENTA PARA POTENCIAR LA  
ADQUISICIÓN DE UNA MAYOR CAPACIDAD INMUNOMODULADORA**

JOEL GUSTAVO CABEZAS SALAZAR

Chillán-Chile

2018

Tesis para optar al  
grado de Doctor en Ciencias Veterinarias

Profesor Tutor: Dr. Fidel Ovidio Castro  
Dpto. de Ciencia Animal  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad de Concepción

PRECONDICIONAMIENTO *in vitro* DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES  
DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO EQUINO, COMO HERRAMIENTA PARA  
POTENCIAR LA ADQUISICIÓN DE UNA MAYOR CAPACIDAD  
INMUNOMODULADORA

**Aprobada por:**

Fidel Ovidio Castro Reboredo

Ing. Zootecnista, PhD

---

Profesor guía

Ángel Oñate Contreras

Inmunólogo, PhD

---

Evaluador interno

Carlos Escudero Orozco

Médico, MDPhD

---

Evaluador externo

Lleretny Rodríguez Alvarez

Lic. Microbiología, PhD

---

Evaluador interno



*A mis padres Magaly y Jorge,  
a mis abuelos Ana y Joel,  
a mis hermanos Fany, Cami y Diego  
y a Pamela*





*En algún lugar, algo increíble  
está esperando a ser descubierto.*

***Carl Sagan***

## AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho de este viaje para convertirme en Doctor, algo más llevadero. Primero quiero agradecer a mis padres Magaly y Jorge, a mis abuelos Ana y Joel, quienes siempre estuvieron atentos a mi andar por este proceso de formación, siempre apoyando de alguna u otra manera la posibilidad de conseguir mis sueños. Agradecer a Pamela, mi pareja quien ha estado coincidentemente al lado mio desde que comencé mi doctorado y ha sido un pilar fundamental para sobre llevar mi vida personal y académica. Quiero agrader profundamente a mis tutores y mentores entodos estos años que he pertenecido al laboratorio de Biotecnología Animal, Fidel y Lleretny, quienes me aceptaron y comenzaron a formar desde muy joven en la Universidad, con paciencia y sabiduría, es en gran parte que gracias a ellos esté consiguiendo estos logros, las enseñanzas, sus conocimientos, las palabras de apoyo en momentos difíciles, las felicitaciones en momentos de conseguir un logro, el apoyo incondicional durante todos estos años de estudio, son ivaluables y estaré eternamente agradecirdo. Tambien quiero agradecer a todos aquellos que de alguna manera fueron parte de mi viaje, a Fabiana Bresan de la Universidad de Sao Paulo, por su gran disposición, a Antonio Casado de la Universidad de Córdoba, por su energía y humildad, a Claudio Henriquez de la Universidad Austral, por su enorme espíritu y generosidad, todos ellos con gran expertiz en su área de estudio. Tambien agradecer a mis compañeros de laboratorio, José, Felipe, Ana, Pedro, Edwin, Diana, Alejandra, quienes jugaron un rol importante para mantenerme firme estos años, muchas gracias por sus momentos, sus palabras y esas conversaciones de pacillo con un café. Todos fueron parte de este proceso, todos han sido gestores de alguna manera de que este finalizando esta etapa, por su apoyo en momentos difíciles, fueron personas incondicionales y que lograron de alguna manera, motivar mi espirutu científico en aquellos momentos en que la moral estaba baja, es por eso que estoy enormemente agradecer.

También agradezco que este trabajo de investigación y tesis doctoral, fue financiado por fondos Gubernamentales de Fondo de Fomento al Desarrollo Científico y Tecnológico FONDEF, institución encargada de financiar proyectos de investigación que permitan vincular las instituciones de investigación, las empresas y otras entidades. Este trabajo se desarrolló en el marco del proyecto FONDEF IDeA código ID14I10234, a cargo del docente e investigador Fidel Ovidio Castro, que tuvo una duración de 4 años, abarcando el periodo desde 2014 a 2018.

## TABLA DE CONTENIDO

|   |             |
|---|-------------|
| <b>AGRADECIMIENTOS</b> .....  | <b>V</b>    |
| <b>TABLA DE CONTENIDOS</b> .....  | <b>VI</b>   |
| <b>RESUMEN</b> .....  | <b>X</b>    |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | <b>XI</b>   |
| <b>LISTA DE TABLAS</b> .....  | <b>XII</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS</b> .....   | <b>XIII</b> |
| <b>ABREVIACIONES</b> .....  | <b>XVII</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN</b> .....   | <b>1</b>    |
| <b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....   | <b>3</b>    |
| <b>Aspectos generales de la industria equina y la medicina regenerativa</b> ..... | <b>4</b>    |
| La industria equina .....   | 4           |
| Costos económicos asociados a la salud en la industria equina .....               | 4           |
| La medicina regenerativa y el equino .....  | 5           |
| <b>Características de las células madre</b> .....                                 | <b>6</b>    |
| Ontogenia de las células madre .....  | 6           |
| Células madre mesenquimales (MSC) .....   | 8           |
| Factores reguladores de la diferenciación .....                                   | 10          |
| Interacción de las MSC y los nichos .....   | 13          |
| Fuentes de obtención de MSC .....   | 13          |
| Características de las MSC derivadas de tejido adiposo .....                      | 14          |
| Aislamiento de las ASC .....  | 16          |
| Características biológicas de las ASC .....                                       | 16          |
| Características específicas de las ASC equinas .....                              | 17          |
| Uso de MSC equinas en medicina regenerativa .....                                 | 18          |
| <b>Inmunobiología de las células madre mesenquimales</b> .....                    | <b>21</b>   |
| Secreción de factores bioactivos de las MSC .....                                 | 21          |
| Inmunomodulación mediada por las MSC .....  | 22          |
| Producción de mediadores inmunomoduladores .....                                  | 25          |
| Precondicionamiento de las MSC .....  | 27          |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....   | <b>30</b>   |
| Hipótesis .....   | 30          |
| Objetivo general .....  | 30          |
| Objetivos específicos .....   | 30          |
| <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....   | <b>32</b>   |
| Lugar de trabajo .....  | 33          |
| Diseño experimental .....   | 33          |
| Detalles de los materiales y métodos .....  | 33          |

|  |           |
|--|-----------|
| 1. Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (eASC) obtenidas de muestras de caballo chileno .....  | 34        |
| 1.1. Animales .....  | 34        |
| 1.2. Colección de tejido adiposo y aislamiento de MSCs .....   | 34        |
| 1.3. Viabilidad celular .....  | 35        |
| 1.4. Estimación del tiempo de duplicación de la población (PDT) .....  | 35        |
| 1.5. Diferenciación de tri-linaje y tinción específica .....   | 35        |
| 1.5.1. Tinción de Alizarin red para diferenciación Osteogénica .....   | 36        |
| 1.5.2. Tinción de Alcian blue para diferenciación Condrogénica .....   | 36        |
| 1.5.3. Tinción de Oil red para diferenciación Adipogénica .....  | 36        |
| 1.6. Análisis de imágenes .....  | 36        |
| 1.7. Histología .....  | 37        |
| 1.8. Migración celular por ensayo de scratch .....   | 37        |
| 1.9. Análisis de marcadores de superficie de las eASC para marcadores multipotentes .....  | 37        |
| 2. Establecer la capacidad de dos moléculas (PGE <sub>2</sub> , Sustancia P) de estimular la expresión cuantificable de mediadores de la actividad inmunomoduladora de eASC <i>in vitro</i> .....                                      | 38        |
| 2.1. Análisis de RT-qPCR .....   | 38        |
| 3. Ensayo de la actividad inmunomoduladora <i>in vitro</i> de las eASC sometidas a las sustancias y combinaciones del objetivo anterior o no (náive), sobre linfocitos t en modelos de co-cultivo. seleccionar la mejor condición..... | 39        |
| 3.1. Linfoproliferación .....  | 39        |
| 3.1.1. Células mononucleares aisladas desde sangre periférica (PBMC) .....   | 39        |
| 3.1.2. Precondicionamiento de las eASC .....   | 40        |
| 3.1.3. Función inmunomoduladora de las MSC sobre poblaciones de PBMC .....   | 40        |
| 3.1.4. Ensayo de BrdU para evaluar la proliferación de poblaciones de PBMC .....   | 40        |
| 3.2. Análisis de marcadores para linfocitos T reguladores .....  | 41        |
| 4. Evaluar el efecto de los tratamientos precondicionantes sobre la actividad biológica intrínseca (no inmune) de las eASC y análisis de tri-potencia diferenciativa <i>in vitro</i> .....   | 41        |
| 4.1. Capacidad tripotente de las eASC precondicionadas .....   | 41        |
| 4.2. Inmunofenotipo de las eASC precondicionadas .....   | 41        |
| 5. Establecer mediante secretómica, el patrón de secreción global y diferencial de eASC precondicionadas con PGE <sub>2</sub> y SP vs las eASC vírgenes, de la mejor condición seleccionada en el objetivo 2.....                      | 42        |
| 5.1. Análisis de proteínas secretables .....   | 42        |
| 5.2. Identificación de proteínas de la digestión en solución (proteómica de Shotgun) .....   | 42        |
| 5.3. Análisis bioinformático .....   | 44        |
| 6. Análisis estadístico.....   | 44        |
| <b>RESULTADOS .....</b>  | <b>45</b> |
| 1. Aislamiento y caracterización de las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo (eASC) obtenidas de muestras de caballo chileno .....  | 46        |
| 1.1. Aislamiento y cultivo de las eASC .....   | 46        |
| 1.2. Tiempo de duplicación de la población (PDT) .....   | 47        |

|   |           |
|---|-----------|
| 1.3. Diferenciación .....   | 47        |
| 1.4. Ensayo de migración por Scratch .....  | 48        |
| 1.5. Patrón de marcadores de superficie de las eASC .....   | 49        |
| 2. Evaluar el efecto de los tratamientos precondicionantes sobre la actividad biológica intrínseca (no inmune) de las eASC y análisis diferenciación <i>in vitro</i> . .....  | 51        |
| 2.1. Patrón inmunofenotípico de las eASC precondicionadas .....   | 51        |
| 2.2. Diferenciación tripotente en eASC precondicionadas .....   | 52        |
| 3. Ensayar la actividad inmoduladora <i>in vitro</i> de las eASC sometidas a las moléculas y sus combinaciones del objetivo anterior o no (vírgenes), sobre PBMC en modelos de co-cultivo. Seleccionar la mejor condición ..... | 57        |
| 3.1. Evaluación del efecto mitogénico del LPS y Poly I:C sobre PBMC .....   | 57        |
| 3.2. Efecto antiproliferativo de los tratamientos precondicionantes .....   | 61        |
| 3.3. Inducción de PBMC hacia células CD4 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> y FOXP3 <sup>+</sup> .....  | 63        |
| 4. Establecer la capacidad de PGE <sub>2</sub> y SP para estimular la expresión cuantificable de mediadores de la actividad inmunomoduladora de eASC <i>in vitro</i> .....  | 67        |
| RT-qPCR .....   | 67        |
| 5. Establecer mediante secretómica, el patrón de secreción global y diferencial de eASC precondicionadas con PGE <sub>2</sub> y SP vs las eASC vírgenes, de la mejor condición seleccionada en el objetivo 2 .....              | 69        |
| 5.1. Patrón de secreción global de las eASC precondicionadas .....  | 69        |
| 5.2. Efecto del precondicionamiento en la participación de las funciones moleculares y procesos biológicos de las proteínas secretadas por las eASC .....   | 70        |
| 5.3. Participación individual de las proteínas asociadas a procesos del SI .....  | 82        |
| 5.4. Evaluación del patrón de secreción individual de las eASC asociado al sistema inmune, en las células nativas y en las células sometidas al precondicionamiento .....   | 83        |
| 5.5. Proteínas asociadas al sistema inmune que son compartidas entre los diferentes tratamientos y el control .....   | 84        |
| 5.6. Asociación de las proteínas secretadas con su participación en rutas metabólicas (pathways analysis) .....   | 87        |
| Productividad .....   | 89        |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>   | <b>90</b> |
| Caracterización de los atributos multipotentes .....  | 91        |
| Características de las eASC en cultivo .....  | 91        |
| Tiempo de doblaje celular .....   | 92        |
| Capacidad de diferenciación tripotentes de las eASC no precondicionadas .....   | 92        |
| Capacidad migratoria .....  | 93        |
| Inmunofenotipo de las eASC .....  | 94        |
| Precondicionamiento de las eASC .....   | 95        |
| Evaluación de la mantención de las propiedades biológicas en las eASC precondicionadas .....  | 97        |
| Análisis de los transcritos en las eASC precondicionadas .....  | 98        |

|  |            |
|--|------------|
| Propiedades inmunológicas de las eASC.....   | 99         |
| Inhibición de PBMC activadas .....   | 99         |
| Inducción de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> , CD25 <sup>+</sup> y FOXP3 <sup>+</sup> .....      | 100        |
| Secretoma: inducción de factores paracrinos a través del preconditionamiento de las eASC ..... | 102        |
| Patrón secretor de las eASC .....  | 104        |
| <b>CONCLUSIÓN.....</b>   | <b>111</b> |
| <b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....</b>  | <b>113</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>131</b> |



## RESUMEN

La industria equina, corresponde a un sector económico altamente activo dada la cantidad de equinos que hay en el mundo y los variados deportes que se practican con estos. Cada animal lesionado genera grandes pérdidas económicas a esta industria y al propietario, dado que muchas de estas lesiones solo cuentan con alternativas terapéuticas de tipo paliativo, principalmente farmacológicas. Es por ello que en las últimas décadas se han postulado a las células madre mesenquimales adultas (MSC), en lo que conoce como terapia regenerativa, como una alternativa terapéutica de carácter más resolutivo, ya que se han postulado como las responsables de la renovación celular en tejidos altamente regenerativos, lo que las convierte en candidatas para tratar tejidos con pobre capacidad regenerativa. Las MSC se han identificado en tejidos de muchas especies, incluidos los humanos, los roedores, las mascotas y algunos animales de granja. Pero en los últimos años se ha observado que estas células provenientes desde un donante, pueden llegar a generar, rechazo contra el injerto, por lo cual es de gran interés encontrar una estrategia para generar células con un licenciamiento inmunológico más robusto.

El objetivo de este trabajo fue aislar MSC desde tejido adiposo y evaluar atributos biológicos e inmunobiológicos a través del acondicionamiento con PGE<sub>2</sub>, Sustancia P e IFN $\gamma$  (molécula acondicionante canónica). Aquí aislamos y caracterizamos con éxito las MSC derivadas de tejido adiposo. Dichas células mostraron morfología similar a los fibroblastos, crecieron en plástico, duplicaron los tiempos de población de  $46.4 \pm 3.38$  h, se diferenciaron en tres linajes (osteogénico, condrogénico y adipogénico) después de inducciones apropiadas, migraron hacia la atracción de Suero Fetal Bovino y exhibieron un patrón de marcadores de superficie comúnmente aceptados para caballos MSC. Todas estas son propiedades de MSC. Las células fueron acondicionadas con PGE<sub>2</sub>, SP e IFN $\gamma$  y se evaluó la capacidad de las MSC de regular poblaciones de PBMC y la secreción de proteínas bajo estos estímulos.

El acondicionamiento resultó en una mantención de las propiedades biológicas de las MSC virgen al acondicionarlas con PGE<sub>2</sub> y SP, pero no así con IFN $\gamma$  y un aumento en las propiedades inmunobiológicas de las MSC bajo los estímulos con PGE<sub>2</sub> y SP, tratamiento que resultó ser el que mayor efectos inmunomoduladores generó sobre las MSC, como una mayor capacidad de inhibir poblaciones de PBMC activadas, producción de linfocitos T reguladores (CD4, CD25 y FOXP3)<sup>+</sup> y un patrón de secreción de proteínas totalmente diferente al estado virgen de éstas células, resultando en el primer análisis conocido de este tipo en MSC de equinos.

En conclusión, las MSC derivadas de tejido adiposo equino, pueden ser acondicionadas in vitro, con el tratamiento de PGE<sub>2</sub> y SP, para adquirir características que le otorguen un licenciamiento inmunológico más potente sin perder sus características biológicas de MSC. Posiblemente IFN $\gamma$ , la molécula canónica para otorgar este licenciamiento en MSC, no resulta ser para las MSC equinas.

**Palabras clave:** Células madre mesenquimales, inmunomodulación, acondicionamiento, Prostaglandina E<sub>2</sub>, Sustancia P.

## ABSTRACT

The equine industry is a highly active economic sector because of the large number of horses in the world and the various sports that are practiced with them. Each horse that is injured, generates great economic losses to this industry and to the owner, because many of these injuries only have reparation-type treatment alternatives, which are mainly pharmacological. It is because in the last decades adult mesenchymal stem cells (MSC) have been postulated, in what is known as regenerative therapy, because they have been postulated as responsible for cellular renewal in highly regenerative tissues, which makes them in candidates to treat tissues with poor regenerative capacity. MSCs have been identified in tissues of many species, including humans, rodents, pets and some farm animals. But in recent years it has been observed that these cells from a donor, can generate, rejection against the graft, which is of great interest to find a strategy to generate cells with a more robust immunological licensing.

The objective of this work was to isolate MSC from adipose tissue and evaluate biological and immunobiological attributes through preconditioning with PGE<sub>2</sub>, Substance P and IFN $\gamma$  (canonical preconditioning). Here we isolate and characterize successfully the MSCs derived from adipose tissue. These cells showed morphology similar to the fibroblasts, grew in plastic, doubled the population times of  $46.4 \pm 3.38$  h, differentiated into three lineages (osteo, chondro and adipogenic) after appropriate inductions, migrated towards Fetal Fetal Suction and They exhibited a pattern of commonly accepted surface markers for MSC horses. These are all MSC properties. The cells were preconditioned with PGE<sub>2</sub>, SP and IFN $\gamma$  and the capacity of the MSCs to regulate populations of T lymphocytes and the secretion of proteins under these stimuli was evaluated.

The preconditioning resulted in a maintenance of the biological properties of the naïve MSCs when preconditioning them with PGE<sub>2</sub> and SP, but not with IFN $\gamma$  and an increase in the immunobiological properties of the MSCs was observed under the stimuli with PGE<sub>2</sub> and SP, treatment that turned out to be the one that enhanced immunomodulatory effects on MSCs, such as a greater ability to inhibit populations of activated T lymphocytes, production of regulatory T lymphocytes (CD4, CD25 and FOXP3)<sup>+</sup> and the pattern of protein secretion was totally different from the naïve state of these cells, resulting in the first analysis of this type in equine MSCs.

In conclusion, MSCs derived from equine adipose tissue can be preconditioned in vitro, with the treatment of PGE<sub>2</sub> and SP, to acquire characteristics that give them a more powerful immunological license without losing their biological characteristics of MSC. Possibly IFN $\gamma$ , the canonical molecule to provide this in MSC licensing, not be for equine MSC.

**Key words:** Mesenchymal stem cells, immunomodulation, preconditioning, Prostaglandin E2, Substance P.

## LISTA DE TABLAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1:</b> principales mediadores inmunomoduladores detectados en diferentes especies de mamíferos...   | 25 |
| <b>Tabla 2.</b> Lista de los anticuerpos utilizados para el análisis de marcadores de superficie de MSCs equinas, a través de citometría de flujo .....  | 38 |
| <b>Tabla 3:</b> Pares de partidores utilizados para el análisis de PCR con sus respectivas secuencias y temperaturas de anilling (TA).....   | 39 |
| <b>Tabla 4:</b> Lista de los anticuerpos utilizados para el análisis de marcadores de superficie de linfocitos T reguladores, medidos a través de citometría de flujo.....   | 41 |
| <b>Tabla 5:</b> Porcentajes y desviaciones estándar de los marcadores positivos y negativos para las eASC, medidos por citometría de flujo comparadas contra el control negativo que corresponden a células sin marcar ( $P<0,05$ ) .....  | 49 |
| <b>Tabla 6:</b> Listado de 65 proteínas involucradas en procesos de RP o RN en el SI, secretadas por las eASC ante los diferentes tratamientos. Esta lista se usó como base para la confección del diagrama de Venn de la figura 34. Las X indican ausencia de esa proteína en el secretoma cada condición y el ✓ indica presencia de la proteína en el secretoma de cada condición..... | 85 |

## ANEXOS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla 7:</b> Set de proteínas compartidas por todos los tratamientos precondicionantes utilizados en el experimento, se describe su nombre sistemático y su ID (Nombre del gen).....   | 132 |
| <b>Tabla 8:</b> Proteínas compartidas entre los diferentes tratamientos precondicionantes y el control .....  | 133 |
| <b>Tabla 9:</b> Lista de proteínas secretadas de forma independientes por el control y los tratamientos precondicionantes .....   | 134 |
| <b>Tabla 10:</b> Regulaciones biológicas asociadas con inmunidad según GO, de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de precondicionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos .....  | 136 |
| <b>Tabla 11:</b> Regulaciones positivas asociadas con la inmunidad según GO de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de precondicionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos ..... | 137 |
| <b>Tabla 12:</b> Regulaciones negativas asociadas con la inmunidad según GO, de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de precondicionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos..... | 138 |

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Grados de potencia de las células madre en diferentes estadios del desarrollo, desde el cigoto el cual es totipotente, pasando por el blastocisto, en el que sus células son pluripotentes, hasta un organismo adulto donde las células que lo conforman son de carácter multipotente y dan origen a los diferentes tipos celulares de un organismo (tomado y adaptado de Hayes et al., 2012) ..... 7
- Figura 2:** Esquema del desarrollo de las células madre en el organismo desde el estadio de cigoto hasta células completamente diferenciadas y con funciones específicas. ESC: embryonic stem cells, NSC: neural stem cells, EpSC: epidermal stem cells, MSC: mesenchymal stem cells, HSC: hematopoietic stem cells (Tomado y adaptado de Osteocord bone from blood. Copyrigh BTR©) ..... 8
- Figura 3:** Representación esquemática de la diferenciación de las MSC hacia linajes mesodérmicos. Las células pueden diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos, por medio de la expresión de factores maestros para cada linaje (Tomado y adaptado de Beederman et al., 2013) ..... 12
- Figura 4:** Eventos claves de la diferenciación desde MSC a adipocitos en dependencia de la existencia de factores maestros de la diferenciación adipogénica, donde se puede apreciar los tipos de células que coexisten en la grasa blanca. (tomado y adaptado de Dani y Billon, 2012) ..... 15
- Figura 5:** Citoquinas liberadas por las MSC y sus efectos paracrinos en diferentes escenarios (Tomada y modificada de Singer y Caplan, 2011)..... 22
- Figura 6:** Diseño experimental del estudio de la inmunobiología de las eASC sometidas a preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> y SP. Fuente: elaboración propia..... 34
- Figura 7:** Morfología fibroblastoide representativa de MSCs aisladas de tejido adiposo en un aumento de 10X (a) y 20X (b) en alta confluencia. Viabilidad de las células que se usaron en el estudio, en verde (naranja acridina) y azul (Nuc blue) en un aumento de 10X (C) Y 40X (D)..... 46
- Figura 8:** Diferenciación de los tres linajes de las eASC en el día 21. (a) Células teñidas no inducidas para el colorante respectivo, imagen representativa de tinción con rojo de alizarina. (b) Los depósitos de hidroxapatita después de teñir con rojo de alizarina son indicativos de diferenciación osteogénica. (c) Los glucosaminoglucanos teñidos con azul de Alcian indican una diferenciación condrogénica. (d) Las gotas de aceite se tiñen de rojo aceite en las MSC que se diferencian hacia los adipocitos. .... 47
- Figura 9:** Evaluación de la capacidad de migración in vitro de eASC. (a) Visualización bajo microscopio del área de llenado real para ambos tipos de células. El área coloreada de verde, corresponde al rasguño, la ampliación es de 4X. (b) Porcentaje de llenado del rasguño en diferentes puntos de tiempo para eASC. (b) Los valores se presentan como el promedio de dos repeticiones biológicas y tres réplicas técnicas. \*\*\*\* (p <0,05) ..... 48
- Figura 10:** (a) Porcentajes y desviación estándar de la expresión de los marcadores de superficie analizados por citometría de flujo en eASC. AF: autofluorescencia de células no marcadas. (b) Histogramas representativos de los marcadores de superficie para eASC ..... 49
- Figura 11:** Esquema representativo de los histogramas con los marcadores evaluados en las eASC posterior al preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/ SP, solamente con SP e IFN $\gamma$  ..... 51
- Figura 12:** Gráfico de barras de los porcentajes de positividad de los marcadores de superficie analizados posterior al preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP, SP e IFN $\gamma$  , donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a los porcentajes de expresión de los marcadores analizados ..... 52
- Figura 13:** Imágenes microfotográficas magnificadas de las diferenciaciones osteogénicas de las células preconditionadas. a) eASC control de la diferenciación (células que no fueron expuestas a medio preconditionado de osteogénesis), b) células control (expuestas a medio condicionado de osteogénesis), c)

células expuestas a acondicionamiento con PGE<sub>2</sub>, d) PGE<sub>2</sub>/SP, e) SP y f) a IFN $\gamma$ . El color rojo corresponde a la tinción de la hidroxiapatita con Rojo alizarina..... 53

**Figura 14:** Análisis de imágenes representativas de la diferenciación osteogénica de eASC acondicionadas con PGE<sub>2</sub> (b); PGE<sub>2</sub>/SP (c); SP (d), IFN $\gamma$  (e); no acondicionadas pero sometidas a diferenciación osteogénica, (a) no acondicionadas y (f) sin haber sido sometidas a diferenciación..... 53

**Figura 15:** Gráficos de barras de los porcentajes de cobertura de matriz extracelular teñida con Alizarin red en las células sometidas a diferentes condiciones acondicionantes y el control. Donde se puede apreciar la diferencia significativa encontrada solamente en las células sometidas a la diferenciación osteogénica que estuvo bajo la influencia de IFN $\gamma$  respecto al resto de los tratamientos y el control..... 54

**Figura 16.** Diferenciación condrogénica, imágenes representativa de las micromasas que se formaron a partir de la inducción hacia condrocitos al día 21 post inducción, donde podemos apreciar en la imagen a) control de la diferenciación, b) control del tratamiento, c) PGE<sub>2</sub>, d) PGE<sub>2</sub>/SP, e) SP y f) IFN $\gamma$ ..... 55

**Figura 17:** Cortes histológicos de las micromasas sometidas a diferenciación condrogénica que se formaron a los 21 días de inducción hacia condrocitos. Se puede apreciar en las imágenes (a-e), los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina con un aumento de 10X, (f-j) con un aumento de 40X. Las imágenes (a y f) corresponden al control del tratamiento, (b y g) al acondicionamiento con PGE<sub>2</sub>, (c y h) SP, (d e i) PGE<sub>2</sub>/SP y (e y j) a IFN $\gamma$ . Las imágenes de la tercera y cuarta fila, corresponden a los cortes histológicos teñidos con Alcian blue PAS (k-o) con un aumento de 10X y (p-t) con un aumento de 40X. Las imágenes (k y p) corresponden al control del tratamiento, (l y q) al acondicionamiento con PGE<sub>2</sub>, (m y r) SP, (n y s) PGE<sub>2</sub>/SP y (o y t) a IFN $\gamma$  ..... 55

**Figura 18:** Diferenciación adipogénica de las eASC sometidas a acondicionamientos y sus respectivos controles. (a) control de la diferenciación (células sin estímulos de diferenciación adipogénica), (b) células sin ser sometidas a acondicionamiento pero sí estuvieron bajo el estímulo de la diferenciación adipogénica, (c) células acondicionadas con PGE<sub>2</sub> y sometidas a diferenciación adipogénica, (d) células acondicionadas con PGE<sub>2</sub>/SP y sometidas a diferenciación adipogénica, (e) células acondicionadas con SP y sometidas a diferenciación adipogénica y (f) células acondicionadas con IFN $\gamma$  y sometidas a diferenciación adipogénicas. Se puede apreciar la formación de vacuolas de lípidos teñidas de color rojo por medio del Oil red. Aumento de 40X, barra de 100 $\mu$ m ..... 56

**Figura 19:** Dot plot representativos de la citometría de flujo de (a) leucocitos y de (b) linfocitos aislados posterior al gradiente de densidad de Ficoll, donde se puede apreciar en el cuadrante UC R1, todas las poblaciones de leucocitos y eritrocitos presentes en la sangre y en el cuadrante BL1-A R1, las células aisladas por el gradiente de densidad que corresponden solamente a poblaciones de células mononucleares o linfocitos ..... 57

**Figura 20:** Gráficos de barra con la comparación de la capacidad del LPS y Poly I:C para estimular la proliferación de PBMC vírgenes, con sus respectivas desviaciones estándar, para linfocitos bajos y linfocitos altos, medidos por citometría de flujo y marcados con BrdU (\*P<0,05). AF corresponde a la autofluorescencia de los linfocitos..... 58

**Figura 21:** Ensayo de proliferación de linfocitos activados con mitógenos y co-cultivados con eASC vírgenes. Porcentaje de proliferación y desviaciones estándar del efecto de los mitógenos LPS y Poly I:C sobre poblaciones de linfocitos Tn y el efecto de las eASC vírgenes en la supresión de la proliferación de linfocitos. Las barras indican diferencias entre linfocitos altos y bajos (\*P<0,05) ..... 59

**Figura 22:** Imágenes de microscopía con un aumento de 10X, donde se observa el efecto de los mitógenos sobre poblaciones de PBMC (b y c) y el efecto del co cultivo con las eASC (d-e). El efecto de los mitógenos sobre la proliferación de los PBMC se puede apreciar para (b) LPS, (c) Poly I:C y para el co-cultivo con las eASC vírgenes y PBMC estimulados con (d) LPS y (e) Poly I:C y su respectivo (a) control (linfocitos Tn). ..... 60

- Figura 23:** Gráficos con los porcentajes de positividad a BrdU, donde se observa la capacidad inhibitoria de las eASC vírgenes y preconicionadas sobre los PBMC vírgenes y estimulados con (a) LPS y (b) Poly I:C (\*P<0,05). AF corresponde a la autofluorescencia de los linfocitos ..... 62
- Figura 24:** Panel representativo del cambio de fenotipo de PBMC de un animal sano (linfocitos bajos) a Treg (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, cuadrante superior derecho en cada plot (a-m). Panel superior (b-g; PBMC estimulados con LPS), panel inferior (h-m; PBMC estimulados con Poly I:C). Los detalles de los tratamientos de los PBMC son: PBMC sin MSC (b y h); PBMC co-cultivados con eMSC naïve (c e i); con MSC+ PGE<sub>2</sub> (d y j); con PGE<sub>2</sub> + SP (e y k); con SP (f y l); con IFN $\gamma$  (g y m). Panel a: autofluorescencia de los PBMC vírgenes ..... 64
- Figura 25:** Panel representativo del cambio de fenotipo de PBMC vírgenes de un animal enfermo (linfocitos alto) a Treg (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, cuadrante superior derecho en cada plot (a-m). Panel superior (b-g; PBMC estimulados con LPS), panel inferior (h-m; PBMC estimulados con Poly I:C). Los detalles de los tratamientos de los PBMC son: PBMC sin MSC (b y h); PBMC co-cultivados con eMSC naïve (c e i); con MSC+ PGE<sub>2</sub> (d y j); con PGE<sub>2</sub> + SP (e y k); con SP (f y l); con IFN $\gamma$  (g y m). Panel a: autofluorescencia de los PBMC vírgenes ..... 65
- Figura 26:** Gráficos con los porcentajes de positividad a CD25 y FOXP3, donde se observa la capacidad del cambio de fenotipo hacia iTreg por parte de las eASC vírgenes y preconicionadas sobre PBMC vírgenes y estimulados con (a) LPS y (b) Poly I:C (\* P<0,05) ..... 66
- Figura 27:** Gráficos de los transcriptos analizados por RT-qPCR, indicando sus DS y sus fold change, para (a) PGES, (b) IL-6, (c) IL-1A, (d) TNF $\alpha$  y (e) IL-8 ..... 67
- Figura 28.** Número de proteínas totales y secretables analizadas en cada uno de los tratamientos ..... 69
- Figura 29.** Diagrama de Venn, donde se aprecia la secreción global de las eASC sometidas a los diferentes tratamientos de preconicionamiento junto al número de proteínas que se comparten y se secretan de forma individual ..... 70
- Figura 30.** Análisis de las funciones moleculares y procesos biológicos en los cuales están involucradas las proteínas analizadas según la predicción de la base de datos online de la herramienta PANTHER y sus GO ..... 72, 73, 74, 75
- Figura 31.** Redes de asociación y co-expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el control evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias de las eASC no tratadas, (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>, (c) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (d) proteínas compartidas con IFN $\gamma$  y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos ..... 76
- Figura 32.** Redes de asociación y co expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el tratamiento preconicionante con PGE<sub>2</sub> evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias del tratamiento con PGE<sub>2</sub>, (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (c) proteínas compartidas con IFN $\gamma$ , (d) proteínas compartidas con el control y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos ..... 77
- Figura 33.** Redes de asociación y co expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el tratamiento preconicionante con PGE<sub>2</sub>/SP evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias del tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP, (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (c) proteínas compartidas con IFN $\gamma$ , (d) proteínas compartidas con el control y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos ..... 78
- Figura 34.** Redes de asociación y co expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el tratamiento preconicionante de IFN $\gamma$  evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias del tratamiento con IFN $\gamma$ , (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>, (c) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (d) proteínas compartidas con el control y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos ..... 79
- Figura 35.** Número de proteínas secretadas por cada tratamiento que participan en las diferentes RP del sistema inmune ..... 81

|   |        |
|---|--------|
| <b>Figura 36.</b> Número de proteínas secretadas por cada tratamiento que participan en las diferentes RN del sistema inmune .....  | 81     |
| <b>Figura 37.</b> Número de RP del sistema inmune en las que participan cada una de las proteínas secretadas por los diferentes tratamientos según las predicciones del GO .....  | 82     |
| <b>Figura 38.</b> Número de RN del sistema inmune en las que participan cada una de las proteínas secretadas por los diferentes tratamientos según las predicciones del GO .....  | 83     |
| <b>Figura 39:</b> Diagrama de Venn, de las proteínas involucradas en procesos del SI tanto en RP como en RN, secretadas por los diferentes tratamientos, donde se aprecia las proteínas que fueron secretadas de forma individual y las que son compartidas por los distintos tratamientos y el control .....   | 85     |
| <b>Figura 40:</b> Esquema del modelo propuesto de participación de las eASC en diferentes procesos de regulaciones negativas y positivas del sistema inmune en dependencia del tratamiento aplicado, el cual se muestra en la parte superior de la tabla y fueron: control o estado vírgenes de las eASC, acondicionamiento con PGE <sub>2</sub> , acondicionamiento con PGE <sub>2</sub> /SP y acondicionamiento con IFN $\gamma$ . Las regulaciones, negativas o positivas son tomadas de la herramienta de predicción GO de STRING ..... | 86     |
| <b>Figura 41:</b> Análisis de rutas metabólicas usando REACTOME. Se destaca la participación de las proteínas en diferentes rutas en (a) el control, (b) el tratamiento acondicionante con PGE <sub>2</sub> , (c) con PGE <sub>2</sub> /SP y (d) con IFN $\gamma$ .....   | 88, 89 |

## ANEXO

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 42:</b> Esquema resumen: Las células provenientes desde a) un equino donante, b) son aisladas y cultivadas in vitro. Una vez que se cuenta con una apropiada concentración de células, estas son c) acondicionadas con PGE <sub>2</sub> combinada con SP. En un estado d) virgen, las células secretan proteínas asociadas principalmente al sistema inmune innato, mientras que e) las células acondicionadas, secretan proteínas que participan en el sistema inmune innato y en el sistema inmune adaptativo. Dentro de los fenómenos que se generan encontramos principalmente f) funciones inmunomoduladoras sobre poblaciones de células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B. En la g) inmunidad innata junto a efectos sobre células, se secretan proteínas que están involucradas en la respuesta de defensa contra patógenos, activación del complemento y proteínas bactericidas. Mientras que en h) sistema inmune adaptativo, son efectos principalmente celulares los que se generan, como el bloqueo de la proliferación de linfocitos T CD4+, bloqueo de la diferenciación terminal de linfocitos B, bloqueo de la diferenciación desde linfocitos T CD8+ hacia linfocitos T citotóxicos y el cambio de genotipo desde linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reg. A pesar de los resultados obtenidos, i) es necesario ahondar aun más en las proteínas encontradas en el acondicionamiento de PGE <sub>2</sub> y SP, las cuales, según la literatura, cuentan con funciones importantes, que le otorgan a la terapia celular, abarcar una mayor cantidad de procesos inmunológicos y de esta manera, j) poder utilizar esta herramienta para el uso de células alogénicas (derivadas de un donante) o sus derivados secretantes como tratamiento. .... | 140 |
|---|-----|

## ABREVIACIONES

|  |  |
|--|--|
| <b><math>\alpha</math>-SMAD:</b> Small Mothers Against Decapentaplegic       | <b>HSC:</b> Hematopoietic stem cells   |
| <b>BMP:</b> Bone Morphogenetic Protein                                       | <b>IDO:</b> Indolamine 2,3-dioxygenase 1   |
| <b>CCL19:</b> C-C motif ligand 19  | <b>IFN<math>\gamma</math>:</b> Inteferon gamma                                       |
| <b>CCL21:</b> C-C motif Ligand 21  | <b>IGF:</b> Insulin growth factor  |
| <b>CCR7:</b> C-C chemokine receptor type 7                                   | <b>IL-1:</b> Interleukin-1   |
| <b>CD1a:</b> CD1a molecule   | <b>IL-4:</b> Interleukin-4   |
| <b>CD4:</b> T-cell Surface glycoprotein CD4                                  | <b>IL-5:</b> Interleukin-5   |
| <b>CD8:</b> T- cell Surface glycoprotein CD8                                 | <b>IL-6:</b> Interleukin-6   |
| <b>CD11b:</b> Integrin alpha-M   | <b>IL-8:</b> Interleukin-8   |
| <b>CD14:</b> Monocyte differentiation antigen CD14                           | <b>IL-10:</b> Interleukin-10   |
| <b>CD19:</b> B-lymphocyte antigen CD19                                       | <b>IL-11:</b> Interleukin-11   |
| <b>CD24:</b> Signal transducer CD24  | <b>IL-12:</b> Interleukin-12   |
| <b>CD25:</b> Interleukin-2 receptor subunit alpha                            | <b>IL-13:</b> Interleukin-13   |
| <b>CD29:</b> Integrin beta-1   | <b>iNOS:</b> Nitric oxide synthase inducible   |
| <b>CD31:</b> platelet endothelial cell adhesion molecule                     | <b>ISSCR:</b> International Society for Stem Cells Research                          |
| <b>CD34:</b> Hematopoietic progenitor cell antigen CD34                      | <b>JNK:</b> c-Jun NH2-terminal kinase  |
| <b>CD40:</b> CD40 ligand   | <b>LIF:</b> Leukemia inhibitory factor   |
| <b>CD44:</b> CD44 antigen  | <b>LPS:</b> Lipopolisacarido   |
| <b>CD45:</b> Receptor-type tyrosine-protein phosphatase C                    | <b>M-CSF:</b> Macrophage colony-stimulating factor                                   |
| <b>CD54:</b> Intracellular adhesion molecule 1                               | <b>MAPK:</b> Mitogen-activated protein kinases                                       |
| <b>CD73:</b> 5'-nucleotidase   | <b>MCP-1:</b> Monocyte chemoattractan protein-1                                      |
| <b>CD79a:</b> B-cell antigen receptor complex-associated protein alpha chain | <b>mESC:</b> Mouse embryonic stem cells  |
| <b>CD80:</b> T-lymphocyte activation antigen CD80                            | <b>MHC:</b> Mayor histocompatibility complex   |
| <b>CD86:</b> T-lymphocyte activation antigen CD86                            | <b>MRFI:</b> Peptide chain release factor 1, mitochondrial                           |
| <b>CD90:</b> Thy-1 membrane glycoprotein                                     | <b>NANOG:</b> Homeobox protein NANOG   |
| <b>CD105:</b> Endoglin   | <b>NELL-1:</b> Protein kinase C-binding protein NELL1                                |
| <b>CD106:</b> Vascular cell adhesion protein 1                               | <b>NK:</b> Natural Killer  |
| <b>CD117:</b> Mast/stem cell growth factor recepto kit                       | <b>NKG2D:</b> NKG2-D type II integral membrane protein                               |
| <b>CD132:</b> Cytokine receptor common subunit gamma                         | <b>NKp30:</b> Natural cytotoxicity triggering receptor 3                             |
| <b>CD138:</b> Syndecan-1   | <b>NKp44:</b> Natural cytotoxicity triggering receptor 2                             |
| <b>CD244:</b> Naturall killer cell receptor 2B4                              | <b>OCT4:</b> Octamer-binding transcription factor 4                                  |
| <b>COX2:</b> Cytochrome c oxidase subunit 2                                  | <b>PBS:</b> Phosphate-buffered saline  |
| <b>CXCL-1:</b> Growth-regulated alpha protein                                | <b>PDGF:</b> PLatelet-derived growth factor  |
| <b>CXCL12:</b> Stromal cell-derived factor 1                                 | <b>PGE<sub>2</sub>:</b> Prostaglandina E2  |
| <b>CXCL13:</b> C-X-C motif chemokine 13                                      | <b>Poly I:C:</b> Polyinosinic:polycytidylic acid, sodium salt                        |
| <b>CXCR4:</b> C-X-C chemokine receptor type4-A                               | <b>PPAR<math>\gamma</math>:</b> Peroxisome proliferator-actived receptor gamma       |
| <b>CXCR5:</b> C-X-C chemokine receptor type 5                                | <b>RANTES:</b> Regulated on activation, normal T cells expressed and secreted (CCL5) |
| <b>DC:</b> Dendritic cells   | <b>RunX:</b> Runt-related transcription factor                                       |
| <b>Dll:</b> Delta-like protein   | <b>SCF:</b> Stem cell factor   |
| <b>EMA:</b> European Medicine Agency   | <b>SDF-1:</b> Stromal cell-derived factor 1  |
| <b>ERK:</b> Extracellular signal-regulated kinases                           | <b>SOX9:</b> Transcription factor SOX9   |
| <b>FDA:</b> Food and Drug Administration                                     | <b>SP:</b> Sustancia P   |
| <b>FGF:</b> Fibroblast growth factor   | <b>SSEA3:</b> Stage specific embryonic antigen 3                                     |
| <b>FOXP3:</b> Forkhead box protein P3  | <b>SSEA4:</b> Stage specific embryonic antigen 4                                     |
| <b>FVE:</b> Fracción Vascular Estromal                                       | <b>TGF-<math>\beta</math>:</b> Transforming growth factor beta                       |
| <b>FZD2:</b> Frizzled-2  | <b>Th:</b> T helper cells  |
| <b>GMP:</b> Good Manufacturing Practice                                      | <b>TNF<math>\alpha</math>:</b> Tumor necrosis factor alpha                           |
| <b>hESC:</b> Human Embryonic stem cells                                      | <b>TRA-1-60:</b> Podocalyxin   |
| <b>HGF:</b> Hepatocyte growth factor receptor                                | <b>TRA-1-81:</b> Podocalyxin   |
| <b>HH:</b> Protein Hedgehog  | <b>VGF:</b> Nerve growth factor inducible  |
| <b>HLA-DR:</b> HLA Class II histocompatibility antigen, DR alpha chain       | <b>Wnt:</b> Signal pathway   |
| <b>HO-1:</b> Heme oxigenase 1  |  |

## INTRODUCCIÓN

Las investigaciones en células madre adultas, es un campo que está creciendo año a año, dado su potencial rol como alternativa segura en tratamientos curativos y no paliativos de variadas enfermedades degenerativas. A la fecha en el campo de las células madre adultas (conocidas como *mesenchymal or hematopoietic stem cells*), hay más de 188.000 artículos publicados, mientras que en un ámbito más específico como lo es el estudio de células madre adultas equinas, a la fecha se han publicado más de 6.000 artículos (según base de datos de Science Direct a la fecha.).

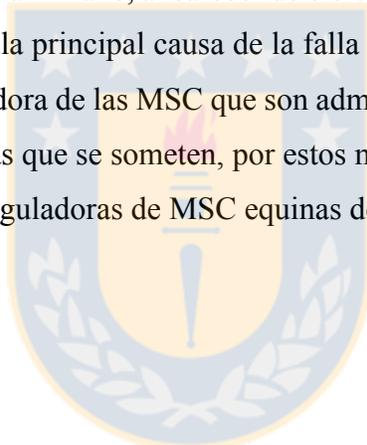
Hoy en día la medicina regenerativa (*área de la medicina que consiste en el uso de las células madre adultas o sus productos para regenerar tejidos*), se perfila como una herramienta poderosa tanto en la medicina humana como en la veterinaria. Siendo en esta última, de suma utilidad ya que hay varias enfermedades en las que hoy solo se cuenta con tratamientos farmacológicos o quirúrgicos, los cuales nos son regenerativos si no reparativos. En este sentido, las MSC han sido utilizadas para tratamientos en enfermedades degenerativas que afectan, por ejemplo, a tejido nervioso, músculo esquelético, fallas orgánicas, enfermedades autoinmunes y reproductivas. Pero aún queda mucho por dilucidar en relación a estas particulares células que cuentan con la habilidad de regenerar tejidos, recuperando su estructura y función por medio del microambiente que ellas generan en la zona de aplicación.

La industria equina genera millones de pesos por concepto de deportes asociados al equino y centros de reproducción, cría y venta de estos. El número de animales junto a los tipos de deportes que se practican con caballos, genera una alta prevalencia de una serie de lesiones asociadas al aparato locomotor y reproductivo de estos, los cuales, a su vez, generan enormes gastos para la industria y los propietarios, que se dan principalmente por el no uso de los animales, pagos por servicios veterinarios, uso de fármacos y procedimientos asociados a al tratamiento de la patología.

Estos elementos constituyeron la base conceptual para proponer el uso de células madre adultas para tratamientos en equinos, terapias que han sido prometedoras, no obstante existen dificultades que se requieren subsanar para que esta técnica sea cada vez más eficiente, segura y comúnmente usada en la práctica veterinaria, por ejemplo: no contar aún en medicina veterinaria con normas GMP para la manufactura de productos hechos a base de MSC, la gran heterogeneidad en la producción, manipulación, obtención y las fuentes de las MSC, como también, el no contar con un consenso en relación a la caracterización de las células, su utilización a partir de un donante

y no contar con un producto de forma inmediata para evitar esperar largos períodos de tiempo entre la obtención y producción de células para un tratamiento.

Uno de los puntos más complejos a sortear al momento de realizar tratamientos con MSC, es la compatibilidad de las células alogénicas o derivadas de un donante, dado que, en la práctica, muchas veces no se cuenta con el tiempo necesario ni las condiciones para obtener las células del propio paciente, el que requiere de una disponibilidad inmediata de MSC, lo que se consigue con bancos de células que puedan almacenar las MSC provenientes de un donante. Pero las MSC pueden sortear la barrera inmunológica, característica intrínseca estas, que tienen *per se* la capacidad de inmunomodular ambientes en tejidos dañados, pero cuando se trata de un donante esta característica se ve limitada por la cantidad de dosis o tratamientos que pueden ser realizados en los pacientes con células alogénicas, dado que nunca el 100% de las células administradas, pasará desapercibida para el sistema inmune, al carecer de ciertas proteínas que gatillan el rechazo, siendo este el punto donde radica la principal causa de la falla en los tratamientos, como la baja o ausente capacidad inmunorreguladora de las MSC que son administradas a los pacientes, producto de las manipulaciones *in vitro* a las que se someten, por estos motivos se propone la modulación *in vitro* de las propiedades inmunoreguladoras de MSC equinas derivadas de tejido adiposo.



# REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA



## **ASPECTOS GENERALES DE LA INDUSTRIA EQUINA Y LA MEDICINA REGENERATIVA**

### **La industria equina**

---

Cuando se asocia el potencial terapéutico de las MSC a la masa animal que eventualmente requeriría de un tratamiento basado en este tipo de células, se evidencia que es una necesidad que requiere ser abordada en la actualidad. La industria equina en Estados Unidos, contribuye directamente a la economía, con \$39 mil millones de dólares, mientras que de manera indirecta aporta con \$102 mil millones de dólares, ya que cuenta con una masa caballar de alrededor de 9.500.000 equinos (Deloitte, 2005). Por otro lado en la Unión Europea (UE), al año 2007 se cuantificó un total de 5.750.714 equinos, repartidos en todos los países de la UE y en Alemania específicamente, el impacto económico de esta industria, genera utilidades de hasta \$5 billones de euros mientras que genera gastos de \$2,6 billones de euros (Liljenstolpe, 2009). Por otro lado, Chile, un país pequeño, en relación a la masa caballar que tiene, se generan aproximadamente 35 millones de dólares al año y según el último censo Agropecuario y forestal, cuenta con una masa caballar de aproximadamente 304.000 equinos (INE 2007).

### **Costos económicos asociados a la salud en la industria equina**

---

El alto número de caballos, genera una gran inversión por animal y enormes pérdidas cuando estos padecen de algún tipo de lesión, ya sea aguda o crónica, pero aquellas que son de tipo crónicas y llevan a degeneraciones de tejidos, resultan ser las más costosas. Datos de Estados Unidos, indican que según su cantidad de animales los problemas de salud generan grandes pérdidas económicas por concepto de diagnóstico y tratamiento, monto que supera los 3.000 dólares anuales por animal (Stacey, 2009).

Al evaluar la epidemiología de las lesiones en equinos, se logra observar, por ejemplo, que en los Estados Unidos, las cojeras, tienen una incidencia anual de 8.5 a 13.7 eventos por cada 100 caballos, con un costo veterinario de \$432 dólares por evento y una pérdida por el no uso del animal de aproximadamente 110 días. Al evaluar esto por año, los costos son de \$678 millones de dólares, de los cuales \$448 millones son de pérdidas por el no uso del animal (66% del costo total), \$195

millones por costos asociados a servicios veterinarios y drogas (29% del costo total) y \$35 millones asociados a pérdidas por muertes (5% del costo total; Seitzinger *et al.*, 2000; APHIS, 2001).

Cuando se analiza la casuística relacionadas a lesiones de quinos, se observa por ejemplo que en Estados Unidos, los mayores porcentajes de lesiones se concentraban en el tendón flexor digital profundo, tendón flexor digital superficial y en el ligamento suspensor (45,98%), seguido del síndrome navicular (6,42%), carpo y túnel carpiano (4,47%) y hombro (4,36%) de un total de 222.993 animales analizados (Williams *et al.*, 2001). Mientras que en Chile, estudios realizados en el caballo Chileno, indican que la mayor frecuencia de lesiones músculo esqueléticas, estudio realizado sobre 114 equinos lesionados, se dan en desmitis en el ligamento suspensor (14%), osteoartritis en el tarso (13,2%), síndrome navicular (8,8%), laminitis (7,9%), tendinitis en el tendón flexor digital profundo (7%) y osteoartritis en la articulación metacarpofalángica (6,1%) (Mora-Carreño *et al.*, 2014).

## La medicina regenerativa y el equino

---

La premisa de la medicina regenerativa es restaurar la estructura y la función de los tejidos u órganos dañados por el tiempo, enfermedades o injurias. Es una terapia que se basa principalmente en el uso de las células madre adultas de origen mesenquimal o hematopoyético (MSC; del inglés Mesenchymal Stem Cells ó HSC; del inglés Hematopoietic Stem Cells) y sus factores bioactivos (Lopez y Jarazo, 2015). El uso de terapias en base a MSC, está ampliamente descrito en el equino, particularmente en el tratamiento de tendones (Schnabel *et al.*, 2009; De Mattos Carvalho *et al.*, 2011; Marfe *et al.*, 2012; Godwin *et al.*, 2012; Manning *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 2014), lesiones de cartílago articular (Mothersill *et al.*, 1991; Arufe, 2011; Carrade *et al.*, 2011, Spaas *et al.*, 2012), ligamentos (Leppänen y Miettinen, 2009; Renzi *et al.*, 2013) y lesiones reproductivas equinas, asociadas principalmente al tejido endometrial (Mambelli *et al.*, 2013; Ferris *et al.*, 2014). Todos estos estudios han entregado valiosa información y con resultados muy alentadores, pero aún existen retos, científicos y técnicos. Para poder entender de mejor manera esta materia, es necesario evaluar la biología de las MSC y su interacción con el entorno.

## CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS MADRE

### Ontogenia de las células madre

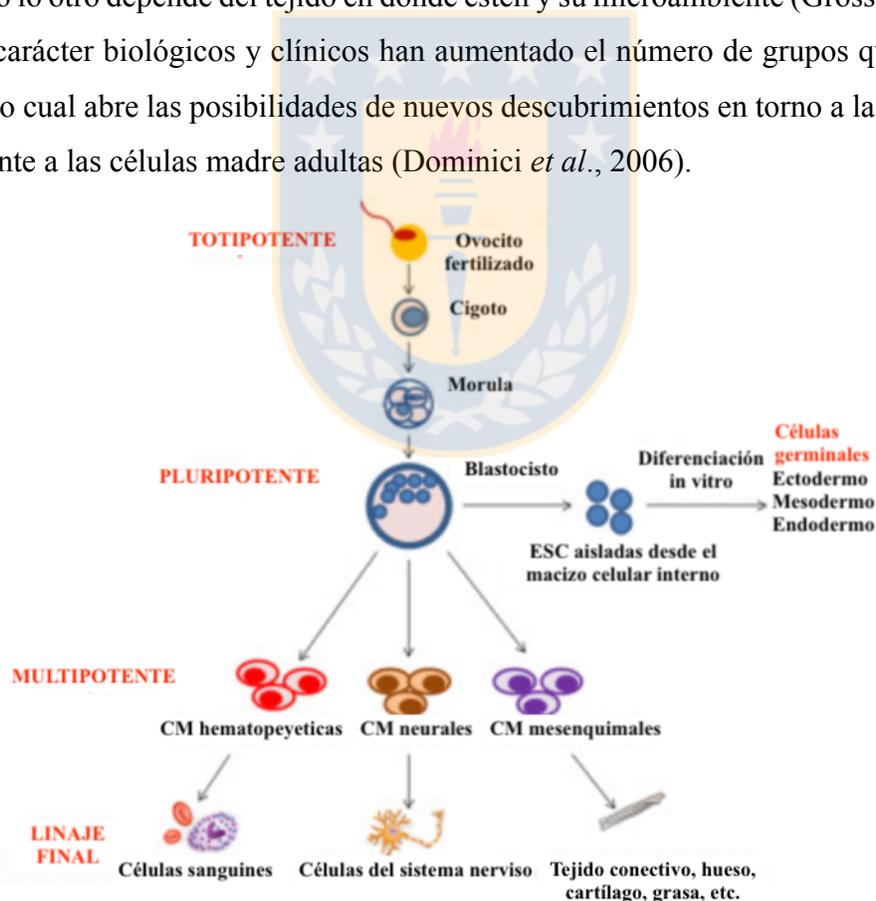
---

El concepto de *Stem cells* se acuñó a finales del siglo XIX, cuando se teorizaba que ciertos tejidos tenían la posibilidad de renovarse durante toda la vida de un organismo (Haeckel, 1874). Estas células se clasifican según su potencia, en totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes y unipotentes (Weissman, 2000; Hui *et al.*, 2011). Totipotente, es un atributo exclusivo de las células embrionarias, específicamente desde el estadio de cigoto hasta mórula, ya que estas células darán origen a todas las células de un organismo, posterior a este estadio, las células pasan a ser pluripotentes (Hui *et al.*, 2011, Condic, 2014). La célula pluripotente, corresponde a una célula embrionaria, que en el caso de la especie humana, derivada del macizo celular interno del blastocito de entre 4-5 días posteriores a la fertilización, un embrión de entre 50-150 células (Ying *et al.*, 2003). Los primeros reportes *in vitro* de estas células, fueron del macizo celular interno de blastocitos de ratón (Evans y Kaufman, 1981) y posteriormente de blastocito humano (Thomson *et al.*, 1998), lográndose obtener las primeras líneas de células madre pluripotentes de ratón (mESC) y humanas (hESC) (Figura 1). Estas células llamadas también células madre embrionarias, expresan marcadores y características similares a las células de un embrión en transición, como la actividad alta de fosfatasa alcalina y de telomerasa, también expresan marcadores nucleares que le otorgan la característica de “*Stemness*” como OCT4 y NANOG (Mitalipov y Wolf, 2009). Además, estudios realizados por citometría de flujo a células hESC, han demostrado la expresión de marcadores de superficie como SSEA3, SSEA4, TRA-1-81, TRA-1-60 y CD24, marcadores que posterior al día 9 de ser sometidas a diferenciación desaparecen, evidenciando la importancia de estos para que la célula mantenga su característica pluripotente (Ramirez *et al.*, 2011).

Las hESC, son una promesa para la medicina actual, dados sus potenciales usos médicos en la ingeniería de tejidos, utilizándolas como terapia de reemplazo celular en patologías tales como infartos al miocardio, Parkinson y diabetes (Doss *et al.*, 2004). Pero esto no es del todo así, estudios han demostrado que el perfil de transcripción cambia cuando las hESC se mantienen en cultivo, lo que hace complicado mantener *in vitro* a estas células (Calhoun *et al.*, 2004).

Esta diferenciación *in vitro* ha llevado a que se replantee el almacenamiento de estas células en los bancos de hESC, junto a su uso con la potencial formación de tumores y rechazo al trasplante celular, este último dado por la presencia en la superficie de las hESC de moléculas MHC del donante (Doss *et al.*, 2004). Un estudio realizado en 2005, donde se evaluó la cantidad necesaria de donantes para tener una cantidad de hESC con un nivel de coincidencia de MHC aceptable, determinó que se necesitaría un banco con al menos 150 líneas de hESC para tener un repertorio que abarcara entre los MHC A, B y DR, donde solo un 20% de los receptores sería compatible (Taylor *et al.*, 2005).

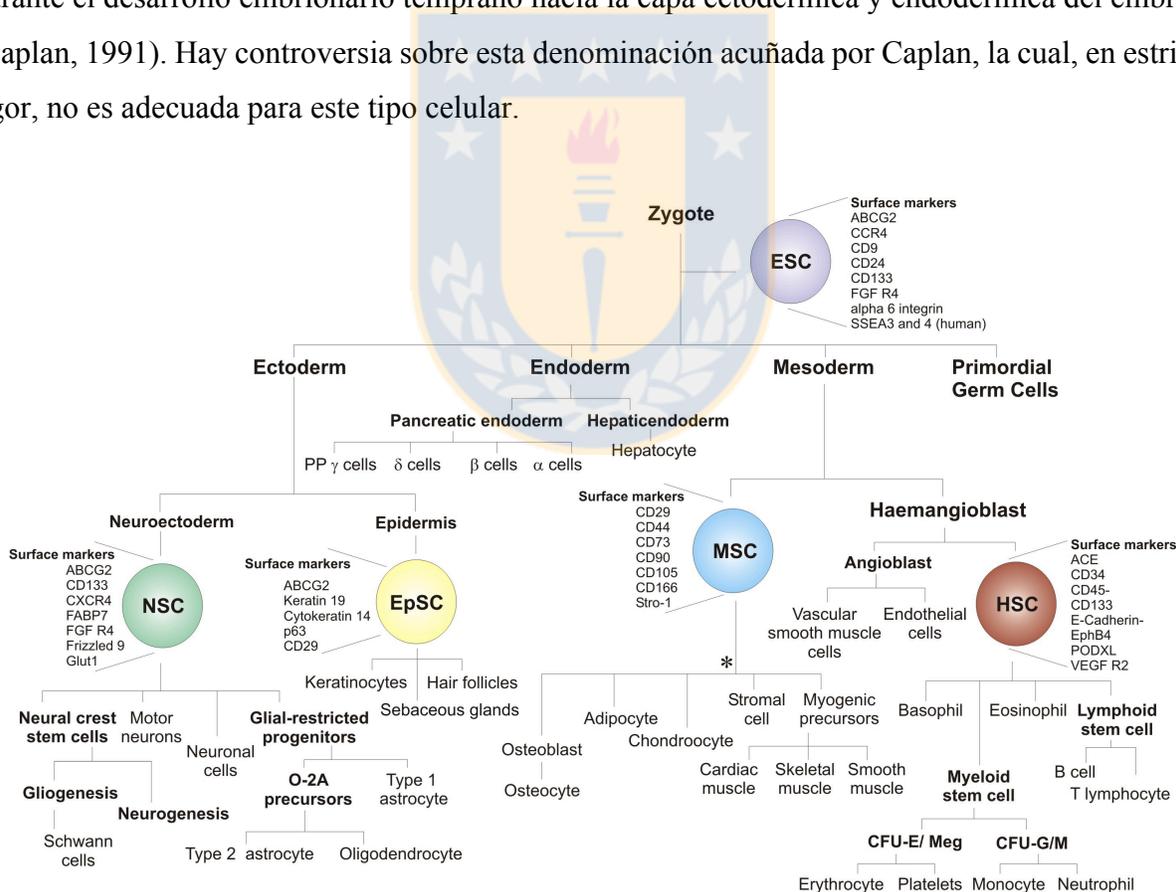
Avanzando en desarrollo embrionario, fetal y posterior nacimiento de un individuo, las células comienzan a perder su potencialidad. Cuando el individuo es adulto las células madre reducen su grado de potencialidad hasta ser multipotentes, oligopotentes o unipotentes (**Figura 1**). El ser lo uno o lo otro depende del tejido en donde estén y su microambiente (Gross y Häupl, 2013). Intereses de carácter biológicos y clínicos han aumentado el número de grupos que estudian este tipo celular, lo cual abre las posibilidades de nuevos descubrimientos en torno a las células madre, específicamente a las células madre adultas (Dominici *et al.*, 2006).



**Figura 1:** Grados de potencia de las células madre en diferentes estadios del desarrollo, desde el cigoto el cual es totipotente, pasando por el blastocisto, en el que sus células son pluripotentes, hasta un organismo adulto donde las células que lo conforman son de carácter multipotente y dan origen a los diferentes tipos celulares de un organismo (tomado y adaptado de Hayes *et al.*, 2012).

## Células madre mesenquimales (MSC)

Los primeros reportes respecto cultivos de MSC, fueron derivados de médula ósea (Friedenstein, 1980). Se reportaron cultivos exitoso de células con aspecto fibroblástico que lograban formar colonias, pero no fue hasta los años 90 que se asoció y popularizó a estas células con el término: célula madre mesenquimal o del inglés mesenchymal stem cells (Caplan, 1991; Horwitz *et al.*, 2005), lo cual se logró por medio del estudio de los orígenes de estas células y de los tejidos de los cuales eran obtenidas. Estas células provienen de la capa mesodérmica del embrión, capa germinal que da origen a todos los componentes del sistema músculo esquelético (músculos, ligamentos, tendones y cartílago), por lo que el término mesenchymal, que deriva del griego *mes* (medio) y *enkyma* (infusión) hace referencia a la capacidad de las células a migrar durante el desarrollo embrionario temprano hacia la capa ectodérmica y endodérmica del embrión (Caplan, 1991). Hay controversia sobre esta denominación acuñada por Caplan, la cual, en estricto rigor, no es adecuada para este tipo celular.



**Figura 2:** Esquema del desarrollo de las células madre en el organismo desde el estadio de cigoto hasta células completamente diferenciadas y con funciones específicas. ESC: embryonic stem cells, NSC: neural stem cells, EpSC: epidermal stem cells, MSC: mesenchymal stem cells, HSC: hematopoietic stem cells (Tomado y adaptado de Osteocord bone from blood. Copyright BTR®)

La Sociedad internacional para la investigación de células madre (de su sigla en inglés ISSCR), clasifica a las MSC humanas, como células que cuentan con las siguientes características: 1) capacidad de renovarse, dividirse y generar copias de ellas mismas, 2) capacidad de diferenciarse en diferentes tipos de células especializadas y 3) capacidad de adherirse al plástico en cultivo (Horwitz *et al.*, 2005; ISSCR, 2014). Junto a esto, en el año 2006 se establecieron los criterios mínimos para definir a una MSC en cultivo, indicándose que estas células deben cumplir con; 1) Adherencia al plástico en condiciones de cultivo celular *in vitro*, 2) expresión de antígenos específicos de superficie, donde el 95% de la población de MSC debe expresar marcadores como CD105, CD73 y CD90 y carecer (< 02-05% de positividad) de CD45, CD34, CD14 o CD11b, CD79a o CD19 y MHC de clase II, lo cual debe ser establecido por medio de una citometría de flujo y 3) presentar un potencial de diferenciación multipotente hacia osteoblastos, adipocitos y condroblastos, bajo condiciones estándares de diferenciación *in vitro* (Dominici *et al.*, 2006).

Para poder identificarlas, se establece el siguiente patrón inmunofenotípico, deben ser positivas para:

- **CD105** (Pilz *et al.*, 2011; Rolandsson y Sjöland, 2014; Maleki *et al.*, 2014), conocida como endoglin y originalmente como MAB SH2 (Dominici *et al.*, 2006), ha sido caracterizada como una molécula accesoria al receptor de TGF- $\beta$  (Pierelli *et al.*, 2001)
- **CD73**, es una exo-5' nucleotidasa, que juega un papel crucial en la generación de adenosina, es uno de los marcadores más expresados en las MSC (Ode *et al.*, 2012)
- **CD90** conocida también como THY-1 (Wiesmann *et al.*, 2006; Kawamoto *et al.*, 2013), es una molécula de adhesión celular y un pequeño miembro de la super-familia de las inmunoglobulinas (Kisselbach *et al.*, 2009).

Y negativas para:

- **CD45** (Chow *et al.*, 2011; Parker, 2013), es una glicoproteína de superficie celular con un dominio tirosina fosfatasa citoplasmática, la que está involucrada en la activación y maduración de los linfocitos T (Im *et al.*, 2011; Cheng *et al.*, 2014)
- **CD34** (Lin *et al.*, 2013), es un antígeno de superficie de células progenitoras hematopoyéticas, también conocido como podocalxin-like protein, con funciones aún desconocidas, se postula que está encargada de potenciar el tráfico y la migración de células hematopoyéticas (Nielsen y McNagny, 2008)

- **CD14** (Zimmermann *et al.*, 2003), también llamada leucine-rich  $\alpha 2$  glycoprotein, tiene como función ser un receptor para el factor de Von Willebrand en la superficie de la membrana de la plaqueta (Setoguchi *et al.*, 1989)
- **CD11b** es una molécula de adhesión de la familia de las  $\beta 2$ -integrinas (Mafi *et al.*, 2011)
- **CD79a** (Chen *et al.*, 2014), es un marcador de citoplasmático que está altamente asociado a linajes de linfocitos B (Chung *et al.*, 2007)
- **CD19** es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, presente en la superficie de los linfocitos B y las células dendríticas foliculares del sistema hematopoyético. Es un regulador esencial en el desarrollo, activación y diferenciación de los linfocitos B (Alipour *et al.*, 2010).
- **MHC de clase II** es un potente aloantígeno relacionado con el rechazo a injertos (Ryan *et al.*, 2005)

Si bien, estos son los criterios de la ISSCR para determinar si este tipo celular corresponde a una MSC, las diferencias en los procedimientos de obtención de los tejidos, los protocolos y los grupos de investigación, han llevado a que exista una variedad en los patrones de expresión de marcadores de superficie, en relación al tejido del cual deriven las MSC (Mafi *et al.*, 2011).

El tercer criterio, corresponde a la capacidad de diferenciación a linajes mesodérmicos, esta es una característica que demuestra la funcionalidad de las MSC (Horwitz *et al.*, 2005), ya que, las MSC bajo estímulos específicos *in vitro*, pueden diferenciarse a osteoblastos, condroblastos y adipocitos (Dieudonne *et al.*, 2013; Amable *et al.*, 2014). Aun así, no están del todo comprendidas las vías de señalización que rigen la diferenciación de las MSC, pero sí se han logrado dilucidar algunos de los reguladores moleculares y sus mecanismos de acción (Kolf *et al.*, 2007). En las tres líneas de diferenciación mesodérmica, hay factores de transcripción maestros que deben ser activados para dirigir la diferenciación de MSC hacia alguno de estos linajes (Figura 3).

## Factores reguladores de la diferenciación

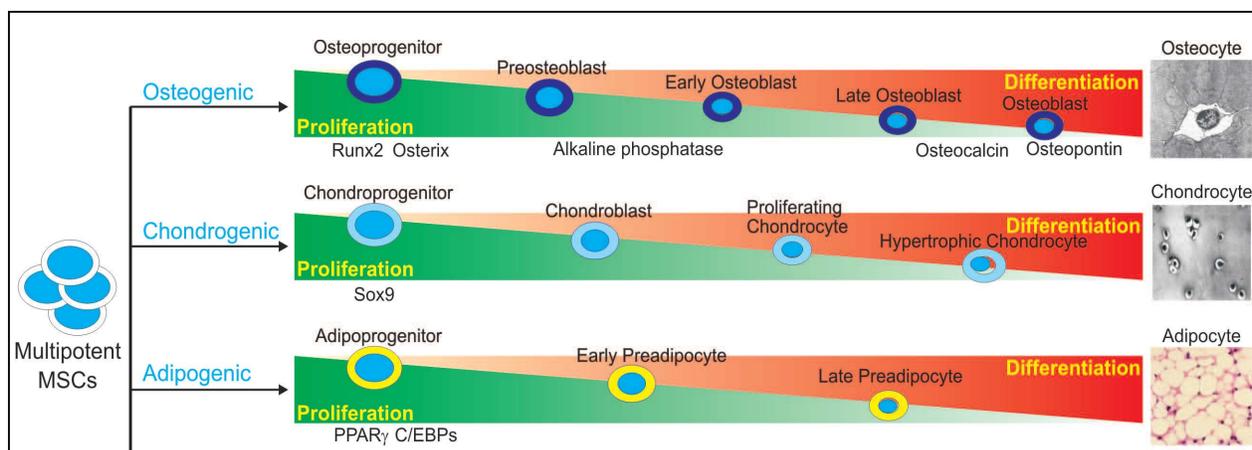
---

En la diferenciación condrogénica intervienen varias moléculas, entre ellas, varios tipos de TGF- $\beta$ . Durante el periodo de diferenciación de la MSC a condroblasto *in vivo*, hay una alta proliferación y las células comienzan a depositar moléculas específicas de cartilago como colágeno tipo II y agregan, seguido de una diferenciación terminal del condrocito a una osificación

endocondral. TGF- $\beta$ , juega un rol importante en esta evolución condrogénica sobre las MSC, estimulando la condensación celular por medio de un aumento en la expresión de N-caderina incrementando así la adhesión celular (Van der Kraan *et al.*, 2009), también se estimula la actividad MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) y se modula la señal de Wnt (Tuli *et al.*, 2003). Junto a TGF- $\beta$ , hay otros factores de crecimiento importantes en la inducción y mantención de las MSC hacia condrocitos, como la Proteína Morfogénica Ósea (BMP del inglés Bone Morphogenic Protein), Factor de Crecimiento tipo Insulínico (IGF del inglés insulin-like-growth factor) y el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF del inglés Fibroblast Growth Factor; Da-Ae *et al.*, 2012). Por otro lado también se ha demostrado que Sox9 es el factor de transcripción clave en la condrogénesis, pero es dependiente de una inducción con BMP2 (Pan *et al.*, 2008).

Las proteínas de la familia de las BMP, que son componentes de la super-familia de los TGF, juegan un rol crítico en la diferenciación osteogénica, ya que al exponer a las MSC a BMP, resulta en un aumento de la expresión de marcadores específicos de osteoblastos, fosfatasa alcalina y marcadores tardíos como osteocalcina, osteopontina y Runx2 (Luu *et al.*, 2007; Beederman *et al.*, 2013). Runx es una familia compuesta por 3 proteínas (Runx1, 2 y 3), donde Runx2 es la encargada de desencadenar la diferenciación osteogénica, ya que activa y regula la osteogénesis por medio de la activación de genes involucrados en diferentes vías de señalización como, TGF- $\beta$ 1, Wnt, HH y NELL-1, considerándose a Runx2 como el factor de transcripción maestro de la osteogénesis (James, 2013).

Mientras que la diferenciación adipogénica, está mediada principalmente por PPAR $\gamma$ , el que es expresado en bajos niveles en tejido adiposo o en otros tejidos, pero sus niveles de expresión son altos en el estadio temprano de la diferenciación adipogénica, siendo un clave regulador de la expresión génica en la adipogénesis (Peter *et al.*, 1994). Aun así, las MSC no solo cuentan con la capacidad diferenciarse a linajes mesodérmicos, se ha reportado que también lo pueden hacer hacia linajes que no son de origen mesodérmicos, como neuronas, células del páncreas endocrino, hepatocitos, células endoteliales y cardiomiocitos (Schäffler y Büchler, 2007).



**Figura 3:** Representación esquemática de la diferenciación de las MSC hacia linajes mesodérmicos. Las células pueden diferenciarse a osteocitos, condrocitos y adipocitos, por medio de la expresión de factores maestros para cada linaje (Tomado y adaptado de Beederman *et al.*, 2013).

Wnt es una proteína rica en cisteína, que se encuentra en la membrana celular y desencadena en el espacio intracelular una serie de eventos que regulan el desarrollo, la proliferación celular, la motilidad y el destino celular. Wnt1, 2, 3, 3a, 8 y 8a son consideradas como las Wnt canónicas. Es una vía de señalización que es dependiente de  $\beta$ -catenina. En las MSC, la vía Wnt, juega un rol vital en la regulación de la proliferación y diferenciación celular, expresando varios ligandos Wnt (5a, 11, 16) y varios receptores para la proteína Wnt, como FZD2, 3, 4, 5 y 6. Se sugiere que este estado indiferenciado, se mantiene gracias a la vía canónica Wnt (Ling *et al.*, 2009).

Notch es un receptor tipo ligando de trans-membrana que se compone de dos clases, Dll o Jagged. En vertebrados hay 4 receptores Notch (Watt *et al.*, 2008). La vía Notch se destaca por ser importante en la función de células madre de muchos tejidos, es una vía de señalización bastante conservada a través de la evolución que regula decisiones celulares como la proliferación, diferenciación y la apoptosis celular (Xie *et al.*, 2013).

Las BMP son de miembros de la superfamilia TGF- $\beta$ . Estas proteínas que componen la vía de señalización de las BMP (Beederman *et al.*, 2013), juegan un rol importante en la diferenciación de las MSC, principalmente en la diferenciación osteogénica (Wozney *et al.*, 1988).

La vía de señalización MAPK, está encargada principalmente de iniciar y mantener el programa de diferenciación celular en las MSC (Mei *et al.*, 2013), donde los factores de transcripción PPAR $\gamma$  y Runx2 son necesarios para promover la adipogénesis y la osteogénesis

respectivamente y ambas están asociadas a las vías de señalización de ERK/MAPK (Ge *et al.*, 2007).

TGF- $\beta$ , PDGF y FGF son citoquinas que inducen la proliferación en las MSC, por medio de la activación de c-Jun NH2-terminal kinase (JNK), que son parte de las MAPK. Estas citoquinas, activan esta vía induciendo la proliferación celular y el ciclo celular, pasando desde la fase G0/G1 a la fase S (Kang *et al.*, 2005).

### **Interacción de las MSC y los nichos**

---

Las MSC están presentes prácticamente en todos los tejidos de un individuo adulto, donde pueden interactuar con las células del propio tejido en las que residen, así como también con células del sistema inmune, en situaciones de un proceso inflamatorio (Hoogduijn *et al.*, 2014).

En muchos tejidos, estos nichos contienen poblaciones celulares heterogéneas, teniendo cada uno de ellos una función específica, donde se genera una interacción entre estas y las MSC (Lane *et al.*, 2014). La existencia de estas poblaciones de MSC de reserva, para dar origen a células con un mayor grado de especialización y la reversión de células diferenciadas hacia MSC, está condicionada por el nicho.

En el nicho, las MSC interactúan de dos maneras, a través del contacto directo célula-célula entre las MSC y el resto de las células del nicho o de manera indirecta, a través de interacciones mediadas por factores secretables. En el contacto directo, priman receptores como moléculas de adhesión células-células y de ligandos unidos a membrana (Lane *et al.*, 2014). En el grupo de los ligandos, se encuentran diversas vías de señalización que intervienen en el desarrollo y diferenciación de las MSC, como Wnt, Notch, BMP, miembros de la familia MAPK, miembros de la familia TGF y FGF, siendo todas estas, vías de señalización, las que están implicadas en la regulación de la diferenciación de las MSC (Andersson *et al.*, 2011).

### **Fuentes de obtención de MSC**

---

El tejido mesenquimal o también conocido como tejido estromal, contiene una importante población de MSC, hasta la fecha se han aislado MSC desde diferentes tejidos, tales como el tejido adiposo (ASC del inglés Adipose derived Stem Cells; Zuk *et al.*, 2001), médula ósea (BM-SC del

ingles Bone Marrow-derived Stem Cells; Krebsbach *et al.*, 1999), ligamento periodontal (PDL-SC del ingles, Periodontal Ligament-derived Stem Cells; Miletic *et al.*, 2014), pulpa dental (DP-SC del ingles Dental Pulp-derived Stem Cells: Akpinar *et al.*, 2014), membrana sinovial (SM-MSC del ingles Synovial Membrane-derived Stem Cells; Vandenabeele *et al.*, 2003), cordón umbilical (CB-MSC del inglés Cord Blood-Mesenchymal Stem Cells; Zhang *et al.*, 2011), sangre de cordón umbilical (UCB-MSC del inglés Umbilical Cord Blood-Mesenchymal Stem Cells; Koch *et al.*, 2007; Sibov *et al.*, 2012), gelatina de Wharton (UCM-SC del inglés Umbilical Cord Matrix-Stem Cells; Seshareddy *et al.*, 2008), células madre derivadas de sangre periférica (BD-SC del inglés Blood derived Stem Cells; Marfe *et al.*, 2012; Spaas *et al.*, 2012) y otros como periostio (Kisiel *et al.*, 2012), músculo (Qu-Petersen *et al.*, 2002), hígado (Lu *et al.*, 2014), pericondrio (Arai *et al.*, 2002), folículo piloso (Yu *et al.*, 2006), placenta (Miao *et al.*, 2006), líquido amniótico (Wouters *et al.*, 2007), menstruación (Patel *et al.*, 2008), orina (Zhang *et al.*, 2014) y desde endometrio (Gargett *et al.*, 2009; Cabezas *et al.*, 2014; Cabezas *et al.*, 2017; Rink *et al.*, 2017).

### **Características de las MSC derivadas de tejido adiposo**

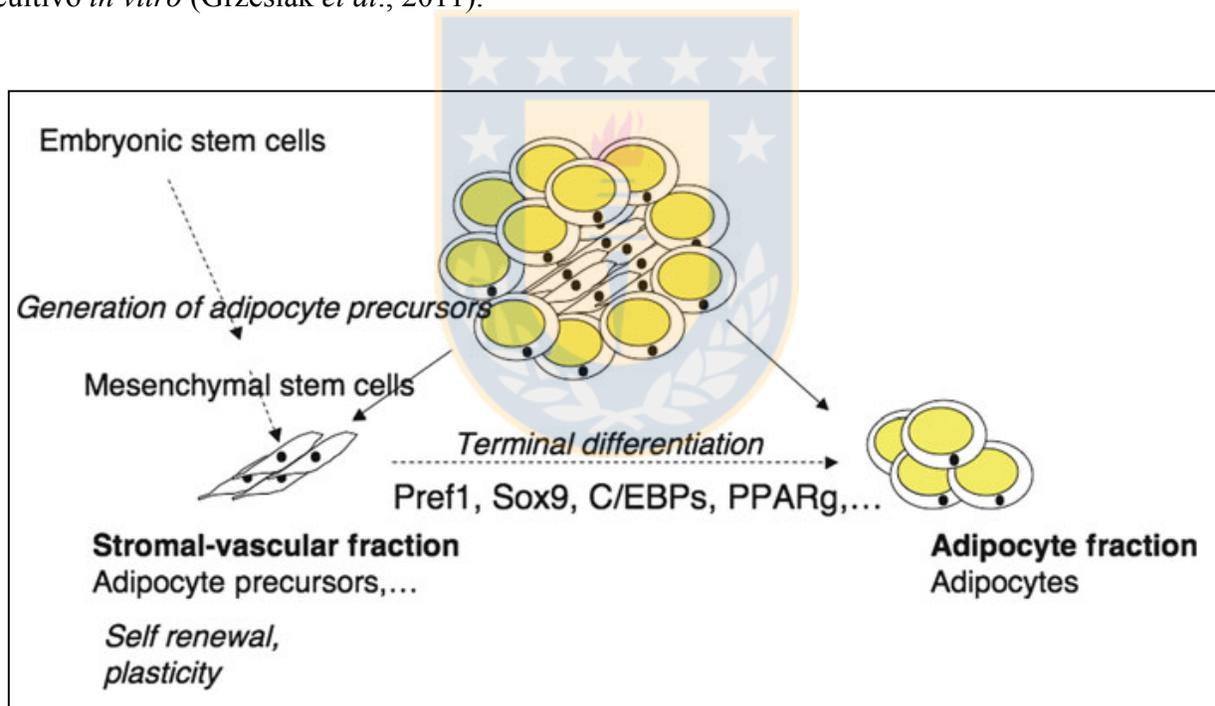
---

El tejido adiposo en el humano, está compuesto por dos tipos, los cuales coexisten, pero tienen diferentes funciones, la grasa blanca y la grasa parda. La grasa blanca está encargada de la reserva energética mientras que la grasa parda es especializada en el gasto energético, teniendo una actividad termogénica (Cannon, 2004). El tejido adiposo blanco, está compuesto por adipocitos maduros, células vasculares estromales (Figura 4), donde podemos encontrar células inmunes, células endoteliales y células precursoras de adipocitos (Dani y Billon, 2012).

Las células precursoras de adipocitos derivan de las MSC que provienen de la capa germinal mesodérmica (Cannon, 2004). Pero durante el desarrollo de los vertebrados superiores, el mesodermo no es la única capa germinal de la que derivan las MSC de tejido adiposo (Dani y Billon, 2012b). Ya que hay estudios donde se demuestra que en la cabeza por ejemplo, los hueso faciales derivan desde la cresta neural, que corresponde a un grupo de células que derivan del neuroectodermo (Dupin, *et al.*, 2000). Pero aun así varios estudios han intentado dilucidar el lugar en el que residen las MSC en el tejido adiposo, demostrando por inmuno-tinción, que las MSC derivan de la Fracción Vascular Estromal (FVE) del tejido adiposo, encontrándose específicamente en la zona peri-vascular de los vasos sanguíneos que lo irrigan, localizándose la expresión de

marcadores como  $\alpha$ -SMAD en la musculatura lisa de todos los vasos sanguíneos, CD31 en el endotelio de los mismos vasos sanguíneos, mientras que OCT4 y SSEA-1 fueron localizados en músculo liso pero no en células endoteliales (Lin *et al.*, 2008).

Las ASC, tienen una gran ventaja sobre el resto de MSC, ya que son una fuente de células con mayor accesibilidad que las BM-SC por mencionar un ejemplo (Schäffler y Büchler, 2007), pero aun así, no hay mayores diferencias en morfología, aislamiento, expresión de marcadores, y capacidad de diferenciación (Kern *et al.*, 2006). En relación a la morfología, son células con aspecto fibroblástico, que contienen un abundante retículo endoplasmático, una alta proporción núcleo-citoplasma, con mitocondrias y vacuolas citoplasmáticas en la zona peri-nuclear, concluyendo en base a estudios realizados sobre la comparación de ASC de diferentes especies, estas no muestran diferencias significativas en su morfología al ser aisladas, ni al mantenerlas en cultivo *in vitro* (Grzesiak *et al.*, 2011).



**Figura 4:** Eventos claves de la diferenciación desde MSC a adipocitos en dependencia de la existencia de factores maestros de la diferenciación adipogénica, donde se puede apreciar los tipos de células que coexisten en la grasa blanca. (tomado y adaptado de Dani y Billon, 2012).

## Aislamiento de las ASC

---

Los primeros reportes se realizaron en los años 60, aislando las células desde tejido adiposo del epidídimo de un ratón, por medio de un procedimiento quirúrgico, mecánico y posteriormente enzimático (Rooney *et al.*, 1963; Rodbell y Jones, 1966). Seguido a esto, se plantea un protocolo de aislamiento de MSC a partir de lipo-aspirados humanos, de tejido subcutáneo, obteniéndose la FVE.

La FVE corresponde a una población heterogénea de células, que incluye células endoteliales, mastocitos, macrófagos, células epiteliales (Rooney *et al.*, 1963) y MSC (Almeida *et al.*, 2008). En la práctica veterinaria, la lipoaspiración no es común y por lo general se obtienen las ASC a partir de tejidos seccionados quirúrgicamente, lo que hace más complicada la disponibilidad y el acceso en comparación con el lipo-aspirado. Las poblaciones de ASC pueden variar dependiendo del tipo de método que se usa para su obtención, ya sea por un lipo-aspirado o por una abdominoplastia. Si bien en el lipo-aspirado se obtiene una gran cantidad de tejido y por ende muchas células para cultivo, esta técnica genera un alto daño en el tejido, resultando en la liberación de mediadores pro-inflamatorios, situación que genera la migración de otros tipos celulares a la zona de lesión (Tholpady *et al.*, 2006). El rendimiento promedio en relación a la cantidad de MSC que pueden llegar a obtenerse varían enormemente dependiendo de la fuente de aislamiento, ya que en el aislamiento de BM-SC por medio de un gradiente de densidad, solo el 0,001 a 0,01% de las células aisladas corresponden a MSC, mientras que desde 1gr de tejido adiposo pueden ser aisladas aproximadamente  $5 \times 10^3$  MSC, una cantidad 500 veces mayor de células que las que se logran obtener a partir de la médula ósea (Pittenger *et al.*, 1999). Es por ello, que el aislamiento, cultivo y uso en tratamiento de las ASC se hace más atractivo.

## Características biológicas de las ASC

---

Las MSC que son aisladas desde tejido adiposo, presentan un variado patrón fenotípico. En humanos por ejemplo, se ha descrito que las ASC deben ser, (CD29, CD44, CD73, CD90 y CD105)<sup>+</sup> y (CD14, CD34, CD45, CD117, CD31 y HLA-DR)<sup>-</sup> (Ryu *et al.*, 2013), mientras que en ratas, deben ser (CD29, CD90, CD54 y MHC de clase I)<sup>+</sup> y (CD45, CD106 y MHC de clase II)<sup>-</sup> (Niyaz *et al.*, 2012).

En cultivo las ASC tienen la capacidad de formar colonias (Friedenstein, 1974). En las MSC humanas las colonias se forman a partir de una sola célula, en cambio en ratones una célula puede generar varias colonias dado que la célula se desprende de la superficie de la placa de cultivo, se expande y vuelve a re-sembrarse y adherirse a la placa (Pochampally, 2008). La formación de colonias ha sido ampliamente reportada en investigaciones con MSC (Pessoa *et al.*, 2014). El tiempo de doblaje de las MSC es muy superior a las células somáticas normales, con un doblaje que va de los 3.6 a los 4.7 días en células somáticas vs a 1 día en MSC (Mitchell *et al.*, 2006). Algunos estudios indican que las ASC tienen una capacidad proliferativa mayor que las BM-SC, dado el número de células que se puede obtener desde la muestra inicial (Pendleton *et al.*, 2013).

Mientras que la capacidad de diferenciación de las ASC hacia linajes mesodérmicos, está ampliamente estudiada y demostrada, logrando diferenciarlas *in vitro* hacia adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Bunnell *et al.*, 2008; Pendleton *et al.*, 2013; Devitt *et al.*, 2015).

### **Características específicas de ASC equinas derivadas de tejido adiposo (eASC)**

---

Diversos grupos de investigación han caracterizado las MSC derivadas de tejido adiposo en la especie equina, por los tipos de lesiones que sufren estos animales y su impacto económico. Para estas células, en la especie equina, se ha descrito que en cultivo *in vitro*, presentan una capacidad de adhesión mayor que las MSC derivadas de médula ósea y de cordón umbilical, con una adhesión al plástico que se genera entre las 32 y 48 hrs post cultivo respectivamente (Barberini *et al.*, 2014) y dentro de las primeras 24 hrs de cultivo, ya se pueden apreciar células mononucleares con forma de huso adheridas a la placa de cultivo (Vidal *et al.*, 2007).

En relación a su potencial de diferenciación hacia linajes mesodérmicos, ha sido ampliamente reportado que las ASC equinas tienen la capacidad de diferenciarse a linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos bajo estímulos adecuados (Vidal *et al.*, 2007; Ranera *et al.*, 2011; Bravo *et al.*, 2012; Carvalho *et al.*, 2013; Barberini *et al.*, 2014) y presentan una alta expresión de fosfatasa alcalina (Vidal *et al.*, 2007).

Hay muchos estudios respecto al estudio del inmunofenotipo de las MSC, pero muy pocos de estos, cuentan con paneles de expresión completos para los marcadores indicados por la ISSC. Dentro de lo que se ha reportado, estas células resultan ser positivas para CD90, CD105, CD44 (Carvalho *et al.*, 2009; Carvalho *et al.*, 2013; Barberini *et al.*, 2014), CD29, CD73 (Ranera *et al.*,

2011) y MHC I (Carrade et al., 2012), mientras que presentan una baja expresión de CD34, MHC II (Barberini *et al.*, 2014), CD14, CD79 (Carvalho et al., 2013), CD13 (Carvalho *et al.*, 2009), CD45 y CD11b (Bravo *et al.*, 2012).

Todas estas características que son analizadas *in vitro*, corresponden a parte de las características biológicas que le otorgan la capacidad de renovar tejidos a las MSC, por lo cual, en las últimas décadas, han sido objeto de interés para ser utilizadas como herramientas para tratamientos en patologías degenerativas tanto en humanos como en otras especies de mamíferos domésticos.

### Uso de MSC equinas en medicina regenerativa

---

Las MSC en la medicina veterinaria, se han adoptado como una poderosa herramienta terapéutica para lesiones degenerativas, en especial en la especie equina, dado el gran número de animales que sufren lesiones asociadas al tipo de actividad que realizan. Varios grupos alrededor del mundo, han trabajado en revertir lesiones principalmente músculo esqueléticas en equinos de competencia utilizando tratamientos a base de MSC, pero muchos de estos trabajos carecen de un grupo control y son basados principalmente en la casuística clínica (Schnabel *et al.*, 2013). Herthel (2001) trató 100 caballos con lesiones en el ligamento suspensor, con BM-SC autólogas. A los 6 meses, el 84% de los caballos habían retornado al trabajo de forma completa, resultando en el primer reporte de tratamientos con MSC en equinos. Esto gatilló una serie de ensayos empleando diversas fuentes de MSC, tales como BD-SC (Marfe *et al.*, 2012; Spaas *et al.*, 2012), BM-SC (Renzi *et al.*, 2013), ASC (Del Bue *et al.*, 2008; Nixon *et al.*, 2008; De Mattos Carvalho *et al.*, 2011), placenta (Carrade et al., 2011) y UCB-MS (Van Loon *et al.*, 2014).

Las patologías tratadas en equinos han sido principalmente, lesiones músculo esqueléticas y reproductivas, en las que se ha demostrado ser efectivas, como es el caso de la enfermedad degenerativa articular (Carrade *et al.*, 2011; Spaas *et al.*, 2012), lesiones en el tendón flexor digital superficial (Smith *et al.*, 2003; Nixon *et al.*, 2008; Godwin *et al.*, 2012; De Mattos Carvalho *et al.*, 2013), laminitis (Morrison *et al.*, 2014), osteoartritis (Nicpoñ *et al.*, 2013) y endometriosis (Mambelli *et al.*, 2013; Falomo *et al.*, 2015).

Un resultado que se puede extraer de estos reportes, el cual no es menor, resulta ser la recuperación de los animales posterior al tratamientos con porcentajes de reincorporación que

superan en algunos casos el 80% (Marfe *et al.*, 2012; Renzi *et al.*, 2013), lo cual es de gran interés tanto para el médico veterinario como para el propietario o productor, ya que las terapias con MSC mejoran notablemente la calidad de vida del paciente y permiten recuperar la performance del animal *versus* un tratamiento tradicional (Del Bue *et al.*, 2008; Godwin *et al.*, 2012; Durgam y Stewart, 2017).

Otro problema en la medicina veterinaria, que ha sido objeto de interés, corresponde a las lesiones reproductivas en yeguas, centrándose principalmente en el tratamiento de la endometrosis pero con resultados hasta la fecha muy pobres (Mambelli *et al.*, 2013). No existen hoy en día estudios suficientes y adecuadamente controlados que permitan tener una comprensión más profunda respecto a la posibilidad de regenerar el endometrio en yeguas con MSC, situación que también es válida para la medicina regenerativa en lesiones de tendones, ligamentos y articulaciones en equinos (Berry-Miller, 2012), no obstante son en su mayoría reportes de casos clínicos, pero aun así aportan información valiosa respecto a la regeneración de tejidos y a la inocuidad de los tratamientos. Uno de los estudios más completos y controlados se realizó en 2013, donde se experimentó en ocho equinos, con los cuales se formaron dos grupos randomizados, cuatro de ellos fueron tratados con ASC y los cuatro restantes fueron tratados con PBS (control negativo), a todos los equinos se les indujo quirúrgicamente la misma lesión dos semanas previas al tratamiento y se administraron ASC autólogas, dentro de los resultados obtenidos, se observó que el uso de MSC impidió la progresión de la lesión, exhibiendo mejoras tanto en la arquitectura del tendón y en la disminución del proceso inflamatorio entre los animales tratados *versus* los no tratados (Carvalho *et al.*, 2013).

El uso de MSC en la medicina regenerativa en equinos y en otras especies, es una herramienta prometedora, pero aún hay que responder muchas preguntas respecto a sus usos terapéuticos, como ¿cuál es el número óptimo de células a aplicar?, ¿cuál es la mejor vía de administración? y ¿conservan sus características inmunomoduladoras posterior a un cultivo *in vitro*?. Actualmente se hacen enormes esfuerzos para responder estas interrogantes, pero para ello, se requieren mayores estudios, normas de manufactura estandarizadas como las normas de Buenas Prácticas de Fabricación (Good Manufacturing Practice: GMP) y que sean realizados de forma controlada (Schnabel *et al.*, 2013). En las últimas décadas ha existido un aumento en las aplicaciones clínicas de las MSC, lo cual ha generado una gran preocupación respecto a la producción de estas células, principalmente para su uso en humanos, por parte de la Food and Drug Administration (FDA) y la

European Medicine Agency (EMA), para que las MSC sean consideradas como drogas (medicamentos), por lo que, están sujetos a los mismos requisitos legales y reglamentarios como otros medicamentos para animales o humanos (FDA, 2015) y por ende, se rigen por las normas establecidas para el ensayo y validación de estos, debiendo ser producidas en condiciones GMP (Sensebé *et al.*, 2013).



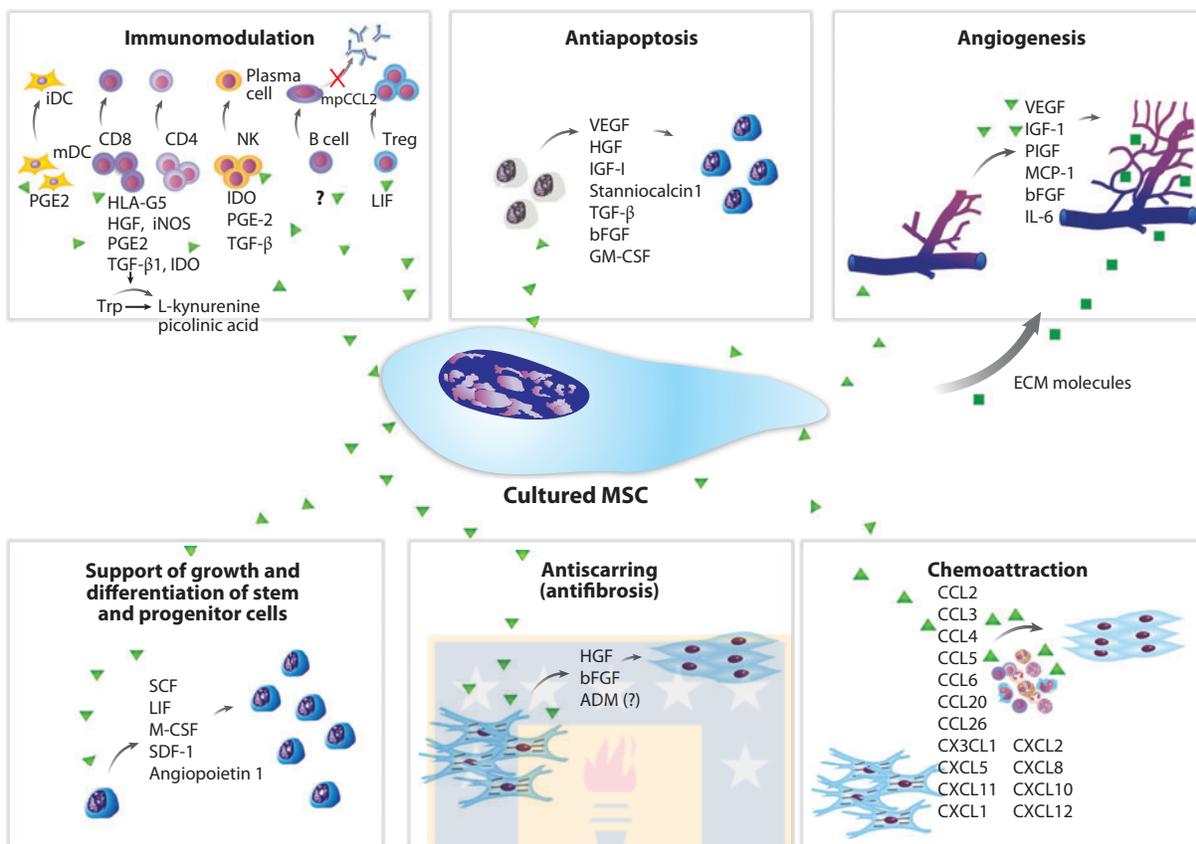
## INMUNOBIOLOGÍA DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

### Secreción de factores bioactivos de las MSC

---

La manera en que las MSC actúan en una zona lesionada, aún no está del todo clara, pero uno de los postulados que más ha cobrado fuerza en los últimos años, es el efecto modulador y regulador de la respuesta inmune (Carrade *et al.*, 2012). El paradigma respecto a cómo las MSC actúan, cambió hace algunos años cuando se incluyó dentro de las características de las MSC la secreción de factores bioactivos (Figura 5), que ejercen efectos paracrin, inmunomoduladores, anti-cicatrización y quimioattractantes sobre otras células (Meirelles *et al.*, 2009).

Dentro de los factores bioactivos secretados por las MSC, se encuentran citoquinas anti-apoptóticas tales como VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, IGF-I, postulando en base a esto, que las MSC no reemplazan a las células del tejido lesionado, si no que actúan protegiéndolas de procesos apoptóticos y estimulando su propia regeneración (Rehman, 2004; Tögel *et al.*, 2007). De igual modo, se han hallado citoquinas angiogénicas y quimioattractantes como VEGF, bFGF, HB-EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, CXCL-1, RANTES, MCP-1 y M-CSF, las cuales intervienen principalmente en estimular la neo-formación de vasos sanguíneos, a través del aumento en la proliferación de células endoteliales (Kinnaird *et al.*, 2004). Otros factores descritos con propiedades anti-cicatrizantes son bFGF y HGF, factores que están involucrados principalmente en prevenir la producción de zonas fibróticas (Rehman, 2004). Además de los factores mencionados, se ha demostrado que las MSC cultivadas *in vitro* expresan moléculas tales como IL-6, IL-11, SCF, LIF, M-CSF, SDF-1 y angiopoietina-1 (Park *et al.*, 2009). De lo anterior se desprende, que estos factores permiten generar las condiciones para regular la proliferación, la diferenciación y la mantención de las MSC (Haynesworth *et al.*, 1996). Mientras que en las últimas décadas, ha tomado cada vez mayor importancia los reportes de mediadores de la inmunidad mediada por las MSC como PGE<sub>2</sub> (Bouffi *et al.*, 2010), TGF- $\beta$  (Nicola *et al.*, 2002), iNOS (Sato *et al.*, 2007) e IDO (Meisel *et al.*, 2004).



**Figura 5:** Citoquinas liberadas por las MSC y sus efectos paracrinos en diferentes escenarios (Tomada y modificada de Singer y Caplan, 2011)

## Immunomodulación mediada por las MSC

Las terapias con MSC, se han basado en el uso de MSC provenientes del propio paciente (autólogos) o de un donante (allogénicos). En el primer caso, el donante y el receptor son el mismo individuo y en el segundo caso el donante y el receptor son individuos diferentes, pero de la misma especie. Varios estudios en medicina humana (Rafei *et al.*, 2009; Hare *et al.*, 2012; Majeed *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012) y en medicina veterinaria (Udehiya *et al.*, 2013; Kol *et al.*, 2015), han determinado que el uso de MSC allogénicas pudieran presentar efectos adversos posterior a la administración. Sin embargo existe gran controversia respecto a este tema, llegando incluso a sugerir que las MSC allogénicas, en comparación con las autólogas, tienen un mayor efecto inmunosupresor (Maccario *et al.*, 2005).

Las MSC, son en general consideradas como células que presentan una baja inmunogenicidad o “inmunológicamente privilegiadas” (Uccelli *et al.*, 2006). Esto es debido a la reducida expresión de antígenos MHC clase I y II, junto a la expresión de marcadores de superficie CD40, CD80 y CD86, que corresponden a moléculas co-estimuladoras requeridas para la activación de linfocitos T. Se ha visto tanto *in vitro* como *in vivo*, principalmente en humanos y recientemente en especies domesticas, que las MSC modulan la producción de citoquinas por parte de las células dendríticas y subpoblaciones de células T DC1/Th1 y DC2/Th2, también bloquean la maduración y activación de las células presentadoras de antígenos, aumentan la producción de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> y CD25<sup>+</sup> y suprimen la función de células B y NK (Bassi *et al.*, 2011; Singer y Caplan, 2011).

Cuando evaluamos el efecto que tienen las MSC sobre poblaciones celulares involucradas en la respuesta inmune, observamos que:

Las MSC *in vitro*, pueden inhibir la diferenciación y la activación de células dendríticas, las cuales permanecen en un estado inmaduro, por el bloqueo de monocitos al entrar a la fase G1 acumulándose células de forma progresiva en la fase G0 (Ramasamy *et al.*, 2007). También pueden generar cambios en el patrón de secreción de estas células, estimulando la secreción de interleuquina 10 (IL-10), la inhibición de Interferón gama (IFN- $\gamma$ ), interleuquina 12 (IL-12) y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ; Nauta *et al.*, 2006). Al inhibir la maduración y diferenciación de las células dendríticas, estas presentan una inhibición de la expresión de proteínas de superficie como CD1a, CD40, CD83, CD80, CD86 y HLA-DR y una inhibición de la endocitosis, lo cual se ha observado cuando las células dendríticas son sometidas a un cultivo con el sobrenadante proveniente de las MSC (Zhang *et al.*, 2004; Jiang *et al.*, 2005).

En linfocitos B en humanos, se ha visto que las MSC logran inhibir la diferenciación terminal de los linfocitos B a células plasmáticas, por lo cual se genera una disminución de la secreción de inmunoglobulinas IgM, IgD e IgG y de la expresión de CD138 (Asari *et al.*, 2009). También se ha observado que inhiben la quimiotaxis de los linfocitos B, a través de la modulación en la expresión de receptores de quimioquinas como CXCL12 que interactúa con CXCR4, de CXCL13 que interactúa con CXCR5, de CCL19 y CCL21 que interactúan con CCR7, receptores que se han visto disminuidos en linfocitos B enfrentados con MSC (Corcione *et al.*, 2006).

Los efectos inmunomoduladores de las MSC sobre poblaciones de linfocitos T en humanos, es algo que ha sido descrito principalmente en experimentos realizados con BM-SC. Las MSC son capaces de reducir la expresión de algunos marcadores de activación como CD25, CD38 y CD69, esto apoya la hipótesis de que las MSC logran escapar al reconocimiento mediado por los linfocitos T y que logran suprimir la proliferación de células (CD3, CD4)<sup>+</sup> (Linfocitos T helper) y (CD3, CD8)<sup>+</sup> (Linfocitos T citotóxicos; Blanc *et al.*, 2004). Cuando son sometidas a co-cultivo con las MSC, la diferenciación de los linfocitos T virgen (Tn) hacia linfocitos Th1 se ve afectada, disminuyendo los niveles de secreción de IFN- $\gamma$ . Una situación similar ocurre en la diferenciación de los linfocitos Tn hacia linfocitos Th2 en presencia de MSC, generándose una disminución de secreción de IL-4 (Aggarwal, 2005). Por otro lado, cuando se diferencian linfocitos Tn hacia células Th17 (CD3 y CD28)<sup>+</sup>, se genera una inhibición de la diferenciación y de la secreción de IL-4, IL-5, IL-13 y IL-10 (Ghannam *et al.*, 2010).

En el caso de los linfocitos Natural Killer (Nk), las MSC generan una disminución de los receptores de superficie como MRFI, NKp30, NKp44, NKG2D, CD244 y CD132 (Spaggiari *et al.*, 2008). También se ha reportado, que inducen cambios en el patrón de secreción de las NK y de la citotoxicidad de estas contra HLA clase I, lo cual se da por una baja expresión de NK Group2D (NKG2D), el que está involucrado en el reconocimiento inducido por el estrés del MHC de clase I (Reinders y Hoogduijn, 2014).

Mientras que en el caso de los linfocitos T reguladores (Treg), cuando son enfrentados a las MSC, no obstaculizan las funciones y los efectos de estas. Las primeras evidencias indicaron que, las MSC inhiben fuertemente la expansión de linfocitos T CD8<sup>+</sup> y de células NK, pero favorece la expansión de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> específicamente al subconjunto que co-expresan CD25 y/o CTLA-4, que corresponde a la sub población de células conocida como Treg (Maccario *et al.*, 2005). Los linfocitos Treg dificultan la proliferación de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y células dendríticas, los mismos subconjuntos de células inmunes que regulan las MSC (Velthuis *et al.*, 2006; Hendrikx *et al.*, 2009). Junto a esto, se ha visto que las moléculas que los Treg utilizan para su efecto tolerogénico, son las mismas que están implicadas en la inmunomodulación de las MSC, como IL-10, TGF- $\beta$  y Heme oxigenasa-1 (HO-1; Tang y Bluestone, 2008).

## Producción de mediadores inmunomoduladores

Los mediadores por los que las MSC adquieren un fenotipo inmunomodulador varía dependiendo de cada especie. De manera general, estas moléculas tienen como objetivo inmunomodular y/o inhibir una respuesta inmune. Por mencionar algunos, en el caso de las MSC de murinos, se ha visto que inhiben la proliferación de células T por medio de la secreción de NO, mientras que las MSC humanas y primates no humanos, las citoquinas inflamatorias inducen la secreción deIDO (Ren *et al.*, 2009). Estas diferencias y los mediadores descritos para las diferentes especies estudiadas, pueden apreciarse en la tabla 1.

**Tabla 1:** principales mediadores inmunomoduladores detectados en diferentes especies de mamíferos.

| Especie        | Mediador                                  | Referencia                       |
|----------------|---|----------------------------------|
| <b>Humanos</b> | Hepatocyte Growth Factor (HGF)            | Ren <i>et al.</i> , 2009         |
|                | Indolamine 2,3-Dioxygenase (IDO)          | Ren <i>et al.</i> , 2009         |
|                | IL-6                                      | Djouad <i>et al.</i> , 2007      |
|                | IL-10                                     | Tasso <i>et al.</i> , 2012       |
|                | Semaphorin-3 A                            | Lepelletier <i>et al.</i> , 2010 |
|                | B7-H4                                     | Xue <i>et al.</i> , 2010         |
|                | Leukemia Inhibitory Factor (LIF)          | Nasef <i>et al.</i> , 2008       |
|                | Galectin                                  | Lepelletier <i>et al.</i> , 2010 |
|                | Heme Oxigenase-1 (HO-1)                   | Chabannes <i>et al.</i> , 2007   |
|                | Prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> )     | English <i>et al.</i> , 2009     |
| <b>Caninos</b> | Fas Ligand (FasL)                         | Akiyama <i>et al.</i> , 2012     |
|                | Hepatocyte Growth Factor (HGF)            | Kang <i>et al.</i> , 2008        |
|                | Indolamine 2,3-Dioxygenase (IDO)          | Kang <i>et al.</i> , 2008        |
|                | TGF- $\beta$ 1                            | Lee <i>et al.</i> , 2011         |
|                | Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) | Lee <i>et al.</i> , 2011         |
|                | COX2                                      | Lee <i>et al.</i> , 2011         |
| <b>Murinos</b> | IL-8                                      | Lee <i>et al.</i> , 2011         |
|                | Prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> )     | Kang <i>et al.</i> , 2008        |
|                | Óxido Nítrico (NO)                        | Ren <i>et al.</i> , 2008         |
|                | IL-6                                      | Djouad <i>et al.</i> , 2007      |
|                | IL-10                                     | Tasso <i>et al.</i> , 2012       |
|                | Chemokine Ligand 2 (CCL2)                 | Lepelletier <i>et al.</i> , 2010 |
| <b>Pollos</b>  | Heme Oxigenase-1 (HO-1)                   | Chabannes <i>et al.</i> , 2007   |
|                | Prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> )     | English <i>et al.</i> , 2009     |
|                | Fas Ligand (FasL)                         | Akiyama <i>et al.</i> , 2012     |
|                | Óxido Nítrico (NO)                        | Khatri <i>et al.</i> , 2009      |

|                            |   |                               |
|----------------------------|---|-------------------------------|
| <b>Equinos</b>             | TGF- $\beta$ 1                            | Carrade <i>et al.</i> , 2012  |
|                            | IL-6                                      | Carrade <i>et al.</i> , 2012  |
|                            | Prostaglandina E2 (PGE <sub>2</sub> )     | Carrade <i>et al.</i> , 2012  |
| <b>Cerdos</b>              | TGF- $\beta$ 1                            | Poncelet <i>et al.</i> , 2007 |
|                            | IL-10                                     | Raoufi <i>et al.</i> , 2011   |
| <b>Conejos</b>             | TGF- $\beta$ 1                            | Liu <i>et al.</i> , 2006      |
|                            | IL-10                                     | Liu <i>et al.</i> , 2006      |
| <b>Primates no humanos</b> | TGF- $\beta$ 1                            | Berman <i>et al.</i> , 2010   |
|                            | Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) | Berman <i>et al.</i> , 2010   |

Se ha descrito que las MSC equinas secretan los siguientes mediadores: PGE<sub>2</sub>, IL-6, TGF- $\beta$  e iNOS. Siendo estos estudios realizados comparando a las eASC y eBM-SC, determinando que las MSC logran inhibir la proliferación de linfocitos T y presentan un incremento en la secreción de IL-6 cuando son co-cultivadas con linfocitos T *versus* las que no fueron co-cultivadas. Por otro lado se ha observado una reducción en la producción de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T cuando estaban en presencia de las MSC. Mientras que la producción de iNOS, fue detectada solamente en las eBM-SC, no así en las eASC. Por otro lado,IDO no se ha detectado en ninguna de las fuentes celulares hasta la fecha (Carrade *et al.*, 2011). Este estudio preliminar en la especie equina permitió identificar las moléculas secretadas por las distintas fuentes de células madre equinas.

De esta manera se postula, que la inhibición de los linfocitos T depende de la fuente de origen de las MSC equinas. Estudios posteriores realizado por el grupo de investigación de Carrade *et al.*, (2014) de la Universidad de California, Davis, USA, determinaron que la IL-6, no es la responsable de inhibir los linfocitos T, lo cual se determinó por el uso de anticuerpos anti IL-6. Al co-cultivar los linfocitos T con las MSC, se inhibió la proliferación, pero al inhibir la IL-6 no se revirtió el efecto inhibitorio mediado por las MSC. Lo mismo se realizó con iNOS, el cual se inhibió por medio de L-NAME y no se vieron efectos de reversión del fenómeno, pero cuando se analizó la secreción y la inhibición de PGE<sub>2</sub>, se observó que al inhibir PGE<sub>2</sub> si se lograba revertir el efecto inhibitorio, observándose una proliferación progresiva de los linfocitos T. Esto fue acompañado de una restauración de la secreción de citoquinas producidas por los linfocitos T, tales como TNF $\alpha$  y IFN $\gamma$ . Lo interesante de esto, es que PGE<sub>2</sub> es secretada por las principales fuentes de MSC como las ASC, BM-SC, CB-SC y UCB-SC.

Se postulan varias explicaciones para el fenómeno de inhibición de la proliferación de linfocitos T, dependiendo de la fuente celular; este puede estar dado por (1) una disminución de la síntesis de ADN en la fase S, (2) un arresto en el ciclo celular en fase G0/G1 ó (3) una inducción de la apoptosis. Las eASC y las eUC-SC, inducen a la apoptosis de las células T, mientras que las eUCB-SC y las eBM-SC inducen a los linfocitos T a quedar arrestados en G0 (Carrade *et al.*, 2014).

## Precondicionamientos de las MSC

---

Los fenómenos descritos, han sido evaluados principalmente *in vitro*, situación muy diferente a lo descrito *in vivo*. Durante el trasplante de MSC, existe una gran pérdida de estas en las zonas lesionadas, ya sea por una bajo suministro de sangre, isquemia, inflamación o por la inducción de apoptosis celular (Noiseux *et al.*, 2012). Esto genera grandes complicaciones y obliga a la comunidad científica a buscar alternativas para minimizar estos riesgos, entre ellos se ha estudiado la posibilidad de generar precondicionamientos *in vitro* a las MSC y así potenciar sus características.

Junto al precondicionamiento de las MSC, se ha estudiado el efecto de diferentes moléculas para generar un efecto mitogénico en los linfocitos T, utilizando diferentes estrategias para estimular la capacidad proliferativa de estos. Entre los precondicionamientos usados, se ha descrito el uso de triacilil lipopeptido para estimular TLR1, peptidoglicanos para estimular TLR2, dsRNA como Poly I:C para estimular TLR3, el uso de LPS para estimular TLR4, diacril lipopeptido para estimular TLR6, ssARN para estimular TLR7 y CpG ADN para estimular TLR9 (Caramalho *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010; Salem *et al.*, 2011; Kulkarni *et al.*, 2011). De esta manera se estimula la activación de células CD4<sup>+</sup>, se suprime la actividad de linfocitos Treg o se logra aumentar la supervivencia de los linfocitos T, este fenómeno es esencial para realizar los ensayos *in vitro* de cocultivo y determinar la efectividad del licenciamiento inmunológico de las MSC.

Por otro lado, para potenciar las características inmunomoduladoras de las MSC, se han probado diferentes estrategias *in vitro* (Saparov *et al.*, 2016), como el precondicionamiento con hipoxia (Bader *et al.*, 2015; Rosová *et al.*, 2015; Beegle *et al.*, 2015), el uso de citoquinas de la inmunidad innata como el IFN $\gamma$  y el TNF $\alpha$  (Tu *et al.*, 2010; Noone *et al.*, 2013), moléculas pro-inflamatorias como el LPS (Gray *et al.*, 2015; Ti *et al.*, 2015), IFN $\beta$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$  (Gu *et al.*, 2015), Poly I:C (Fuenzalida *et al.*, 2016), hormonas como la Oxitocina (Szeto *et al.*, 2008; Elabd *et al.*,

2008; Kim *et al.*, 2012; Noiseux *et al.*, 2012; Vu *et al.*, 2014) y cultivos tridimensionales como el uso de esferoides (Ylöstalo *et al.*, 2012; Bartosh *et al.*, 2013). Pero hasta la fecha el uso de PGE<sub>2</sub> y sustancia P (SP) como moléculas preconditionantes, no han sido testeadas ni reportadas para el preconditionamiento de las MSC.

En el caso particular de las moléculas analizadas en este estudio, se ha demostrado ampliamente que la PGE<sub>2</sub> es uno de los mediadores importantes en la inmunomodulación de las MSC (Yagi *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015). Estudios *in vitro* con MSC han demostrado que PGE<sub>2</sub> es producida en bajas cantidades en condiciones de cultivo, ya que para su expresión requiere de un contacto célula-célula y una señal paracrina proveniente de linfocitos (Zafranskaya *et al.*, 2013). En ausencia de un proceso inflamatorio, las MSC expresan de manera limitada factores como COX-2, PGE<sub>2</sub>, TGF- $\beta$  e IDO, pero cuando están en un ambiente inflamatorio, los factores pro-inflamatorios estimulan a las MSC e inducen la secreción de factores anti-inflamatorios (Tilley *et al.*, 2001). Se ha visto que en presencia de TNF- $\alpha$  e IFN $\gamma$  se incrementan la secreción de PGE<sub>2</sub>, en un contexto *in vivo*, lo cual se genera a través de la activación de linfocitos T que secretan TNF- $\alpha$ , el cual interactúa con los receptores de TNF- $\alpha$  presentes en las MSC (Aggarwal *et al.*, 2005). Se ha discutido ampliamente si la secreción de PGE<sub>2</sub> o IDO tienen menor o mayor importancia en la inmunomodulación que ejercen las MSC, observándose que la PGE<sub>2</sub> estaría relacionada con la supresión inmune temprana, mientras que IDO estaría relacionada con una supresión retardada mediada por las MSC (Zafranskaya *et al.*, 2013). Ahora, la PGE<sub>2</sub> por sí sola, no es mejor que el resto de los mediadores, ya que el efecto inmunomodulador está asociado al factor soluble que es secretado (Kang *et al.*, 2008b). Lo cual indicaría que la asociación de factores cooperan para un efecto inmunomodulador más efectivo (Zafranskaya *et al.*, 2013).

Por otro lado, la SP es un neuropéptido de 11 aminoácidos que está relacionada con la percepción del dolor (Hong *et al.*, 2009; Li, 2014). Pero también se ha visto involucrada en la quimiotaxis, movilización y *homing* de las MSC. Esto ha sido observado en estudios realizados en BM-SC en lesiones corneales, generándose una liberación de SP endógena, la cual atrae células CD29<sup>+</sup> desde el estroma de la médula ósea. También son atraídas, cuando la SP es inyectada por vía intravenosa, por lo cual se deduce que la SP es un factor de daño inducible que actúa tempranamente en el proceso de cicatrización. En el mismo estudio se logró demostrar que la SP tiene la capacidad de estimular la transmigración, la proliferación celular, la activación de la vía ERK 1 y 2 y la translocación nuclear de B-catenina *in vitro*. Todo esto convierte a la SP en un

mensajero y movilizador de células CD29<sup>+</sup> para la cicatrización de heridas, desde la periferia hacia la zona de lesión (Hong *et al.*, 2009; Li, 2014; Lan *et al.*, 2015). Otro estudio que se realizó con una línea celular de médula ósea ST2, demostró la expresión del receptor NK1 en su superficie (receptor para SP) y que éstas no sufrían efectos citotóxicos al ser tratadas con SP. También se observó la capacidad de migración de éstas células al estar en presencia de SP, generándose una movilización a las 9 hrs posterior al tratamiento en una herida inducida (Tong *et al.*, 1999). Con estos datos se podrían evaluar tres enfoques importantes en la estimulación con SP; (1) aumentar la proliferación de MSC endógenas *in vivo*, (2) mejorar la migración de las MSC desde la médula ósea y (3) para inducir la proliferación de las MSC recolectadas *in vitro* (Dubon y Park, 2015). También, se ha reportado que la SP tiene un potente efecto sobre las MSC y su actividad inmunomoduladora, ya que estudios recientes demostraron que la actividad de las MSC que eran cultivadas por largos periodos de tiempo perdían la capacidad moduladora sobre los linfocitos T, por una reducción en los niveles de TGF- $\beta$ 1. Esto indica que la producción de factores inmunomoduladores decrece y eventualmente la función inhibitoria de las MSC sobre el sistema inmune puede desaparecer. Pero cuando las MSC son preconditionadas con SP, estas incrementan la producción de TGF- $\beta$ 1 *in vitro* e IL-10 *in vivo*, de esta forma se revierte la incapacidad de suprimir la actividad de los linfocitos T (Jin *et al.*, 2015).

De lo discutido en esta sección se puede concluir que las MSC son una herramienta imprescindible en la medicina regenerativa veterinaria actual y que, desde el punto de vista práctico y funcional, las aproximaciones terapéuticas deben pasar preferentemente por el uso de células alogénicas, para lo cual se precisa entender y manipular, cómo las células exógenas pueden evitar ser detectadas y eliminadas por el sistema inmune del receptor.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

### Hipótesis

---

Sobre la base de lo planteado anteriormente, se propone la siguiente hipótesis: “El acondicionamiento con PGE<sub>2</sub> y Sustancia P, potencia las características inmunomoduladoras de las células madre mesenquimales equinas derivadas de tejido adiposo”.

### Objetivos

#### Objetivo general

---

Evaluar el efecto del acondicionamiento de células madre mesenquimales (MSCs) con PGE<sub>2</sub> y SP, sobre la capacidad de dichas células de adquirir actividad inmunomoduladora *in vitro*, en un modelo celular equino, para su uso futuro en terapias regenerativas alogénicas *in vivo*.

#### Objetivos específicos

---

1. Aislar y caracterizar las células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo obtenidas de muestras de caballo chileno.
2. Establecer la capacidad de dos moléculas (PGE<sub>2</sub> y Sustancia P) y de sus combinaciones, de estimular la síntesis y secreción cuantificable de mediadores de la actividad inmunomoduladora de MSCs *in vitro*.
3. Ensayar la actividad inmunomoduladora *in vitro* de las MSCs sometidas a las sustancias y combinaciones del objetivo anterior o no (vírgenes), sobre linfocitos T. Seleccionar la mejor condición.
4. Evaluar el efecto de los tratamientos acondicionantes sobre la actividad biológica intrínseca (no inmune) de las MSCs, en ensayos de migración y de diferenciación *in vitro*.

5. Establecer mediante secretómica a través de la técnica MALDI-TOF, el patrón de secreción global diferencial (proteico) de MSCs preconicionadas vs células vírgenes.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## Lugar de trabajo

---

La etapa de obtención de las muestras de tejido adiposo se realizó en el hospital de animales mayores de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, campus Chillan y la fase de procesamiento, análisis de las muestras y experimentos, se desarrolló en el Laboratorio de Biotecnología Animal del Departamento de Ciencia Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Concepción, campus Chillan. Este proyecto se realizó con el financiamiento del proyecto FONDEF IDEA ID14I10234 y con la aprobación del comité de bioética dentro del marco de dicho proyecto.

## Diseño experimental

---

El modelo animal que se utilizó en este proyecto corresponde la especie equina, dada su importancia en la economía deportiva en Chile y en el mundo por el gran impacto económico que significa tener a uno de estos animales lesionados y la posibilidad de extrapolar este conocimiento a la especie humana. Las muestras para la investigación fueron de fácil acceso dado el interés de los propietarios de estos animales, los que tienen un gran valor sentimental, económico y genético. Las muestras fueron obtenidas a partir de tres animales, de la Fina Sangre Chilena (FSC), con condición corporal 5/9, buen estado de salud y de edades de entre 5 y 8 años.

En relación a los objetivos planteados, el estudio se dividió en dos grandes partes; en la primera parte del estudio, se caracterizó biológicamente a las MSC derivadas de tejido adiposo equino, en relación a su capacidad proliferativa, diferenciación a las tres estirpes mesodérmicas, hueso, cartílago y grasa, capacidad de migración e inmunotipificación celular. Mientras que la segunda parte, comprendió el estudio de las MSC en relación a los factores de secreción, la adquisición de una capacidad inmunomoduladora, ante el reto con moléculas PGE<sub>2</sub> y Sustancia P y el efecto de estas moléculas sobre las propiedades biológicas intrínsecas definidas en la primera parte del estudio (figura 6).



**Figura 6:** Diseño experimental del estudio de la inmunobiología de las eASC sometidas a precondicionamiento con PGE<sub>2</sub> y SP. Fuente: elaboración propia.

## DETALLES DE LOS MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSITO (eASC) OBTENIDAS DE MUESTRAS DE CABALLO CHILENO.

#### 1.1. Animales

Se obtuvieron muestras de tejido adiposo de tres caballos FSC con una condición corporal 5 de una escala de 9 puntos (Henneke et al., 1983) y de un rango de entre 5-8 años de edad, sanos al examen clínico.

#### 1.2. Colección de tejido adiposo y aislamiento de MSCs

**Recolección y procesamiento del tejido adiposo:** se tomaron quirúrgicamente 15 grs de tejido adiposo subcutáneo desde la grupa de los caballos. El tejido se sometió a varios lavados en una solución salina tamponada con fosfato sódico (PBS al 1%) a 37°C, suplementado con 1X de

antibiótico antimicótico (AAM), seguido de un picado manual y digestión en tubos de 15 mL cónicos por 2 hrs en presencia de colagenasa-A (1 mg/mL) con agitación suave a 38°C, como se describió anteriormente (Castro et al., 2014). El tejido y los trozos sin digerir se dejaron sedimentar y el sobrenadante se extrajo cuidadosamente y se sembró en placas de Petri estériles de 60 mm que contenían DMEM: F12 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de AAM a 39°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Las células se adhirieron, crecieron y alcanzaron la confluencia en aproximadamente 3 a 5 días y se subcultivaron dos veces más antes de la congelación. El cultivo primario se denominó equine adipose stem cells (eASC). En todos los experimentos se usaron estas células en pasaje 3 (P3).

### **1.3. Viabilidad celular**

La viabilidad celular se evaluó usando tinción con naranja de acridina/ioduro de propidio (kit de viabilidad celular AO/PI, Logos Biosystem, Seúl, Corea), según instrucciones del fabricante. La lectura se realizó en un contador de células fluorescentes automático Luna II (Logos Biosystem).

### **1.4. Estimación del tiempo de duplicación de la población (PDT)**

Este ensayo se realizó esencialmente como se describió anteriormente (Alipour et al., 2015). En resumen, las células en P3, se sembraron a una densidad de 30000 células/pocillo en placas de 12 pocillos. Después de 6 días o al llegar a la confluencia, el número de células se contó de nuevo y el PDT se calculó utilizando un software en línea (<http://doubling-time.com/compte.php>). El algoritmo para el cálculo fue, PDT: duración del cultivo \* log (2) /log (concentración final) - log (concentración inicial). Todo el conteo se realizó en el contador automático de células fluorescentes Luna II (Logos Biosystem, Seúl, Corea).

### **1.5. Diferenciación de tri-linaje y tinción específica**

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron para cada animal por triplicado en placas de 6 pocillos en P3. Las células se sembraron y se les permitió alcanzar 80-90% de confluencia. En este punto, se eliminó el medio de cultivo, las células se lavaron dos veces con PBS al 1X y se cambió por los medios de inducción comerciales (STEMPRO Differentiation kit A1007001, A1007101, A1007201, Gibco, Grand Island, NY, EE. UU.) y se mantuvieron bajo los estímulos de diferenciación durante 21 días. En los días 7, 14 y 21 se realizó la tinción

específica. Cada experimento incluía un control negativo de células teñidas las que no se encontraban inducidas.

**1.5.1. Tinción de Alizarin red para la diferenciación osteogénica:** las células se lavaron dos veces con PBS al 1% y luego se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 15 min a temperatura ambiente (TA) y se tiñeron con 1 mL por pocillo de Alizarin red S al 2% (Sigma Aldrich), pH 4,1 a 4,3, se incubó durante 20 minutos con agitación suave. El exceso de tinción se eliminó lavando 4 veces en 1 mL de PBS al 1% durante 5 minutos con agitación sutil. Finalmente, las placas se examinaron bajo el microscopio invertido para buscar cristales de hidroxapatita.

**1.5.2. Tinción con Alcian Blue para la diferenciación condrogénica:** las células se lavaron dos veces con PBS al 1% y luego se fijaron con etanol al 100% durante 60 minutos a TA, se lavó con PBS al 1% y se tiñeron con 1 mL por pocillo de Alcian Blue 8GX al 0,02% (Sigma Aldrich), pH 1, durante 3 hrs con agitación suave y posteriormente se lavó 3 veces con 1 mL de etanol al 100% durante 5 minutos con agitación. El exceso de líquido se eliminó y luego se evaluó bajo el microscopio invertido para glicosaminoglicanos ácidos (GAG).

**1.5.3. Tinción con Oil red para la diferenciación adipogénica:** las células se lavaron dos veces con PBS al 1% y luego se fijaron con formaldehído al 10% durante 20 min a TA, se lavaron y se tiñeron con la solución de Oil red durante 20 minutos bajo agitación sutil. Las células se lavaron 3 veces con 1 mL de PBS al 1% para eliminar el exceso de colorante. Finalmente, las células se visualizaron bajo el microscopio invertido, para observar la coloración roja de las vacuolas lipídicas dentro de las células.

## 1.6. Análisis de imágenes

La medición semicuantitativa de la diferenciación se realizó por medio del análisis de las imágenes con el software libre ImageJ (<https://imagej.net>). Para esto, diez marcos representativos de cada imagen para cada tipo de diferenciación fueron elegidos y procesados aleatoriamente por el software Imagen J. Los valores se expresaron como porcentaje del área de cobertura para la tinción dada y se calcularon usando la media de todas las mediciones y desviación estándar.

### 1.7. Histología

Los pellets de la diferenciación condrogénica fueron fijados en paraformaldehído al 4% en PBS 1%, por 48 horas, luego fueron procesadas en un procesador automático Citadel 1000 Shandon, cortes a 4µm fueron hechas desde muestras embebidas en parafina (FFPE). Las muestras fueron teñidas con hematoxilina eosina, Alcian blue PAS pH 2,5 según parámetros de la AFIP (Armed Forces Institute Pathology, Estados Unidos). Para visualizarlas se utilizó un microscopio de luz Axioscope 4.0 Carl Zeiss.

### 1.8. Migración celular por ensayo de Scratch

La monocapa de células cultivadas en placas de 12 pocillos en confluencia total se expuso durante 2 hrs a 10 mg/mL de Mitomicina C derivada de *Streptomyces caespitosus* (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.), para evitar sellar el scratch por la proliferación celular. Después de la incubación, la mitomicina C se lavó con medio fresco y las células se sometieron al ensayo de migración como se describe anteriormente (Justus et al., 2014). La monocapa se rasguñó con una punta amarilla en línea recta perpendicular al punto central imaginario de la placa. El rasguño abarcó todo el fondo de la placa (ancho aproximado: 1 mm). Después del scratch, las células se alimentaron con DMEM:F12 (1:1) sin suero (grupo de control) o con DMEM: F12 suplementado con SFB al 10%. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. El área rasguñada sin células se capturó inmediatamente después del rasguño y se midió a las 12 y 24 hrs usando la captura de fotografías y un sistema de software asociado con un microscopio invertido de fluorescencia EVOS FL (ThermoFisher, Santiago, Chile). La barra de escala utilizada como referencia para las medidas fue de 1000 µm. Se midió el porcentaje de llenado del rasguño en diferentes puntos de tiempo para eASC. Las imágenes fueron analizadas por el software ImageJ (<https://imagej.net>).

### 1.9. Análisis de marcadores de superficie de las eASC para marcadores multipotentes

La citometría de flujo se utilizó como técnica para analizar los marcadores de superficie de las MSC, en un citómetro de flujo acústico (Attune<sup>®</sup> NXT Acoustic Focusing Cytometer, ThermoFisher, Santiago, Chile). Los marcadores, la marca, el número de catálogo y el clon de los anticuerpos utilizados se muestran en la **Tabla 1**. Todos los anticuerpos primarios, a excepción de

CD29 y CD105, estaban conjugados comercialmente. Para CD29 y CD105, se utilizaron anticuerpos secundarios marcados. En todos los casos se midió la autofluorescencia y la fluorescencia de los anticuerpos marcados que coinciden con isotipos (IgG1k e IgG2a según el anticuerpo primario). Se contaron 10,000 eventos en cada medición. La reactividad cruzada de los anticuerpos se provó previamente en el laboratorio (datos no mostrados) utilizando controles positivos y negativos apropiados tanto en citometría celular como en inmunofluorescencia, además todos los anticuerpos utilizados se habían notificado anteriormente para caballos en la literatura especializada (Carrade et al., 2012).

**Tabla 2.** Lista de los anticuerpos utilizados para el análisis de marcadores de superficie de MSCs equinas, a través de citometría de flujo

| Anticuerpo                                     | Especificidad | Compañía    | Clon        | Numero de catalogo | Reactividad | Hospedador |
|--|---------------|-------------|-------------|--------------------|-------------|------------|
| PE mouse anti human CD90                       | CD90          | BD          | 5E 10       | 555596             | Humano      | Ratón      |
| Mouse anti horse CD44:RPE                      | CD44          | ABD         | CVS18       | MCA1082PE          | Equino      | Ratón      |
| Mouse anti horse MHC class I monomorphic: RPE  | MHC class I   | ABD         | CVS22       | MBS224439          | Equino      | Ratón      |
| Mouse anti horse MHC class II monomorphic: RPE | MHC class II  | ABD         | CVS20       | MCA1085PE          | Equino      | Ratón      |
| Anti Human CD105 (unconjugated)                | CD105         | eBioscience | SN6         | 124714             | Humano      | Ratón      |
| CD45 antibody PE conjugate                     | CD45          | Thermo      | EM-05       | MA1-10233          | Ratón       | Rata       |
| CD29 antibody (unconjugated)                   | CD29          | Beckman     | 4b4LDC9LDH8 | 4235595-G          | Ratón/Rata  | Ratón      |

## 2. ESTABLECER LA CAPACIDAD DE DOS MOLÉCULAS (PGE<sub>2</sub>, SUSTANCIA P) DE ESTIMULAR LA EXPRESIÓN CUANTIFICABLE DE MEDIADORES DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE eASC *in vitro*.

### 2.1. Análisis de RT-qPCR

Un microgramo de ARN total, fue utilizado para la síntesis de ADNc, mediante transcripción reversa. La contaminación de ADN, fue eliminada por medio del tratamiento de DNase y RNase-free. Para cada muestra, se realizó una reacción completa, pero sin transcriptasa inversa (RT). Los cebadores se seleccionaron cuidadosamente para amplificar regiones expresadas verdaderas, abarcando intrones de los genes y para evitar la amplificación de pseudogenes o variantes de corte y empalme. El análisis de expresión génica se realizó mediante PCR en tiempo real usando el método de curva estándar. Para eso, las curvas estándar para cada gen se prepararon utilizando diluciones seriadas de productos de PCR cortados y eluidos de geles de agarosa y cuantificados

por Epoch (Biotek, Berlín, Alemania). Se incluyeron ocho puntos en cada curva estándar y se usaron 2 µl por duplicado para cada punto de la curva. En todas las lecturas de qPCR, se utilizó ACTB y GUSB como controles internos. Solo aquellos experimentos de PCR con una eficiencia (incluyendo curvas estándar y muestras) con un rango de 90-110% con un coeficiente de correlación de 0.97, se usaron para el análisis de expresión génica. Además, todas las muestras dentro del rango de cuantificación de la curva estándar se consideraron para el análisis. Las muestras se procesaron por triplicado en una reacción de 10µl usando SYBRGreen en el equipo de PCR en tiempo real MX3000P (Agilent, Santa Clara, CA, EE. UU.). Los valores de la curva de disociación y el umbral de corte (CT) se calcularon con el software incorporado para todas las lecturas. La lista de partidores está disponible en la tabla 3. Los genes analizados son los siguientes: TNF $\alpha$ , IL1a, IL-10, IL-8, IL-6, PGES y los genes constitutivos ACTB y GUSB.

**Tabla 3:** Pares de partidores utilizados para el análisis de PCR con sus respectivas secuencias y temperaturas de anilling (TA).

| Número de acceso | Gen          | Forward                     | Reverse                      | TA   |
|------------------|--------------|-----------------------------|------------------------------|------|
| NM_001081819.2   | TNF $\alpha$ | 5'-GCTGGAGAAGGGTGATCAAC-3'  | 5'-TCACAGGGCAATGATCCCAA-3'   | 55°C |
| NM_001082500.2   | IL-1a        | 5'-GACTGTTTGTGAGTGCCCAA-3'  | 5'-AAGAAGAGGAGGTTGGTCTCA-3'  | 53°C |
| NM_001082490.1   | IL-10        | 5'-TCATCGATTTCTGCCCTGTGA-3' | 5'-ACTCATGGCTTTGTAGACACCT-3' | 54°C |
| NM_001083951.2   | IL-8         | 5'-TTGGCCGTCTTCCTGCTTTC-3'  | 5'-AAGGTTGGAGTGCGTCTTGA-3'   | 55°C |
| NM_001082496.1   | IL-6         | 5'-CCAAAGTCCTGGTCCAGATCC-3' | 5'-GTGAATGCAGCTTAGCCAGC-3'   | 55°C |
| NM_001081935.1   | PTGES        | 5'-GAAGAAGGCTTTCGCCAACC-3'  | 5'-ATGGTCTCCATGTCGTTCCG-3'   | 58°C |
| NM_001081838.1   | ACTB         | 5'-GCTCCCAGCACGATGAAGAT-3'  | 5'-GGTGGACAATGAGGCCAGAA-3'   | 53°C |
| XM_005598720.2   | GUSB         | 5'-TGATGTGGTCTGTGGCCAAT-3'  | 5'-CGGGAAGGGTCCAAGTCTTT-3'   | 56°C |

### 3. ENSAYO DE LA ACTIVIDAD INMUMODULADORA *in vitro* DE LAS eASC SOMETIDAS A LAS SUSTANCIAS Y COMBINACIONES DEL OBJETIVO ANTERIOR O NO (VÍRGENES), SOBRE LINFOCITOS T EN MODELOS DE CO-CULTIVO. SELECCIONAR LA MEJOR CONDICIÓN.

#### 3.1.Linfoproliferacion

3.1.1. **Células monocucleares aisladas desde sangre periférica (PBMC):** La sangre fue colectada de sangre periférica de equinos, desde la vena yugular, en tubos con EDTA. Se obtuvo mezclando 15 mL de sangre entera con 15 mL de PBS al 1X, depositándolos en 15 mL de Ficoll Histopaque-1077 (Sigma, 10771), se centrifugaron a 400 x g por 30 minutos

sin freno, la fracción de PBMC fue aislada y se lavó dos veces con PBS al 1X centrifugándolas a 1500 rpm por 10 minutos sin freno y el pellet resultante se re-suspendió en medio RPMI 1640 (Biological Industries) suplementado con 10% de SBF inactivado y se mantuvieron en hielo hasta su uso.

- 3.1.2. **Precondicionamiento de las eASC:** las eASC se cultivaron en placas de 6 wells hasta llegar a un 90% de confluencia en pase 3, una vez alcanzada la confluencia se estimularon con 3  $\mu\text{M}$  por 24hrs de PGE<sub>2</sub> (Prostaglandin E2, Cayman Chemical, 14010, Ann Harbor, MI, Estados Unidos), en medio DMEM HG (Gibco) a pH 6.8, otro grupo con 3  $\mu\text{M}$  de PGE<sub>2</sub> asociada a 100nM por 24 hrs SP (TOCRIS, 1156) en medio DMEM HG a pH 6,8, un grupo solo con 100nM por 24 horas SP y otro grupo con 10ng/ml de IFN $\gamma$  (Recombinant human IFN gamma protein, R&D) en medio DMEM HG pH 7,2 por un periodo de 24 hrs a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> y humedad continua. Para evitar la proliferación de las eASC en el co-cultivo se inactivaron con Mitomicina C (Sigma, M4287), posterior a las 24 hrs de precondicionamiento, por un periodo de 2 hrs a 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> y humedad continua.
- 3.1.3. **Función inmunomoduladora de las MSC sobre las poblaciones de PBMC:** se evaluó por medio de la capacidad de modular a las PBMC activadas por mitógenos. Los mitógenos utilizados fueron LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , LPS-B5, InvivoGen, 15C11-MM) y Poly I:C (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Poly (I:C) HMW fluorescein, InvivoGen, TLR-PICF). El co-cultivo se realizó utilizando una proporción de eASC:PBMC de 1:10 (10.000:100.000), en placas de 96 pocillos, cultivadas en 100 $\mu\text{l}$  de medio RPMI 1640, suplementado con 10% de SBF inactivado. El cultivo se mantuvo por un periodo de 72 hrs a 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> y humedad continua.
- 3.1.4. **Ensayo de BrdU, para evaluar proliferación de poblaciones de PBMC:** este ensayo se realizó según lo indicado por el fabricante, para lo cual se usó el kit BrdU Staining kit para citometría de flujo (Invitrogen). Brevemente: se adicionaron 10 $\mu\text{M}$  de BrdU al medio de cultivo 18 hrs previo a que se cumpla el tiempo final (en este caso 72 hrs). Se expusieron las células al marcador a 37°C por 1 hr, se lavaron 2X. Se incubaron con el buffer de tinción para citometría de flujo por 15 minutos. Posteriormente, se agregaron 300 $\mu\text{l}$  de DNasa por 1 hr bajo incubación a 37°C. Se agregaron 5 $\mu\text{l}$  de anticuerpo anti BrdU y se incubaron por 20 a 30 minutos en oscuridad. Posterior a esto se leyó en el citómetro de flujo.

### 3.2. Análisis de marcadores para linfocitos T reguladores

Para el análisis de los marcadores de linfocitos T reguladores, se utilizaron los anticuerpos primarios conjugados CD4, Foxp3 y CD25 sin conjugar (tabla 4). El análisis se realizó por medio de la citometría de flujo (Attune<sup>®</sup> NXT Acoustic Focusing Cytometer, ThermoFisher, Santiago, Chile). Se consideraron 10.000 eventos por cada medición. La medición por citometría de flujo, se realizó por triplicado para cada tratamiento.

**Tabla 4:** Lista de los anticuerpos utilizados para el análisis de marcadores de superficie de linfocitos T reguladores, medidos a través de citometría de flujo

| Anticuerpo                      | Especificidad | Compañía   | Clon       | Numero de catalogo | Reactividad | Hospedador |
|---------------------------------|---------------|------------|------------|--------------------|-------------|------------|
| Mouse anti horse CD4 FITC       | CD4           | BioRad     | CVS4       | MCA1078F           | Equino      | Ratón      |
| Human CD25/IL-2R alpha antibody | CD25          | R&D        | Policlonal | AF-223-NA          | Humano      | Cabra      |
| Anti-mouse/rat Foxp3 PE         | FOXP3         | Affimetrix | FJK-16s    | 12-5773.           | Ratón/Rata  | Rata       |
| AffiniPure F(ab') APC           | CD25          | Jackson IR | Policlonal | 705-136-147        | Cabra       | Donkey     |

## 4. EVALUAR EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PRECONDICIONANTES SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA INTRÍNSECA (NO INMUNE) DE LAS eASC Y ANÁLISIS DE TRIPOTENCIA DIFERENCIATIVA *in vitro*.

### 4.1. Capacidad tripotente de las eASC preconditionadas

Para evaluar la capacidad de diferenciación de las eASC posterior al preconditionamiento se sometió a las mismas condiciones mencionadas anteriormente en el punto 1.5. La diferencia consistió en que las células fueron cultivadas en placas de 24 pocillos, por un período de 24 hrs de preconditionamiento, momento en el cual se sustituyó el medio de cultivo por los respectivos medios inductores de la diferenciación condrogénica, adipogénica y osteogénica, procedimientos previamente descritos en los materiales métodos.

### 4.2. Inmunofenotipo de las eASC preconditionadas

Para la evaluación de efecto del preconditionamiento sobre el inmunofenotipo de las eASC, se sometieron a las mismas condiciones previamente descritas en el punto 1.9., pero cultivadas en placas de 6 pocillos y preconditionadas con PGE<sub>2</sub> y SP por un período de 24 hrs, momento en el que se realizó la lectura de los marcadores por citometría de flujo.

## **5. ESTABLECER MEDIANTE SECRETÓMICA, EL PATRÓN DE SECRESIÓN GLOBAL Y DIFERENCIAL DE eASC PRECONDICIONADAS CON PGE<sub>2</sub> y SP VS LAS eASC VÍRGENES, DE LA MEJOR CONDICIÓN SELECCIONADA EN EL OBJETIVO 2.**

### **5.1. Análisis de proteínas secretables (secretómica)**

Para el análisis de las proteínas secretadas por las eASC. Las células se cultivaron con medio preconditionante sin SFB por 24 hrs. Los medios preconditionantes utilizados fueron 1) PGE<sub>2</sub> en medio DMEM HG (Gibco) a pH 6.8, 2) PGE<sub>2</sub> + SP en medio DMEM HG a pH 6,8, 3) SP; y 4) IFN $\gamma$  (estándar de oro) en medio DMEM HG pH 7,2 por 24 hrs a 37°C, 5%, CO<sub>2</sub> y humedad continua. Para el análisis comparativo se utilizó como control células eASC no preconditionadas y su secretoma se consideró como la línea basal de proteínas secretadas al espacio extracelular. Posterior a la incubación por 24 hrs, se colectaron los sobrenadantes, se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 12%, se cortaron las bandas (9 en total) y se enviaron a la Universidad de South Dakota en Estados Unidos para el servicio de secuenciación. Este se llevó a cabo por espectrometría de masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight).

### **5.2. Identificación de proteínas de la digestión en solución (proteómica de shotgun)**

El análisis de shotgun se realizó de acuerdo a lo reportado por Sun et al., 2013 y Callegri, 2016. La proteína liofilizada se disolvió en ácido clorhídrico Tris 50 mM, seguido de reducción con DTT 50 mM a 65°C durante 5 minutos y se alquiló con 100 mM de yodoacetamida a TA durante 30 minutos. Se añadió un grado secuenciado de tripsina a 1/40 ( $\mu$ g de proteasa/ $\mu$ g de proteínas) e incubó a 37°C durante la noche para realizar la digestión. La reacción se detuvo mediante la adición de ácido acético para alcanzar un pH<3 y las proteínas digeridas se colocaron en hielo seco y luego se concentraron en un speedVac. Los péptidos trípticos se analizaron en un Ultimate 3000 nanoUHPLC utilizando un atrapamiento y desalación en línea a través de una columna trampa con un cartucho de 300 $\mu$ m x 20 mm Acclaim PepMap C18 100A (Thermo Scientific) y separados por un Acclaim PepMap RSLC 2 $\mu$ m, 75 $\mu$ m X 15 cm, nanoViper (Thermo Scientific) acoplado al espectrómetro de masas nanoESI QExactive Plus Orbitrap HR/MA. Las condiciones de la cromatografía fueron las siguientes: se utilizó un gradiente largo de 2 horas: 0-4 min, B isocrático al 1,2%; 4-98 min, 1.2-98% B lineal. Fase A móvil (Agua/Ácido fórmico, 99.9:

0.1% v/v), y fase B (Agua/Acetonitrilo/Ácido fórmico, 20/80/0.08% v/v). La velocidad de flujo del solucionador fue 300-400 nL min<sup>-1</sup>. El instrumento QExactive Plus fue operado en modo dependiente (DDS) para cambiar automáticamente entre la adquisición completa de MS y MS/MS. Los iones se analizaron en modo de ion MS positivo (m/z 350-1800) con una resolución de 70,000 (m/z 200) después de la acumulación con iones objetivo a un valor de 1x10<sup>6</sup> basado en el AGC predictivo. La selección de iones MS/MS se estableció en 1x10<sup>5</sup> cuentas. El espectro se deconvolucionó y se analizó utilizando Mascot Distiller v2.6 ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). Se generó una lista de formatos genéricos de Mascot (formato MGF) para identificar +1 o múltiples iones precursores cargados desde el archivo de datos de espectrometría de masas.

### 5.3. Análisis bioinformático

Se aplicó el servidor de Mascot v2.6.0 ([www.matrix-science.com](http://www.matrix-science.com), Reino Unido) en modo de búsqueda de iones MS/MS (licencias locales), para realizar coincidencias de péptidos (masas peptídicas y etiquetas de secuencia) y la búsqueda de proteínas frente a *Equus caballus* NCBIInr\_2017-071 (51584 secuencias; 25568827 residuos; localmente personalizado y curado) Se establecieron los siguientes parámetros para la búsqueda: carbamidometilo (C) cisteína se seteo como fijo; las modificaciones variables incluyeron asparagina, desamidación de glutamina y oxidación de metionina; se contaron las masas monoisotópicas; el péptido precursor y la tolerancia de la masa del fragmento se ajustaron a 15 ppm y 0,02 Da para QExactive Plus Orbitrap FTMS; el puntaje iónico o el corte esperado se estableció en 5. Los espectros MS/MS se buscaron con MASCOT utilizando un intervalo de confianza del 95% (% CI) (p < 0,05), con un puntaje mínimo de 30 para la identificación de péptidos. La redundancia de proteínas que apareció en la base de datos con diferentes números de gi y de acceso se limitó a *Equus caballus*. Todas las proteínas identificadas en el estudio actual se encontraron estos dominios.

La información entregada por el análisis de MASCOT, se analizó por medio de las siguientes herramientas: UNIPROT (<http://www.uniprot.org>), para analizar las interacciones de las proteínas secretadas para la identificación de los ID, funciones moleculares, procesos biológicos, SPRING (<http://string-db.org>), para analizar las interacciones de las proteínas secretadas, PHANTER (<http://geneontology.org>), para el análisis de procesos biológicos y funciones moleculares y REACTOME (<https://reactome.org>), para el análisis de las pathways, pero esta vez el análisis se realizó con bases de datos de *Homo sapiens*.

## 6. Análisis estadísticos

Todos los resultados se muestran como valores de medias con su desviación estándar (SD). La diferenciación, migración, citometrías y proliferación de linfocitos T, se analizaron a través de un análisis de Varianza de una vía (One Way ANOVA) y mediante un post hoc test de Tuckey utilizando el software Graphpad Prims 6.0 (GraphPad Software, Inc. La Jolla, CA, EE. UU.). En el caso del qRT-PCR, se utilizó un Análisis de varianza (ANDEVA) y un post hoc test de Duncan`s con el Software InfoStat<sup>®</sup> 2010 (Universidad de Córdoba, Argentina).



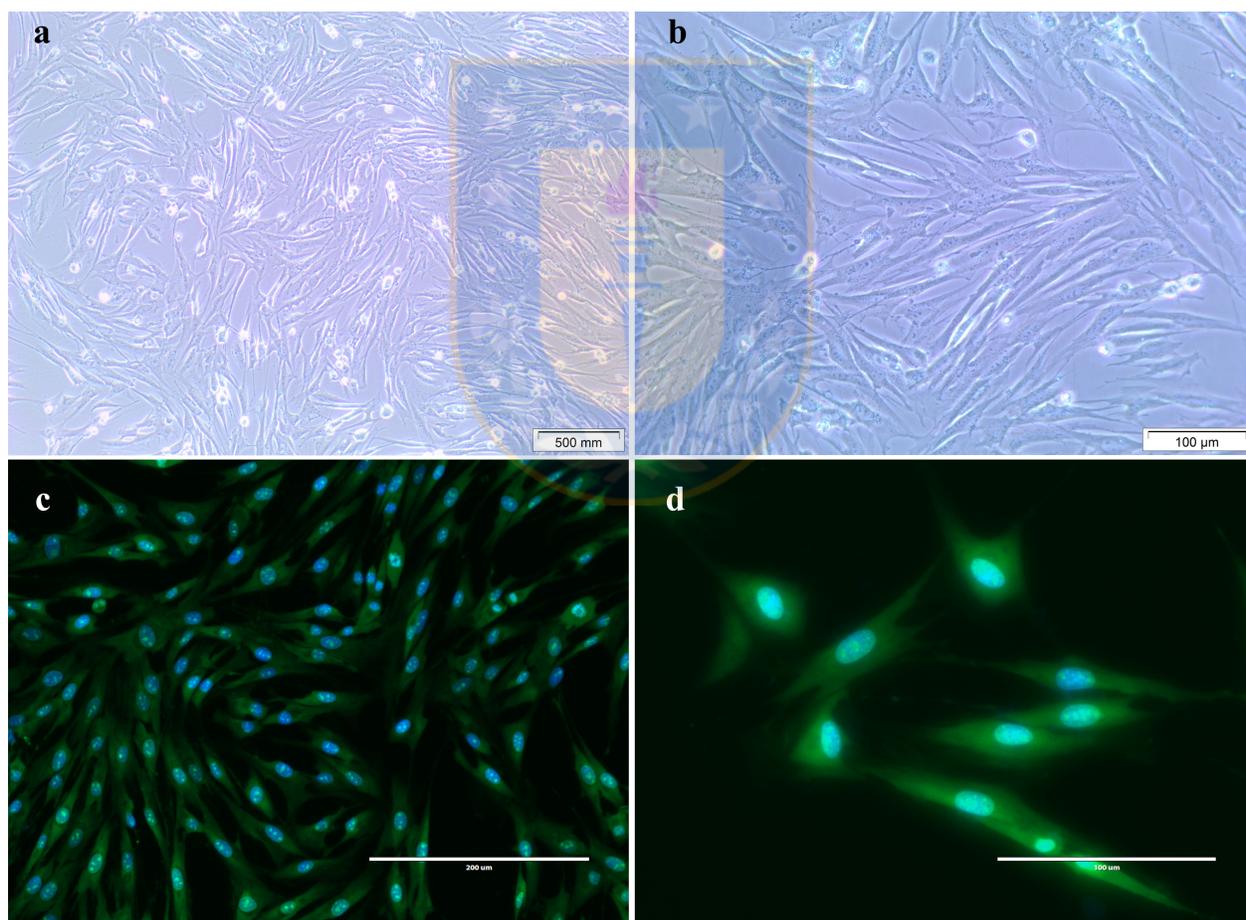
# RESULTADOS



## OBJETIVO 1: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES DERIVADAS DE TEJIDO ADIPOSO (eASC) OBTENIDAS DE MUESTRAS DE CABALLO CHILENO.

### 1.1. Aislamiento y cultivo de las eASC

Se lograron obtener cultivos celulares primarios de todas las muestras sometidas a digestión con colagenasa. *In vitro*, la adhesión al plástico se produjo aproximadamente 20 a 24 hrs después de la siembra y las células aisladas mostraron un aspecto fibroblástico, con un núcleo central y abundante citoplasma, que fue evidente 48 hrs después de la siembra (figuras 7 a y b). La viabilidad promedio de las células siempre fue superior al 95% (datos no mostrados; figura 7 c y d).



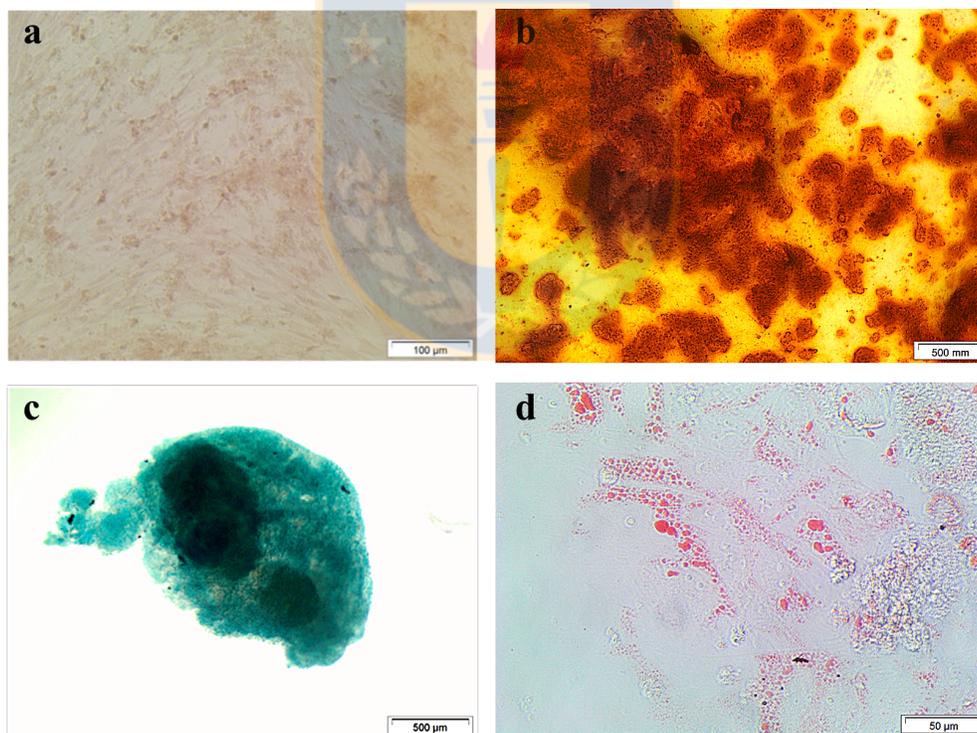
**Figura 7:** Morfología fibroblastoide representativa de MSCs aisladas de tejido adiposo en un aumento de 10X (a) y 20X (b) en alta confluencia. Viabilidad de las células que se usaron en el estudio, en verde (naranja acridina) y azul (Nuc blue) en un aumento de 10X (c) y 40X (d).

## 1.2. Tiempo de duplicación de la población (PDT)

Al analizar la capacidad proliferativa de las eASC, el PDT mostró que éstas células duplicaron su población cada  $37,3 \pm 12,3$  hrs en condiciones de normoxia.

## 1.3. Diferenciación

La diferenciación hacia los tres linajes, se documentó en todas las eASC en los puntos de tiempo indicados después de la inducción con los estímulos correspondiente. Las células que estuvieron bajo los estímulos de diferenciación, tendieron a cambiar la morfología fibroblástica a partir del día 14 de la inducción para la diferenciación osteogénica (figura 8 b) y adipogénica (figura 8 d). En la diferenciación condrogénica (figura 8 c), las células inducidas en el día 7 comenzaron a desprenderse de la placa en monocapa y formaron una micro masa. En el control (células no inducidas) no se observaron tales cambios morfológicos (figura 8 a).

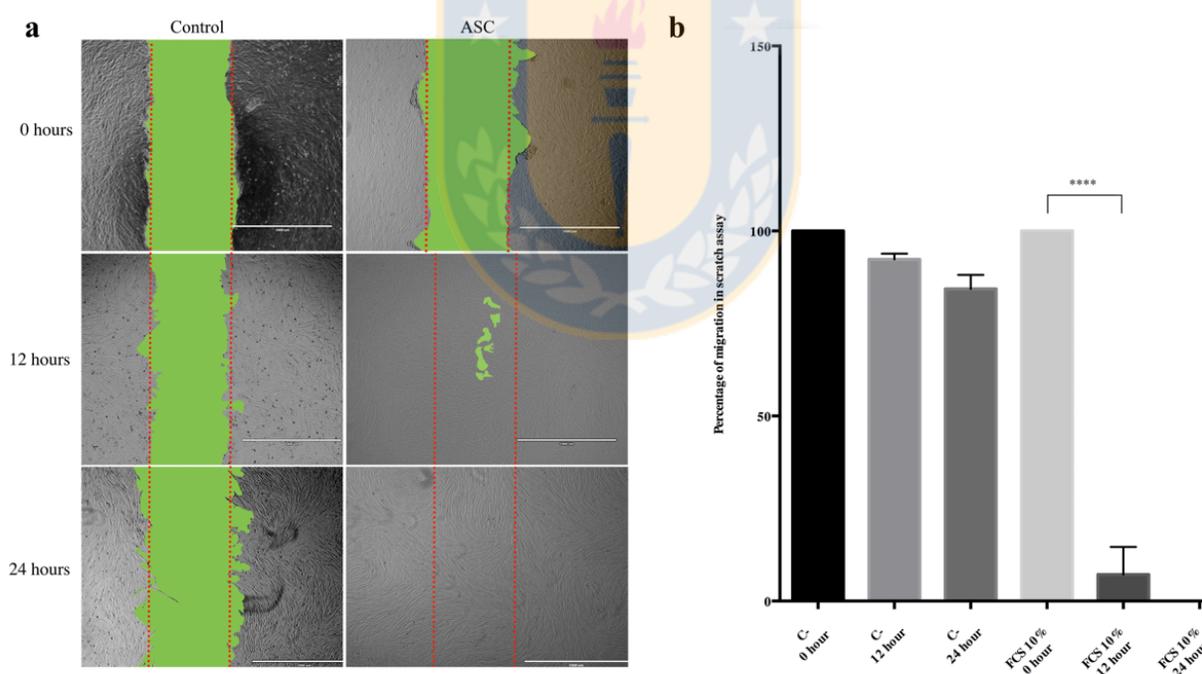


**Figura 8:** Diferenciación de los tres linajes de las eASC en el día 21. (a) Células teñidas no inducidas para el colorante respectivo, imagen representativa de tinción con rojo de alizarina. (b) Los depósitos de hidroxapatita después de teñir con rojo de alizarina son indicativos de diferenciación osteogénica. (c) Los glucosaminoglucanos teñidos con azul de Alcian indican una diferenciación condrogénica. (d) Las gotas de aceite se tiñen de rojo aceite en las MSC que se diferencian hacia los adipocitos (no se ven las flechas).

El día 21, se documentó la tinción positiva para la osteogénesis marcando de color rojo los depósitos de hidroxapatita por medio del Alizarin red, en la adipogénesis los depósitos de lípidos en la vacuola se marcaron de color rojo con el Oil red y en la condrogénesis se marcó de azul los glucosaminglicanos ácidos con Alcian blue, esto se observó en todas las células sometidas al ensayo de diferenciación (figura 8 b, c y d), situación que no se observó en el grupo control (figura 8 a).

#### 1.4. Ensayo de migración por scratch

El patrón de migración, expresado como el porcentaje de llenado del rasguño en las primeras 12 hrs, fue significativamente mayor para eASC suplementadas con 10% de SFB ( $92,8\% \pm 7,4$ ), que, en los controles no suplementadas con 10% de SFB (Fig. 9 a y b). A las 24 hrs, el área del rasguño se llenó por completo en las eASC tratadas con 10% de SFB. No se detectó migración en el grupo de control (Fig. 9 a).

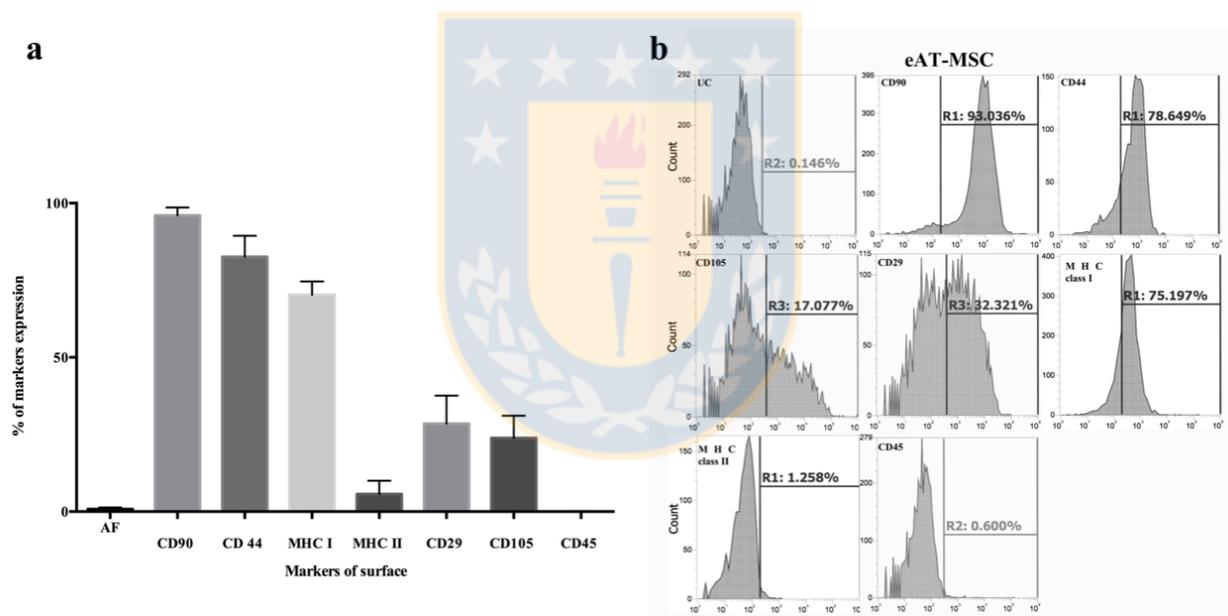


**Figura 9:** Evaluación de la capacidad de migración in vitro de eASC. (a) Visualización bajo microscopio del área de llenado real para ambos tipos de células. El área coloreada de verde, corresponde al rasguño, la ampliación es de 4X. (b) Porcentaje de llenado del rasguño en diferentes puntos de tiempo para eASC. (b) Los valores se presentan como el promedio de dos repeticiones biológicas y tres réplicas técnicas. \*\*\*\* ( $p < 0,05$ ).

### 1.5. Patrón de marcadores de superficie de las eASC

Los eASC resultaron ser positivas para los marcadores CD29, CD44, CD90, CD105 y MHC de clase I y negativas para los marcadores MHC de clase II y CD45 (figura 10). Las eASC mostraron una alta expresión de los marcadores CD90, CD44 y MHC de clase I, con porcentajes de expresión por sobre el 70%, situación que no ocurrió en los marcadores CD29 y CD105 (cerca de un 30% de positividad promedio). Por otro lado, se observó una baja positividad en MHC de clase II y nula expresión en el caso de CD45. Las células controles (no marcadas) mostraron negatividad al análisis de autofluorescencia (AF).

Los resultados resumidos del análisis de citometría de flujo de los marcadores de superficie analizados en las eASC, se muestran en la Tabla 5.



**Figura 10:** (a) Porcentajes y desviación estándar de la expresión de los marcadores de superficie analizados por citometría de flujo en eASC. AF: autofluorescencia de células no marcadas. (b) Histogramas representativos de los marcadores de superficie para eASC.

**Tabla 5:** Porcentajes y desviaciones estándar de los marcadores positivos y negativos para las eASC, medidos por citometría de flujo comparadas contra el control negativo que corresponden a células sin marcar ( $P < 0,05$ ).

| Marcador                    | % de expresión  |
|-----------------------------|-----------------|
| <b>Autofluorescencia</b>    | $0,81 \pm 0,55$ |
| <b>Marcadores positivos</b> |                 |
| CD90                        | $96 \pm 2,6$    |

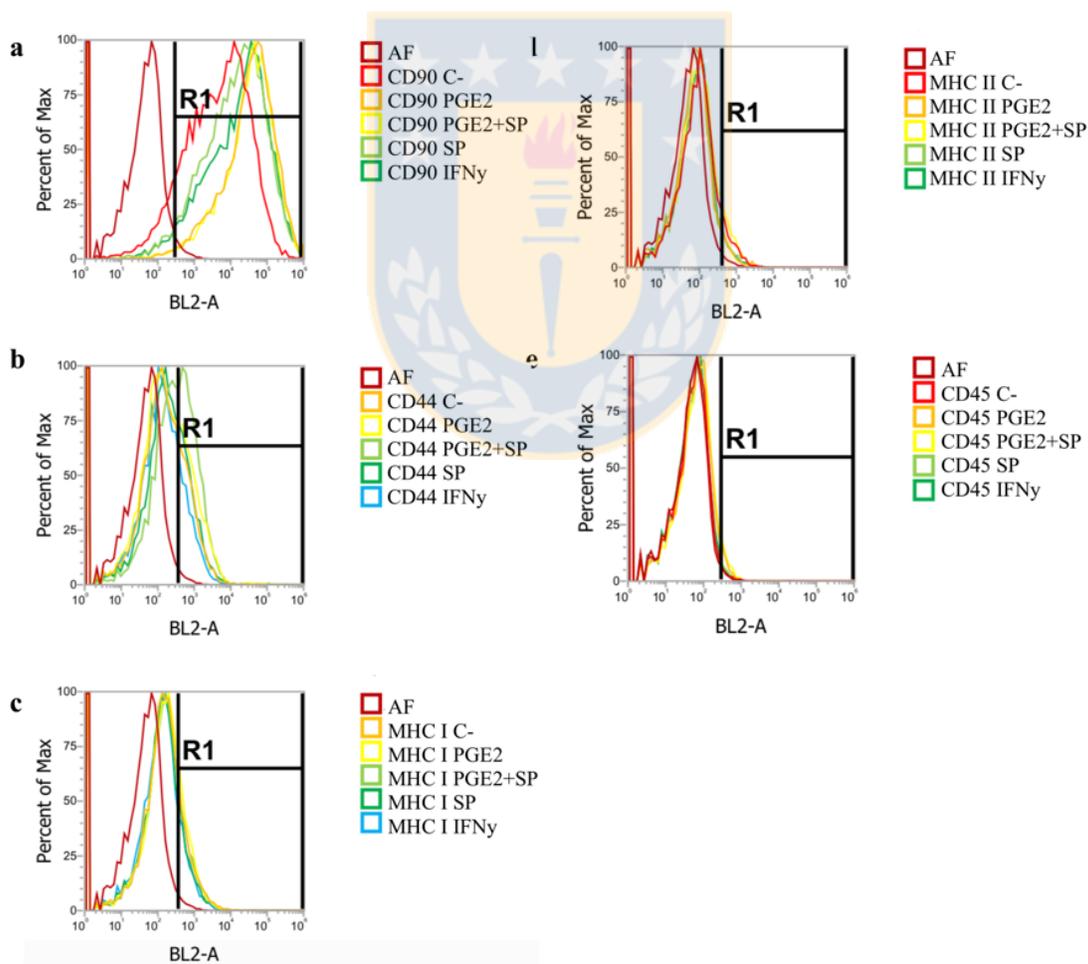
|                             |                  |
|-----------------------------|------------------|
| <b>CD44</b>                 | $82,62 \pm 6,83$ |
| <b>MHC I</b>                | $70,22 \pm 4,38$ |
| <b>CD29</b>                 | $28,49 \pm 9,13$ |
| <b>CD105</b>                | $23,86 \pm 9,13$ |
| <b>Marcadores negativos</b> |                  |
| <b>MHC II</b>               | $5,67 \pm 4,33$  |
| <b>CD45</b>                 | $0,07 \pm 0,15$  |



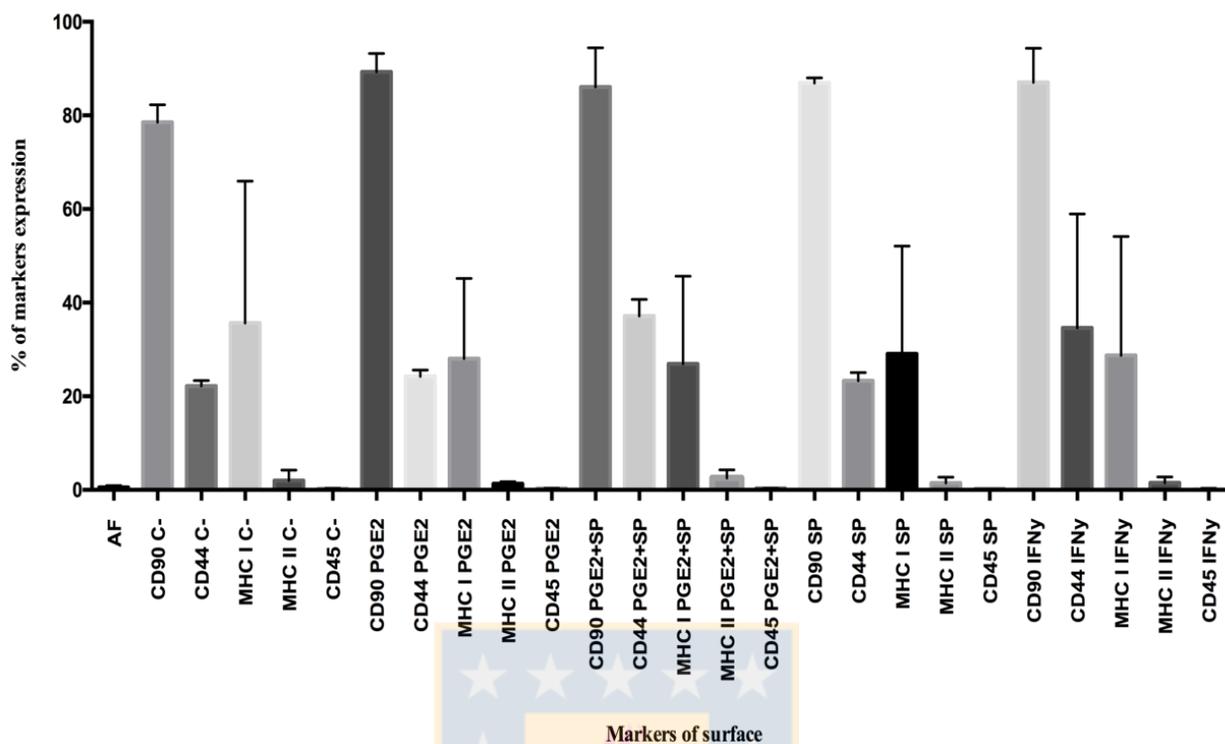
**OBJETIVO 2: EVALUAR EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS PRECONDICIONANTES SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA INTRÍNSECA (NO INMUNE) DE LAS eASC Y ANÁLISIS DIFERENCIACIÓN *in vitro*.**

**2.1. Patrón inmunofenotípico en eASC preconditionadas**

Al cultivar las eASC bajo condiciones de normoxia y con los estímulos preconditionantes, se evaluó el efecto que tendrían la PGE<sub>2</sub>, SP, su combinación e IFN $\gamma$ , sobre el patrón inmunofenotípico de las eASC. No se hallaron diferencias significativas entre los porcentajes de expresión de los marcadores evaluados en los diferentes tratamientos respecto al control. El fenotipo de superficie de todas las células se mantuvo similar al del experimento 1.4. siendo CD90<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, MHC de clase I<sup>+</sup>, MHC de clase II<sup>-</sup> y CD45<sup>-</sup> (figura 11 y 12).



**Figura 11:** Esquema representativo de los histogramas con los marcadores evaluados en las eASC posterior al preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/ SP, solamente con SP e IFN $\gamma$ .

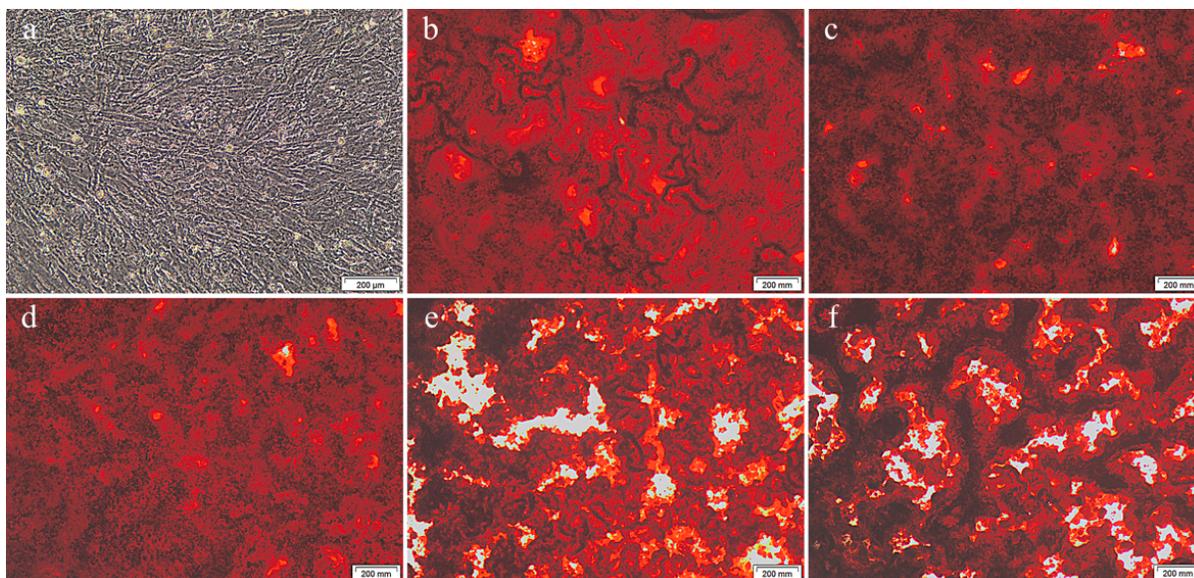


**Figura 12:** Gráfico de barras de los porcentajes de positividad de los marcadores de superficie analizados posterior al acondicionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP, SP e IFN $\gamma$ , donde no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos respecto a los porcentajes de expresión de los marcadores analizados.

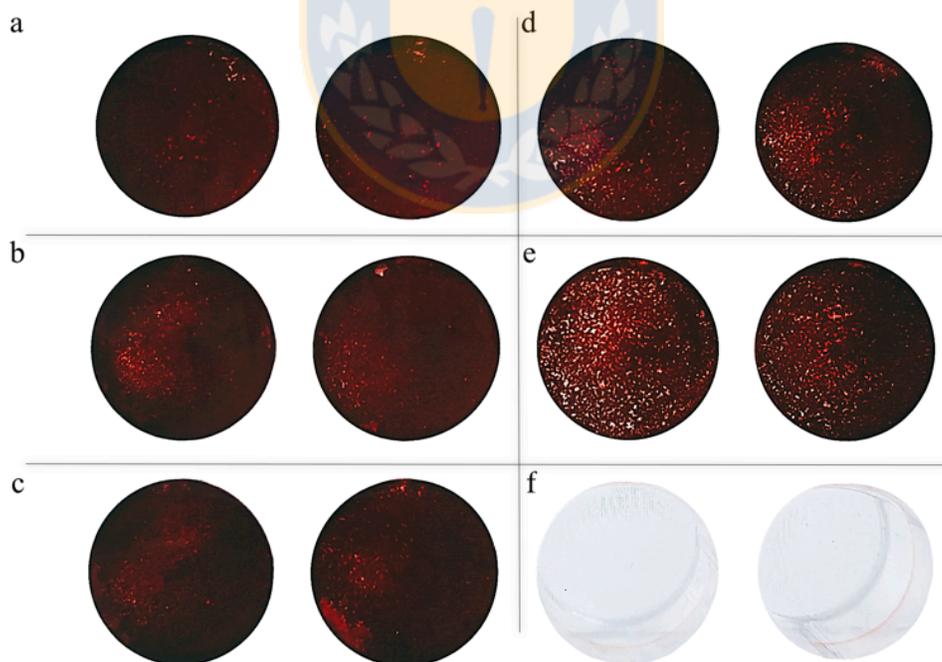
## 2.2. Diferenciación tripotente en eASC preconditionadas

En este grupo de experimentos, se evaluó la influencia de los acondicionamientos sobre otra propiedad importante e innata de las eASC: su capacidad de diferenciación tripotente. La exposición (precondicionamiento) previa de las células a PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>/SP, no modificó sustancialmente el patrón de diferenciación osteogénica con respecto a las células control (no preconditionadas). Sin embargo, cuando se usó SP sola o IFN $\gamma$ , se apreció una menor capacidad de las células para producir hidroxiapatita (figura 13 y 14).

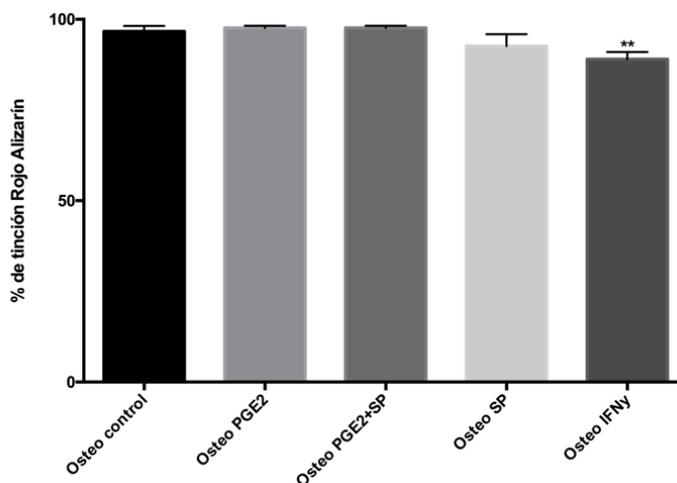
Esta disminución fue significativamente estadística solo para IFN $\gamma$ , las cuales fueron analizadas por medio de los softwares Image J y PRISM (figuras 15).



**Figura 13:** Imágenes microfotográficas magnificadas de las diferenciaciones osteogénicas de las células precondicionadas. a) eASC control de la diferenciación (células que no fueron expuestas a medio precondicionado de osteogénesis), b) células control (expuestas a medio condicionado de osteogénesis), c) células expuestas a precondicionamiento con  $\text{PGE}_2$ , d)  $\text{PGE}_2/\text{SP}$ , e) SP y f) a  $\text{IFN}\gamma$ . El color rojo corresponde a la tinción de la hidroxiapatita con Rojo alizarina.



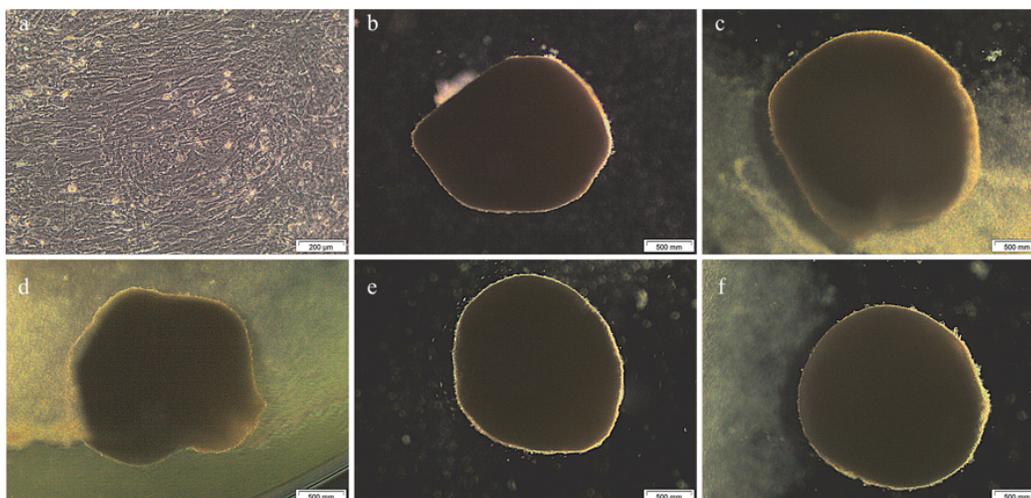
**Figura 14:** Análisis de imágenes representativas de la diferenciación osteogénica de eASC precondicionadas con  $\text{PGE}_2$  (b);  $\text{PGE}_2/\text{SP}$  (c); SP (d),  $\text{IFN}\gamma$  (e); no precondicionadas, pero sometidas a diferenciación osteogénica, (a) no condicionadas y (f) sin haber sido sometidas a diferenciación.



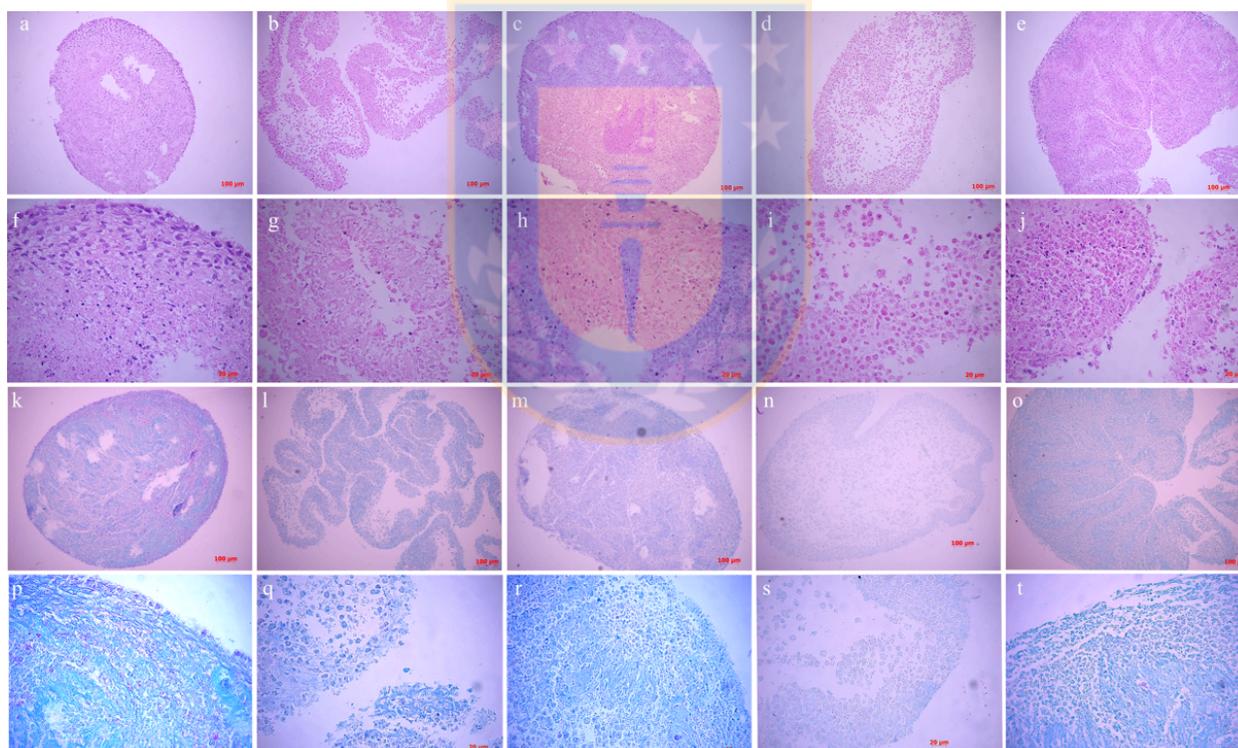
**Figura 15:** Gráficos de barras de los porcentajes de cobertura de matriz extracelular teñida con Alizarin red en las células sometidas a diferentes condiciones preconditionantes y el control. Donde se puede apreciar la diferencia significativa encontrada solamente en las células sometidas a la diferenciación osteogénica que estuvo bajo la influencia de IFN $\gamma$  respecto al resto de los tratamientos y el control.

La diferenciación condrogénica no fue diferente en ninguno de los tratamientos (precondicionadas o no). En todos los grupos inducidos a dicha diferenciación se observó la formación de una micro-masa a partir del cuarto día de inducción. Esto es consistente con resultados previos de nuestro grupo de investigación con ASC equinas, las cuales forman esta estructura una vez sometidas a la diferenciación condrogénica. Las micro masas resultantes, se sometieron a análisis histológico y tinción con Alcian blue-PAS (pH 2.5), contrastada con Hematoxilina & Eosina (figura 17 a-j). Para esto las masas fueron cortadas en secciones de 4  $\mu$ m y teñidas. Se detectó la producción de proteoglicanos sulfatados (color azul a la tinción de Alcian blue) y de mucina (color violeta a la tinción PAS; figura 17 k-t). Las células mesenquimales que no se sometieron al medio inductor de diferenciación, no formaron micro-masas, ni se tiñeron con Alcian blue-PAS (figura 16 a).

Esta situación no se observó en todos los cortes histológicos realizado en las micromasas de condrogénesis, siendo el control (no sometido a tratamientos, pero si cultivado bajo la influencia de medios condicionados para condrogénesis), el que mostró ambos tipos de productos. En el resto de las muestras la producción de proteoglicanos sulfatados no estaba presente, observándose solamente la mucina ácida de color violeta (figura 17 k- l).

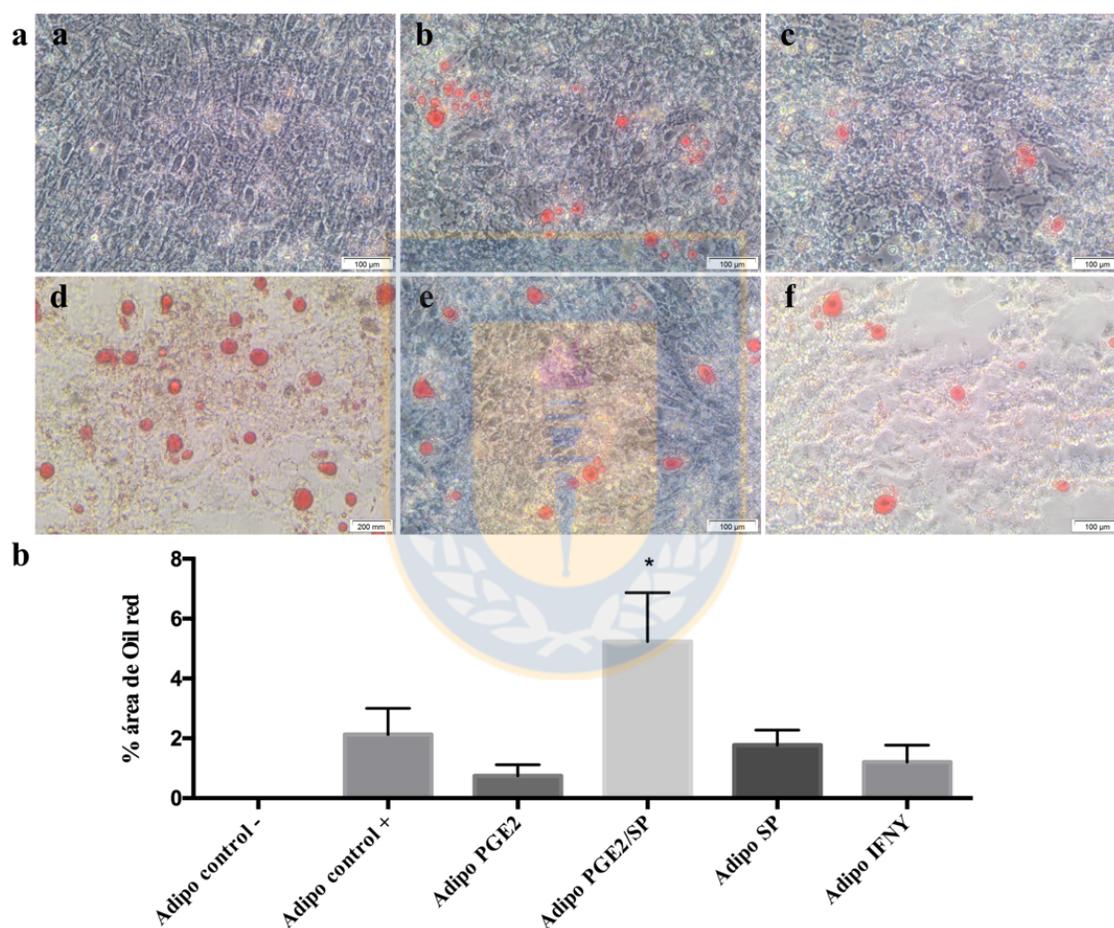


**Figura 16.** Diferenciación condrogénica, imágenes representativas de las micromasas que se formaron a partir de la inducción hacia condrocitos al día 21 post inducción, donde podemos apreciar en la imagen a) control de la diferenciación, b) control del tratamiento, c)  $PGE_2$ , d)  $PGE_2/SP$ , e) SP y f)  $IFN\gamma$ .



**Figura 17:** Cortes histológicos de las micromasas sometidas a diferenciación condrogénica que se formaron a los tras 21 días de inducción hacia condrocitos. Se puede apreciar en las imágenes (a-e), los cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina con un aumento de 10X, (f-j) con un aumento de 40X. Las imágenes (a y f) corresponden al control del tratamiento, (b y g) al acondicionamiento con  $PGE_2$ , (c y h) SP, (d e i)  $PGE_2/SP$  y (e y j) a  $IFN\gamma$ . Las imágenes de la tercera y cuarta fila, corresponden a los cortes histológicos teñidos con Alcian blue PAS (k-o) con un aumento de 10X y (p-t) con un aumento de 40X. Las imágenes (k y p) corresponden al control del tratamiento, (l y q) al acondicionamiento con  $PGE_2$ , (m y r) SP, (n y s)  $PGE_2/SP$  y (o y t) a  $IFN\gamma$ .

Mientras que en la diferenciación adipogénica, los controles negativos no formaron vacuolas de lípidos (figura 18 a.a), mientras que en los controles positivos si se formaron vacuolas de lípidos (figura 18 a.b). En el caso de las eASC preconditionadas (figura 18 a.c-f), se observó la formación de vacuolas de lípidos que fueron teñidas con Oil red (color rojo) durante los 21 días de estimulación adipogénica, tal como se observó en el control positivo. El único tratamiento que mostro diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con un incremento en la formación de vacuolas respecto al control positivo, fue el tratamiento de  $PGE_2/SP$  (figura 18 b).



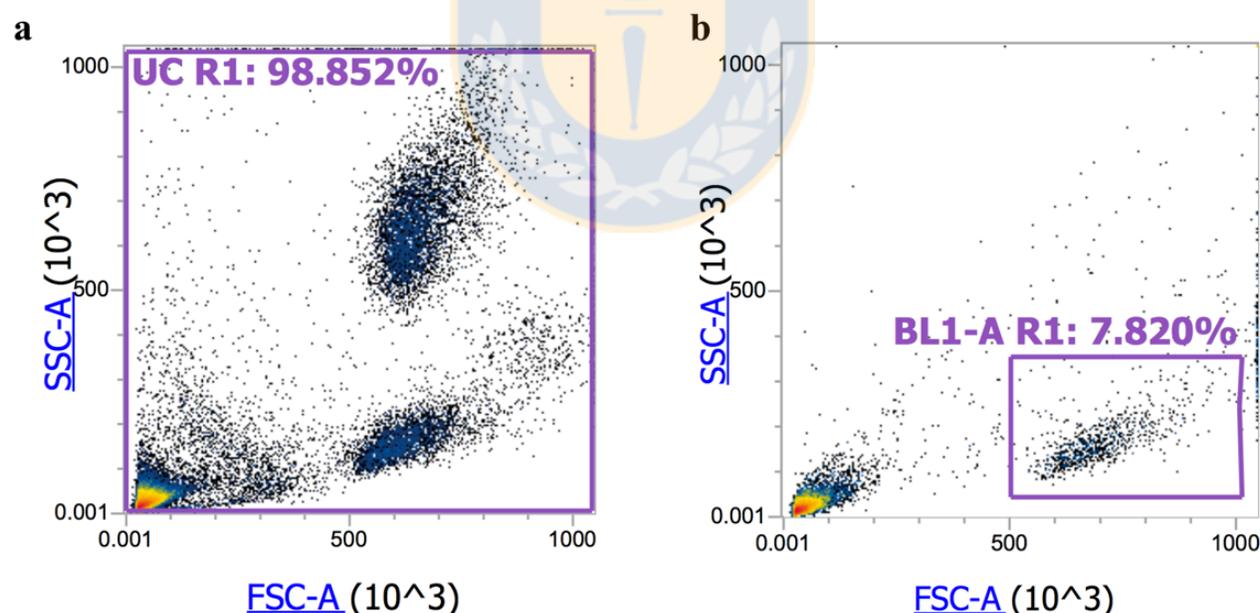
**Figura 18:** Diferenciación adipogénica de las eASC sometidas a preconditionamientos y sus respectivos controles. (a) control de la diferenciación (células sin estímulos de diferenciación adipogénica), (b) células sin ser sometidas a preconditionamiento pero sí estuvieron bajo el estímulo de la diferenciación adipogénica, (c) células preconditionadas con  $PGE_2$  y sometidas a diferenciación adipogénica, (d) células preconditionadas con  $PGE_2/SP$  y sometidas a diferenciación adipogénica, (e) células preconditionadas con SP y sometidas a diferenciación adipogénica y (f) células preconditionadas con  $IFN\gamma$  y sometidas a diferenciación adipogénicas. Se puede apreciar la formación de vacuolas de lípidos teñidas de color rojo por medio del Oil red. Aumento de 40X, barra de 100 $\mu$ m.

**OBJETIVO 3: ENSAYAR LA ACTIVIDAD INMUMODULADORA *in vitro* DE LAS eASC SOMETIDAS A LAS MOLECULAS Y COMBINACIONES DEL OBJETIVO ANTERIOR O NO (VIRGENES), SOBRE PBMC EN MODELOS DE CO-CULTIVO. SELECCIONAR LA MEJOR CONDICIÓN.**

En estos ensayos, se evaluó la inhibición de la proliferación de PBMC, en dos escenarios, uno: en PBMC provenientes de un animal sano (denominado a los efectos de simplicidad: linfocitos bajo), con conteos y poblaciones celulares en condiciones normales; dos: en PBMC provenientes de un animal que padecía una patología crónica en un tendón enfermo (denominado a los efectos de simplicidad: linfocitos alto).

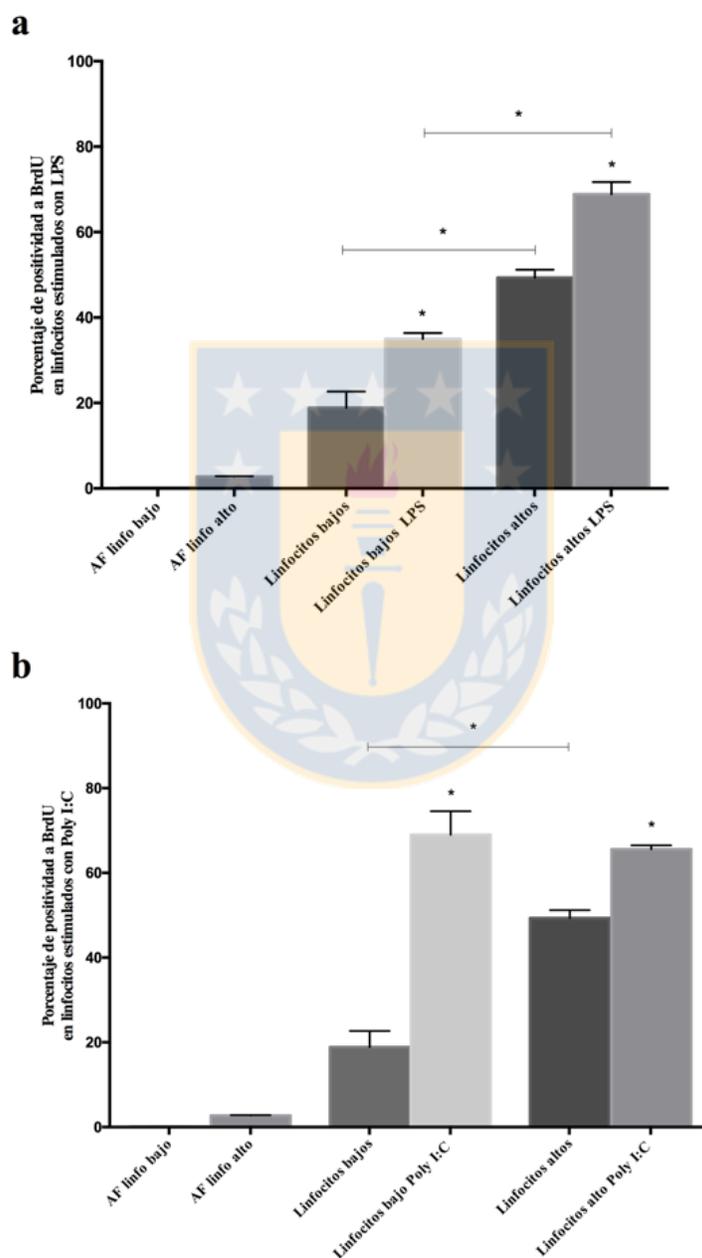
**3.1. Evaluación del efecto mitogénico del LPS y Poly I:C sobre poblaciones PBMC.**

Para complementar este objetivo, el primer ensayo consistió en la evaluación de la capacidad de dos mitógenos para activar PBMC, LPS y Poly I: C. Para ello, la población PBMC fue purificada por medio de un gradiente de densidad de Ficoll (figura 19) y sometidos al ensayo de BrdU (figura 20).



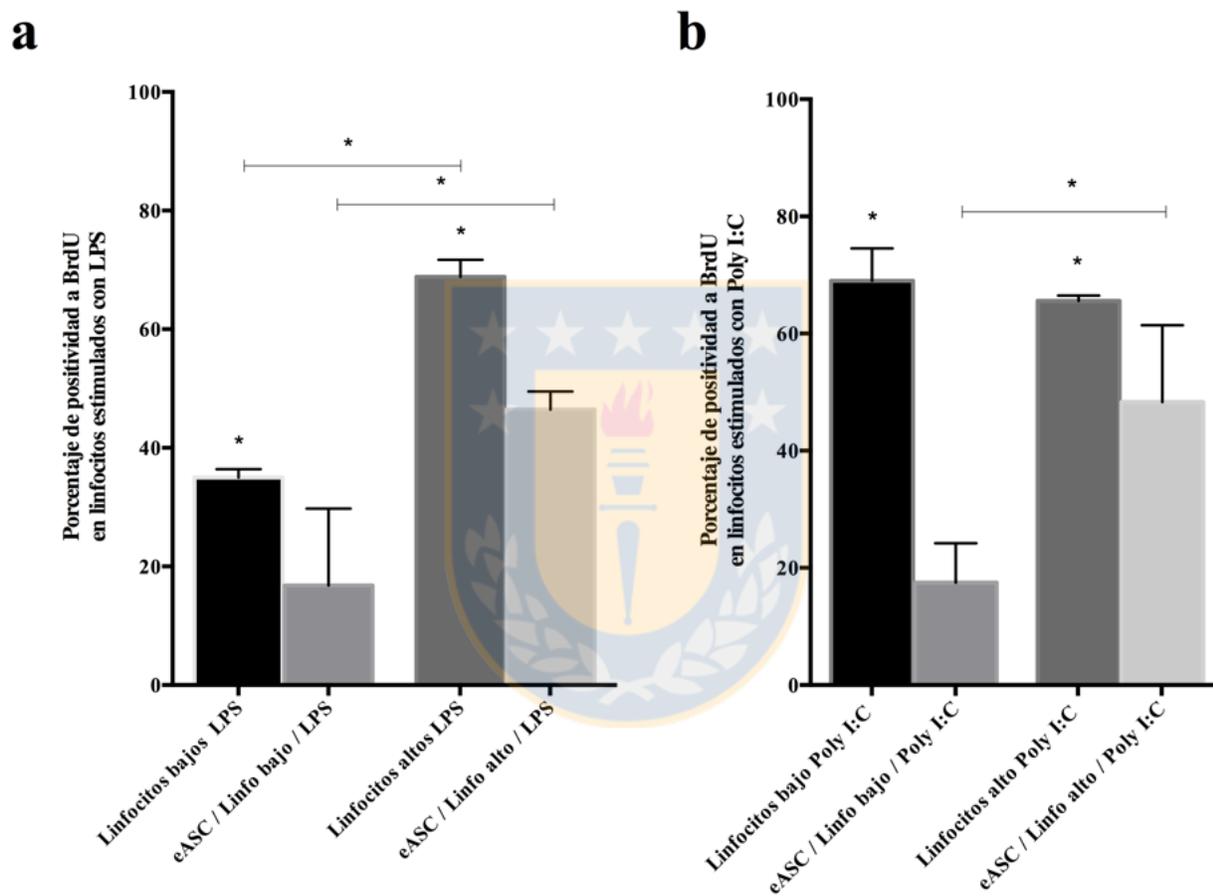
**Figura 19:** Dot plot representativos de la citometría de flujo de (a) leucocitos y de (b) linfocitos aislados posterior al gradiente de densidad de Ficoll, donde se puede apreciar en el cuadrante UC R1, todas las poblaciones de leucocitos y eritrocitos presentes en la sangre y en el cuadrante BL1-A R1, las células aisladas por el gradiente de densidad que corresponden solamente a poblaciones de células mononucleares o linfocitos.

La mayor acción mitogénica sobre las poblaciones de PBMC, se logró a través de la estimulación con Poly I:C, con diferencias significativas entre este mitógeno y el control, con un incremento de hasta 4 puntos de absorbancia en relación al control, situación que también fue observada entre la actividad mitogénica de LPS y Poly I:C, con un incremento de 2 unidades de absorbancia entre ellos ( $p < 0,05$ ) (figura 20).



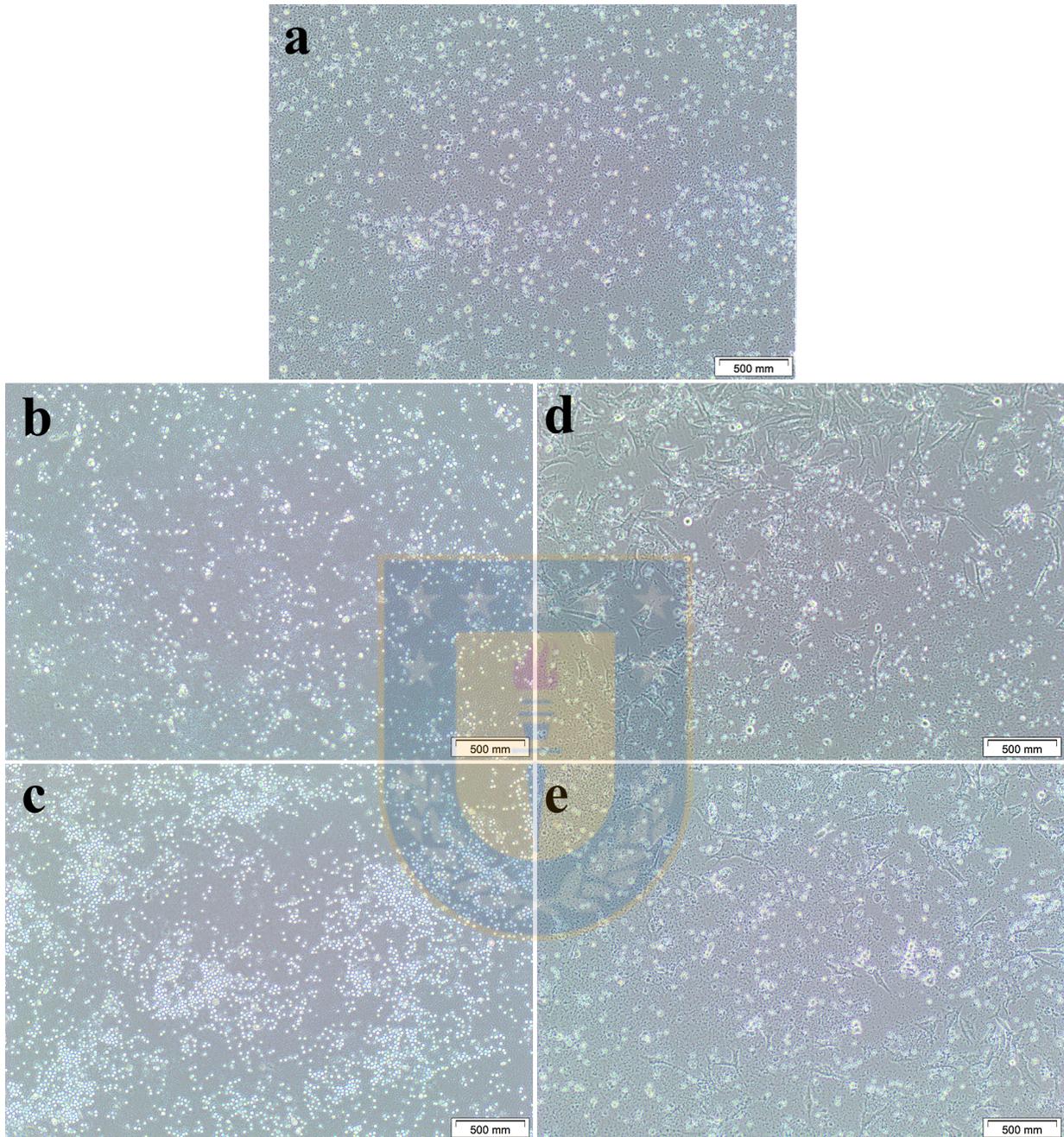
**Figura 20:** Gráficos de barra con la comparación de la capacidad del LPS y Poly I:C para estimular la proliferación de PBMC vírgenes, con sus respectivas desviaciones estándar, para linfocitos bajos y linfocitos altos, medidos por citometría de flujo y marcados con BrdU ( $*P < 0,05$ ). AF corresponde a la autofluorescencia de los linfocitos.

Una vez concluida la validación de los mitógenos, se co-cultivaron las eASC con poblaciones de PBMC activadas, según lo descrito anteriormente y se evaluó la capacidad anti-proliferativa al estar expuestos al co-cultivo con las eASC. Las eASC impidieron la proliferación de PBMC previamente activados, en los experimentos de co-cultivo. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los mitógenos, lo que es indicativo de una actividad anti-proliferativa mediada por las eASCs (figura 21).



**Figura 21:** Ensayo de proliferación de linfocitos activados con mitógenos y co-cultivados con eASC vírgenes. Porcentaje de proliferación y desviaciones estándar del efecto de los mitógenos LPS y Poly I:C sobre poblaciones de linfocitos Tn y el efecto de las eASC vírgenes en la supresión de la proliferación de linfocitos. Las barras indican diferencias entre linfocitos altos y bajos (\* $P < 0,05$ ).

Esta situación, también se detectó a través de imágenes de microscopía, donde se observa la inhibición y la estimulación de la proliferación (figura 22).



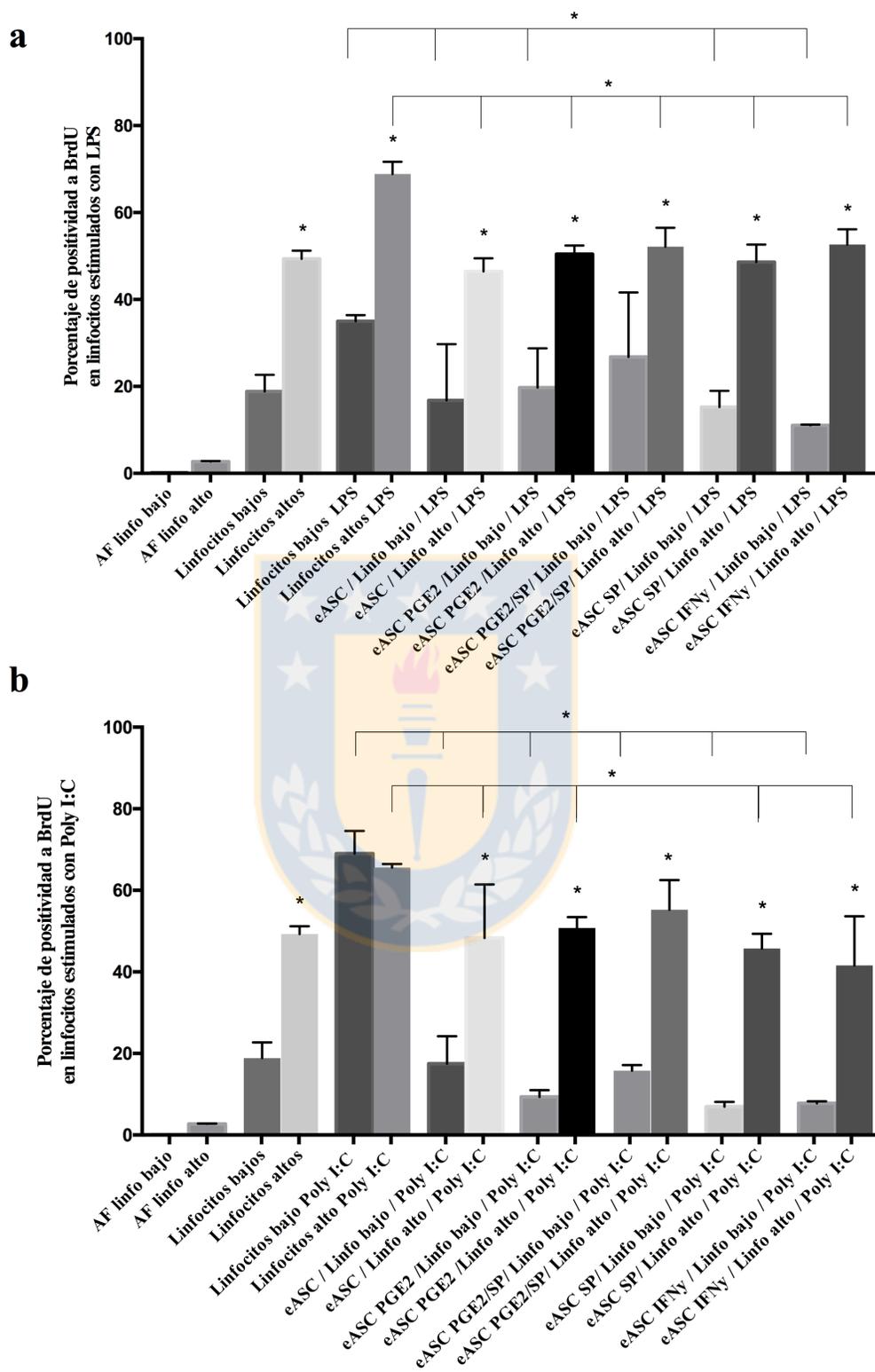
**Figura 22:** Imágenes de microscopía con un aumento de 10X, donde se observa el efecto de los mitógenos sobre poblaciones de PBMC (b y c) y el efecto del co cultivo con las eASC (d-e). El efecto de los mitógenos sobre la proliferación de PBMC se puede apreciar para (b) LPS, (c) Poly I:C y para el co-cultivo con las eASC vírgenes y PBMC estimuladas con (d) LPS y (e) Poly I:C y su respectivo (a) control (linfocitos Tn).

### 3.2. Efecto anti-proliferativo de los tratamientos preconditionantes

Se evaluó la capacidad intrínseca y adquirida de las eASC para inhibir poblaciones de PBMC activadas con LPS y Poly I:C. Para ello, se midió a través de la técnica de tinción con BrdU y los resultados se leyeron a través de citometría de flujo. Como línea base (proliferación basal) se tomaron las poblaciones PBMC sin activar (linfocitos Tn) y como control positivo se consideró a la estimulación de las poblaciones de PBMC vírgenes con LPS y Poly I:C, según los resultados anteriormente descritos. Como capacidad intrínseca de las eASC para inhibir la proliferación, se consideró al co-cultivo de las eASC sin haber estado bajo algún tipo de preconditionamiento (eASC vírgenes).

Al comparar el efecto de las moléculas preconditionantes sobre las eASC co-cultivadas con PBMC activados con LPS, se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ) al comparar la inhibición entre los linfocitos bajos y los linfocitos altos (figura 23a). Específicamente en los linfocitos bajos, la inhibición generada por las eASC preconditionadas fue mayor que en los linfocitos altos (con promedios no mayores al 26% y no menores al 45% de positividad a BrdU respectivamente).

Todos los tratamientos preconditionantes a excepción de  $PGE_2/SP$  a los que fueron sometidas las eASC co-cultivadas con linfocitos bajos activados con LPS, mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al efecto mitogénico del LPS sobre los linfocitos Tn ( $P < 0,05$ ). Siendo el  $IFN\gamma$  el único tratamiento que mostró una fuerte inhibición de la proliferación de los PBMC activados con LPS ( $P < 0,05$ ), ver tabla 6. Mientras que en el co-cultivo con linfocitos altos estimulado con LPS, todos los tratamientos mostraron una inhibición estadísticamente significativa respecto al efecto mitogénico del LPS sobre los PBMC vírgenes ( $P < 0,05$ ), sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos (figura 23a).



**Figura 23:** Gráficos con los porcentajes de positividad a BrdU, donde se observa la capacidad inhibitoria de las eASC vírgenes y preconicionadas sobre los PBMC vírgenes y estimulados con (a) LPS y (b) Poly I:C (\* $P < 0,05$ ). AF corresponde a la autofluorescencia de los linfocitos.

Los linfocitos (bajos o altos) estimulados con Poly I:C y co-cultivados con eASC generaron un patrón similar a lo observado en la estimulación con LPS. Se encontró además una diferencia estadísticamente significativa entre ambos tipos de linfocitos ( $P < 0,05$ ; figura 23b).

Todos los tratamientos preconditionantes sobre las eASC y que se co-cultivaron con linfocitos bajos y estimulados con Poly I:C, mostraron diferencias estadísticamente significativas respecto al efecto mitogénico del Poly I:C sobre los linfocitos Tn ( $P < 0,05$ ), sin observarse diferencias significativas entre los tratamientos. Mientras que en el co-cultivo con linfocitos altos, en todos los tratamientos a excepción de PGE<sub>2</sub>/SP, mostraron una inhibición estadísticamente significativa respecto al efecto mitogénico del Poly I:C sobre los linfocitos Tn ( $P < 0,05$ ), siendo el IFN $\gamma$  el único tratamiento que mostró una fuerte inhibición de la proliferación de los PBMC activados ( $P < 0,05$ ).

### **3.3. Inducción de PBMC hacia células CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y FOXP3<sup>+</sup>**

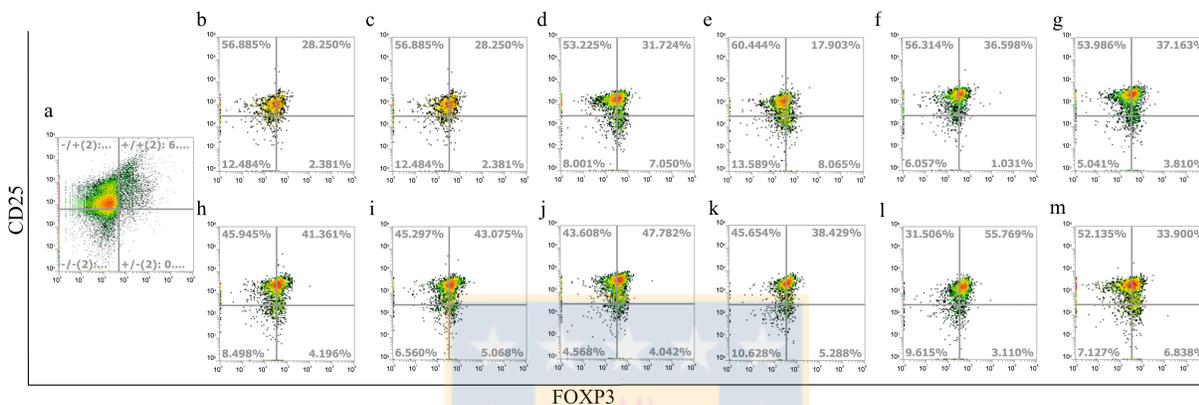
La adquisición de un fenotipo regulador de los linfocitos T (Treg), se determinó por medio de citometría de flujo para los marcadores (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, sobre la población de células CD4<sup>+</sup> previamente identificadas. El estudio se llevó a cabo en PBMC vírgenes recién aislados, como también en PBMC expuestos a los mitógenos LPS (figura 24) y Poly I:C (figura 25), los cuales fueron co-cultivados con eASC vírgenes o eASC preconditionadas. El objetivo de este experimento fue determinar el efecto del preconditionamiento sobre la adquisición de dicho fenotipo.

En los PBMC vírgenes, se obtuvieron poblaciones con bajos porcentajes de células Treg CD4<sup>+</sup>, (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, tanto en los linfocitos bajos ( $9,41\% \pm 0,02$ ) como en linfocitos altos ( $5,95\% \pm 0,35$ ). El enfrentamiento de los PBMC previamente estimulados con LPS y con eASC vírgenes, produjo un aumento en el porcentaje de Treg (rango 23-42% para linfocitos bajos) y de 12-15% (para linfocitos altos). En ambos casos la diferencia contra la población PBMC virgen fue estadísticamente significativa ( $P < 0,05$ ).

Cuando se emplearon eASC preconditionadas, en lugar de vírgenes, en todos los tratamientos a excepción del preconditionamiento con la combinación de PGE<sub>2</sub> y SP, se observó una diferencia significativa ( $P < 0,05$ ), en la capacidad de estas para inducir linfocitos con fenotipo

Treg.

Entre los tratamientos, el uso de Sustancia P produjo una mayor inducción de Treg con respecto al preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP e IFN $\gamma$  ( $p < 0,05$ ). Es de notar, que cuando se emplearon linfocitos altos, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos cuando se les comparó con las eASC vírgenes.

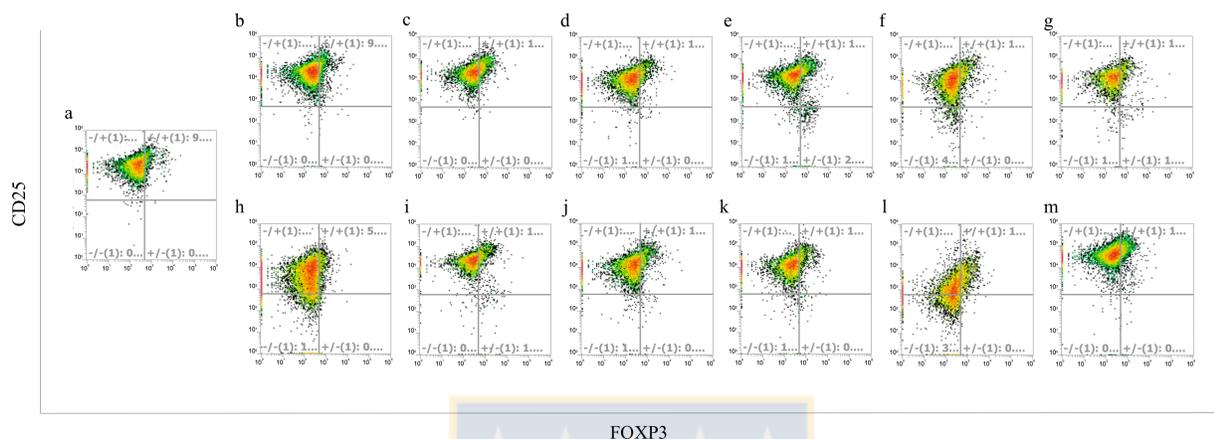


**Figura 24:** Panel representativo del cambio de fenotipo de PBMC de un animal sano (linfocitos bajos) a Treg (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, cuadrante superior derecho en cada plot (a-m). Panel superior (b-g; PBMC estimulados con LPS), panel inferior (h-m; PBMC estimulados con Poly I:C). Los detalles de los tratamientos de los PBMC son: PBMC sin MSC (b y h); PBMC co-cultivados con eMSC naïve (c e i); con MSC+ PGE<sub>2</sub> (d y j); con PGE<sub>2</sub> + SP (e y k); con SP (f y l); con IFN $\gamma$  (g y m). Panel a: autofluorescencia de los PBMC bajos

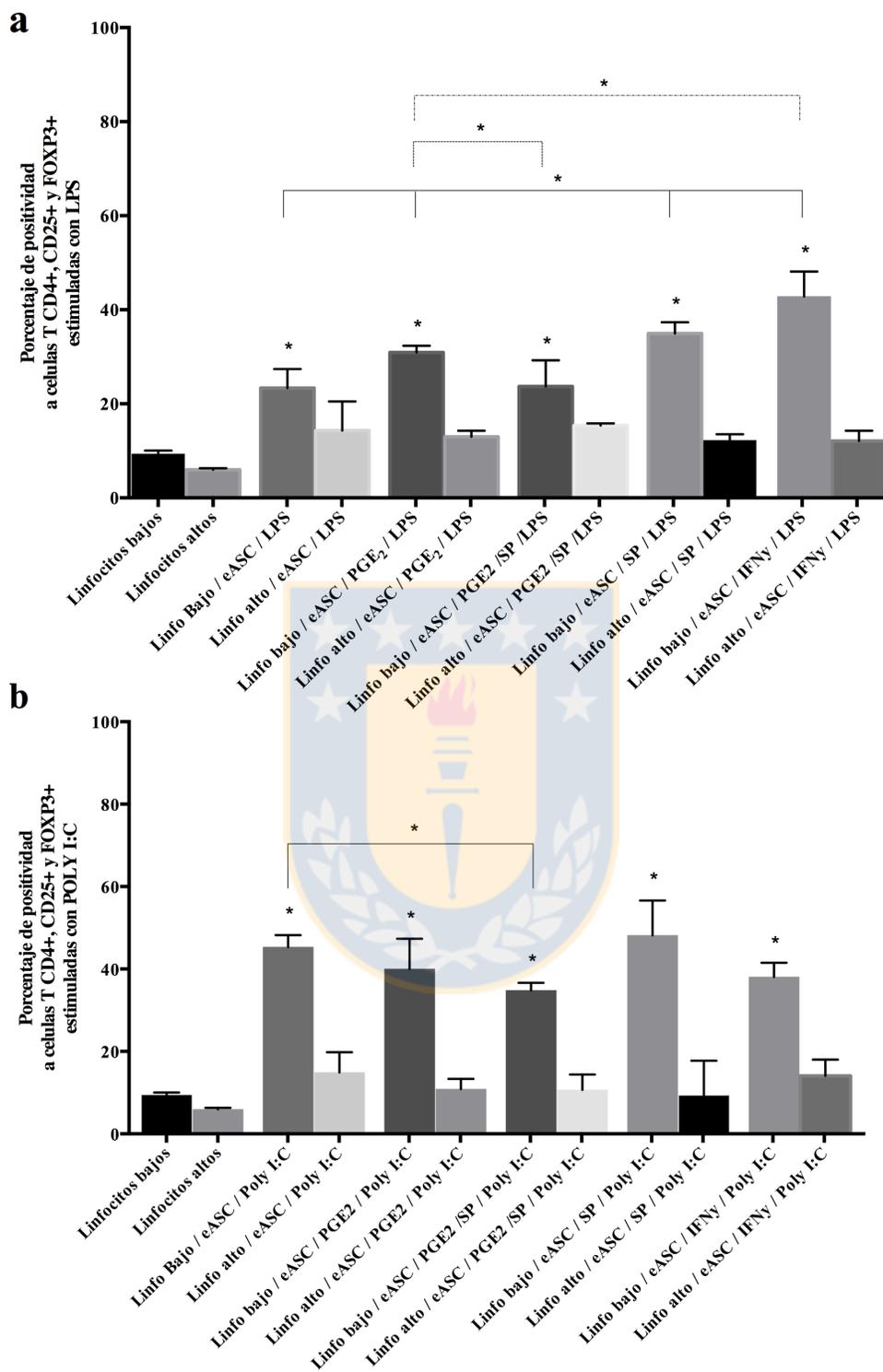
Cuando los linfocitos bajos fueron estimulados con Poly I:C y se expusieron a eASC vírgenes o preconditionadas, se obtuvieron esencialmente los mismos resultados de inducción de Treg que con LPS. Se observó una diferencia significativa en el porcentaje de Treg obtenidos 34 y 48% con respecto al control sin eASC. Mientras que los linfocitos altos al estimulados con Poly I:C y expuestos a eASC vírgenes o preconditionadas, se obtuvo una inducción del fenotipo Treg en el 9-14% de ellos, lo cual es significativamente menor que en las mismas condiciones para los linfocitos bajos (figura 26 b).

De especial interés resultó el hecho de que las eASC con mayor capacidad inhibitoria de la actividad proliferativa de PBCM del experimento 3.1, fueron las que menor proporción de Treg generaron en este ensayo. El fenómeno inverso también se pudo detectar, las eASC de menor capacidad inhibitoria de la proliferación de PBMC, mostraron un mayor porcentaje de Treg

(CD25/FOXP3)<sup>+</sup>. Dado el limitado tamaño muestral, no se pueden sacar conclusiones, pero los datos pudieran ser indicativos de que el co-cultivo de PBMC vírgenes, provenientes de un animal sano con eASC, gatilla un efecto modulador de las poblaciones de PBMC vírgenes hacia Treg (figuras 24 y 25).



**Figura 25:** Panel representativo del cambio de fenotipo de PBMC vírgenes de un animal enfermo (linfocitos alto) a Treg (CD25/FOXP3)<sup>+</sup>, cuadrante superior derecho en cada plot (a-m). Panel superior (b-g; PBMC estimulados con LPS), panel inferior (h-m; PBMC estimulados con Poly I:C). Los detalles de los tratamientos de los PBMC son: PBMC sin MSC (b y h); PBMC co-cultivados con eMSC naïve (c e i); con MSC+ PGE2 (d y j); con PGE2 + SP (e y k); con SP (f y l); con IFN $\gamma$  (g y m). Panel a: autofluorescencia de los PBMC vírgenes



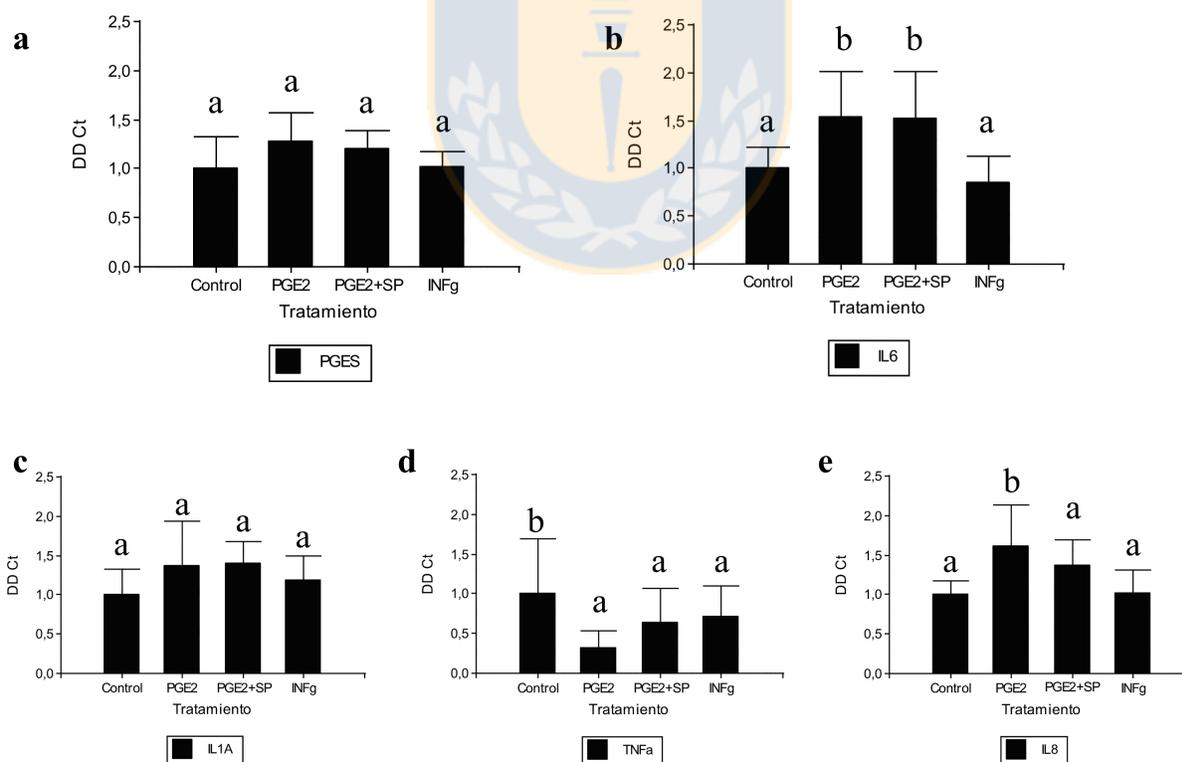
**Figura 26:** Gráficos con los porcentajes de positividad a CD25 y FOXP3, donde se observa la capacidad del cambio de fenotipo hacia iTreg por parte de las eASC vírgenes y precondicionadas sobre los PBMC vírgenes y estimulados con (a) LPS y (b) Poly I:C (\*  $P < 0,05$ ).

**OBJETIVO 4: ESTABLECER LA CAPACIDAD DE PGE<sub>2</sub> y SP PARA ESTIMULAR LA EXPRESIÓN CUANTIFICABLE DE MEDIADORES DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE eASC *in vitro*.**

Para evaluar los mediadores de la actividad inmunomoduladora de las eASC, se ensayaron ELISAs para algunas de las proteínas de interés, pero la falta de especificidad con la especie equina y los altos costos asociados, impidieron hacer los análisis apropiados, es por ello, que se decidió realizar la detección de los transcritos por medio de RT-qPCR.

**RT-qPCR**

Utilizando la técnica de RT-qPCR, se estudió la expresión de transcritos de genes específicos relacionados con la actividad inmunomoduladora, como PGES, IL-6, IL-1a, TNF $\alpha$  e IL-8. Para ello se extrajo RNA de las eASC preconditionadas con PGE<sub>2</sub>, la combinación de PGE<sub>2</sub> y SP e IFN $\gamma$ .



**Figura 27:** Gráficos de los transcritos analizados por RT-qPCR, indicando sus DS y sus fold change, para (a) PGES, (b) IL-6, (c) IL-1A, (d) TNF $\alpha$  y (e) IL-8.

Todos los genes anteriormente mencionados, fueron detectados en todas las eASC y tratamientos analizados. Por un lado, la expresión de prostaglandina E sintasa (PGES) e Interleuquina 1A (IL-1A) fue detectada en todos los tratamientos sin observarse una variación de la expresión de estos en relación al tipo de tratamiento utilizado, ni tampoco con respecto al control.

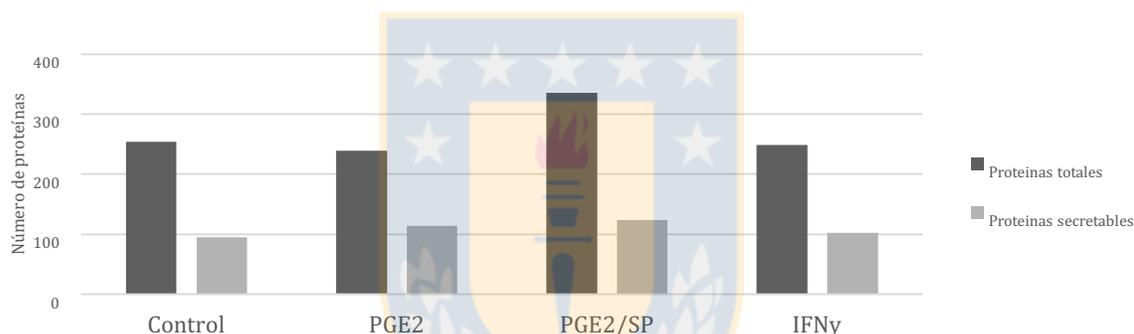
Mientras que si se observaron diferencias en la expresión de IL-6 en los diferentes tratamientos, observándose una regulación a la alta de 0,5 veces en los tratamientos donde se utilizó como preconditionante a PGE<sub>2</sub> y la combinación de PGE<sub>2</sub> con SP. En el caso de la expresión de TNF $\alpha$ , se vio una regulación a la baja del gen en todos los tratamientos respecto al control. Mientras que la expresión de IL-8 se vio regulada a la alta de 0,5 veces, solamente cuando las eASC estuvieron bajo la estimulación preconditionante de PGE<sub>2</sub> (figura 27).



**OBJETIVO 5: ESTABLECER MEDIANTE SECRETÓMICA, EL PATRÓN DE SECRECIÓN GLOBAL Y DIFERENCIAL DE eASC PRECONDICIONADAS VS LAS eASC VIRGENES, DE LA MEJOR CONDICIÓN SELECCIONADA EN EL OBJETIVO 2**

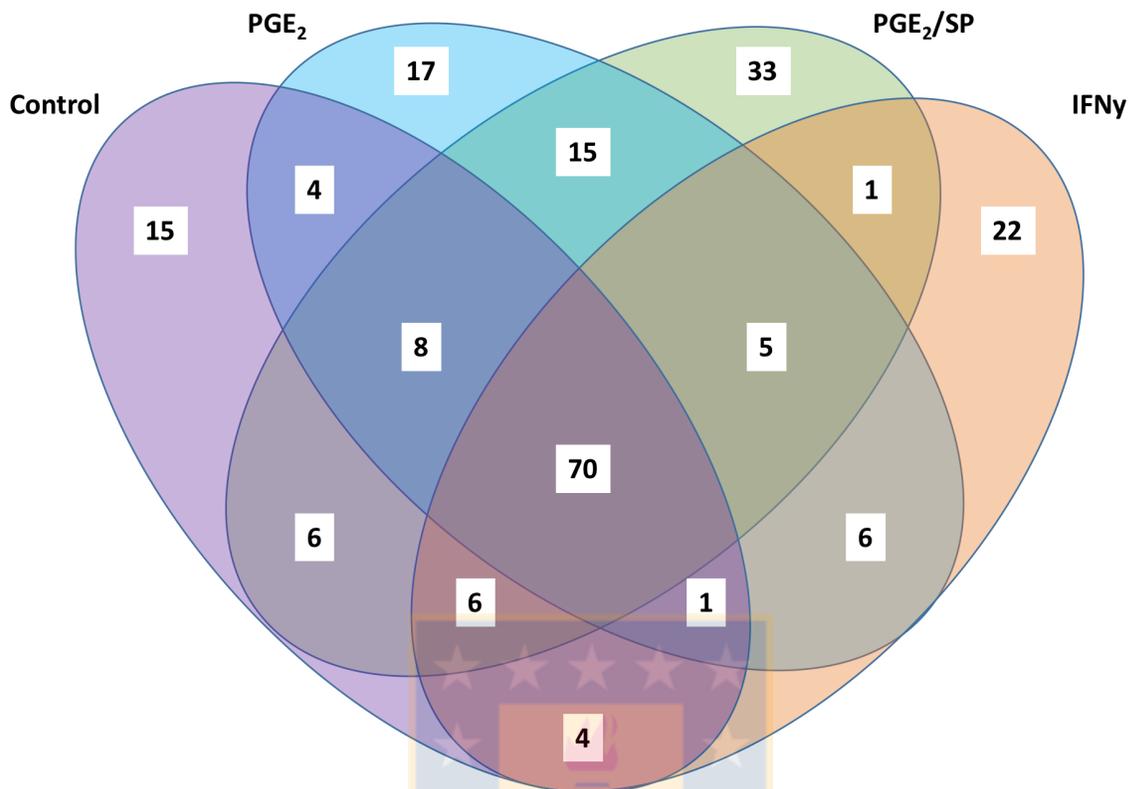
**5.1. Patrón de secreción global de las eASC preconditionadas**

En el grupo control se identificaron a 254 proteínas, de las cuales 95 (37,4%), resultaron ser proteínas secretables. En el tratamiento con PGE<sub>2</sub>, el total de proteínas fue de 239 con 114 proteínas secretables (47,7%), en el preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>/SP el total de proteínas fue de 335 con 124 proteínas secretables (37%) mientras que en el tratamiento con IFN $\gamma$  el total de proteínas fue de 249 con 102 proteínas secretables (41%; figura 28). La lista detallada de las proteínas identificadas está compilada en las tablas 7-9 (ANEXO).



**Figura 28.** Número de proteínas totales y secretables analizadas en cada uno de los tratamientos

Una vez excluidas las proteínas no secretables, se encontró un grupo común de proteínas en los tres tratamientos y en el control (figura 29). De igual modo, ciertas proteínas son compartidas entre los tratamientos, mientras que se encontramos otras proteínas secretadas de manera individual (tabla 9; ANEXO).



**Figura 29.** Diagrama de Venn, donde se aprecia la secreción global de las eASC sometidas a los diferentes tratamientos de preconditionamiento junto al número de proteínas que se comparten y se secretan de forma individual.

En los tratamientos preconditionantes, se identificó un subconjunto de 70 proteínas secretadas que fueron comunes entre ellos (tabla 7; ANEXO). No todas las proteínas secretadas por las eASC vírgenes fueron compartidas con los tres grupos de tratamiento, aunque sí entre el control y alguno de ellos (tabla 8; ANEXO). El grupo de proteínas de mayor relevancia identificado fue aquel que fue exclusivo de cada grupo tratado o del control. Las cifras fueron 15 proteínas exclusivas del control, 17 proteínas en PGE<sub>2</sub>, 33 proteínas en PGE<sub>2</sub>/SP y 22 proteínas en IFN<sub>γ</sub> (figura 29).

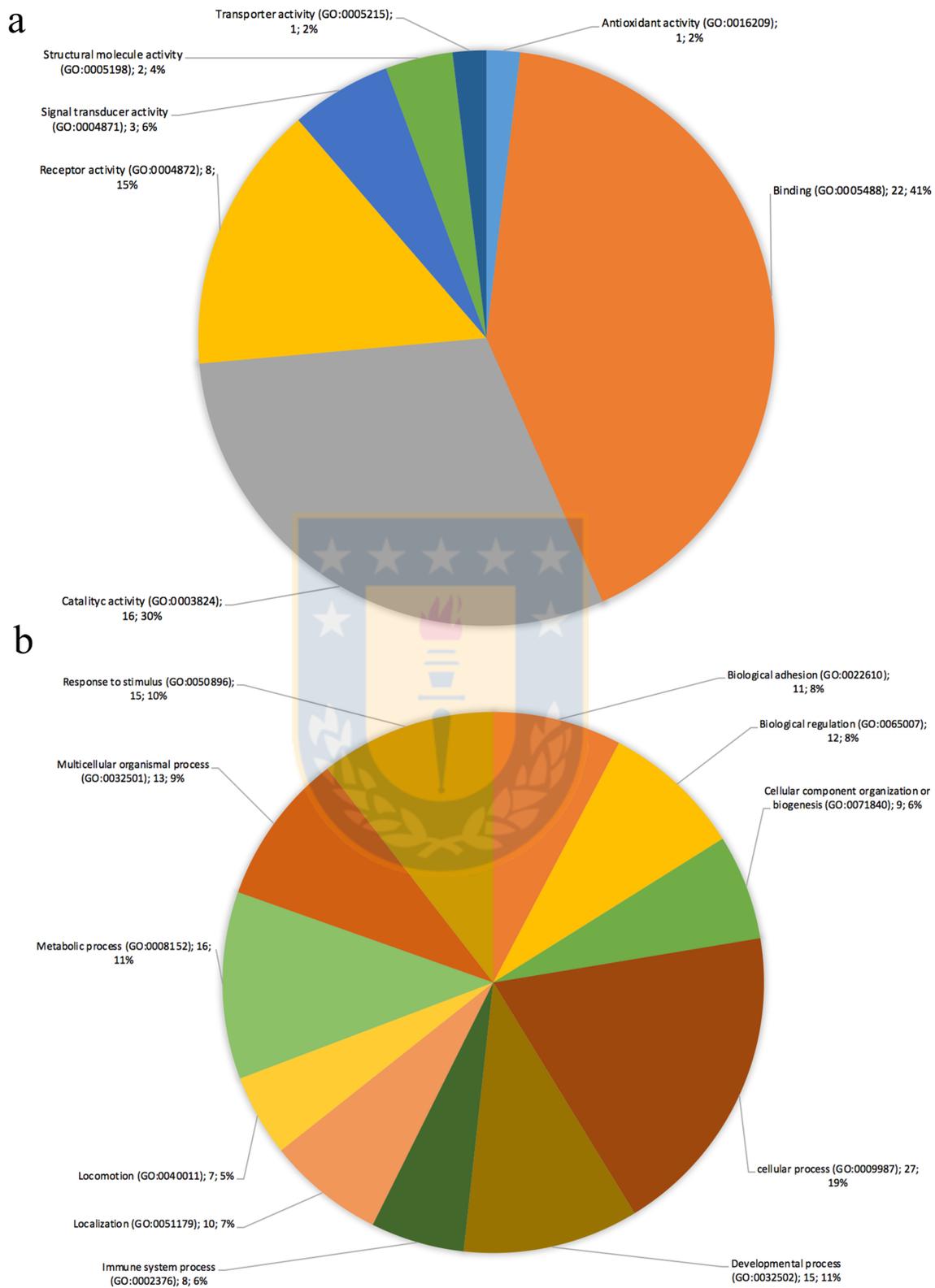
## 5.2. Efecto del preconditionamiento en la participación de las funciones moleculares y procesos biológicos de las proteínas secretadas por las eASC

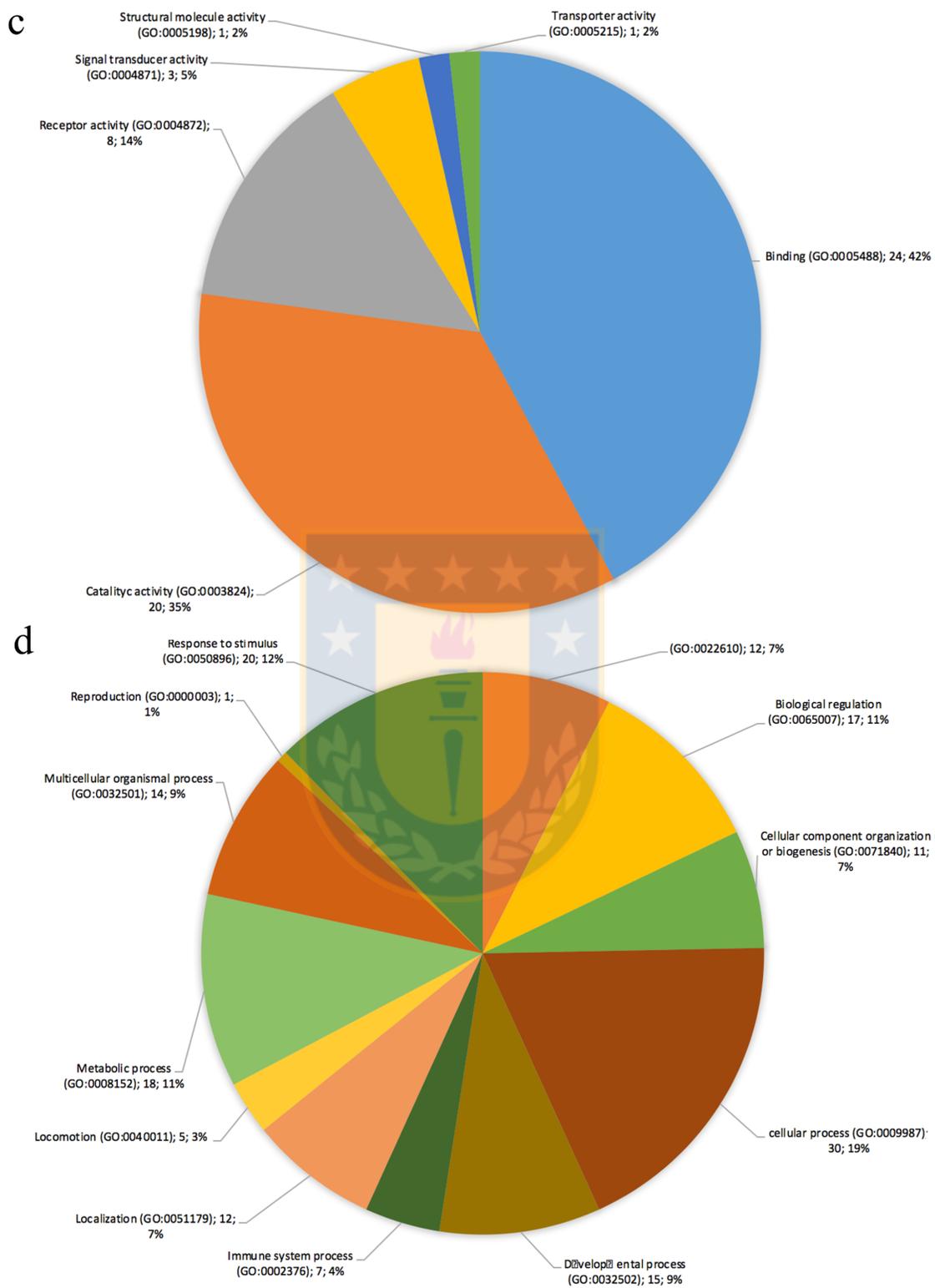
Para evaluar el secretoma de las eASC sometidas a los diferentes tratamientos de preconditionamiento, se analizó la participación de las proteínas en relación a las funciones moleculares (FM) y procesos biológicos (PB), los cuales fueron analizados con la herramienta online PHANTER classification system (<http://www.pantherdb.org>), de acuerdo a esta

herramienta, se puede apreciar que la secreción de proteínas varió notoriamente en función de los tratamientos experimentales, si bien algunas de estas proteínas se compartían entre todos los tratamientos, cada grupo de forma independiente generó un set único de proteínas dependiendo del estímulo.

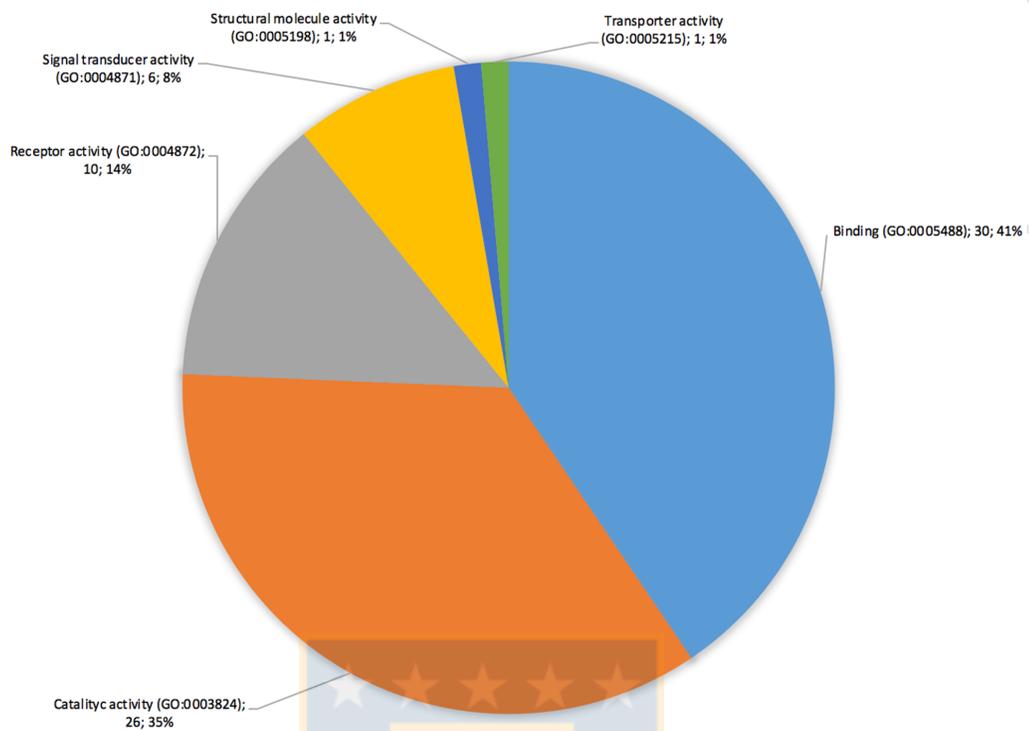
Las principales FM en las que estaban involucradas las proteínas analizadas, tienen que ver según la predicción del Gene Ontology (GO), con la actividad antioxidante (GO:0016209), unión (GO:0005488), actividad catalítica (GO:0003824), actividad receptora (GO:0004872), actividad de transducción de señales (GO:0004871), actividad de moléculas estructurales (GO:0005215) y actividad de transporte (GO:0005215; figura 30). De particular relevancia parece ser la diferencia a la alza en proteínas de efecto anti-oxidante que se hallaron particularmente en el tratamiento con PGE<sub>2</sub> (figura 30).

En cuanto a los PB en los que estuvieron involucradas las proteínas según las predicciones del GO, corresponden a procesos de adhesión (GO:0022610), regulación (GO:0065007), organización de componentes celulares o biogénesis (GO:0071840), procesos celulares (GO:0009987), desarrollo (GO:0032502), sistema inmune (GO:0002376), localización (GO:0051179), locomoción (GO:0040011), metabólicos (GO:0008152), de organismos multicelulares (GO:0032501), reproducción (GO:0000003) y de respuesta a estímulos (GO:0050896; figura 30). Si bien se logró predecir la vinculación de todas las proteínas con los procesos biológicos mencionados, se encontraron diferencias en el comportamiento secretor de las eASC en dependencia al tratamiento utilizado. Las figuras 31 a la 34 muestran estos análisis para el grupo control y para cada uno de los tres grupos experimentales por separado.

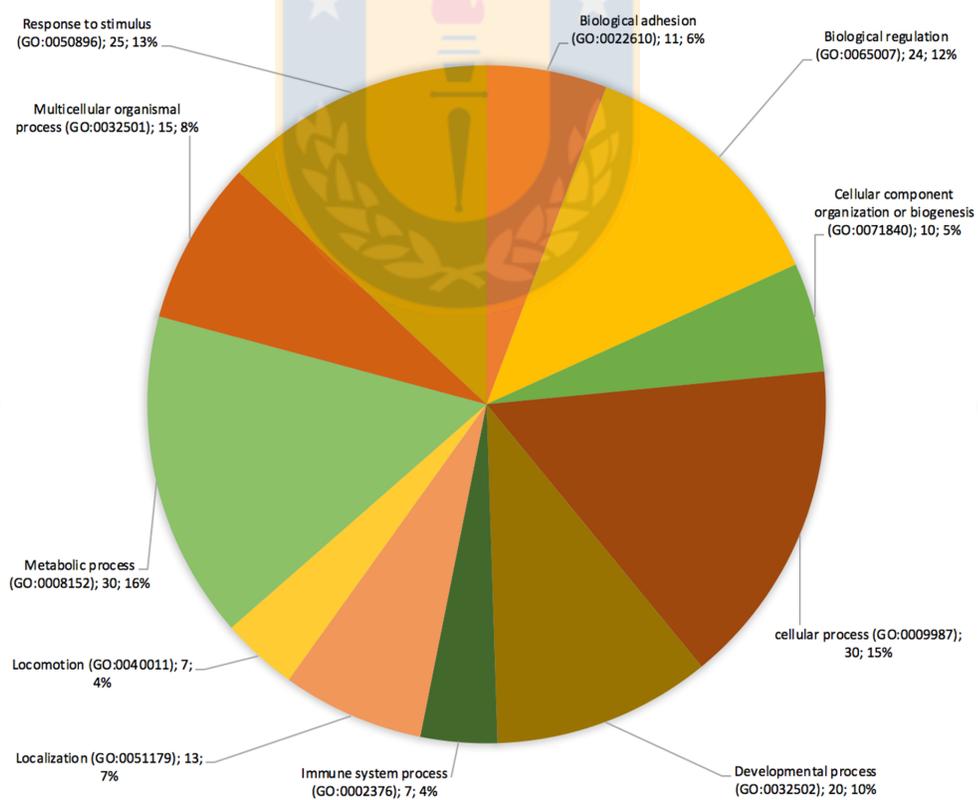




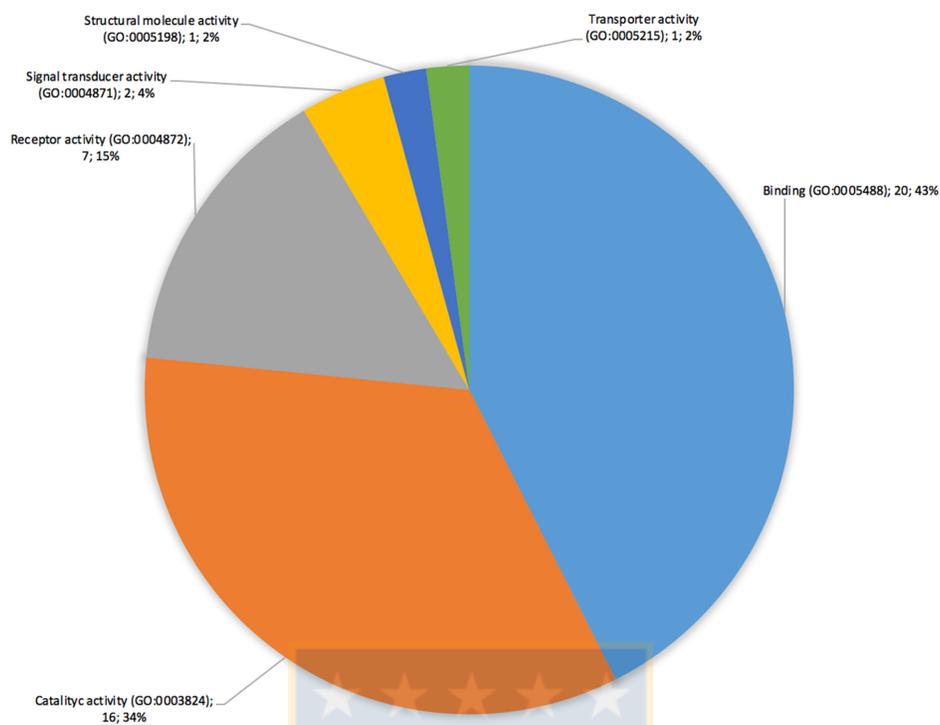
f



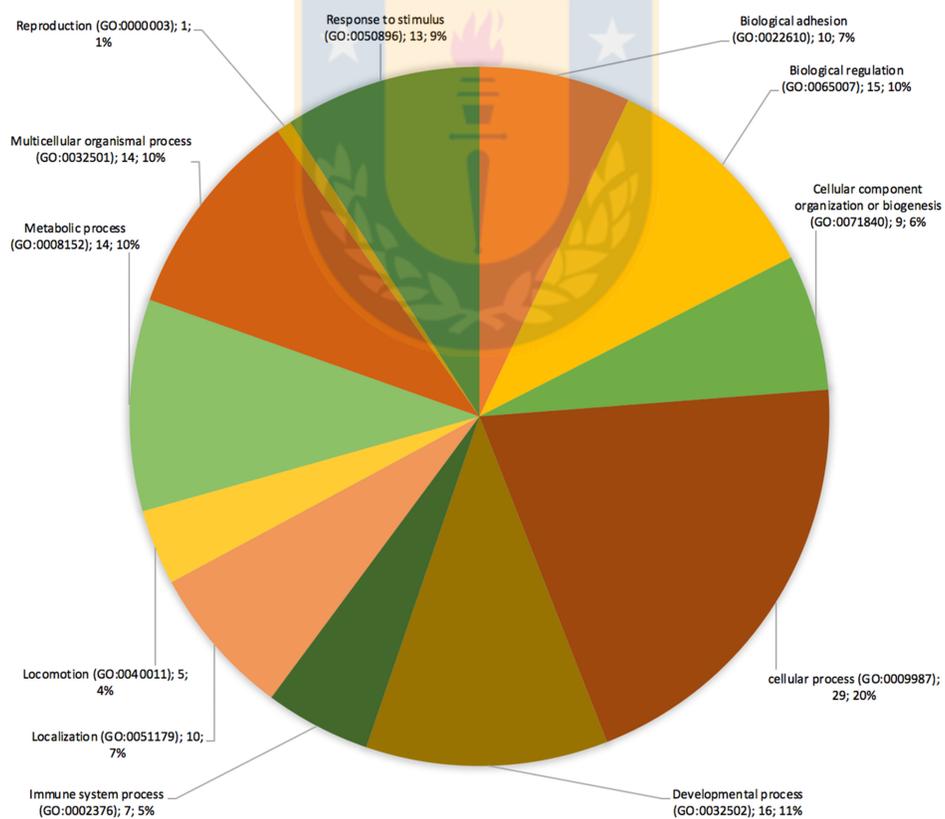
g



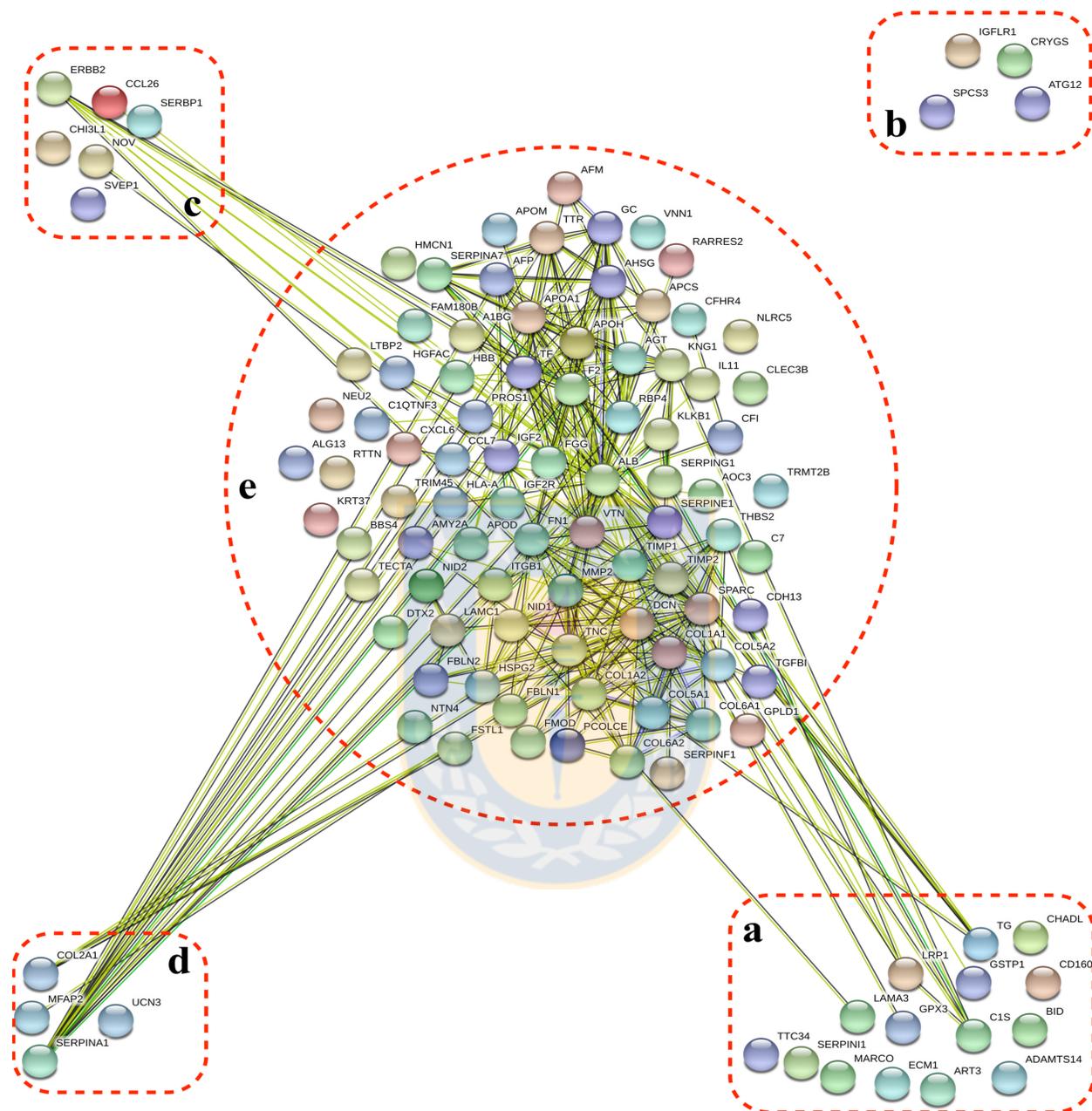
h



i

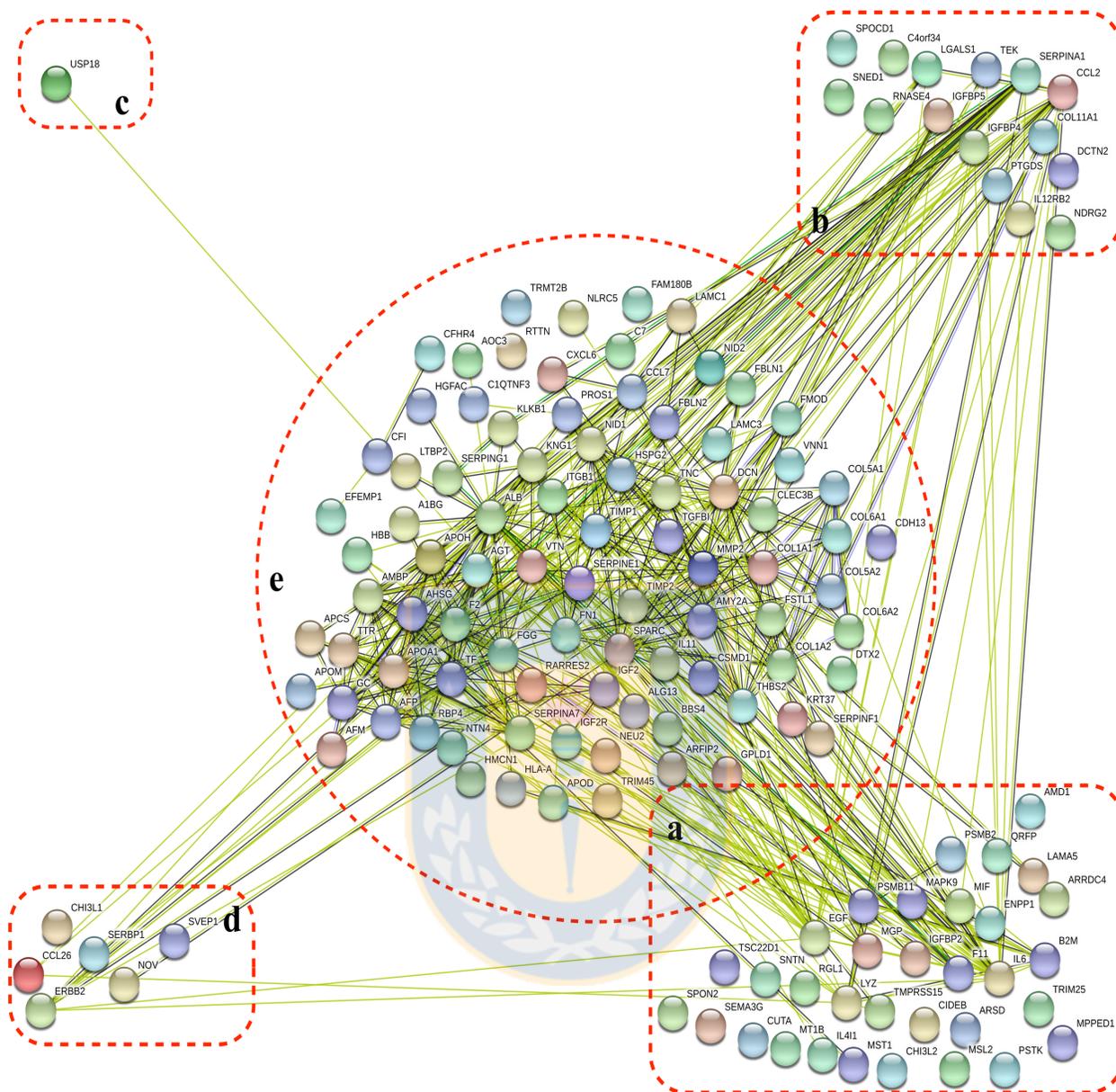


**Figura 30.** Análisis de las funciones moleculares y procesos biológicos en los cuales están involucradas las proteínas analizadas según la predicción de la base de datos online de la herramienta PHANTER y sus GO.

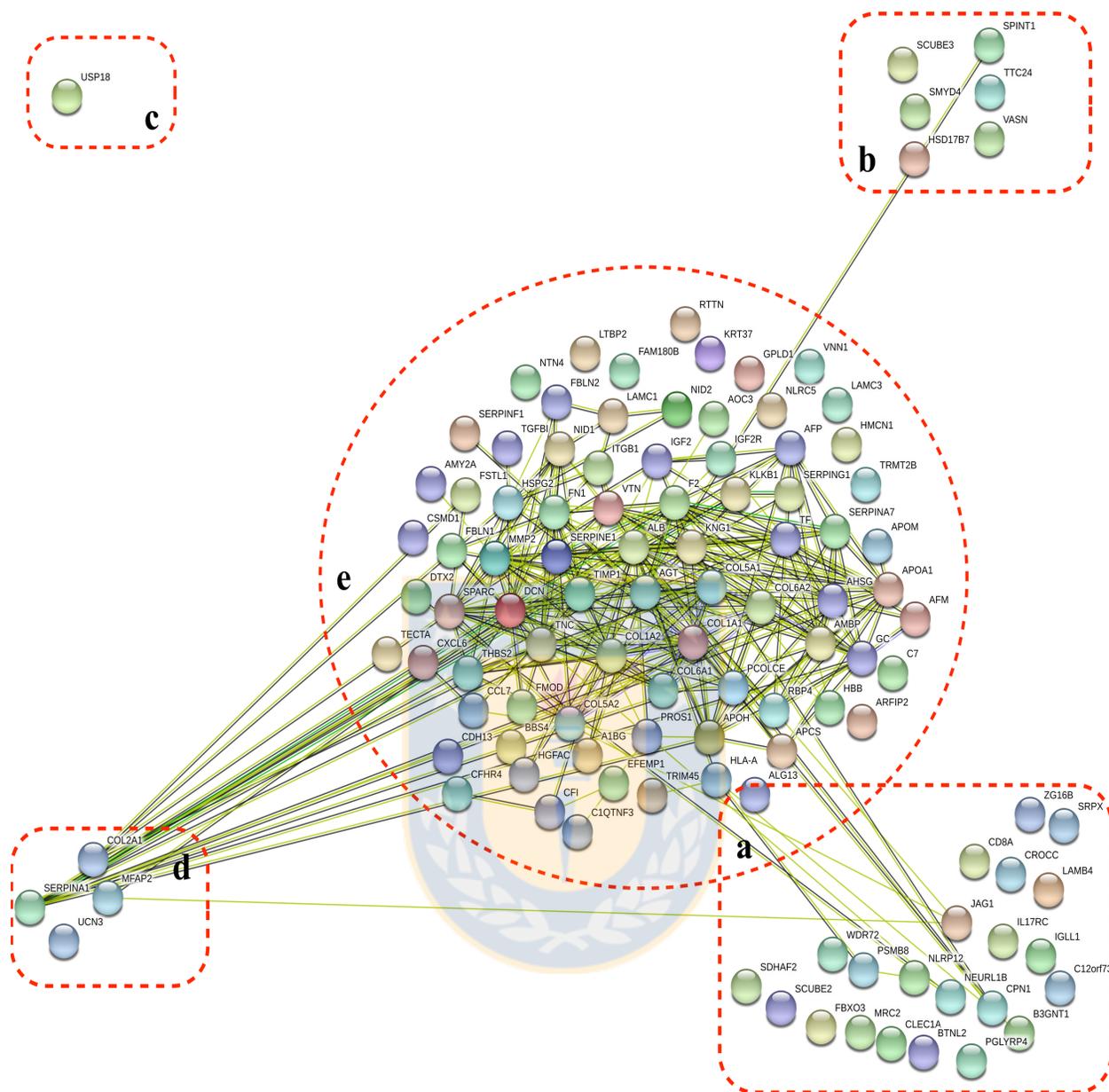


**Figura 31.** Redes de asociación y co-expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el control evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias de las eASC no tratadas, (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>, (c) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (d) proteínas compartidas con IFN $\gamma$  y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos.





**Figura 33.** Redes de asociación y co expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el tratamiento preconditionante con PGE<sub>2</sub>/SP evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias del tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP, (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (c) proteínas compartidas con IFN $\gamma$ , (d) proteínas compartidas con el control y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos.



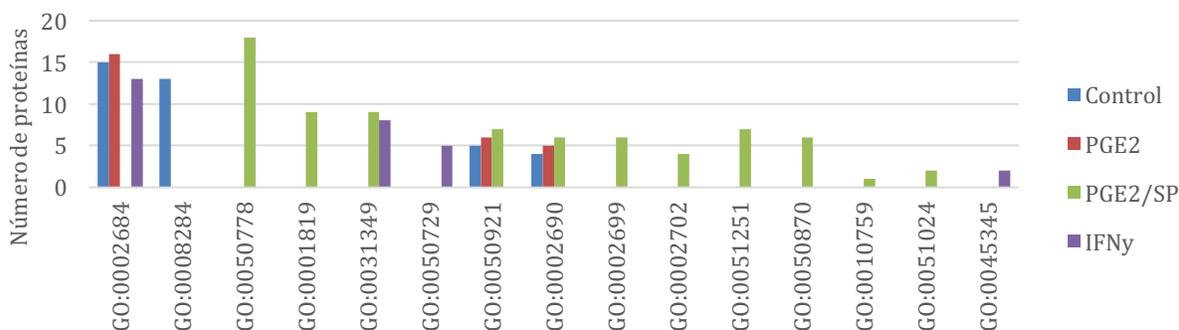
**Figura 34.** Redes de asociación y co expresión global de las proteínas secretadas por las eASC en el tratamiento preconditionante de IFN $\gamma$  evaluadas con STRING. (a) Proteínas propias del tratamiento con IFN $\gamma$ , (b) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>, (c) proteínas compartidas con PGE<sub>2</sub>/SP, (d) proteínas compartidas con el control y (e) proteínas comunes entre los cuatro tratamientos.

Del análisis de las redes de asociación y co-expresión se puede apreciar con claridad, que el preconditionamiento con cualquiera de las moléculas, genera un cambio notable en la estructura de las interacciones entre las proteínas, las cuales no existen en el grupo control (figura 31), sin embargo, se establecen en los grupos tratados (figuras 32, 33 y 34).

El tratamiento de las eASC con PGE<sub>2</sub>/SP, reguló positivamente la respuesta ante la estimulación inmunológica con organismos externos o sus derivados (GO:0050778), mientras que el resto de los grupos tratados regularon negativamente dicho proceso (GO:0050777). Curiosamente, el tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP, también generó proteínas que regularon negativamente la respuesta inmune, sin embargo, estas proteínas fueron distintas a las que se generaron mediante el preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> e INF $\gamma$ .

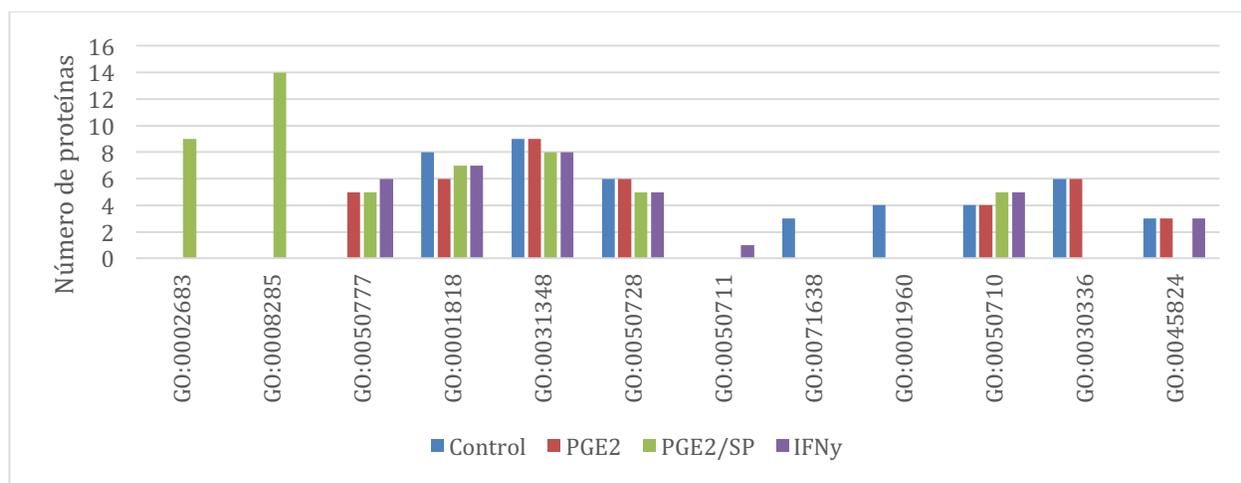
En lo referente a la estimulación de la producción de citoquinas (GO:0001819), solo el tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP, se observaron proteínas que regulan positivamente este proceso. En los procesos de respuesta de defensa (GO:0031349), los tratamientos con PGE<sub>2</sub>/SP e INF $\gamma$  secretaron proteínas vinculadas a la regulación positiva, mientras que todos los tratamientos presentan proteínas secretadas que regulan a la baja la respuesta de defensa ante patógenos (GO:0031348).

De especial importancia es la respuesta inflamatoria, en la cual las MSC juegan un papel decisivo. Solo las células tratadas con INF $\gamma$  secretaron proteínas involucradas en este proceso, que está relacionado con incrementar una respuesta inflamatoria, mientras que en la RN (GO:0050728) del mismo proceso, todos los tratamientos secretaron proteínas que regulan a la baja las respuestas inflamatorias, si bien INF $\gamma$  se ve involucrada en ambos procesos, el set de proteínas es distinto. En el caso de las regulaciones asociadas a la quimiotaxis, como la RP de quimiotaxis (GO:0050921) y la quimiotaxis de leucocitos (GO:0002690), se detectaron proteínas en los tratamientos de PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP y en el control, con el mismo set de proteínas, mientras que no se detectó participación de proteínas en ninguno de los tratamientos analizados en las RN de los mismos procesos. La proliferación celular fue regulada positivamente solo en el grupo de células no tratadas (GO:0008284), mientras que en la RN (GO:0008285) del mismo proceso, nuevamente solo en el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP se detectaron proteínas que participan de él.



**Figura 35.** Número de proteínas secretadas por cada tratamiento que participan en las diferentes RP del sistema inmune.

No todos los tratamientos, ni todas las proteínas, tuvieron una participación en ambas regulaciones, tal es el caso de las siguientes regulaciones, donde solamente hubo participación en las RP, como es el caso de los procesos efectores inmunes (GO:0002699), producción de mediadores moleculares de la respuesta inmune (GO:0002702), activación de linfocitos (GO:0051251), activación de células T (GO:0050870), quimiotaxis de macrófagos (GO:0010759) y secreción de inmunoglobulinas (GO:0051024), solamente se detectaron proteínas involucradas en la regulación a la alta de estos procesos, en el tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP. Una situación particular ocurre en la RP de los procesos de biosíntesis de MHC de clase I (GO:0045345), en el cual solo en el tratamiento de IFN $\gamma$  secretó un grupo de proteínas que están involucradas en el incremento del MHC de clase I, mientras que en la RN (GO:0045344) del mismo proceso, no hubo participación de ninguno de los tratamientos. Para analizar en detalle las proteínas asociadas a los GO predichos por STRING, ver la tabla 11 y 12 (ANEXO) y figura 35.

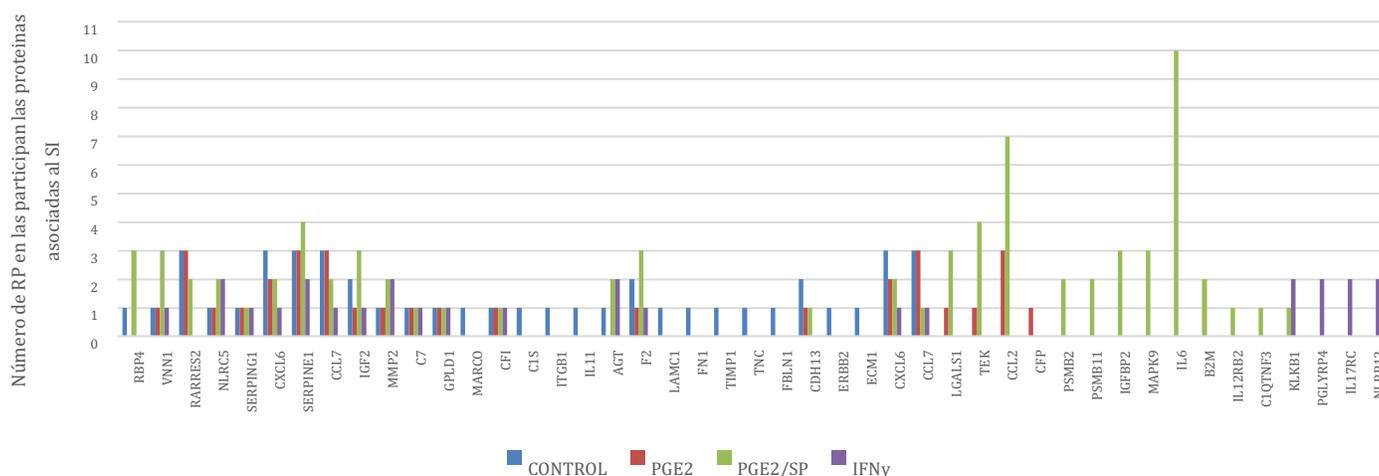


**Figura 36.** Número de proteínas secretadas por cada tratamiento que participan en las diferentes RN del sistema inmune.

En términos globales, el patrón predictivo del secretoma derivado de las eASC control, estaría participando principalmente en procesos asociados a la quimiotaxis y migración celular, comportamiento muy similar que tienen las eASC que fueron precondicionadas con PGE<sub>2</sub>, proteínas que participan principalmente en procesos de quimiotaxis. Situación totalmente diferente a lo que ocurre con la adición de SP al tratamiento con PGE<sub>2</sub>, en este caso, las proteínas secretadas abarcan una amplia cantidad de regulaciones positivas, que van desde la respuesta de defensa, secreción de citoquinas, quimiotaxis, procesos efectoros, activación de poblaciones linfoides y participación de la secreción de inmunoglobulinas, mientras que las eASC tratadas con IFN $\gamma$ , presentan un patrón de proteínas más asociado a la defensa ante organismos o estímulos inmunogénicos, activando la maquinaria del MHC de clase I (tabla 11 y 12; ANEXO).

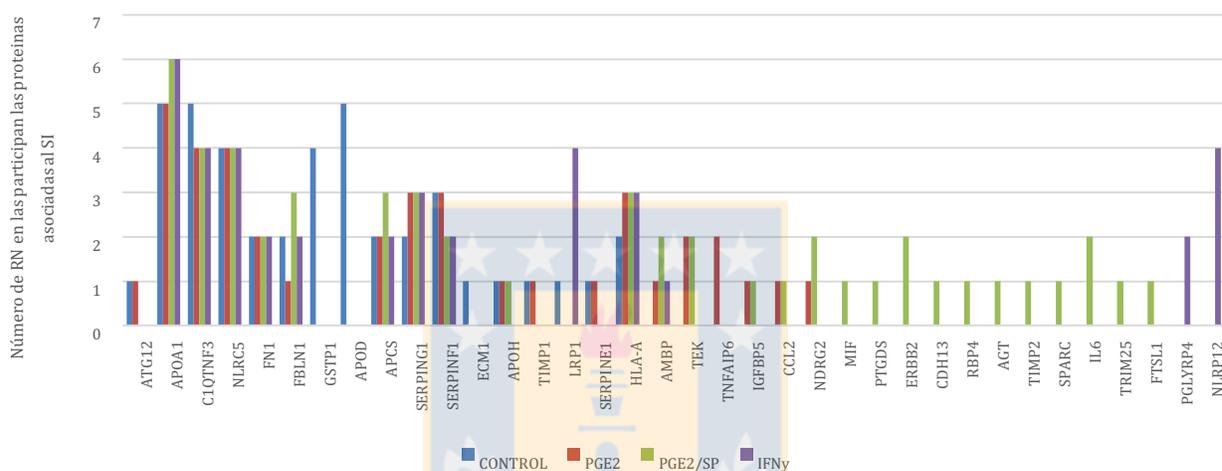
### 5.3. Participación individual de las proteínas asociadas a procesos del SI

Al cambiar el análisis desde uno más global hacia uno más particular y poder de esa forma profundizar en las proteínas individuales involucradas en los procesos asociados al SI, se observó que varias proteínas participan de manera exclusiva en la regulación ya sea positiva o negativa de procesos inmunes (figura 37 y 38). De este modo, en las RP el tratamiento con PGE<sub>2</sub> aportó proteínas como MARCO, C1S, ITGB1, IL-11, LAMC1, FN1, TIMP1, TNC, FBLN1, ERBB2 y ECM1 mientras que en el caso del tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP se detectaron las proteínas PSMB2, PSMB11, IGFBP2, MAPK9, IL-6, BSM, IL12RB2 y C1QTNF3 (figura 32).



**Figura 37.** Número de RP del sistema inmune en las que participan cada una de las proteínas secretadas por los diferentes tratamientos según las predicciones del GO.

Por otro lado, otro conjunto de proteínas fueron detectadas, pero esta vez asociadas a RN de procesos del sistema inmune, como es el caso de las proteínas GSTP1, APOD y ECM1 secretadas por el control, la proteína TNEFAIP6 secretada por las células sometidas al tratamiento con PGE<sub>2</sub>, el conjunto de proteínas MIF, PTGDS, ERBB2, CDH13, RBP4, AGT, TIMP2, SPARC, IL-6, TRIMP25 y FTSL1 secretada por las células sometidas al tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP y las proteínas PGLYRP4 y NLRP12 secretadas por las eASC estimuladas con IFN $\gamma$  (Figura 38).



**Figura 38.** Número de RN del sistema inmune en las que participan cada una de las proteínas secretadas por los diferentes tratamientos según las predicciones del GO.

#### 5.4. Evaluación del patrón de secreción individual de las eASC asociado al sistema inmune, en las células nativas y en las células sometidas al preconditionamiento

Para investigar más a fondo el patrón de proteínas involucradas en el SI de cada uno de los tratamientos y del control, se decidió agrupar las proteínas según su participación en las RP y RN y analizar cuáles de ellas lo hacían de manera independiente o bien se compartían entre los tratamientos y el control, por lo cual estos resultados están relacionados únicamente al SI. Del total de las 65 proteínas secretadas e identificadas por MALDI-TOF que están involucradas con el SI (figura 36), son en su mayoría proteínas que se comparten en los diferentes procesos del SI entre los tratamientos y el control, mientras que las proteínas que participaron de forma independientes en procesos del SI, corresponde a una pequeña proporción del total analizado, lo que puede visualizarse en el diagrama de ven (figura 36) y en la tabla 6, donde se puede apreciar que el control,

que corresponde al estado vírgenes de las eASC, tiene un patrón compuesto por 46 proteínas, el tratamiento de PGE<sub>2</sub> está compuesto por 44 proteínas, el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP está compuesto por 53 proteínas y el tratamiento con IFN $\gamma$  está compuesto de 32 proteínas (tabla 6). Con estos datos se puede tener información respecto a cómo se está comportando la célula ante los diferentes estímulos a los que es expuesta en relación al SI.

### **5.5. Proteínas asociadas al sistema inmune que son compartidas entre los diferentes tratamientos y el control**

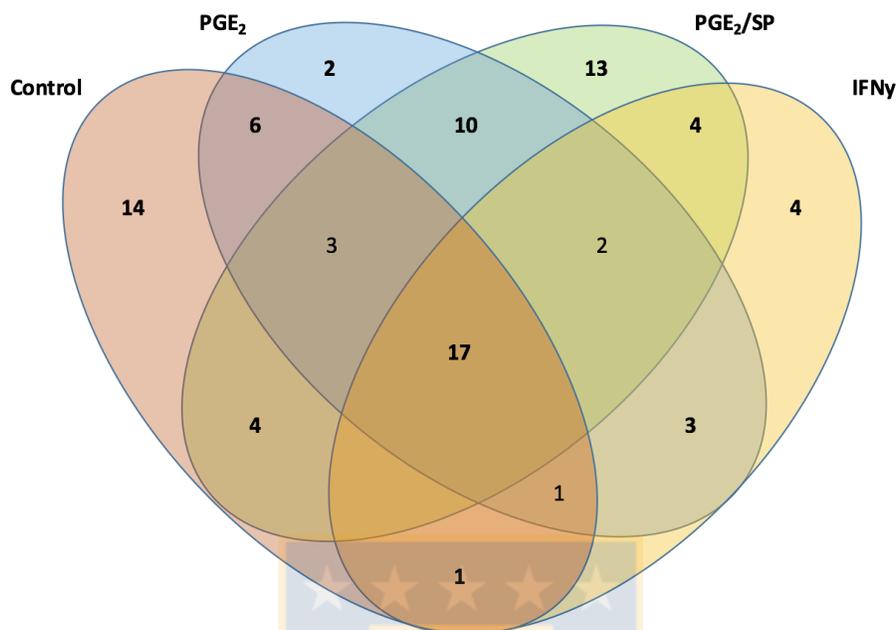
En relación a las proteínas que se comparten entre los tratamientos y el control, el estado basal de las eASC (tabla 6), se observó que con los tratamientos con quienes más se compartieron proteínas fue con el secretoma del tratamiento preconditionante de PGE<sub>2</sub> (6 proteínas) y con PGE<sub>2</sub>/SP (4 proteínas), mientras que con el tratamiento de IFN $\gamma$ , solamente se compartió 1 proteína (figura 34). Del total de las proteínas observadas que participan en procesos del SI según las predicciones del GO (STRING y UniProt), 14 de ellas corresponden a proteínas que realizan regulaciones de manera independiente, que solamente fueron detectadas en el secretoma del control (figuras 34 y 35).

El preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> generó un cambio en las proteínas secretadas por las eASC al compararlas con el control, con este grupo compartió 6 proteínas, 10 proteínas con el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP (10 proteínas), y sólo 3 proteínas con el tratamiento de IFN $\gamma$  (figura 34). Solo 2 proteínas derivadas del tratamiento con PGE<sub>2</sub> vinculadas al SI, participan de forma independiente en alguna regulación de este sistema (figuras 34 y 35).

El preconditionamiento con la combinación de PGE<sub>2</sub>/SP por su parte, comparte 10 proteínas con PGE<sub>2</sub>, como se mencionó anteriormente y 4 proteínas con el control y con IFN $\gamma$ . La adición de SP al medio con PGE<sub>2</sub>, genera un patrón diferente en la cantidad, el tipo y la función de las proteínas presentes, con un total de 13 proteínas únicas secretadas que participan en el SI (figura 39).

Por último, en el tratamiento preconditionante con el “estándar de oro” de IFN $\gamma$ , las eASC muestran un patrón distinto al de los grupos condicionados con base a PGE<sub>2</sub>, siendo menor el número de proteínas involucradas en el SI que se secretan bajo el efecto de esta citoquina. Se comparten 3 proteínas, con el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP comparte 4 proteínas mientras que con el

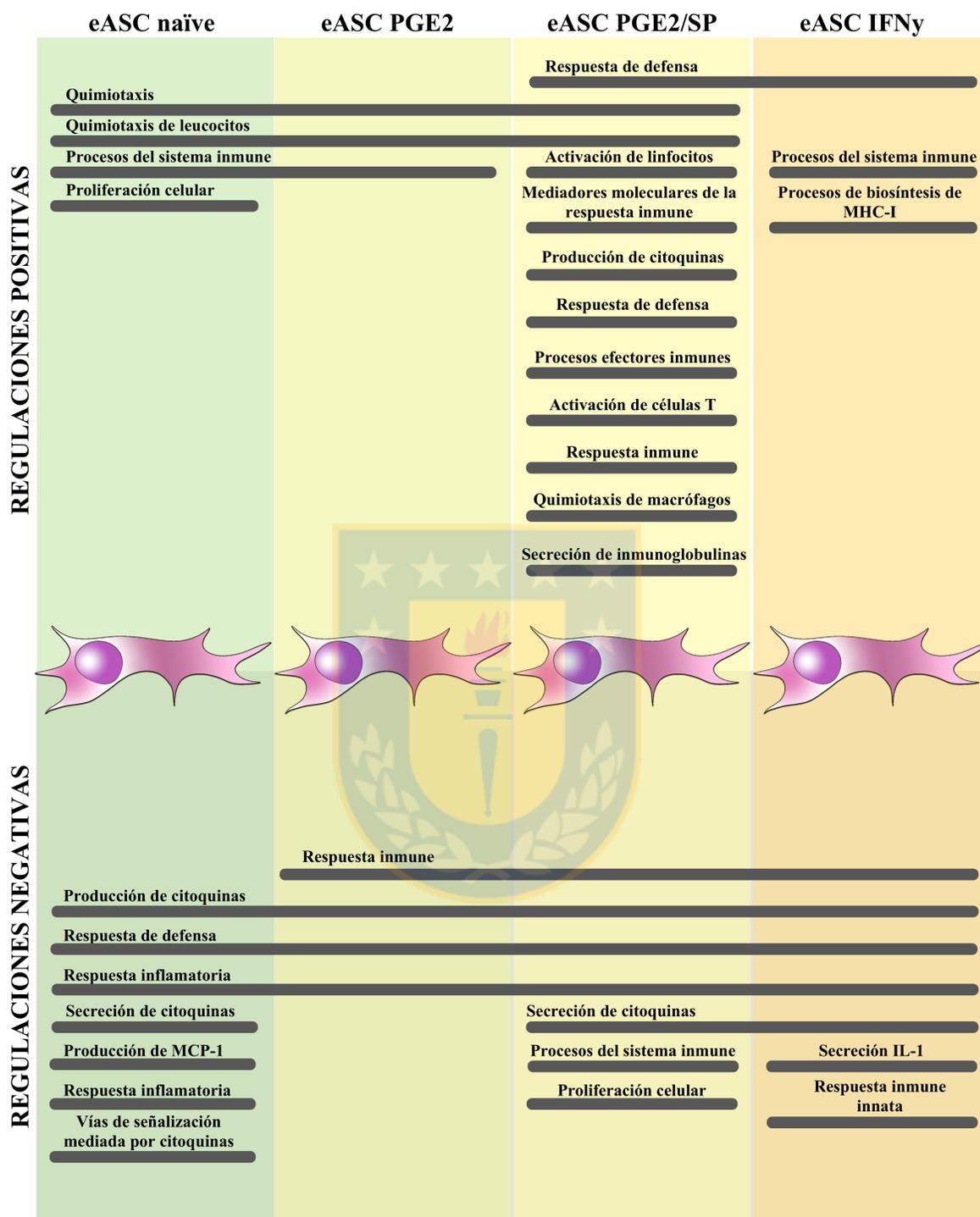
control comparte solo 1 proteína (figura 39).



**Figura 39:** Diagrama de Venn, de las proteínas involucradas en procesos del SI tanto en RP como en RN, secretadas por los diferentes tratamientos, donde se aprecia las proteínas que fueron secretadas de forma individual y las que son compartidas por los distintos tratamientos y el control.

**Tabla 16:** Listado de 65 proteínas involucradas en procesos de RP o RN en el SI, secretadas por las eASC ante los diferentes tratamientos. Esta lista se usó como base para la confección del diagrama de Venn de la figura 34. Las X indican ausencia de esa proteína en el secretoma cada condición y el ✓ indica presencia de la proteína en el secretoma de cada condición.

| Proteína | Control | PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> /SP | IFN <sub>γ</sub> | Proteína | Control | PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> /SP | IFN <sub>γ</sub> | Proteína | Control | PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> /SP | IFN <sub>γ</sub> |
|----------|---------|------------------|----------------------|------------------|----------|---------|------------------|----------------------|------------------|----------|---------|------------------|----------------------|------------------|
| RBP4     | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | AMBIP    | X       | ✓                | ✓                    | ✓                | MIF      | X       | X                | ✓                    | X                |
| NLRCS    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | TIMP1    | ✓       | ✓                | X                    | X                | MAPK9    | X       | X                | ✓                    | X                |
| SERPING1 | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | ERBB2    | ✓       | X                | ✓                    | X                | B2M      | X       | X                | ✓                    | X                |
| CXCL6    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | LGALS1   | X       | ✓                | ✓                    | X                | IL12RB2  | X       | X                | ✓                    | X                |
| SERPINE1 | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | TEK      | X       | ✓                | ✓                    | X                | IGFBP2   | X       | X                | ✓                    | X                |
| CCL7     | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | CCL2     | X       | ✓                | ✓                    | X                | PSMB11   | X       | X                | ✓                    | X                |
| IGF2     | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | AGT      | X       | X                | ✓                    | ✓                | PSMB2    | X       | X                | ✓                    | X                |
| MMP2     | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | KLKB1    | X       | X                | ✓                    | ✓                | PGLYRP4  | X       | X                | X                    | ✓                |
| C7       | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | ATG12    | ✓       | ✓                | X                    | X                | JAG1     | X       | X                | X                    | ✓                |
| GPLD1    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | NDRG2    | X       | ✓                | ✓                    | X                | IL17RC   | X       | X                | X                    | ✓                |
| CFI      | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | IGFBP5   | X       | ✓                | ✓                    | X                | NLRP12   | X       | X                | X                    | ✓                |
| FBLN1    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | MARCO    | ✓       | X                | X                    | X                | GSTP1    | ✓       | X                | X                    | X                |
| C1QTNF3  | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | C1S      | ✓       | X                | X                    | X                | APOD     | ✓       | X                | X                    | X                |
| APOA1    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | ITGB1    | ✓       | X                | X                    | X                | LAMA3    | ✓       | X                | X                    | X                |
| APCS     | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | IL11     | ✓       | X                | X                    | X                | LRP1     | ✓       | X                | X                    | X                |
| HLA-A    | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | AGT      | ✓       | X                | X                    | X                | TNFAIP6  | X       | ✓                | X                    | X                |
| SERPINF1 | ✓       | ✓                | ✓                    | ✓                | F2       | ✓       | X                | X                    | X                | PTGDS    | X       | X                | ✓                    | X                |
| RARRES2  | ✓       | ✓                | ✓                    | X                | LAMC1    | ✓       | X                | X                    | X                | TIMP2    | X       | X                | ✓                    | X                |
| FN1      | ✓       | ✓                | X                    | ✓                | TNC      | ✓       | X                | X                    | X                | SPARC    | X       | X                | ✓                    | X                |
| CDH13    | ✓       | ✓                | ✓                    | X                | ECM1     | ✓       | X                | X                    | X                | TRIM25   | X       | X                | ✓                    | X                |
| VNN1     | X       | ✓                | ✓                    | ✓                | CFP      | X       | ✓                | X                    | X                | FTSL1    | X       | X                | ✓                    | X                |
| APOH     | ✓       | ✓                | ✓                    | X                | IL6      | X       | X                | ✓                    | X                | VNN1     | ✓       | X                | X                    | X                |



**Figura 40:** Esquema del modelo propuesto de participación de las eASC en diferentes procesos de regulaciones negativas y positivas del sistema inmune en dependencia del tratamiento aplicado, el cual se muestra en la parte superior de la tabla y fueron: control o estado vírgenes de las eASC, preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>/SP y preconditionamiento con IFN $\gamma$ . Las regulaciones, negativas o positivas son tomadas de la herramienta de predicción GO de STRING

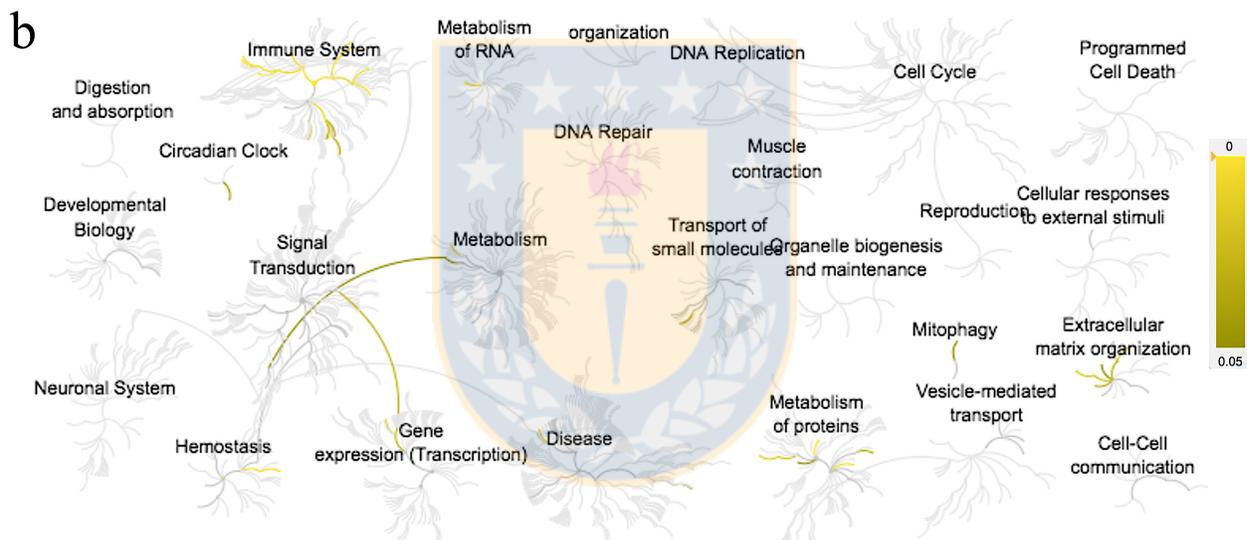
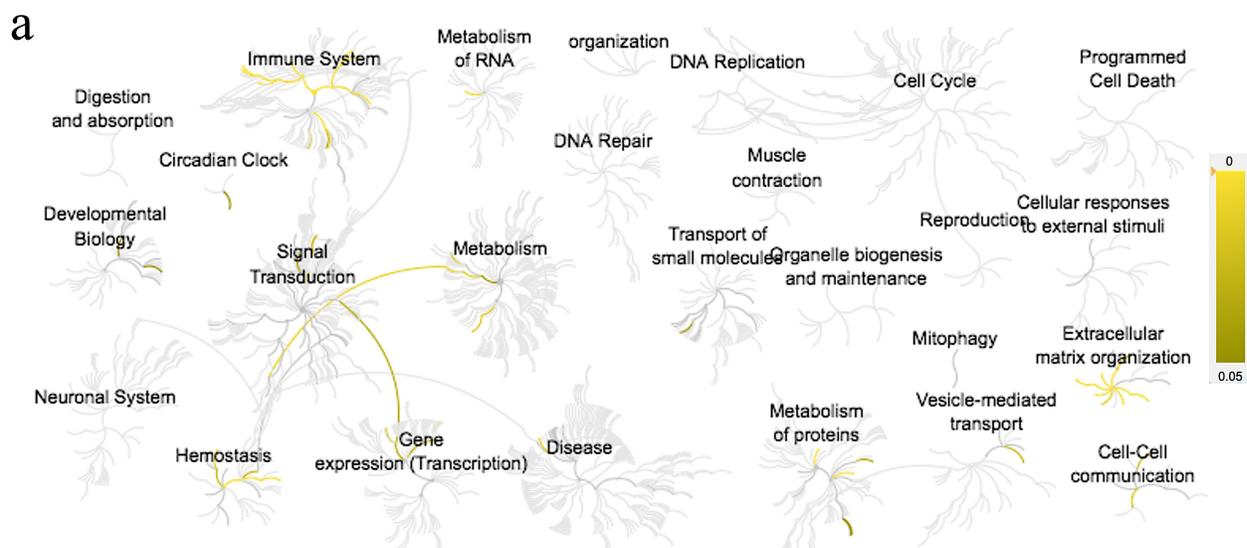
## 5.6. Asociación de las proteínas secretadas con su participación en rutas metabólicas (pathways analysis)

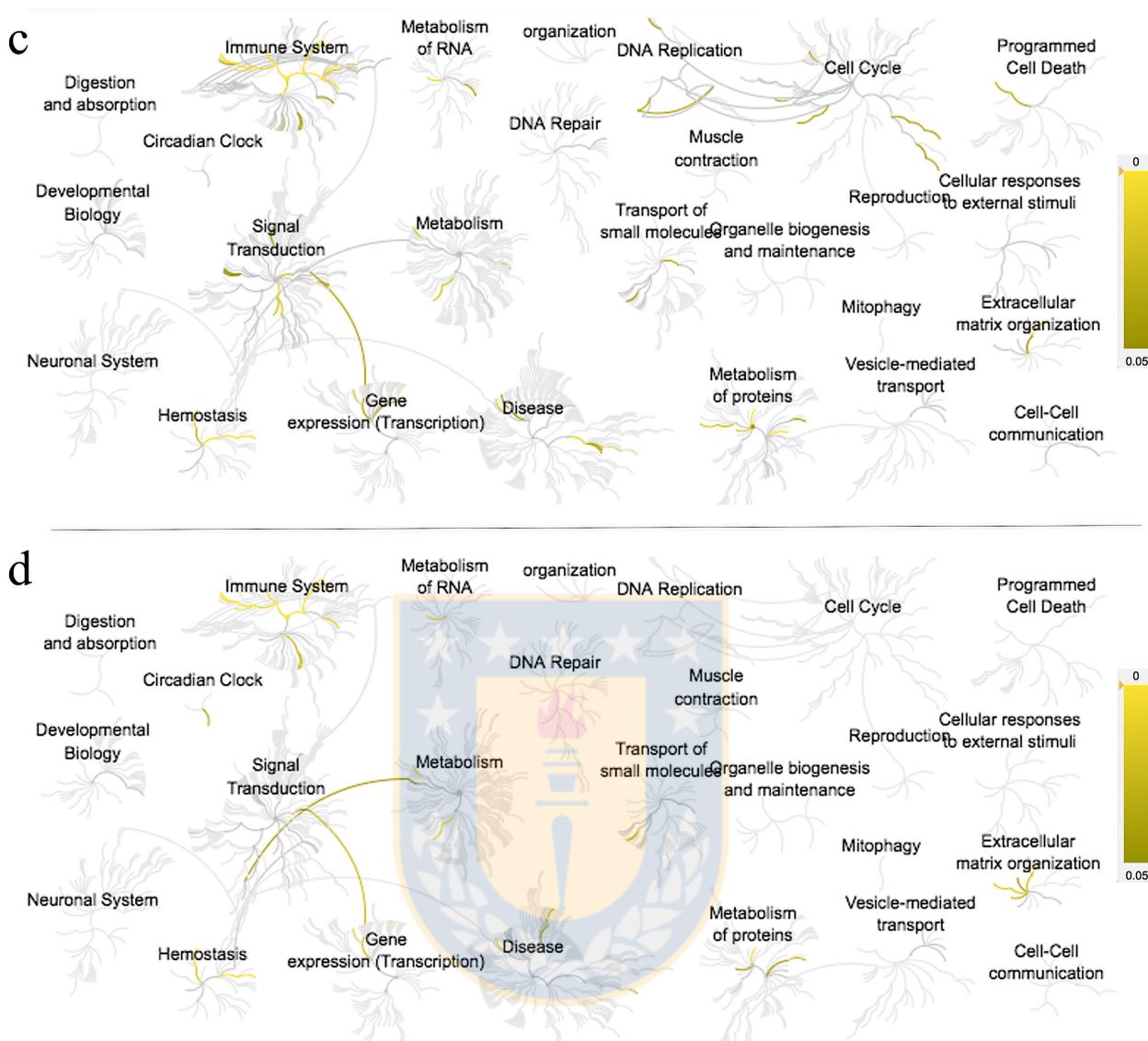
Para estudiar la participación de las proteínas secretadas en las rutas metabólicas (*pathways*), se utilizó la herramienta pública online REACTOME (<https://reactome.org>). Las predicciones realizadas se muestran en la figura 41. Las rutas que mayor cantidad de coincidencias mostraron y se compartieron entre el control y los tratamientos preconditionantes fueron: el sistema inmune, el ciclo circadiano, el desarrollo biológico, la transducción de señales, la homeostasis, la transcripción, el metabolismo, la enfermedad, el metabolismo del ARN, el transporte de pequeñas moléculas, las proteínas del metabolismo, el transporte mediado por vesículas, la organización de la matriz extracelular y la comunicación celular (figura 41).

El preconditionamiento utilizado sobre las eASC, define las rutas cuando se le compara con las células en estado vírgenes. Bajo el estímulo de PGE<sub>2</sub>, junto a las rutas mencionadas anteriormente, se suman rutas como la mitofagia (un tipo de autofagia selectiva para las mitocondrias). También se observa un aumento de la participación de proteínas secretadas, en rutas asociadas a la organización de la matriz extracelular y el metabolismo, mientras que disminuyen rutas relacionadas con el desarrollo biológico y la comunicación celular (figura 41 b).

Para el estímulo con PGE<sub>2</sub>/SP, se añaden rutas relacionadas con el ciclo celular, la muerte celular programada, el metabolismo de las proteínas y la respuesta celular a estímulos externos. También se observó un aumento en rutas del sistema inmune, el metabolismo del ARN, la replicación de ADN, la transducción de señales, la transcripción y la enfermedad, mientras que se observó una disminución en la organización de la matriz extracelular (figura 41 c).

En cuanto al estímulo con IFN $\gamma$ , no se observó la participación de proteínas en nuevas rutas, por el contrario, algunas de ellas desaparecieron, como lo fue la replicación del ADN, el ciclo celular, la muerte celular programada y la comunicación celular. Junto a esto, se ve una disminución de proteínas que participan en rutas del sistema inmune, el metabolismo del ARN, la respuesta celular a estímulos externos y el metabolismo de las proteínas (figura 41 d).





**Figura 41:** Análisis de rutas metabólicas usando REACTOME. Se destaca la participación de las proteínas en diferentes rutas en (a) el control, (b) el tratamiento preconditionante con  $PGE_2$ , (c) con  $PGE_2/SP$  y (d) con  $IFN\gamma$ .

## Productividad

Todos los resultados del primer bloque, se resumieron y dieron lugar a una publicación de corriente principal (Cabezas et al., 2017).

Mientras que los resultados del segundo bloque dieron lugar a una patente: Procedimiento de preconditionamiento celular *in vitro* para la obtención de células madre mesenquimales (MSCs) con características inmunomoduladoras. 2017-02129. Castro F.O; Cabezas J; Rodriguez-Alvarez L.L; Saravia F. Año 2017.

# DISCUSIÓN



El objetivo de este trabajo, fue evaluar atributos biológicos importantes de las eASC como la “stemness”, así como también su capacidad de adquirir un fenotipo inmunomodulador en dependencia de la exposición a medios condicionados con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP e IFN $\gamma$  versus su estado virgen.

*In vivo*, las MSC no secretan proteínas inmunomoduladoras a menos que sean activadas por un ambiente inflamatorio (Peroni y Borjesson, 2011). Mientras que *in vitro*, ha sido demostrado que cuando las MSC son expuestas a linfocitos activados o a citoquinas como IFN $\gamma$  o el TNF $\alpha$ , se activa la secreción de proteínas inmunomoduladoras (Deuse et al., 2011). Cuando esto sucede, las MSC cambian su fenotipo al de una MSC anti-inflamatoria, lo cual se ha denominado como fenotipo MSC2 (Bernardo y Fibbe, 2013; Vizoso et al., 2017; Redondo-Castro et al., 2017). Este fenómeno estaría mediado por la estimulación de los Toll-like receptor 3 (TLR3) expresados en su superficie (Waterman et al., 2010). Es por eso, que nuestros resultados junto a los existente en la literatura actual, soportan aún más el hecho que la polarización de las MSC hacia un fenotipo inmunomodulador potente, solo podría estar dado por un preconditionamiento *in vitro* de estas y no como un fenómeno netamente intrínseco de las MSC.

## CARACTERIZACIÓN DE LOS ATRIBUTOS MULTIPOTENTES

A los efectos de esta discusión, se separará el análisis de las propiedades biológicas no inmunes (tiempo de doblaje, diferenciación mesodérmica, capacidad migratoria y patrón de marcadores de superficie), de las propiedades inmunes de las eASC.

### Características de las eASC en cultivo

Las células analizadas y estudiadas en este trabajo fueron obtenidas por digestión enzimática con colagenasa, generando una fracción vascular estromal de la cual se obtuvieron los cultivos en pase 3, similar a lo reportado por otros autores (Pascucci et al., 2010; Alipour et al., 2015). Las células fueron cultivadas *in vitro*, y mostraron morfología fibroblástica, alargada y fusiforme, un crecimiento en monocapa y la capacidad de adhesión al plástico, todas estas características han sido descritas previamente para las MSC equinas *in vitro* (Vidal et al., 2006; Vidal et al., 2007; Vidal et al., 2008; Pascucci et al., 2010; Alipour et al., 2015).

### **Tiempo de doblaje celular**

El PDT promedio de 37,3 hrs observado en las eASC, resultó estar en concordancia con lo reportado por otros autores, donde han observado valores de PDT entre 39.88 a 46.7 hrs promedio para MSC derivadas de grasa de ratas, caninos y equinos (Peng et al., 2008; Villatoro et al., 2014, Alipour et al., 2015, respectivamente).

### **Capacidad de diferenciación tripotente de las eASC no precondicionadas**

Una característica de gran relevancia de las MSC es su capacidad biológica de diferenciación *in vitro* hacia linajes osteogénicos, condrogénicos y adipogénicos, para lo cual se usan condiciones específicas para cada tipo de diferenciación. Todas las eASC aisladas se diferenciaron *in vitro* en osteocitos, adipocitos y condrocitos, sin encontrar diferencias en la cinética, en el patrón de tinción o la intensidad de las mismas, respecto a lo reportado previamente para las eASC (Vidal et al., 2007; Pascucci et al., 2010; Ranera et al., 2011; Ranera et al., 2012; Castro et al., 2014).

En el caso de la diferenciación osteogénica, se observó que a partir del día 5 post inducción, ya existían depósitos de minerales sobre la monocapa de células. Ya hacia el día 14, todas presentaban un marcado depósito de matriz extracelular tipo hidroxiapatita, lo que también se ha visto en estudios previos de eASC equinas, con indicios de diferenciación a los 10 días post inducción (Vidal et al., 2007; Barberini et al., 2014).

En el caso de la condrogénesis, en todos los cultivos a partir del día 3, se observó que la monocapa se comenzó a desprender desde los bordes y pasó a dar forma a una micromasa, la cual al día 14 estaba completamente formada, lo que concuerda con reportes previos de diferenciación de este tipo de células (Calvalho et al., 2013). Otros autores, han encontrado diferenciación condrogénica más tardía, llegando incluso a evidenciarse después de los 21 días de inducción (Barberini et al., 2014). Por otro lado, en la histología realizada sobre las micromasas formadas en la diferenciación condrogénica, se observaron diferentes patrones y calidades de diferenciación en dependencia del tratamiento utilizado *versus* el control (células sin precondicionamiento). Pudimos observar que solamente las micromasas formadas a partir de las eASC precondicionadas con PGE<sub>2</sub>/SP, tuvieron un aspecto histológico similar en arquitectura como en el tipo de matriz extracelular a la histología del control. Mientras que en el resto de las eASC precondicionadas y sometidas a la diferenciación condrogénica, las micromasas mostraban un patrón de diferenciación incompleto, más inmaduro, las cuales no eran sólidas y que posterior a la tinción no observó la

secreción de los diferentes tipos de matrices extracelulares como si se logró ver en el control positivo, tal como ha sido reportado anteriormente en otros trabajos (Vidal et al., 2008; Shademan et al., 2015; Luesma et al., 2016; Desancé et al., 2018).

Por otro lado, en la diferenciación adipogénica, las células comenzaron a aumentar de volumen desde el día 3 post inducción. Al día 7 ya se podía observar pequeñas vacuolas en su interior, las que hacia el día 14, eran de mayor tamaño, situación similar a lo reportado por otros autores en MSC equinas (Vidal et al., 2007; Barberini et al., 2014). Sin embargo, la cantidad y tamaño de las vacuolas, varió entre los tratamientos, siendo el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP el que indujo una mayor producción de vacuolas en las eASC. Esto concuerda con resultados en MSC que fueron precondicionadas con genisteína (Zhang et al., 2016), IGFBP2 en UC-MS y CB-MS humanas (Wang et al., 2017) y diferentes concentraciones de insulina (Lee et al., 2015), observándose un aumento en la capacidad de las MSC para diferenciarse hacia estirpes adipogénicas.

### **Capacidad migratoria**

La capacidad de migración hacia el quimioattractante, es una propiedad muy deseada para las MSC, siendo un pre-requisito para el “*homing*” o anidamiento *in vivo* y la migración hacia tejidos diana, no necesariamente cercanos al nicho de las MSC (Becker and Riet, 2016). El éxito de la aplicación o administración de las MSC depende de que las MSC presenten una eficiente migración y *homing* en los sitios de interés, pero solo un pequeño porcentaje de las células administradas logran llegar a su diana (Devine et al, 2003). La manipulación *ex vivo* de las células, tales como el aislamiento y la expansión en cultivo, generan la pérdida de moléculas que participan en el *homing* (Rombouts et al., 2003; Honczarenko et al., 2006). Nuestros resultados indicaron que las células, mantuvieron la capacidad de migrar hacia estímulos inespecíficos como SFB al 10% a pesar de ser manipuladas *in vitro*, tal como se ha informado anteriormente para otros tipos celulares (Smith et al., 2012). La migración temprana evaluada a las 12 y 24 hrs, fue significativamente mayor en las eASC tratadas con SFB que en las eASC control, las que no estaban suplementadas con 10% de SFB, tal como se ha reportado en otros estudios (Baek et al., 2011; Ciria et al., 2017). Esto es indicativo, de que, a pesar de la manipulación las células mantenían su capacidad de ser atraídas hacia un estímulo.

### **Inmunofenotipo de las eASC**

Con el fin de tener una caracterización más profunda de las eASC aisladas y utilizadas en este estudio, se evaluó un panel de anticuerpos con reactividad conocida para marcadores de superficie en las eASC. El análisis del inmunofenotipo, arrojó que la proteína CD90 y CD44, fueron los marcadores más expresados en las eASC, seguidos por CD29, CD105 y MHC-de clase I, mientras que se detectó una baja o nula expresión de CD45 y MHC- de clase II.

El marcador CD90, es probablemente el marcador que es detectado con mayor frecuencia en las MSC de equinos. Sin embargo, su expresión varía notablemente entre los diferentes reportes existentes en dependencia de la fuente de MSC, como es el caso de eASC en las que los porcentajes de positividad obtenidos son de un 99% (Barberini et al., 2014), mientras que otros autores han reportado un 21,7% de expresión positiva (Hillmann et al., 2016). En el caso de las BM-MS, los resultados son aún más amplios y dispares entre autores, con valores que oscilan entre el 98,2% (Barberini et al., 2014) y el 3,07% (Paebst et al., 2014). Se ha reportado una situación similar para UCB-MS con un 99,9% (Kang et al., 2013) y en UCT-MS con rangos tan amplios que van desde un 93.4% (Iacono et al., 2012) a un 0,22% o la nula expresión de este marcador (Hillmann et al., 2016). En nuestro caso las eASC en caballo chileno, expresaron un  $96\% \pm 2,6$  de positividad, lo que está acorde con lo reportado en trabajos previos para la especie equina (Iacono et al., 2012; Kang et al 2013; Barberini et al., 2014).

Otros grupos han demostrado que las eASC expresan altos niveles de CD44, lo que concuerda con nuestros resultados (Ranera et al., 2011; Carvalho et al., 2013; Barberini et al., 2014). Se ha visto que este marcador, se incrementa en relación al aumento en el número de pases de las células en cultivo *in vitro* (Carvalho et al., 2013). Pero esta situación no fue considerada en nuestros experimentos, ya que todas las células se encontraban en el pase 3 al momento del análisis.

Respecto a los marcadores CD29 y CD105, también han sido ampliamente estudiados en las MSC equinas de diferentes tejidos, con porcentajes de expresión positiva bastante variados. En el caso de CD29, ha sido evaluado en fuentes como tejido adiposo (Ranera et al., 2011; Ranera et al., 2012), médula ósea (Carrade et al., 2012; Ranera et al., 2012; Paebst et al., 2014), sangre de cordón umbilical (De schauwe et al., 2012; Carrade et al., 2012), cordón umbilical (Paebst et al., 2014) y tendón (Paebst et al., 2014; Hillmann et al., 2015), donde se han obtenido valores con porcentajes que fluctúan entre un 37,5 a un 99,73% de positividad, porcentajes que están acordes a lo obtenido en nuestro estudio.

Una situación muy similar es la que se reporta para CD105, donde las mediciones que se realizaron en MSC derivadas de médula ósea (Barberini et al., 2014), tejido adiposo (Bravo et al., 2012; Carvalho et al., 2013; Paebst et al., 2014; Barberini et al., 2014; Hillmann et al., 2015), cordón umbilical, sangre de cordón umbilical (Iacono et al., 2012; Kang et al., 2013; Paebst et al., 2014), tendón (Hillmann et al., 2015) y líquido amniótico (Iacono et al., 2012), presentaron valores que fluctúan entre un 0,42 a un 98,38% de positividad. Estos porcentajes se encuentran en concordancia con nuestros resultados, que, a pesar de ser bajos, la mayor parte de los resultados reportados en la literatura para este marcador en la especie equina son bajos.

Mientras que el marcador MHC de clase I, es uno de los marcadores menos estudiados en las MSC equinas, con escasos reportes, nuestros resultados coinciden con el único estudio de este en MSC adiposas equinas, (69,69% de positividad; Carrade et al., 2012; 70% de positividad en nuestros resultados). Aun así, se contrastan notoriamente con lo reportado por Tessier et al., 2015, quien halló un 1% de expresión de MHC-I en MSC derivadas de sangre de cordón umbilical, lo que probablemente esté relacionado con el origen de las células.

Por otro lado, los marcadores negativos analizados: MHC clase II y CD45, resultaron claramente negativos, lo que coincide con la literatura e indican que las células no sean de origen hematopoyético CD45 o poblaciones linfoides MHC de clase II (Radtke et al., 2011; Radtke et al., 2013; Ranera et al., 2011; Iacono et al., 2012; Radtke et al., 2013; Paebst et al., 2014; Hillmann et al., 2015; Lombana et al., 2015).

En resumen, de esta primera etapa del trabajo, se puede concluir sin ninguna duda que se aislaron poblaciones de células madre mesenquimales equinas de origen adiposo, que cumplen con los requisitos establecidos para MSC humanas por la ISSCR y que a su vez, coinciden con lo reportado por otros autores para la especie equina.

Como se mencionó al inicio de esta sección, el objetivo experimental fundamental de este trabajo y que constituye la esencia de la hipótesis científica, es que el pre-condicionamiento de las eASC con moléculas seleccionadas, les confiere a las células propiedades inmunomoduladoras, sin que éstas pierdan sus atributos biológicos no relacionados con la inmunidad.

### **Precondicionamiento de las eASC**

Diversos métodos han sido utilizados para estimular la secreción de factores tróficos e inmunomoduladores y de esta manera potenciar los efectos paracrinos de las MSC. Estos métodos

incluyen estrategias fisiológicas como la hipoxia, moleculares como el uso de citoquinas y factores de crecimiento, farmacológicas como el uso de LPS y físicos como el uso de esferoides (Baraniak et al., 2010; Mohammadi et al., 2017). A pesar de que en la literatura se reportan diferentes sistemas o métodos de preconditionamiento, hasta la fecha no existe evidencia respecto a algún tipo de preconditionamiento en MSC, en el cual se utilice PGE<sub>2</sub> y SP exógena y menos aún del uso conjunto de éstas.

En el caso específico de las MSC equinas de origen adiposo, se ha demostrado que los mediadores del efecto inmunomodulador sobre poblaciones de leucocitos, a diferencia de lo que sucede en MSC humanas y murinas, no son IL-6, iNOS, ni IDO. Sin embargo, este efecto estaría mediado por PGE<sub>2</sub> (Carrade et al., 2012; Carrade et al., 2014; Colbath et al., 2017).

Esta respuesta, es claramente tejido-específica, ya que en el caso de iNOS, solo es producido por fuentes como eBM-MSc y en eCB-MSc, pero no por las eASC y las eCT-MSc, mientras que en el caso de IDO, se ha reportado que no es producida por ninguna de las fuentes anteriormente mencionadas (Carrade et al., 2012; Carrade et al., 2014). Todas las MSC equinas, sin embargo, secretan PGE<sub>2</sub>, al ser estimuladas con linfocitos T activados (Carrade et al., 2014). No existen reportes previos de secreción, ni de la respuesta a SP por parte de las MSC equinas de ningún tipo.

En otras especies, la SP exógena (pero no utilizada como preconditionante), se ha visto involucrada en fenómenos de migración y proliferación de BM-MSc provenientes de ratones (Dubon and Park, 2015), vía Wnt (MacDonald et al., 2009). Se ha visto que SP genera un efecto protector en BM-MSc de ratas cuando se encuentran deprivadas de SFB (Fu et al., 2015) y tiene la capacidad de potenciar la actividad inmunosupresiva de las hBM-MSc en pasajes tardíos en preconditionamientos *in vitro* (Jin et al., 2015). También existen reportes donde se ha vinculado a la SP con diversos fenómenos de modulación inmunológica (Katsanos et al., 2008). Esta modulación puede generar la alteración de la función de macrófagos, la inducción de la producción de citoquinas y la participación en la respuesta inmune en cobayos, indicando por ejemplo que los macrófagos a través de la estimulación con SP, producen citoquinas proinflamatorias como IL-1, IL-6, TNF $\alpha$  y PGE<sub>2</sub> (Chancellor-Freeland et al., 1995).

Si bien se ha reportado el efecto que tienen las moléculas sobre las MSC (*in vivo* en el caso de la PGE<sub>2</sub> e *in vitro* en el caso de la SP), según nuestros resultados, la asociación de estas dos moléculas, que han demostrado potentes efectos sobre en las propiedades paracrinas de las eASC, no ha sido reportada hasta la fecha.

### **Evaluación de la mantención de las propiedades biológicas en las eASC preconditionadas**

Entendiendo que las moléculas en cuestión generan cambios en el comportamiento de las MSC, fue necesario evaluar el efecto que se generaba en las eASC al ser preconditionadas con PGE<sub>2</sub> y SP. Para ello se evaluó el patrón de marcadores de superficie de las eASC sometidas a medios condicionados con éstas moléculas. De modo general, el patrón inmunofenotípico de las eASC no se vio afectado por los tratamientos de preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP e IFN $\gamma$ , y fue similar a las células que no se sometieron a preconditionamiento (eASC virgen), de las cuales se discutió anteriormente. Esto está en línea con lo reportado previamente en MSC humanas por medio del preconditionamiento con pequeñas moléculas (Jahandideh et al., 2017) o en condiciones de hipoxia (Jiang et al., 2015), mientras que otros estudios, en los cuales las MSC fueron expuestas a ambientes inflamatorios, sí se vio un cambio en el patrón, pero a nivel de expresión génica de los marcadores mencionados (Barrachina et al., 2016).

Estudios previos han demostrado que las MSC pueden mantener sus propiedades biológicas *in vitro* posterior a un preconditionamiento, principalmente lo que se conoce como “*stemness*”, que engloba las propiedades inmunofenotípicas y de diferenciación de estas (Hu and Li, 2018). Reportándose por ejemplo, que la adición de TGF $\beta$  conduce a las MSC hacia la generación de osteoblastos *in vitro*, pero a su vez, se inhibe la diferenciación adipogénica (van Zoelen et al., 2016). Por otro lado, se ha visto que la adición de IL-1 y TNF $\alpha$  inhiben la osteogénesis y la adipogénesis en las MSC por medio de la activación de la señalización de Nf-kB (Sullivan et al., 2014). También se ha reportado que la adición de IL-1 $\beta$ , incrementa la diferenciación condrogénica en MSC, pero, cuando son sometidas a altas concentraciones de IL-1 $\beta$ , se reduce la adhesión celular y la pluripotencia de las MSC (Matsumura et al., 2017). También se ha demostrado que, bajo condiciones de hipoxia, las MSC no pierden su capacidad de diferenciación hacia estirpes osteogénicas y adipogénicas (Loftinia et al., 2015). Por otro lado, se ha visto que el preconditionamiento con medios con remplazo de suero, no altera la capacidad de diferenciarse hacia estirpes osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas (Periasamy et al., 2018). Específicamente en MSC derivadas de tejido adiposo, el preconditionamiento por períodos de 48 hrs con deferoxamina, no alteró la capacidad de diferenciarse hacia estirpes osteogénicas, adipogénicas (Oses et al., 2017), situación muy diferente a lo observado en nuestros resultados, que a pesar de que todas las eASC vírgenes y preconditionadas se diferenciaron a adipocitos,

se observó una diferencia significativamente mayor cuando estaban bajo el preconditionamiento de PGE<sub>2</sub>/SP.

Los resultados de este trabajo, indican que el preconditionamiento tanto con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP, SP e IFN $\gamma$  no alteran el patrón inmunofenotípico de las eASC ni la capacidad para diferenciarse a las estirpes anteriormente mencionadas, a excepción cuando se encuentra en presencia de IFN $\gamma$ , el cual genera una disminución en la capacidad de diferenciarse a osteoblastos.

### **Análisis de los transcriptos en las eASC preconditionadas**

A nivel transcriptómico, se evaluó la presencia de los ARN mensajeros de PGES, IL-6, IL-1, TNF $\alpha$  e IL-8. Previamente se ha visto que cuando las BM-MSC son preconditionadas con hipoxia y también en UC-MSC estimuladas con IL-1 $\beta$ , se genera un aumento de IL-6 e IL-8 (Fan et al., 2012; Chen et al., 2014). Otros reportes con preconditionamiento con LPS en UC-MSC, han demostrado una disminución de TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-1 (Carrero et al., 2012), pero estos corresponden a estimuladores preconditionantes tradicionales para inducir propiedades inmunes en las MSC. En cuanto a la PGE<sub>2</sub>, no existen reportes de preconditionamiento en MSC y si bien, en el caso de la SP hay reportes del efecto de esta en MSC (Jin et al., 2015), no se midió la expresión de las citoquinas que fueron evaluadas en este estudio. Por lo cual, este, correspondería al primer reporte del efecto transcriptómico en MSC preconditionadas con PGE<sub>2</sub>, SP y su combinación.

De todas formas, lo observado en nuestros resultados es concordante con lo reportado en el preconditionamiento con hipoxia e IL-1 $\beta$ , donde se vio un aumento de la transcripción de IL-6 e IL-8. Esto también se ha observado en MSC equinas al estimular TLR4 por medio de del uso de LPS (Cassano et al., 2017). Aun así, estos resultados son contradictorios respecto a lo reportado por Carrero (2012) en hBM-MSC, donde se observó una disminución de IL-1 $\beta$ , diferencia que puede estar dada por ser análisis realizados en MSC de diferentes especies. Sin embargo, según nuestros resultados las MSC sin preconditionar, de forma basal, expresan todos los transcriptos mencionados anteriormente.

## PROPIEDADES INMUNOLOGICAS DE LAS eASC

### Inhibición de PBMC activadas

Uno de los fenómenos generados por las MSC que se han observado *in vitro*, es inhibir la proliferación de linfocitos T, lo cual ha sido ampliamente reportado (Carrade et al., 2012; Tobin et al., 2012; Carrade et al., 2014; Niu et al., 2017). Distintos mediadores que participan en la inhibición de linfocitos T se han descritos para las MSC, como es el caso de PGE<sub>2</sub>, IDO, iNOS, TGFβ1, HGF y Hemoxigenasa-1 (Meisel et al., 2004; Aggarwal et al., 2005; Chabannes et al., 2007; Patel et al., 2010). En el caso de las MSC equinas es la PGE<sub>2</sub> quien participa en la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados (Carrade et al., 2014).

Esta inhibición mediada por las MSC, fue observada en este trabajo. Las eASC vírgenes generaron una marcada inhibición de la proliferación de los PBMC comparados con los PBMC activados con LPS. Lograron mantener la inhibición independientemente del tipo de preconditionamiento al que fueron expuestas las eASC o al mitógeno con el que fueron estimulados los PBMC vírgenes. Estos resultados, son consistentes con estudios previos donde han hallado que las MSC en presencia de estimulaciones inflamatorias, inhiben significativamente la proliferación de linfocitos T alogénicos (Carrade et al., 2012; Chen et al., 2010; Barminko et al., 2013; Hsu et al., 2013).

Es interesante observar que no en todos los tratamientos se obtuvo el mismo fenómeno, si bien todas las eASC inhibieron la proliferación de PBMC, el único tratamiento que indujo una marcada inhibición de PBMC respecto al efecto intrínseco de las eASC, fue el preconditionamiento con IFNγ, resultados similares han sido obtenidos previamente en otras investigaciones (Krenger et al., 1996; Klinker et al., 2017). Pero este efecto, solamente se dio bajo el estímulo del LPS en linfocitos bajos (de un animal sano), ya que, en linfocitos altos, no se observaron diferencias entre los tratamientos.

Mientras que, en un escenario diferente, bajo las mismas condiciones de preconditionamiento, pero con el estímulo de Poly I:C, sucedió una situación contraria a lo ocurrido en la estimulación con LPS. Se observaron diferencias entre los tratamientos respecto a las eASC vírgenes al momento de inhibir las poblaciones de linfocitos bajos y tampoco en linfocitos altos, pero aun así todas las eASC generaron inhibición de la proliferación de PBMC activados. Estos resultados concuerdan con las observaciones en ASC humanas, en las que la

estimulación con Poly I:C por 48 hrs, genera un efecto inhibitorio sobre los linfocitos T activados (Mancheño-Corvo et al., 2015). Este efecto está dado por un contacto directo con las MSC, las cuales conducen a una detención de la proliferación de los linfocitos T en la fase G0 del ciclo celular (Glennie et al., 2005) y solamente ocurre el fenómeno antiproliferativo, cuando los linfocitos T son activados. Mientras que, en un estado de quiescencia, las MSC solo apoyan la supervivencia de los linfocitos T (Benvenuto et al., 2007; Xu et al., 2007). Este contacto célula a célula, es bastante fuerte, ya que se ha observado que en sistemas de co-cultivos, los linfocitos T a las 4 hrs toman contacto con las MSC quedando atrapados junto a estas, por hasta 60 hrs (Suva et al., 2008). Algo no menor, es la especificidad del proceso por el cual las MSC logran inhibir la proliferación de los linfocitos T, demostrándose en MSC derivadas de tejido adiposo, que este sistema funciona siempre y cuando los linfocitos T sean diferentes de las MSC en cultivo (Quaedackers et al., 2009). Aun así, otros estudios en ratones, han demostrado que las MSC *in vivo*, no desencadenan una inhibición de la proliferación de los linfocitos T, situación que si observaron *in vitro* (Schurgers et al., 2010).

### **Inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y FOXP3<sup>+</sup>**

La habilidad de las MSC para generar una inducción hacia un fenotipo de linfocitos Tregs, ha sido ampliamente reportada tanto en humanos como en otras especies (Maccario et al., 2005; di Iani et al., 2008; English et al., 2009; Gonzales-Rey et al., 2012; Luz-Crawford et al., 2013; Khosravi et al., 2017a; Khosravi et al., 2017b). Los linfocitos Tregs son una sub-población de linfocitos T, que participan en fenómenos inmunosupresivos importantes para mantener la homeostasis inmunológica y la auto-tolerancia (Vignali et al., 2008; Ohkura et al., 2013) y que se producen a partir desde subpoblaciones de linfocitos T maduros en el timo o desde linfocitos Tn en la periferia (Sakaguchi et al., 2008; Wood et al., 2012).

En este trabajo, todos los tratamientos, incluyendo el control (eASC virgen), lograron inducir un cambio de fenotipo desde PBMC vírgenes hacia linfocitos Treg CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y FOXP3<sup>+</sup>, con porcentajes de positividad superiores a los PBMC controles (Tregs basales). Los PBMC controles, fueron medidos sin la presencia de eASC y mitógenos, lo cual ha sido observado en otros estudios previamente (Aggarwal and Pittenger, 2005; Ghannam et al., 2010; Kol et al., 2015; Yang et al., 2015).

Varios autores han reportado que IL-6 es el mayor regulador del balance Th17/Tregs (Kimura

and Kishimoto, 2010; Yan et al., 2015). Según nuestros resultados, las eASC sometidas a los tratamientos con PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>/SP, expresaron significativamente más IL-6 que el control a nivel transcriptómico, observándose un incremento de 0,5 fold change respecto al control. Junto a esto, también se ha reportado que los cambios en poblaciones de células inmunes, principalmente el fenómeno de inducción hacia células Tregs, se genera en un contexto en que las MSC deben estar en contacto directo célula a célula (Le Blanc, 2003; Gur-Wahnon et al., 2007). Ya que se ha visto que en condiciones de cultivo en un sistema de transwells, no se genera la inducción hacia células Treg (Nicola et al., 2002; English et al., 2009). Es la razón por la cual nuestros resultados provienen de experimentos realizados en un sistema de co-cultivo, donde las eASC se encontraban en contacto directo con las poblaciones de PBMC vírgenes (Luz-Crawford et al., 2013). Este mecanismo de contacto y la capacidad de las MSC humanas de expandir los linfocitos T hacia Treg, se ha visto que es dependiente del antígeno leucocitario humano G 5 (HLA-G5; Selmani et al., 2008).

Según los resultados obtenidos y contrastados con los resultados de la inhibición *in vitro* de la proliferación de PBMC (punto anterior), observamos que cuando las eASC fueron co-cultivadas con PBMC vírgenes provenientes desde un animal sano y estando bajo la estimulación de LPS y Poly I:C, junto a inducir un marcado cambio del fenotipo hacia Treg respecto al control, también generaron una marcada inhibición de la proliferación de PBMC. Esto no ocurrió en microambiente en donde se co-cultivaron con linfocitos altos, observándose que aquellos tratamientos que inhibieron pobremente la proliferación de PBMC, también tuvieron un bajo porcentaje en el cambio de fenotipo hacia Treg. Sin embargo, se ha visto que aparte del efecto contacto célula-célula, hay un efecto mediado por los factores solubles de las MSC humanas como TGFβ y PGE<sub>2</sub>, papel que no es redundante, pero contribuyen a la inducción de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> y FOXP3<sup>+</sup>, pero este es un efecto que requiere de un contacto previo con las MSC (English et al., 2009). A pesar de la evidencia existente respecto al papel que juega PGE<sub>2</sub> en este cambio de fenotipo, la adición de PGE<sub>2</sub> o su combinación con SP exógena al medio, no mejoró la producción de Treg en comparación con el efecto intrínseco de las eASC (eASC vírgenes). Sin embargo, se observó que hay cambios a nivel del patrón secretor de las eASC cuando son sometidas a un microambiente con PGE<sub>2</sub> o su combinación con SP exógena, que afectan procesos inmunológicos. Selmani y colaboradores (2007), demostraron que la proteína HLA-G5 (un miembro de la familia de los MHC de clase I), juega un rol importante en la supresión de linfocitos T y la polarización de los linfocitos T hacia

Treg, lo cual es esencial al momento del contacto célula- célula. En este sentido nuestras células eASC, mostraron una alta positividad al marcador de superficie MHC de clase I (genérico), lo cual podría ser en nuestro modelo uno de los causantes importantes del cambio de fenotipo de las PBMC vírgenes, junto a PGE<sub>2</sub> endógena.

### **Secretoma: inducción de factores paracrinos a través del preconditionamiento de las eASC**

Una de las maneras por las cuales se dan los fenómenos anteriormente mencionados, es por el efecto paracrino que ejercen las MSC sobre el sistema inmune (Ma et al., 2014; Seo and Jung, 2016; Saldaña et al., 2017). Estos corresponden a una parte muy significativa de su potencial efector, es por eso, que, en este trabajo, se estudió las proteínas que secretan las MSC, tanto en su estado virgen, como en condiciones preconditionantes a las que fueron expuestas, como PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP e IFN $\gamma$ .

Hay una variada evidencia que sugiere que modificaciones en el microambiente de las MSC podría mejorar el efecto terapéutico de estas, a través de la modificación de su secretoma (Vizoso et al., 2017). Dentro de estos estudios, se ha visto que, bajo condiciones de Hipoxia, se activan los factores inducibles por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), induciendo a su vez la expresión de factores angiogénicos como VEGF (Youn et al., 2011; Ahluwalia et al., 2012, Hawkins et al., 2013). En humanos se ha visto, a través de la adición de moléculas proinflamatorias al microambiente como IFN $\gamma$ , se logra estimular la producción deIDO, lo que potencia la acción inmunomoduladora de las MSC (Croitoru-Lamoury et al., 2011; Kang et al., 2012; Lin et al., 2012). Junto a esto, otros reportes han demostrado que existe un fenotipo diferente en dependencia del estímulo que se ejerza sobre la MSC, observándose que si la MSC es estimulada vía TLR4, la MSC se polariza hacia un fenotipo pro inflamatorio denominado MSC1, mientras que si se estimula vía TLR3, la MSC se polariza hacia un fenotipo inmunosupresivo conocido como MSC2, con patrones de expresión y secreción totalmente diferentes. Por medio de TLR3 se estimula la secreción de CCL10, CCL5, IL4 y IL-10, mientras que a través de la estimulación de TLR4, se aumenta la secreción de IL-6 y IL-8 (Waterman et al., 2010a; Waterman et al., 2010b). Por lo tanto, existe evidencia respecto a un cambio de fenotipo de la MSC en dependencia del microambiente y del estímulo que se ejerza sobre ella, lo cual sustenta lo que se conoce hoy sobre la MSC como una célula inmunomoduladora. Mientras que, bajo estímulos inflamatorios, como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ , se ha observado que hMSC, tienen una marcada expresión de genes como IDO e IL-6, mientras que TIMP2 y TGF $\beta$  se ven bajamente

expresados. Otros genes, como HGF, IL-1 $\beta$  y TIMP1 no mostraron diferencias entre células vírgenes y preconditionadas con las citoquinas mencionadas. También se ha visto que, se aumenta la secreción del factor H, lo cual se interpreta como un patrón secretor antiinflamatorio cuando las MSC se encuentra bajo condiciones inflamatorias (van Buul et al., 2012; Tu et al., 2012).

Por otro lado, se ha evaluado el efecto de un ambiente inflamatorio a través del preconditionamiento con IL-1B sobre poblaciones de MSC, donde se logró observar que en MSC derivadas de cordón umbilical, se genera un aumento en la expresión de COX-2, IL-6 e IL-8, la producción de CXCR4 y mejora la capacidad migratoria de las células *in vitro* (Fan et al., 2012). Mientras que en BM-MSC se ha observado que aumenta la expresión de TNF $\alpha$ , IL-6, IL-8, IL-23, CCL5, CCL20, CXCL1, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL10, CXCL11, moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 e ICAM4, aumenta la capacidad de reclutamiento de linfocitos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos, donde al parecer NF- $\kappa$ B jugaría un rol importante en este proceso (Carrero et al., 2012). Estas moléculas, tienen gran importancia por ejemplo en procesos de respuestas asociadas a la inmunidad innata, como es el caso del aumento en la migración de macrófagos (Chen et al., 2014) y a la vez, genera una disminución de las poblaciones de macrófagos con fenotipo M1 (Fan et al., 2012). Específicamente en el caso de TNF $\alpha$  e IL-1, estarían involucradas en la producción de proteínas de la fase aguda, con un consecuente reclutamiento de neutrófilos y expresión de moléculas de adhesión (O'Garra et al., 2007; Scheller et al., 2011).

Lamentablemente, muchos de estos estudios son evaluaciones a nivel de los transcritos utilizando la técnica de PCR y son muy pocos los análisis proteómicos o transcriptómicos disponibles para las MSC. Es por eso que es tan importante, estudiar el efecto del microambiente al que las MSC son expuestas y su relación con las proteínas que expresan, ya que el microambiente es el principal efector sobre el sistema inmune (Le Blanc et al, 2003). Muchos de los resultados obtenidos en nuestro estudio, tienen relación con lo reportado en la literatura para diferentes tipos de MSC y en diferentes especies en torno a su función sobre el sistema inmune (Le Blanc y Davies, 2015; Contreras et al., 2016; Zhao et al., 2016; Rivera –Cruz et al., 2017), con una participación de proteínas secretadas por las MSC en procesos y regulaciones del sistema inmune innato (Le Blanc y Davies, 2015) y en el sistema inmune adaptativo (Cao et al., 2015).

Por todo lo anterior, se decidió realizar un análisis de forma global respecto al perfil cualitativo de las proteínas secretadas por las eASC, con el fin de identificar directamente los factores secretados por este tipo de células en las diferentes condiciones a las que fueron sometidas

y su relación con procesos inmunológicos, específicamente con las regulaciones del sistema inmune. Como resultado, se hallaron patrones de secreción muy distintos entre el control y los tratamientos preconditionantes. Dado que la definición de secretoma es el subconjunto de proteínas secretadas activamente a partir de las células bajo determinadas condiciones (Bal et al 2013), es de esperar que existan cambios cuantitativos de las proteínas secretadas en los diferentes tratamientos aplicados, pero esto no ha sido analizado en nuestro estudio, el que se concentró principalmente en determinar el patrón cualitativo de secreción de las eASC bajo diferentes condiciones preconditionantes *versus* las eASC vírgenes.

### **Patrón secretor de las eASC**

La secreción de proteínas por parte de las MSC y las interacciones que estas forman, está influenciada por el microambiente, en este caso, las moléculas preconditionadoras. De especial interés para esta tesis, son aquellas proteínas relacionadas con funciones inmunes de las MSC y cómo estas son reguladas de modo positivo (RP) o negativo (RN), según las predicciones de la herramienta online de interacciones proteicas STRING. Las eASC secretan de modo constitutivo proteínas que regulan a la alza (RP) funciones del sistema inmune (grupo control). Este patrón se mantuvo incluso cuando las células fueron expuestas a PGE<sub>2</sub> o a IFN $\gamma$  y corresponde al término GO:0002684 del GO. Este término engloba a procesos involucrados en el funcionamiento del sistema inmune, que está preparado ante cualquier respuesta a amenazas internas o invasivas. Cuando las células fueron tratadas con la combinación de PGE<sub>2</sub>/SP, por el contrario, se activaron proteínas involucradas en la RN del mismo proceso (GO:0002683). Esto puede ser de gran valor para el futuro uso de moléculas preconditionantes en momentos o situaciones particulares en las cuales se requiera manipular a la alza o a la baja ciertos procesos relacionados con el sistema inmune de los equinos.

Cuando se evaluó el patrón secretor de las diferentes condiciones a las que estuvieron expuestas las eASC, observamos que las eASC vírgenes presentaron un patrón secretor relacionado principalmente con regulaciones del sistema del complemento, de la respuesta inflamatoria, procesos efectoros, de la respuesta de defensa y de la migración de linfocitos (Zachar et al., 2016). Una vez que fue agregada la estimulación con PGE<sub>2</sub> al cultivo de las eASC, se conservaron varias regulaciones de las eASC vírgenes, pero se perdieron regulaciones asociadas al sistema del complemento, sin embargo, se observaron nuevos tipos de regulaciones, como son la producción

y secreción de citoquinas y la quimiotaxis de linfocitos NK, situación que ha sido observada en MSC humanas (Cui et al., 2016). Cuando las eASC se sometieron a un acondicionamiento con la combinación de PGE<sub>2</sub> y SP, se observó que las proteínas secretadas abarcaron una mayor cantidad de regulaciones de los procesos inmunológicos. En términos numéricos, este microambiente generado por la combinación de ambas moléculas, fue el que indujo la secreción de una mayor cantidad de proteínas respecto a los demás tratamientos y al control, y como consecuencia, las proteínas estaban involucradas en una mayor cantidad de regulaciones inmunológicas. Las principales regulaciones en las que logró predecir la participación de estas proteínas por el GO en el sistema inmune, están asociadas a la respuesta de defensa, a procesos inflamatorios, a procesos efectoros del sistema inmune, a la producción y activación de citoquinas, a la quimiotaxis de linfocitos T y de linfocitos NK. Al igual que lo ocurrido con la estimulación con PGE<sub>2</sub>, en este tratamiento, se encontraron, en menor proporción, proteínas que están involucradas en regulaciones del sistema del complemento, las que, si fueron observadas en las eASC vírgenes, lo cual es interesante, ya que se ha reportado previamente que el complemento participa en el reconocimiento y rechazo de las MSC después de la infusión y es activado por ellas (Li y Lin, 2012). El hecho de que estos tratamientos reduzcan o inhiban parte de la maquinaria del complemento, es atractivo desde el punto de vista terapéutico con células alogénicas.

Varias de las proteínas que fueron detectadas en la secreción de todos los tratamientos y el control, regulan de manera negativa procesos asociados al sistema del complemento, como C1QTNF3, C7, CFHR4, CFI, SERPINF1, SERPING1, SERPINA7, mientras que la proteína SERPINA1 se compartía en la secreción del tratamiento con PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>/SP y también entre el tratamiento de IFN $\gamma$  y control, la proteína SERPINA1 también se encontraba compartida entre el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP e IFN $\gamma$ , mientras que la proteína C1S solo fue detectada en el secretoma del control. Se ha reportado previamente que estas proteínas tienen una participación en procesos asociados al sistema del complemento, principalmente regulando la activación de la cascada del complemento (Beinrohr et al., 2011; Mika et al., 2012; Skerka et al., 2013; Turner et al., 2015; Xue et al., 2017).

Otra de las regulaciones que se vieron mayormente sobre reguladas, son las que tienen relación con la atracción e inducción de efectos sobre poblaciones celulares vinculadas en gran parte con el sistema inmune adaptativo, donde se detectó un conjunto de citoquinas y quimoquinas entre los diferentes secretomas de los tratamientos y el control, las cuales están, según lo reportado

por otros autores, involucradas en regulaciones positivas de la quimiotaxis (Nagpal et al., 1997; Weissenbach et al., 2004; Arndt et al., 2005; Huang et al., 2010; Le Blanc and Davies, 2015; Jovic et al., 2016; Lee et al., 2017). Varias de estas se compartían entre los secretomas de los diferentes tratamientos como CXCL6 y CCL7. Por otro lado, RARRES2 es una proteína que fue secretada bajo los tratamientos de PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP y en el control, SERPINE1 en los tratamientos de PGE<sub>2</sub>/SP, IFN $\gamma$  y el control, CCL2 en los tratamientos de PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>/SP.

También se detectaron en todos los tratamientos y el control, proteínas secretadas que participaban de manera negativa en las regulaciones de la quimiotaxis como CDH13, RBP4, APOH, AGT, FBLN1, SPARC, SERPINF1 y GPLD1, tal como ha sido demostrado por otros autores previamente. Otras proteínas, como GFBP5, PTGDS y NDRG2 fueron secretadas de manera compartida entre los tratamientos PGE<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>/SP. La proteína TIMP2 que se compartió con PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>/SP y el control, corresponde a una proteína que se han visto previamente secretadas por las MSC, pero sin estar asociadas a procesos del SI (Andersen et al., 2015; Holley et al., 2015; Yoon et al., 2016; Dostert et al., 2017; Eslani et al., 2017; Takigawa et al., 2017; Chang et al., 2018). La proteína ERBB2 estaba compartida entre los tratamientos de PGE<sub>2</sub>/SP y el control, mientras que la proteína IL-6 solo fue detectada bajo el tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP. Esta situación es interesante, ya que se ha reportado previamente que IL-6 es dependiente de la secreción de PGE<sub>2</sub>, pero como se mencionó previamente, IL-6 solo fue secretada en presencia de SP (Bouffi et al., 2010). Estos procesos prácticamente se vieron ausentes con una marcada regulación a la baja cuando las eASC estaban bajo el efecto de IFN $\gamma$ , a pesar de que se han reportado una serie de proteínas secretadas por las MSC para esta regulación,

En nuestro estudio, la adición de SP al medio preconditionante, generó la mayor desregulación en la expresión de proteínas involucradas en procesos inmunológicos. Si bien la PGE<sub>2</sub> por sí sola genera un cambio en el patrón secretor de las eASC hacia un fenotipo inmunomodulador, la mayor participación de proteínas en procesos inmunes fue detectada cuando estaban en presencia SP. Esto concuerda con lo reportado por otros autores con respecto al rol clave de la SP en la migración celular a través de la inducción de varias citoquinas, receptores y moléculas de adhesión (Ahluwalia et al., 1998; Mashaghi et al., 2016). Se ha visto también que SP estimula la migración de neutrófilos (Ahluwalia et al., 1998) y recluta leucocitos hacia terminales de nociceptores periféricos (Ren y Dubner, 2010).

De gran relevancia fueron las proteínas LYZ, B2M, MIF y IL-6, presentes en el

precondicionamiento de PGE<sub>2</sub>/SP y que estaban ausentes en el resto de los tratamientos y en las eASC vírgenes. Se ha reportado previamente que tanto la PGE<sub>2</sub> como la SP contribuyen en varios aspectos de la defensa antimicrobiana (Allaker et al., 1999; Kowalska et al., 2002; El Karim et al., 2008; Lin et al., 2016). También SP induce la secreción de citoquinas proinflamatorias, quimioquinas, metabolitos del ácido araquidónico que resultan ser claves en células inmunes como leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, macrófagos y células no inmunes como células mononucleares de sangre periférica y líneas de células epiteliales (Lorenz et al., 1998; Cuesta et al., 2002; Wong et al., 2005; Kulka et al., 2008; Yaranee et al., 2009; Gallicchio et al., 2009; Kulka et al., 2008). Si bien para las MSC no se han descrito funciones antibacterianas inducidas a través de SP, está descrito que en BM-MS, la SP potencia las propiedades inmunomoduladoras (Jin et al., 2015). Por otro lado, se ha reportado que PGE<sub>2</sub> tiene un fuerte vínculo con la señalización de STAT3, generándose un ciclo de retroalimentación positiva entre el eje COX-2/PGE<sub>2</sub> y la señalización de STAT3 (Lin et al., 2016). Previamente se había demostrado que existe una regulación de COX-2 vía TLR4 (Fukata et al., 2004; Weinlich et al., 2008). También se ha reportado que PGE<sub>2</sub> amortigua la respuesta inmune que desencadenan los macrófagos alveolares, al inhibir eventos de señalización de los receptores de reconocimiento de patrones como lo es el TLR4 (Degraaf et al 2014), por lo cual, todo indica que la PGE<sub>2</sub> juega un rol importante en la inmunidad innata.

Dentro de las proteínas que fueron inducidas por el tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP, hubo proteínas con funciones antibacterianas, con participación en la presentación de antígenos y en la producción y secreción de interleuquinas y citoquinas. Dentro de las proteínas antibacterianas, encontramos la proteína Lisozima C (LYZ), que corresponde a una enzima involucrada en la inmunidad innata, la cual tiene roles de defensa contra bacterias generando una hidrólisis de la pared de peptidoglicanos (Callewaert et al., 2010). Es una proteína que se encuentra presente en abundancia en los mamíferos, en sangre e hígado y en fluidos como las lágrimas, la orina, la saliva y la leche, como también en superficies corporales. Principalmente se ha descrito su secreción en macrófagos, neutrófilos y células dendríticas (Callewaert et al., 2010; Lelouard et al., 2010). Hay una amplia evidencia respecto al efecto antibacteriano de las MSC, con efectos beneficiosos en el tratamiento de sepsis inducida por bacterias (Eiro et al., 2007; Gupta et al., 2007; Gonzales-Rey et al., 2009; Nemeth et al., 2009; Mei et al., 2010), como también el efecto bactericida que tienen las hUCESC-CM sobre *E. Coli* y *S. epidermidis* (Beer et al., 2017). Aun así, hasta la fecha no se ha descrito esta

proteína como parte de la secreción de las MSC, por lo que nuestros hallazgos de la proteína LYZ en el secretoma de las eASC gatillada por el preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> y SP, correspondería al primer reporte de este hallazgo.

Otra proteína de interés corresponde a B2M, la cual es una proteína de bajo peso molecular, que puede estar presente en forma sérica secretable o en asociación con la cadena  $\alpha$  del MHC de clase I en la superficie celular (Peranau et al., 1990). Dado que forma parte de manera fisiológica del MHC de clase I, es que se ha utilizado como un gen “*housekeeping*” para el análisis de transcritos (Berko et al., 2005; Matsuzaki et al., 2015; Nazari et al., 2015). Al ser parte del MHC de clase I, también juega un rol en la presentación de antígenos (Cooper and Plesner, 1980), pero cuando B2M es un metabolito, que está presente de forma libre en los fluidos, no se sabe claramente cuál es su función, sin embargo, se ha reportado un nuevo rol antibacteriano de B2M (Kim et al., 2012; Chiou et al., 2016). Nuestros resultados al igual que otros realizados en células epiteliales, muestran que B2M solo se expresa y secreta bajo condiciones determinadas, algunos estudios lo han demostrado a través de la exposición a patógenos, observando un aumento del ARNm de b2m (Kim et al., 2012). En este trabajo, se observó la presencia de esta proteína secretada en el sobrenadante de las eASC expuestas únicamente al tratamiento de PGE<sub>2</sub>/SP. De este modo, al parecer la combinación de PGE<sub>2</sub> y SP generó en las eASC un efecto antibacteriano inducido, lo cual es novedoso y de potencial relevancia para futuras perspectivas terapéuticas.

MIF corresponde a otra proteína que fue secretada de forma diferencial en las eASC expuestas a PGE<sub>2</sub>/SP. La proteína MIF es una citoquina pleiotrópica que se ha reportado su expresión en diversos tipos celulares como macrófagos y monocitos, células musculares de vasos sanguíneos y cardiomiocitos (Calandra et al., 1994; Burger-Kentischer et al., 2002; Willis et al., 2005). Sin embargo, se ha observado que las MSC expresan y secretan altos niveles de MIF bajo condiciones de hipoxia al compararlas con células en normoxia, mostrando potentes efectos protectivos sobre las MSC contra los efectos de la hipoxia, actuando como un agente anti-apoptótico a través de la vía de señalización dependiente de CD74 (Xia et al., 2015).

Por último, la citoquina IL-6, corresponde a otra proteína de gran relevancia que fue detectada únicamente en el secretoma del tratamiento con PGE<sub>2</sub>/SP y según las predicciones del GO, indican amplios efectos sobre las regulaciones de procesos inmunológicos (Tanaka et al., 2014). Según nuestros resultados, las eASC en un estado virgen no secretan IL-6, lo cual sí se ha visto en MSC de otras especies, como en MSC de humanos (Gu et al., 2015; Deng et al., 2016; Mi

and Gong, 2017) y en ratones (Huh and Lee., 2013). Es de interés, que, en nuestro trabajo, sí se encontró el RNAm de IL-6 en todos los tratamientos y en las eASC vírgenes, lo cual también ha sido reportado por otros autores en la especie equina (Paterson et al., 2014; Carrade et al., 2014). Cuando las eASC estuvieron bajo el estímulo de PGE<sub>2</sub>/SP, sí se detectó IL-6 secretable, lo cual no ocurrió cuando las eASC estuvieron bajo el preconditionamiento con PGE<sub>2</sub>, por lo que aparentemente, la adición de SP resultaría ser el detonante que contribuye a que las eASC adquieran una actividad inmunoreguladora incrementada. La función más conocida de la IL-6 es la de una citoquina proinflamatoria, reportándose que al interactuar con IL-1 y TNF $\alpha$  se induce a la secreción de proteínas de la fase aguda, reclutamiento de neutrófilos y estimula la proliferación de linfocitos T (Xing et al., 1998; Scheller et al., 2011). De manera conjunta con IL-4 participa en la generación de linfocitos Th2 (Scheller et al., 2011) y también se ha reportado su participación en la respuesta humoral (Benihoud et al., 2000). Pero recientemente se ha reportado la participación de IL-6 como una citoquina con funciones anti-inflamatorias al regular el balance de Th17 e inducción de Treg (Kimura and Kishimoto, 2010; Yan et al., 2015), ya sea interactuando con TGF $\beta$  y generando Th17 (Veldhoen et al., 2006) o a través de la inhibición de TGF $\beta$  e así induciendo Treg (Mangan et al., 2006). Pero, aun así, no sería la molécula responsable de inhibir la proliferación de linfocitos T, ya que se ha visto en otros estudios en MSC equinas, que al bloquear IL-6, no se logra revertir el arresto proliferativo de los linfocitos T (Carrade et al., 2014).

Los resultados de este trabajo muestran que las eASC en su estado virgen son capaces de generar un efecto inmunomodulador, lo cual se condice con el uso reportado para ellas en terapias alogénicas, no obstante, el fenotipo y patrón de secreción de proteínas involucradas en funciones inmunes son distintos al de las células preconditionadas *in vitro*. De gran interés resulta el uso de PGE<sub>2</sub> como molécula preconditionadora, ya que ésta ha sido identificada como la mediadora clave de la inmunomodulación en células madre mensesquimales equinas. Sin embargo, en este trabajo se demostró que la PGE<sub>2</sub> *per se*, al parecer, no juega ese papel tan decidor en la inducción de un patrón inmunomodulador. El uso combinado de PGE<sub>2</sub> y Sustancia P, sí generó una respuesta inmunomoduladora potente en los ensayos realizados.

De igual modo, en este trabajo se demostró que, si bien existe un efecto basal de inhibición de la proliferación de PBMC activados y una inducción de Tregs, por la célula virgen, el mayor efecto se logra al combinar PGE<sub>2</sub> y Sustancia P, obteniendo resultados incluso por encima del IFN $\gamma$ , considerado para MSC humanas y murinas el “estándar de oro” en la inducción de un

fenotipo inmunomodulador (“immunological licensing”).

Por lo anterior estos resultados retan el estado del arte actual referente a la adquisición de dicho fenotipo en células MSC equinas, y abren las puertas para estudiar más a fondo este fenómeno para dicha especie. Concretamente, se propone que la combinación de  $PGE_2$  y Sustancia P, y no IFN $\gamma$  pudieran ser el verdadero “estándar de oro” en la inmunomodulación de MSC equinas.

Se sugiere el preconditionamiento de MSC con esta combinación para el tratamiento de enfermedades autoinmunes y para el uso en terapias regenerativas alogénicas.



# CONCLUSIÓN



- 1) El aislamiento de células madre mesenquimales a partir de tejido adiposo se logró de una manera simple, reproducible y las células aisladas se adhirieron a la superficie de la placa de cultivo, migraron, se diferenciaron al tri-linaje y expresaron un patrón inmunofenotípico de MSC, cumpliendo con las características biológicas de una MSC.
- 2) Se demostró mediante PCR la expresión diferencial de genes cruciales de mediadores de la actividad inmunomoduladora.
- 3) El preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> y SP, resultó en una mejora en la capacidad de las eASC para inhibir la proliferación de PBMC activados y para inducir a un cambio en el fenotipo Treg (CD4, CD25 y FOXP3)<sup>+</sup>.
- 4) El preconditionamiento con PGE<sub>2</sub> y SP, resultó ser la mejor condición para inducir un licenciamiento inmunológico *in vitro* de las eASC, mientras que el preconditionamiento canónico con IFN $\gamma$ , resultó generar una menor capacidad de adquirir un licenciamiento inmunológico.
- 5) Se demostró y se describieron por primera vez para las eASC, los patrones de secreción de proteína bajo estas condiciones preconditionantes, resultando en un cambio del patrón secretor bajo el estímulo de PGE<sub>2</sub> y SP.

# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Aggarwal, S. 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822.
- Ahluwalia, A., C. De Felipe, J. O'Brien, S. P. Hunt, M. Perretti. 1998. Impaired IL-1 $\beta$ -induced neutrophil accumulation in tachykinin NK1 receptor knockout mice. *Br J Pharmacol*. 124:1013–1015.
- Ahluwalia, A., A. S. Tarnawski. 2012. Critical role of hypoxia sensor-HIF-1 $\alpha$  in VEGF gene activation. Implications for angiogenesis and tissue injury healing. *Curr. Med. Chem.* 19:90–97
- Akiyama, K., C. Chen, D. Wang, X. Xu, C. Qu, T. Yamaza, S. Shi. 2012. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell*, 10(5), 544–55.
- Akpınar, G., M. Kasap, A. Aksoy, G. Duruksu, G. Gacar, E. Karaoz. 2014. Phenotypic and Proteomic Characteristics of Human Dental Pulp Derived Mesenchymal Stem Cells from a Natal, an Exfoliated Deciduous, and an Impacted Third Molar Tooth. *Stem Cells Int.* 2014:457059.
- Alipour, F., A. Parham, H. Kazemi Mehrjedi, H. Dehghani. 2015. Equine Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotype and Growth Characteristics, Gene Expression Profile and Differentiation Potentials. *Cell J.* 16(4):456–65.
- Alipour, R., F. Sadeghi, B. Hashemi-Beni, S. H. Zarkesh-Esfahani, F. Heydari, S. Behrouz Mousavi, N. Esmail. 2010. Phenotypic characterizations and comparison of adult dental stem cells with adipose-derived stem cells. *International Journal of Preventive Medicine*, 1(3), 164–171.
- Allaker, R. P., C. Zihni, S. Kapas. 1999. An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 23:289–293.
- Almeida, K., A. Campa, M. Alonso-Vale, F. Lima, E. Daud, I. Stocchero. 2008. Stromal vascular fraction from fat tissue: obtaining stem cells and their yield according to the topography of the donor areas: previous note, 34.
- Amable, P. R., M. V. T. Teixeira, R. B. V. Carias, J. M. Granjeiro, R. Borojevic. 2014. Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biology*, 15(1), 1–10.
- Andersson, E. R., R. Sandberg, U. Lendahl. 2011. Notch signaling: simplicity in design, versatility in function. *Development (Cambridge, England)*, 138(17), 3593–3612.
- Andersen, R. K., W. Zaher, K. H. Larsen, N. Ditzel, K. Drews, W. Wruck, J. Adjaye, B. M. Abdallah, M. Kassem. 2015. Association between in vivo bone formation and ex vivo migratory capacity of human bone marrow stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 6:196
- APHIS. 2001. National Economic Cost of Equine Lameness, Colic, and Equine Protozoal Myeloencephalitis (EPM) in the United States, (October), 1–3. Retrieved from [http://www.aphis.usda.gov/animal\\_health/nahms/equine/downloads/equine98/Equine98\\_is\\_EconCost.pdf](http://www.aphis.usda.gov/animal_health/nahms/equine/downloads/equine98/Equine98_is_EconCost.pdf)
- Arai, F., O. Ohneda, T. Miyamoto, X. Q. Zhang, T. Suda. 2002. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *The Journal of Experimental Medicine*, 195(12), 1549–1563.
- Arndt, P. G., S. K. Young, G. S. Worthen. 2005. Regulation of Lipopolysaccharide-Induced Lung Inflammation by Plasminogen Activator Inhibitor-1 through a JNK-Mediated Pathway. *J Immunol*, 175 (6) 4049–4059
- Arufe, M. C. 2011. Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World Journal of Orthopedics*, 2(6), 43.
- Asari, S., S. Itakura, K. Ferreri, C. P. Liu, Y. Kuroda, F. Kandeel, Y. Mullen. 2009. Mesenchymal stem cells suppress B-cell terminal differentiation. *Experimental Hematology*, 37(5), 604–15.
- Baglio, S. R., K. Rooijers, D. Koppers-Lalic, F. J. Verweij, M. Pérez Lanzón, N. Zini, D. M. Pegtel. 2015. Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), 127.
- Baraniak, P. R., T. C. McDevitt. 2010. Stem cell paracrine actions and tissue regeneration. *Regenerative medicine*. 5(1):121–143.
- Barberini, D. J., N. P. P. Freitas, M. S. Magnoni, L. Maia, A. J. Listoni, M. C. Heckler, R. M. Amorim. 2014. Equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue and umbilical cord: immunophenotypic characterization and differentiation potential. *Stem Cell Research & Therapy*, 5(1), 25.
- Barminko, J., A. Gray, T. Maguire, R. Schloss y M. L. Yarmush. 2013. Mesenchymal stromal cell mechanisms of immunomodulation and homing. In: *Mesenchymal Stem Cell Therapy*. LG Chase, MC Vemuri, and K Turksen, eds. Humana Press, New York. pp 15–38.
- Bassi, Ê. Ê. J., C. Alberto, M. Aita, N. Olsen, S. Câmara, C. D. C. Biológi, N. Câmara. 2011. Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World Journal of Stem Cells*, 3(1), 1–8.

- Beederman, M., J. D. Lamplot, G. Nan, J. Wang, X. Liu, L. Yin, T. C. He. 2013. BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 06(08), 32–52.
- Beinrohr, L., A. Thomas, L. Dyksterhuis, P. Zavodszky, P. Gal, N. R. Pike, L. C. Wijeyewickrema. 2011. Serpins and the Complement System. *Methods Enzymol.*;499:55-75.
- Benichou, G., Y. Yamada, S. H. Yun, C. Lin, M. Fray, G. Tocco. 2011. Immune recognition and rejection of allogeneic skin grafts. *Immunotherapy*, 3(6), 757–770.
- Benihoud, K., B. Salone, S. Esselin, P. Opolon, V. Poli, M. Di Giovine, M. Perricaudet, I. Saggio. 2000. The role of IL-6 in the inflammatory and humoral response to adenoviral vectors. *J Gene Med.* 2: 194-203
- Benvenuto, F., S. Ferrari, E. Gerdoni, F. Gualandi, F. Frassoni, V. Pistola, G. Mancardi, A. Ucceli. 2007. Human mesenchymal stem cells promote survival of T cells in a quiescent state. *Stem Cells*, vol. 25, no. 7, pp. 1753–1760.
- Berko, D., Y. Carmi, G. Cafri, S. Ben-Zaken, H. M. Sheikhet, E. Tzehoval, L. Eisenbach, A. Margalit, G. Gross. 2005. Membrane-anchored beta 2-microglobulin stabilizes a highly receptive state of MHC class I molecules. *Journal of immunology.* 174, 2116–2123.
- Berman, D. M., M. A. Willman, D. Han, G. Kleiner, N. M. Kenyon, O. Cabrera, N. S. Kenyon. 2010. Mesenchymal stem cells enhance allogeneic islet engraftment in nonhuman primates. *Diabetes*, 59(10), 2558–68.
- Berry-Miller, S. E. 2012. Continued Use of Unproven Stem Cell Therapies in the Clinic: The Need for Controlled Studies that Demonstrate Efficacy and Preclinical Studies to Optimize Treatment. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 03(04), 3–5.
- Bouffi, C., C. Bony, G. Courties, C. Jorgensen, D. Noël. 2010. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*, 5(12), e14247.
- Boujtita, N. 2008. Separation of PBMCs from Blood Samples Using the New Thermo Scientific Benchtop 1-Liter Centrifuge. *Thermo Fisher Scientific*, 6–8.
- Bravo, M., J. M. Moraes, C. B. S. Dummont, R. R. Filgueiras, H. H. Hashimoto, R. F. Godoy. 2012. Isolation, expansion and characterization of equine adipose tissue derived stem cells. *Ars Veterinaria*, 28(2), 66–74.
- Breakefield, X. O., R. M. Frederickson, R. J. Simpson. 2011. Gesicles: Microvesicle “Cookies” for Transient Information Transfer Between Cells. *Molecular Therapy*, 19(9), 1574–1576.
- Bouffi, C., C. Bony, G. Courties, C. Jorgensen, D. Noël. 2010. IL-6-Dependent PGE2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells Inhibits Local Inflammation in Experimental Arthritis. *PLoS ONE*, 5(12), e14247.
- Bunnell, B., M. Flaata, C. Gagliardi, B. Patel, C. Ripoll. 2008. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. *Methods*, 45, 115–120.
- Burlacu, A., G. Grigorescu, A. M. Rosca, M. B. Preda, M. Simionescu. 2012. Factors Secreted by Mesenchymal Stem Cells and Endothelial Progenitor Cells Have Complementary Effects on Angiogenesis In Vitro. *Stem Cells and Development*, 22(4), 121019095328006.
- Cabezas, J., E. Lara, P. Pacha, D. Rojas, D. Veraguas, F. Saravia, Ll. Rodriguez-Alvarez, F. O. Castro. 2014. The endometrium of cycling cows contains populations of putative mesenchymal progenitor cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 49(4), 550–559.
- Calhoun, J. D., R. R. Rao, S. Warrenfeltz, R. Rekaya, S. Dalton, J. McDonald, S. L. Stice. 2004. Transcriptional profiling of initial differentiation events in human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 323(2), 453–464.
- Callegari, E. A. 2016. Shotgun Proteomics Analysis of Estrogen Effects in the Uterus Using Two-Dimensional Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 1366:131-148
- Callewaert, L., C. W. Michiels. 2010. Lysozymes in the animal kingdom. *J Biosci.* 35(1):127–60.
- Cannon, B. 2004. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. *Physiological Reviews*, 84(1), 277–359.
- Cao, W., K. Cao, J. Cao, Y. Wang, Y. Shi. 2015. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunology Letters* 168, 147–153
- Caplan, A. 1991. Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–50.
- Carrade, D. D., M. W. Lame, M. S. Kent, K. C. Clark, N. J. Walker, D. L. Borjesson. 2012. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult-derived mesenchymal stem cells. *Cell Med.* 4:1–11.
- Carrade, D. D., J. A. Wood, J. L. Granick, N. J. Walker, K. C. Clark, D. L. Borjesson. 2014. Equine Mesenchymal Stem Cells Inhibit T Cell Proliferation Through Different Mechanisms Depending on Tissue Source. *Stem cells and development.* 23, 11

- Carrade, D., M. Lame, M. Kent, K. Clark, N. Walker, D. Borjesson. 2012. Comparative analysis of the immunomodulatory properties of equine adult derived msc. *Cell Med*, 4(1), 1–11.
- Carrade, D., D. Owens, D. Galuppo, A. Vidal, L. Ferraro, F. Librach, L. Borjesson. 2011. Clinicopathologic findings following intra-articular injection of autologous and allogeneic placentally derived equine mesenchymal stem cells in horses. *Cytotherapy*, 13(4), 419–30.
- Carrero, R., I. Cerrada, E. Lledó, J. Dopazo, F. Garcia-Garcia, M. P. Rubio, C. Trigueros, A. Dorronsoro, A. Ruiz-Sauri, J. A. Montero, P. Sepulveda. 2012. IL1 induces mesenchymal stem cells migration and leucocyte chemotaxis through NF- B. *Stem Cell Reviews and Reports*. 8, 3, 905–916.
- Carvalho, A., A. Yamada, M. A. Golim, L. Alvarez, L. Jorge, M. Conceição, A. L. G. Alves. 2013. Characterization of mesenchymal stem cells derived from equine adipose tissue. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria E Zootecnia*, 65, 939–945.
- Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury, J. Demengeot. 2003. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide. *Journal of Experimental Medicine*. 197:4, 403–411.
- Castro, F. O., A. Torres, J. Cabezas, L. Rodriguez-Alvarez. 2014. Combined use of platelet rich plasma and vitamin C positively affects differentiation in vitro to mesodermal lineage of adult adipose equine mesenchymal stem cells. *Res Vet Sci*. 96(1):95-101.
- Chabannes, D, M. Hill, E. Merieau, J. Rossignol, R. Brion, J. P. Soulilou, I. Anegon, M. C. Culturi. 2007. A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*. 110:3691–4.
- Chabannes, D., M. Hill, E. Merieau, J. Rossignol, J. P. Soulillou, I. Anegon, M. C. Cuturi. 2007. Brief report A role for heme oxygenase-1 in the immunosuppressive effect of adult rat and human mesenchymal stem cells. *Blood*, 110(10), 3691–3694.
- Chang, P., B. Zhang, L. Shao, W. Song, W. Shi, L. Wang, T. Xu, S. Li, X. Gao, Y. Qu, L. Dong, J. Wang. 2018. Mesenchymal stem cells over-expressing cxcl12 enhance the radioresistance of the small intestine. *Cell Death & Disease* volume. 9:154
- Chalasani, G., Q. Li, B. T. Konieczny, L. Smith-Diggs, B. Wrobel, Z. Dai, F. G. Lakkis. 2004. The allograft defines the type of rejection (acute versus chronic) in the face of an established effector immune response. *Journal of Immunology*. 172(12), 7813–7820.
- Chancellor-Freeland, C., G. F. Zhu, R. Kage, D. I. Beller, S. E. Leeman, P. H. Black. 1995. Substance P and stress-induced changes in macrophages. *Ann N Y Acad Sci*. 771:472-84.
- Chen, K., D. Wang, W. T. Du, Z. B. Han, H. Ren, Y. Chi, S. G. Yang, D. Zhu, F. Bayard, Z. C. Han. 2010. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol* 135:448–458.
- Chen L., Y. Xu, J. Zhao, Z. Zhang, R. Yang, J. Xie, X. Liu, S. Qi. 2014. Conditioned medium from hypoxic bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhances wound healing in mice. *PLoS One*. 9(4):e96161
- Chen, G., A. Yue, Z. Ruan, Y. Yin, R. Wang, Y. Ren, L. Zhu. 2014. Human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells do not undergo malignant transformation during long-term culturing in serum-free medium. *PLoS ONE*, 9(6), 1–8.
- Cheng, D., Y. Tsai, Y. Hsu, M. Hou, E. Tsai, J. Wang, P. Kuo. 2014. Cluster of differentiation  $\text{CD}45$  activation is crucial in interleukin-10-dependent tumor-associated dendritic cell differentiation. *Oncology Letters*, (20), 620–626.
- Chiou, S. J., C. C. Wang, Y. S. Tseng, Y. J. Lee, S. C. Chen, C. H. Chou, L. Y. Chuang, Y. R. Hong, C. Y. Lu, C. C. Chiu, M. Chingnard. 2016. A novel role for  $\beta$ 2-microglobulin: a precursor of antibacterial chemokine in respiratory epithelial cells. *Sci Rep*. 6:31035
- Choo, S. Y. 2007. The HLA system: Genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Medical Journal*, 48(1), 11–23.
- Chow, K. S., D. Jun, K. M. Helm, D. H. Wagner, S. M. Majka. 2011. Isolation & characterization of Hoechst(low) CD45(negative) mouse lung mesenchymal stem cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (56), e3159.
- Chung, H. J., H. S. Chi, Y. U. Cho, E. H. Lee, S. Jang, C. J. Park, E. J. Seo. 2007. Prognostic effect of cytoplasmic CD79a expression in acute myeloid leukemia with t(8;21). *The Korean Journal of Laboratory Medicine*, 27(6), 388–393.
- Ciria, M., N. A. Garcia, I. O. Oviedo, H. Gonzales-King, R. Carrero, J. L. De la Pompa, J. A. Montero, P. Sepulveda. 2017. Mesenchymal Stem Cell Migration and Proliferation Are Mediated by Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Upstream of Notch and SUMO Pathways. 26:13.

- Colter, D. C., R. Class, C. M. DiGirolamo, D. J. Prockop. 2000. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3213–3218.
- Condic, M. 2014. Confusions About Totipotency: Stem Cells Are Not Embryos | Public Discourse. Retrieved December 14, 2015, from <http://www.thepublicdiscourse.com/2014/03/12361/>
- Condic, M. L. 2014. What It Is and What It Is Not. *Stem Cells and Development*, 23(8), 10–10.
- Cooper, E. H., T. Plesner. 1980. Beta-2-microglobulin review: its relevance in clinical oncology. *Med Pediatr Oncol*. 23: 247–249
- Corcione, A., F. Benvenuto, E. Ferretti, D. Giunti, V. Cappiello, F. Cazzanti, A. Uccelli. 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Multiple Sclerosis*, 107(1), 367–372.
- Cuesta, M. C., L. Quintero, H. Pons, H. Suarez-Roca. 2002. Substance P and calcitonin gene-related peptide increase IL-1 beta, IL-6 and TNF alpha secretion from human peripheral blood mononuclear cells. *Neurochem. Int*. 40:301–306.
- Cui, R., H. Rekasi, M. Hepner-Schefczyk, K. Fessmann, R. M. Petri, K. Bruderek, S. Brandau, M. Jäger y S. B. Flohé. 2016. Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Res Ther*. 7: 88.
- Da-Ae, Y., H. Jin, K. Byung-Soo. 2012. Stimulation of chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 5(1), 16–22.
- Dalloul, A. 2013. B-cell-mediated strategies to fight chronic allograft rejection. *Frontiers in Immunology*, 4(DEC), 1–8.
- Dani, C., y N. Billon. 2012a. *Adipose Tissue Biology*. *Adipose Tissue Biology*, 1–17.
- Dani, C., y N. Billon. 2012b. *Adipose Tissue Biology*, 1–17.
- De Becker, A., I. Van Riet. 2006. Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy?. *World J Stem Cells*. 8(3): 73-87
- De Mattos Carvalho, A., A. L. G. Alves, M. A. Golim, A. Moroz, C. A. Hussni, P. G. G. de Oliveira, E. Deffune. 2009. Isolation and immunophenotypic characterization of mesenchymal stem cells derived from equine species adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 132(2-4), 303–306.
- De Mattos Carvalho, A., A. L. G. Alves, P. G. G. De Oliveira, L. E. Cisneros Álvarez, R. L. Amorim, C. A. Hussni, E. Deffune. 2011. Use of Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells for Experimental Tendinitis Therapy in Equines. *Journal of Equine Veterinary Science*, 31(1), 26–34.
- Defelitto, J. R., A. H. Cariello. 2011. *Cirugia: bases clínicas y terapéuticas*. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de La Plata. 3. 411-471
- Del Bue, M., S. Riccò, R. Ramoni, V. Conti, G. Gnudi, S. Grolli. 2008. Equine adipose-tissue derived mesenchymal stem cells and platelet concentrates: their association in vitro and in vivo. *Veterinary Research Communications*, 32 Suppl 1(S1), 51–55.
- Deloitte, L. L. 2005. The economic impact of the horse industry on the United States. In: LL Deloitte (ed). National Consulting. American Horse Council.
- Delves, P., and Roitt, I. 2000. First of Two Parts three levels of defense. *N Engl J Med*. 37–50.
- Deng, Y., Y. Zhang, L. Ye, T. Zhang, J. Cheng, G. Chen, Q. Zhang, Y. Yang. 2016. Umbilical Cord-derived Mesenchymal Stem Cells Instruct Monocytes Towards an IL10-producing Phenotype by Secreting IL6 and HGF. *Sci. Rep*. 6, 37566.
- Desancé, M., R. Contentin, L. Bertoni, T. Gomez-leduc, T. Branly, S. Jacquet, J. M. Betsch, A. Batho, F. Legendre, F. Audigié, P. Galéra y M. Demoor. 2018. Chondrogenic Differentiation of Defined Equine Mesenchymal Stem Cells Derived from Umbilical Cord Blood for Use in Cartilage Repair Therapy. *Int J Mol Sci*. 19(2). pii: E537
- Devine, S. M., C. Cobbs, M. Jennings, A. Bartholomew, R. Hoffman. 2003. Mesenchymal stem cells distribute to a wide range of tissues following systemic infusion into nonhuman primates. *Blood*. 101: 2999-3001
- Devitt, S. M., C. M. Carter, R. Dierov, S. Weiss, R. P. Gersch, I. Percec. 2015. Successful Isolation of Viable Adipose-Derived Stem Cells from Human Adipose Tissue Subject to Long-Term Cryopreservation: Positive Implications for Adult Stem Cell-Based Therapeutics in Patients of Advanced Age. *Stem Cells International*. 146421, 11.
- Di Ianni, M., B. Del Papa, M. De Ioanni, L. Moreti, E. Bonifacio, D. Cacchini, P. Sportoletti, F. Falzetti, A. Tabilio. 2008. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Experimental Hematology*, vol. 36, no. 3, pp. 309–318.

- Dieudonne, F. X., N. Sévère, M. Biosse-Duplan, J. J. Weng, Y. Su, P. J. Marie. 2013. Promotion of osteoblast differentiation in mesenchymal cells through Cbl-mediated control of STAT5 activity. *Stem Cells*, 31(7), 1340–1349.
- Djouad, F., L. M. Charbonnier, C. Bouffi, P. Louis-Pence, C. Bony, F. Apparailly, D. Noël. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells*. 25(8), 2025–32.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Doss, M. X., C. I. Koehler, C. Gissel, J. Hescheler, A. Sachinidis. 2004. Embryonic stem cells: a promising tool for cell replacement therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 8(4), 465–73.
- Dostert G., B. Mesure, P. Menu, É. Velot. 2017. How do mesenchymal stem cell influence or are influenced by microenvironment through extracellular vesicles communication? *Frontier in Cell and Developmental Biology*. 5
- Dubon, M. J., and Park, K. S. 2015. Substance P enhances the proliferation and migration potential of murine bone marrow-derived mesenchymal stem cell-like cell lines. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 9(4), 1185–1191.
- Dupin, E., S. Creuzet, N. M. L. Douarin, 2000. The Contribution of the Neural Crest to the Vertebrate Body. *Adv Exp Med Biol*. 589:96-119.
- Durgam, S. and Stewart, M. 2017. Evidence supporting intralesional stem cell therapy to improve equine flexor tendón healing. *Veterinary evidence*.2: 1
- Eiro, N., I. Pidal, B. Fernandez-Garcia, S. Junquera, M. L. Lamelas, J. M. Del Casar, L. O. Gonzalez, A. Lopez-Muniz, F. J. Vizoso. 2012. Impact of CD68/(CD3+ CD20) ratio at the invasive front of primary tumors on distant metastasis development in breast cancer. *PLoS ONE*. 7:e52796
- El Karim, I. A., G. J. Linden, D. F. Orr, F. T. Lundy. 2008. Antimicrobial activity of neuropeptides against a range of microorganisms from skin, oral, respiratory and gastrointestinal tract sites. *J. Neuroimmunol*. 200:11–16.
- Elabd, C., A. Basillais, H. Beaupied, V. Breuil, N. Wagner, M. Scheideler, E. Z. Amri. 2008. Oxytocin controls differentiation of human mesenchymal stem cells and reverses osteoporosis. *Stem Cells*. 26(9), 2399–407.
- English, K., J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, B. P. Mahon. 2009. Cell contact, prostaglandin E (2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clin Exp Immunol*. 156: 149-160
- English, K., J. M. Ryan, L. Tobin, M. J. Murphy, F. P. Barry, B. P. Mahon. 2009. Cell contact, prostaglandin E (2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 156(1), 149–60.
- Eslani, M., I. Putra, X. Shen, J. Hamouie, N. Afsharkhamseh, S. Besharat, A. R. Djalilian. 2017. Corneal Mesenchymal Stromal Cells Are Directly Antiangiogenic via PEDF and sFLT-1. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 58(12), 5507–5517.
- Eslamnejad, M. B., S. Mardpour, M. Ebrahimi. 2008. Growth Kinetics and in Vitro Aging of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Rat Adipose Versus Bone Marrow Tissues. *IJVS*. 3, 2:7
- Evans, M. J., y Kaufman, M. H. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156.
- Falomo, M. E., L. Ferroni, I. Tocco, C. Gardin, B. Zavan. 2015. Immunomodulatory Role of Adipose-Derived Stem Cells on Equine Endometriosis. *Biomed Res Int*. 141485.
- Fan, H., G. Zhao, L. Liu, F. Liu, W. Gong, X. Liu, L. Yang, J. Wang, Y. Hou. 2012. Pre-treatment with IL-1 enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cellular & Molecular Immunology*. 9, 6, 473–481.
- FDA. 2015. Guidance for Industry Cell-Based Products for Animal Use, (July 2014).
- Ferris, R. A., D. D. Frisbie, P. M. McCue. 2014. Use of mesenchymal stem cells or autologous conditioned serum to modulate the inflammatory response to spermatozoa in mares. *Theriogenology*, 82(1), 36–42.
- Friedenstein, J. 1980. Stromal mechanisms of bone marrow: cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Haematology and Blood Transfusion*, 25, 19–29.
- Fukata, M., A. Chen, A. Klepper, S. Krishnareddy, A. S. Vamadevan, L. S. Thomas, R. Xu, H. Inoue, A. M. Ardit, A. J. Dannenberg. M. T. Abreu. 2006. Cox-2 is regulated by Toll-like receptor-4 (TLR4) signaling: Role in proliferation and apoptosis in the intestine. *Gastroenterology*. 131(3):862-877

- Galicchio, M., E. Benetti, A. C. Rosa, R. Fantozzi. 2009. Tachykinin receptor modulation of cyclooxygenase-2 expression in human polymorphonuclear leucocytes. *British J. Pharmacol.* 156:486–496.
- Gargett, C. E., K. E. Schwab, R. M. Zillwood, H. P. T. Nguyen, D. Wu. 2009. Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biology of Reproduction*, 80(6), 1136–1145.
- Ge, C., G. Xiao, D. Jiang, R. T. Franceschi. 2007. Critical role of the extracellular signal-regulated kinase-MAPK pathway in osteoblast differentiation and skeletal development. *The Journal of Cell Biology*, 176(5), 709–718.
- Ghannam, S., J. Pene, G. Torcy-Moquet, C. Jorgensen, H. Yssel. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit human Th17 cell differentiation and function and induce a T regulatory cell phenotype. *The Journal of Immunology*, 185(1), 302–312.
- Glennie, S., I. Soeiro, P. J. Dyson, E. W.F. Lam, F. Dazzi. 2005. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*, vol. 105, no. 7, pp. 2821–2827.
- Godwin, E. E., N. J. Young, J. Dudhia, I. C. Beamish, R. K. W. Smith. 2012. Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Veterinary Journal*, 44(1), 25–32.
- Gonzalez-Rey, E., P. Anderson, M. A. Gonzalez, L. Rico, D. Buscher, M. Delgado. 2009. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*.58:929–939.
- Gronthos, S., D. M. Franklin, H. A. Leddy, P. G. Robey, R. W. Storms, J. M. Gimble. 2001. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of Cellular Physiology*, 189(1), 54–63.
- Gross, G., y T. Häupl. 2013. Stem cells-dependent therapies. Mesenchymal stem cells in chronic inflammatory disorders. Gross, Häupl, Eds. Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston.
- Grzesiak, J., K. Marycz, J. Czogala, K. Wrzeszcz, J. Nicpon. 2011. Comparison of Behavior, Morphology and Morphometry of Equine and Canine Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells in Culture. *International Journal of Morphology*.
- Gu, Y., M. He, X. Zhou, J. Liu, N. Hou, T. Bin, Y. Zhang, T. Li, J. Chen. 2016. Endogenous IL-6 of mesenchymal stem cell improves behavioral outcome of hypoxic-ischemic brain damage neonatal rats by supressing apoptosis in astrocyte. *Sci. Rep.* 6, 18587
- Gupta, N., X. Su, B. Popov, J. W. Lee, V. Serikov, M. A. Matthay. 2007. Intrapulmonary delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells improves survival and attenuates endotoxin-induced acute lung injury in mice. *J. Immunol.* 179:1855–1863.
- Gur-Wahnon, D., Z. Borovsky, S. Beyth, M. Liebergall, J. Rachmilewitz. 2007. Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Experimental Hematology* 35. 426–433
- Guzmán-Flores, J. M., y D. P. Portales-Pérez. 2013. Mecanismos de supresión de las células T reguladoras (Treg). *Gaceta Medica de Mexico*, 149, 630–638.
- Haeckel, E. 1874. Anthropogenie oder Entwicklungsgeschichte des menschen. Retrieved December 14, 2015, from <https://archive.org/details/anthropogenieod05haecgoog>
- Hare, J. M., J. E. Fishman, G. Gerstenblith, D. L. DiFede Velazquez, J. P. Zambrano, V. Y. Suncion, A. W. Heldman. 2012. Comparison of Allogeneic vs Autologous Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Delivered by Transendocardial Injection in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *Jama*, 308(22), 2369.
- Hawkins, K. E., T. V. Sharp, T. R. McKay. 2013. The role of hypoxia in stem cell potency and differentiation. *Regen. Med.* 8:771–782.
- Haynesworth, S. E., M. A. Baber, A. I. Caplan. 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *Journal of Cellular Physiology*, 166(3), 585–92.
- Hendriks, T. K., E. A. F. J. van Gorp, V. D. K. D. Sewgobind, W. M. Mol, W. Schoordijk, M. Klepper, C. C. Baan. 2009. Generation of donor-specific regulatory T-cell function in kidney transplant patients. *Transplantation*, 87(3), 376–83.
- Henneke, D. R., G. D. Potter, J. L. Kreider, B. F. Yeates. 1983. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. *Equine Veterinary Journal*. 15 (4): 371–2
- Herthel, D. J. 2001. Enhanced suspensory ligament healing in 100 horses by stem cells and other bone marrow components. *Proc Am Assoc of Eq Pract*, 47, 319–321.

- Holley, R. J., G. Tai, A. J. Williamson, S. Taylor, S. A. Cain, S. M. Richardson, C. L. Merry, A. D. Whetton, C. M. Klelty, A. E. Canfield. 2015. Comparative Quantification of the Surfaceome of Human Multipotent Mesenchymal Progenitor Cells. *Stem Cell Reports*.10;4(3):473-88
- Honzarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A. M. Glodek, L. E. Silberstein. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 24: 1030-1041
- Hong, H. S., J. Lee, E. Lee, Y. S. Kwon, E. Lee, W. Ahn, Y. Son. 2009. A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nature medicine*.
- Hoogduijn, M., E. Eggenhofer, F. Luk, M. Dahlke. 2014. The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in Immunology*, 5(MAY), 1–6.
- Horwitz, E. M., K. Le Blanc, M. Dominici, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. C. Marini, A. Keating. 2005. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), 393–395.
- Hsu, W. T., C. H. Lin, B. L. Chiang, H. Y. Jui, K. K. Y. Wu, C. M. Lee. 2013. Prostaglandin E2 potentiates mesenchymal stem cell induced IL-10 + IFN-g + CD4 + regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J Immunol*. 190:2372–2380.
- Hu, C., L. Li. 2018. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 22, 3. 1428-1442
- Huang, J., Z. Zhang, J. Guo, A. Ni, A. Deb, L. Zhang, M. Mirosou, R.E. Pratt, V.J. Dzau. 2010. Genetic modification of mesenchymal stem cells overexpressing CCR1 increases cell viability, migration, engraftment, and capillary density in the injured myocardium. *Circ Res*. 11;106(11):1753-62
- Huh, J. E., S. J. Lee. 2013. IL-6 is produced by adipose-derived stromal cells and promotes osteogenesis. *Biochimica et Biophysica*. 1833,2608–2616
- Hui, H., Y. Tang, M. Hu, X. Zhao, V. A. Greater, L. A. Health, L. Angeles, L. 2011. Stem Cells: General Features and Characteristics. *Stem Cells in Clinic and Research*, 1–20.
- Im, M., H. Chae, T. Kim, H. H. Park, J. Lim, E. J. Oh, K. Han, K. 2011. Comparative quantitative analysis of cluster of differentiation 45 antigen expression on lymphocyte subsets. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 31(3), 148–153. <http://doi.org/10.3343/kjlm.2011.31.3.148>
- INE. 2007. VII Censo Agropecuario y Forestal. Ministerio de Agricultura. Gobierno de Chile
- Ingulli, E. 2010. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatric Nephrology*.
- ISSCR. 2014. (ISSCR), International Society For Stem Cells Research. *Stem Cells Facts*.
- James, A. W. 2013. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica*, 2013, 684736.
- Janeway, C., P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik. 2001. *Antigen Recognition by B-cell and T-cell Receptors*. Garland Science. Retrieved from
- Jiang, X., Y. Zhang, B. Liu. 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), 4120–4126.
- Jin, Y., H. S. Hong, Y. Son. 2015. Substance P enhances mesenchymal stem cells-mediated immune modulation. *Cytokine*. 71(2), 145–153.
- Jovic, S., H. M. Linge, M. M. Shikhagaie, A. I. Olin, L. Lannefors, J. S. Erjefält, M. Mörgelin, A. Egesten. 2016. The neutrophil-recruiting chemokine GCP-2/CXCL6 is expressed in cystic fibrosis airways and retains its functional properties after binding to extracellular DNA. *Nature*. 9:1.
- Justus, C. R. N. Leffler, M. Ruiz-Echeveria, L.V. Yang. 2014. In vitro cell migration and invasion assays. *J Vis. Exp.* (88):51046.
- Kang, J. W., K. S. Kang, H. C. Koo, J. R. Park, E. W. Choi, Y. H. Park. 2008. Soluble factors-mediated immunomodulatory effects of canine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells and Development*, 17(4), 681–93.
- Kang, Y. J., E. S. Jeon, H. Y. Song, J. S. Woo, J. S. Jung, Y. K. Kim, J. H. Kim. 2005. Role of c-Jun N-terminal kinase in the PDGF-induced proliferation and migration of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 95(6), 1135–1145.
- Katsanos, G. S., A. Anogeianaki, C. Orso, S. Tetè, V. Salini, P.L. Antinolfi, G. Sabatino. 2008. Impact of substance p on cellular immunity. *Journal of biological regulators & homeostatic agents*.22, 2, 93-98
- Kawamoto, K., M. Konno, H. Nagano, S. Nishikawa, Y. Tomimaru, H. Akita, H. Ishii. 2013. CD90-(Thy-1-) high selection enhances reprogramming capacity of murine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Disease Markers*, 35(5), 573–579.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1294–301.

- Khatri, M., T. D. O'Brien, J. M. Sharma. 2009. Isolation and differentiation of chicken mesenchymal stem cells from bone marrow. *Stem Cells and Development*, 18(10), 1485–92.
- Khosravi, M., A. Bidmeshkipour, A. Moravej, S.H. Assari, S. Niserian, M.H. Karimi. 2018. Induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by mesenchymal stem cells is associated with RUNX complex factors. *Immunol Res.* 66:207–218
- Khosravi, M., M. H. Karimi, M. H. Aghdaie, M. Kalani, S. Naserian, A. Bidmeshkipour. 2017. Mesenchymal stem cells can induce regulatory T cells via modulating miR-126a but not miR-10a. *Gene* 627. 327-336.
- Kim, J. Y., S. C. Park, J. K. Lee, S. J. Choi, K. S. Hahm, Y. Park. 2012. Novel Antibacterial Activity of  $\beta$ 2-Microglobulin in Human Amniotic Fluid. *PLoS ONE*. 7(11):e47642.
- Kim, Y. S., Y. Ahn, J. S. Kwon, Y. K. Cho, M. H. Jeong, J. G. Cho, J. C. Kang. 2012. Priming of mesenchymal stem cells with oxytocin enhances the cardiac repair in ischemia/reperfusion injury. *Cells, Tissues, Organs*, 195(5), 428–42.
- Kimura, A., T. Kishimoto. 2010. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *Eur. J. Immunol.* 40: 1830–1835
- Kinnaird, T, E. Stabile, M. S. Burnett, M. Shou, C. W. Lee, S. Barr, S. Fuchs, S. E. Epstein. 2004. Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*. 109 (12) 1543-9
- Kisiel, A. H., L. A. McDuffee, E. Masaoud, T. R. Bailey, B. P. Esparza Gonzalez, R. Nino-Fong. 2012. Isolation, characterization, and in vitro proliferation of canine mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, muscle, and periosteum. *American Journal of Veterinary Research*, 73(8), 1305–1317.
- Kisselbach, L., M. Merges, A. Bossie, A. Boyd. 2009. CD90 expression on human primary cells and elimination of contaminating fibroblasts from cell cultures. *Cytotechnology*, 59(1), 31–44.
- Koch, T. G., T. Heerkens, P.D. Thomsen, D. H. Betts. 2007. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology*, 7, 26.
- Kol, A., J. A. Wood, D. D. Carrade Holt, J. A. Gillette, L. K. Bohannon-Worsley, S. M. Puchalski, D. L. Borjesson. 2015. Multiple intravenous injections of allogeneic equine mesenchymal stem cells do not induce a systemic inflammatory response but do alter lymphocyte subsets in healthy horses. *Stem Cell Res Ther*, 6(1), 73.
- Kolf, C. M., E. Cho, R. S. Tuan. 2007. Mesenchymal stromal cells. *Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. Arthritis Research & Therapy*, 9(1), 204.
- Kowalska, K., D. B. Carr, A. W. Lipkowski. 2002. Direct antimicrobial properties of substance P. *Life Sci.* 71:747–750
- Krebsbach, P. H., S. A. Kuznetsov, P. Bianco, P. G. Robey. 1999. Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine : An Official Publication of the American Association of Oral Biologists*, 10(2), 165–181.
- Kulka, M., C. H. Sheen, B. P. Tancowny, L. C. Grammer, R. P. Schleimer. 2008. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*. 123:398–410.
- Kulkarni, R., S. Behboudi, S. Sharif. 2011. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell and Tissue Research*. 343, 1, 141–152.
- Lai, R. C., F. Arslan, M. M. Lee, N. S. K. Sze, A. Choo, T. S. Chen, S. K. Lim. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 4(3), 214–222.
- Lai, R. C., S. S. Tan, B. J. Teh, S. K. Sze, F. Arslan, D. P. de Kleijn, S. K. Lim. 2012. Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *International Journal of Proteomics*, 2012, 1–14.
- Lan, Y., S. Kodati, H. S. Lee, M. Omoto, Y. Jin, S. K. Chauhan. 2015. Kinetics and Function of Mesenchymal Stem Cells in Corneal Injury, *53(7)*, 3638–3644.
- Lane, S. W., D. Williams, F. M. Watt. 2014. Modulating the stem cell niche for tissue regeneration. *Nature Biotechnology*, 32(8), 795–803.
- Le Blanc, K., D. Mougiakakos. 2012. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system, *Nat. Rev. Immunol.* 12. 383–396.
- Le Blanc, K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells,” *Cytherapy*, vol. 5, no. 6, pp. 485–489.
- Le Blanc, K., I. Rasmusson, C. Go, K. Le Blanc, I. Rasmusson, C. Götherström, O. Ringdén. 2004. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Expression of CD25 (Interleukin-2 Receptor) and CD38 on Phytohaemagglutinin-Activated Lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 25(3), 307–315.
- Lee, H. K., H. S. Kim, J. S. Kim, Y. G. Kim, K. H. Park, J. H. Lee, K. H. Kim, I. Y. Chang, S. C. Bae, Y. Kim, J. T. Hong, J. H. Kehrl, S. B. Han. 2017. CCL2 deficient mesenchymal stem cells fail to establish long-lasting contact with T cells and no longer ameliorate lupus symptoms. *Sci Rep.*; 7: 41258.

- Lee, S. H., S. H. Cha, C. L. Kim, H. S. Lillehoj, J. Y. Song y K. W. Lee. 2015. Enhanced adipogenic differentiation of bovine bone marrow-derived mesenchymal stem cells, *Journal of Applied Animal Research*. 43:1, 15-21
- Lee, W. S., Y. Suzuki, S. S. Graves, M. Iwata, G. M. Venkataraman, M. Mielcarek, R. Storb. 2011. Canine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells suppress alloreactive lymphocyte proliferation in vitro but fail to enhance engraftment in canine bone marrow transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 17(4), 465–75.
- Lelouard, H., S. Henri, B. De Bovis, B. Mugnier, A. Chollat-Namy, B. Malissen, S. Meresse, J.P. Gorvel. 2010. Pathogenic bacteria and dead cells are internalized by a unique subset of Peyer's patch dendritic cells that express lysozyme. *Gastroenterology*.138(1):173–84 e1-3.
- Lepelletier, Y., S. Lecourt, A. Renand, B. Arnulf, V. Vanneaz, J. P. Femand, J. Larghero. 2010. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells and Development*, 19(7), 1075–1079.
- Leppänen, M., y S. Miettinen. 2009. Management of equine tendon and ligament injuries with expanded autologous adipose-derived mesenchymal stem cells: a clinical study. *World Conference on ...* Retrieved from
- Li, Y. y F. Lin. 2012. Mesenchymal stem cells are injured by complement after their contact with serum. *Blood*. 25;120(17):3436-43.
- Li, F. 2014. Mesenchymal stem cells: Potential role in corneal wound repair and transplantation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 296.
- Liljenstolpe, C. 2009. *Horses in Europe*. Swedish University of Agricultural Sciences.
- Lin A., G. Wang, H. Zhao, Y. Zhang, Q. Han, C. Zhang, Z. Tian, J. Zhang. 2016. TLR4 signaling promotes a COX-2/PGE2/STAT3 positive feedback loop in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. *OncoImmunology*. 5-2
- Lin, C., H. Ning, G. Lin, T. F. Lue. 2013. NIH Public Access, 14(10).
- Lin, G., M. Garcia, H. Ning, L. Banie, Y. L. Guo, T. F. Lue, C. S. Lin. 2008. Defining Stem and Progenitor Cells within Adipose Tissue. *Stem Cells and Development*, 17(6), 1053–1063.
- Ling, L., V. Nurcombe y S. M. Cool. 2009. Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*, 433(1-2), 1–7.
- Liu, H., D. M. Kemeny, B. C. Heng, H. W. Ouyang, A. J. Melendez, T. Cao. 2006. The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *Journal of Immunology*. 176(5), 2864–71. Retrieved from
- Liu, G., L. Zhang, Y. Zhao. 2010. Modulation of immune responses through direct activation of Toll-like receptors to T cells *Clinical and Experimental Immunology*. 160:2. 168–175.
- Loftinia, M., S. Lak, N. Mohammadi Ghahhari, B. Johari, F. Maghsood, S. Parsania, B. Sadegh Tabrizi, M. Kadivar. 2017. Hypoxia Pre-Conditioned Embryonic Mesenchymal Stem Cell Secretome Reduces IL-10 Production by Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Iran Biomed J*. 21(1):24-31
- Lofty, A., M. Salama, F. Zahran, E. Jones, A. Badawy, M. Sobh. 2014. Characterization of Mesenchymal Stem Cells Derived from Rat Bone Marrow and Adipose Tissue: A Comparative Study. *Int J Stem Cells*. 7(2): 135–142.
- Lopez, M. J., J. Jarazo. 2015. State of the art: Stem cells in equine regenerative medicine. *Equine Veterinary Journal*, 47(2), 145–54.
- Lorenz, D., B. Wiesner, J. Zipper, A. Winkler, E. Krause, M. Beyermann, M. Lindau, M. Bienert. 1998. Mechanism of peptide-induced mast cell degranulation. Translocation and patch-clamp studies. *J. Gen. Physiol*. 112:577–591.
- Lu, T., P. Hu, X. Su, C. Li, Y. Ma, W. Guan. 2014. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from fetal bovine liver. *Cell and Tissue Banking*, 15(3), 439–450.
- Luesma, M. J., I. Cantanero, B. ranera, A. R. Remacha, T. Castiella, A. Romero, I. Martín, C. Rodellar, C. Junquera. Primary Cilia in Chondrogenic Differentiation of Equine Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: Ultrastructural Study. *JEVs*. 47, 47 – 54.
- Luu, H. H., W. Song, X. Luo, D. Manning, J. Luo, Z. Deng. 2007. Distinct Roles of Bone Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res*, 25(4), 665–677.
- Ma, S., N. Xie, W. Li, B. Yuan, Y. Shi, Y. Wang. 2014. Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ*.21(2):216-25.
- Maccario, R., M. Podesta, A. Moretta, A. Cometa, D. Montagna, L. Daudt, A. Ibatici, G. Piaggio, S. Pozzi, F. Fransoni, F. Locatelli. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, vol. 90, no. 4, pp. 516–525.

- Maccario, R., M. Podestà, A. Moretta, A. Cometa, P. Comoli, D. Montagna, F. Locatelli. 2005. Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4 + T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*, 90(4), 516–525.
- MacDonald, B.T., K. Tamai, X. He. 2009. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 17, 1, 9–26
- Mafi, P., S. Hindocha, R. Mafi, M. Griffin, W. Khan. 2011. Adult mesenchymal stem cells and cell surface characterization - a systematic review of the literature. *The Open Orthopaedics Journal*, 5(Suppl 2), 253–60.
- Majeed, R., A. Hamid, Y. Qurishi, A. K. Qazi, A. Hussain, M. Ahmed, R. A. Najjar, J. A. Bhat, S. K. Singh, A. K. Saxena. 2012. Therapeutic Targeting of Cancer Cell Metabolism: Role of Metabolic Enzymes, Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Journal of Cancer Science and Therapy*, 4(9), 281–291.
- Maleki, M., F. Ghanbarvand, M. Reza Behvarz, M. Ejtemaei, E. Ghadirkhomi. 2014. Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *International Journal of Stem Cells*, 7(2), 118–26.
- Mambelli, L. I., G. H. Z. Winter, A. Kerkis, E. Malschitzky, R. C. Mattos, I. Kerkis. 2013. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. *Theriogenology*, 79(5), 744–750.
- Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'quinn, W. S. Helms, D. C. Bullar, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor- $\beta$  induces development of the TH17 lineage. *Nature* volume 441, pages 231–234
- Manning, C. N., A. G. Schwartz, W. Liu, J. Xie, N. Havlioglu, S. E. Sakiyama-Elbert, S. Thomopoulos. 2013. Controlled delivery of mesenchymal stem cells and growth factors using a nanofiber scaffold for tendon repair. *Acta Biomaterialia*, 9(6), 6905–6914.
- Marfe, G., G. Rotta, L. De Martino, M. Tafani, F. Fiorito, C. Di Stefano, A. Gambacurta. 2012. A new clinical approach: use of blood-derived stem cells (BDSCs) for superficial digital flexor tendon injuries in horses. *Life Sciences*, 90(21-22), 825–30.
- Martin, E., S. Nielsen, J. C. Quinn. 2014. Willingness of a Convenience Sample of Horse Owners to Use Stem Cell Therapy for the Treatment of Equine Tendon Injury and Factors that Influence This Decision. *Journal of Equine Veterinary Science*, 34(7), 889–896.
- Mashaghi, A., A. Marmalidou, M. Tehrani, P. M. Grace, C. Pothoulakis y R. Dana. 2016. Neuropeptide Substance P and the Immune Response. *Cell Mol Life Sci*. 73(22): 4249–4264.
- Matsumura, E., K. Tsuji, K. Komori, H. Koga, I. Sekuya, T. Muneta. 2017. Pretreatment with IL-1 $\beta$  enhances proliferation and chondrogenic potential of synovium-derived mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*. 19: 181–93
- Matsuzaki, Y., T. Unemoto, Y. Tanaka, T. Okano, M. Yamato. 2015. b2-Microglobulin is an appropriate reference gene for RT-PCR-based gene expression analysis of hematopoietic stem cells. *Regenerative Therapy* 1. 91e97
- Mei, S. H., J. J. Haitsma, C. C. Dos Santos, Y. Deng, P. F. Lai, A. S. Slutsky, W. C. Liles, D. J. Stewart. 2010. Mesenchymal stem cells reduce inflammation while enhancing bacterial clearance and improving survival in sepsis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 182:1047–1057.
- Mei, Y., C. Bian, J. Li, Z. Du, H. Zhou, Z. Yang, R. C. H. Zhao. 2013. MiR-21 modulates the ERK-MAPK signaling pathway by regulating SPRY2 expression during human mesenchymal stem cell differentiation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(6), 1374–1384.
- Meirelles, L. D. S., A. M. Fontes, D. T. Covas, A. I. Caplan. 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 20(5-6), 419–27.
- Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Göbel, W. Däubener, D. Dilloo. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood*. 103:4619–21. 12.
- Meisel, R., A. Zibert, M. Laryea, U. Gobel, W. Daubener, D Dilloo. 2004. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), 4619–4622.
- Mi, F., L. Gong. 2017. Secretion of interleukin-6 by bone marrow mesenchymal stem cells promotes metastasis in hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep*. 21;37(4).
- Miao, Z., J. Jin, L. Chen, J. Zhu, W. Huang, J. Zhao, X. Zhang. 2006. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biology International*, 30(9), 681–687.
- Mika, A., S. L. Reynolds, F. C. Mohlin, C. Willis, P. M. Swe, D. A. Pickering, V. Halilovic, L. C. Wijeyewickrema, R. N. Pike, A. M. Blom, D. J. Kemp, K. Fischer. 2012. Novel Scabies Mite Serpins Inhibit the Three Pathways of the Human Complement System. *PLoS ONE* 7(7): e40489.

- Miletic, M., S. Mojsilovic, I. Okic-Dordevic, T. Kukulj, A. Jaukovic, J. Santibañez, D. Bugariski. 2014. mesenchymal stem cells isolated from human periodontal ligament, 66(1), 261–271.
- Mitalipov, S., y D. Wolf. 2009. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 114, 185–199.
- Mitchell, J. B., K. McIntosh, S. Zvonic, S. Garrett, Z. E. Floyd, A. Kloster, J. M. Gimble. 2006. Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers. *Stem Cells*, 24(2), 376–385.
- Mora-Carreño, M., R. Briones, D. Parra, C. Rosenfeld, A. Schmeisser, B. Menarim, B. 2014. Main musculoskeletal injuries associated with lameness in Chilean Rodeo horses Principales afecciones musculoesqueléticas asociadas a claudicación en equinos del rodeo chileno. *Arch Med Vet.* 424, 419–424.
- Morrison, S., V.C. Dryden, R. Bras, S. Morrell. 2014. How to Use Stem Cells in Clinical Laminitis Cases, 60, 499–503.
- Mothersill, C., C.B. Seymour, A. O'Brien. 1991. Induction of c-myc oncoprotein and of cellular proliferation by radiation in normal human urothelial cultures. *Anticancer Research*, 11(4), 1609–1612.
- Murphy, K., P. Travers, M. Walport. 2009. *Inmunología de Janeway*. McGraw-Hill/ Interamericana de México. 7ª edición.
- Nagpal, S., S. Patel, H. Jacobe, D. DiSepio, C. Ghosn, M. Malhotra, M. Teng, M. Duvic, R.A. Chandraratna. 1997. Tazarotene-induced gene 2 (TIG2), a novel retinoid-responsive gene in skin. *J Invest Dermatol.* 109:91–95.
- Nasef, A., C. Mazurier, S. Bouchet, S. François, A. Chapel, D. Thierry, L. Fouillard. 2008. Leukemia inhibitory factor: Role in human mesenchymal stem cells mediated immunosuppression. *Cellular Immunology*, 253(1-2), 16–22.
- Nauta, A. J., A.B. Kruisselbrink, E. Lurvink, R. Willemze, W.E. Fibbe. 2006. Mesenchymal Stem Cells Inhibit Generation and Function of Both CD34+-Derived and Monocyte-Derived Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 177(4), 2080–2087.
- Nazari, F., A. Parham, A.F. Maleki. 2015. GAPDH,  $\beta$ -actin and  $\beta$ 2-microglobulin, as three common reference genes, are not reliable for gene expression studies in equine adipose- and marrow-derived mesenchymal stem cells. *JAST.* 57:18
- Nemeth, K., A. Leelahavanichkul, P.S. Yuen, B. Mayer, A. Parmelee, K. Doi, P.G. Robey, K. Leelahavanichkul, B.H. Koller, J.M. Brown, X. Hu, I. Jelinek, R.A. Star, E. Mezey. 2009. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E2-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* 15:42–49.
- Newton, K., y V.M. Dixit. 2012. Signaling in Innate Immunity and Inflammation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4(3), a006049–a006049.
- Nicola, M. D., C. Carlo-Stella, M. Magni M. Milanese, P.D. Longoni, S. Grisanti, A. M. Gianni. 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, vol. 99, no. 10, pp. 3838–3843.
- Nicpoń, J., K. Marycz, J. Grzesiak. 2013. Therapeutic effect of adipose-derived mesenchymal stem cell injection in horses suffering from bone spavin. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 753–4.
- Nielsen, J. S., y K. M. McNagny. 2008. Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science*, 121(Pt 22), 3683–3692.
- Nieto, J., J. Ramírez, M. Cristiam, L. Garcia. 2010. Papel del linfocito B en el rechazo crónico del trasplante, 41–64.
- Nixon, A. J., L.A. Dahlgren, J.L. Haupt, A.E. Yeager, D.L. Ward. 2008. Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *American Journal of Veterinary Research*, 69(7), 928–37.
- Niyaz, M., Ö. A. Gürpınar, S. Günaydin, M.A. Onur. 2012. Isolation, culturing and characterization of rat adipose tissue-derived mesenchymal stem cells: a simple technique, 36, 658–664.
- Noiseux, N., M Borie, A. Desnoyers, A. Menaouar, L.M. Stevens, S. Mansour, J. Gutkowska. 2012. Preconditioning of stem cells by oxytocin to improve their therapeutic potential. *Endocrinology*, 153(11), 5361–72.
- Oberbarnscheidt, M. H., Q. Zeng, Q. Li, H. Dai, A.L. Williams, W.D. Shlomchik, F.G. Lakkis. 2014. Non-self recognition by monocytes initiates allograft rejection. *Journal of Clinical Investigation*, 124(8), 3579–3589.
- Ode, A., J. Schoon, A. Kurtz, M. Gaetjen, J. E. Ode, S. Geissler, G. N. Duda. 2012. CD73/5'-ecto-nucleotidase acts as a regulatory factor in osteo-/chondrogenic differentiation of mechanically stimulated mesenchymal stromal cells. *European Cells and Materials*, 25(030), 37–47.
- Oses, C., B. Olivares, M. Ezquer, C. Acosta, P. Bosh, M. Donoso, P. Léniz. 2017. Preconditioning of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells with deferroxamine increases the production of pro-angiogenic,

- neuroprotective and anti-inflammatory factors: Potential application in the treatment of diabetic neuropathy. *PLoS ONE*. 12(5): e0178011.
- Pan, Q., Y. Yu, Q. Chen, C. Li, H. Wu, Y. Wan, F. Sun. 2008. Sox9, a key transcription factor of bone morphogenetic protein-2-induced chondrogenesis, is activated through BMP pathway and a CCAAT box in the proximal promoter. *Journal of Cellular Physiology*, 217(1), 228–241.
- Park, C.W., K.S. Kim, S. Bae H.K. Son, P.K. Myung, H.J. Hong, H. Kim. 2009. Cytokine secretion profiling of human mesenchymal stem cells by antibody array. *International Journal of Stem cells*. 2. 1.
- Parkin, J., y B. Cohen. 2001. An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777–89.
- Patel, S. A., J. R. Meyer, S. J. Greco, K. E. Corcoran, M. Bryan, P. Ramesgwar. 2010. Mesenchymal stem cells protect breast cancer cells through regulatory T cells: role of mesenchymal stem cell-derived TGF-beta. *J Immunol*. 184:5885–94
- Patel, A. N., E. Park, M. Kuzman, F. Benetti, F. J. Silva, J. G. Allickson. 2008. Multipotent menstrual blood stromal stem cells: Isolation, characterization, and differentiation. *Cell Transplantation*, 17(3), 303–311.
- Paterson, Y. Z., N. Rash, E. R. Garvican, R. Paillot, D. J. Guest. 2014. Equine mesenchymal stromal cells and embryo-derived stem cells are immune privileged in vitro. *Stem Cell Research & Therapy*. 5:90
- Pendleton, C., Q. Li, D. A. Chesler, K. Yuan, H. Guerrero-Cazares, A. Quinones-Hinojosa. 2013. Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: In Vitro Comparison of Their Tropism towards Gliomas. *PLoS ONE*, 8(3).
- Peng, G., Z. Guo, Y. Kiniwa. 2005. Immunology: Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4+ regulatory T cell function. *Science*. 309: 5739, 1380–1384.
- Perarnau, B., C.A. Siegrist, A. Gillet, C. Vincent, S. Kimura, F.A. Lemonnier. 1990. Beta 2-microglobulin restriction of antigen presentation. *Nature*. 346, 751–754.
- Pessoa, G. T., M. Levi, T. Feitosa, N. Martins, A. Neto, A. Rego, D. D. O. Bezerra. 2014. Isolation, Culture and Differentiation Potential of Collared Peccary (*Tayassu tajacu*) Adipose-Derived Stem Cells, 55.
- Tontonoz, P., E. Hu, G. Reed, B. Adriane, S. Bruce. 1994. mPPAR $\gamma$ /2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev*. 4, 1224–1234.
- Pierelli, L., G. Bonanno, S. Rutella, M. Marone, G. Scambia, G. Leone. 2001. CD105 (endoglin) expression on hematopoietic stem/progenitor cells. *Leukemia & Lymphoma*, 42(6), 1195–1206.
- Pilz, G. A., J. Braun, C. Ulrich, T. Felka, K. Warstat, M. Ruh, W. K. Aicher. 2011. Human mesenchymal stromal cells express CD14 cross-reactive epitopes. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 79(8), 635–645.
- Pittenger, M. F., A.M. Mackay, S.C. Beck, R.K. Jaiswal, R. Douglas, J.D. Mosca, D.R. Marshak. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), 143–7. Retrieved from
- Pochampally, R. 2008. Colony forming unit assays for MSCs. *Methods in Molecular Biology*, 449, 83–91.
- Poncelet, A. J., J. Vercausse, A. Saliez, P. Gianello. 2007. Although pig allogeneic mesenchymal stem cells are not immunogenic in vitro, intracardiac injection elicits an immune response in vivo. *Transplantation*, 83(6), 783–90.
- Qu-Petersen, Z., B. Deasy, R. Jankowski, M. Ikezawa, J. Cummins, R. Pruchnic, J. Huard. 2002. Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *The Journal of Cell Biology*, 157(5), 851–864.
- Quaedackers, M. E., C. C. Baan, W. Weimar y M. J. Hoogduijn. 2009. Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes. *European Journal of Immunology*, vol. 39, no. 12, pp. 3436–3446.
- Rafei, M., E. Birman, K. Forner, J. Galipeau. 2009. Allogeneic mesenchymal stem cells for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 17(10), 1799–1803.
- Ramasamy, R., H. Fazekasova, E. W. F. Lam, I. Soeiro, G. Lombardi, F. Dazzi. 2007. Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 83(1), 71–6.
- Ramirez, J. M., S. Gerbal-Chaloin, O. Milhavet, B. Qiang, F. Becker, S. Assou, J. De Vos. 2011. Brief report: Benchmarking human pluripotent stem cell markers during differentiation into the three germ layers unveils a striking heterogeneity: All markers are not equal. *Stem Cells*, 29(9), 1469–1474.
- Ranera, B., J. Lyahyai, A. Romero, F.J. Vázquez, A.R. Remacha, M.L. Bernal, I. Martín-Burriel. 2011. Immunophenotype and gene expression profiles of cell surface markers of mesenchymal stem cells derived

- from equine bone marrow and adipose tissue. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2), 147–154.
- Rani, S., A.E. Ryan, M.D. Griffin, T. Ritter. 2015. Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Mol Ther*, 23(5), 812–823.
- Raoufi, M. F., P. Tajik, M.M. Dehghan, F. Eini, A. Barin. 2011. Isolation and differentiation of mesenchymal stem cells from bovine umbilical cord blood. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 46(1), 95–9.
- Rehman, J. 2004. Secretion of Angiogenic and Antiapoptotic Factors by Human Adipose Stromal Cells. *Circulation*, 109(10), 1292–1298.
- Reinders, M. E. y M.J. Hoogduijn. 2014. NK Cells and MSCs: Possible Implications for MSC Therapy in Renal Transplantation. *Journal of Stem Cell Research & Therapy*, 4(2), 1000166.
- Ren, K. y R. Dubner. 2010. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nature medicine*. 16:1267–1276.
- Ren, G., J. Su, L. Zhang, X. Zhao, W. Ling, A. L’huillie, Y. Shi. 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 27(8), 1954–62.
- Ren, G., L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A.I. Roberts, Y. Shi. 2008. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), 141–50.
- Renzi, S., S. Riccò, S. Dotti, L. Sesso, S. Grolli, M. Cornali, M. Ferrari. 2013. Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: A clinical report. *Research in Veterinary Science*, 95(1), 272–277.
- Ridder, D. D., V. Nowé, D. Ph, E.T. Al. 2004. F Unctional a Natomy of the H Uman C Ochlear N Erve and I Ts R Ole in M Icrovascular, 54(2), 381–390.
- Rodbell, M., y A. Jones. 1966. Metabolism of isolated fat cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 241(july), 140–142.
- Rolandsson, S., y A. Sjöland. 2014. Primary mesenchymal stem cells in human transplanted lungs are CD90/CD105 perivascularly located tissue-resident cells. *BMJ Open Respiratory Research*, 1, 1–12.
- Rombouts, W. J., R. E. Ploemacher. 2003. Primary murine MSC show highly efficient homing to the bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia*. 17: 160-170
- Rooney, W. D., T.M. Barbara, T. M., C.S. 1963. Metabolism of isolated fat cells. *Springer*. 239, 674–681.
- Ryan, J. M., F. P. Barry, J. M. Murphy, B. P. Mahon. 2005. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal of Inflammation (Lon)*, 2, 8.
- Ryu, Y. J., T. J. Cho, D. S. Lee, J. Y. Choi, J. Cho. 2013. Phenotypic characterization and in vivo localization of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Molecules and Cells*, 35(6), 557–64.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono. 2008. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, vol. 133, no. 5, pp. 775–787.
- Saldaña, L., G. Vallés, F. Bensiamar, F.J. Mancebo, E. Garcia-Rey, N- Vilaboa. 2017. Paracrine interactions between mesenchymal stem cells and macrophages are regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Scientific Reports*. 7: 14618
- Salem, M. L. 2011. Triggering of toll-like receptor signaling pathways in T cells contributes to the anti-tumor efficacy of T cell responses. *Immunology Letters*. 137:1-2, 9–14.
- Sato, K., K. Ozaki, I. Oh, A. Meguro, K. Hatanaka, T. Nagai, K. Ozawa. 2007. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Immunobiology*, 109(1), 228–235.
- Schäffler, A., y C. Büchler. 2007. Concise review: adipose tissue-derived stromal cells--basic and clinical implications for novel cell-based therapies. *Stem Cells*, 25(4), 818–827.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, S. Rose-John. 2011. The pro and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*. 1813(5):878-88
- Schnabel, L. V., L. A. Fortier, C. Wayne McIlwraith, K. M. Nobert. 2013. Therapeutic use of stem cells in horses: Which type, how, and when? *Veterinary Journal*, 197(3), 570–577.
- Schnabel, L. V., M. E. Lynch, M. C. H. Van Der Meulen, A. E. Yeager, M. A. Kornatowski, A. J. Nixon. 2009. Mesenchymal stem cells and insulin-like growth factor-I gene-enhanced mesenchymal stem cells improve structural aspects of healing in equine flexor digitorum superficialis tendons. *Journal of Orthopaedic Research*, 27(10), 1392–1398.
- Schurgers, E., H. Kelchtermans, T. Mitera, L. Geboes, P. Mathys. 2010. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 12, R31

- Selmani, Z., A. Naji, I. Zidi, B. Favier, E. Gaiffe, L. Obert, C. Borg, P. Saas, P. Tiberghien, N. Rouas-Freiss, E. D. Carosella, F. Deschaseaux. 2008. Human leukocyte antigen- G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem Cells*, 26: 1, 212–222.
- Sensebé, L., M. Gadelorge, S. Fleury-Cappellesso. 2013. Production of mesenchymal stromal/stem cells according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(3), 66.
- Seo, B. F., S. N. Jung. 2016. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars. *Stem Cells International*. Article ID 6937976, 8.
- Seshareddy, K., D. Troyer, M. L. Weiss. 2008. Method to Isolate Mesenchymal-Like Cells from Wharton's Jelly of Umbilical Cord. *Methods in Cell Biology*.
- Setoguchi, M., N. Nasu, S. Yoshida, Y. Higuchi, S. Akizuki, S. Yamamoto. 1989. Mouse and human CD14 (myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) primary structure deduced from cDNA clones. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1008(2), 213–222.
- Shademan, M., A. Parham, H. Dehghani. 2016. Enhancement of chondrogenic differentiation potential of equine adipose tissue-derived mesenchymal stem cells using TGF- $\beta$ 3 and BMP-6. *Turk J Biol*. 40: 360-368
- Siachoque, H., N. Satisteban, A. Iglesias-Gamarra, A. 2011. Linfocitos T reguladores: Subpoblaciones, mecanismo de acción e importancia en el control de la autoinmunidad. *Revista Colombiana de Reumatología*, 18(3), 203–220.
- Sibov, T. T., P. Severino, L. C. Marti, L. F. Pavon, D. M. Oliveira, P. R. Tobo, C. A. Moreira-Filho. 2012. Mesenchymal stem cells from umbilical cord blood: Parameters for isolation, characterization and adipogenic differentiation. *Cytotechnology*, 64(5), 511–521.
- Singer, N. G. y A. I. Caplan. 2011. Mesenchymal stem cells: mechanisms of inflammation. *Annual Review of Pathology*, 6, 457–478.
- Smith, R. K. W., M. Korda, G. W. Blunn, A. E. Goodship. 2003. Isolation and implantation of autologous equine mesenchymal stem cells from bone marrow into the superficial digital flexor tendon as a potential novel treatment. *Equine Veterinary Journal*, 35, 99–102.
- Spaas, J. H., M. Oosterlinck, S. Broeckx, M. Dumoulin, J. Saunders, A. Soom, S. A. Van. 2012. Treatment of equine degenerative joint disease with autologous peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: a case report Een degeneratieve gewrichtsaandoening behandeld met autologe equine mesenchymale stamcellen uit het perifeer bloed, 11–16.
- Spaggiari, G. M., A. Capobianco, H. Abdelrazik, F. Becchetti, M. C. Mingari, L. Moretta. 2008. 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.
- Stacey, O. 2009. Equine Osteoarthritis: The Economic Impact | TheHorse.com. Retrieved November 11, 2015, from <http://www.thehorse.com/articles/24074/equine-osteoarthritis-the-economic-impact>
- Stewart, J. 2008. Innate and Acquired Immunity. Search, 2008.
- Sullivan, C.B., R.M. Porter, C.H. Evans, T. Ritter, G. Shaw, F. Barry, J.M. Murphy. 2014. TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  influence the differentiation and migration of murine MSCs independently of the NF-kappaB pathway. *Stem Cell Res Ther*. 5: 104.
- Sun, L., G. Zhu, N.J. Dovichi. 2013. Comparison of LTQ-Orbitrap Velos and Q-Exactive for proteomic analysis of 1-1000 ng RAW 264.7 cell lysate digests. *Rapid communications in mass spectrometry: RCM*. 27(1):157-162
- Suva, D., J. Passweg, S. Arnaudeau, P.H. Meyer y V. Kindler. 2008. In vitro activated human T lymphocytes very efficiently attach to allogenic multipotent mesenchymal stromal cells and trans-migrate under them. *Journal of Cellular Physiology*, vol. 214, no. 3, pp. 588–594.
- Szeto, A., D. A. Nation, A. J. Mendez, J. Dominguez-Bendala, L. G. Brooks, N. Schneiderman, P. M. McCabe. 2008. Oxytocin attenuates NADPH-dependent superoxide activity and IL-6 secretion in macrophages and vascular cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 295(6), E1495–501.
- Takigawa, H., Y. Kitadai, K. Shinagawa, R. Yuge, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui. K. Chayama. 2017. Mesenchymal Stem Cells Induce Epithelial to Mesenchymal Transition in Colon Cancer Cells through Direct Cell-to-Cell Contact. *Neoplasia*. 19:5, 429-438.
- Tang, Q., Y J. A. Bluestone. 2008. The Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nature Immunology*, 9(3), 239–44.
- Tasso, R., C. Ilengo, R. Quarto, R. Cancedda, R. R. Caspi, G. Pennesi. 2012. Mesenchymal stem cells induce functionally active T-regulatory lymphocytes in a paracrine fashion and ameliorate experimental autoimmune uveitis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(2), 786–93.

- Taylor, C. J., E. M. Bolton, S. Pocock, L. D. Sharples, R. A. Pedersen, J. A. Bradley. 2005. Banking on human embryonic stem cells: Estimating the number of donor cell lines needed for HLA matching. *Lancet*, 366(9502), 2019–2025.
- Tholpady, S. S., R. Llull, R. C. Ogle, J. P. Rubin, J. W. Futrell, A. J. Katz. 2006. Adipose tissue: Stem cells and beyond. *Clinics in Plastic Surgery*.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, S. S. Shapiro, M. A. Waknitz, J. J. Swiergiel, V. S. Marshall, J. M. Jones. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5391), 1145–1147.
- Tilley, S. L., T. M. Coffman, B. H. Koller. 2001. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(1), 15–23.
- Timmers, L., S. K. Lim, F. Arslan, J. S. Armstrong, I. E. Hoefler, P. A. Doevendans, D. P. V. de Kleijn. 2008. Reduction of myocardial infarct size by human mesenchymal stem cell conditioned medium. *Stem Cell Research*, 1(2), 129–137.
- Tizard, I. 2009. *Introducción a la Inmunología Veterinaria*. 8ª edición. Elsevier Saunder.
- Tögel, F., K. Weiss, Y. Yang, Z. Hu, P. Zhang, C. Westenfelder. 2007. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*, 292(5), F1626–F1635.
- Tu Z., Q. Li, H. Bu, and F. Lin. 2010. Mesenchymal stem cells inhibit complement activation by secreting factor H. *Stem Cells and Development*, vol. 19, no. 11, pp. 1803–1809.
- Tuli, R., S. Tuli, S. Nandi, X. Huang, P. A. Manner, W. J. Hozack, R. S. Tuan. 2003. Transforming growth factor-beta-mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41227–41236.
- Turner, N. A., S.E. Sartain, S.K. Hui, J.L. Moake. 2015. Regulatory Components of the Alternative Complement Pathway in Endothelial Cell Cytoplasm, Factor H and Factor I, Are Not Packaged in Weibel-Palade Bodies. *PLoS ONE* 10(3): e0121994.
- Uccelli, A., L. Moretta, V. Pistoia. 2006. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *European Journal of Immunology*, 36(10), 2566–73.
- Udehiya, R. K., Amarpal, H. P. Aithal, P. Kinjavdekar, A. M. Pawde, R. Singh, G. Taru Sharma. 2013. Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 743–52.
- Va Buul, G. M., E. Villafuentes, P.K. Bos, J.H. Waarsing, N. Kops, R. Narcisi, H. Weinans, J.A.N. Verhaar, M.R. Bernsen, G.J.V.M. Van Osch. 2012. Mesenchymal stem cells secrete factors that inhibit inflammatory processes in short-term osteoarthritic synovium and cartilage explant culture. *Osteoarthritis and Cartilage* 20. 1186e1196
- van der Kraan, P. M., E. N. Blaney Davidson, A. Blom, W. B. van den Berg. 2009. TGF-beta signaling in chondrocyte terminal differentiation and osteoarthritis. Modulation and integration of signaling pathways through receptor-Smads. *Osteoarthritis and Cartilage*. Elsevier Ltd.
- Van Loon, V. J. F., C. J. W. Scheffer, H. J. Genn, A. C. Hoogendoorn, J. W. Greve. 2014. Clinical follow-up of horses treated with allogeneic equine mesenchymal stem cells derived from umbilical cord blood for different tendon and ligament disorders. *The Veterinary Quarterly*, (September 2014), 1–6.
- Van Zoelen, E.J., I. Duarte, J.M. Hendriks JM, S.P. Van der Woning. 2016. TGFbeta-induced switch from adipogenic to osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: identification of drug targets for prevention of fat cell differentiation. *Stem Cell Res Ther.* 7: 123
- Vandenabeele, F., C. De Bari, M. Moreels, I. Lambrechts, F. Dell'Accio, P. L. Lippens, F. P. Luyten. 2003. Morphological and immunocytochemical characterization of cultured fibroblast-like cells derived from adult human synovial membrane. *Archives of Histology and Cytology*.
- Veldhoen, M., R.J. Hocking, C.J. Atkins, R.M. Locksley, B. Stockinger. 2006. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. 24(2):179-189
- Velthuis, J. H. L., W. M. Mol, W. Weimar, C. C. Baan. 2006. CD4+CD25bright+ regulatory T cells can mediate donor nonreactivity in long-term immunosuppressed kidney allograft patients. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(12), 2955–64.
- Vidal, M. A., S. O. Robinson, M. J. Lopez, D. B. Paulsen, O. Borkhsenius, J. R. Johnson, R. M. Moore, J. M. Gimble. 2008. Comparison of Chondrogenic Potential in Equine Mesenchymal Stromal Cells Derived from Adipose Tissue and Bone Marrow. *Vet Surg.* 37(8): 713–724.

- Vidal, M. A., G. E. Kilroy, M. J. Lopez, J. R. Johnson, R. M. Moore, J. M. Gimble. 2007. Characterization of Equine Adipose Tissue-Derived Stromal Cells: Adipogenic and Osteogenic Capacity and Comparison with Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells. *Veterinary Surgery*, 36(7), 613–622.
- Vignali, D.A.A., L.W. Collison. 2008. Workman. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.*; 8(7):523–532.
- Vu, M., S. DerSarkissian, L. Stevens, S. Mansour, M. Borie, D. Roy, N. Noiseux. 2014. Preconditioning human stem cells with oxytocin to optimize cell therapy for the treatment of cardiovascular disease. *Canadian Journal of Cardiology*, 30(10), S55.
- Wang, Y, Y. Liu, Z. Fan, D. Liu, F. Wang, Y. Zhou. 2017. IGFBP2 enhances adipogenic differentiation potentials of mesenchymal stem cells from Wharton’s jelly of the umbilical cord via JNK and Akt signaling pathways. *PLoS ONE*. 12(8): e0184182
- Waterman, R.S., S.L. Henkle, A.M. Betancourt. 2012. Mesenchymal Stem Cell 1 (MSC1)-Based Therapy Attenuates Tumor Growth Whereas MSC2-Treatment Promotes Tumor Growth and Metastasis. *PLoS ONE* 7(9): e45590.
- Waterman, R.S., S.L. Tomchuck, S.L. Henkle, A. M. Betancourt. 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS ONE* 5(4): e10088.
- Watt, F. M., S. Estrach, C. A. Ambler. 2008. Epidermal Notch signalling: differentiation, cancer and adhesion. *Current Opinion in Cell Biology*.
- Weinlich, R., K.R. Bortoluci, C.F. Chehab, C.H. Serezani, A.G. Ulbrich, M. Peters-Golden, M. Russo, G.P. Amarante-Mendes. 2008. TLR4/MYD88-dependent, LPS-induced synthesis of PGE2 by macrophages or dendritic cells prevents anti-CD3-mediated CD95L upregulation in T cells. *Cell Death Differ*. 15(12):1901-9
- Weissenbach, M., T. Clahsen, C. Weber, D. Spitzer, D. Wirth, D. Vestweber, P.C. Heinrich, F. Schaper. 2004. Interleukin-6 is a direct mediator of T cell migration. *Eur. J. Immunol*. 34: 2895–2906
- Weissman, I. L. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–168.
- Wieder, E. 2003. Dendritic Cells: A Basic Review. *International Society for Cellular Therapy*, (May), 1–6.
- Wiesmann, A., H. J. Bühring, C. Mentrup, H. P. Wiesmann. 2006. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head & Face Medicine*, 2, 8.
- Williams, R. B., L. S. Harkins, C. J. Hammond, J. L. Wood. 2001. Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Veterinary Journal*, 33, 478–486.
- Wood, K. J., A. Bushell y J. Hester. 2012. Regulatory immune cells in transplantation. *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, no. 6, pp. 417–430.
- Wouters, G., S. Grossi, A. Mesoraca, D. Bizzoco, L. Mobili, P. Cignini, C. Giorlandino. 2007. Isolation of amniotic fluid-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Prenatal Medicine*, 1(3), 39–40.
- Wozney, J. M., V. Rosen, A. J. Celeste, L. M. Mitsock, M. J. Whitters, R. W. Kriz, E. A. Wang. 1988. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4885), 1528–1534.
- Xia, W., C. Xie, M. Jiang, M. Hou. 2015. Improved survival of mesenchymal stem cells by macrophage migration inhibitory factor. *Mol Cell Biochem*. 404:11–24
- Xie, J., W. Wang, J. W. Si, X. Y. Miao, J. C. Li, Y. C. Wang, H. Han. 2013. Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells. *Cellular Immunology*, 281(1), 68–75.
- Xu, G., Y. Zhang, L. Zhang, G. Ren y Y. Shi. 2007. The role of IL- 6 in inhibition of lymphocyte apoptosis by mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 361, no. 3, pp. 745–750.
- Xu, J., D. Wang, D. Liu, Z. Fan, H. Zhang, O. Liu, S. Wang. 2012. Allogeneic mesenchymal stem cell treatment alleviates experimental and clinical Sjogren syndrome. *Blood*, 120(15), 3142–3151.
- Xue, X., J. Wu, D. Ricklin, F. Forneris, P. Di Crescenzo, C.Q. Schmidt, J. Granneman, T.H. Sharp, J.D. Lambris, P. Gros. 2017. Regulator-dependent mechanisms of C3b processing by factor I allow differentiation of immune responses. *Nat Struct Mol Biol*. 24(8):643-651.
- Xue, Q., X. Y. Luan, Y. Z. Gu, H. Y. Wu, G. B. Zhang, G. H. Yu, X. G. Zhang. 2010. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. *Stem Cells and Development*, 19(1), 27–38.
- Yagi, H., A. Soto-Gutierrez, B. Parekkadan, Y. Kitagawa, R. G. Tompkins, N. Kobayashi, M. L. Yarmush. 2010. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. *Cell Transplantation*, 19(6), 667–79.
- Yamamoto, N., H. Akamatsu, S. Hasegawa, T. Yamada, S. Nakata, M. Ohkuma, K. Matsunaga. 2007. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. *Journal of Dermatological Science*, 48(1), 43–52.

- Yang, N., B. Baban, C.M. Isales, X.M. Shi. 2015. Crosstalk between bone marrow-derived mesenchymal stem cells and regulatory T cells through a glucocorticoid-induced leucine zipper/developmental endothelial locus-1-dependent mechanism. *FASEB J.*29(9):3954-63.
- Yaraee, R., T. Ghazanfari. 2009. Substance P potentiates TGF- $\beta$ 1 production in lung epithelial cell lines. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*8:19-24.
- Ying, Q. L., J. Nichols, I. Chambers, A. Smith. 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281-292.
- Youn, S.W., L.W. Lee, J. Lee, H. K. Jeong, J.W. Suh, C.H. Yoon, H.J. Kang, H.Z. Kim, G.Y. Koh, B.H. Oh, Y.B. Park, H.S. Kim. 2011. Comp-Ang1 stimulates HIF-1 $\alpha$ -mediated SDF-1 overexpression and recovers ischemic injury through BM-derived progenitor cell recruitment. *Blood*. 117:4376-4386
- Yoon, D., H. Kim, E. Lee, M.H. Park, S. Chung, H. Jeon, C.H. Ahn, K. Lee. 2016. Study on chemotaxis and chemokinesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in hydrogel-based 3D microfluidic devices. *Biomaterials Research*, 20, 25.
- Yu, B., X. Zhang, X. Li. 2014. Exosomes derived from mesenchymal stem cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4142-57.
- Yu, H., D. Fang, S. M. Kumar, L. Li, T. K. Nguyen, G. Acs, X. Xu. 2006. Isolation of a novel population of multipotent adult stem cells from human hair follicles. *The American Journal of Pathology*, 168(6), 1879-1888.
- Zachar, L., D. Bacenková, J. Rosocha. 2016. Activation, homing, and role of the mesenchymal stem cells in the inflammatory environment. *Journal of inflammation research*. 9
- Zafranskaya, M., D. Nizheharodava, M. Yurkevich, G. Ivanchik, Y. Demidchik, H. Kozhukh, A. Fedulov. 2013. PGE2 Contributes to in vitro MSC-Mediated Inhibition of Non-Specific and Antigen-Specific T Cell Proliferation in MS Patients. *Scandinavian Journal of Immunology*, 78(5), 455-462.
- Zhang, L. Y., H. G. Xue, J. Y. Chen, W. Chai y M. Ni. 2016. Genistein induces adipogenic differentiation in human bone marrow mesenchymal stem cells and suppresses their osteogenic potential by upregulating PPAR $\gamma$ . *Exp Ther Med*. 11: 1853-8.
- Zhang, B., Y. Yin, R. C. Lai, S. S. Tan, A. B. H. Choo, S. K. Lim. 2014. Mesenchymal stem cells secrete immunologically active exosomes. *Stem Cells and Development*, 23(11), 1233-44.
- Zhang, D., G. Wei, P. Li, X. Zhou, Y. Zhang. 2014. Urine-derived stem cells: A novel and versatile progenitor source for cell-based therapy and regenerative medicine. *Genes Dis*, 1(1), 8-17.
- Zhang, W., W. Ge, C. Li, S. You, L. Liao, Q. Han, R. C. H. Zhao. 2004. Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells and Development*, 13(3), 263-71.
- Zhang, X., M. Hirai, S. Cantero, R. Ciubotariu, L. Dobrila, A. Hirsh, T. A. Takahashi. 2011. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood: reevaluation of critical factors for successful isolation and high ability to proliferate and differentiate to chondrocytes as compared to mesenchymal stem cells fro. *Journal of Cellular Biochemistry*, 112(4), 1206-18.
- Zhao, Q., H. Ren, Z. Han. 2015. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *Journal of Cellular Immunotherapy*.
- Zimmermann, S., M. Voss, S. Kaiser, U. Kapp, C. F. Waller, U. M. Martens. 2003. Lack of telomerase activity in human mesenchymal stem cells. *Leukemia : Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K.*, 17(6), 1146-1149.
- Zuk, P. A., M. Zhu, H. Mizuno, J. Huang, J. W. Futrell, J. A. Katz, M. H. Hedrick. 2001. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Engineering*, 7(2), 211-228.

# ANEXOS



**Tabla 10:** Set de proteínas compartidas por todos los tratamientos precondicionantes utilizados en el experimento, se describe su nombre sistemático y su ID (Nombre del gen).

| Nombre sistemático  | Nombre del gen |
|---|----------------|
| 72 kDa type IV collagenase  | MMp2           |
| afamin isoform X2   | AFM            |
| alpha-1B-glycoprotein   | A1BG           |
| alpha-2-HS-glycoprotein   | AHSG           |
| alpha-fetoprotein precursor   | AFP            |
| angiotensinogen   | AGT            |
| apolipoprotein A-I  | APOA1          |
| apolipoprotein M  | APOM           |
| Bardet-Biedl syndrome 4 protein isoform X2                                    | BBS4           |
| basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein_ partial | HSPG2          |
| $\beta$ -2-glycoprotein 1   | APOH           |
| cadherin-13 precursor   | CDH13          |
| cation-independent mannose-6-phosphate receptor                               | IGF2R          |
| C-C motif chemokine 7   | CCL7           |
| collagen alpha-1(I) chain   | COL1A1         |
| collagen alpha-1(V) chain   | COL5A1         |
| collagen alpha-1(VI) chain  | COL6A1         |
| collagen alpha-2(I) chain   | COL1A2         |
| collagen alpha-2(V) chain   | COL5A2         |
| collagen alpha-2(VI) chain  | COL6A2         |
| complement C1q tumor necrosis factor-related protein 3 isoform X2             | C1QTNF3        |
| complement component C7   | C7             |
| complement factor H isoform X5  | CFHR4          |
| C-X-C motif chemokine 6 precursor   | CXCL6          |
| decorin precursor   | DCN            |
| fibromodulin precursor  | FMOD           |
| fibronectin   | FN             |
| fibulin-1   | FBLN1          |
| fibulin-2   | FBLN2          |
| follistatin-related protein 1   | FSTL1          |
| GTPase IMAP family member GIMD1   | GIMD1          |
| hemicentin-1  | HMCN1          |
| hemoglobin subunit $\beta$  | HBB            |
| hepatocyte growth factor activator  | HGFA           |
| insulin-like growth factor II precursor                                       | IGF2           |
| keratin_ type I cuticular Ha7   | KRT37          |
| keratin_ type II microfibrillar_ component 7C                                 | K2M2           |
| laminin subunit gamma-1   | LAMC1          |
| latent-transforming growth factor $\beta$ -binding protein 2                  | LTBP2          |
| membrane primary amine oxidase isoform X1                                     | AOC3           |
| metalloproteinase inhibitor 1 precursor                                       | TIMP1          |
| netrin-4  | NTN4           |
| nidogen-1   | NID1           |
| nidogen-2   | NID2           |

|   |          |
|---|----------|
| pantetheinase   | VNN1     |
| pigment epithelium-derived factor precursor   | SERPINF1 |
| plasma kallikrein   | KLKB1    |
| plasma protease C1 inhibitor  | SERPING1 |
| probable E3 ubiquitin-protein ligase DTX2 isoform X2  | DTX2     |
| protein NLRC5   | NLRC5    |
| prothrombin   | F2       |
| putative bifunctional UDP-N-acetylglucosamine transferase and deubiquitinase ALG13 isoform X4 | ALG13    |
| retinol-binding protein 4 precursor   | RBP4     |
| rotatin isoform X1  | RTTN     |
| serotransferrin precursor   | TF       |
| serum albumin precursor   | ALB      |
| serum amyloid P-component   | APCS     |
| SPARC precursor   | SPARC    |
| tenascin  | TNC      |
| thrombospondin-2 precursor  | THBS2    |
| thyroxine-binding globulin  | SERPINA7 |
| transforming growth factor- $\beta$ -induced protein ig-h3_ partial                           | TGFBI    |
| vitamin D-binding protein   | GC       |
| vitamin K-dependent protein S   | PROS1    |
| vitronectin   | VTN      |
| kininogen-1 isoform X1  | KNG1     |
| MHC class I heavy chain precursor   | HLA-A    |
| pancreatic alpha-amylase-like   | AMY2A    |
| phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D isoform X1                               | GPLD1    |
| complement factor I isoform X3  | CFI      |

**Tabla 11:** Proteínas compartidas entre los diferentes tratamientos precondicionantes y el control

| Secreción simultanea                   | Nombre sistemático                                      | Nombre del gen                              |         |
|--|---|---|---------|
| PGE <sub>2</sub> -PGE <sub>2</sub> /SP | alpha-1-antiproteinase 2 precursor                      | SERPINA1                                    |         |
|  | angiopoietin-4 isoform X1                               | TEK   |         |
|  | C-C motif chemokine 2 precursor                         | CCL2  |         |
|  | collagen alpha-1(XI) chain                              | COL11A1                                     |         |
|  | dynactin subunit 5 isoform X2                           | DCTN2                                       |         |
|  | galectin-1  | LGALS1                                      |         |
|  | insulin-like growth factor binding protein-5 precursor  | IGFBP5                                      |         |
|  | insulin-like growth factor-binding protein 4_ partial   | IGFBP4                                      |         |
|  | interleukin-12 receptor subunit $\beta$ -2 isoform X4   | IL12RB2                                     |         |
|  | prostaglandin-H2 D-isomerase precursor                  | PTGDS                                       |         |
|  | protein NDRG2 isoform X2                                | NDRG2                                       |         |
|  | ribonuclease 4  | RNASE4                                      |         |
|  | small integral membrane protein 14                      | C4orf34                                     |         |
|  | SPOC domain-containing protein 1                        | SPOCD1                                      |         |
|  | sushi_ nidogen and EGF-like domain-containing protein 1 | SNED1                                       |         |
|  | PGE <sub>2</sub> -IFN $\gamma$                          | 3-keto-steroid reductase isoform X1         | HSD17B7 |
|  |   | kunitz-type protease inhibitor 1 isoform X1 | SPINT1  |

|   |  |          |
|---|--|----------|
|   | signal peptide_CUB and EGF-like domain-containing protein 3 isoform X1             | SCUBE3   |
|   | tetratricopeptide repeat protein 24  | TTC24    |
|   | vasorin  | VASN     |
|   | SET and MYND domain-containing protein 4 isoform X1                                | SMYD4    |
| PGE <sub>2</sub> -Control                           | β-crystallin S   | CRYGS    |
|   | IGF-like family receptor 1 isoform X1  | IGFLR1   |
|   | signal peptidase complex subunit 3_ partial  | SPCS3    |
| PGE <sub>2</sub> -PGE <sub>2</sub> /SP-IFN $\gamma$ | ubiquitin-like protein ATG12 isoform X1  | ATG12    |
|   | arfaptin-2 isoform X2  | ARFIP2   |
|   | CUB and sushi domain-containing protein 1  | CSMD1    |
|   | EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1                         | EFEMP1   |
|   | laminin subunit gamma-3_ partial   | LAMC3    |
|   | protein AMBP   | AMBP     |
| PGE <sub>2</sub> -PGE <sub>2</sub> /SP-Control      | fibrinogen gamma chain   | FGG      |
|   | interleukin-11   | IL11     |
|   | metalloproteinase inhibitor 2  | TIMP2    |
|   | retinoic acid receptor responder protein 2   | RARRES2  |
|   | sialidase-2 isoform X2   | NEU2     |
|   | tetranectin  | CLEC3B   |
|   | transthyretin  | TTR      |
|   | apolipoprotein D isoform X2  | APOD     |
| PGE <sub>2</sub> -IFN $\gamma$ -Control             | procollagen C-endopeptidase enhancer 1 isoform X2                                  | PCOLCE   |
| PGE <sub>2</sub> /SP-Control                        | receptor tyrosine-protein kinase erbB-2 isoform X2                                 | ERBB2    |
|   | C-C motif chemokine 26   | CCL26    |
|   | chitinase-3-like protein 1   | CHI3L1   |
|   | plasminogen isoform X2   | SERBP1   |
|   | protein NOV homolog  | NOV      |
|   | sushi_ von Willebrand factor type A_ EGF and pentraxin domain-containing protein 1 | SVEP1    |
| PGE <sub>2</sub> /SP-IFN $\gamma$ -Control          | alpha-tectorin   | ITGB1    |
|   | integrin $\beta$ -1 isoform X1   | SERPINE1 |
|   | plasminogen activator inhibitor 1  | FAM180B  |
|   | protein FAM180B  | TRIM45   |
|   | tripartite motif-containing protein 45 isoform X1                                  | TRMT2B   |
|   | tRNA (uracil(54)-C(5))-methyltransferase homolog                                   | APOD     |
| IFN $\gamma$ -Control                               | alpha-1-antitrypsin 2-like   | SERPINA1 |
|   | microfibrillar-associated protein 2  | MFAP2    |
|   | urocortin-3  | UCN3     |
|   | collagen alpha-1(II) chain precursor   | COL2A1   |

**Tabla 12:** Lista de proteínas secretadas de forma independientes por el control y los tratamientos precondicionantes

| Secreción independiente | Nombre sistemático  | Nombre del gen |
|-------------------------|---|----------------|
| Control                 | A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 14 | ADAMTS14       |
|                         | BH3-interacting domain death agonist                              | BID            |
|                         | CD160 antigen   | CD160          |

|                           |  |                 |
|---------------------------|--|-----------------|
|                           | chondroadherin-like precursor  | CHADL           |
|                           | complement C1s subcomponent  | C1S             |
|                           | ecto-ADP-ribosyltransferase 5 isoform X3   | ART3            |
|                           | extracellular matrix protein 1   | ECM1            |
|                           | glutathione peroxidase 3 precursor   | GPX3            |
|                           | glutathione S-transferase P  | GSTP1           |
|                           | laminin subunit alpha-3-like   | LAMA3           |
|                           | macrophage receptor MARCO  | MARCO           |
|                           | neuroserpin  | SERPINI1        |
|                           | prolow-density lipoprotein receptor-related protein 1                            | LRP1            |
|                           | tetratricopeptide repeat protein 34  | TTC34           |
|                           | thyroglobulin  | TG              |
| <b>PGE<sub>2</sub></b>    | A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2-like anosmin-1  | ADAMTS2<br>KAL1 |
|                           | carbohydrate sulfotransferase 4  | CHST4           |
|                           | collagen alpha-1(IX) chain   | COL9A1          |
|                           | C-type lectin domain family 4 member F   | CLEC4F          |
|                           | cytokine receptor-like factor 3  | CRLF3           |
|                           | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 3-like isoform X2 | ENPP3           |
|                           | insulin-like growth factor binding protein-6 precursor                           | IGFBP6          |
|                           | interleukin-22   | IL22            |
|                           | laminin subunit alpha-2 isoform X2   | LAMA2           |
|                           | properdin  | CFP             |
|                           | proprotein convertase subtilisin/kexin type 5 isoform X2                         | PCSK5           |
|                           | protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 5                                    | TGM5            |
|                           | PX domain-containing protein 1_partial   | PXDC1           |
|                           | transmembrane emp24 domain-containing protein 9                                  | TMED9           |
|                           | tumor necrosis factor alpha-induced protein 6 precursor                          | TNFAIP6         |
|                           | von Willebrand factor precursor  | VWF             |
| <b>PGE<sub>2</sub>/SP</b> | β-2-microglobulin precursor  | B2M             |
|                           | interleukin-6 precursor  | IL6             |
|                           | arrestin domain-containing protein 4   | ARRDC4          |
|                           | arylsulfatase D  | ARSD            |
|                           | cell death activator CIDE-B  | CIDEB           |
|                           | chitinase-3-like protein 2   | CHI3L2          |
|                           | coagulation factor XI  | F11             |
|                           | E3 ubiquitin/ISG15 ligase TRIM25   | TRIM25          |
|                           | E3 ubiquitin-protein ligase MSL2   | MSL2            |
|                           | ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 1                 | ENPP1           |
|                           | enteropeptidase  | TMPRSS15        |
|                           | hepatocyte growth factor-like protein isoform X1                                 | MST1            |
|                           | insulin-like growth factor-binding protein 2_partial                             | IGFBP2          |
|                           | laminin subunit alpha-5_partial  | LAMA5           |
|                           | L-amino-acid oxidase   | IL4I1           |
|                           | L-seryl-tRNA(Sec) kinase isoform X2  | PSTK            |
|                           | lysozyme C   | LYZ             |
|                           | macrophage migration inhibitory factor   | MIF             |

|                               |  |          |
|-------------------------------|--|----------|
|                               | matrix Gla protein   | MGP      |
|                               | metallophosphoesterase domain-containing protein 1               | MPPED1   |
|                               | metallothionein-1B   | MT1B     |
|                               | mitogen-activated protein kinase 9 isoform X4                    | MAPK9    |
|                               | orexigenic neuropeptide QRFP                                     | QRFP     |
|                               | pro-epidermal growth factor isoform X4                           | EGF      |
|                               | proteasome subunit $\beta$ type-11                               | PSMB11   |
|                               | proteasome subunit $\beta$ type-2                                | PSMB2    |
|                               | protein CutA isoform X1  | CUTA     |
|                               | Ral guanine nucleotide dissociation stimulator-like 1            | RGL1     |
|                               | S-adenosylmethionine decarboxylase proenzyme                     | AMD1     |
|                               | Semaphorin-3G  | SEMA3G   |
|                               | Sentan   | SNTN     |
|                               | spondin-1  | SPON1    |
| <b>IFN<math>\gamma</math></b> | $\beta$ -1_4-glucuronyltransferase 1                             | B3GNT1   |
|                               | butyrophilin-like protein 2                                      | BTNL2    |
|                               | carboxypeptidase N catalytic chain isoform X1                    | CPN1     |
|                               | C-type lectin domain family 17_ member A isoform X1              | CLEC1A   |
|                               | C-type mannose receptor 2  | MRC2     |
|                               | E3 ubiquitin-protein ligase NEURL3                               | NEURL1B  |
|                               | F-box only protein 44 isoform X3                                 | FBXO3    |
|                               | Ig gamma-1 chain C region  | IGLL1    |
|                               | interleukin-17 receptor C  | IL17RC   |
|                               | laminin subunit $\beta$ -4                                       | LAMB4    |
|                               | NACHT_ LRR and PYD domains-containing protein 12-like isoform X1 | NLRP12   |
|                               | peptidoglycan recognition protein 4 isoform X1                   | PGLYRP4  |
|                               | proteasome subunit $\beta$ type-8                                | PSMB8    |
|                               | protein jagged-1   | JAG1     |
|                               | rootletin  | CROCC    |
|                               | signal peptide_ CUB and EGF-like domain-containing protein 2     | SCUBE2   |
|                               | succinate dehydrogenase assembly factor 2_ mitochondrial         | SDHAF2   |
|                               | sushi repeat-containing protein SRPX isoform X1                  | SRPX     |
|                               | T-cell surface glycoprotein CD8 alpha chain-like                 | CD8A     |
|                               | uncharacterized protein LOC102149743 isoform X3                  | C12orf73 |
|                               | WD repeat-containing protein 72                                  | WDR72    |
|                               | zymogen granule protein 16 homolog B-like                        | ZG16B    |

**Tabla 13:** Regulaciones biológicas asociadas con inmunidad según GO, de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de preconditionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos.

| GO                         | GO Regulación                                 | Número de proteínas |                  |                      |              |
|----------------------------|---|---------------------|------------------|----------------------|--------------|
|                            |   | Control             | PGE <sub>2</sub> | PGE <sub>2</sub> /SP | IFN $\gamma$ |
| <a href="#">GO:0050727</a> | Regulación de la respuesta inflamatoria       | 14                  | 15               | 13                   |              |
| <a href="#">GO:0002673</a> | Regulación de la respuesta inflamatoria aguda | 8                   | 7                | 7                    | 6            |
| <a href="#">GO:0031347</a> | Regulación de la respuesta de defensa         | 18                  | 17               | 21                   | 19           |

|                            |  |    |    |    |    |
|----------------------------|--|----|----|----|----|
| <a href="#">GO:0002682</a> | Regulación de los procesos del Sistema inmune                                | 22 | 19 | 27 | 20 |
| <a href="#">GO:0030449</a> | Regulación de la activación del complemento                                  | 5  |    |    |    |
| <a href="#">GO:0050776</a> | Regulación de la respuesta inmune  | 16 |    | 19 | 12 |
| <a href="#">GO:0002697</a> | Regulación de los procesos efectores inmunes                                 | 8  | 9  | 11 | 8  |
| <a href="#">GO:2000401</a> | Regulación de la migración de linfocitos                                     | 3  |    |    |    |
| <a href="#">GO:0001817</a> | Regulación de la producción de citoquinas                                    |    | 12 | 14 | 10 |
| <a href="#">GO:0002700</a> | Regulación de la producción de mediadores moleculares de la respuesta inmune |    |    | 5  |    |
| <a href="#">GO:0050863</a> | Regulación de la activación de linfocitos T                                  |    |    | 7  |    |
| <a href="#">GO:0051249</a> | Regulación de activación de leucocitos                                       |    |    | 8  |    |
| <a href="#">GO:0045088</a> | Regulación de la respuesta inmune innata                                     |    |    | 8  |    |
| <a href="#">GO:0051140</a> | Regulación de la quimiotaxis de NK   |    | 2  | 2  |    |
| <a href="#">GO:1901222</a> | Regulación de la señalización de NIK/NFkB                                    |    |    | 3  |    |
| <a href="#">GO:0002740</a> | Regulación de la secreción de citoquinas envueltas en la respuesta inmune    |    |    | 2  |    |
| <a href="#">GO:0050707</a> | Regulación de la secreción de citoquinas                                     |    | 5  |    |    |

**Tabla 14:** Regulaciones positivas asociadas con la inmunidad según GO de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de preconditionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos.

| GO                         | Regulación positiva  | Control   | PGE2   | PGE2/SP   | IFN $\gamma$  |
|----------------------------|--|---|--|---|---|
| <a href="#">GO:0002684</a> | <b>Regulación positiva de procesos del Sistema inmune</b>  | RBP4, VNN1, RARRES2, NLRC5, SERPING1, CXCL6, SERPINE1, CCL7, IGF2, MMP2, C7, GPLD1, MARCO, CFI, C1S | LGALS1, TEK, CCL2, VNN1, SERPING1, NLRC5, CCL7, IGF2, RBP4, SERPINE1, MMP2, RARRES2, CFI, C7, CFP, GPLD1 |   | VNN1, IGF2, NLRC5, MMP2, SERPING1, CCL7, CXCL6, CFI, RBP4, C7, GPLD1, PGLYRP4, JAG1 |
| <a href="#">GO:0008284</a> | <b>Regulaciones positivas de la proliferación celular</b>  | ITGB1, IL11, AGT, F2, IGF2, LAMC1, FN1, TIMP1, TNC, FBLN1, CDH13, ERBB2, ECM1                       |  |   |   |
| <a href="#">GO:0050921</a> | <b>Regulación positiva de la quimiotaxis</b>               | RARRES2, CXCL6, CCL7, SERPINE1, CDH13   | CCL2, CCL7, RARRES2, SERPINE1, CDH13, CXCL6  | CDH13, RARRES2, CCL7, CXCL6, SERPINE1, CCL2, IL6  |   |
| <a href="#">GO:0002690</a> | <b>Regulación positiva de la quimiotaxis de leucocitos</b> | RARRES2, CXCL6, CCL7, SERPINE1  | CCL2, CCL7, RARRES2, SERPINE1, CXCL6   | RARRES2, SERPINE1, CCL2, CCL7, CXCL6, IL6   |   |
| <a href="#">GO:0050778</a> | <b>Regulación positiva de la respuesta inmune</b>          |   |  | TEK, LGALS1, VNN1, SERPING1, CFI, C7, CCL2, IGF2, NLRC5, MMP2, GPLD1, PSMB2, PSMB11, IGFBP2, MIF, MAPK9, IL6, B2M |   |

|                            |  |  |  |  |
|----------------------------|--|--|--|--|
| <a href="#">GO:0002699</a> | <b>Regulación positiva de los procesos efectoros inmunes</b>                                 |  | TEK, RBP4, CCL2, MIF, IL6, B2M                               |  |
| <a href="#">GO:0001819</a> | <b>Regulación positiva de la producción de citoquinas</b>                                    |  | TEK, IL12RB2, C1QTNF3, SERPINE1, AGT, CCL2, MAPK9, MIF, IL6  |  |
| <a href="#">GO:0002702</a> | <b>Regulación positiva de la producción de mediadores moleculares de la respuesta inmune</b> |  | TEK, RBP4, MIF, IL6  |  |
| <a href="#">GO:0051251</a> | <b>Regulación positiva de la activación de linfocitos</b>                                    |  | LGALS1, VNN1, CCL2, IGF2, MIF, IGFBP2, IL6                   |  |
| <a href="#">GO:0031349</a> | <b>Regulación positiva de la respuesta de defensa</b>  |  | KLKB1, SERPINE1, AGT, NLRC5, MMP2, PSMB11, PSMB2, MAPK9, IL6 | NLRC5, KLKB1, AGT, MMP2, SERPINE1, PGLYRP4, IL17RC, NLRP12 |
| <a href="#">GO:0050870</a> | <b>Regulación positiva de la activación de células T</b>                                     |  | LGALS1, VNN1, CCL2, IGF2, IGFBP2, IL6                        |  |
| <a href="#">GO:0010759</a> | <b>Regulación positiva de la quimiotaxis de macrófagos</b>                                   |  | RANRES2  |  |
| <a href="#">GO:0051024</a> | <b>Regulación positiva de la secreción de inunoglobulinas</b>                                |  | RBP4, IL6  |  |
| <a href="#">GO:0050729</a> | <b>Regulación positiva de la respuesta inflamatoria</b>                                      |  |  | AGT, KLKB1, SERPINE1, IL17RC, NLRP12                       |
| <a href="#">GO:0045345</a> | <b>Regulación positiva de los procesos de biosíntesis del MHC de clase I</b>                 |  |  | NLRC5, NLRP12  |

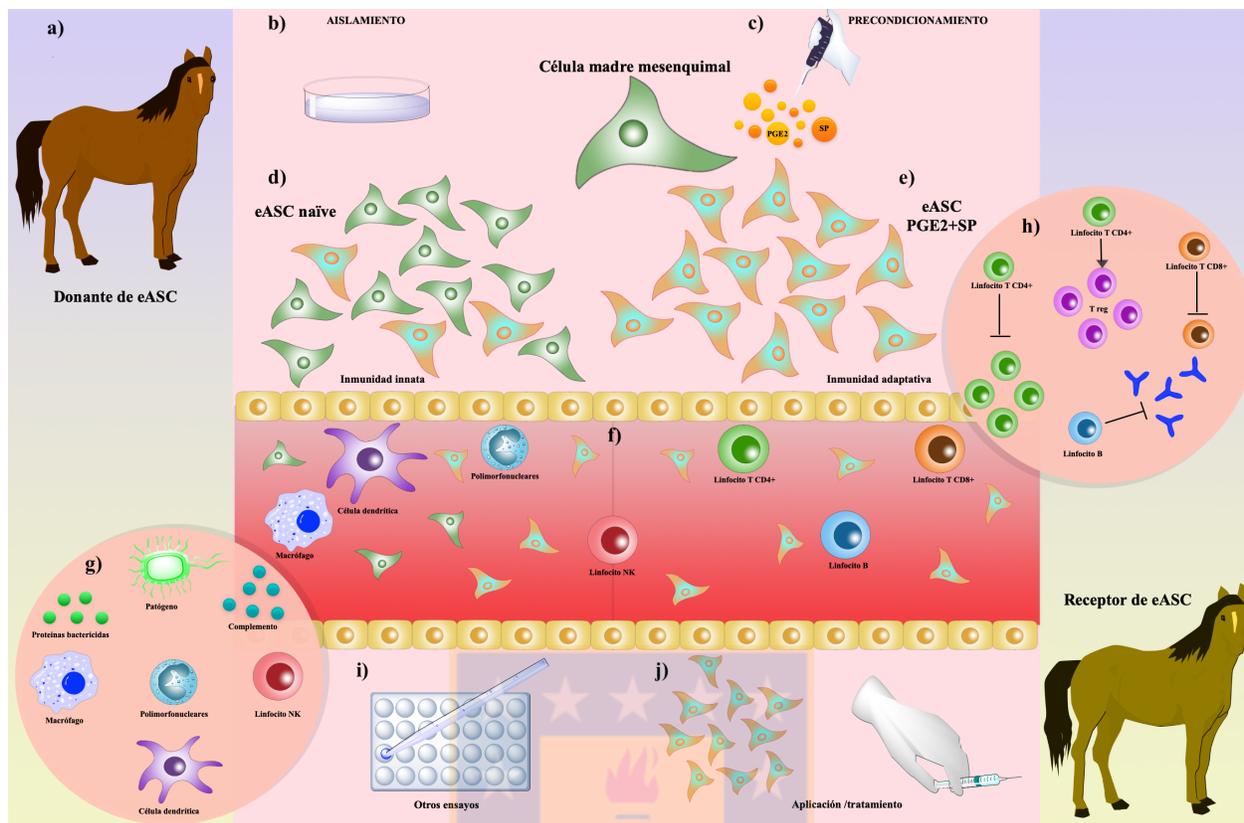


**Tabla 15:** Regulaciones negativas asociadas con la inmunidad según GO, de las proteínas secretadas por las eASC en los distintos tratamientos de preconditionamiento y el número de proteínas encontradas en cada uno de ellos.

| GO                         | Regulación negativa   | Control | PGE2 | PGE2/SP  | IFN $\gamma$ |
|----------------------------|---|---------|------|--|--------------|
| <a href="#">GO:0002683</a> | <b>Regulación negativa de los procesos del Sistema inmune</b> |         |      | SERPINE1, HLA-A, APOA1, AMBP, APCS, CCL2, NLRC5, ERBB2, MIF,                                   |              |
| <a href="#">GO:0008285</a> | <b>Regulación negativa de la proliferación celular</b>        |         |      | IGFBP5, PTGDS, NDRG2, CDH13, RBP4, APOH, AGT, TIMP2, FBLN1, SPARC, SERPINF1, GPLD1, ERBB2, IL6 |              |

|                            |  |   |  |   |  |
|----------------------------|--|---|--|---|--|
| <a href="#">GO:0050777</a> | <b>Regulación negativa de la respuesta inmune</b>  |   | SERPING1, NLRC5, AMBP, APOA1, HLA-A                                  | SERPING1, AMBP, APOA1, HLA-A, NLRC5                         | HLA-A, NLRC5, SERPING1, AMBP, APOA1, PGLYRP4                   |
| <a href="#">GO:0001818</a> | <b>Regulación negativa de la producción de citoquinas</b>                                  | ATG12, APOA1, C1QTNF3, NLRC5, FN1, FBLN1, GSTP1, APOD               | NDRG2, C1QTNF3, NLRC5, FN1, APOA1, ATG12,                            | NDRG2, APOA1, C1QTNF3, FN1, FBLN1, NLRC5, TRIM25            | FN1, FBLN1, NLRC5, APOA1, C1QTNF3, PGLYRP4, NLPR12             |
| <a href="#">GO:0031348</a> | <b>Regulación negativa de la respuesta de defensa</b>                                      | APCS, APOA1, NLRC5, C1QTNF3, SERPING1, SERPINF1, HLA-A, LAMA3, APOD | TEK, SERPING1, C1QTNF3, NLRC5, APOA1, APCS, SERPINF1, TNFAIP6, HLA-A | TEK, SERPING1, C1QTNF3, APOA1, APCS, NLRC5, SERPINF1, HLA-A | HLA-A, SERPINF1, NLRC5, SERPING1, C1QTNF3, APCS, APOA1, NLRP12 |
| <a href="#">GO:0050728</a> | <b>Regulación negativa de la respuesta inflamatoria</b>                                    | APCS, APOA1, C1QTNF3, SERPINF1, GSTP1, APOD                         | TEK, C1QTNF3, APOA1, APCS, SERPINF1, TNFAIP6                         | TEK, APOA1, C1QTNF3, APCS, FTSL1,                           | SERPINF1, C1QTNF3, APCS, NLRP12, APOA1                         |
| <a href="#">GO:0050711</a> | <b>Regulación negativa de la secreción de interleuquina 1</b>                              |   |  |   | APOA1, NLRP12  |
| <a href="#">GO:0071638</a> | <b>Regulación negativas de la producción de la proteína 1 quimiotractante de monocitos</b> | C1QTNF3, GSTP1, APOD  |  |   |  |
| <a href="#">GO:0001960</a> | <b>Regulación negativa de las vías de señalización mediadas por citoquinas</b>             | APOA1, NLRC5, ECM1, GSTP1   |  |   |  |
| <a href="#">GO:0050710</a> | <b>Regulación negativa de la secreción de citoquinas</b>                                   | APOA1, C1QTNF3, FN1, FBLN1,   | C1QTNF3, APOA1, FBLN1, FN1,  | APOA1, C1QTNF3, FN1, FBLN1, IL6                             | FN1, FBLN1, C1QTNF3, APOA1, NLRP12                             |
| <a href="#">GO:0030336</a> | <b>Regulación negativa de la migración</b>   | APOH, TIMP1, SERPINF1, LRP1, APOD, SERPINE1,                        | IGFBP5, CCL2, APOH, SERPINE1, TIMP1, SERPINF1                        |   |  |
| <a href="#">GO:0045824</a> | <b>Regulación negativa de la respuesta inmune innata</b>                                   | NLRC5, SERPING1, HLA-A  | SERPING1, NLRC5, HLA-A   |   | HLA-A, NLRC5, SERPING1   |





**Figura 42:** Esquema resumen: Las células provenientes desde a) un equino donante, b) son aisladas y cultivadas in vitro. Una vez que se cuenta con una apropiada concentración de células, estas son c) preconditionadas con PGE2 combinada con SP. En un estado d) virgen, las células secretan proteínas asociadas principalmente al sistema inmune innato, mientras que e) las células preconditionadas, secretan proteínas que participan en el sistema inmune innato y en el sistema inmune adaptativo. Dentro de los fenómenos que se generan encontramos principalmente f) funciones inmunomoduladoras sobre poblaciones de células del sistema inmune como macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares, linfocitos NK, linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+ y linfocitos B. En la g) inmunidad innata junto a efectos sobre células, se secretan proteínas que están involucradas en la respuesta de defensa contra patógenos, activación del complemento y proteínas bactericidas. Mientras que en h) sistema inmune adaptativo, son efectos principalmente celulares los que se generan, como el bloqueo de la proliferación de linfocitos T CD4+, bloqueo de la diferenciación terminal de linfocitos B, bloqueo de la diferenciación desde linfocitos T CD8+ hacia linfocitos T citotóxicos y el cambio de genotipo desde linfocitos T CD4+ hacia linfocitos T reg. A pesar de los resultados obtenidos, i) es necesario ahondar aun más en las proteínas encontradas en el preconditionamiento de PGE2 y SP, las cuales según la literatura, cuentan con funciones importantes, que le otorgan a la terapia celular, abarcar una mayor cantidad de procesos inmunológicos y de esta manera, j) poder utilizar esta herramienta para el uso de células alogénicas (derivadas de un donante) o sus derivados secretantes como tratamiento.