



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CELULARES Y PERFIL
INMUNOLÓGICO DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES
EQUINAS SUPLEMENTADAS CON LISADO PLAQUETARIO**

SILVIA GIMENA AVILA AGUIRRE

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

**URUGUAY
2022**



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

**EFFECTO SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS CELULARES Y PERFIL
INMUNOLÓGICO DE LAS CÉLULAS ESTROMALES MESENQUIMALES
EQUINAS SUPLEMENTADAS CON LISADO PLAQUETARIO**

SILVIA GIMENA AVILA AGUIRRE

Dr. Kevin Yaneselli
Director de Tesis

Dra. Andrea Rossi
Co-directora

Dra. Agustina Algorta
Co-directora

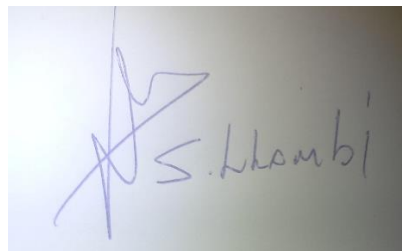
Dra. Analía Rial
Co-directora

URUGUAY
2022

**INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE
DEFENSA DE TESIS**



**Dr. Uruguaysito Benavides
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay**



**Dra. Silvia Llambí
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay**



**Dr. Rodrigo Puentes
Facultad de Veterinaria
Universidad de la República- Uruguay**

ACTA DEL TRIBUNAL



Facultad de Veterinaria
Universidad de la República
Uruguay



ACTA DE TESIS DE MAESTRÍA

ORIENTACIÓN: Salud animal

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: 22/11/2022

TRIBUNAL: Uruguaysito Benavidez, Silvia Llambi, Rodrigo Puentes

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4344495-4	Gimena Ávila Aguirre	S.S.S.	12

NOTA: La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

TRIBUNAL

Silvia Llambi

Rodrigo Puentes

Jruguaysito Benavides

FIRMA

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores Dr. Kevin Yaneselli y Dra. Agustina Algorta que me permitieron acompañarlos en este proyecto compartiendo su conocimiento, tiempo y energía. Motivándome para recorrer este lindo camino que es la investigación.

A la Dra. Analía Rial y Dra. Andrea Rossi por aceptar ser mis co-tutoras de esta tesis de maestría, permitiendo realizar experimentos en su laboratorio y brindando generosamente sus conocimientos y consejos.

A la Dres. Laureana de Brun, Lic. Leticia Diana y Rodrigo Puentes por aprobar realizar una pasantía en sus laboratorios.

A la Dra. Sabrina Castro por su tiempo y colaboración a la hora de trabajar con los equinos.

A el equipo del Laboratorio de Endocrinología y Metabolismo Animal por posibilitar el uso de equipos e infraestructura para actividades de esta tesis.

Listado de abreviaturas

AD-MSC	<i>adipose tissue-derived mesenchymal stomal/stem cells</i>
eAD-MSC	<i>equine Adipose tissue-derived mesenchymal stomal/stem cells</i>
ARN	ácido ribonucleico
ATB	antibiótico
bFGF	factor de crecimiento de fibroblastos básico
CFU	<i>colony forming units-fibroblastic</i>
Con A	concavalina A
CP	concentrado plaquetario
CPA	concentrado plaquetario A 10X
CPB	concentrado plaquetario B 5X
CTGF	factor de crecimiento de tejido conectivo
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DT	<i>cell doubling times</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epitelial
ESCs	<i>embryonic stem cells</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
HGF	factor de crecimiento de hepatocitario
IBMX	3 iso-butil -1-metilxantina
IGF-1	factor de crecimiento similar a la insulina-1
iPSCs	<i>induced of pluripotent stem cells</i>
LP	lisado plaquetario
LPA	lisado plaquetario concentrado A
LPB	lisado plaquetario concentrado B
LPS	lipopolisacaridos
MHC I	complejo mayor de histocompatibilidad I
MHC II	complejo mayor de histocompatibilidad II
MTT	<i>(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)</i>
MSC	mesenchymal stem cells
NK	<i>natural killer</i>
PBS	solución tampón fosfato salino
PDGF-BB	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PLT	plaquetas
RT-qPCR	<i>real time quantitative polymerase chain reaction</i>
SFB	suero fetal bovino
TA	tejido adiposo
Tm	temperatura de melting
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta
WBC	leucocitos

Listado de tablas

Tabla I. Secuencias de primers utilizados para analizar el perfil de expresión por RT-qPCR	19
Tabla II. Cuantificación de concentración de plaquetas y leucocitos	21
Tabla III. Cuantificación de factores de crecimiento TGF- β y PDGF-BB	22
Tabla IV. Análisis intracondición del DT para células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino eAD-MSc en las 3 condiciones de cultivo.	25
Tabla V. Análisis de la proliferación a través del ensayo de MTT a nivel de intracondición para las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino eAD-MSc cultivadas en los diferentes suplementos (n=7).	27
Tabla VI. Análisis de expresión de MHC II	31
Tabla VII. Eficiencia de genes analizados.....	34

Listado de Figuras

- Figura 1.** Concentración de plaquetas (PLT) y leucocitos (WBC) de los hemoderivados utilizados para conformar el LPA, LPB de equinos (n=5). A) Gráfico de concentración de plaquetas. B) Gráfico concentración de leucocitos. Análisis de plaquetas se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal-Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's. Para los datos de leucocitos, se utilizó ANOVA y como post-hoc Tukey. *p< 0,05..... 20
- Figura 2.** Comparación de los factores de crecimiento TGF- β (A) y PDGF-BB (B) para las diferentes formulaciones de concentrados plaquetarios (CP) y lisados plaquetarios (LP) (n=5). Los datos obtenidos son representados como un gráfico de Tukey. Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal-Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. * p< 0,05..... 22
- Figura 3.** Imágenes microscópicas 10x de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino (eAD-MSC) cultivadas en las tres condiciones A) LPA, B) LPB y C) SFB, respectivamente..... 23
- Figura 4.** Tiempo de doblaje (DT) de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Los resultados del DT por pasaje (n=7) se expresan como gráfico de Tukey. Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal -Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. ° Representa valor atípico. 24
- Figura 5.** Proliferación de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Se determinó en los pasajes P₃ y P₄ para las 3 condiciones de cultivo a lo largo de 7 días mediante el ensayo MTT (n=7). A) Gráfico proliferación celular en P₃. B) Gráfico proliferación celular en P₄. Los resultados se representan como valor de mediana (rango intercuartílico Q25; Q75). Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal -Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. 26
- Figura 6.** Imágenes macroscópicas de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Se muestra colonias celulares cultivadas en placa de seis hoyos LPA, LPB y SFB respectivamente. 28
- Figura 7.** Evaluación de la capacidad clonogénica determinando la UFC-F de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Gráfico representa el número de colonias. Los datos fueron analizados con la prueba paramétrica ANOVA y Tukey como *post-hoc*. ° Representa valor atípico. 29
- Figura 8.** Ensayo de tridiferenciación *in vitro* de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. (A, D, G) linaje adiposo tinción realizada con colorante Oil Red O imagen 40x con una flecha se indican las vacuolas. (B, E, H) linaje cartilaginoso tinción con colorante Alcian Blue imagen 4x con una flecha se indica la matriz. (C, F, I) linaje óseo tinción con Alizarin Red S imagen 10x se indica con una flecha la matriz mineralizada. Los controles negativos se muestran a modo de ejemplo para la condición SFB (J, K y L)..... 30
- Figura 9.** Expresión de MHC II en células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino, en el pasaje 3, cultivadas en presencia LPA, LPB o SFB (n=7). Se muestran los resultados de una de las muestras (a modo representativo) en la que se representa mediante un gráfico dotplot

el parámetro FSC (Forward Scatter) vs MHC II (A), y se muestran las regiones definidas para identificar la población celular con expresión de MHC II y la población que no expresa este marcador. B) Histogramas para MHC II, mostrando la población positiva y negativa para MHC II..... 32

Figura 10. Análisis por citometría de flujo de células estromales mesenquimales equinas derivadas de tejido adiposo, en el pasaje 3, cultivadas en presencia LPA, LPB o SFB (n=7 para cada condición). A) Se representa el porcentaje de células que expresan el marcador MHC II. B) Se representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la población de células que expresan MHCII. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica ANOVA Kruskal -Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's. Los datos se representan como gráfico de Tukey..... 32

Figura 11. qPCR optimizada para el gen MHC II a partir de ARN de muestras de sangre con estimulación mitogénica (LPS o Con A) y sin estimular (PBS). (A) Se muestran las curvas de amplificación. (B) Se muestran las curvas de disociación..... 34

35

Figura 12. Validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (A) Gráfica de Ct vs el \log_{10} (dilución). Un pool de los ADNc fue preparado a partir de ARN de las muestras de sangre, fueron diluidas al medio, y cada dilución fue utilizada como molde para las qPCR. La recta obtenida en el gráfico fue ajustada mediante un análisis de regresión lineal. Las pendientes de cada qPCR fueron utilizadas para calcular las eficiencias. (B) Los ΔCt ($Ct_{GAPDH} - Ct_{gen\ problema}$) para cada dilución fueron calculados y graficados en función del \log_{10} (dilución). Los datos fueron ajustados por regresión lineal, y luego fue calculada la pendiente de la curva. 35

Figura 13. Niveles relativos del ARNm en P3 de células estromales mesenquimales (eAD-MSc) suplementadas con LPA, LPB y SFB. Para todos los genes, las barras corresponden a la Media \pm SEM de los niveles relativos de ARNm de MHC I (A), MHC II (B), y IL-6 (C). Las barras negras corresponden a LPA, las rojas a LPB y las verdes a SFB. Para cada muestra, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen GAPDH y relativizados al promedio de la condición SFB. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica ANOVA Kruskal -Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's. 37

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	I
Listado de abreviaturas	II
Listado de tablas	III
Listado de Figuras.....	IV
ÍNDICE	VI
RESUMEN	VIII
SUMMARY	IX
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Células estromales mesenquimales.....	1
1.2 Aplicación terapéutica de las MSC.....	1
2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	3
2.1 Suero fetal bovino como suplemento de referencia “ <i>gold standard supplement</i> ”.....	3
2.2 Desarrollo de medio libre de componentes xenogénicos.....	4
2.3 Lisado plaquetario.....	6
2.4 Efecto del uso de LP sobre las características de las MSC.....	7
2.5 Uso terapéutico de MSC cultivadas en LP	8
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	10
4.1 Hipótesis	10
4.2 Objetivo general.....	10
4.3 Objetivos específicos:	10
5 ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN	11
6 MATERIALES Y MÉTODOS	11
6.1 Preparación de lisado plaquetario	11
6.1.1 Cuantificación de factores de crecimiento	12
6.2 Aislamiento y crioconservación de las eAD-MSD.....	12
6.3 Cultivo de eAD-MSD con LP y SFB.....	13
6.4 Proliferación celular.....	13
6.4.1 Tiempo de duplicación celular (DT)	13
6.4.2 Prueba MTT.....	14
6.5 Capacidad clonogénica	14
6.6 Ensayo de Tridiferenciación	14
6.7 Inmunofenotipificación de MHC II	15

6.8	Expresión de genes asociados a la respuesta inmune	16
6.8.1	Crioconservación de muestra para análisis del perfil de expresión génica	16
6.8.2	Estimulación mitogénica de sangre entera equina.....	16
6.8.3	Extracción de ARN.....	16
6.8.4	Reacción Retrotranscripción (RT).....	17
6.8.5	qPCR.....	18
6.9	Análisis Estadístico.....	19
7	RESULTADOS	20
7.1	Composición del LP.....	20
7.1.1	Cuantificación de factores de crecimiento	21
7.2	Aislamiento y criopreservación de las eAD-MSc.....	22
7.3	Proliferación celular.....	23
7.3.1	Tiempo de doblaje celular	23
7.3.2	Prueba MTT.....	25
7.4	Capacidad clonogénica	28
7.5	Ensayo de tridiferenciación <i>in vitro</i>	29
7.6	Perfil inmunológico	31
7.6.1	Marcador inmunogénico.....	31
7.6.2	Expresión de genes asociados a la respuesta inmune	33
8	DISCUSIÓN	38
9	CONCLUSIONES.....	44
10	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

RESUMEN

Las células estromales mesenquimales (MSC: *mesenchymal stromal/stem cells*) presentan interés científico debido a los efectos beneficiosos en la regeneración tisular e inmunomodulación. Sin embargo, es necesario expandirlas *in vitro* utilizando suero fetal bovino (SFB) como suplemento de cultivo. No obstante, el SFB presenta algunas desventajas como la contaminación celular con xenoproteínas y que dado que para su obtención se sacrifican fetos bovinos su producción impacta sobre el bienestar animal. Este trabajo está enfocado en estudiar el efecto del reemplazo del SFB por el lisado plaquetario (LP) alogénico en el cultivo de MSC derivadas de tejido adiposo equino (eAD-MSC). Para ello, se establecieron 3 condiciones de cultivo para eAD-MSC (n=7) suplementados con 10% de LP alogénico con concentración alta (LPA), concentración media (LPB) y SFB como control. Se determinó la concentración plaquetaria y los factores de crecimiento presentes en los suplementos. Posteriormente, se evaluó la cinética de crecimiento, capacidad clonogénica y tridiferenciación *in vitro* para las 3 condiciones de cultivo. Además, se inmunofenotipificó las eAD-MSC con el marcador MHC II mediante citometría de flujo (n=7). Por otra parte, se estudió la expresión de estos genes: MHC I, MHC II, IL10, IL6 y TNF- α de las eAD-MSC (n=3) por RT-qPCR. Como resultado, se logró concentrar 5,8 y 3 veces más plaquetas que el valor basal del plasma para LPA y LPB. Se encontró una mayor concentración del factor TGF- β en la formulación LPA en relación a la concentración basal. Con respecto a PDGF-BB los concentrados LPA y LPB presentaron mayor concentración de este factor. La cinética de crecimiento, capacidad clonogénica y multipotencialidad *in vitro* de las eAD-MSC fue similar para las condiciones de LP en comparación al control. En la inmunotipificación los resultados indican que presentan similar expresión en la superficie celular de MHC II para todas las condiciones. Por otra parte, se pudo observar que las tres condiciones (LPA, LPB y SFB) expresan similares niveles de ARNm de MHC I y MHC II. En relación a genes inmunomoduladores, las tres condiciones expresaron niveles similares de ARNm de IL-6, mientras que los genes TNF- α e IL-10 no fueron detectados. Entonces, la formulación de LPB parece ser más conveniente que LPA debido que ante menor concentración plaquetaria se obtiene resultados similares en el cultivo celular y es más eficiente en cuanto a volumen de sangre requerido para su formulación. En suma, este trabajo permitió evaluar el LP cómo reemplazo del SFB para el cultivo de eAD-MSC, no encontrando diferencias entre las condiciones en los parámetros analizados en este trabajo. Por ello, estos resultados nos permiten sugerir que es posible sustituir el SFB con el lisado plaquetario alogénico para expandir las eAD-MSC *in vitro* ya que conservan sus características celulares e inmunológicas.

SUMMARY

Mesenchymal stromal/ stem cells (MSCs) are of scientific interest due to the beneficial effects on tissue regeneration and immunomodulation. However, they need to be expanded *in vitro* using fetal bovine serum (FBS) as a culture supplement. Nevertheless, FBS has some disadvantages such as cell contamination with xenoproteins and that since bovine fetuses are sacrificed to obtain it, its production impacts on animal welfare. This work is focused on studying the effect of replacing FBS with allogeneic platelet lysate (PL) in the culture of equine adipose tissue derived MSCs (eAD-MSCs). For this, 3 culture conditions were established for eAD-MSCs (n = 7) supplemented with 10% allogeneic PL with high concentration (PLA), medium concentration (PLB) and FBS as a control. The platelet concentration and growth factors present in the supplements were determined. Subsequently, growth kinetics, clonogenic capacity and *in vitro* tridifferentiation were evaluated for the 3 culture conditions. In addition, eAD-MSCs was immunophenotyped with the MHC II marker by flow cytometry (n=7). On the other hand, the expression of these genes was studied: MHC I, MHC II, IL10, IL6 and TNF- α of the eAD-MSCs (n = 3) by RT-qPCR. As a result, 5.8 and 3 times more platelets than baseline plasma for PLA and PLB were concentrated. A higher concentration of the TGF- β factor was found in the PLA formulation in relation to the baseline concentration. With respect to PDGF-BB, PLA and PLB concentrates showed higher concentrations of this factor. The growth kinetics, clonogenic capacity and *in vitro* multipotentiality of eAD-MSCs were similar for PL conditions compared to control. In immunotyping, the results indicate that they present similar expression on the cell surface of MHC II for all conditions. On the other hand, it was observed that the three conditions (PLA, PLB and FBS) express similar levels of mRNA of MHC I and MHC II. In relation to immunomodulatory genes, all three conditions expressed similar levels of IL-6 mRNA, while TNF- α and IL-10 genes were not detected. So, the formulation of PLB seems to be more convenient than PLA because lower platelet concentration yields similar results in cell culture and is more efficient in terms of blood volume required for its formulation. In summary, this work allowed to evaluate the PL as a replacement of FBS for the culture of eAD-MSCs, finding no differences between the conditions in the parameters analyzed in this work. Therefore, these results allow us to suggest that it is possible to replace FBS with allogeneic platelet lysate to expand eAD-MSCs *in vitro* since they retain their cellular and immunological characteristic.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Células estromales mesenquimales

Las células estromales mesenquimales, descritas en la literatura internacional del inglés como *mesenchymal stromal/stem cells* (MSC), también conocidas como células madre/troncales mesenquimales, son células multipotentes, de origen no hematopoyético, con capacidad de autorrenovación (Dias et al., 2019). Tienen un gran atractivo en la aplicación de terapias de medicina regenerativa, tanto en medicina humana como veterinaria dada sus propiedades inmunomoduladoras y regenerativas (Clark et al., 2016; Yaneselli et al., 2019). Estas células son relativamente fáciles de aislar y pueden expandirse en cultivos de laboratorio (Dias et al., 2019). Se pueden obtener de diferentes tejidos como médula ósea, tejido adiposo, sangre periférica, cordón umbilical, músculo tejido conectivo, pulpa dental, placenta y líquido amniótico en humanos (Clark et al., 2016; Ludicone et al., 2014). Estas, se pueden clasificar en células madre embrionarias (*embryonic stem cells*: ESCs) células madre pluripotentes inducidas (*induced of pluripotent stem cells*: iPSCs) y células madre adultas como son las MSC. Las diferencias radican en el origen, en la plasticidad, en el potencial de diferenciación y en el riesgo de tumorigénesis (Dias et al., 2019)

Las MSC fueron definidas a partir de investigaciones publicadas por *The International Society for Cellular Therapy* (ISCT) que propuso criterios mínimos para identificarlas. Las células estromales multipotentes deben presentar adherencia al plástico en condiciones estándares de cultivo, potencial de diferenciación *in vitro* en los linajes adiposo, condrogénico y osteogénico, y además, expresar marcadores de superficie específicos como CD105, CD73, CD90 y ausencia de CD45, CD34, (CD14 o CD11b), (CD79 α o CD19) y HLA-DR (Dominici et al., 2006). Asimismo, los autores las definen como *multipotent mesenchymal stromal cells*, mostrando diferencias en cuanto a la nomenclatura de las MSC.

1.2 Aplicación terapéutica de las MSC

Las MSC tienen el potencial terapéutico para tratar una amplia variedad de enfermedades inflamatorias y degenerativas como osteoartritis, mielopatía degenerativa y laminitis (Cassano et al., 2018). Además, es posible su aplicación clínica en enfermedades inmunomediadas (Clark et al., 2016) úlceras corneales, lesiones tendinosas y quistes óseos (Cassano et al., 2018). En equinos la aplicación más común es en el tratamiento de lesiones musculoesqueléticas (Dias et al., 2019; Vidal et al., 2006). También se ha

estudiado su aplicación en tratamientos de enfermedades respiratorias, reproductivas y oftalmológicas muchas veces combinadas con otros procedimientos (Barrachina et al., 2018).

Si bien se conocen los beneficios de la terapia celular en equinos es importante remarcar que para realizar este tipo de tratamiento es necesario propagar *in vitro* las MSC y que estas se encuentren en un número apropiada para su aplicación (Guercio et al., 2013). Para ello, se utiliza habitualmente como suplemento de cultivo el suero fetal bovino (SFB), que presenta los factores nutritivos, estimulantes del crecimiento y proliferación celular. Siendo eficaz para la mayoría de los tipos de células tanto de seres humanos y animales (Gstraunthaler et al., 2013). Sin embargo, este suplemento de referencia presenta algunas desventajas, como podemos mencionar riesgos clínicos por reacciones adversas debido a proteínas bovinas, agentes infecciosas que pueda presentar y consideraciones éticas sobre su obtención (Hemeda et al., 2014).

2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1 Suero fetal bovino como suplemento de referencia “*gold standard supplement*”

Para un aislamiento exitoso de MSC los protocolos de cultivo requieren medios que contengan como sustrato proteínas, moléculas bioactivas, factores de crecimiento y nutrientes. Hasta ahora, el SFB se ha utilizado como suplemento de medios de cultivo y es considerado como suplemento de referencia, por lo que en la literatura internacional se lo considera como “*gold standard supplement*” (Shih & Burnouf, 2015). A pesar de ser un excelente suplemento para el crecimiento de células de mamíferos presenta algunos aspectos negativos. En particular, para su extracción se sacrifican fetos bovinos mediante punción intracardiaca. En este procedimiento se necesita que el feto tenga al menos 3 meses de lo contrario, el corazón es pequeño para la realización del procedimiento. Un feto con ese desarrollo puede producir alrededor de 150 mL de suero aumentando a 350 mL a los 6 meses y 550 mL al final de la gestación. En base a estos datos se puede estimar la producción global de suero sin procesar alrededor de 500.000 litros al año (Jochems et al., 2002). El procedimiento de extracción puede causar sufrimiento en el bovino, en consecuencia, se ve afectado el bienestar animal generando cuestiones éticas en su utilización debido a que presentan desarrollo de estructuras neurológicas desde los tres meses de gestación permitiéndoles percibir estímulos sensoriales (Jochems et al., 2002). Por otro lado, otra desventaja es la contaminación del SFB con proteínas bovinas, priónicas y contaminantes de origen vírico (Hemeda et al., 2014). Por ejemplo podemos mencionar un estudio donde se evaluaron diferentes lotes comerciales a los que se les realizó una caracterización de diferentes virus como posterior a los procesos de filtrado los autores encontraron agentes como parvovirus y papillomavirus (Sadeghi et al., 2017). Otro agente infeccioso contaminante que se ha detectado en el SFB es micoplasma. De hecho, un estudio reciente evaluó los procesos de irradiación gamma y encontraron contaminación con esta bacteria (Pecora et al., 2020).

La contaminación con xenoproteínas en el uso clínico del SFB es una de las características que más preocupa debido a las potenciales reacciones que puede provocar en el receptor de la terapia (Hemeda et al., 2014; Pilgrim et al., 2022). Dos xenoproteínas bovinas han sido identificadas las cuales son capaces de incorporarse en las MSC como ácido N-glicolilneuramínico (Neu5Gc) y apolipoproteína bovina B-100 (apo-B-100) (Pilgrim et al., 2022). Se evaluó la presencia de la xenoproteína Neu5Gc en cultivos de MSC humanas, encontrando por diferentes técnicas diagnósticas en las células

(Heiskanen et al., 2007). Con respecto a la proteína apoB-100 se detectó su presencia en células tratadas con SFB tanto en ratones como en humanos. Además se pudo comprobar respuesta de los anticuerpos y reacciones de hipersensibilidad (Sakamoto et al., 2007). Un estudio realizado a partir de MSC humanas determinó una concentración de proteínas bovinas de 7 a 30 mg en preparados terapéuticos de 1 millón de células. Además, los mismos autores encuentran respuesta inmune en suero de ratones que fueron tratados previamente con células de su misma especie provenientes de cultivo suplementados con SFB (Spees et al., 2004).

Asimismo, existe evidencia que muestra una respuesta de rechazo a estas proteínas. Una evidencia en medicina equina es el estudio realizado con aplicación de MSC cultivadas con SFB y otro grupo que depletaron este suplemento. Los autores realizaron aplicaciones repetidas intra-articulares de células en ambas condiciones y observaron que posterior a la segunda aplicación de células con SFB había una respuesta clínica evidente con aumento del dolor, en respuesta a un infiltrado celular los autores plantean que este incremento es debido a una respuesta inmune adaptativa siendo esta respuesta inmunológica consecuencia de la xenocontaminación en el grupo cultivado con SFB (Joswig et al., 2017).

Recientemente, Rowland et al. (2021) evaluaron la respuesta inmune en equinos a los cuales se les inyectó MSC de médula ósea expandidas con SFB, y MSC cultivadas con sobrenadante de médula ósea autólogo y alogénico. Los autores reportaron que las células cultivadas sin SFB mostraron menos edema en el sitio de la aplicación. Además realizaron evaluaciones in vitro de porcentajes de muerte celular y observaron una mayor muerte celular en los animales que recibieron el SFB atribuyendo esta observación a los anticuerpos contra SFB que presentaban los equinos por aplicaciones previas (Rowland et al., 2021). En base a los diferentes trabajos se puede observar muchos de los aspectos negativos que presenta este clásico suplemento, lo que ha llevado a buscar medios de cultivos y/o suplementos alternativos que permitan evitar esas desventajas.

En base a los diferentes trabajos se puede observar muchas de los aspectos negativos que presenta este clásico suplemento, lo que ha llevado a buscar medio de cultivo y/o suplementos alternativos que permitan evitar esas desventajas.

2.2 Desarrollo de medio libre de componentes xenogénicos

Se han propuesto en la literatura diferentes alternativas al medio estándar estas propuestas presentan ventajas y desventajas seguidamente se pasará a describir estas formulaciones es importante mencionar que los suplementos

deben tener todos los nutrientes, aminoácidos, lípidos, hormonas, vitaminas, sustancias buffer y factores de crecimiento que permitan llevar a cabo las funciones fisiológicas como la proliferación celular (Hemeda et al., 2014)

Existen distintos tipos de suplementos podemos mencionar según la clasificación de Hemeda et al. (2014) a) Todos los componentes son sintéticos o derivados de la especie de origen de las células cultivadas. La adición de componentes recombinantes es considerado aceptable para esta definición de cultivos. Conocido internacionalmente como *xeno-free media*

b) Medio libre de suero, este no contiene suero animal, ni humano. Se pueden incluir proteínas y factores recombinantes e incluso componentes animales no derivados del suero. Conocido internacionalmente como *serum-free media*. c) Medio libre de componentes de animales el cual carece de cualquier componente animal. Se admiten proteínas recombinantes y permite que la placa de cultivo puede estar recubierta con proteínas séricas. Este medio es conocido internacionalmente como *free-animal media*.

Es importante mencionar que existen diferentes tipos de cultivo como: a) Cultivo totalmente libre de componentes animales, estos están desprovistos de cualquier componente animal en el medio y la placa. b) Cultivo totalmente sintético libre de factores de crecimiento, este solo contiene proteínas sintéticas (Hemeda et al., 2014).

Los medios que en su formulación exclusivamente presentan fuentes no animales o combinaciones de factores de crecimiento recombinantes presentan una limitante en su uso dada por la variedad del origen de las células y sus necesidades fisiológicas, ya que requieren una mezcla de componentes como proteínas (Shih & Burnouf, 2015). Otro aspecto a destacar es que los medios que usan plasma y plaquetas para cultivo de MSC humanas se observó que las células mantenían proliferación y características fenotípicas similares al medio estándar (Müller et al., 2006). Por otro lado, investigaciones más recientes observan crecimiento satisfactorio en células humanas de origen adiposo no así en equinos encontrando alteraciones en la morfología y desprendimientos celulares de la monocapa (Schubert et al., 2018). Asimismo, en otro estudio realizado con equinos se evaluó MSC cultivadas con suero equino y SFB encontrando menor tiempo de duplicación celular y mayor secreción de citoquinas en los cultivos suplementados con el medio estándar (Pezzanite et al., 2021). Como alternativa ha surgido el suplemento conocido como lisado plaquetario (LP) que ha logrado con éxito mantener cultivos celulares los cuales mantienen sus características (Even et al., 2022; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019).

2.3 Lisado plaquetario

El LP se obtiene a partir de sangre entera, mediante procesos de centrifugación se concentran las plaquetas y luego de ciclos de congelado y descongelado se consigue el lisado de la porción plaquetaria (Barrachina et al., 2018; Russell & Koch, 2016).

Las plaquetas almacenan una serie de compuestos bioactivos localizados principalmente en sus gránulos alfa, incluidas diversas quimiocinas y diferentes factores de crecimiento como: factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF o FGF-2), factor de crecimiento hepatocitario (HGF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) proteínas morfogenéticas óseas 2,4 y 6 (BMP-2,4, 6) (Shih & Burnouf, 2015). Además de contener un alto contenido de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), factor de crecimiento similar a la insulina-1 (IGF-1) (Doucet et al., 2005).

La obtención de los concentrados plaquetarios puede ser mediante extracción manual de sangre o aféresis. Seguido de la obtención del plasma rico en plaquetas con ciclos de centrifugado. La activación para generar la liberación de los componentes de las plaquetas y lisado plaquetario se obtiene con procesos físicos o químicos. Los métodos físicos son sonicación o congelado/descongelado (Astori et al., 2016). Los métodos de preparación del lisado difieren en los distintos trabajos publicados, los procedimientos de separación de las plaquetas con centrifugación en dos pasos versus el método de aféresis plaquetaria y también existen variaciones en el paso de lisis plaquetaria. Asimismo se encuentran diferencias en las temperaturas usadas, en el número de ciclos de congelado/descongelado, en el proceso de eliminación de fragmentos de plaquetas o, en la fuerza y duración de los pasos del centrifugado (Doucet et al., 2005). Un inconveniente que presenta el LP es su contenido en fibrinógeno y otros factores de coagulación que genera la formación de un gel en el medio de cultivo. Para su uso como suplemento requiere la adición de heparina que cumple la función anticoagulante y evita la formación de coágulos (Mojica-Henshaw et al., 2013). La concentración de heparina utilizada para evitar la gelatinización es crítica porque una alta concentración puede alterar la diferenciación celular, se recomienda un rango de 0,6 UI/mL - 2,4 UI/mL (Hemeda et al., 2013). Este anticoagulante suele tener origen animal de cerdos o bovinos, por lo que el producto celular *in vitro* resultante no será libre de xenoproteínas (Mojica-Henshaw et al., 2013). Reducir el fibrinógeno con métodos mecánico o

químicos en el LP es una alternativa para obtener un sustituto libre de xenoproteínas (Pilgrim et al., 2022).

2.4 Efecto del uso de LP sobre las características de las MSC

El lisado plaquetario fue propuesto por Doucet et al. (2005) como alternativa al SFB para la expansión de MSC *in vitro* en el año 2005. En ese trabajo de investigación se observó que el LP era capaz de promover la expansión de MSC humanas disminuyendo el tiempo necesario para llegar a la confluencia en cultivos y aumento en el tamaño de las unidades formadoras de colonias. En equinos la primera descripción del uso de LP en MSC fue el trabajo de Del Bue et al. (2007) que demostraron la utilidad de este suplemento en la propagación de células de origen adiposo y tendinoso. Posteriormente, surgen reportes en la literatura donde evalúan *in vitro* las características de células equinas aisladas de médula ósea (Even et al., 2022; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019). En células de caninos también ha sido reportado el uso de LP para la proliferación de MSC (Hagen et al., 2022; Russell et al., 2015). Se ha demostrado que las MSC equinas cultivadas con LP mantienen las características proliferativas, fenotípicas y su capacidad de tridiferenciación comparable a las células cultivadas en condiciones estándar con SFB (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016).

Respecto a la proliferación las MSC cultivadas con LP presentaron comportamiento similares en su crecimiento (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018). Contradictoriamente, en otro trabajo se encontró un incremento en la proliferación en los cultivos con LP (Yaneselli et al., 2019). Por otro lado, Seo et al. (2013) reportó cambios en la morfología celular, observando que las células eran más pequeñas cultivadas con LP que las cultivadas con SFB. Asimismo, en caninos se observaron cambios en la morfología celular cuando se usó LP a bajas concentraciones (Hagen et al., 2022). Por el contrario, en humanos se evaluó el lisado para cultivo de MSC manteniendo éstas sus características (Bieback et al., 2009; Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014).

Desde el punto de vista inmunológico, algunos trabajos en células de origen humano han descrito alteraciones en MSC expandidas con LP observándose modificaciones en la expresión de algunas moléculas de superficie y reducción de su capacidad de inhibir la proliferación de células T y células *natural killer* (NK) (Abdelrazik et al., 2011). Contradictoriamente, otros autores demuestran que MSC cultivadas con LP tenían un efecto mayor inhibitorio sobre la proliferación de linfocitos en relación a las cultivadas con SFB

(Flemming et al., 2011). Por otro lado, en equinos el impacto sobre las características inmunológicas de las MSC es incipiente debido a que las primeras descripciones fueron realizadas hace menos de 5 años y existen escasos reportes. Se ha descrito una similar expresión de marcadores de superficie en las MSC cultivadas con LP (Even et al., 2022; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019). En referencia al perfil inmunológico, los trabajos encuentran un perfil similar en cuanto a la expresión de citoquinas inmunomoduladoras o perfil inmunogénico (Even et al., 2022; Naskou et al., 2018). Sin embargo, se encontró en otro trabajo un aumento de expresión para IL-6 (Yaneselli et al., 2019). Por ello, aún no hay consenso sobre el efecto que tiene el LP sobre las características inmunológicas de las MSC por lo que parece un aspecto terapéuticamente relevante y debe ser explorado en profundidad.

2.5 Uso terapéutico de MSC cultivadas en LP

El uso terapéutico en equinos de las MSC presenta diferentes aplicaciones como en procesos de endotoxemia, enfermedad inflamatoria intestinal, asma equina y uveítis recurrente (MacDonald & Barrett, 2020). Asimismo, se utilizan inyecciones intra-articulares en procesos de osteoartritis, lesiones de meniscos y lesiones ligamentosas (Al Naem et al., 2020). Como antecedente, podemos mencionar tratamientos articulares con MSC libres de SFB suplementadas con suero equino donde se observó respuesta adversa en el grupo que tenía SFB luego de la segunda aplicación, los autores especulan que sea por la contaminación del SFB (Joswig et al., 2017). Existe escasa información acerca de terapias en equinos con MSC expandidas con LP por lo que es importante seguir estudiando este suplemento para poder en un futuro utilizarlo en experimentos y poder evaluar los resultados en los tratamientos.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las MSC presentan interés en veterinaria por su uso terapéutico con efectos beneficiosos en la regeneración tisular e inmunomodulación (Berglund et al., 2017). Principalmente, el área de investigación con MSC ha ganado un impulso significativo debido al potencial terapéutico de estas células en medicina humana y veterinaria (Pilgrim et al., 2022). Para realizar una terapia celular con MSC es necesario su aislamiento y propagación *in vitro*, para ello, es utilizado como suplemento de cultivo el SFB definido como suplemento de referencia “*gold standard supplement*” para cultivos celulares. Sin embargo, a pesar de ser el más utilizado presenta las siguientes desventajas: a) para su extracción se requiere sacrificar fetos vivos, y b) presencia de proteínas xenogénicas (Hemeda et al., 2014; Jochems et al., 2002). Frente a estas desventajas han surgido trabajos que evalúan otros suplementos como alternativa y el LP alogénico ha ganado gran relevancia en la literatura actual como una opción prometedora (Hagen et al., 2021; Yaneselli et al., 2019). En general, esta alternativa ha sido utilizada con éxito en diferentes estudios de propagación de MSC en equinos (eMSC) (Del Bue et al., 2007; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019), en humanos (Doucet y col., 2005), y en caninos (Hagen et al., 2022). Sin embargo, en equinos existen escasos estudios que evalúen el impacto del reemplazo del nuevo suplemento en las características *in vitro* de las MSC, como la proliferación, inmunogenicidad e inmunomodulación, que son las principales características de interés terapéutico (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016). Asimismo, en el trabajo de Yaneselli et al. (2019) se encontró alteración tanto en la proliferación celular, como también de la expresión de genes inmunogénicos e inmunomoduladores de MSC equinas cultivadas con LP como suplemento. Debido a que no ha sido totalmente elucidado como afecta las características inmunológicas de las eMSC cultivadas con LP, este trabajo busca contribuir a la descripción del efecto del reemplazo del clásico suplemento (SFB) sobre sus características a nivel *in vitro* como así también sobre su perfil inmunológico, debido que potencialmente podría repercutir en su uso terapéutico.

4 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 Hipótesis

Es posible la propagación *in vitro* de eMCS con LP alogénico como suplemento. Asimismo, el LP potencialmente puede modificar el perfil celular de moléculas inmunogénicas e inmunomoduladoras observando un aumento en aquellas pro-inflamatorias.

4.2 Objetivo general

Estudiar el efecto del reemplazo del SFB por el LP alogénico en las MSC derivadas de tejido adiposo equino (eAD-MSC).

4.3 Objetivos específicos:

- a) Elaborar LP en diferentes concentraciones plaquetarias.
- b) Cuantificar factores de crecimiento en las diferentes formulaciones de LP.
- c) Caracterizar eAD-MSC en condiciones estándar.
- d) Evaluar la cinética de crecimiento *in vitro* de las eAD-MSCs con diferentes formulaciones de LP alogénico como suplemento de cultivo.
- e) Determinar la multipotencialidad *in vitro* de las eAD-MSCs cultivadas en LP alogénico.
- f) Evaluar el perfil inmunológico de las eAD-MSCs cultivadas con LP alogénico.

5 ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN

La estrategia de investigación se realizó en 3 etapas: Etapa I) Preparación de los lisado plaquetarios, para ello se tomaron muestras de sangre de equinos donantes y se prepararon 2 formulaciones: LPA, LPB, a las cuales se les determinó parámetros sanguíneos y la concentración de TGF- β y PDGF-BB. Luego, se procesaron muestras de tejido adiposo de equinos para el aislamiento y criopreservación de las eAD-MSC de manera estándar. Etapa II) Se establecieron 3 condiciones diferentes de cultivo suplementados con: LPA, LPB que fueron comparados con SFB como condición control evaluadas en eAD-MSC post-criopreservación hasta el P₄. En estos se evaluó proliferación celular mediante la prueba MTT ((3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), duplicación celular (DT) y capacidad clonogénica (CFU-F). Además, se comprobó la multipotencialidad a través del ensayo de tridiferenciación *in vitro*. Etapa III) Se analizó expresión de MHC II por citometría de flujo. Finalmente, se evaluó la expresión de genes asociados a la respuesta inmune como MHC I, MHC II, IL-6, IL-10 y TNF- α en las diferentes condiciones utilizando la técnica de RT-qPCR.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Preparación de lisado plaquetario

Para la preparación del LP se realizó extracción de 500 mL de sangre entera de la vena yugular de forma aséptica de equinos (*Equus caballus*) adultos (n=5), cruce, saludables, con un rango de edad de 3 a 5 años, el anticoagulante utilizado fue el citrato de sodio 3,8% (p/v). La sangre se transportó refrigerada al laboratorio. Todas las muestras se centrifugaron a 200 g durante 10 min. El sobrenadante resultante fue recolectado y sometido a una segunda centrifugación de 900 g por 15 min. A partir de estos pellets, se prepararon dos concentrados plaquetarios (CP) de diferentes concentraciones. Para realizar el suplemento de mayor concentración plaquetaria (CPA) se resuspendió el pellet en un 10% del volumen total inicial de plasma, de forma de obtener un CPA 10x, para el suplemento de concentración media (CPB) se resuspendió el pellet en un 20% del volumen total inicial de plasma llevado a una concentración fuera 5x. Se realizó determinación del recuento plaquetario y leucocitario de la muestra basal de plasma y los concentrados plaquetarios mediante hemocitómetro (Mythic 18 Vet, Orphee). Para lisar las plaquetas de CPA y CPB se realizó un ciclo de congelado a -80 °C y descongelado en baño caliente 37 °C durante 30 min.

Posteriormente, se centrifugó a 1600 g por 30 min. Finalmente se filtraron las diferentes formulaciones obtenidas LPA y LPB con filtro de 0,22 μm . Adaptado a lo anteriormente publicado por diferentes trabajos (Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019). El protocolo contó con la autorización del protocolo CEUA-FVET 1625.

6.1.1 Cuantificación de factores de crecimiento

La concentración de TGF- β y PDGF-BB fueron cuantificadas mediante los kits Quantikine ELISA (DB100B y DBB00, R & D Systems). Las muestras analizadas por duplicado fueron plasma, suero, CPA, CPB, LPA y LPB, además para comparar se realizó análisis de la condición estándar SFB y medio DMEM utilizado en los cultivos. Las muestras usadas para TGF- β se activaron previamente con ácido clorhídrico de acuerdo a lo sugerido por el protocolo del kit, el procedimiento realizado para la cuantificación de ambos factores de crecimiento fue el recomendado por el fabricante. La lectura de las placas se realizó a 450 nm.

6.2 Aislamiento y crioconservación de las eAD-MSc

Para el aislamiento de eAD-MSc fueron tomadas muestras de grasa de caballos (*Equus caballus*) de la región abdominal proveniente de animales adultos y saludables (n=10), cruza, peso entre 320-380 kg con un rango de edad 3 a 6 años. La toma del tejido se realizó con pinza y tijera quirúrgica estéril, tomando entre 5-10 gramos de TA y transportado bajo refrigeración (4–8°C) en tubo estéril con medio de transporte y procesada en un tiempo máximo de 24 h. En el laboratorio se cortaron en pequeñas porciones y se dispensaron en placa de Petri y fueron lavadas dos veces con solución tampón fosfato salino (PBS) suplementada con penicilina/anfotericina B (Capricorn). Posteriormente, el TA fue sometido a una digestión enzimática durante 40 min a 37 °C en una solución de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) bajo en glucosa (Gibco) con 0,1 mg/mL de colagenasa tipo I, la digestión se frenó con medio de cultivo suplementado con SFB al 20% (Capricorn). Luego fue centrifugado a 700 g durante 10 min. El pellet resultante fue resuspendido y sembrado en botellas de cultivo con DMEM suplementado con SFB al 20% y 2% de antibiótico penicilina/estreptomocina (Capricorn) una vez que las células alcanzaron una confluencia de 80–90 % fueron levantadas con 0,25% tripsina-EDTA (SAFC), contadas, centrifugadas a 700 g durante 10 min y resuspendidas en 1 mL del medio de crioconservación compuesto por: 95% de SFB y un 5% de dimetilsulfóxido (DMSO) (MP Biomedicals). El almacenamiento fue hecho a -80 °C para su

posterior uso, adaptado de lo descrito por Yaneselli et al. (2018). El protocolo contó con la autorización bioética con la identificación CEUA-FVET 1097.

6.3 Cultivo de eAD-MSC con LP y SFB

Las eAD-MSC previamente aisladas y crioconservadas fueron descongeladas y centrifugadas a 600 g durante 5 min posteriormente sembradas con DMEM. Se establecieron 3 condiciones de cultivo suplementados con 10% de SFB condición de referencia para todos los ensayos, 10% de LPA o LPB con la adición de 2 UI/mL de heparina sódica (FU) para evitar formación de coágulos y 1% de ATB penicilina/estreptomicina. Las eAD-MSC se mantuvieron en condiciones estándar de cultivo (37 °C y 5% CO₂) una vez alcanzada la confluencia celular necesaria se procedió a realizar los diferentes ensayos que serán descritos a continuación.

6.4 Proliferación celular

6.4.1 Tiempo de duplicación celular (DT)

Para los ensayos de DT las células se sembraron a una concentración de 5×10^3 células/cm² en placas de 6 pocillos. Se seleccionaron los pasajes P₂ a P₄. Cada 4 días se realizaron lavados con PBS y cambio de medio. Cumplido los 7 días, las células fueron cosechadas con 0,25% tripsina-EDTA, se contaron en cámara de Neubauer utilizando como indicador de viabilidad Trypan Blue 0,4% (Gibco). La cinética de crecimiento se determinó a través del ensayo del tiempo de duplicación celular, *cell doubling times* (DT) el cual fue calculado con la siguiente fórmula adaptada de Vidal et al. (2006).

$$DT = \frac{\text{días en cultivo}}{\ln(N_f/N_i) / \ln(2)}$$

N_f= número final de células

N_i= número inicial de células

6.4.2 Prueba MTT

Para evaluar la proliferación celular se utilizó el ensayo colorimétrico MTT. Se sembraron 1600 células por pocillo con 6 réplicas por individuo en placa de 96 hoyos. Se seleccionaron los pasajes P₃ y P₄. El ensayo por pasaje tuvo una duración de 7 días. Se diseñó una curva estándar con 8 puntos, con un rango de siembra de 0 a 6×10⁴ células por hoyo con 6 réplicas, se incubaron las placas por 24 h para poder extrapolar la concentración de células a través de las ecuaciones de la curva descrita en la literatura (Remacha et al., 2015). El protocolo utilizado en el ensayo fue el recomendado por el fabricante (Invitrogen). La lectura de los datos se realizó con espectrofotómetro con una densidad óptica de 540 nm.

6.5 Capacidad clonogénica

Para evaluar la capacidad clonogénica se realizó el ensayo de unidad formadoras de colonia fibroblastoides (CFU-F: *colony forming units-fibroblastic*) fueron sembradas 1×10³ células por hoyo en placa de 6 para las tres condiciones de cultivo en sucesivos pasajes, P₃ y P₄. Se realizó lavado y cambio de medio cada 72 h. Transcurrido 7 días de la siembra inicial se procedió a fijar las colonias con metanol frío y posterior tinción con Giemsa adaptado de Guercio et al. (2013). El conteo de las colonias teñidas y fijadas se hizo con el programa (Image J).

6.6 Ensayo de Tridiferenciación

Para realizar el ensayo de tridiferenciación *in vitro* se utilizaron células en P₃ las que fueron sembradas a una concentración de 1×10⁴ células por hoyo en placa de 24 pocillos para las tres condiciones de cultivo. Se cambió medio cada 72 h y se mantuvieron los cultivos hasta alcanzar confluencia de un 50–60% para iniciar la inducción. Los cultivos fueron mantenidos por 21 días con su respectivo medio de inducción. Para diferenciar al linaje adiposo se añadió IBMX (3 iso-butil-1-metilxantina) 5 μM, 60 μM indometacina, dexametasona 1 μM y 5 μg/ml de insulina. Transcurrido el tiempo de diferenciación celular los cultivos se fijaron con formol al 10% durante 15 min y se utilizó para teñir el colorante Oil Red O. Para el linaje cartilaginoso se adiciono ácido ascórbico 1,7 mM, 10 ng/mL de TGF-β y 18 μL/mL de insulina. Luego las células se fijaron y tiñeron con el colorante Alcian Blue. Para el linaje óseo el medio de inducción se preparó con dexametasona 1 μM, β-glicerofosfato 10 mM y 50 μM de ácido ascórbico finalizado el tiempo de inducción se fijaron y se tiñeron con Alizarin Red S para evidenciar la matriz mineralizada. Adaptado de lo descrito por Yaneselli et al. (2018).

6.7 Inmunofenotipificación de MHC II

Se estudió la expresión del MHC II de las eAD-MSC en P₃. Para ello, se sembraron células con una concentración de $5 \times 10^3/\text{cm}^2$ en frascos de cultivo T25. Cuando las células presentaron una confluencia de 80% se retiró el medio de cultivo y se adicionaron 5 mL de solución fría *fluorescence-activated cell sorting* (FACS) compuesta por PBS libre de Ca^{++} y Mg^{++} , 1 mM EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y 0,5% de SFB. Las células fueron levantadas mecánicamente y resuspendidas en FACS. Se procedió a centrifugar 400 g por 5 min. Las células se incubaron por 30 min en oscuridad con 10 μL del anticuerpo (0,1 mg/mL) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (clona CVS20, Invitrogen). Posteriormente, se lavaron con FACS y se centrifugaron a 400 g por 5 min. Finalmente se procedió al análisis. La adquisición de datos se realizó con el equipo BD FACS canto II, utilizando el láser 488 nm. Se adquirieron un mínimo de 20.000 eventos por muestra, y el análisis se realizó mediante el software BD FACSDiva Versión 6.1.3.

6.8 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune

6.8.1 Crioconservación de muestra para análisis del perfil de expresión génica

El análisis de la expresión génica se realizó en P₃ de las eAD-MS (n=3). Las células fueron cosechadas con tripsina, luego resuspendidas en medio de cultivo y centrifugadas 5 min a 600 g, se descartó sobrenadante posteriormente se le adiciono 1 mL de TRIzol. Las muestras se dispensaron en criotubos y fueron mantenidas a -80°C hasta la purificación del ARN.

6.8.2 Estimulación mitogénica de sangre entera equina

Para tener un control positivo para los ensayos de análisis de expresión génica, se extrajo sangre heparinizada de un equino adulto saludable. La sangre equina fue dispensada de a 1 mL en placas de 48 pocillos, y estimuladas por duplicado con: Concanavalina A (ConA) 20 µg/mL (Sigma), lipopolisacáridos (LPS) 100 ng/mL (Invitrogen), y 250 ng/mL (Invitrogen). Como control negativo, se incubó, por duplicado, 1 mL de sangre con PBS. Todas las muestras fueron incubadas por 16 h a 37 °C al 5% CO₂. Finalizada la estimulación, los cultivos de sangre fueron trasvasados individualmente a falcón 15. Para lisar los glóbulos rojos se agregó 5 mL de Buffer EL (Qiagen), se incubó 10 min en hielo y centrifugó 10 min a 500 g, según las instrucciones del fabricante. El pellet resultante se lavó con PBS libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺. Finalmente, se adicionó 1 mL TRIzol (Invitrogen) para realizar la extracción de ARN.

6.8.3 Extracción de ARN

La extracción de ARN con TRIzol se realizó según protocolo descrito por el fabricante, con un paso de extracción con cloroformo, precipitación en alcohol isopropílico y lavado con etanol 75%, y posterior resolubilización en agua ultra pura incubándose a 65°C durante 10 min. La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó en Nanodrop (ThermoFisher Scientific) a 260 nm. La calidad de los ARN fue evaluada mediante las relaciones de absorbancia: A₂₆₀/A₂₈₀ y A₂₆₀/A₂₃₀ que indican contaminación con proteínas y compuestos fenólicos, respectivamente. Para esta tesis, consideramos que un ARN es de “buena calidad” si las relaciones A₂₆₀/A₂₈₀ y A₂₆₀/A₂₃₀ mostraban un valor superior a 1,8 y 1,5 respectivamente.

6.8.4 Reacción Retrotranscripción (RT)

Para realizar la RT se partió de 1 µg de ARN total, el cual previamente fue tratado con 0,4 U/µL de DNasa I (Invitrogen) para eliminar contaminación de ADN genómico, según las instrucciones del fabricante. La RT se realizó empleando 200 U de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) en buffer provisto por el fabricante y en presencia de 200 ng de random primers (Invitrogen), dinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM de cada tipo, 400 U de RNase Out (Invitrogen) y DTT (Invitrogen) 10 mM en un volumen final de reacción de 20 µL. La reacción se realizó siguiendo el siguiente programa: 10 min, 25°C, 50 min, 37°C, 15 min, 70°C. El ADNc fue diluido 1/5 en agua ultra pura antes de realizar la PCR en tiempo real (qPCR).

6.8.5 qPCR

Se evaluó la expresión génica de MHC I, MHC II, IL-6, IL-10 y TNF- α . Los primers fueron tomados de la bibliografía y su secuencia de detalla en la Tabla I. La especificidad de los primers fue verificada utilizando Primer-Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

La qPCR se realizó empleando kit QuantiTect (QIAGEN) según instrucciones del fabricante. Las qPCR se realizaron en un volumen final de 10 μ L, empleando en todos los casos los primers a concentración final de 0.9 μ M y 2 μ L del ADNc diluido. El protocolo de amplificación que se usó para todos los genes fue el siguiente: 15 min, 95°C, seguido de 40 ciclos de 15 seg, 95°C; 1 min, 60°C (paso de adquisición de fluorescencia en el canal verde). Seguidamente se realizó curva de disociación de los productos según el siguiente protocolo: 60-95°C con aumentos de 1°C cada 5 seg, con registro de fluorescencia en cada paso. Las qPCR se realizaron en el termociclador en tiempo real Rotor Gene-6000 (QIAGEN). El análisis de datos de las PCR se realizó con el programa provisto por el fabricante del termociclador. Posteriormente, los datos se procesaron según el método descrito en (Livak and Schmittgen, 2001). El gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) fue utilizado como gen de referencia endógeno. Los resultados se expresan como niveles relativos respecto del grupo control (condición SFB).

Tabla I. Secuencias de primers utilizados para analizar el perfil de expresión por RT-qPCR

Gen	Secuencia de Primer (5'-3')	Tamaño de Amplicón
TNF- α	F: CATGTTGTAGCAAACCCCAA R: TACAGCCCATCCAATGGTACC	125
IL- 6	F: AACAGCAAGGAGGTACTGGCA R: CAGGTCTCCTGATTGAACCCA	95
IL- 10	F: GACATCAAGGAGCACGTGAACT R: TGGAGCTTACTGAAGGCACTCT	140
MHC I	F: CGTGAGCATCATTGTTGGC R: TCCCTCTTTTTTCACCTGAGG	92
MHC II	F: AGCGGCGAGTTGAACCTACAGT R: CGGATCAGACCTGTGGAGATGA	172
GAPHD	F: GGCAAGTTCCATGGCACAGT R: CACAACATATTCAGCACCAGCAT	129

6.9 Análisis Estadístico

La distribución de los datos se estudió con la prueba de normalidad Lilliefors, para ello se utilizó el programa Past (Paleontological statistics software). Luego de verificar la distribución se determinó el uso de estadística paramétrica o no paramétrica. Las diferencias estadísticas para la concentración de leucocitos y el ensayo de CFU-F se analizaron con la prueba paramétrica ANOVA y Tukey como *post-hoc*. Para evaluar los datos de concentración de plaquetas, concentración de factores de crecimiento, MTT, DT e inmunofenotipo fueron analizadas con la prueba no paramétrica ANOVA Kruskal-Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 8 software (GraphPad Prism Inc.), se fijó un $P < 0,05$ para todos los análisis. Los datos con distribución normal se expresaron como media \pm desvío estándar y los no paramétricos como mediana (rango intercuartílico Q25; Q75).

7 RESULTADOS

7.1 Composición del LP

El procedimiento empleado permitió concentrar las plaquetas 5,8 veces en el caso de CPA y 3 veces para CPB en relación al valor basal del plasma. Estos hemoderivados fueron utilizados para conformar los LP, encontrando diferencias significativas entre CPA y plasma ($p < 0,009$) también entre CPA vs. sangre ($p < 0,002$, Fig. 1, A). Asimismo, no se encontraron diferencias significativas cuando comparamos CPA vs. CPB.

Con respecto a los leucocitos, CPA presentó un aumento de 9,7 veces en relación al plasma, mientras que en el caso de CPB el aumento fue de 5,2 veces. Sin embargo, dada la variabilidad entre las muestras, solo se observaron diferencias significativas en la comparación CPA vs. plasma ($p < 0,003$) ver (Fig. 1, B). Asimismo, se observó una relación plaquetas: leucocitos de 171:1 para CPA, 170:1 para CPB y 270:1 plasma. La eficiencia obtenida de los concentrados plaquetarios, a partir del volumen total de sangre fue 5,7% para CPA y 12% para CPB. Los valores de cuantificación de plaquetas y leucocitos se resumen en (Tabla II).

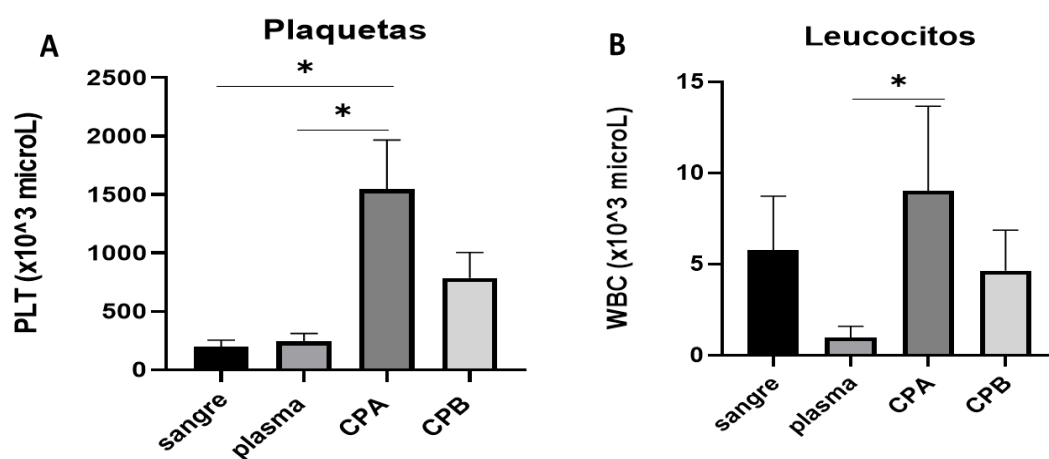


Figura 1. Concentración de plaquetas (PLT) y leucocitos (WBC) de los hemoderivados utilizados para conformar el LPA, LPB de equinos ($n=5$). A) Gráfico de concentración de plaquetas. B) Gráfico concentración de leucocitos. Análisis de plaquetas se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal-Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's. Para los datos de leucocitos, se utilizó ANOVA y como post-hoc Tukey. * $p < 0,05$.

Tabla II.**Cuantificación de concentración de plaquetas y leucocitos**

Condición	Plaquetas	Leucocitos
CPA	1603 (1108; 1952)	7,2 (5,1; 13,8)
CPB	805 (567; 996)	4,2 (2,7; 6,9)
Plasma	247 (176; 307)	0,8 (0,4; 1,6)

valores $10^3/\mu\text{L}$

Los resultados de plaquetas y leucocitos se expresan como mediana (rango intercuartílico Q25; Q75)

7.1.1 Cuantificación de factores de crecimiento

La concentración de TGF- β fue analizada en muestras de plasma, CP y LP de los 5 equinos (Tabla III). Solo se encontró diferencias para la formulación A que es la presenta mayor concentración. Encontrando diferencias entre plasma vs. LPA ($p < 0,01$) (Fig. 2, A). Con respecto a la cuantificación de PDGF-BB (Tabla III), se observó que los concentrados CPA y CPB presentaron mayor concentración de este factor. Encontrando diferencia para CPA vs. plasma ($p < 0,002$) y CPB vs. plasma ($P < 0,03$) (Fig. 2, B).

A pesar de ver una disminución de los factores de crecimiento del pasaje CP a LP las diferencias no fueron significativas. Como control, se cuantificó la concentración de estos factores en una única muestra de SFB, observándose que el SFB tenía $2,3 \times 10^3$ pg/mL de TGF- β , pero no fue detectado PDGF-BB. Por otra parte, no fueron detectados estos factores de crecimiento en el medio DMEM.

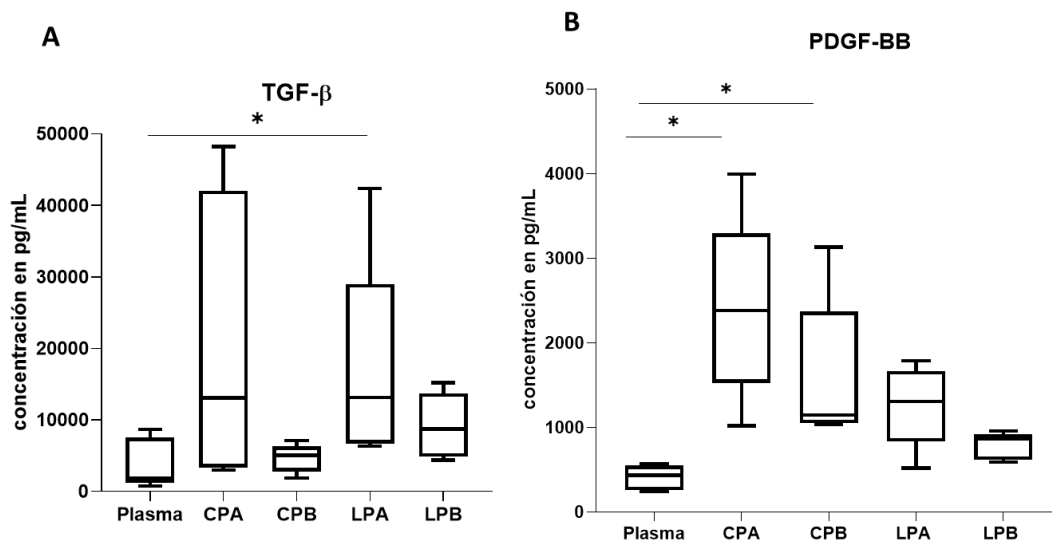


Figura 2. Comparación de los factores de crecimiento TGF- β (A) y PDGF-BB (B) para las diferentes formulaciones de concentrados plaquetarios (CP) y lisados plaquetarios (LP) (n=5). Los datos obtenidos son representados como un gráfico de Tukey. Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal-Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. * $p < 0,05$

Tabla III. Cuantificación de factores de crecimiento TGF- β y PDGF-BB

Muestra	TGF- β $\times 10^3$ (pg/mL)	PDGF-BB $\times 10^3$ (pg/mL)
Plasma	1,8 (1,2; 7,5)	0,4 (2,5; 5,4)
CPA	13 (3,3; 42)	2,3 (1,5; 3,2)
CPB	5 (2,7; 62)	1,1 (1,0; 2,3)
LPA	13 (6,6; 29)	1,3 (0,8; 1,6)
LPB	8,7 (4,8; 13)	0,8 (0,6; 0,9)

Los resultados de TGF- β y PDGF-BB se expresan como mediana (rango intercuartílico Q25; Q75).

7.2 Aislamiento y criopreservación de las eAD-MSc

Fue posible aislar y expandir eAD-MSc provenientes de 8 equinos de un total de 10 muestras de TA, con una tasa de éxito de 80%, utilizando SFB como suplemento. A las 24—48 h posteriores a la siembra se pudo observar células adheridas con morfología tipo fibroblástica. Luego de alcanzar confluencia 80—90% las células se conservaron con DMSO y SFB a una concentración de 1×10^6 células/mL conformando un biobanco en P₁, con un total de 38 viales.

7.3 Proliferación celular

7.3.1 Tiempo de doblaje celular

En las tres condiciones se observó que las eAD-MSc presentaron crecimiento en monocapa, morfología fibroblástica y adherencia al plástico. Se pudo observar cultivos confluentes para las diferentes condiciones (Fig. 3).

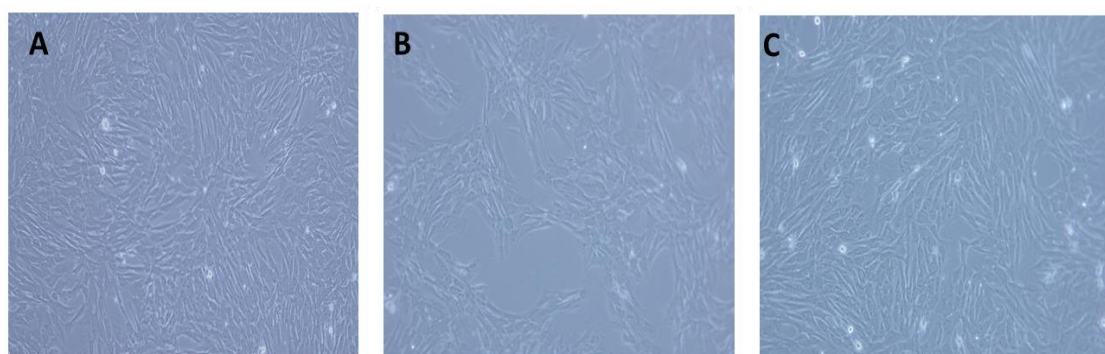


Figura 3. Imágenes microscópicas 10× de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino (eAD-MSc) cultivadas en las tres condiciones A) LPA, B) LPB y C) SFB, respectivamente.

La cinética de crecimiento fue determinada mediante el ensayo DT encontrando que esta fue similar para las condiciones suplementadas con LPA, LPB o SFB, en todos los pasajes evaluados P₂ a P₄ (Fig. 4). Además, se hizo un análisis pareado por condición en cada pasaje y de la misma manera no se encontraron diferencias cuando se analiza de forma individual las condiciones (Tabla IV).

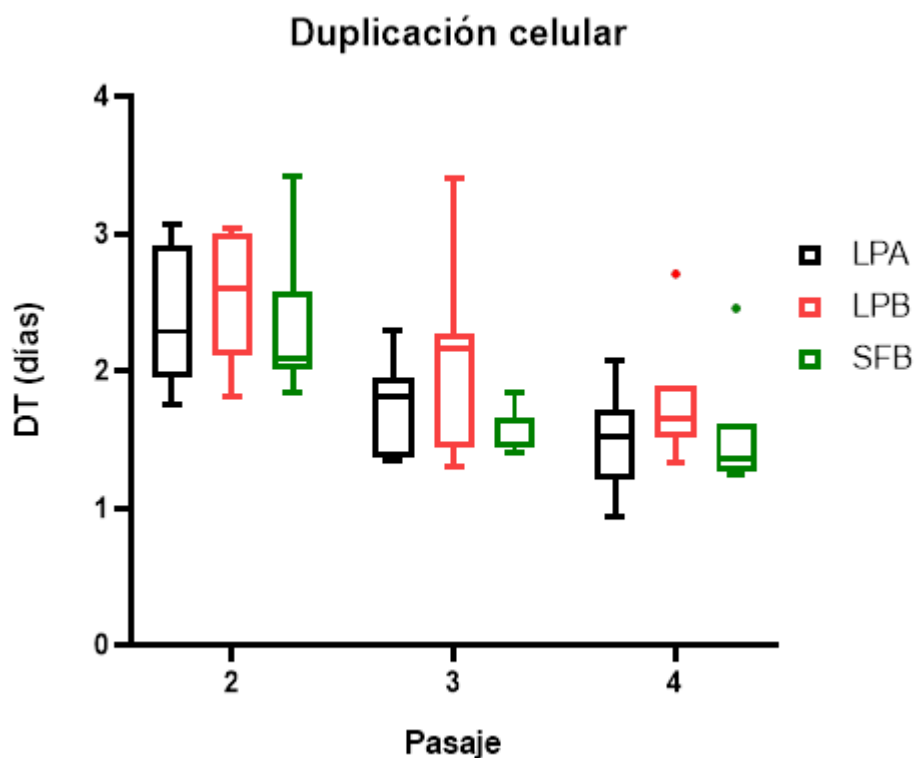


Figura 4. Tiempo de doblaje (DT) de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Los resultados del DT por pasaje (n=7) se expresan como gráfico de Tukey. Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal -Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's. ° Representa valor atípico.

Tabla IV. Análisis intracondición del DT para células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino eAD-MSC en las 3 condiciones de cultivo.

Condición	Pasaje celular		
	P ₂	P ₃	P ₄
LPA	2,2 (1,9; 2,9)	1,8 (1,3;1,9)	1,5 (1,2;1,7)
LPB	2,6 (2,1; 3,0)	2,1 (1,4; 2,2)	1,6 (1,5;1,8)
SFB	2,0 (2,0; 2,5)	1,6 (1,4; 1,6)	1,3 (1,2;1,6)

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico Q25; Q75).

7.3.2 Prueba MTT

Se cuantificó la proliferación celular a través de la prueba MTT durante 7 días para los pasajes P₃ y P₄(n =7). El total de células fue determinado por extrapolación a partir de una curva de calibración para cada condición. Se observó crecimiento exponencial de las células en las diferentes condiciones que comenzó alrededor del día 3—4 post-siembra hasta el día 7. Tanto LPA como LPB mostraron crecimiento similar al SFB no encontrándose diferencia en los pasajes analizados (Fig. 5). Además, se realizó un análisis pareado intracondición por cada día de ensayo en los pasajes P₃ y P₄. En este análisis se encontraron diferencias entre días, y se puede observar el día 4 como bisagra en el crecimiento celular que coincide con la fase exponencial graficada (Tabla V). Este comportamiento se da en ambos pasajes.

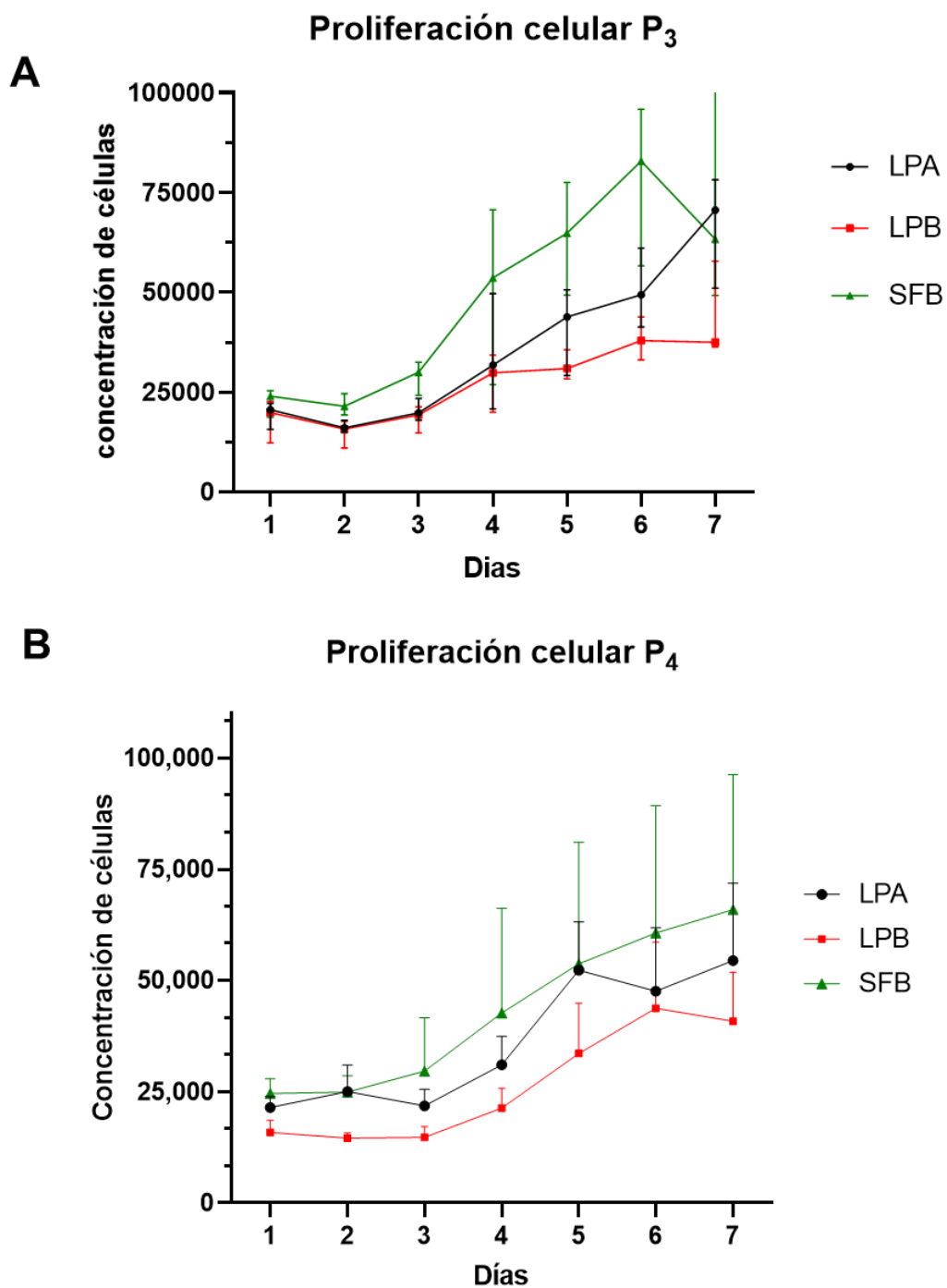


Figura 5. Proliferación de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Se determinó en los pasajes P₃ y P₄ para las 3 condiciones de cultivo a lo largo de 7 días mediante el ensayo MTT (n=7). A) Gráfico proliferación celular en P₃. B) Gráfico proliferación celular en P₄. Los resultados se representan como valor de mediana (rango intercuartílico Q25; Q75). Se utilizó test no paramétrico ANOVA Kruskal -Wallis y como *post-hoc* la prueba Dunn's.

Tabla V. Análisis de la proliferación a través del ensayo de MTT a nivel de intracondición para las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino eAD-MSC cultivadas en los diferentes suplementos (n=7).

Suplemento	Días						
	1	2	3	4	5	6	7
LPA P ₃	20 (15; 22) ^{ab}	16 (14; 17) ^{ac}	19 (18; 23) ^{ab}	31 (20; 49) ^{abd}	43 (29; 50) ^{bd}	49 (41; 61) ^{bd}	70 (51 ;78) ^d
LPB P ₃	19 (12;22) ^{ab}	15 (10;17) ^{ac}	19 (14;21) ^{ab}	29 (19;34) ^{abd}	30 (28;35) ^{bd}	37 (33;43) ^d	37 (36;57) ^d
SFB P ₃	24 (18;25) ^a	21 (19;24) ^a	30 (24;32) ^a	53 (26;70) ^{ab}	64 (49;77) ^b	82 (56;95) ^b	63 (49;114) ^b
LPA P ₄	21 (18;22) ^a	22 (19;30) ^a	21 (17; 25) ^a	31(26;37) ^{ad}	47 (42;59) ^d	44 (35;63) ^d	59 (32;66) ^d
LPB P ₄	14 (12;19) ^{ab}	14 (13;15) ^{ac}	14 (12;17) ^a	20 (17;23) ^{abd}	29 (25;44) ^{bd}	40 (28;60) ^d	41 (30;50) ^d
SFB P ₄	24 (21;25) ^a	25 (21;26) ^a	27 (18;38) ^a	32 (24;61) ^a	42 (31;74) ^a	65 (34;81) ^a	28 (72;90) ^a

Valores $\times 10^3$ células.

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico Q25; Q75). Diferentes letras significan diferencias ($p < 0,05$) el código se diseñó de modo que si comparten misma letra no hay diferencia

7.4 Capacidad clonogénica

Se evaluó la capacidad de formar colonias fibroblastoides en los pasajes P₃ y P₄. Las colonias macroscópicas se muestran a modo de ejemplo en la (Fig. 6). La capacidad de formar colonias fue similar en las 3 condiciones estudiadas siendo el recuento de colonias de 46 ± 5 para LPA, 49 ± 3 para LPB y 39 ± 5 para SFB, no encontrándose diferencias entre condiciones con respecto al SFB (Fig. 7).

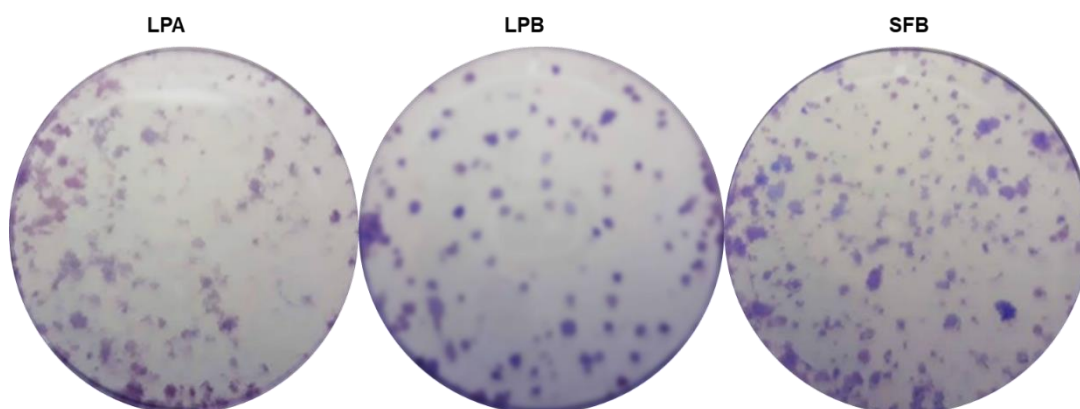


Figura 6. Imágenes macroscópicas de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Se muestra colonias celulares cultivadas en placa de seis hoyos LPA, LPB y SFB respectivamente.

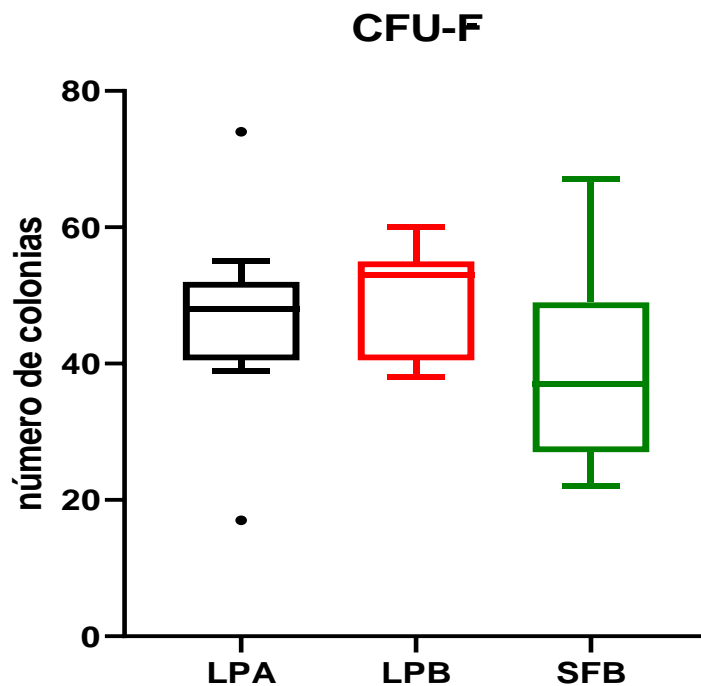


Figura 7. Evaluación de la capacidad clonogénica determinando la UFC-F de células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. Gráfico representa el número de colonias. Los datos fueron analizados con la prueba paramétrica ANOVA y Tukey como *post-hoc*. ° Representa valor atípico.

7.5 Ensayo de tridiferenciación *in vitro*

Para evaluar la capacidad de multipotencialidad *in vitro* se indujo la diferenciación a los linajes adiposo, cartilaginoso y óseo. Se observó que para las 3 condiciones las células presentaron multipotencialidad posterior a las dos semanas de estimulación. En el linaje adipogénico se vieron vacuolas intracitoplasmáticas ser teñidas de rojo con la tinción Oil Red O (Fig. 8, A, B y C). Asimismo, para el linaje condrogénico se observó una afinidad al colorante Alcian Blue, de color azulado, indicando la síntesis de glucosaminoglicanos como matriz extracelular (Fig. 8, D, E y F). El linaje osteogénico nos indicó el depósito de matriz mineralizada debido a la afinidad por la tinción con Alizarin Red S de color rojizo (Fig. 8, G, H y I). Los controles negativos que consistieron en cultivos de eAD-MSc no presentaron afinidad en ninguna de las inducciones realizadas (Fig. 8, J, K y L).

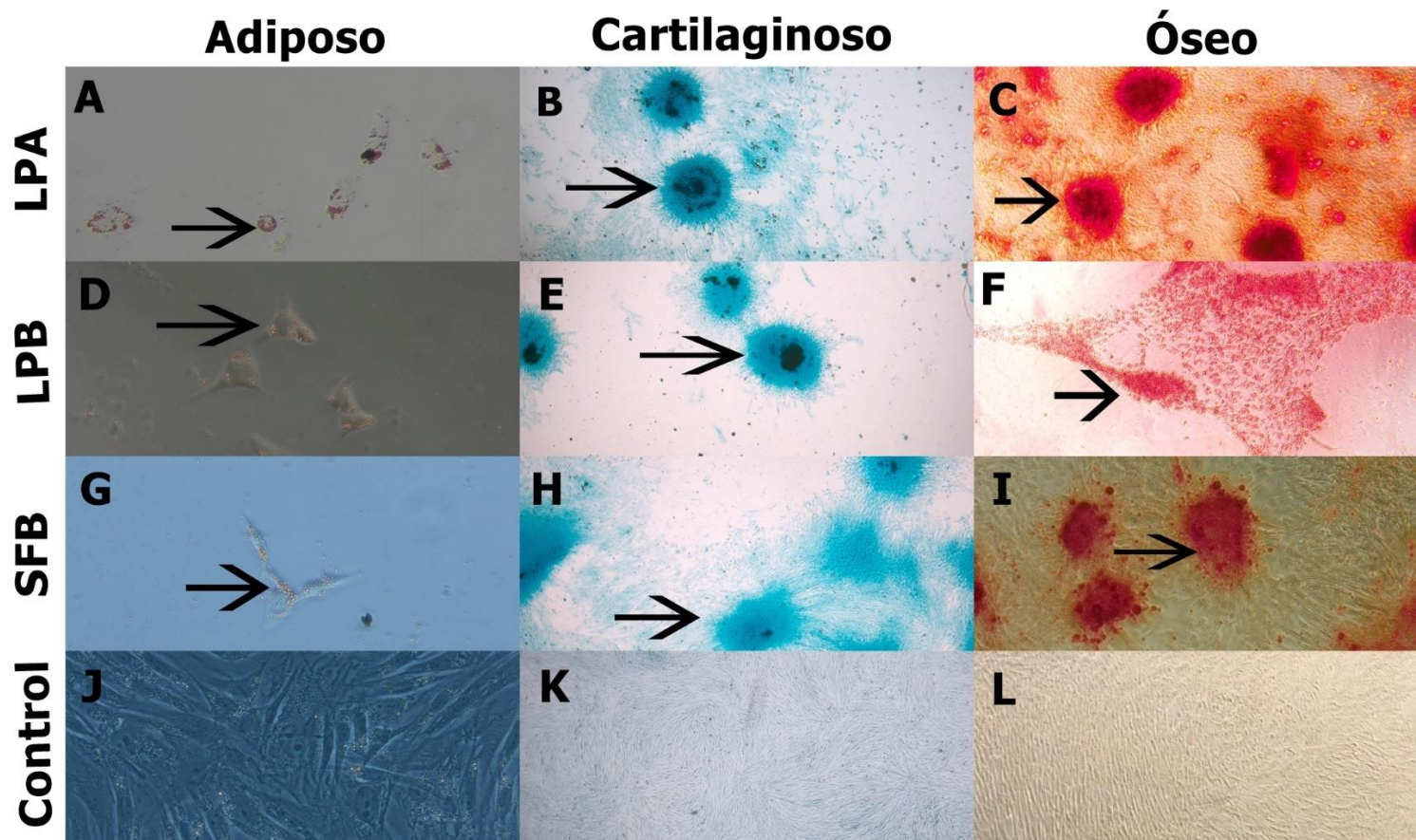


Figura 8. Ensayo de tridiferenciación *in vitro* de las células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino. (A, D, G) linaje adiposo tinción realizada con colorante Oil Red O imagen 40x con una flecha se indican las vacuolas. (B, E, H) linaje cartilaginoso tinción con colorante Alcian Blue imagen 4x con una flecha se indica la matriz extracelular. (C, F, I) linaje óseo tinción con Alizarin Red S imagen 10x se indica con una flecha la matriz mineralizada. Los controles negativos se muestran a modo de ejemplo para la condición SFB (J, K y L).

7.6 Perfil inmunológico

7.6.1 Marcador inmunogénico

Se evaluó la expresión de MHC II, por citometría de flujo, en las eAD-
MSC, correspondientes al pasaje P₃ (n=7), cultivadas en las 3
condiciones de estudio (LPA, LPB y SFB). Se observó una alta
variabilidad en la expresión de este marcador, dado por una gran
dispersión en los porcentajes de células positivas para MHC II. No se
encontraron diferencias entre las 3 condiciones de cultivo. Se analizó
también la intensidad media de fluorescencia (MFI del inglés *Mean
Fluorescence Intensity*) para MHC II (ver Tabla VI) y los resultados
sugieren que la expresión en superficie de MHC II es similar para las
células cultivadas en presencia de los LP, así como del control con suero
fetal (Fig. 9 y Fig.10).

Tabla VI. Análisis de expresión de MHC II

Condición	% de células MHC II +	MFI
LPA	20 (8; 43)	719 (519; 897)
LPB	39 (28; 51)	781 (711; 1059)
SFB	53 (25;57)	772 (585;1207)

Los resultados se expresan como mediana (rango intercuartílico
Q25; Q75).

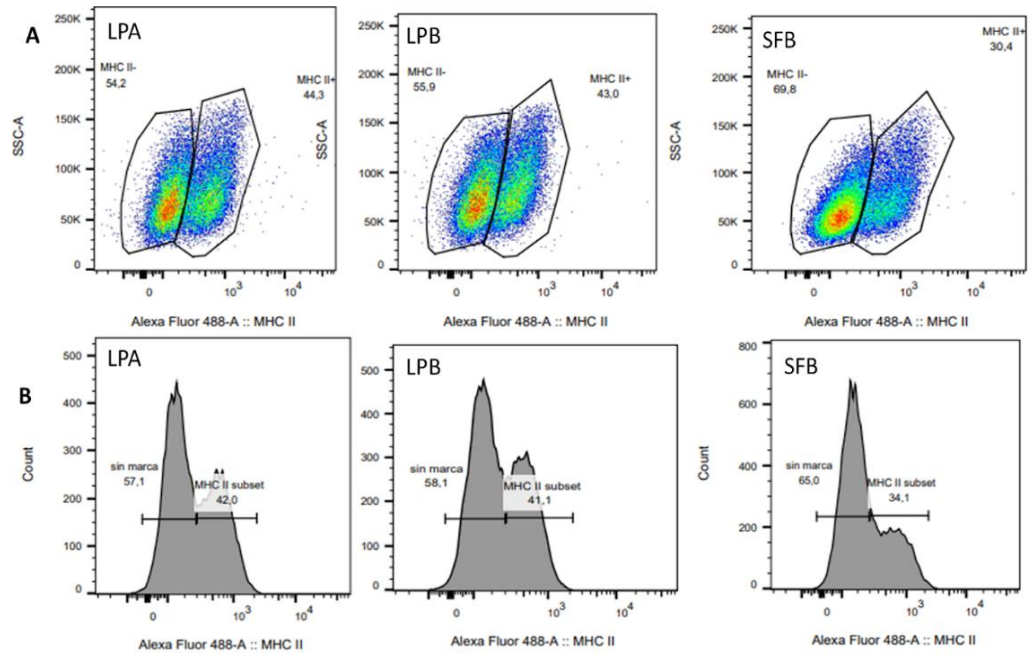


Figura 9. Expresión de MHC II en células estromales mesenquimales derivadas de tejido adiposo equino, en el pasaje 3, cultivadas en presencia LPA, LPB o SFB (n=7). Se muestran los resultados de una de las muestras (a modo representativo) en la que se representa mediante un gráfico dotplot el parámetro FSC (Forward Scatter) vs MHC II (A), y se muestran las regiones definidas para identificar la población celular con expresión de MHC II y la población que no expresa este marcador. B) Histogramas para MHC II, mostrando la población positiva y negativa para MHC II.

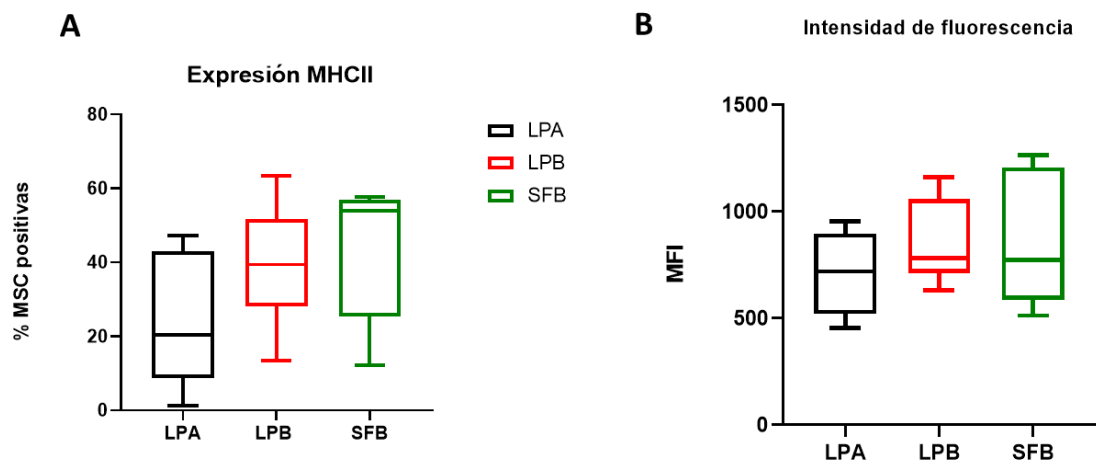


Figura 10. Análisis por citometría de flujo de células estromales mesenquimales equinas derivadas de tejido adiposo, en el pasaje 3, cultivadas en presencia LPA, LPB o SFB (n=7 para cada condición). A) Se representa el porcentaje de células que expresan el marcador MHC II. B) Se representa la Intensidad Media de Fluorescencia (MFI) de la población de células que expresan MHCII. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica ANOVA Kruskal -Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's. Los datos se representan como gráfico de Tukey.

7.6.2 Expresión de genes asociados a la respuesta inmune

Con el fin de obtener un control positivo para las reacciones de qPCR se realizó estimulación mitogénica de sangre entera equina con el LPS y Con A. A partir del ARN purificado de estas muestras de sangre estimuladas, se preparó ADNc que fue utilizado para optimizar las qPCR para GAPDH, IL-6, IL-10, MHC I, MHC II y TNF- α . En todas las muestras estimuladas se observó amplificación para los genes analizados. Todas las qPCR presentaron curvas de amplificación con una buena pendiente y amplificaron un único amplicón, no se observaron dímeros de primers y el control negativo no amplificó en ninguna de las qPCR. En la figura 11 se muestra a modo de ejemplo los resultados de la qPCR optimizada para MHC II. (Fig 11)

Para aplicar el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, las eficiencias de las qPCR para el gen housekeeping y el gen problema deben ser cercanas al 100% y similares entre sí (Livak and Schmittgen, 2001). Para ello, realizamos un pool (20 μ L de cada una) con los ADNc de las muestras estimuladas con LPS (100 ng/mL) y Con A, a partir del cual se hicieron diluciones seriadas al medio para calcular las eficiencias de todas las qPCR. Las pendientes fueron obtenidas de los datos de Ct (para cada dilución de ADNc) vs el log₁₀ (dilución), ajustados por regresión lineal. Las eficiencias calculadas arrojaron valores de 101% y 96% (Tabla VII). Para verificar que las eficiencias fueran similares entre sí, se graficó el ΔCt ($Ct_{GAPDH} - Ct_{gen\ problema}$) vs el log₁₀ (dilución). Las pendientes para todas las qPCR dieron un valor absoluto por debajo de 0,1 por lo cual podemos asumir que las eficiencias de las qPCR de los genes analizados en esta tesis y el gen housekeeping fueron similares, y por tanto pudimos aplicar el método para cuantificar en forma relativa sus expresiones (Livak & Schmittgen, 2001). A modo de ejemplo se muestra los gráficos para validar el método del $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para el gen MCH II (Fig. 12).

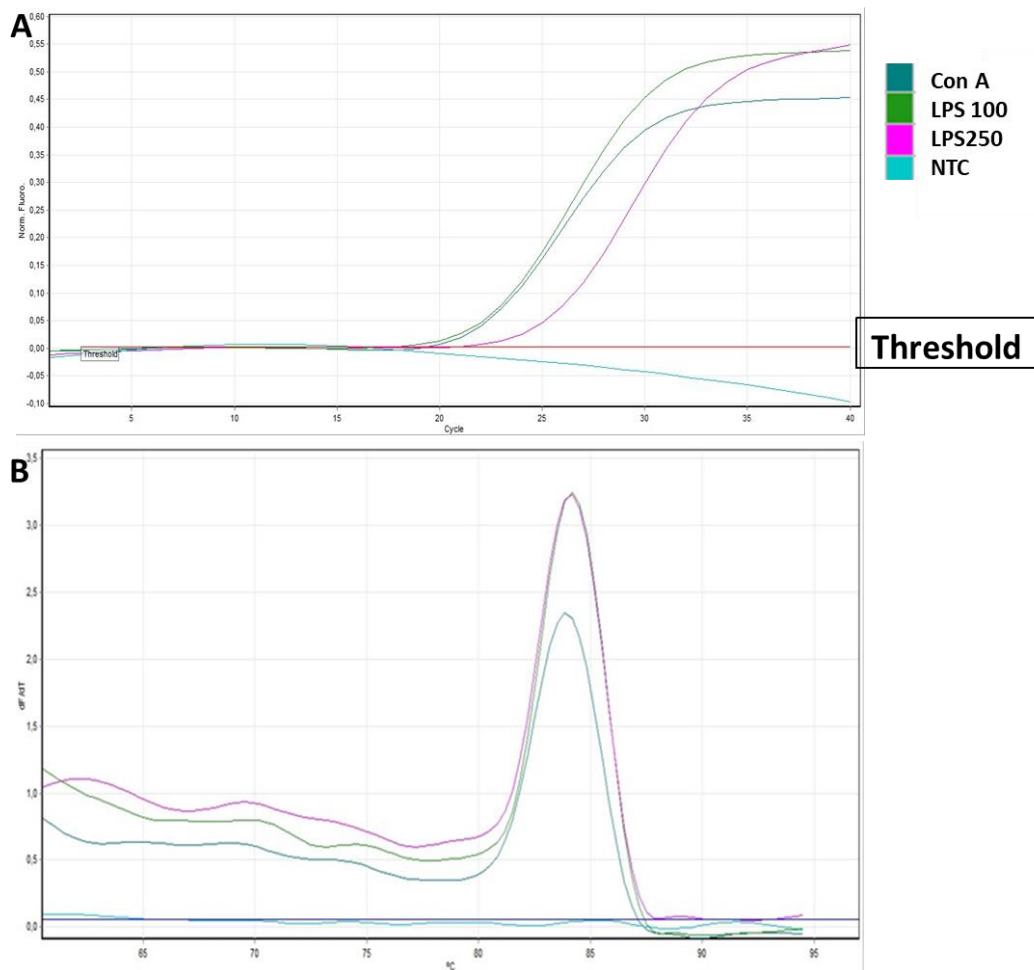


Figura 11. qPCR optimizada para el gen MHC II a partir de ARN de muestras de sangre con estimulación mitogénica (LPS o Con A) y sin estímulo (PBS). (A) Se muestran las curvas de amplificación. (B) Se muestran las curvas de disociación.

Tabla VII. Eficiencia de genes analizados

Gen	Eficiencia
MHC I	101
MHC II	100
IL-6	96
IL-10	97
TNF- α	100

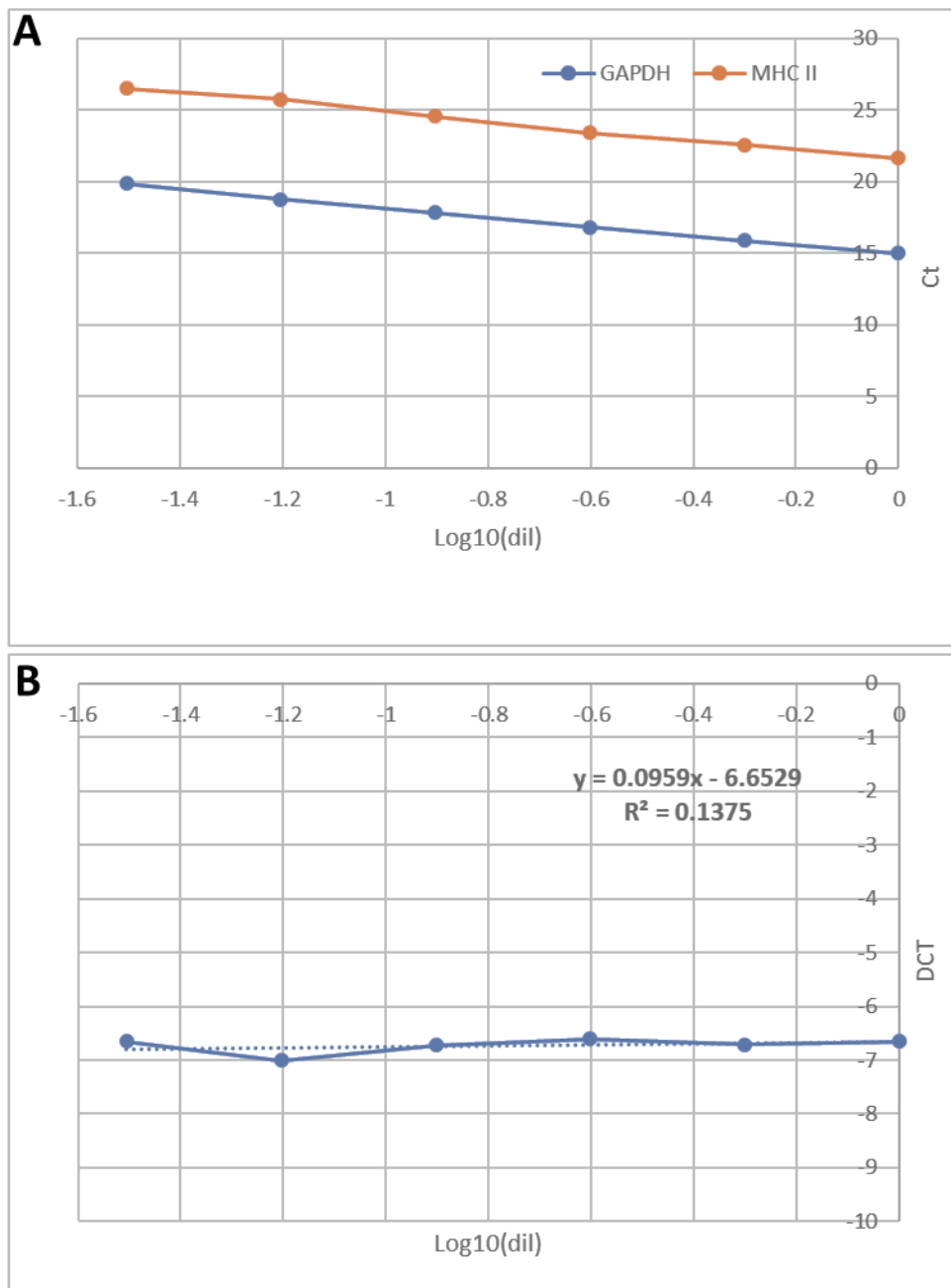


Figura 12. Validación del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (A) Gráfica de Ct vs el Log_{10} (dilución). Un pool de los ADNc fue preparado a partir de ARN de las muestras de sangre, fueron diluidas al medio, y cada dilución fue utilizada como molde para las qPCR. La recta obtenida en el gráfico fue ajustada mediante un análisis de regresión lineal. Las pendientes de cada qPCR fueron utilizadas para calcular las eficiencias. (B) Los ΔCt ($Ct_{\text{GAPDH}} - Ct_{\text{gen problema}}$) para cada dilución fueron calculados y graficados en función del log_{10} (dilución). Los datos fueron ajustados por regresión lineal, y luego fue calculada la pendiente de la curva.

Una vez optimizadas las qPCR para los genes GAPDH, IL-6 IL-10 MHC I, MHC II y TNF- α , se analizó la expresión génica en células del pasaje P₃ provenientes de 3 equinos diferentes. Los ARN obtenidos a partir de los cultivos tuvieron una calidad y concentración adecuada que permitió que sean utilizados para hacer la RT-qPCR. Los resultados mostraron que en el pasaje P₃ de las eAD-MSc para las tres condiciones sólo amplificaron los amplicones para MHC I, MHC II e IL-6. Las tres condiciones (LPA, LPB y la condición control, SFB) mostraron niveles similares de expresión del ARNm para MHC I (Fig. 13, A) e IL-6 (Fig. 13 C). Las células suplementadas con LPA y LPB expresan niveles similares del ARNm de MHC II, niveles que parecerían ser mayores que los de la condición control (SFB) dado que si bien se observó una tendencia a un incremento esta diferencia fue no significativa (Fig. 13, B).

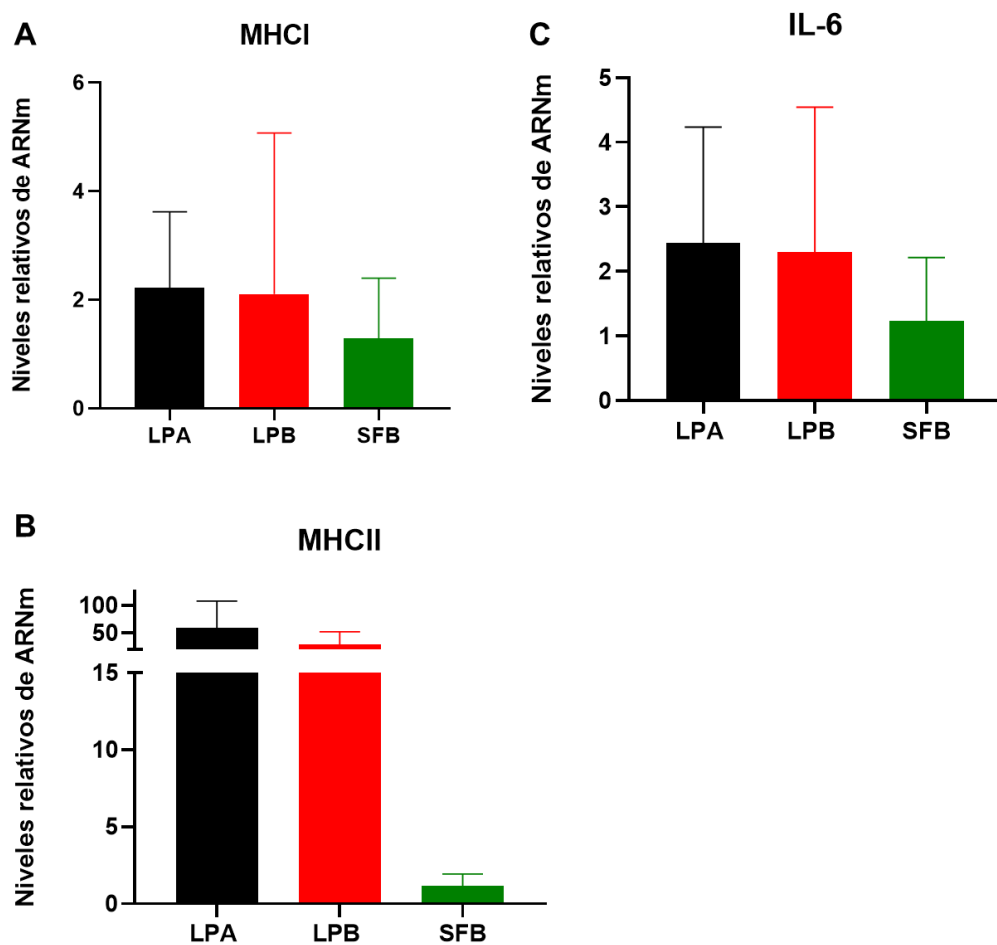


Figura 13. Niveles relativos del ARNm en P3 de células estromales mesenquimales (eAD-MSC) suplementadas con LPA, LPB y SFB. Para todos los genes, las barras corresponden a la Media \pm SEM de los niveles relativos de ARNm de MHC I (A), MHC II (B), y IL-6 (C). Las barras negras corresponden a LPA, las rojas a LPB y las verdes a SFB. Para cada muestra, los niveles de ARNm fueron normalizados respecto al gen GAPDH y relativizados al promedio de la condición SFB. El análisis estadístico se realizó con la prueba no paramétrica ANOVA Kruskal -Wallis y como post-hoc la prueba Dunn's.

8 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron diferentes características de las eADMSC cultivadas con LP, con la finalidad de determinar si éste puede ser usado como suplemento de cultivo en reemplazo del SFB. Para ello, en primera instancia se evaluaron parámetros sanguíneos de los diferentes hemoderivados para la elaboración del LP y se determinó que había 1603×10^3 y 805×10^3 plaquetas/ μL para LPA y LPB. En la literatura hay autores que publican LP con menores y otros con valores mayores. Se describen concentraciones más bajas como 357×10^3 (Sumner et al., 2017), 484×10^3 (Hagen et al., 2021) y 591×10^3 (Yaneselli et al., 2019) o de 1000×10^3 plaquetas/mL (Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013) que es mayor a LPB. Incluso se describe un rango mayor al obtenido en LPA de 1000 – 2000×10^3 plaquetas/ μL (Del Bue et al., 2007). Esto nos muestra una gran heterogeneidad en la concentración de plaquetas y no se ha elucidado cuál sería su concentración óptima (Del Bue et al., 2007; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019).

Estas variaciones pueden estar dadas por los diferentes métodos de obtención del LP equino. En nuestro trabajo, utilizamos el método de doble centrifugación y la referencia fue de v/v, concentrando al 10 y 20% del volumen inicial de plasma similar a estudios anteriores (Gilbertie et al., 2018; Yaneselli et al., 2019) y diferente a otros trabajos que con el mismo método fijan la concentración plaquetaria con el valor de 1000×10^3 plaquetas/ μL (Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013). Por otra parte, otros autores han utilizado la aféresis para la elaboración de LP equino (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Sumner et al., 2017). Este método separa los componentes sanguíneos de forma mecánica y selectiva. El valor de 1000×10^3 plaquetas/ μL fue tomado de lo establecido para humanos (Doucet et al., 2005) y probado en eMSC. De todas formas, nuestros resultados y la literatura muestran un desempeño satisfactorio del LP por debajo de esa concentración establecida originalmente para humanos.

Por consiguiente, debido a la gran heterogeneidad de concentración plaquetaria y de métodos de elaboración de lisado plaquetario sería importante estandarizar su uso en cultivo de eMSC y optimizar la obtención de LP.

Por otra parte, cuando se determinó la relación plaquetas:leucocitos observamos que fue similar entre los LP utilizados, siendo de 171:1 para LPA, 170:1 para LPB y que en términos relativos fue menor que en el plasma (270:1). A diferencia de lo descrito por otros autores que obtuvieron una relación diferente de 1175:1 (Russell & Koch, 2016) y 1002:1 (Yaneselli et al., 2019) para LP concentrado. De todas formas, no está elucidado en la literatura el efecto de la relación plaquetas:leucocitos en los cultivos de eMSC

(Hagen et al., 2021; Yaneselli et al., 2019). En cuanto a la cuantificación de los leucocitos obtuvimos $9 \times 10^3/\mu\text{L}$ y $4,7 \times 10^3/\mu\text{L}$ para LPA y LPB, respectivamente. Comparando estos resultados con otro estudio realizado, nuestro recuento de leucocitos fue superior a 590/mL (Yaneselli et al., 2019). Estos trabajos utilizaron el mismo método de obtención al usado por nosotros (Del Bue et al., 2007; Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019). Se podría especular de este modo que las diferencias pueden estar dadas por la manipulación y/o la variación individual de los equinos donantes. Por otra parte, autores que usaron el método aféresis mostraron un recuento muy inferior de $0,15 \times 10^3/\text{mL}$ (Sumner et al., 2017) debido que la reducción leucocitaria se realiza de forma mecánica separando los componentes celulares en el proceso de extracción (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Sumner et al., 2017). De todas formas, no está determinado cual sería el nivel crítico de leucocitos que podría alterar el perfil de las eMCS.

En nuestro trabajo fueron evaluados los factores de crecimiento TGF- β y PDGF-BB en el LP ya que se sabe que pueden influir positivamente en la proliferación de las MSC (Doucet et al., 2005; Hemeda et al., 2014). Se determinó que los LP utilizados en el presente ensayo contenían niveles de estos factores superiores a los del plasma. El alto nivel de estos factores de crecimiento coincide con diversos trabajos que caracterizan LP equino (Even et al., 2022; Hagen et al., 2021; Russell & Koch, 2016; Sumner et al., 2017). Nuestros resultados mostraron una concentración de 13 ng/mL de TGF- β para LPA y 8,7 ng/mL para LPB. Otros estudios describen concentraciones variables de este factor que van hasta , 24,5ng/mL (Russell & Koch, 2016), 7,3 ng/mL (Sumner et al., 2017) o 3,9 ng/mL (Hagen et al., 2021). En relación al PDGF-BB la concentración fue de 1,3 y 0,8 ng/mL para LPA y LPB, respectivamente. Otros autores reportan valores superiores a los nuestros, 5,2 ng/mL (Russell & Koch, 2016), 3,6 ng/mL (Sumner et al., 2017) o 3,7 ng/mL (Hagen et al., 2021). Estas variaciones en las concentraciones tanto de TGF- β como de PDGF-BB pueden radicar en el proceso de activación del plasma en los ciclos de congelado/descongelado. En nuestro caso se utilizó solo un ciclo de congelado/descongelado al igual que otros trabajos (Del Bue et al., 2007; Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019) y diferente a otros que utilizan más de un ciclo (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Sumner et al., 2017). En la literatura también se ha estudiado una posible relación entre la edad de los equinos donadores y los factores de crecimiento, no encontrando los autores relación entre los mismos (Hagen et al., 2021). Nosotros trabajamos con equinos jóvenes como donadores de sangre para conformar el LP y además se realizó un pool con todas las muestras. Entonces, sería importante estudiar cuales son las

concentraciones óptimas de TGF- β y PDGF-BB en la formulación de LP el cual podría ser un valor estandarizado para su uso en cultivo y no el valor plaquetario debido que no se asegura a misma cantidad de plaquetas mismas concentración de factores de crecimiento (Iudicone et al., 2014).

En la mayoría de los trabajos que evalúan el LP como suplemento para la eMSC en el comienzo del cultivo no son libre de compuestos xenocontaminantes. Debido a que el aislamiento y pasaje primario del cultivo celular es realizado con SFB como suplemento y luego adaptado al LP como se realizó en el presente trabajo (Del Bue et al., 2007; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016; Yaneselli et al., 2019).

Sin embargo, otros trabajos han conseguido establecer y propagar cultivos primarios de eMSC libre de SFB en todas sus etapas (Even et al., 2022; Seo et al., 2013). De todas maneras, en este trabajo como la mayoría de la literatura optan por comenzar con SFB en la etapa de aislamiento debido a que ya se sabe que con solo una privación de 48 h de SFB de los cultivos se reduce la xenocontaminación drásticamente para eMSC (Joswig et al., 2017), como también se ha visto para MSC humanas (Spees et al., 2004). Es importante poder retirar las xenoproteínas debido a que se ha descrito xenorespuesta inmune del receptor a estas proteínas en terapia celular en equinos (Longhini et al., 2019; Owens et al., 2016) y en humanos (Horwitz et al., 2002; Sundin et al., 2006), siendo viable iniciar un cultivo primario con SFB y posteriormente reemplazarlo por LP alogénico como una forma factible de reducir el riesgo de xenorespuesta del receptor (Del Bue et al., 2007; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016; Yaneselli et al., 2019).

Se consiguió la expansión *in vitro* de las eAD-MSC utilizando LP como suplemento coincidiendo con lo descrito anteriormente (Del Bue et al., 2007; Hagen et al., 2021). Asimismo, otros autores también describen el LP como suplemento para cultivo de eMSC derivadas de medula ósea (eBM-MSC) (Naskou et al., 2018; Yaneselli et al., 2019). Este trabajo analizó la proliferación celular por medio del tiempo de doblaje celular (DT) y a través de la prueba de MTT observando un aumento de la proliferación a partir del día 3 de cultivo, pero no encontrando en los resultados diferencias significativas entre las condiciones en sucesivos pasajes lo que nos indica que el LP tiene un comportamiento similar al suplemento de referencia (SFB), coincidiendo con diversos autores que estudian eMSC (Del Bue et al., 2007; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018; Russell & Koch, 2016; Seo et al., 2013; Yaneselli et al., 2019) e incluso se evaluó su uso en cultivo de MSC humanas (Hemeda et al., 2014; Iudicone et al., 2014). La concentración

usada del LP fue al 10% (v/v), en relación al volumen total del medio de cultivo, coincidiendo de este modo con investigaciones previas (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018). Sin embargo, discrepan con el utilizado por Yaneselli et al. (2019) donde se utilizó una concentración de 20% (v/v) de LP encontraron un incremento significativo de la proliferación en los cultivos con LP en comparación al SFB. Por otro lado, se describe que concentraciones menores a 5% de LP resulta en una pobre proliferación celular (Hagen et al., 2021) y en casos donde se evaluó una mayor suplementación al 30% también se observó una baja en proliferación (Russell & Koch, 2016). Entonces, la concentración utilizada del LP es un factor determinante para la proliferación de las eMSC. Se ha demostrado relación dosis dependiente en la proliferación celular y que en un rango de 10 a < 30% sería óptimo para su uso (Del Bue et al., 2007; Russell & Koch, 2016). Asimismo, este efecto dosis de suplemento puede explicar las diferencias con el trabajo de Yaneselli et al. (2019) en la cinética de crecimiento celular. Entonces, tanto para LPA y LPB se logró una proliferación similar al medio de crecimiento estándar. Por un lado, LPB tiene menor concentración plaquetaria. Por otro lado, la formulación de LPB presenta una mayor eficiencia de obtención (12% mientras 5,7% para LPA) en relación al volumen total de sangre periférica requerida para preparar cada formulación. Por tanto, considerando que ambos LP indujeron similar proliferación, LPB representa una mejor alternativa al momento de seleccionarlo como suplemento del cultivo.

Se logró la diferenciación celular para los tres linajes recomendados internacionalmente por la ISCT (Bourin et al., 2013; Dominici et al., 2006). Se realizó la inducción de los cultivos utilizando los diferentes suplementos, LPA, LPB y SFB, de forma similar a trabajos previos los cuales consiguen la tridiferenciación *in vitro* de eMSC (Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018) como también se describe en otras especies como la canina (Hagen et al., 2022), humana (Doucet et al., 2005). Sin embargo, no todos los trabajos que evalúan el LP como suplemento de MSC describen realizar la tridiferenciación *in vitro* sugerida en la literatura (Del Bue et al., 2007; Schallmoser et al., 2007; Seo et al., 2013). Por lo tanto, este trabajo permitió comprobar la tridiferenciación *in vitro* de las eAD-MSK con LP como suplemento.

Para evaluar antígenos inmunogénicos de las eMSC, se determinó la expresión de MHC II a través de citometría de flujo. Se demostró una expresión similar para las tres condiciones, este resultado coincide con la literatura donde se encuentra un perfil de expresión similar entre células suplementadas con LP en relación al SFB además de (Even et al., 2022).

En nuestro trabajo no se encontró cambios en el perfil de expresión a pesar de tener una alta cantidad de leucocitos en ambas formulaciones de LP, lo que hipotéticamente podría influir en su perfil proinflamatorio (Yaneselli et al., 2019). Sin embargo, discrepa con lo reportado por otros autores que encuentran una pobre expresión menor al 10% en eMSC suplementadas con LP (Even et al., 2022; Hagen et al., 2021; Naskou et al., 2018). Las diferencias pueden estar dadas por el tipo de clona utilizada para el inmunomarcado de las células. En este trabajo, se utilizó un anticuerpo monoclonal directamente conjugado a FITC (clon CVS20. En el caso del trabajo de Naskou et al. (2018) utilizan otro clon (EqT2). Asimismo, el pasaje celular también podría influir. Nosotros trabajamos en el pasaje P₃ mientras que Naskou et al. (2018) evalúan las células en P₄. Para finalizar, en la literatura se encuentra gran variación en cuanto al nivel basal de expresión de MHC II para eMSC variando según el equino donante en MHCII expresión baja y alta (Kamm et al., 2019). Es importante explorar cómo nuevos suplementos pueden influir en la inmunogenicidad en un posible receptor de la terapia debido que se ha descrito el rechazo al MHC II de las eMSC en terapia celular (Berglund et al., 2017; Schnabel et al., 2014).

Se evaluó la expresión de genes relacionados al reconocimiento celular como MHC I y MHC II no se encontraron diferencias en los niveles de expresión en las células cultivadas con LPA y LPB con respecto a la condición control. Si se observó un ligero aumento en los gráficos, sin embargo, este aumento no es significativo, siendo esta observación similar a lo estudiado anteriormente por Yaneselli et al. (2019). En relación al análisis de IL-6 no fue significativa la diferencia de expresión entre las condiciones se observa un leve incremento en las condiciones estudiadas con respecto al control, pero no significativo. Este resultado está en discordancia por lo descrito por Yaneselli et al. (2019) que hallaron diferencias en la expresión para las células suplementadas con el LP. Las diferencias con el trabajo mencionados podrían ser explicadas por el origen de las MSC ya que estos analizaron células aisladas de médula ósea, y en este trabajo se analizó células de origen adiposo, se ha observado que la fuente de MSC puede estar relacionada a la expresión génica pudiendo ser variable dependiendo del origen de las mismas (Cassano et al., 2018). Con respecto al nivel de expresión de IL-6 en ensayos de otros autores de células estimuladas con citoquinas proinflamatorias se observó aumento de la expresión de este gen en MSC cultivadas con SFB el estímulo fue realizado con TNF- α e INF- γ (Barrachina et al., 2016; Caffi et al., 2020), demostrando que un microambiente proinflamatorio *in vitro* puede alterar el perfil de las eMSC. Por otro lado, aumentar el *n* de los experimentos podría permitir profundizar en el conocimiento de este perfil génico ver si se encuentran diferencias en la

expresión según el suplemento en aquellos genes que se vio un leve aumento. Sin embargo, varios autores utilizan un n reducido para este tipo de ensayos moleculares por su complejidad (Barrachina et al., 2016; Cassano et al., 2018; Even et al., 2022; Yaneselli et al., 2019)

9 CONCLUSIONES

Se utilizaron dos formulaciones de LP de una alta concentración (LPA) y otra intermedia (LPB) las cuales presentaron similar concentración de factores de crecimiento. Estos nuevos suplementos fueron utilizados para la expansión *in vitro* de las eAD-MSC observando que conservaban sus características de adherencia al plástico, morfología fibroblástica, capacidad clonogénica y multipotencialidad mediante diferenciación a linajes de origen mesodérmicos. Además, comparamos la cinética de crecimiento celular en sucesivos pasajes y no se encontró diferencias entre los cultivos con LP y el suplemento de referencia (SFB). Por otra parte, se comparó el perfil inmunológico a través de la determinación de MCH II en la superficie celular y se encontró una expresión similar para todas las condiciones de cultivo. Asimismo, se evaluó el perfil génico determinado la expresión de MHCI, MHC II y IL-6, se observó similares niveles para todas las condiciones. Por lo mencionado anteriormente, estos resultados permiten proponer al LP como una posible alternativa de suplemento para expansión *in vitro* de eAD-MSC libre de proteínas bovinas y conservando sus características celulares. La opción del LPB parece ser ventajosa respecto a la LPA debido a su eficiencia de obtención y similares resultados como suplemento. Por último, no encontramos alteraciones en el perfil inmunológico significativas en las eMSC cultivadas con LP lo que nos indica su potencial uso en terapia celular debido que conservaron sus características *in vitro*.

10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdelrazik, H., Spaggiari, G. M., Chiossone, L., & Moretta, L. (2011). Mesenchymal stem cells expanded in human platelet lysate display a decreased inhibitory capacity on T- and NK-cell proliferation and function. *European Journal of Immunology*, *41*(11), 3281–3290. <https://doi.org/10.1002/eji.201141542>
- Al Naem, M., Bourebaba, L., Kucharczyk, K., Röcken, M., & Marycz, K. (2020). Therapeutic mesenchymal stromal stem cells: Isolation, characterization and role in equine regenerative medicine and metabolic disorders. *Stem Cell Reviews and Reports*, *16*(2), 301–322. <https://doi.org/10.1007/s12015-019-09932-0>
- Astori, G., Amati, E., Bambi, F., Bernardi, M., Chierigato, K., Schäfer, R., Sella, S., & Rodeghiero, F. (2016). Platelet lysate as a substitute for animal serum for the ex-vivo expansion of mesenchymal stem/stromal cells: Present and future. *Stem Cell Research and Therapy*, *7*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0352-x>
- Barrachina, L., Remacha, A. R., Romero, A., Vázquez, F. J., Albareda, J., Prades, M., Ranera, B., Zaragoza, P., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2016). Effect of inflammatory environment on equine bone marrow derived mesenchymal stem cells immunogenicity and immunomodulatory properties. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *171*, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.007>
- Barrachina, L., Romero, A., Zaragoza, P., Rodellar, C., & Vázquez, F. J. (2018). Practical considerations for clinical use of mesenchymal stem cells: From the laboratory to the horse. *Veterinary Journal*, *238*, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.07.004>
- Berglund et al., 2017. (2017). Allogeneic major histocompatibility complex-mismatched equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells are targeted for death by cytotoxic anti-major histocompatibility complex antibodies. *Equine Veterinary Journal*, *49*(4), 539–544. <https://doi.org/10.1111/evj.12647>
- Bieback, K., Hecker, A., Kocaömer, A., Lannert, H., Schallmoser, K., Strunk, D., & Klüter, H. (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells*, *27*(9), 2331–2341. <https://doi.org/10.1002/stem.139>
- Bourin, P., Bunnell, B. A., Casteilla, L., Dominici, M., Katz, A. J., March, K. L., Redl, H., Rubin, J. P., Yoshimura, K., & Gimble, J. M. (2013). Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: A joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International

- So. *Cytherapy*, 15(6), 641–648. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.02.006>
- Caffi, V., Espinosa, G., Gajardo, G., Morales, N., Durán, M. C., Uberti, B., Morán, G., Plaza, A., & Henríquez, C. (2020). Pre-conditioning of Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Increases Their Immunomodulatory Capacity. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00318>
- Cassano et al., 2018. (2018). The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 195, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.10.003>
- Clark, K. C., Kol, A., Shahbenderian, S., Granick, J. L., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2016). Canine and Equine Mesenchymal Stem Cells Grown in Serum Free Media Have Altered Immunophenotype. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(2), 245–256. <https://doi.org/10.1007/s12015-015-9638-0>
- Del Bue, M., Riccò, S., Conti, V., Merli, E., Ramoni, R., & Grolli, S. (2007). Platelet lysate promotes in vitro proliferation of equine mesenchymal stem cells and tenocytes. *Veterinary Research Communications*, 31(SUPPL. 1), 289–292. <https://doi.org/10.1007/s11259-007-0099-z>
- Dias, I. E., Pinto, P. O., Barros, L. C., Viegas, C. A., Dias, I. R., & Carvalho, P. P. (2019). Mesenchymal stem cells therapy in companion animals: useful for immune-mediated diseases? *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2087-2>
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy*, 8(4), 315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
- Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J. R., Begot, L., Holy, X., & Lataillade, J. J. (2005). Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *Journal of Cellular Physiology*, 205(2), 228–236. <https://doi.org/10.1002/jcp.20391>
- Even, K. M., Gaesser, A. M., Ciamillo, S. A., Linardi, R. L., & Ortved, K. F. (2022). Comparing the immunomodulatory properties of equine BM-MSCs culture expanded in autologous platelet lysate, pooled platelet lysate, equine serum and fetal bovine serum supplemented culture media. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.958724>
- Flemming, A., Schallmoser, K., Strunk, D., Stolk, M., Volk, H. D., & Seifert, M. (2011). Immunomodulative efficacy of bone marrow-derived mesenchymal stem cells cultured in human platelet lysate. *Journal of Clinical Immunology*, 31(6), 1143–1156. <https://doi.org/10.1007/s10875-011-9581-z>

- Gilbertie, J. M., Long, J. M., Schubert, A. G., Berglund, A. K., Schaer, T. P., & Schnabel, L. V. (2018). Pooled platelet-rich plasma lysate therapy increases synoviocyte proliferation and hyaluronic acid production while protecting chondrocytes from synoviocyte-derived inflammatory mediators. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(JUL), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00150>
- Gstraunthaler, G., Lindl, T., & Van Der Valk, J. (2013). A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. *Cytotechnology*, 65(5), 791–793. <https://doi.org/10.1007/s10616-013-9633-8>
- Guercio, A., Bella, S. Di, Casella, S., Marco, P. Di, Russo, C., & Piccione, G. (2013). Canine mesenchymal stemcells (mscs): Characterization in relation to donor age and adipose tissue-harvesting site. *Cell Biology International*, 37(8), 789–798. <https://doi.org/10.1002/cbin.10090>
- Hagen, A., Holland, H., Brandt, V. P., Doll, C. U., Häußler, T. C., Melzer, M., Moellerberndt, J., Lehmann, H., & Burk, J. (2022). Platelet Lysate for Mesenchymal Stromal Cell Culture in the Canine and Equine Species: Analogous but Not the Same. *Animals*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/ani12020189>
- Hagen, A., Lehmann, H., Aurich, S., Bauer, N., Melzer, M., Moellerberndt, J., Patané, V., Schnabel, C. L., & Burk, J. (2021). Scalable Production of Equine Platelet Lysate for Multipotent Mesenchymal Stromal Cell Culture. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.613621>
- Heiskanen, A., Satomaa, T., Tiitinen, S., Laitinen, A., Mannelin, S., Impola, U., Mikkola, M., Olsson, C., Miller-Podraza, H., Blomqvist, M., Olonen, A., Salo, H., Lehenkari, P., Tuuri, T., Otonkoski, T., Natunen, J., Saarinen, J., & Laine, J. (2007). N-Glycolylneuraminic Acid Xenoantigen Contamination of Human Embryonic and Mesenchymal Stem Cells Is Substantially Reversible. *Stem Cells*, 25(1), 197–202. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0444>
- Hemeda, H., Giebel, B., & Wagner, W. (2014). Evaluation of human platelet lysate versus fetal bovine serum for culture of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 16(2), 170–180. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.004>
- Hemeda, H., Kalz, J., Walenda, G., Lohmann, M., & Wagner, W. (2013). Heparin concentration is critical for cell culture with human platelet lysate. *Cytotherapy*, 15(9), 1174–1181. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.05.006>
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., & Hofmann, T. (2002). Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8932–8937. <https://doi.org/10.1073/pnas.132252399>

- Iudicone, P., Fioravanti, D., Bonanno, G., Miceli, M., Lavorino, C., Totta, P., Frati, L., Nuti, M., & Pierelli, L. (2014). Pathogen-free, plasma-poor platelet lysate and expansion of human mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*, *12*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-28>
- Jochems, C. E., van der Valk, J. B., Stafleu, F. R., & Baumans, V. (2002). *The Use of Fetal Bovine Serum: Ethical or Scientific Problem?*
- Joswig, A. J., Mitchell, A., Cummings, K. J., Levine, G. J., Gregory, C. A., Smith, R., & Watts, A. E. (2017). Repeated intra-articular injection of allogeneic mesenchymal stem cells causes an adverse response compared to autologous cells in the equine model. *Stem Cell Research & Therapy*, *8*(1), 42. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0503-8>
- Kamm, J. L., Parlane, N. A., Riley, C. B., Gee, E. K., Dittmer, K. E., & McIlwraith, C. W. (2019). Blood type and breed-associated differences in cell marker expression on equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells including major histocompatibility complex class II antigen expression. *PLoS ONE*, *14*(11), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225161>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, *25*(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Longhini, A. L. F., Salazar, T. E., Vieira, C., Trinh, T., Duan, Y., Pay, L. M., Calzi, S. L., Losh, M., Johnston, N. A., Xie, H., Kim, M., Hunt, R. J., Yoder, M. C., Santoro, D., McCarrel, T. M., & Grant, M. B. (2019). Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells demonstrate immunomodulatory potential for therapeutic use in horses. *PLoS ONE*, *14*(3), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212642>
- MacDonald, E. S., & Barrett, J. G. (2020). The Potential of Mesenchymal Stem Cells to Treat Systemic Inflammation in Horses. *Frontiers in Veterinary Science*, *6*(January), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00507>
- Mojica-Henshaw, M. P., Jacobson, P., Morris, J., Kelley, L., Pierce, J., Boyer, M., & Reems, J. A. (2013). Serum-converted platelet lysate can substitute for fetal bovine serum in human mesenchymal stromal cell cultures. *Cytotherapy*, *15*(12), 1458–1468. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.06.014>
- Müller, I., Kordowich, S., Holzwarth, C., Spano, C., Isensee, G., Staiber, A., Viebahn, S., Gieseke, F., Langer, H., Gawaz, M. P., Horwitz, E. M., Conte, P., Handgretinger, R., & Dominici, M. (2006). Animal serum-free culture conditions for isolation and expansion of multipotent mesenchymal stromal cells from human BM. *Cytotherapy*, *8*(5), 437–444. <https://doi.org/10.1080/14653240600920782>
- Naskou, M. C., Sumner, S. M., Chocallo, A., Kemelmakher, H., Thoresen, M., Copland, I., Galipeau, J., & Peroni, J. F. (2018). Platelet lysate as a novel

serum-free media supplement for the culture of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1).
<https://doi.org/10.1186/s13287-018-0823-3>

Owens, S. D., Kol, A., Walker, N. J., & Borjesson, D. L. (2016). Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Treatment Induces Specific Alloantibodies in Horses. *Stem Cells International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5830103>

Pecora, A., Pérez López, J., Jordán, M. J., Franco, L. N., Politzki, R., Ruiz, V., & Alvarez, I. (2020). Analysis of irradiated Argentinean fetal bovine serum for adventitious agents. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(6), 892–897. <https://doi.org/10.1177/1040638720951556>

Pezzanite, L., Chow, L., Griffenhagen, G., Dow, S., & Goodrich, L. (2021). Impact of Three Different Serum Sources on Functional Properties of Equine Mesenchymal Stromal Cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(April), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.634064>

Pilgrim, C. R., McCahill, K. A., Rops, J. G., Dufour, J. M., Russell, K. A., & Koch, T. G. (2022). A Review of Fetal Bovine Serum in the Culture of Mesenchymal Stromal Cells and Potential Alternatives for Veterinary Medicine. *Frontiers in Veterinary Science*, 9(May), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.859025>

Remacha, A. R., Barrachina, L., Álvarez-Arguedas, S., Ranera, B., Romero, A., Vázquez, F. J., Zaragoza, P., Yañez, R., Martín-Burriel, I., & Rodellar, C. (2015). Expression of genes involved in immune response and in vitro immunosuppressive effect of equine MSCs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 165(3–4), 107–118.
<https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.04.004>

Rowland, A. L., Burns, M. E., Levine, G. J., & Watts, A. E. (2021). Preparation Technique Affects Recipient Immune Targeting of Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 8(September), 8–11. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.724041>

Russell, K. A., Gibson, T. W. G., Chong, A., Co, C., & Koch, T. G. (2015). Canine platelet lysate is inferior to fetal bovine serum for the isolation and propagation of canine adipose tissue- and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *PLoS ONE*, 10(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136621>

Russell, K. A., & Koch, T. G. (2016). Equine platelet lysate as an alternative to fetal bovine serum in equine mesenchymal stromal cell culture - too much of a good thing? *Equine Veterinary Journal*, 48(2), 261–264.
<https://doi.org/10.1111/evj.12440>

Sadeghi, M., Kapusinszky, B., Yugo, D. M., Phan, T. G., Deng, X., Kanevsky, I., Opriessnig, T., Woolums, A. R., Hurley, D. J., Meng, X. J., & Delwart, E. (2017). Virome of US bovine calf serum. *Biologicals*, 46, 64–67.
<https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2016.12.009>

- Sakamoto, N., Tsuji, K., Muul, L. M., Lawler, A. M., Petricoin, E. F., Candotti, F., Metcalf, J. A., Tavel, J. A., Lane, H. C., Urba, W. J., Fox, B. A., Varki, A., Lunney, J. K., & Rosenberg, A. S. (2007). Bovine apolipoprotein B-100 is a dominant immunogen in therapeutic cell populations cultured in fetal calf serum in mice and humans. *Blood*, *110*(2), 501–508.
<https://doi.org/10.1182/blood-2007-01-066522>
- Schallmoser, K., Bartmann, C., Rohde, E., Reinisch, A., Kashofer, K., Stadelmeyer, E., Drexler, C., Lanzer, G., Linkesch, W., & Strunk, D. (2007). Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, *47*(8), 1436–1446.
<https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2007.01220.x>
- Schnabel, L. V., Pezzanite, L. M., Antczak, D. F., Felipe, M. J. B., & Fortier, L. A. (2014). Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Research and Therapy*, *5*(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/scrt402>
- Seo, J. pil, Tsuzuki, N., Haneda, S., Yamada, K., Furuoka, H., Tabata, Y., & Sasaki, N. (2013). Comparison of allogeneic platelet lysate and fetal bovine serum for in vitro expansion of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Research in Veterinary Science*, *95*(2), 693–698.
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.04.024>
- Shih, D. T. B., & Burnouf, T. (2015). Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *New Biotechnology*, *32*(1), 199–211. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2014.06.001>
- Spees, J. L., Gregory, C. A., Singh, H., Tucker, H. A., Peister, A., Lynch, P. J., Hsu, S. C., Smith, J., & Prockop, D. J. (2004). Internalized antigens must be removed to prepare hypoimmunogenic mesenchymal stem cells for cell and gene therapy. *Molecular Therapy*, *9*(5), 747–756.
<https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.02.012>
- Sumner, S. M., Naskou, M. C., Thoresen, M., Copland, I., & Peroni, J. F. (2017). Platelet lysate obtained via plateletpheresis performed in standing and awake equine donors. *Transfusion*, *57*(7), 1755–1762.
<https://doi.org/10.1111/trf.14124>
- Sundin, M., Örvell, C., Rasmusson, I., Sundberg, B., Ringdén, O., & Le Blanc, K. (2006). Mesenchymal stem cells are susceptible to human herpesviruses, but viral DNA cannot be detected in the healthy seropositive individual. *Bone Marrow Transplantation*, *37*(11), 1051–1059.
<https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705368>
- Vidal, M. A., Kilroy, G. E., Johnson, J. R., Lopez, M. J., Moore, R. M., & Gimble, J. M. (2006). Cell growth characteristics and differentiation frequency of

adherent equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells: Adipogenic and osteogenic capacity. *Veterinary Surgery*, 35(7), 601–610.
<https://doi.org/10.1111/j.1532-950X.2006.00197.x>

Yaneselli, K., Barrachina, L., Remacha, A. R., Algorta, A., Vitoria, A., Cequier, A., Romero, A., Vázquez, F. J., Maisonnave, J., & Rodellar, C. (2019). Effect of allogeneic platelet lysate on equine bone marrow derived mesenchymal stem cell characteristics, including immunogenic and immunomodulatory gene expression profile. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 217(June), 109944. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2019.109944>