Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral

Original

Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea

Sara Oliva-Lozano[1], Victoria Pulido-Escribano[1], Bárbara Torrecillas-Baena[1], Alfonso Calañas-Continente[1,2], Feliciano Priego-Capote[3,4], Marta Camacho-Cardenosa[1], Antonio Casado-Díaz[1,2,4]

[1]Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC). Córdoba. [2]Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. [3]Departamento de Química Analítica. Campus Rabanales. Universidad de Córdoba. Córdoba. [4]Centro de Investigación Biomédica en Red de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES). Córdoba

Resumen

Introducción: el uso de vesículas extracelulares (VE) tiene un alto potencial en medicina regenerativa. Aunque principalmente se han estudiado las derivadas de células estromales mesenquimales (MSC), las VE circulantes de sangre de cordón umbilical (veCU) o de adultos jóvenes sanos (veAD), también contienen factores que pueden favorecer la regeneración tisular. Este estudio evalúa el efecto de veCU y veAD sobre la diferenciación de MSC a osteoblastos y adipocitos, y la angiogénesis de células endoteliales.

Material y métodos: las VE fueron aisladas por cromatografía de exclusión de tamaño, caracterizadas y cuantificadas. Cultivos de MSC fueron tratados con veCU y veAD durante la diferenciación a osteoblastos o adipocitos. En ellas se estudió la expresión de genes osteoblásticos o adipogénicos, la mineralización y la formación de vesículas de grasa. Fueron evaluadas células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) en ensayos de angiogénesis.

Resultados: VeCU y veAD no afectaron a la viabilidad de las MSC, pero veAD aumentó la de HUVEC. En osteoblastos, aumentó la expresión de colágeno alfa-1 tipo I (COL1A1) con veAD, pero la mineralización no se afectó. En adipocitos se inhibió la expresión de adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) y la proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4), y disminuyó la formación de vesículas de grasa con ambos tipos de VE. En HUVEC, veCU y veAD indujeron la angiogénesis.

Conclusión: los resultados sugieren que ambos tipos de VE, procedentes de fuentes abundantes, sin aspectos éticos importantes y fáciles de aislar, tienen un alto potencial en medicina regenerativa aplicada al hueso, inhibiendo la adiposidad de la médula ósea y favoreciendo la angiogénesis.

Palabras clave:
Células estromales mesenquimales.
Adipocitos.
Osteoblastos.
Vesículas extracelulares circulantes.
Exosomas.
Angiogénesis.

Recibido: 01/11/2024 • Aceptado: 09/02/2025

Sara Oliva-Lozano y Victoria Pulido-Escribano han contribuido de igual modo.

Marta Camacho-Cardenosa y Antonio Casado-Díaz son los autores de correspondencia de este artículo.

Financiación: esta investigación ha sido financiada por el CIBER "Fragilidad y Envejecimiento Saludable" (CIBERFES, CB16/10/00501) y el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII, PI21/01935), Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), España, y la Unión Europea (UE).

Aspectos éticos: este estudio ha sido desarrollado cumpliendo con la Declaración de Helsinki. Todos los participantes dieron su consentimiento informado por escrito antes de su inclusión en el estudio.

Agradecimientos: beca FEIOMM de Investigación Traslacional 2022.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflicto de interés.

Inteligencia artificial: los autores declaran no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.

Oliva-Lozano S, Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Calañas-Continente A, Priego-Capote F, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Las vesículas extracelulares circulantes modifican la diferenciación de células estromales mesenquimales y angiogénesis. Potencial uso en regeneración ósea. Rev Osteoporos Metab Miner 2025;17(1):19-30

DOI: 10.20960/RevOsteoporosMetabMiner.00066

Correspondencia:
Antonio Casado-Díaz. Unidad de Gestión Clínica de Endocrinología y Nutrición. Hospital Universitario Reina Sofía. Edificio IMIBIC. Menéndez Pidal, s/n. 14004 Córdoba
e-mail: bb1cadia@uco.es

INTRODUCCIÓN

El sistema óseo depende de un equilibrio entre la formación y la reabsorción ósea. Cuando este equilibrio se ve interrumpido por un traumatismo en forma de fractura ósea, este tejido tiene la capacidad de autorrenovación (1). En este proceso de cicatrización, intervienen distintos tipos celulares, matrices extracelulares y moléculas de señalización (2), a lo largo de las tres principales fases que tienen lugar: fase de inflamación, fase reparativa y fase de remodelado. En la fase reparativa, las células osteoprogenitoras y las células mesenquimales indiferenciadas son inducidas a diferenciarse a osteoblastos, en lugar de a otros tipos celulares, como los adipocitos (3). Además, en el proceso regenerativo es fundamental la formación de nuevos vasos sanguíneos que aporten el oxígeno y nutrientes necesarios para la formación ósea (2). Sin embargo, en algunos casos, pueden producirse retrasos en la cicatrización, fracturas no consolidadas o enfermedades óseas (osteoporosis, osteonecrosis o cáncer). Las cuales, presentan una morbilidad significativa y merman sustancialmente la actividad y calidad de vida de los pacientes que las sufren. Por ello, es necesario nuevas estrategias terapéuticas que puedan reducir la inmovilización prolongada o las intervenciones quirúrgicas repetidas. Estas podrían además suponer un coste significativo para los sistemas sanitarios y la sociedad (4).

Recientes avances en la ingeniería de tejidos han propuesto la combinación de diferentes tipos celulares con biomateriales sintéticos, como alternativa a los injertos óseos. Concretamente, las células madre estromales mesenquimales (MSC) derivadas de médula ósea, han sido propuestas para tratar diversas patologías, debido a su capacidad de diferenciación, regenerativa e inmunomoduladora (5). Sin embargo, aunque pueden obtenerse de terceros donantes, la posibilidad de la persistencia de las MSC implantadas en los pacientes receptores o la formación de tejidos ectópicos han frenado su aplicación para la curación de lesiones óseas (6). Además, entre otras limitaciones para su aplicación se encuentran la dificultad para mantener una potencia y viabilidad óptima durante la expansión celular, y la forma de administración al paciente (7). Estudios recientes han revelado que el potencial de las MSC en la regeneración tisular está ligado a su actividad paracrina, la cual, depende en parte, de las vesículas extracelulares (VE) derivadas del secretoma. Así, se ha propuesto el uso de estas VE en medicina regenerativa como una estrategia terapéutica libre de células (8).

Las VE tienen una función de comunicación intercelular y contienen gran variedad de moléculas biológicamente activas, como proteínas, lípidos y distintos tipos de ácidos nucleicos que pueden ser relevantes en la respuesta inflamatoria y en la regeneración tisular a través de señales que se transmiten a células receptoras (9). En función de su tamaño, las VE pueden ser clasificadas como microvesículas, exosomas y cuerpos apoptóticos. Concretamente, los exosomas, oscilan entre 40 y 100 nm, tienen un origen endosomal y son liberados por exocitosis de cuerpos multivesiculares a través de membranas plasmáticas (7). Así, pueden ser administrados por vía intravenosa y circular a través de fluidos corporales, como la sangre, la orina o la saliva (10). Estos exosomas parecen transmitir los efectos terapéuticos de la célula de origen, a la vez que solventan las limitaciones propias del uso de células en medicina regenerativa (7,9). Pueden ser aislados de múltiples fluidos corporales como semen, sangre, orina, saliva, leche materna, líquido amniótico, ascítico o cefalorraquídeo y bilis (11). El contenido de estas VE circulantes depende del estado del organismo, por lo que son una fuente de biomoarcadores y de factores que pueden ser utilizados incluso para aplicaciones terapéuticas, como alternativa a la VE derivadas de MSC. Efectivamente, la utilización de VE de MSC supone la manipulación de cultivos celulares *in vitro,* lo cual puede provocar pérdida de propiedades de las MSC e inestabilidad genética al efectuarse fuera de su nicho natural (12). Esto puede ser evitado en parte mediante líneas estables e inmortalizadas de MSC obtenidas por manipulación genética, induciendo por ejemplo la expresión de la telomerasa transcriptasa inversa humana (hTERT). Este procedimiento ha producido MSC con una alta capacidad de proliferación y expansión, manteniendo sus propiedades inmunomoduladoras, de diferenciación y regenerativas (13,14). Aunque diversos estudios en animales han mostrado que con el tiempo MSC inmortalizadas no se transforman en células tumorales y por lo tanto concluyen que pueden ser consideradas como seguras para su posible uso clínico, estos estudios tienen ciertas limitaciones. Entre ellas se encuentran la falta de ensayos clínicos y el desconocimiento aún sobre si las MSC inmortalizadas pueden acumular mutaciones no deseadas tras largos periodos de expansión. Por ello, se ha sugerido que el uso de estas células, tanto en terapia celular como en terapia libre de células basada en el uso de VE, debe estar sujeto a controles estrictos durante su cultivo (15). Esto aumenta la complejidad del procedimiento debido a la necesidad de mantener las líneas de MSC estables y el diseño de biorreactores para la producción a gran escala de VE. Por ello es interesantes estudiar otras fuentes alternativas de VE con capacidad regenerativa, entre las que se encuentran las VE circulantes en sangre, las cuales pueden ser obtenidas sin necesidad de expandir y mantener células en cultivo (16). Además, la cantidad de VE obtenidas en plasma, puede ser entre 10 y más de 100 veces superior a la obtenida a partir de cultivos celulares (17). Una posible fuente es la sangre de cordón umbilical. La cual tiene una composición similar a la de la médula ósea en adultos, pero a diferencia de esta, también contiene una serie de células inmunosupresoras, que le permite reducir los niveles de citoquinas inflamatorias (18). En humanos se ha observado que las VE derivadas de sangre de cordón umbilical (veCU), en relación con las de san-

gre periférica de adultos (veAD), poseen una mayor expresión de miRNA involucrados en el embarazo, la supresión de la leucemia, la inhibición de la inflamación, la movilidad celular y el desarrollo del sistema nervioso, además de factores relacionados con el desarrollo embrionario (19,20), lo que sugiere un alto potencial regenerativo. En cuanto a las veAD, diversos estudios han mostrado su potencial terapéutico para el tratamiento de procesos isquémicos y cicatrización de heridas (21). Así, el objetivo del presente estudio ha sido evaluar los potenciales efectos veCU y veAD sobre la angiogénesis de células endoteliales y la diferenciación osteoblástica y adipogénica de MSC.

MATERIAL Y MÉTODOS

EXTRACCIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES DE PLASMA SANGUÍNEO

Tras firma de consentimiento informado, mujeres sanas, sin patologías crónicas y en edad adulta (entre 26 y 31 años) fueron sometidas a una única extracción de sangre. La sangre de cordón umbilical fue donada por madres que cumplían los mismos criterios de inclusión que las adultas sanas, y del mismo modo, firmaron su consentimiento de participación.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm 10 minutos para la obtención del plasma. Un mililitro de plasma se pasó por columnas de cromatografías de exclusión de tamaño *PURE-EVs* (HansaBioMed Life Sciences Ltd.) utilizando disolución salina tamponada con fosfato (PBS) como vehículo. Los 3 mililitros en los que eluyeron las VE se concentraron mediante ultrafiltración con concentradores de 10 MWCO (Vivaspin 6 centrifugal concentrator, Sartorius) hasta un volumen de 300-350 µl que se almacenaron a -20 °C hasta su uso. La concentración y tamaño de los exosomas obtenidos de cada muestra se determinaron con un analizador de seguimiento de nanopartículas (Nanosight NS300) basado en la tecnología "Nanoparticle Tracking Analysis" (NTA) en el Instituto Universitario de Nanoquímica (IUNAN) de la Universidad de Córdoba.

CARACTERIZACIÓN DE LAS VE MEDIANTE *WESTERN BLOT*

Las VE se caracterizaron mediante *Western blot*. Para ello, 10 ug de cada muestra fueron cargados en un gel de acrilamida 8-16 % (nUView Tris-Glycine Precast Gels, NuSeP) en condiciones desnaturalizantes y separados por electroforesis usando el sistema "Mini-Protean" (Bio-Rad). Tras ello, las proteínas se transfirieren a una membrana de difluoruro de polivinilidina (PVDF) (Bio-Rad) mediante *Trans-Blot Tranfer System* (Bio-Rad). La membrana fue bloqueada con una solución al 5 % de leche desnatada en polvo en tampón TTBS (20 nM Tril-CL pH 7.6, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween) durante 1 h a temperatura ambiente y se incubó a 4 °C durante toda la noche, con los anticuerpos primarios anti-CD81 (25kDa, 1:500; ref.: 10630D), CD9 (25kDa, 1:1000; ref.: 10626D) y anti-CD63 (30-60 kDa, 1:1000; ref.: 10628D), todos ellos en 1 % en leche con TTBS. Tras ello, se lavó con TTBS y se incubó durante 1h con el anticuerpo secundario anti-mouse (1:4000; ref.: 32430), en 2 % de leche con TTBS. Todos los anticuerpos utilizados fueron de Invitrogen, ThermoFisher Scientific. La detección se realizó utilizando el sustrato quimioluminiscente *Clarity Western ECL Substrate* (Bio-Rad) y las imágenes se adquirieron con el sistema ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad) mediante el software Image Lab 6.1 del mismo fabricante.

CULTIVOS CELULARES DE MSC Y HUVEC

Las MSC utilizadas se aislaron a partir de células mononucleares criopreservadas comerciales (Stemcell Technologies, Colonia, Alemania) según el protocolo descrito previamente por nuestro grupo (22). Fueron expandidas en medio esencial mínimo alfa (αMEM) de Biowest (Nuaillé, Francia), que contenía 2 mM de ultraglutamina (Biowest), 10 % de suero bovino fetal (FBS; Gibco-Thermo Fisher Scientific), 100 U de penicilina, 0,1 mg de estreptomicina/ml y 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-2) de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EE. UU.). Las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) de Lonza (Basilea, Suiza) fueron crecidas en medio basal endotelial (EBM), con suplementos y factores de crecimiento, conocido como medio de crecimiento endotelial (EGM) de Lonza. Este contenía 10 % de FBS, hidrocortisona, gentamicina, factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) y extracto de cerebro bovino.

Tanto los cultivos de MSC como de HUVEC se incubaron a 37 °C con 95 % de humedad y 5 % de CO_2. Cuando alcanzaron el 90 % de confluencia, las células fueron levantadas con tripsina-EDTA (Gibco) y sembradas en placas de cultivo (Nalgene-Nunc-Thermo Fisher Scientific) de 12 (P12), 24 (P24) o 96 pocillos (P96) para los diferentes experimentos.

ENSAYO DE VIABILIDAD CELULAR

La viabilidad celular se determinó utilizando el ensayo de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolio (MTT; Sigma-Aldrich). Las MSC y HUVEC se sembraron en P96, a una densidad de 4000 y 8000 células por pocillo, respectivamente, en el medio de cultivo correspondiente a cada tipo celular, según lo descrito en el apartado anterior. Tras 24 horas, el medio se sustituyó por medio con FBS libre de exosomas, suplementado con distintas concentraciones de veCU o veAD (10×10^6, 20×10^6, 40×10^6, 80×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). Después de 72 h, se retiró el medio y se

añadieron 50 µl/pocillo de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sin rojo fenol suplementado con 1 mg de MTT/ml (ambos de Sigma-Aldrich). Después de 2 h de incubación, el medio fue retirado y, los cristales de formazán producidos, disueltos en isopropanol. En la solución resultante, se midió la absorbancia a 570 nm, utilizando la absorbancia a 650 nm como referencia, con un espectrofotómetro de microplacas PowerWave XS de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE. UU.).

ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR

La migración se estudió mediante el ensayo *Scratch* en P24. En cultivos en confluencia, se generó una zona libre de células utilizando la punta de una pipeta P200, y se adicionaron al medio distintas concentraciones de veCU o de veAD (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). Los cultivos se mantuvieron hasta 24 h, obteniendo imágenes a distintos tiempos a través de un *IncuCyte Zoom Imain System, Sartorius.* Imágenes a 18 y 15 h de migración para MSC y HUVEC, respectivamente, fueron analizadas con el *software* ImageJ V1.53f51 (NIH; Bethesda, MD, USA). Los tiempos fueron seleccionados debido a que en tiempos posteriores la zona libre de células había sido totalmente ocupada por las células, lo que impedía identificar diferencias entre tratamientos. La migración se cuantificó en relación al porcentaje del área inicial no ocupada por las células.

DIFERENCIACIÓN DE MSC A OSTEOBLASTOS Y ADIPOCITOS

En cultivos de MSC al 60-80 % de confluencia, se indujo la diferenciación a osteoblastos o adipocitos. La diferenciación osteoblástica se mantuvo durante 21 días en medio suplementado con 10 nM de dexametasona, 0,2 mM de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerolfosfato (Sigma-Aldrich), en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de VE evaluadas (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). Por otro lado, la diferenciación hacia adipocitos fue inducida con 500 nM de dexametasona, 0,5 mM de isobutilmetilxantina y 50 µM de indometacina (todos de Sigma-Aldrich), manteniéndose durante 14 días, en presencia o ausencia de las distintas concentraciones de VE.

TINCIONES CITOQUÍMICAS

La tinción con rojo de alizarina a los 21 días de la diferenciación osteoblástica se utilizó para la visualización y cuantificación de la mineralización de la matriz extracelular. Cultivos en P12 se fijaron con formaldehído al 3,7 % durante 10 min y posteriormente fueron teñidos con 40 mM de rojo de alizarina en agua, pH 4,15 (Sigma-Aldrich) durante 10 min. A continuación, los pocillos se lavaron varias veces con isopropanol al 60 %, se secaron y se visualizaron con microscopio óptico. Las mediciones de depósitos de rojo de alizarina se llevaron a cabo después de la elución con ácido acético al 10 %, la neutralización con hidróxido de amonio al 10 % y la cuantificación por espectrofotometría a 405 nm de absorbancia de la solución resultante.

La formación de vesícula de grasa en los cultivos inducidos a diferenciarse en adipocitos se evaluó mediante tinción *Oil Red O*. Para ello, las células se fijaron con formaldehído 3,7 % durante 15 min, se lavaron con 60 % de isopropanol en agua y se tiñeron durante 15-20 min con una solución del 0,3 % de *Oil Red O* (peso/volumen) en 60 % de isopropanol. A continuación, las células se lavaron dos veces en agua destilada, se tiñeron con hematoxilina y se tomaron imágenes, al menos nueve por pocillo, con un microscopio óptico. La tinción de las vesículas de grasa fue cuantificada con el software ImageJ (NIH) y los valores fueron normalizados con el número de células por imagen. La acumulación de lípidos en los cultivos se expresó como: (área teñida con *Oil Red O* / n.º de células).

AISLAMIENTO DE ARN Y CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Se tomaron muestras para el aislamiento de ARN y el posterior análisis de genes marcadores de la adipogénesis y osteoblastogénesis, de cultivos de MSC, a los 10 días de ser inducidas a diferenciarse a osteoblastos o adipocitos. El ARN se aisló siguiendo las instrucciones del fabricante utilizando el kit *NZY total RNA isolation* (NZYTech, Lisboa, Portugal) y cuantificado con un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). A continuación, 900 ng se retrotranscribieron con el kit de síntesis de ADNc iScript de Bio-Rad (Hercules,CA, EE. UU.). Pruebas de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) se llevaron a cabo en un CFX96 Connect (Bio-Rad). Cada reacción contenía 1 µL de ADNc, 10 pmol de cada par de cebadores (Tabla I) y SensiFAST Sybr No-Rox Mix de Bioline (Londres, Reino Unido). El programa de amplificación de PCR incluyó un ciclo a 95 °C durante 2 min (desnaturalización del ADN y activación de la ADN polimerasa) y 44 ciclos de amplificación: 95 °C durante 5 s (desnaturalización del ADN) y 65 °C durante 30 s (hibridación y extensión). Los resultados se analizaron con el software CFX Maestro V 2.3. (Bio-Rad) para la obtención de los ciclos umbrales (Ct) Como gen constitutivo se utilizó el gen codificante de la RNA polimerasa II subunidad A (POLR2A) y la expresión relativa respecto a las muestras control se expresaron como unidades arbitrarias calculadas a través del método $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$, donde ΔΔCt= ΔCt (muestra) – ΔCt (muestra control); y ΔCt (muestra) = Ct (muestra gen interes) – Ct (muestra gen constitutivo) y ΔCt (muestra control) = Ct (muestra control gen interes) – Ct (muestra control gen constitutivo).

Tabla I. Cebadores utilizados para QRT-PCR

Gen	Secuencia (5'-->3)	Producto (pb)
Polymerase (RNA; DNA directed) II polypeptide A (POLR2A)	TTTTGGTGACGACTTGAACTGC CCATCTTGTCCACCACCTCTTC	125
Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)	TGGTTAATCTCCGCAGGTCAC ACTGTGCTGAAGAGGCTGTTTG	143
Osterix (SP7)	AGCCAGAAGCTGTGAAACCTC AGCTGCAAGCTCTCCATAACC	163
Integrin-binding sialoprotein (IBSP)	AGGGCAGTAGTGACTCATCCG CGTCCTCTCCATAGCCCAGTGTTG	171
Collagen, type I, alpha 1 (COL1A1)	CGCTGGCCCCAAAGGATCTCCTG GGGGTCCGGGAACACCTCGCTC	263
Peroxisome proliferator activated receptor gamma 2 (PPARG2)	GCGATTCCTTCACTGATACACTG GAGTGGGAGTGGTCTTCCATTAC	136
Patatin Like Phospholipase Domain Containing 2 (ATGL)	CCAACACCAGCATCCAGTTCA ATCCCTGCTTGCACATCTCTC	102
Lipoprotein lipase (LPL)	AAGAAGCAGCAAAATGTACCTGAAG CCTGATTGGTATGGGTTTCACTC	113
Fatty-acid-binding protein 4 (FABP4)	TCAGTGTGAATGGGGATGTGAT TCTGCACATGTACCAGGACACC	162

ENSAYO DE ANGIOGÉNESIS EN HUVEC

Con el objetivo de evaluar el efecto de las veCU y veAD sobre la angiogénesis en HUVEC, se realizó un ensayo de formación de estructuras tubulares en matrigel. Células HUVEC fueron pretratadas durante 24h con distintas concentraciones de veCU o veAD (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml) en medio EGM + 10 % FBS sin exosomas. Para el ensayo de angiogénesis, 10 µl de Matrigel reducido en factores de crecimiento (Corning, NY, EE. UU.) a 4 °C fue añadido a microplacas P96 de Greiner Bio-One (Kremsmunster, Austria), dejándose gelificar a temperatura ambiente. A continuación, de cada cultivo de HUVEC pretratado con las distintas VE, se añadieron 15 000 células por pocillo, resuspendidas en 70 µl de EBM + 2 % FBS sin exosomas, suplementado con el tipo y concentración de VE correspondiente. Las células se mantuvieron en condiciones de cultivo durante 4 h a 37 °C y 5 % CO_2. Tras este periodo de tiempo, se tomaron imágenes al microscopio óptico que se analizaron con la extensión *Angiogenesis Analyzer* del *software* ImageJ. Como control negativo de angiogénesis, se utilizaron cultivos mantenidos en medio de cultivo sin suplementar con VE y, como control positivo, el medio fue suplementado con 30 ng/ml del inductor angiogénico factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se muestran como la media más el error estándar de la media (media ± SEM). En todos los experimentos el número de replicados para cada parámetro estudiado fue de al menos 3. La comparación entre los distintos tratamientos se realizó mediante la prueba ANOVA para detectar cambios significativos, seguida de una prueba de Tukey para identificar diferencias significativas entre pares de tratamientos. Se han considerado cambios significativos para $p < 0,05$.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS VE CIRCULANTES DEL PLASMA SANGUÍNEO DE CORDÓN UMBILICAL O DE ADULTOS

El análisis del tamaño de las veCU y veAD por *Nanoparticle Tracking Analysis* muestra que la mayoría de las VE obtenidas tienen un diámetro comprendido entre 50 y 150 nm (Figs. 1 A y B). La concentración de partículas por ml de plasma de cordón umbilical estuvo comprendida entre $0,7 \times 10^{11}$ y $1,3 \times 10^{11}$, y la de plasma de sangre de adulto entre $3,2 \times 10^{11}$ y 1.1×10^{12}. Por otro lado, la caracterización de la expresión proteica de los marcadores CD81, CD9 y CD63, mediante *Western blot* indicó que, ambos tipos de VE, expresan dichos marcadores (Fig. 1C). Estos resultados muestran cómo tras el procesamiento de las muestras de plasma de sangre de cordón umbilical o de adulto, se obtuvieron VE circulantes.

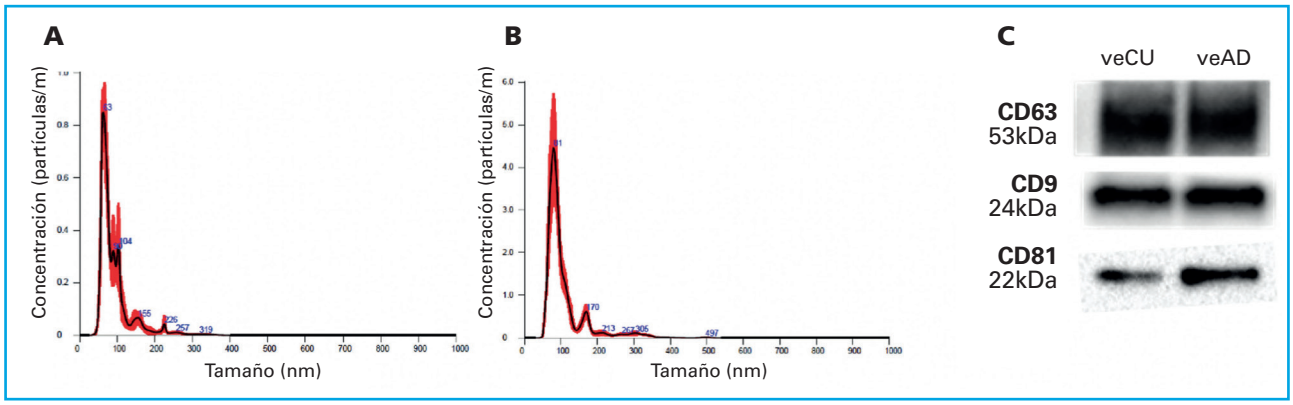

Figura 1. Cuantificación y caracterización de los exosomas circulantes aislados de plasma de sangre de cordón umbilical (veCU) o de sangre periférica de adultos sanos (veAD). A y B. Muestran el análisis mediante de la distribución del tamaño de las partículas obtenidas de veCU y veAD, respectivamente. C. Muestra la expresión proteica mediante *Western blot* de los marcadores de VE CD63, CD9 y CD81, en veCU y veAD.

EFECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE MSC Y HUVEC

Para evaluar el efecto de veCU y veAD, en la viabilidad celular de cultivos de MSC, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones de VE (10×10^6, 20×10^6, 40×10^6, 80×10^6 y 160×10^6 partículas/ml) durante 48 h. Los resultados mostraron que la viabilidad no se vio afectada significativamente con ninguna de las dosis y tipo de VE (Fig. 2A). En base a estos resultados, en cultivos de HUVEC, se evaluó el efecto de la menor y mayor concentración de VE utilizadas en el estudio sobre la viabilidad en MSC (10×10^6 y 160×10^6 partículas/ml). En este caso, se observó un aumento significativo de la viabilidad cuando las células fueron tratadas con la concentración más pequeña (10×10^6) de partículas/ml de veAD (Fig. 2B).

EFECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA MIGRACIÓN DE MSC Y HUVEC

En el ensayo de migración celular, la presencia de 10×10^6 o 160×10^6 partículas/ml de ambos tipos de VE (veCU y veAD), disminuyeron la migración en cultivos de MSC y de HUVEC, tras 18 h o 15 h, respectivamente (Fig. 3). La disminución tendió a ser mayor en presencia de veAD (Fig. 3).

EFECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE MSC

Diferenciación osteogénica

Los resultados de mineralización de la matriz extracelular después de 21 días de diferenciación osteogénica en las MSC inducidas a diferenciarse a osteoblastos en presencia de distintas concentraciones de

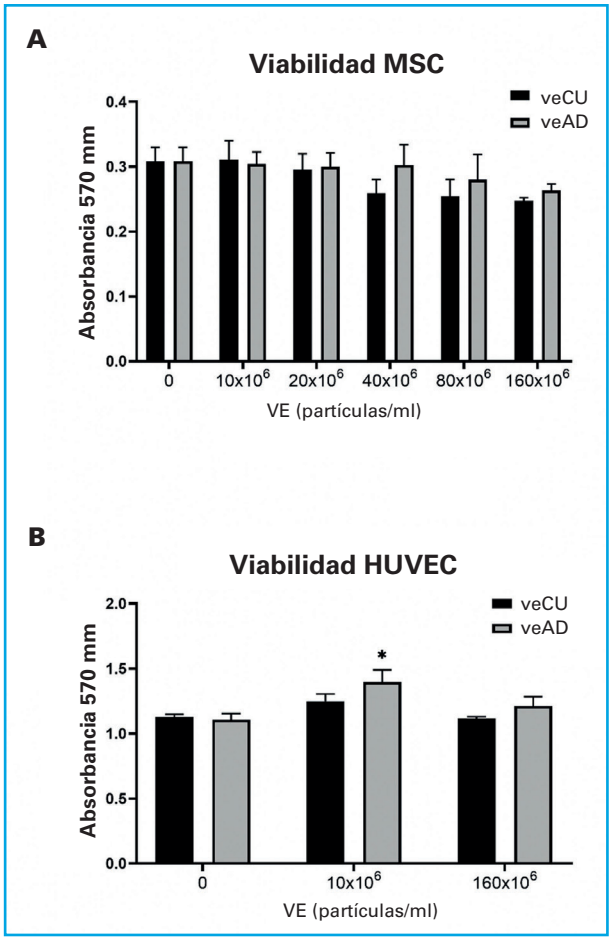

Figura 2. Cuantificación de la viabilidad celular en MSC (A) y en HUVEC (B) tratadas durante 72 horas con distintas concentraciones de veCU o veAD circulantes. *$p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

veCU y veAD, muestran que ninguna de las concentraciones utilizadas afectó a dicha mineralización (Figs. 4 A y B).

A los 10 días de diferenciación osteoblástica, también se estudió en estos cultivos la expresión de genes marcadores osteoblásticos como el *factor de transcripción 2 relacionado con runt* (RUNX2) y *osterix* (SP7), codificantes de dos factores de transcripción responsables de la diferenciación osteogénica, e sialoproteína de unión a integrina (IBSP) y colágeno alfa-1, tipo I (COL1A1), codificantes de proteínas de la matriz extracelular. Los resultados mostrados en la figura 4C indican que, al igual que en la mineralización, el tratamiento con los distintos tipos de VE no produjo cambios significativos en la expresión de estos genes osteoblásticos. Tan solo, en la expresión de COL1A1 se observó un aumento en los cultivos tratados con la mayor concentración de VE (Fig. 4C).

Diferenciación adipogénica

En MSC diferenciados a adipocitos, los resultados del análisis de la tinción *Oil Red O* mostró que la presencia de veCU o de veAD en el medio adipogénico, disminuyó la formación de vesículas de grasa respecto a los cultivos no tratados (Fig. 5B). En cuanto a la expresión del gen codificante del principal factor de transcripción responsable de la diferenciación adipogénica, el receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma 2 (PPARG2), no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos a los 10 días de diferenciación adipogénica. Cambios fueron observados en la expresión de genes involucrados en el metabolismo grasos, como adipo-triglicérido-lipasa (ATGL) y la proteína 4 de unión a ácido graso (FABP4). Los niveles de ARNm de ATGL disminuyeron en los cultivos tratados con 160 × 10^6 partículas/ml de veCU y la expresión génica de FABP4 fue inhibida con las dos concentraciones usadas de veAD (Fig. 5C). La disminución de la expresión de los genes ATGL y FABP4 pueden ser relacionados con la disminución de la formación de vesículas de grasa y con distintos mecanismos de acción de las veCU y veAD sobre los cultivos de MSC diferenciados a adipocitos.

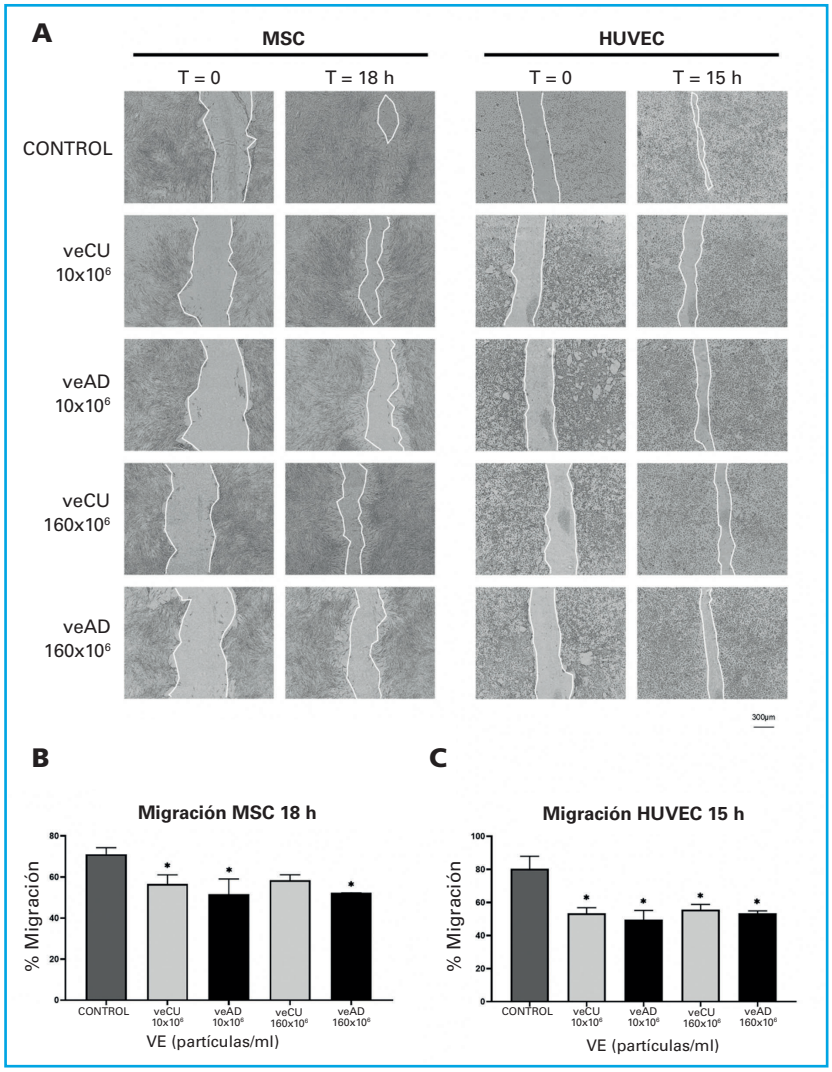

Figura 3. Efecto de veCU y veAD en la migración celular. A. Imágenes representativas de cultivos de MSC o HUVEC, en el tiempo 0 de haber realizado una línea libre de células en la placa, y a las 18 o 15 h de cultivo, respectivamente, en presencia o ausencia de distintas concentraciones de veCU o veAD. B. Cuantificación del porcentaje del área de migración en MSC a las 18 h de tratamiento. C. Igual que en B, a las 15 h con HUVEC. *$p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

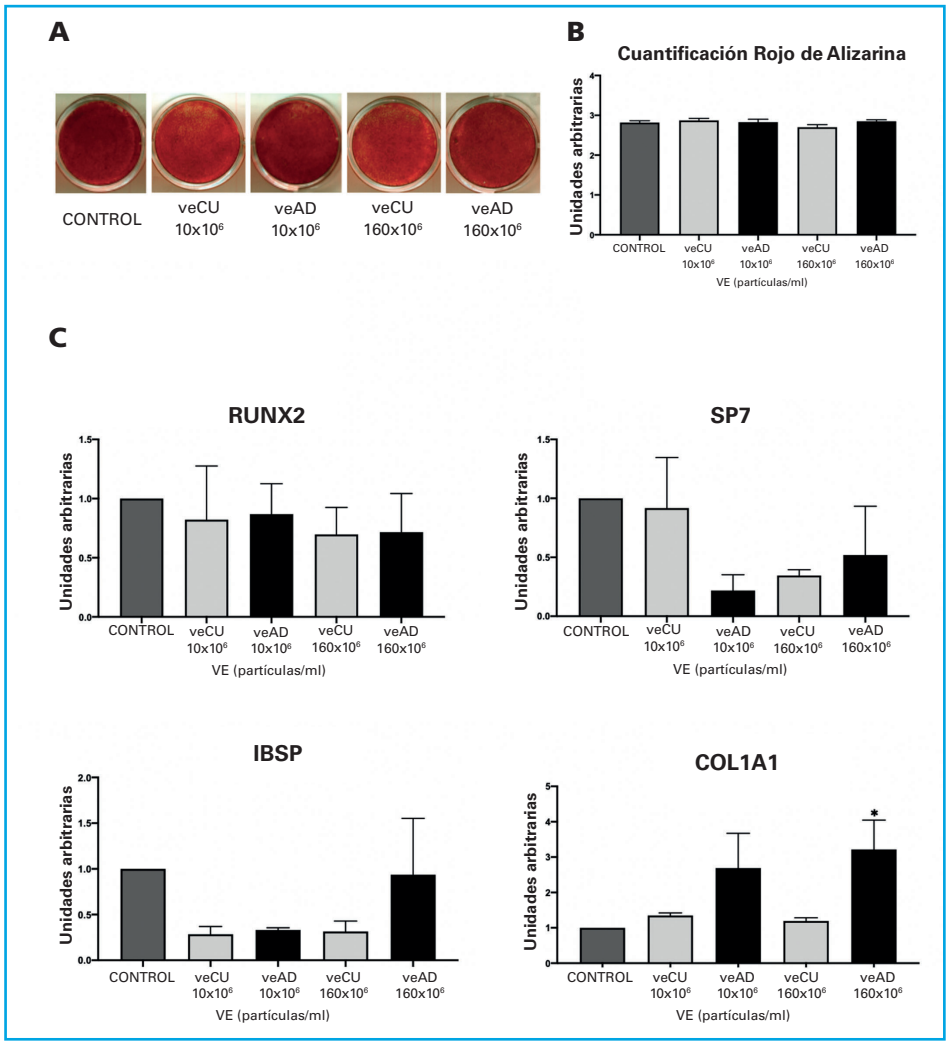

Figura 4. Estudio de la capacidad de diferenciación osteoblástica de MSC tratadas con diferentes concentraciones de veCU y veAD. A. Imágenes representativas de la tinción con rojo de alizarina para la mineralización de la matriz extracelular, de cultivos de MSC inducidos a osteoblastos y tratados con distintas concentraciones de veCU o veAD durante 21 días. B. Cuantificación de la tinción con rojo de alizarina. C. Expresión génica de genes marcadores osteoblásticos (RUNX2, SP7, IBSP y COL1A1), de cultivos de MSC tratadas con veCU o veAD, a los 10 días de la inducción a diferenciarse a osteoblastos. $*p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

ESTUDIO DEL EFECTO DE LAS veCU Y veAD SOBRE LA ANGIOGÉNESIS

Los resultados de la cuantificación de la longitud total de segmentos y la de estructuras tubulares indican que todos los tratamientos con VE aumentaron la angiogénesis respecto a la HUVEC no tratadas (Control -). Este aumento fue más significativo con los tratamientos con veCU (Figs. 6 B y C).

DISCUSIÓN

La medicina regenerativa aplicada al hueso tiene un gran potencial para el tratamiento de patologías como la osteoporosis, la artrosis, la osteonecrosis y las fracturas traumáticas. Aunque la terapia celular ha sido ampliamente evaluada en la regeneración ósea con resultados prometedores (23), actualmente se considera que el uso de VE derivadas de MSC como herramienta terapéutica libre de células, puede evitar los inconvenientes de la producción e implantación de células progenitoras con fines terapéuticos en hueso (7). Sin embargo, la obtención de VE derivadas de MSC, incluso de líneas celulares inmortalizadas, supone el establecimiento y mantenimiento de cultivos celulares estables. Lo cual, aumenta la complejidad de su aislamiento y requiere de instalaciones adecuadas para su uso clínico. Por lo tanto, es conveniente evaluar la posible capacidad terapéutica de otras fuentes de VE que cumplan que sean fácil de acceder, abundantes y su obtención no presente aspectos éticos importantes.

Así, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de VE derivadas de sangre de cordón umbilical y de personas adultas sanas, sobre procesos relacionados con la regeneración ósea, como la angiogénesis de células endoteliales y la diferenciación osteoblástica y adipogénica de MSC derivadas de médula ósea.

Nuestros resultados han mostrado que ambos tipos de VE no afectan significativamente a la diferenciación osteogénica, pero disminuyen la adipogénesis en MSC y aumentan la angiogénesis de HUVEC.

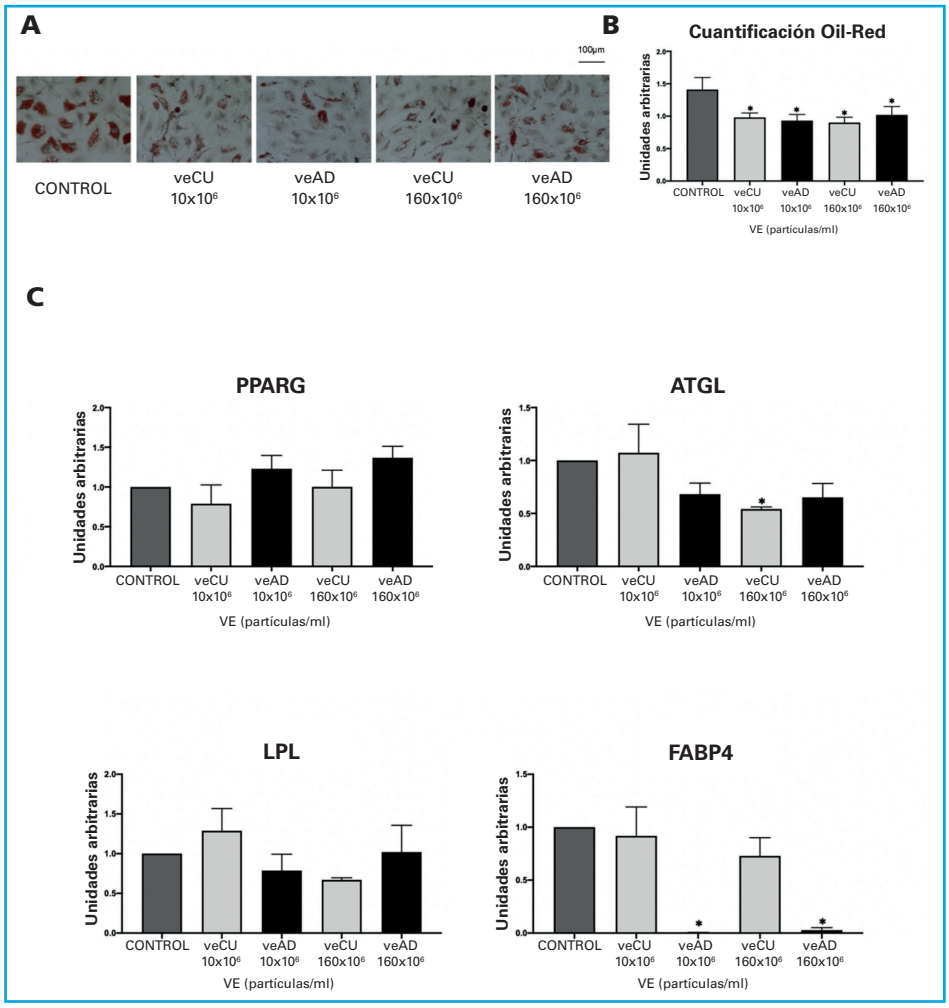

Figura 5. Estudio de la capacidad de diferenciación adipogénica de MSC tratadas con diferentes concentraciones de de veCU y veAD. A. Imágenes representativas de la tinción con "Oil Red O" de vesículas de grasa, de cultivos de MSC inducidos a adipocitos y tratados con distintas concentraciones de veCU o veAD durante 14 días. B. Cuantificación de la tinción "Oil Red O". C. Expresión génica de genes marcadores adipogénicos (PPARG, ATGL, LPL y FABP4), de cultivos de MSC tratadas con veCU o veAD, a los 10 días de la inducción a diferenciarse a adipocitos. *$p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control).

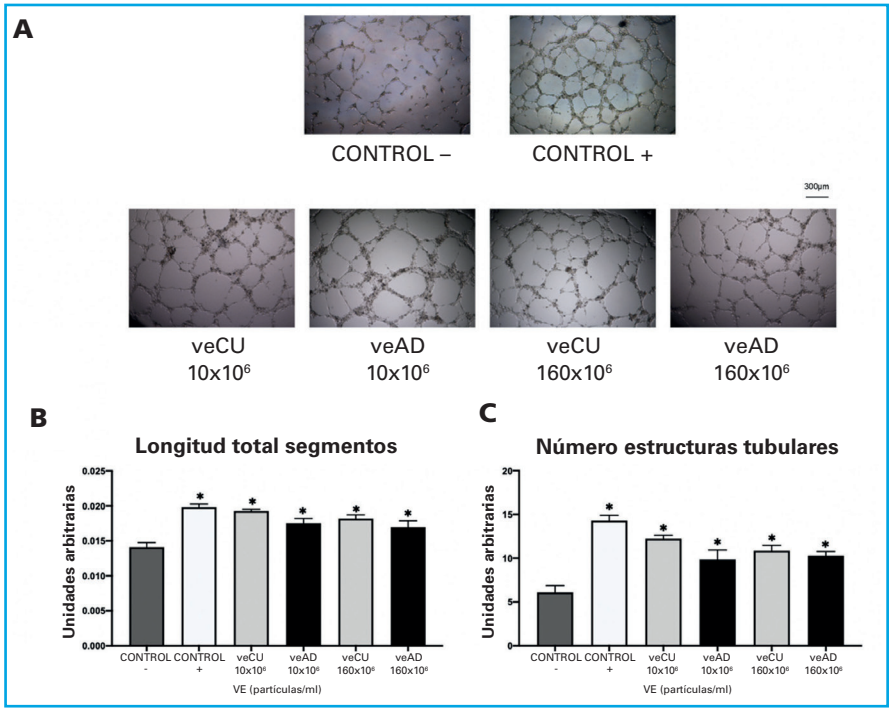

Figura 6. Estudio de la angiogénesis en cultivos de HUVEC. A. Imágenes representativas de la formación de estructuras tubulares en cultivos HUVEC sobre matrigel y tratados con diferentes concentraciones de veCU o veAD. El control (-) corresponde a cultivos no tratados y el control (+) a cultivos tratados con bFGF (30 ng/ml) como factor angiogénico. B y C. Representación gráfica de la cuantificación en el ensayo de angiogénesis de la longitud total de segmentos, y el número de estructuras tubulares, respectivamente. *$p < 0,05$ respecto a los cultivos no tratados (control [-]).

Aunque las veCU parecen favorecer más la angiogénesis y las veAD pueden intervenir de manera más significativa en el metabolismo graso, a través de su inhibición sobre FABP4, no hemos detectado otras diferencias importantes entre ambos tipos de VE. Ello podría ser en parte debido a que además de nutrientes y oxigeno procedentes de la sangre maternal, la sangre de vena de cordón umbilical, transporte VE procedentes de la madre (24). Con lo cual, además de exosomas de origen fetal habría exosomas de adulto.

La respuesta a un daño tisular requiere de una serie de eventos moleculares y celulares que incluyen a la migración celular entre otras (25). Según los resultados obtenidos, la migración de MSC y HUVEC disminuyó, aunque con las veCU el descenso de la migración celular fue menor que con las veAD. Estos resultados sugieren que el contenido de ambos tipos de VE, favoreció la diferenciación, pero disminuyó la migración celular. Dicho efecto ha sido descrito previamente por otros autores, que mostraron como durante la diferenciación osteogénica y condrogénica de MSC, la migración disminuyó conforme progresaba la diferenciación (26). Además, también otros autores han descrito que VE derivados de plasma de individuos sanos inhiben la migración de células endoteliales microvasculares (27).

La diferenciación osteogénica de las MSC es un proceso complejo regulado por varios factores, como el microambiente óseo, el cual influye notablemente en la osteogénesis (28) y donde participan las VE, regulando distintos aspectos fisiológicos de las células madre (29). En este contexto, nuestros resultados han mostrado que la expresión génica del gen COL1A1 aumentó en los cultivos tratados con veAD, lo cual, podría favorecer la mineralización (30). Sin embargo, en la expresión de otros genes osteoblásticos, no se observaron cambios significativos con los tratamientos con veAD o veCU. Esto se puede relacionar con que ninguna de las VE evaluadas afecto a la mineralización de MSC diferenciadas a osteoblastos. La inducción de la formación ósea por VE derivadas de MSC se ha observado en numerosos estudios previos (31). Sin embargo, la aplicación de exosomas derivados de plasma de adolescentes sanos sobre MSC no inducidas a diferenciarse no afecta significativamente a la diferenciación osteogénica, aunque cuando se trataron cultivos primarios de osteoblastos, si se observó un aumento de la actividad de la fosfatasa alcalina (ALPL) (7). No obstante, en ese estudio la mineralización no fue estudiada, por lo que no se puede concluir el posible efecto de esos exosomas sobre la maduración final de los osteoblastos tratados. En otro estudio si han demostrado que el tratamiento de cultivos de MSC derivadas de médula ósea con VE de plasma de sangre de cordón umbilical aumenta la mineralización (32). Las diferencias con los resultados obtenidos en el presente estudio podrían ser debido a la concentración de exosomas utilizada (no pueda ser comparada pues esta expresada en µg/ml) y a que las MSC proceden de ratón y no de humanos.

En relación con la diferenciación adipogénica, el tratamiento con las VE circulantes evaluadas produjo una disminución en la formación de vesículas de grasa. Ello fue acompañado por una disminución de la expresión del gen ATGL en los cultivos tratados con veCU y del FABP4 en veAD, involucrados en el metabolismo graso y en la formación de vesículas de grasa (33,34). Es interesante señalar que la expresión del gen PPARG, no fue afectada con los tratamientos, lo que sugiere que las VE utilizadas pueden afectar más a la maduración que a la diferenciación temprana de los adipocitos.

El hecho de que cada uno de los tipos de VE circulantes evaluadas haya afectado a la expresión de distintos genes adipogénicos, sugiere diferencias en su cargo entre las cuales podría estar el contenido en miRNA. Así, se ha demostrado que la expresión de FABP4 puede inhibirse por varios miRNA, como miR-369-5p y miR-455 (35) mientras que ATGL puede inhibirse por el hsa-miR-214-3p (36). Por lo tanto, en estudios posteriores sería interesante determinar las diferencias de cargo entre las veCU y veAD para identificar posibles mecanismos de acción sobre la diferenciación de las MSC. También hay que destacar, que sobre el efecto de las VE circulantes sobre la adipogénesis es importante conocer la naturaleza y salud de los donantes. Así, exosomas circulantes de adolescentes obesos favorecen la diferenciación adipogénica más que la osteogénica, en relación a los derivados de adolescentes sanos de peso normal (31).

Ha sido descrito que el aumento de la adiposidad de la médula ósea durante el envejecimiento es producido como consecuencias de cambios en el microambiente medular, que favorecen la diferenciación de las MSC a adipocitos en lugar de osteoblastos (37). Por lo tanto, aunque nuestros resultados no muestran un efecto de las veCU y de las veAD sobre la osteoblastogénesis, si han mostrado su capacidad de disminuir la adipogénesis. Por lo tanto, la aplicación de estas vesículas podría prevenir el aumento de la adiposidad de la médula ósea y como consecuencia favorecer la formación ósea a través de un potencial aumento de osteoprogenitores. Esto está apoyado por estudios que han mostrado que la inyección intravenosa de VE de sangre de cordón umbilical en ratones viejos durante dos meses, una vez por semana, disminuyen la pérdida de hueso relacionada con la edad, estimulando la formación e inhibiendo la resorción ósea (32).

La formación de vasos sanguíneos es fundamental en los procesos regenerativos para proporcionar el aporte de nutrientes, oxígeno y facilitar la llegada de células progenitoras e inmunitarias. Nuestros resultados indican que las VE circulantes evaluadas aumentan la angiogénesis de HUVEC. Resultados de otros autores han mostrado un efecto angiogénico de veCU en cerdos (38) y en otros modelos animales. Estudios *in vitro* han mostrado que VE derivadas de sangre de cordón umbilical y de la madre, aumentan la angiogénesis de células endoteliales microvasculares humanas (HMEC) (39)

y de HUVEC (40). También exosomas derivados de suero de humanos sanos de entre 20 y 30 años tienen efecto proangiogénico a través de la inhibición de la inflamación de los macrófagos. Así, la aplicación local de estos exosomas junto con injertos óseos, favoreció la regeneración de hueso en un modelo de defectos óseos mandibulares en ratas, a través de la disminución de la inflamación y el aumento de la angiogénesis (41). Por lo tanto, nuestros resultados están en línea con estos estudios y apoyan que tanto la sangre de adultos sanos como la de cordón umbilical podrían suponer una fuente abundante de VE con fines terapéuticos. Entre las posibles aplicaciones terapéuticas se encontrarían los relacionados con la formación ósea, debido a sus efectos sobre la diferenciación de MSC y la inducción de la angiogénesis.

CONCLUSIONES

En conclusión, ambos tipos de VE no afectaron a la mineralización en MSC diferenciadas a osteoblastos, pero disminuyeron la adipogénesis en MSC y aumentaron la angiogénesis de HUVEC. Así, estos hallazgos sugieren que ambos tipos de VE, procedentes de fuentes abundantes, sin aspectos éticos importantes y fáciles de aislar, tienen un alto potencial en medicina regenerativa aplicada al hueso, inhibiendo la adiposidad de la médula ósea y favoreciendo la angiogénesis.

BIBLIOGRAFÍA

1. Schmidt-Bleek K, Petersen A, Dienelt A, Schwarz C, Duda GN. Initiation and early control of tissue regeneration – bone healing as a model system for tissue regeneration. Expert Opin Biol Ther 2014;14(2):247-59. DOI: 10.1517/14712598.2014.857653
2. Marzona L, Pavolini B. Play and players in bone fracture healing match. Clin Cases Miner Bone Metab 2009;6(2):159-62.
3. Yoo JU, Johnstone B. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair. Clin Orthop Relat Res 1998;(355 Suppl):S73-81. DOI: 10.1097/00003086-199810001-00009
4. Kirkham AM, Bailey AJM, Tieu A, Maganti HB, Montroy J, Shorr R, et al. MSC-Derived Extracellular Vesicles in Preclinical Animal Models of Bone Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. Stem Cell Rev Rep 2022;18(3):1054-66. DOI: 10.1007/s12015-021-10208-9
5. Stanovici J, Le Nail LR, Brennan MA, Vidal L, Trichet V, Rosset P, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. Curr Res Transl Med 2016;64(2):83-90. DOI: 10.1016/j.retram.2016.04.006
6. Prockop DJ, Brenner M, Fibbe WE, Horwitz E, Le Blanc K, Phinney DG, et al. Defining the risks of mesenchymal stromal cell therapy. Cytotherapy 2010;12(5):576-8. DOI: 10.3109/14653249.2010.507330
7. Torrecillas-Baena B, Pulido-Escribano V, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Camacho-Cardenosa M, Casado-Díaz A. Clinical Potential of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Bone Regeneration. J Clin Med 2023;12(13):4385. DOI: 10.3390/jcm12134385
8. Marolt Presen D, Traweger A, Gimona M, Redl H. Mesenchymal Stromal Cell-Based Bone Regeneration Therapies: From Cell Transplantation and Tissue Engineering to Therapeutic Secretomes and Extracellular Vesicles. Front Bioeng Biotechnol 2019;7:352. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00352
9. Park KS, Bandeira E, Shelke GV, Lässer C, Lötvall J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. Stem Cell Res Ther 2019;10(1):288. DOI: 10.1186/s13287-019-1398-3
10. Di C, Zhang Q, Wang Y, Wang F, Chen Y, Gan L, et al. Exosomes as drug carriers for clinical application. Artif Cells Nanomed Biotechnol 2018;46(sup3):S564-70. DOI: 10.1080/21691401.2018.1501381
11. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. J Cell Biol 2013;200(4):373-83. DOI: 10.1083/jcb.201211138
12. Sohni A, Verfaillie CM. Mesenchymal Stem Cells Migration Homing and Tracking. Stem Cells International 2013;2013(1):130763. DOI: 10.1155/2013/130763
13. Zhang Y, Liu J, Mo Y, Chen Z, Chen T, Li Y, et al. Immortalized Mesenchymal Stem Cells: A Safe Cell Source for Cellular or Cell Membrane-Based Treatment of Glioma. Stem Cells International 2022;2022(1):6430565. DOI: 10.1155/2022/6430565
14. Chen Q, Jin M, Wang S, Wang K, Chen L, Zhu X, et al. Establishing an hTERT-driven immortalized umbilical cord-derived mesenchymal stem cell line and its therapeutic application in mice with liver failure. J Tissue Eng 2023;14. DOI: 10.1177/20417314231200328
15. Yamaguchi N, Horio E, Sonoda J, Yamagishi M, Miyakawa S, Murakami F, et al. Immortalization of Mesenchymal Stem Cells for Application in Regenerative Medicine and Their Potential Risks of Tumorigenesis. Int J Mol Sci 2024;25(24):13562. DOI: 10.3390/ijms252413562
16. De Boer HC, Hovens MM, Van Oeveren-Rietdijk AM, Snoep JD, De Koning EJP, Tamsma JT, et al. Human CD34+/KDR+ cells are generated from circulating CD34+ cells after immobilization on activated platelets. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2011;31(2):408-15. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.216879
17. Dong L, Zieren RC, Horie K, Kim CJ, Mallick E, Jing Y, et al. Comprehensive evaluation of methods for small extracellular vesicles separation from human plasma, urine and cell culture medium. J Extracell Vesicles 2020;10(2):e12044. DOI: 10.1002/jev2.12044
18. Liu J, Sun W, Liu C, Na Q. Umbilical Cord Blood-Derived Exosomes in Maternal-Fetal Disease: a Review. Reprod Sci 2023;30(1):54-61. DOI: 10.1007/s43032-022-00879-1
19. Cleys ER, Halleran JL, McWhorter E, Hergenreder J, Enriquez VA, da Silveira JC, et al. Identification of microRNAs in exosomes isolated from serum and umbilical cord blood, as well as placentomes of gestational day 90 pregnant sheep. Mol Reprod Dev 2014;81(11):983-93. DOI: 10.1002/mrd.22420
20. Huang S, Tang Z, Wang Y, Chen D, Li J, Zhou C, et al. Comparative profiling of exosomal miRNAs in human adult peripheral and umbilical cord blood plasma by deep sequencing. Epigenomics 2020;12(10):825-42. DOI: 10.2217/epi-2019-0213
21. de Boer C, Davies NH. Blood derived extracellular vesicles as regenerative medicine therapeutics. Biochimie 2022;196:203-15. DOI: 10.1016/j.biochi.2021.10.009

22. Casado-Díaz A, Santiago-Mora R, Jiménez R, Caballero-Villarraso J, Herrera C, Torres A, et al. Cryopreserved human bone marrow mononuclear cells as a source of mesenchymal stromal cells: application in osteoporosis research. Cytotherapy 2008;10(5):460-8. DOI: 10.1080/14653240802192644
23. Lin H, Sohn J, Shen H, Langhans MT, Tuan RS. Bone marrow mesenchymal stem cells: Aging and tissue engineering applications to enhance bone healing. Biomaterials 2019;203:96-110. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2018.06.026
24. Nakahara A, Nair S, Ormazabal V, Elfeky O, Garvey CE, Longo S, et al. Circulating Placental Extracellular Vesicles and Their Potential Roles During Pregnancy. Ochsner J 2020;20(4):439. DOI: 10.31486/toj.20.0049
25. Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. J Int Med Res 2009;37(5):1528-42. DOI: 10.1177/147323000903700531
26. Sliogeryte K, Thorpe SD, Lee DA, Botto L, Knight MM. Stem cell differentiation increases membrane-actin adhesion regulating cell blebability, migration and mechanics. Sci Rep 2014;4:7307. DOI: 10.1038/srep07307
27. Ramakrishnan DP, Hajj-Ali RA, Chen Y, Silverstein RL. Extracellular Vesicles Activate a CD36-Dependent Signaling Pathway to Inhibit Microvascular Endothelial Cell Migration and Tube Formation. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2016;36(3):534-44. DOI: 10.1161/ATVBAHA.115.307085
28. Li J, Liu X, Zuo B, Zhang L. The Role of Bone Marrow Microenvironment in Governing the Balance between Osteoblastogenesis and Adipogenesis. Aging Dis 2016;7(4):514-25. DOI: 10.14336/AD.2015.1206
29. Hou Y, Liu Y, Liang S, Ding R, Mo S, Yan D, et al. The novel targetexosoms derived from M2 macrophage. Int Rev Immunol 2021;40(3):183-96. DOI: 10.1080/08830185.2020.1800687
30. Veis A, Dorvee JR. Biomineralization mechanisms: a new paradigm for crystal nucleation in organic matrices. Calcif Tissue Int 2013;93(4):307-15. DOI: 10.1007/s00223-012-9678-2
31. Peruzzi B, Urciuoli E, Mariani M, Chioma L, Tomao L, Montano I, et al. Circulating Extracellular Vesicles Impair Mesenchymal Stromal Cell Differentiation Favoring Adipogenic Rather than Osteogenic Differentiation in Adolescents with Obesity. Int J Mol Sci 2023;24(1):447. DOI: 10.3390/ijms24010447
32. Hu Y, Xu R, Chen CY, Rao SS, Xia K, Huang J, et al. Extracellular vesicles from human umbilical cord blood ameliorate bone loss in senile osteoporotic mice. Metabolism 2019;95:93-101. DOI: 10.1016/j.metabol.2019.01.009
33. Kershaw EE, Schupp M, Guan HP, Gardner NP, Lazar MA, Flier JS. PPARγ regulates adipose triglyceride lipase in adipocytes in vitro and in vivo. Am J Physiol Endocrinol Metab 2007;293(6):E1736-45. DOI: 10.1152/ajpendo.00122.2007
34. Qian SW, Li X, Zhang YY, Huang HY, Liu Y, Sun X, et al. Characterization of adipocyte differentiation from human mesenchymal stem cells in bone marrow. BMC Dev Biol 2010;10:47. DOI: 10.1186/1471-213X-10-47
35. Tang W, Chen O, Yao F, Cui L. miR-455 targets FABP4 to protect human endometrial stromal cells from cytotoxicity induced by hydrogen peroxide. Mol Med Rep 2019;20(6):4781-90. DOI: 10.3892/mmr.2019.10727
36. Li Y, Yuan S, Wu W, Zhou J, Zhang P, Li D, et al. The hsa-miR-214-3p/ATGL axis regulates aberrant lipolysis to promote acute myeloid leukemia progression via PPARα in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2022;608:73-81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2022.03.140
37. Ambrosi TH, Scialdone A, Graja A, Gohlke S, Jank AM, Bocian C, et al. Adipocyte Accumulation in the Bone Marrow during Obesity and Aging Impairs Stem Cell-Based Hematopoietic and Bone Regeneration. Cell Stem Cell 2017;20(6):771-784.e6. DOI: 10.1016/j.stem.2017.02.009
38. Luo J, Fan Y, Shen L, Niu L, Zhao Y, Jiang D, et al. The Pro-angiogenesis Of Exosomes Derived From Umbilical Cord Blood Of Intrauterine Growth Restriction Pigs Was Repressed Associated With miRNAs. Int J Biol Sci 2018;14(11):1426-36. DOI: 10.7150/ijbs.27029
39. Hu Y, Rao SS, Wang ZX, Cao J, Tan YJ, Luo J, et al. Exosomes from human umbilical cord blood accelerate cutaneous wound healing through miR-21-3p-mediated promotion of angiogenesis and fibroblast function. Theranostics 2018;8(1):169-84. DOI: 10.7150/thno.21234
40. Jia L, Zhou X, Huang X, Xu X, Jia Y, Wu Y, et al. Maternal and umbilical cord serum-derived exosomes enhance endothelial cell proliferation and migration. FASEB J 2018;32(8):4534-43. DOI: 10.1096/fj.201701337RR
41. Xiang X, Pathak JL, Wu W, Li J, Huang W, Wu Q, et al. Human serum-derived exosomes modulate macrophage inflammation to promote VCAM1-mediated angiogenesis and bone regeneration. J Cell Mol Med 2023;27(8):1131-43. DOI: 10.1111/jcmm.17727