



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Farmacia  
Programa de Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología

***CONTRIBUCION DE LOS RECEPTORES DE  
ADENOSINA EN CELULAS PROGENITORAS  
ENDOTELIALES AL PROCESO DE  
ANGIOGENESIS.***

Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica Clínica e  
Inmunología

Katherine Alejandra Oporto Palma  
CONCEPCIÓN-CHILE  
2019

Profesor Guía: Claudio Aguayo Tapia  
Dpto. de Bioquímica Clínica e Inmunología  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología de la Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.

Profesor Guía

---

Dr. Claudio Aguayo Tapia  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Comisión Evaluadora:



---

Dra. Claudia Radojkovic  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

---

Dr. Marcelo González  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

Director de Programa

---

Dr. Claudio Aguayo Tapia  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por todo lo que me da día a día, a mis padres, hija Montserrat, mi compañero de vida Luis y mi hermano Felipe por todo el apoyo, amor y comprensión que me entregaron en este período del magister.

A mis pacientes, gracias por su generosidad sin ellos no podría haber realizado esta tesis.



Al Magíster en Bioquímica Clínica e Inmunología de la Universidad de Concepción y al departamento de Bioquímica Clínica e Inmunología, de la misma institución educacional. A la escuela de Graduados, Universidad de Concepción.

Finalmente al grupo de Investigación en Función Endotelial (GIFE), Departamento de Bioquímica e Inmunología, Universidad de Concepción.

## INDICE GENERAL

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE GENERAL	iv-vi
INDICE FIGURAS	vii-viii
INDICE TABLAS	ix
ABREVIACIONES	x-xi
RESUMEN	xii-xiv
ABSTRACT	xv-xvi
INTRODUCCION	
I.- Generalidades de células madres	17-18
II.- Células progenitoras endoteliales (EPC)	18-19
III.- Métodos de obtención y características de las EPC	19-22
IV.- Fuentes de origen de células progenitoras endoteliales	24-28
V.- Funciones de células progenitoras endoteliales	30-31
VI.- Factores que modifican la neo-vascularización o la disponibilidad de EPC	31-40
VII.- Vesículas extracelulares	42-43
VIII.- Exosomas	43-47
IX.- Funciones de los exosomas en angiogénesis y regeneración cardíaca	49-53
X.- Participación de exosomas liberados por células progenitoras endoteliales (EPC) en angiogénesis	53-57



<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
HIPOTESIS	58
OBJETIVO GENERAL	58
OBJETIVOS ESPECIFICOS	58
METODOLOGÍA	
I) Extracción de sangre total y cultivo de células progenitoras endoteliales humanas	59-60
II) Evaluación de la expresión de VEGF	
II.1) Extracción de ARN	60
II.2) Síntesis de cDNA	61
II.3) Reacción en cadena de la polimerasa	62
II.4) PCR en tiempo real	64
II.5) Kit BD Cytometric bead array	64-65
III) Aislamiento de exosomas liberados por hEPC	65-66
IV) Caracterización de exosomas	66-67
V) Ensayo de internalización de exosomas	68
VI) Cultivo y ensayo de viabilidad de células ECV304	69
VII) Ensayo de formación de estructuras tipo capilares	70
VIII) Análisis estadístico	70

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
RESULTADOS	
I.- Adenosina favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos en EPC de 3 días	71-74
II.- Expresión y secreción de VEGF de EPC de 3 días estimulados con NECA	75-82
III.- Aislamiento y caracterización de los exosomas liberados por las EPC de 3 días	
III.a) Separación de partículas extracelulares y caracterización por ensayo de seguimiento de nanopartículas (NTA)	82-93
III. b) Caracterización de células progenitoras endoteliales por citometría de flujo	95-101
III. c) Citometría de flujo de las vesículas provenientes de EPC y EPC tratadas con NECA	102-109
IV.- Cuantificación del efecto de los exosomas liberados sobre la viabilidad de células ECV304	110-112
V.- Ensayo de internalización de exosomas	113-116
VI.- Formación de estructuras capilares	117-124
DISCUSIÓN	125-139
CONCLUSION	140
PROYECCIONES	140
ANEXO 1	141-142
BIBLIOGRAFÍA	143-170

## INDICE DE FIGURAS

<b>CONTENIDO</b>		<b>PAGINA</b>
Figura A	Origen y funciones de las células progenitoras endoteliales humanas	23
Figura B	Producción de adenosina bajo condiciones de hipoxia	41
Figura C	Biogénesis de Exosomas	48
Figura 1	Formación de estructuras capilares de ECV incubadas con el sobrenadante de EPC	73-74
Figura 2	Análisis de la expresión de $\beta$ -actina en células EPC	76-77
Figura 3	Análisis de la expresión de VEGF-A en EPC y EPC/NECA	78-79
Figura 4	Análisis de la expresión de VEGF-A	80
Figura 5	Análisis de la secreción de VEGF-A	81
Figura 6	Obtención de vesículas mediante ultra centrifugación	85-86
Figura 7	Obtención de vesículas obtenidas desde EPC por ultra filtración	87-88
Figura 8	Obtención de exosomas por EPC (obtenidos de cultivos con 100ml de sangre periférica) y ECV 304 mediante ultra filtración	89-90
Figura 9	Obtención de exosomas por EPC (obtenidos de cultivos con 200ml de sangre periférica) mediante ultra filtración	92-93

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
Figura 10	Caracterización fenotípica de las células progenitoras endoteliales 96-97
Figura 11	Cuantificación de la expresión de CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales 98-99
Figura 12	Cuantificación de la expresión de CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales tratadas con NECA 100-101
Figura 13	Expresión de marcadores en microvesículas aisladas de sobrenadante de ECV304 104-105
Figura 14	Caracterización de exosomas provenientes de sobrenadante de EPC 106-107
Figura 15	Caracterización de exosomas provenientes de sobrenadante de EPC tratadas con NECA 108-109
Figura 16	Efecto de los exosomas sobre la viabilidad de células ECV304 111-112
Figura 17	Incorporación de VE en células ECV304 115
Figura 18	Internalización de VE aisladas desde EPC y EPC tratadas con NECA en células ECV304 116
Figura 19	Formación de estructuras capilares en ECV304 tratadas con microvesículas de EPC durante 3 horas 118-119
Figura 20	Formación de estructuras capilares en ECV304 tratadas con microvesículas de EPC durante 6 horas 120-121
Figura 21	Formación de estructuras capilares en ECV304 tratadas con distintas concentraciones de microvesículas de EPC 123-124



## INDICE DE TABLAS

<b>CONTENIDO</b>	<b>PAGINA</b>
Tabla 1 Características de las Células Progenitoras Endoteliales	29
Tabla 2 Funciones de los receptores de adenosina en angiogénesis y vasculogénesis	37
Tabla 3 Características de las Vesículas Extracelulares	45
Tabla 4 Exosomas en comunicación cardiovascular	51
Tabla 5 Partidores para determinar la expresión de VEGF y $\beta$ -actina	63
Tabla 6 Resumen de los datos de NTA obtenidos de VE de EPC y EPC/NECA	94

## ABREVIACIONES

EPC: Células progenitoras endoteliales

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

hEPC : Células progenitoras endoteliales humanas

CD133: proteína de superficie conocida como Prominina-1

CD34: glicoproteína de transmembrana altamente glicosilada

CD14: antígeno de diferenciación 14

KDR: receptor de dominio de inserción de quinasa conocido como VEGFR2

VEGFR2: receptor tipo 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular

CD31: antígeno de diferenciación 31, conocido como molécula de adhesión plaqueto-endoteliales

vWF: factor de von Willebrand

CD144: proteína denominada Cadherina tipo 5

Ac LDL: lipoproteína de baja densidad acetiladas

UEA-1: Ulex europaeus alglutinina-1

Tie-2: receptor de angiopoyetina

CFU-EC: unidades formadoras de colonias de células endoteliales

CAC: células angiogénicas circulantes

ECFC: célula endotelial formadora de colonia

CEP: progenitores endoteliales circulantes

CE: célula endotelial

bFGF : factor de crecimiento de fibroblastos básico

IGF-1: factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1

MSC: células madres mesenquimales

NO: óxido nítrico

HGF: factor de crecimiento de hepatocitos

G-CDF: factor estimulador de colonias de granulocitos

HIF-1 $\alpha$ : factor inducible por hipoxia

SDF-1: factor derivado de células estromales 1

CRP: proteína c reactiva

TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral alfa

eNOS : síntasa de óxido nítrico endotelial

PI3-K: fosfoinositol 3 quinasa

ROS: especies reactivas del oxígeno

Ado: adenosina

ATP: adenosín trifosfato

IL-8: interleuquina tipo 8

NECA: 5'-N-etilcarboxamidoadenosina

VE: vesícula extracelular

MVB: cuerpos multivesiculares

ESCRT: complejo de selección endosomal requerido para el transporte

TEM: microscopía de transmisión

nm: nanómetros

ARN: ácido ribonucleico

PBS: buffer fosfato salino

NTA: análisis de seguimiento de nanopartícula.



## RESUMEN

Las células progenitoras endoteliales (EPC) son un tipo de células madres adultas que se localizan en la médula ósea y en sangre periférica y tienen la capacidad de diferenciarse en endotelio adquiriendo sus marcadores de superficie característicos. Las EPC se han visto involucradas en procesos de angiogénesis y proliferación celular mediados por la activación del receptor 2 para el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), promoviendo la movilización tanto de las células endoteliales maduras como de EPC desde médula ósea o sangre periférica hacia el sitio de isquemia e hipoxia. Se han descrito dos poblaciones de células progenitoras endoteliales humanas (hEPC), las tempranas y tardías. Las hEPC tempranas se caracterizan por su capacidad para secretar factores angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, mientras que las hEPC tardías poseen un fenotipo endotelial y se caracterizan por su capacidad para formar vasos sanguíneos. Por otra parte, en condiciones de hipoxia e isquemia, no sólo ocurre proliferación y migración de EPC, si no también liberación de adenosina y la activación de sus receptores los cuales modulan la respuesta isquémica.

El nucleósido adenosina cumple un rol cardio protector, ya que participa activamente en la regulación de procesos de angiogénesis y vasculogénesis. Además, está involucrada en otros procesos como la modulación del sistema inmune, vasodilatación, regulación del flujo sanguíneo y la oxigenación de los tejidos. Estos fenómenos ocurren en el microambiente de los tejidos de acuerdo

a las necesidades metabólicas locales y dependen de la activación de una serie de receptores de membrana asociados a proteína G. A la fecha se han reportado 4 tipos de receptores, denominados A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Resultados previos demuestran el efecto de adenosina sobre la migración y movilización de EPC y además, sugieren que este nucleósido podría modular la capacidad angiogénica de las EPC. Sin embargo, se desconoce el mecanismo mediante el cual adenosina podría modular la capacidad angiogénica de las EPC, se sugiere que la secreción de VEGF y/o liberación de exosomas podrían contribuir en este proceso.

En esta tesis se ha establecido que las células progenitoras endoteliales de tres días de cultivo (hEPC-3d) responden a NECA (activador general de los receptores de adenosina) favoreciendo la liberación del factor angiogénico VEGF, que contribuye a la formación de estructuras capilares. Además, se han aislado y caracterizado parcialmente las microvesículas secretadas por las EPC y en respuesta a activadores de los receptores de adenosina. También, se ha demostrado que las microvesículas contribuyen a la formación de estructuras tipo capilares *in vitro* y aumentan la capacidad de proliferación de las células ECV-304.

Estos resultados son la primera evidencia que demuestra la interrelación entre adenosina y hEPC, puesto que ambos componentes poseen roles centrales en los procesos de vaso regeneración en el organismo. En base a los resultados se puede establecer que adenosina modula la función de las hEPC-3d mediante

la acción sobre sus receptores, y mediante la liberación de factores angiogénicos y microvesículas.



## ABSTRACT

Progenitor endothelial cells (EPC) are stem cells located in bone marrow and blood. They have the ability to differentiate into endothelium and are involved in angiogenesis and cellular proliferation by activation of type 2 vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR2). Two types of EPC populations have been described, called early and late. The early EPC secrete angiogenic factors that stimulate the formation of new blood vessels. On the other hand, the late EPC have an endothelial phenotype and are characterized by their ability to form blood vessels.

In hypoxia and ischemia, EPC migrate and proliferate, followed by adenosine release and the activation of its receptors which modulate the ischemic response.

Adenosine is involved in angiogenesis and vasculogenesis processes and there are four adenosine receptors called A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> and A<sub>3</sub>.

Previous results demonstrate the effect of adenosine on EPCs and mobilization and also suggest that this nucleoside could modulate its angiogenic capacity. However, the mechanism by which adenosine could modulate the angiogenic capacity of EPCs is unknown, but it is suggested that VEGF secretion and / or exosome release could contribute to this process.

In scientific work, it is established that three-days-culture human EPC (hEPC-3d) responds to an adenosine agonist called NECA (general activator of adenosine receptors), favoring the release of the VEGF, which contributes to the formation of capillary structures. In addition, microvesicles secreted by EPCs in response to activators of adenosine receptors, have been partially isolated and characterized, and contribute to the formation of *in vitro* capillary structures and increase the proliferation capacity of ECV-304 cells.

These results are the first evidence that demonstrates the interrelation between adenosine and hEPC, since both components have central roles in vessel regeneration processes in the human body. Based on these results, the proposed hypothesis is accepted, and it is established that adenosine modulates the function of hEPC-3d by the activation on its receptors, followed by the release of angiogenic factors and microve



## INTRODUCCIÓN

### **I.- GENERALIDADES DE CÉLULAS MADRES**

Las células madres corresponden a un grupo heterogéneo de células con la capacidad de auto-renovarse, diferenciarse y proliferar en múltiples linajes celulares. Estas se pueden clasificar según su capacidad de diferenciación y origen (Weissman et al., 2001). De acuerdo con su estado evolutivo, las células madres se clasifican en: a) embrionarias, b) perinatales y c) somáticas o adultas. En relación a su potencial de diferenciación las células madre se pueden clasificar en: a) células madre totipotenciales, capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario y con esto un organismo completo; b) células madre pluripotenciales, con habilidad de diferenciarse a tejidos procedentes de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo); y c) células madre multipotenciales, capaces de diferenciarse en células procedentes de la misma capa embrionaria (Weissman et al., 2001).

Las células madres embrionarias son las únicas con capacidad para diferenciarse en cualquiera de las tres líneas germinales, y por ende, conformar un organismo completo (Yu et al., 2007).

Las células madres adultas, consideradas multipotenciales se presentan en tejido hematopoyético, neuronal, epidérmico, gastrointestinal, músculo esquelético, músculo cardíaco, hígado, páncreas o pulmón. Las células madres adultas derivadas de estos órganos, no sólo generan células maduras del mismo tejido, sino también células derivadas de otras capas embrionarias, proceso denominado transdiferenciación. El caso más típico de transdiferenciación es el de las células madres hematopoyéticas capaces de transdiferenciarse a hepatocitos, músculo cardíaco, endotelio y a otros tejidos, todas derivados de las tres capas embrionarias (Yu et al., 2007).



## **II.- CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES**

Las células progenitoras endoteliales (EPC) corresponden a células madres adultas y poseen esta denominación debido a su capacidad de auto renovarse y capacidad de diferenciación (Figura A) (Patel et al., 2016). Las EPC corresponden a un grupo de células madre adultas circulantes que presenta un rol activo en procesos de angiogénesis y reparación de tejidos (Asahara et al., 1997), por estimulación paracrina en el sitio de la injuria (He et al., 2004). Al comparar los marcadores de superficie, tanto en las células progenitoras endoteliales (EPC) como en las células madre hematopoyéticas (HSC), se ha demostrado que ambos son positivos para CD133, CD34 y KDR, además de

ser negativos para el marcador de linaje hematopoyético (lin+), confirmando que ambos tipos celulares provienen de un progenitor común, el hemangioblasto (Iwami, Masuda, & Asahara, 2004). Además, pueden incorporar lipoproteínas de baja densidad acetiladas (acLDL), unir Ulex europaeus aglutinina-1 (UEA-1) y formar parte de la neovascularización a través de un mecanismo paracrino o autocrino (Chopra et al., 2018).

### **III.- MÉTODOS DE OBTENCIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LAS EPC**

Desde su método de cultivo original propuesto por Asahara (Asahara et al., 1997), se han realizado diversas modificaciones, pudiendo aislar e identificar desde células mononucleares extraídas desde sangre periférica, diferentes tipos celulares, los cuales poseen distintas características funcionales, así podemos mencionar las CFU-EC (Coloni formation units-Endothelial Cells), obtenidas por el método propuesto por Asahara y modificado por Hill (Hill et al., 2003) en el cual las células mononucleares se cultivan en placas recubiertas con fibronectina por 48 horas, para posteriormente las células no adheridas ser re-plaquetas en el mismo tipo de placas, obteniendo las unidades formadoras de colonias a los 5 días aproximadamente; sin embargo, las células obtenidas de ésta forma presentan ciertas características tales como no formar estructuras tipo capilar en ensayos de matrige (Fadini, Losordo, & Dimmeler, 2012). Esta técnica es denominada de re siembra y su principio se basa en

remover monocitos, macrófagos o células endoteliales maduras que podrían estar presente en la muestra de células mononucleares (Yoon et al., 2005).

Un segundo método de obtención de EPC consiste en el cultivo de células mononucleares totales extraídas desde sangre periférica y cultivadas en placas recubiertas con fibronectina, en medio suplementado con factores de crecimiento endoteliales por 4 días; posteriormente las células adheridas a la placa, muestran un fenotipo endotelial, expresando vWF, CD31, VEGFR-2, CD144 y Tie-2 (Hirschi, Ingram, & Yoder, 2008) denominándose células angiogénicas circulantes (CAC), las cuales promueven la neovascularización en modelos animales de miembro isquémico o infarto al miocardio (Kawamoto Losordo, 2008). Sin embargo estas CAC no son capaces de agruparse en unidades formadoras de colonias. Dependiendo del tiempo de cultivo, las células se diferencian en estadios tempranos, pueden aparecer a los tres o siete días de cultivo (Hur et al., 2004), poseen morfología de huso y son caracterizados por la capacidad para liberar citoquinas y por incorporarse a estructuras tipo capilar en Matrigel, en presencia de células endoteliales diferenciadas, o en estadio tardío, las células pueden aparecer a las 4 semanas de cultivo, poseen morfología de empedrado y son capaces de formar estructuras tipo capilar sin la necesidad de células endoteliales de sostén (Rehman et al., 2003, Gulati et al., 2003). Debido a que las CFU-EC y las CAC

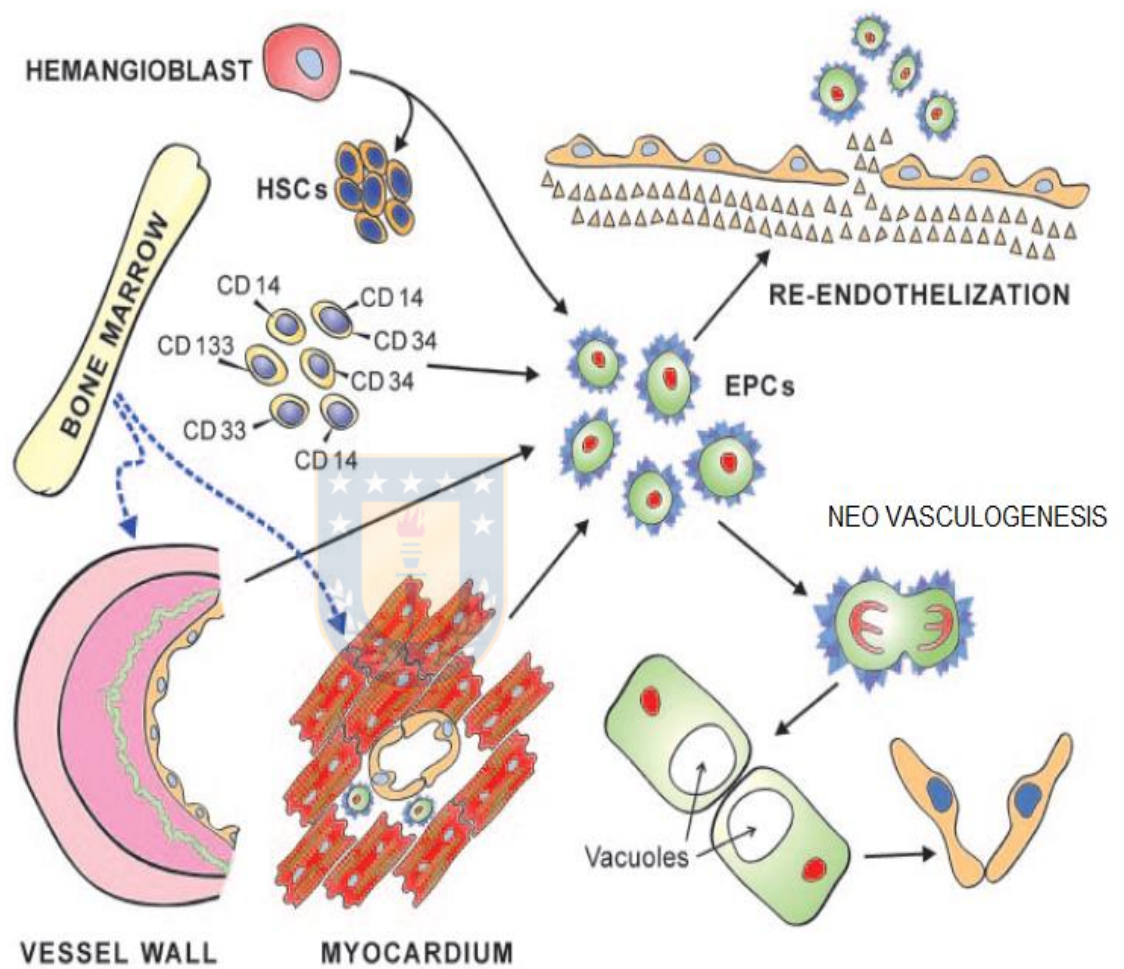
presentan marcadores de membrana similares *in vitro*, ambos se han agrupado bajo el nombre de EPC (Rehman et al., 2004).

Por último, existe un tercer método de obtención de células a partir de mononucleares de sangre periférica, en este caso, éstas son cultivadas en placas recubiertas con colágeno tipo I, en medio para células endoteliales, removiéndose las células no adherentes. Las células que permanecen y crecen en la placa entre los 10-21 días se conocen como ECFC (Endothelial Colony-Forming Cells), exhibiendo la morfología típica de células progenitoras endoteliales tardías, siendo indistinguibles de éstas, ya que poseen los mismos marcadores y la capacidad de formar vasos sanguíneos *de novo* (Ingram et al., 2005). Tanto las células progenitoras tempranas como las tardías (EPC tardías, ECFC) son denominadas colectivamente células Progenitores Endoteliales Circulantes (CEP) (Chopra et al., 2018).

Además, de los distintos grupos de células que se pueden obtener utilizando los métodos de cultivo y selección mencionados anteriormente, también pueden identificarse las EPC basados en los marcadores de superficie (Fadini et al., 2012). Existen dos métodos que se pueden utilizar: MACS que emplea beads magnéticos con anticuerpos adheridos a su superficie y FACS que utiliza el principio de excitación y de la emisión de fluorocromos unidos a anticuerpos. MACS se usó para aislar células CD34<sup>+</sup> desde sangre periférica (Asahara et al., 1997). Cuando las células CD34<sup>+</sup> fueron sembradas sobre placas recubiertas

con fibronectina, pasado los tres días adquirieron morfología de EPC temprana (Flamme et al., 1992). Con FACS, se pueden aislar, clasificar y analizar CEP (Progenitores Endoteliales Circulantes) obteniendo un alto porcentaje de poblaciones celulares sin contaminantes celulares (Timmermans et al., 2007, Medina et al., 2010).





**Figura A: Origen y funciones de las células progenitoras endoteliales humanas (hEPC).**

Las hEPC derivan del precursor hematopoyético hemangioblasto. Entre las funciones en las que participan están la re-endotelización y neo vasculogénesis (Lin et al., 2013).

#### **IV.- FUENTES DE ORIGEN DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES**

Las EPC poseen un precursor común con otras células, por esto pueden ser aisladas o transdiferenciadas desde distintas fuentes de origen (hematopoyético, no hematopoyético y tejido residente) y poseen características fenotípicas parecidas (Chopra et al., 2018).

##### **a) Fuentes de origen hematopoyético**

###### **a.1) Células endoteliales derivadas de la médula ósea.**

En la médula ósea se encuentra un grupo heterogéneo de EPC con morfología de huso (Masek et al., 1994), redonda y de empedrado (Raffi., 1994). Las EPC se movilizan desde la médula ósea hacia la sangre y contribuyen a la formación de nuevos vasos sanguíneos (Nolan et al., 2007).

###### **a.2) Células endoteliales derivadas de células de origen mieloide.**

Estas EPC son derivadas de células CD14+ (origen mieloide) y son estimuladas a adquirir un fenotipo endotelial utilizando medio de cultivo para EPC que está compuesto por VEGF (10 ng/ $\mu$ l), bFGF (2 ng/ $\mu$ l), IGF-1 (1NG/MI) y 20% de suero de bovino recién nacido (Schmeisser et al., 2001). Además, estas células cultivadas *in vitro* e inducidas a diferenciarse a endotelio tienen la capacidad de



generar nuevos vasos sanguíneos, no así las células mieloide CD14+ (Urbich et al., 2003).

a.3) Células madres Mesenquimales (MSC).

Las MSC aisladas y crecidas en medio de cultivo para células endoteliales adquieren características de células endoteliales (CE) expresando VEGFR2, vWF y VE-cadherina (Jiang et al., 2002; Reyes et al., 2008; Oswald et al., 2004). Las EPC derivadas de MSC contribuyen a la neovascularización tumoral en ratones (Jiang et al., 2002) y aumentan la vascularidad en isquemia crónica canina (Silva et al., 2005).



b) **Fuentes de EPC de origen no hematopoyetico**

b.1) Sangre Periférica.

Asahara et al., revolucionó la hematopoyesis y la neovascularización aislando y cultivando células endoteliales de sangre periférica (Asahara et al., 1997). Estas células endoteliales tienen morfología de huso y fueron caracterizadas con varios marcadores, además, tienen la habilidad de endocitar acLDL y unir UEA-1. Estas células endoteliales con forma de huso fueron denominadas células progenitoras tempranas (Hur et al., 2004) o células angiogénicas circulantes (CAC) (Rehman et al., 2003). Si los cultivos de células mononucleares son cultivados por periodos de más de 2 semanas, aparecen células endoteliales

con morfología de empedrado denominadas células endoteliales fuera de crecimiento (OEC) (Lin Y et al., 2000), EPC tardías (Hur et al., 2004), o células formadoras de colonias endoteliales (Ingram et al., 2004). En conjunto estas células son denominadas Progenitores Endoteliales Circulantes (CEPs). Luego del descubrimiento de Asahara y col., numerosos investigadores se han dedicado a aislar, clasificar y definir estas EPC tempranas y tardías (ver Tabla1).

b.2) EPC de sangre de cordón umbilical.

Las EPC de sangre de cordón umbilical aparecen antes en cultivo en comparación con las EPC aisladas desde sangre periférica. Estas colonias son largas y en mayor cantidad que las encontradas en cultivos de sangre (Ingram et al., 2004). Poseen una gran plasticidad y actividad telomerasa y promueven la neovascularización en modelos animales de isquemia de los miembros inferiores (Murohara et al., 2000).

c) **EPC obtenidas desde tejidos residentes**

c.1) Tejido adiposo

El tejido adiposo posee células madres multipotentes, las cuales se pueden obtener por lipoaspiración. Estas células poseen un potencial similar a las células madres mesenquimales pero tienen una caracterización fenotípica

distinta (Zuk et al., 2001), su fenotipo es CD34<sup>+</sup>CD31<sup>-</sup>. Estas células madres derivada de tejido adiposo pueden diferenciarse a células progenitoras endoteliales y aumentar la neovascularización postnatal en ratones (Miranville et al., 2004).

### c.2) Tejido cardiaco

Desde el corazón de ratas adultas se aislaron células madres cardiacas clasificadas como C-KIT<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>, que poseen la capacidad de autorenovarse, son clonogénicas y multipotentes y pueden diferenciarse en tres tipos celulares: cardiomiocitos, células del músculo liso y EPC (Beltrami et al., 2003). La primera evidencia de células madres cardiacas humanas fue determinada al aislar células C-KIT<sup>+</sup> que se diferencian a células musculares lisas, cardiomiocitos y EPC (Bearzi et al., 2007). Cuando estas células fueron inyectadas en el corazón de ratones inmunodeficientes e inmunodeprimidos, pudieron regenerar un corazón generando miocitos, arteriolas y capilares (Bearzi et al., 2007).

En resumen, las EPC pueden ser obtenidas directamente (tejidos como médula ósea, sangre periférica, sangre de cordón umbilical) o producidas por transdiferenciación desde varias fuentes, bajo la influencia de un microambiente para la diferenciación endotelial. Los estudios indican que ambas EPC, transdiferenciadas y las propias, actúan por un mecanismo paracrino en el

proceso

de

regeneración

vascular.



**Tabla 1: Características de las Células Progenitoras Endoteliales (Chopra et al., 2018).**

	<b>EPC tempranas</b>	<b>EPC tardías</b>
Sinónimos	CAC (2)	OECs (1) o ECFC(3)
Población de Células (1)	Heterogenea	Homogenea
Morfología Celular (4)	Células en forma de Huso	Células en forma de Empedrado
Apariencia en cultivo	Entre los 3 y 7 días en cultivo, denominadas EPC-3d o EPC-7d (4)	Luego de 2 o 4 semanas desde el inicio del cultivo (4)
Tiempo de vida (4)	3 a 4 semanas	Más de 12 semanas
Potencial Angiogenico (4)	Bueno	Bueno
<b>Formación de estructuras tubulares in vitro (5, 6, 7))</b>		
Formación de estructuras tubulares solo por EPC	Ausente	Presente
Formación de estructuras tubulares con HUVEC	Ausente	Presente
Formación de estructuras tubulares in vivo(6)	Ausente	Presente
Neovascularización in vivo(2, 6, 8)	Indirecta de una forma Paracrina	Directamente aportando CE, estas células son referidas como las verdaderas EPC.
<b>Marcadores de superficie</b>		
CD34(7, 9)	Positivo	Positivo
CD45(4)	Positivo	Negativo
CD14	Positivo/Negativo(8) solo Positivo(6)	Negativo
CD133	Negativo(9) y Positivo(10)	Negativo
CD31 (4, 7, 8)	Negativo/Positivo	Muy Positivo
VEGFR2 (4, 6, 8)	Negativo/Positivo	Muy Positivo
vWf (4)	Negativo/Positivo	Positivo
Fenotipo (11)	Monocítica	Endotelial
Ingreso de acLDL (5)	Positivo	Muy Positivo
Unión de Lectina (5)	Positivo	Muy Positivo
Producción de NO (5)	Positivo	Muy Positivo

1.- Gulati et al., 2003; 2.- Rehman et al., 2003; 3.- Ingram et al., 2004; 4.- Hur et al., 2004; 5.- Asahara et al., 1997; 6.- Mukai et al., 2008; 7.- Cheng et al., 2013; 8.- Yoon et al., 2005; 9.- Timmermans et al., 2007; 10.- Peichev et al., 2000; 11.- Medina et al., 2010

## **V.- FUNCIONES DE CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES**

Las células progenitoras endoteliales (EPC) derivadas de la médula ósea están involucradas en la reparación vascular. Para efectuar este proceso, el microambiente de la médula ósea posee un rol fundamental en la movilización de EPC, ya que las citoquinas y factores de crecimiento presentes inducen movilización de células progenitoras endoteliales. Después de la movilización a la circulación sanguínea, se produce el homing de EPC, posteriormente el rolling y adhesión. En el sitio de la injuria vascular, las EPC liberan factores angiogénicos, que favorecen la sobrevivencia celular y potencian la capacidad anti-inflamatoria, para su posterior diferenciación en endotelio maduro (Díaz Pérez et al., 2012). Las EPC pueden llegar al sitio con injuria mediante una compleja red de moléculas señalizadoras para poder así, participar en la re-endotelización (Figura A) (Moldovan et al., 2003). Otras de las funciones de las EPC es participar en la neo-vascularización (formación de nuevos vasos sanguíneos). La angiogénesis y la vasculogénesis son los dos grandes procesos de neo-vascularización post natal. La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos desde vasos sanguíneos preexistentes, mientras que la vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos *de novo* mediante células progenitoras endoteliales que forman capilares (Lin et al., 2013). Una serie de estudios han demostrados que las EPC tempranas secretan citoquinas angiogenicas tales como VEGF (factor de crecimiento de

endotelio vascular), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos) y G-CDF (factor estimulador de colonia de granulocitos), las cuales participarían en el proceso de angiogénesis estimulando a células endoteliales adyacentes, mientras que las EPC tardías estimularían la formación de nuevos vasos sanguíneos por proveer una cantidad suficiente de células endoteliales para que el proceso ocurra (Tabla 1) (Hur et al., 2004).

## **VI.- FACTORES QUE MODIFICAN LA NEO-VASCULARIZACIÓN O LA DISPONIBILIDAD DE EPC**

La disponibilidad y función de las EPC puede verse alterada por factores exógenos, endógenos y también por varias condiciones patológicas (Lesnik et al., 2006), tales como:

### **I. Ejercicio.**

La hipoxia en los tejidos inducida por el ejercicio causa una sobre regulación del factor inducible por hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) que es el responsable del aumento en el nivel de citoquinas pro angiogenicas como VEGF y factor derivado de células estromales 1 (SDF-1) (Ceradini et al., 2004) los cuales aumentan la movilización de las EPC desde la médula ósea. Por ejemplo, realizar ejercicio por 10 minutos aumenta el nivel de las EPC en circulación (Rehman et al., 2004). Por otro lado, el ejercicio ayuda a reducir marcadores de inflamación como la CRP (proteína C reactiva) y TNF- $\alpha$  (Beavers et al., 2010). CRP

promueve la apoptosis y disminuye la función y diferenciación de las EPC (Seeger et al., 2005) y TNF- $\alpha$  genera la disminución en la proliferación y diferenciación de las EPC (Seeger et al., 2005, Chopra et al., 2018).

## **II. Ayuno.**

Un cierto grado de ayuno puede ejercer un cambio benéfico metabólico, hormonal y funcional (Fontana et al., 2007). Las funciones de las EPC como adhesión, migración y formación de estructuras tubulares, así como la actividad de la eNOS mejoran durante el proceso de ayuno (Xin et al., 2016).

## **III. Tabaquismo.**

El tabaquismo afecta la función de las EPC (Powell et al., 1998) así como el número de EPC circulantes (Puls et al., 2011). Además, algunos estudios han indicado que el número de EPC está reducido en fumadores crónicos y cuando dejan de fumar se restaura el nivel normal (Kondo et al., 2004).

## **IV. Factores Psicosociales.**

Los pacientes con depresión poseen un número reducido de EPC maduras e inmaduras (Dome et al., 2009) asociado con un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$  y CRP (Tuglu et al., 2003).

## **V. Colesterol.**

Un aumento del colesterol o hipercolesterolemia se asocia con desregulación de la vía PI3K activada por la LDL oxidada y de la vía MAPK, que resulta en la apoptosis de EPC (Wu et al., 2009).



## **VI. Diabetes Mellitus.**

Pacientes con diabetes 1 y 2 poseen una baja expresión de HIF-1 esto provoca una escasa liberación de factores angiogénicos como VEGF y SDF-1 por lo tanto existe una movilización reducida de las EPC desde la médula ósea (Fadini et al., 2006). Además, las EPC aisladas desde pacientes diabéticos exhiben una baja tasa de proliferación, adhesión, migración e incorporación en estructuras tubulares (Tepper et al., 2002). Además, en diabetes existe apoptosis de las EPC debido a un aumento de ROS (especies reactivas del oxígeno) debido a la hiperglicemia y el estrés oxidativo (Nishikawa et al., 2000).

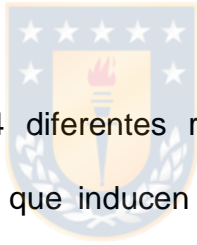
## **VII. Enfermedad Cardiovascular.**

La disfunción endotelial está asociada a enfermedades cardiovasculares como enfermedad arterial coronaria, infarto al miocardio e isquemia. En pacientes con isquemia crónica la capacidad funcional de las EPC está disminuida en comparación al control (Heeschen et al., 2004), los pacientes con angina inestable poseen una mayor cantidad de EPC en circulación en comparación con pacientes con angina estable (George et al., 2004).

## **VIII. Adenosina (Ado).**

La hipoxia es un estrés fisiológico o patológico generado durante una variedad de condiciones como el ejercicio, infarto agudo al miocardio, injuria renal isquémica y cáncer (Duan et al., 2019). Berne et al (Goodwill et al., 2018) demostró que los tejidos hipóxicos producen adenosina desde ATP para restaurar el balance entre la demanda y la oferta de oxígeno. Este nucleótido

genera vasodilatación y un aumento en el flujo de sangre en el corazón, músculo esquelético, cerebro y otros tejidos (Burnstock et al., 2002; Marshall et al., 2001). Además, genera nuevos vasos sanguíneos a concentraciones fisiológicas (1 nM a 10 mM) y participa en varias etapas de la angiogénesis que incluyen proliferación (Dubey et al., 2002), migración de células endoteliales (Lutty et al., 2000) y formación de estructuras tubulares (Fernández et al., 2012). También participa activamente en la vasculogénesis de adulto, reclutando células progenitoras endoteliales en el sitio de injuria (Ryzhov et al., 2008).



Adenosina puede activar 4 diferentes receptores asociados a proteína G llamados  $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  que inducen señales intracelulares que permiten restaurar el balance de energía (Fernández et al., 2012; Escudero et al., 2014). Así, la estimulación del receptor  $A_1$  sobre EPC en embriones promueve la adherencia al endotelio vascular y estimula la secreción de VEGF por parte de monocitos (Ryzhov et al., 2008). La activación del receptor  $A_{2B}$  en células endoteliales de la microvasculatura humana aumenta la producción de VEGF, factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGFb), factor 1 tipo Insulina e IL-8 (Feoktistov et al., 2002). Mientras que la activación del receptor  $A_{2A}$  induce un aumento en la expresión de VEGF en macrófagos (Pinhal-enfield et al., 2003) y la activación del receptor  $A_3$  favorece la sobreexpresión de factores angiogénicos en mastocitos o células tumorales (Feoktistov et al., 2003). Como

se muestra en la Tabla 2 los receptores de adenosina están implicados en la modulación de la angiogénesis en distintos tipos celulares.

### Efecto de adenosina en EPC y células endoteliales

La expresión de los receptores de adenosina en células progenitoras endoteliales humanas ha sido establecido para los receptores  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Fernandez et al., 2012) en cambio en las células progenitoras de ratón se expresa preferencialmente el receptor  $A_1$  (Ryzhov et al., 2008). Además, existe una expresión diferenciada entre los receptores de adenosina en células endoteliales de la macro y microcirculación. Feoktistov et al., reportó que las células HMEC-1 de la microvasculatura expresa un alto nivel de  $A_{2B}$  cuando es comparada con HUVEC, en la cual predomina la isomera  $A_{2A}$  (Feoktistov et al., 2002) (Tabla2).

La estimulación del receptor  $A_1$  en EPC de ratones promueve adherencia al endotelio vascular (Ryzhov et al., 2008), además se ha determinado que los receptores  $A_{2A}$  y  $A_3$  están involucrados en el proceso de migración de las EPC, indicando roles importantes de estos receptores en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Fernández et al., 2012). Otras funciones de estos receptores han sido determinadas en células de la microvasculatura como HMEC o HUVEC, en las cuales cuando es estimulado el receptor  $A_{2A}$  se sobreexpresan factores angiogénicos como VEGF, IL-8 y se inhibe la liberación del factor anti-angiogénico trombospondina 1, señalando un importante rol de este receptor al

estimular el proceso de angiogénesis (Feoktistov et al., 2002). Junto con esto, se ha establecido que la activación de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$  tienen acciones proliferativas en células endoteliales de la microvasculatura retinal humana (Escudero et al., 2014), HUVEC (Feoktistov et al., 2004) y en células endoteliales aórticas de rata (Dubey et al., 2002).



**Tabla 2: Funciones de los receptores de adenosina en angiogénesis y vasculogénesis (Escudero et al., 2014).** Abreviaciones: HMVEC: células endoteliales de la microvasculatura, HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana, HREC: células endoteliales retinales humanas, HMEC-1: células endoteliales de la microvasculatura humana.

Receptor de adenosina	Kd(nM)	Efectos en el proceso de Angiogénesis	Tipo Celular
<b>A<sub>1</sub></b>	3-30	↑ Migración	EPC
<b>A<sub>2A</sub></b>	1-20	↑ Expresión VEGF	Macrófagos
		↑ Expresión de Trombospondina 1	HMVEC
		↓ Liberación de sFlt-1	Macrofagos
		↑ Expresión de mFlt-1	Macrofagos
		↑ Proliferación/migración y expresión de VEGF	HUVEC
<b>A<sub>2B</sub></b>	5000-20000	↑ Permeabilidad	HUVEC-PMN
		↑ Expresión de VEGF	HMVEC
		↑ Migración	HREC
		↑ Expresión de VEGF, IL-8	HMEC-1
		↑ Migración	EPC
		↑ Secreción de IL-8	Células de Melanoma
		↑ Expresión de VEGF	HUVEC bajo hipoxia
		↑ Expresión de VEGF e IL-8	HMEC-1
		↑ Proliferación/Migración y formación de estructuras tubulares y expresión de VEGF	HREC
<b>A<sub>3</sub></b>	> 1000	↓ Migración y formación de estructuras tubulares	HUVEC
		↑ Expresión de VEGF e IL-8	Células de Espuma
		↑ Expresión de VEGF e IL-8	Células de Melanoma
		↑ Expresión de VEGF	HT29
		↑ Expresión de Angiopoietina-2	HMEC-1

### Producción de Adenosina.

La concentración de adenosina en los fluidos intersticiales es un importante factor en la estimulación de la angiogénesis. El mecanismo por el cual se produce una mayor cantidad de adenosina en la mayoría de los tejidos, es por hidrólisis de AMP tanto en condiciones de normoxia como hipoxia (Yanez-Mo et al., 2015). Esto forma parte de una compleja red enzimática que controla la concentración de adenosina intersticial, siendo producida intracelularmente por la acción de nucleotidasa 5' citosólica y extracelularmente por CD73/ecto-5'-nucleotidasa (Ledoux et al., 2003; Sala-Newby et al., 2003). Además, puede ser reciclada por dos mecanismos: mediante la acción de adenosina deaminasa, generando inosina o por la acción de adenosina quinasa, generando AMP. Finalmente, existe un transporte bidireccional de adenosina en la membrana celular que es llevado a cabo por el transportador de nucleosidos (ENT1) que facilita la difusión dependiente de gradiente de concentración (Baldwin et al., 2004; Cass et al., 1999).

### Mecanismo de acción de adenosina

La principal acción de adenosina es regular la producción de factores angiogénicos. Se ha determinado que modula la liberación de factores angiogénicos de varios tipos celulares y tejidos (Feoktistov et al., 2003; Feoktistov et al., 2004; Leibovich et al., 2002; Gu et al., 2000) regulando la formación de estructuras capilares de una forma paracrina. Además, adenosina

puede regular la liberación de factores angiogénicos desde células endoteliales HMVEC (Desai et al., 2005; Khoa et al., 2003) regulando la formación de nuevos capilares de una forma autocrina.

Adenosina induce la expresión de VEGF y otros factores angiogénicos *in vitro*, algunos de estos factores son generados por células endoteliales de retina humana bajo estimulación de NECA (5'-N- etilcarboxamidoadenosina, agonista no selectivo de receptores de adenosina) produciendo IGF-1, FGFb en una manera tiempo dependiente (Grant et al., 1999). Además, incrementa la expresión de IL-8, Ang-2 en mastocitos humanos así como bFGF en células endoteliales de la microvasculatura humana (Feoktistov et al., 2003).



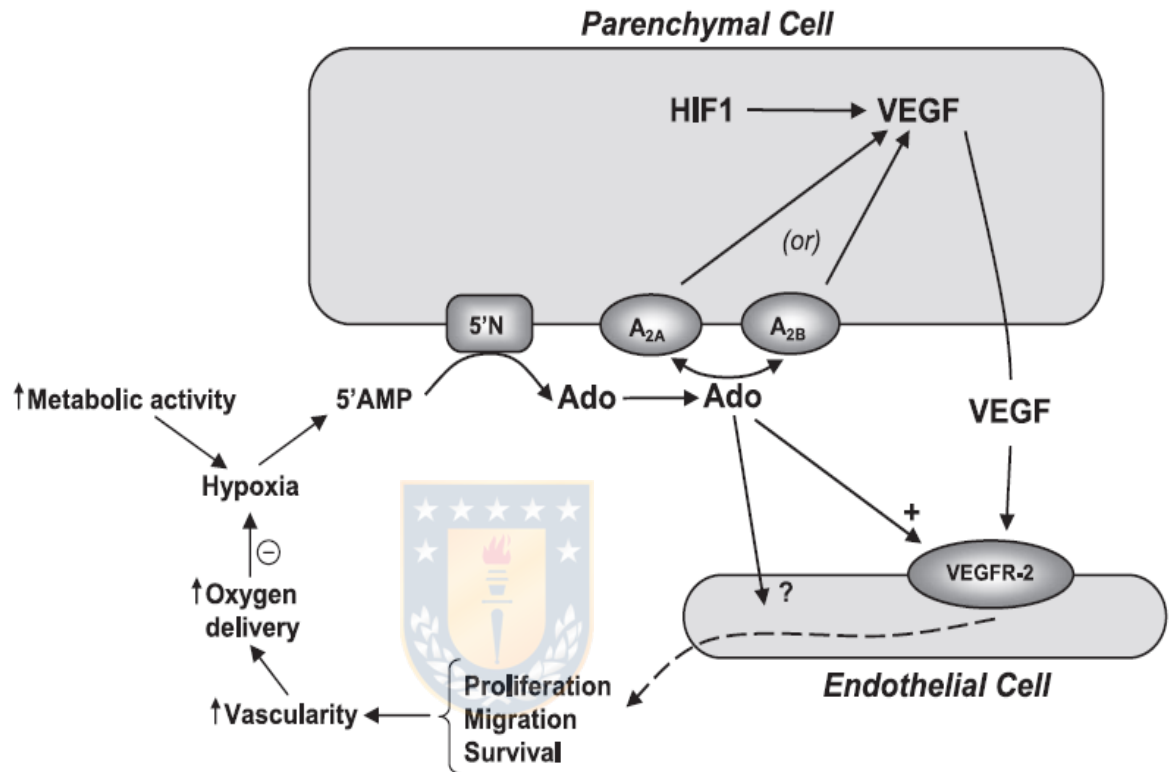
El principal factor angiogenico que es producido bajo la estimulación de adenosina (o NECA) es VEGF, el cual genera proliferación en células no endoteliales como células epiteliales retinales, células del ducto pancreático y células de Schwann (Ferrara et al., 2004).

La producción de VEGF en condiciones isquémicas es estimulada por HIF-1 (factor inducible por hipoxia) mediante la unión de HIF-1 a secuencias específicas en el promotor del gen lo que promueve la transcripción de este gen (Forsythe et al., 1996; Semenza et al., 2001). Existen otras vías para inducir la expresión de VEGF que es independiente de HIF-1 y que es estimulada por adenosina (Adair et al., 2005). La expresión de VEGF ha sido determinada por

tratamientos con adenosina o agonistas de adenosina solos o en combinación con antagonistas de adenosina y se ha determinado que A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> son los principales receptores que estimulan la expresión de esta proteína en mastocitos (Feoktistov et al., 2003) (Figura B).

VEGF es una glicoproteína que al ser secretada forma homodímeros unidos por enlaces disulfuros entre las cisteínas 51 y 60 (Ferrara et al., 2004). Existen cinco VEGF en mamíferos estos corresponden a: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E que se unen a los siguientes grupos de receptores tipo tirosina quinasa: VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3 (Koch et al., 2011). El VEGF-A estimula la movilización de EPC (Gill et al., 2001) y un aumento en su expresión estimula la angiogénesis (Carmeliet et al., 2003). Cuando existe una injuria vascular, el nivel de VEGFA se eleva y esto provoca una rápida movilización de las EPC desde la médula ósea (Rose et al., 2016). Una serie de investigaciones sugieren que VEGF-A induce la expresión de metaloproteínasa de la matriz extracelular 9 (MMP-9) en la médula ósea, promoviendo la liberación de las EPC (Heissig et al., 2002). Tanto el VEGF como los otros factores angiogénicos mencionados pueden ejercer su acción de forma paracrina o autocrina encontrándose en forma aislada en el sitio de la injuria o bien, en vesículas extracelulares liberadas por las EPC, lo que permite la comunicación y transporte de factores angiogénicos hacia las células endoteliales del sitio isquémico (Zhang et al., 2016; Colombo et al., 2015, Yanez-Mo et al., 2015).





**FIGURA B: Producción de adenosina bajo condiciones de hipoxia.** Bajo condiciones de hipoxia se genera un aumento en el AMPc extracelular asociado a un incremento en los niveles de adenosina, mediado por CD73/ecto-5'-nucleotidasa (5'N). Adenosina activa principalmente a los receptores A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> los cuales activan la transcripción de VEGF. Una vez secretada la proteína interacciona con su receptor VEGFR2 en las células endoteliales, lo que aumenta la proliferación, migración y sobrevivencia de estas células, contribuyendo a la formación de vasos sanguíneos (Adair et al., 2005).

## **VII.- VESÍCULAS EXTRACELULARES**

Las células madres son capaces de comunicarse con otras células a través de factores solubles, por contacto directo y por vesículas extracelulares (VE). Estas vesículas poseen un diámetro que va desde los 30 nm a los 3000 nm. Las VE son generalmente divididas en tres grandes grupos: *exosomas* generados desde endosomas intracelulares, *microvesículas* liberadas directamente desde la membrana plasmática y *cuerpos apoptóticos* liberados durante la apoptosis (Riazifar et al., 2017)

Los **Exosomas** se originan desde cuerpos multivesiculares (MVB) que corresponden a invaginaciones de la membrana (plasmática o de organelos) generados por proteínas del complejo de clasificación endosómico (ESCRT) (Andreu et al., 2014). Poseen biomoléculas específicas como ácidos nucleicos, lípidos y proteínas. Las proteínas son de origen principalmente endosomal, de membrana plasmática y citosol pero también pueden contener proteínas del núcleo, mitocondria, retículo endoplasmático y aparato de Golgi (Gurunathan et al., 2019). El contenido de proteínas va a depender del tipo celular que los secreta, así poseen diversas proteínas en común como TSG101, tetraspaninas (CD81, CD63, CD9, CD82, CD151) (Andreu et al., 2014) y algunos lípidos como colesterol, esfingomiélin, ceramida y fosfatidilserina (Raposo et al., 2013; Colombo et al., 2014; Mobius et al., 2003) **(Tabla 3)**.

Las **Microvesículas**, también llamadas Ectosomas, se originan de invaginaciones externas de la membrana plasmática razón por la cual poseen material citoplasmático. Al igual que los exosomas poseen ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y en su biogénesis participa el complejo ESCRT (**Tabla 3**) (Cocucci et al., 2015).

Los **Cuerpos Apoptóticos** son el resultado de la fragmentación de células apoptóticas. Están compuestos de membranas organelar/plasmática y material citoplasmático/nuclear hidrolizado y poseen funciones en la homeostasis celular, que incluye tolerancia inmunogénica (**Tabla 3**) (Robbins et al., 2014).

La información de los ácidos nucleicos y las proteínas presentes en las VE ha sido agrupada en una database que incluye Exo Carta (<http://www.exocarta.org>) y EVpedia (<http://www.evpedia.info>).

### **IX.- EXOSOMAS.**

El término de exosomas fue usado inicialmente en 1981, para describir a vesículas cuyo tamaño está entre 40-1000 nm (Trams et al. 1981). En el mismo año el término se adoptó para vesículas pequeñas (30-100 nm) que son liberadas durante la diferenciación de reticulocitos como consecuencia de la fusión de endosomas o cuerpos multivesiculares (MVBs) con la membrana plasmática (Johnstone et al. 1987).

*i. Biogénesis de Exosomas.*

La biogenesis de los exosomas es un proceso regulado (Figura C) en el cual existen mecanismos en la membrana de los Cuerpos Multivesiculares (MVBs) que aseguran el tipo de proteínas que es cargada en los exosomas (Villarroya et al., 2014), estos son mecanismos dependientes e independientes del complejo ESCRT (Complejo de Selección Endosomal Requerido para el Transporte). El complejo ESCRT está formado por subcomplejos (0, I y III) y el mecanismo independiente está formado por las Tetraspaninas (CD81, CD9 y CD63) (Emanuelli et al., 2015).

Existen diversos factores que influyen la biogénesis de exosomas. Estudios han sugerido que la liberación de exosomas depende del tipo celular. Por ejemplo, las células dendríticas producen una baja cantidad de exosomas (Tian Y et al., 2014) a diferencia de las células mesenquimales que producen una gran cantidad (Chen TS et al., 2011). La confluencia de las células también juega un papel importante en la biogénesis y secreción de exosomas. Las células confluentes producen más exosomas que las pre confluentes, probablemente debido al metabolismo del colesterol (Palviaienm et al., 2019). Otro factor que influye en la liberación de exosomas es la inhibición por contacto entre células que reduce la secreción de exosomas (Steinman et al., 2003; Hayes O et al., 2005). Existen varios estímulos como: ionóforos de  $Ca^{+2}$  (Savina et al., 2003), hipoxia (Svensson et al., 2011; Kucharzewska et al., 2013) que a su vez pueden inducir la secreción de estas VE.

**Tabla 3: Características de las Vesículas Extracelulares (Todorova et al., 2017)**

<b>Características</b>	<b>Exosomas</b>	<b>Microvesículas</b>	<b>Cuerpos Apoptóticos</b>
<b>Tamaño (nm)</b>	30-120	100-1000	800-5000
<b>Morfología</b>	Forma de copa	Heterogénea	Heterogénea
<b>Origen</b>	Cuerpos multivesiculares	Membrana Plasmática	Membrana Plasmática
<b>Mecanismo de formación</b>	Exocitosis de cuerpos multivesiculares	Elevación de Membrana Plasmática	Elevación de membrana plasmática
<b>Mecanismo de liberación desde la célula de origen</b>	Dependiente de ESCRT	Dependiente de $Ca^{+2}$	Vías relacionadas con apoptosis
	Dependiente de Tetraspaninas	Dependiente de células y estímulo	
<b>Tiempo de liberación</b>	10 minutos o más	Segundos	Segundos
<b>Marcador proteico</b>	CD81, CD63, Alix, Tsg101	Selectinas, integrinas, CD40	Caspasa 3, histonas
<b>Composición</b>	Proteínas, lípidos, ARN codificante, ARN no codificante, DNA	Proteínas, lípidos, organelos celulares, ARN codificante, ARN no codificante, DNA	Organelos celulares, proteínas, fracciones nucleares, ARN codificante, ARN no codificante, DNA

Los exosomas liberados pueden ser internalizados en células blancas por diversos mecanismos:

- a) Endocitados o internalizados en un compartimiento endocítico o MVBs (Fitzner et al., 2011)
- b) Fusión de su membrana con la membrana plasmática, liberando el contenido directamente en la célula blanco (Parolini et al., 2009).
- c) Unión a un receptor en la membrana celular, lo que genera activación de una vía o internalización del exosoma (O'Loughlin et al., 2012; Segura et al., 2007).

ii. *Métodos de aislamiento de exosomas.*

Existen varias técnicas que se han adaptado para facilitar el aislamiento de exosomas, como: ultracentrifugación, ultrafiltración, cromatografía, precipitación basada en polímeros, uso de *beads* magnéticos asociados a anticuerpos (Peterson et al., 2015). El método usado depende de la muestra de la cual se van a aislar exosomas (Gurunathan et al., 2019).

iii. *Tamaño y morfología.*

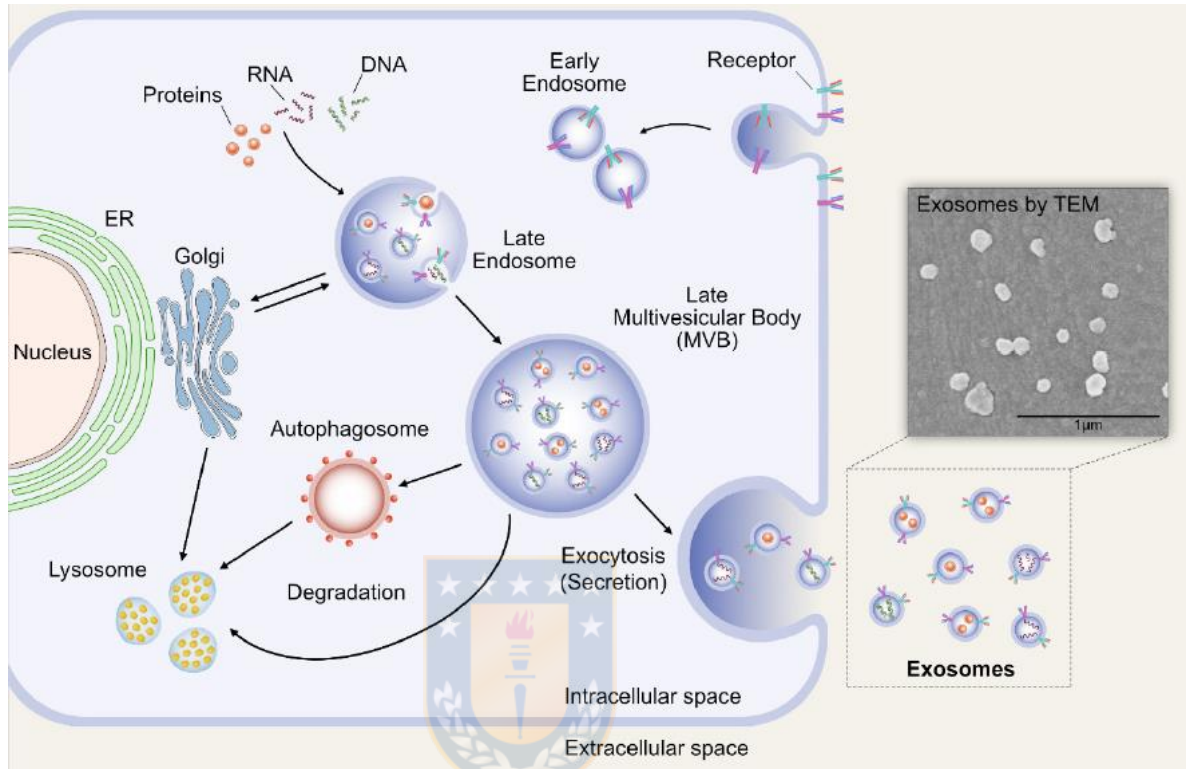
La microscopía de transmisión (TEM) ha sido la técnica de preferencia para la observación directa del tamaño y la morfología de los exosomas (Raposo et al. 1996) que poseen forma de copa. Existe un análisis denominado NTA (análisis de seguimiento de nanopartículas) que permite medir el tamaño y la concentración de nanopartículas (Dragovic et al. 2011). El equipo de NTA

posee un láser que incide sobre la muestra, el movimiento Browniano generado por las partículas permite calcular el diámetro de las partículas en suspensión mediante un programa estadístico (de Necochea-Campion et al., 2018). La ventaja de usar NTA es que permite detectar diferentes VE, incluyendo exosomas y medir pequeñas partículas con diámetros bajo los 30 nm (Szatanek et al., 2017).

*iv. Propiedades Físicas.*

Los exosomas poseen distintos rango de densidad sucrosa que va desde 1,13 al 1,19 g/ml. Esto refleja la heterogeneidad de las vesículas obtenidas por ultracentrifugación. Así, se ha determinado que las vesículas que poseen gran cantidad de tetraspaninas se demoran más que otras vesículas en alcanzar el equilibrio de densidad durante la centrifugación en gradiente de sucrosa (They et al., 2009).

Otro parámetro físico de los exosomas, la dispersión de la luz, que se correlaciona con la geometría y composición de estas vesículas puede ser medido por citometría de flujo, la que permite caracterizar los exosomas de acuerdo a sus proteínas de superficie (Pospichalova et al., 2015). La ventaja de esta técnica es que permite rápidas determinaciones en exosomas, detecta vesículas extracelulares de hasta 300 nm y los exosomas pueden ser clasificados de acuerdo al nivel de expresión de antígenos que posean (Orozco et al., 2010).



**FIGURA C. Biogénesis de Exosomas.** Esta consiste de tres diferentes etapas que incluyen: la formación endocítica de vesículas por la invaginación de la membrana plasmática; la formación de cuerpos multivesiculares (MVBs), la fusión de los cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática y la liberación del contenido vesicular, llamados exosomas (Batista et al., 2011). Las vesículas endocíticas generan vesículas intraluminales o exosomas que poseen contenido citoplasmático dentro de ellos. La acumulación de exosomas en el lumen de endosomas resulta en Cuerpos Multivesiculares (MVBs) (Gurunathan et al., 2019)



## **X.- FUNCIONES DE LOS EXOSOMAS EN ANGIOGENESIS Y REGENERACIÓN CARDIACA**

Las enfermedades cardiovasculares, incluyendo infarto al miocardio, son la primera causa de muerte a nivel mundial (Wendt et al., 2018). Una reducida perfusión y/o oclusión de las arterias coronarias causado por placas ateroscleróticas por ejemplo, reduce el suministro de sangre a distintas regiones del corazón. Esto genera hipoxia y muerte celular en el miocardio, conocido como infarto al miocardio lo que demanda una intervención para restaurar el suministro de sangre en la región infartada (Frank et al., 2012).

En este contexto, los exosomas son vesículas extracelulares que serían mediadores de cardioprotección (Vicencio et al., 2015; Wang X et al., 2015) y generadores de nuevos capilares sanguíneos, participando en el proceso de angiogénesis (Kholia et al., 2016).

### **Exosomas en comunicación cardiovascular**

Existe evidencia que los exosomas son secretados por células madres, cardíacas y vasculares en cultivo (Gray et al., 2015; Barile et al., 2014). Además, los exosomas han sido implicados en la comunicación entre células endoteliales y células del músculo liso (SMCs) (Hergenteider et al., 2012), célula endotelial y pericitos, miocitos cardíacos y células endoteliales (Wang X

et al., 2014) y fibroblastos y cardiomiocitos (Bang et al., 2014). La tabla 4 resume el rol de los exosomas en la comunicación cardiovascular.

En investigaciones recientes, se demostró la comunicación entre fibroblastos y cardiomiocitos (Bang et al., 2014). En este estudio se utilizaron fibroblastos y cardiomiocitos de ratas y se identificó un micro ARN, denominado miR-21, secretado en los exosomas de fibroblastos y que sirve de señal en la hipertrofia cardíaca. Esto ilustra un posible mecanismo que contribuiría a la falla cardíaca (Bang et al., 2014).

Por otro lado, los exosomas también pueden ejercer funciones benéficas, por ejemplo, los pericitos secretan vesículas en respuesta a hipoxia que poseen en su interior miR-132, micro ARN-132 (miR-132), el cual aumenta la capacidad pro angiogenica de HUVECs (Katare et al., 2011). Otro estudio indica que el miRNA-1 es liberado en exosomas a la sangre de ratones con infarto agudo al miocardio. La acción de este miRNA-1 es suprimir la expresión de SDF-1 y del receptor para CXCR-4 en células monucleares de la médula ósea, lo cual podría contribuir al aumento en la movilización de estas células en episodios de isquemia aguda, como un infarto al miocardio (Cheng M et al., 2014). Diversas investigaciones indican que los exosomas pueden participar en mecanismos de diseminación de la enfermedad cardíaca, pero a su vez en la reparación, regeneración del corazón (Barile et al., 2017) y en la formación de nuevos vasos sanguíneos.

**Tabla 4: Exosomas en comunicación cardiovascular. Efecto terapéutico y Patogénico de los exosomas sobre células blanco (Barile et al., 2017).**

<b>Efecto</b>	<b>Célula Liberadora de VE</b>	<b>Molécula Mediadora</b>	<b>Estímulo</b>	<b>Célula Blanco</b>	<b>Efecto Biológico</b>
<b>Terapéutico</b>	Cardiomiocito de Rata	HSP70, HSP90	Hipoxia	Cardiomiocito	Citoprotección
	Célula Endotelial	miR-214		Célula Endotelial	Migración, Angiogénesis
	Célula Madre Mesenquimal	miR-22	Precondicionamiento Isquémico	Cardiomiocito	Cardioproteccion
	Célula Cardíaca de Ratón	miR-144	Precondicionamiento Isquémico Remoto	Cardiomiocito	Cardioproteccion
<b>Patogénico</b>	Cardiomiocito de Ratón	Angiotensina II R1	Aumenta la Presión Cardíaca	Cardiomiocito, Célula Endotelial, Célula del músculo liso	Sensibilidad a Angiotensina II
	Célula Endotelial de la microvasculatura humana	ICAM-1	TNF- $\alpha$	Célula Endotelial	Inflamación Vascular
	Célula endotelial de ratón	miR-146a	Fragmento de Prolactina N-terminal	Cardiomiocito	Baja la función de cardiomiocito
	Fibroblasto Cardíaco	miR-21-3p/miR-21	Angiotensina II	Cardiomiocito	Hipertrofia de cardiomiocito
	Cardiomiocito	miR-320	Hiperglicemia	Célula Endotelial	Anti-angiogenesis
	Plaquetas	Superoxido, NO, peroxinitrito	LPS, NO	Célula Endotelial	Apoptosis

### **Exosomas en Angiogénesis.**

La angiogénesis es la formación de nuevos capilares a partir de vasos sanguíneos existentes y es mediado por una serie de eventos celulares. (Adams et al., 2007; Bazigou et al., 2013), tales como: degradación enzimática de la membrana basal del vaso sanguíneo, proliferación de células endoteliales, migración, ramificación y formación de estructuras tubulares. La estabilización y maduración de los nuevos vasos sanguíneos requiere el reclutamiento de pericitos, la deposición de matriz extracelular y estimulación mecánica por el *shear stress*. En tejidos normales la angiogénesis es regulada por un balance entre señales estimuladoras e inhibitorias que en enfermedades como cáncer, aterosclerosis, artritis reumatoide se encuentran alteradas, generando un crecimiento anormal de vasos sanguíneos (Todorova et al., 2017).

Las vesículas extracelulares liberadas por células madres participan activamente en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Tal es el caso de las células madres Mesenquimales (MSC):

- *MSC derivadas de tejido adiposo* generan exosomas que poseen diversos factores angiogénicos como c-kit, SCF, APRIL, MMP-20 los cuales facilitan la migración de células endoteliales (Lopatina et al., 2014).
- *Las MSC derivadas de la médula ósea* también poseen efecto pro angiogénico, este tipo celular posee propiedades regenerativas que podrían ser atribuidas a las VE que contienen factores paracrinos. Como ha documentado

Bian et al, 2014 las VE liberadas por MSC de la médula ósea al ser inyectadas en un modelo de infarto al miocardio, inducen migración y proliferación de células endoteliales y promueve la angiogenesis en el área isquémica.

- Las *VE de MSC derivadas de cordón umbilical* poseen actividad pro angiogénica, así Chen et al., 2014 demostró que, en condiciones de hipoxia, las MSC producen VE enriquecidas en factores angiogénicos como VEGF, VEGFR2, proteína 1 quimio atrayente de monocitos (MCP-1), angiogenina, IL-6, factor de crecimiento tipo insulina (IGF) que contribuye al proceso de angiogenesis, además sugiere que el microambiente donde estén las MSC puede generar VE enriquecidas de factores pro angiogénicos.

## **XI.- PARTICIPACIÓN DE EXOSOMAS LIBERADOS POR CÉLULAS PROGENITORAS (EPC) ENDOTELIALES EN ANGIOGÉNESIS**

Las EPC son movilizadas desde la médula ósea ante una situación de injuria, ellas actúan de una forma paracrina liberando citoquinas, factores de crecimiento y VE. Su acción neo-angiogenica puede llevarse a cabo mediante estas VE tal como lo señala Li et al., que demuestra que los exosomas derivados de EPC pueden mejorar la función vascular y la reendotelización de vasos sanguíneos, activando a las células endoteliales (Li et al., 2016). Además, sus resultados sugieren que VE transportarían ARNm que sería internalizado por las células endoteliales con lo cual se estimularía la formación

de nuevos vasos sanguíneos (Deregibus et al., 2007). Deregibus et al. indica que este ARNm codificaría para alguna proteína presente en la vía de señalización PI3K/AKT y eNOS que son conocidas vías de señalización que estarían involucradas en el programa angiogénico y antiapoptótico (Shiojima et al., 2002; Donnini et al., 2002). Similares resultados señalan que los exosomas secretados por las EPC provenientes de la médula ósea de ratones, poseen micro RNA 126 y que estos también favorecerían la formación de nuevos vasos sanguíneos (Wu et al., 2018). Así también, se ha determinado que las EPC humanas liberan VE que contienen factores pro angiogénicos y los micro RNA 126 y micro RNA 296, los cuales favorecerían la formación de nuevos vasos sanguíneos, además esta secreción paracrina estaría aumentada en hipoxia (Cantaluppi et al., 2012).

Las EPC mediante sus exosomas contribuirían a la homeostasis vascular de una manera paracrina o autocrina. Sheldon et al (2010) demostraron que estas VE pueden transportar factores angiogénicos tal es el caso de Ligando 4 Delta, el cual es transferido a células endoteliales y bloquea señales Notch que promueve la angiogénesis *in vitro* como *in vivo* (Sheldon et al., 2010). Además, son capaces de acelerar el proceso de cicatrización de herida mediado por la estimulación de la angiogénesis (Zhang et al., 2016), favorece la neovascularización de islotes pancreáticos humanos (Cantaluppi et al., 2018) y estimula proceso de angiogénesis de células endoteliales en estado de reposo (Ranguino et al., 2012)

### **Efecto *in vivo* de los exosomas secretados por las EPC**

Los estudios con VE de EPC varían en cuanto a cantidad de VE y modelo de estudio. Además, las VE de EPC corresponden a células progenitoras endoteliales de > 7 días, demostrando que las VE liberadas por estas células poseen efecto angiogénico. Las investigaciones con VE de EPC corresponden a:

- a) Deregibus et al., (2007) quienes usaron ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID) y 30 µg/ml de VE de hEPC. Los resultados indican que se generó una mayor cantidad de capilares en el grupo de animales tratados con VE en comparación con el control. Con respecto al contenido de las VE, solo se determinó que existe un ARN involucrado en la generación de vasos sanguíneos, el tratamiento con RNA-asa genera una disminución en la formación de capilares.
- b) Ranguino et al., 2012, utilizando un modelo murino de isquemia en las extremidades posteriores demostró que al utilizar 50 µg de MV se observa una mejoran la neo vascularización, un aumento en la densidad de capilares y estas acciones se les atribuye a los miR126 y miR296 presentes en las VE.
- c) Li et al., 2016: este grupo de investigadores usó un modelo en ratón de injuria vascular inducida por balón en arteria carótida externa izquierda y demostró que al inyectar 30 µg de exosomas EPC se generaban vasos sanguíneos más rápidamente que sin estos. Además, este estudio

demuestra que las vesículas aumentan la expresión de factores angiogénicos (VEGFA, HIF-1a, eNOS, E-Selectina, IL-8) y citoquinas (CXCL-12, CXCL16) en células HMEC.

- d) Zhang et al., 2016: En un modelo de ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) a al cual se le generó una lesión en la espalda y se inyectaron exosomas derivados de EPC humanas de sangre de cordón umbilical ( $2 \times 10^{10}$  o  $1 \times 10^{10}$  partículas en 200  $\mu$ l de PBS). Luego de 14 días se demostró que la presencia de exosomas generan un aumento en los capilares en la zona dañada. Se pudo determinar in vitro que estos exosomas estimulan la vía de señalización Erk 1/2 aumentando la expresión de FGF-2, IL-6, IL-8, Cox-2, VEGFA, cMyc lo que favorecería la formación de nuevas estructuras capilares.
- e) Recientemente, Cantaluppi et al., (2018) utilizando cultivos de islotes pancreáticos humanos tratados con 10  $\mu$ g/ml de VE y al ser transplantados en ratones SCID, mejoran su secreción, supervivencia y re-vascularización. Se determinó que la acción de estas VE es a través de los micro RNA-126 y micro RNA-296 que forman parte de la vía de señalización PI3K-AKT (Cantaluppi et al., 2018). Otro estudio realizado por este grupo pero usando un modelo de injuria renal aguda, determino que las MV previenen la injuria renal mediante la transferencia de miR-126 y miR-296 a las células renales (Cantaluppi et al., 2012).



En resumen, el proceso de angiogenesis y formación de nuevos vasos sanguíneos es un proceso fisiológico normal de recambio celular, pero también está relacionado con la reparación de los tejidos dañados, en condiciones de hipoxia e isquemia, en donde se ha demostrado que las EPC y adenosina juegan un rol importante, como una molécula que modula distintos procesos fisiológicos y patológicos.

Existen evidencias previas que sugieren que adenosina podría modular la capacidad angiogénica de las EPC modificando su capacidad de movilización y adhesión. Sin embargo, no existen evidencias del efecto de adenosina sobre la secreción de factores de crecimiento y liberación de exosomas o microvesículas desde las EPC, las cuales podrían representar mecanismos que contribuyen a la angiogenesis y a la reparación de tejido.

Basado en estos antecedentes, el problema de investigación es:

Se desconoce si adenosina favorece la liberación de secreción de factores de crecimiento, tales como VEGF y/o exosomas o microvesículas desde las EPC de 3 días potenciando el proceso de angiogenesis.

**Pregunta de investigación:**

¿Adenosina modifica la liberación de VEGF o exosomas desde hEPC de 3 días favoreciendo el proceso de angiogenesis?

**Hipótesis:**

La secreción de VEGF y/o de exosomas liberados al medio extracelular desde hEPC de 3 días estimuladas con adenosina aumentan el proceso de angiogénesis *in vitro*.

**Objetivo General:**

Determinar si la secreción de VEGF y/o exosomas liberados por EPC de 3 días en presencia de adenosina favorece el proceso de angiogenesis *in vitro*.

**Objetivos específicos:**

- 1.- Evaluar la expresión y secreción de VEGF de EPC de 3 días estimulados con adenosina.
- 2.- Evaluar si el VEGF producido por EPC de 3 días inducido por adenosina favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- 3.- Aislar y caracterizar los exosomas liberados por las EPC de 3 días, en presencia de adenosina, al medio extracelular.
- 4.- Cuantificar el efecto de los exosomas liberados sobre la viabilidad de células ECV304.
- 5.- Evaluar si los exosomas liberados favorecen la formación de nuevos vasos sanguíneo *in vitro*.

## METODOLOGÍA

### I. Extracción de sangre total y cultivo de células progenitoras endoteliales humanas.

#### I.1) Cultivo de células progenitoras endoteliales humanas.

Las muestras de sangre total serán recolectadas a partir de punción venosa desde voluntarios sanos. La sangre será recolectada en tubos con PBS/heparina previo consentimiento informado (ver Anexo 1).

Las EPC fueron aisladas según lo descrito por Asahara et al (1997). La sangre total fue mezclada con una solución de Buffer Fosfato salino (PBS (mM): 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.8 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.2NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.4) con EDTA (0,004M), luego de lo cual las células mononucleares fueron extraídas mediante un gradiente de densidad usando Medio de separación de Linfocitos (*Corning® Lymphocyte Separation Medium*). Las células mononucleares fueron lavadas y resuspendidas en buffers fosfato salino (PBS) y finalmente sembradas en medio de cultivo para células endoteliales (*GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, USA*), suplementado con 20% de suero fetal de bovino (*Biological Industries, Israel*) y factor de crecimiento para células endoteliales (10 Qg/ml; *GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, USA*). Las placas de cultivo (100 mm) fueron recubiertas con fibronectina (1 mg/ml) (Sigma) y las células fueron cultivadas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

#### I.3) Incubación con agonista no selectivo de receptores de Adenosina (NECA).

Luego de tres días de cultivo las EPC fueron lavadas con 5 ml de PBS, se agregó 5 ml de Medio de cultivo 199 (M199, *GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, USA*) con 2% de Suero Bovino Fetal (*Biological Industries, Israel*) y se estimuló con NECA (0,1  $\mu$ M), utilizando como control células tratadas con PBS. La incubación con NECA fue por 24 hrs a 37°C con 0,5% de CO<sub>2</sub>. Luego del tiempo de incubación, se recolectó el sobrenadante y se procedió con cada uno de los experimentos que a continuación se detalla.

## **II. Evaluación de la expresión del VEGF**



### **II.1) Extracción de ARN**

La extracción se realizó con el reactivo Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*), para esto el pellet de células fue incubado con 1 ml de Trizol por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla se agregó a un tubo eppendorf con 200  $\mu$ l de cloroformo, se resuspendió por 15 segundos e incubó por 3 min a Temperatura ambiente. La muestra fue centrifugada a 12000g por 15 min a 4°C y la fase acuosa obtenida se traspasó a un nuevo tubo eppendorf al que se agregó 500  $\mu$ l de isopropanol. Luego, fue incubada a Temperatura ambiente por 10 min y centrifugada a 12000 g por 10 min a 4°C. El precipitado obtenido se lavó con 1 ml de Etanol al 75% y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se dejó secando durante 30 min a

temperatura ambiente. El precipitado de ARN obtenido se dejó hidratando en 20  $\mu$ l de agua libre de ARN/ADNasa a 60°C por 15 min.

La cuantificación del ARN se realizó mediante absorbancia (relación densidad óptica 260/280 nm) utilizando el espectrofotómetro TECAN serie 200 PRO (*Mannedorf, Suiza*).

## **II.2) Síntesis de cDNA**

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1  $\mu$ g de ARN total, 0,5 ng/ $\mu$ l de random primers los cuales fueron incubados a 65°C por 5 min y luego mantenidos a 4°C. Posteriormente a la mezcla se le agregó una solución que contiene: Buffer, agua libre de RNA/ADNasa, dNTP (10 mM), Transcriptasa Reversa (10UI/ $\mu$ l) M-MLV (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y fue incubada a 42°C por 60 min y 10 min a 70°C.

La cuantificación de cDNA se realizó por espectrofotometría (relación 260/280nm) utilizando el espectrofotómetro TECAN serie 200 PRO (*Mannedorf, Suiza*).

### II.3) Reacción en cadena de la polimerasa

Para la reacción de PCR la mezcla que se ocupó consta de: 2x Brilliant II SYBRGreen, 10  $\mu\text{M}$  de partidor *forward*, 10  $\mu\text{M}$  de partidor *reverse*. Los partidores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa están descritos en la **Tabla 5**.

Los programas utilizados para la amplificación de los distintos genes fue: activación de la polimerasa de 95°C por 10 min, denaturación de 95°C por 30 seg, alineamiento de 1 min a la  $T_M$  ( $\beta$  Actina: 57°C; VEGF: 58°C) y extensión de 30 seg a 72°C, por 40 ciclos. Los productos de PCR fueron observados mediante gel de agarosa al 2,5% en presencia de gel Red.

**Tabla 5: Partidores para determinar la expresión de VEGF y  $\beta$ -Actina.**

ARNm	Partidor Forward (5' > 3')	Partidor Reverse (5' < 3')	Tamaño Producto de PCR (pb)
VEGF-A (NM_003376.5)	5'- TCCTCACACC ATTGAAACCA -3'	5'- GATCCTGCC CTGTCTCTCT G-3'	131pb
$\beta$ - Actina (NM_001101.3)	5' ATTGCCGACA GGATGCAGA A-3'	5'GCTGATCC ACATCTGCT GGAA-3'	150 pb

#### **II.4) PCR en tiempo real**

Se realizó PCR en tiempo real utilizando el sistema Rotor Gene 6000. La reacción fue realizada en un volumen de 25  $\mu$ l usando la solución 2x Brilliant II SYBR GREEN

(*Agilent Technologies*), 10 $\mu$ M de primer específico para  $\beta$ - Actina o VEGF, agua libre de RNA/DNAasa. Los ensayos de PCR fueron realizados utilizando las siguientes temperaturas: activación de la polimerasa de 95°C por 10 min, denaturación de 95°C por 30 seg, alineamiento de 1 min a la  $T_M$  ( $\beta$  actina: 57°C; VEGF: 58°C) y extensión de 30 seg a 72°C, por 40 ciclos.

Los valores de Ct expresan una medida relativa de la concentración de un gen en la reacción de PCR. La normalización de los valores Ct con un gen housekeeping ( $\beta$ -actina) permite calcular los valores de la segunda derivada de Ct ( $\Delta\Delta$ Ct) para cada muestra. El valor  $\Delta\Delta$ Ct representa el nivel de expresión absoluto de un gen blanco en la muestra y estos valores pueden ser graficados (Livak et al., 2001).

#### **II.5) Kit BD *Cytometric Bead Array***

Las muestras para citometría se obtuvieron desde el sobrenadante de cultivos de EPC sobre placas de 6 pocillos. Se utilizó el kit BD *Cytometric Bead Array* (CBA) *Human Soluble Protein Master Buffer Kit* (*Becton Dickinson*) el cual



posee beads de captura (B8) específicos para VEGF. Estos se resuspendieron por 5 s. Luego se agregó 50 µl de la muestra a un tubo eppendorf y 25 µl de los beads de captura. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo se agregó 50 µl de reactivo de detección PE y se incubó por 2 h a 25°C. Luego, se agregó 1 ml de *buffer* de lavado y se centrifugó a 1500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 300µl de buffer de lavado. El VEGF fue detectado en las muestras dentro del rango de 10-2500 pg/ml en el citómetro de flujo BD LSR Fortessa™ X-20. La información fue analizada con el Software FCAP Array (Mikko et al., 2005).



### **III. Aislamiento de exosomas liberados por hEPC**

#### **III.1) Obtención de medio libre de exosomas**

El medio M199 con 2% de SBF se centrifugó a 100000 g por 16 h a 4°C para obtener un medio libre de exosomas o medio condicionado (Jappesen et al., 2017)

### III.2) Aislamiento de exosomas

Las EPC aisladas de sangre periférica luego de tres días de cultivo, fueron tratadas con NECA (0,1 $\mu$ M) y como control PBS en medio condicionado M199 con 2% de SBF (Jappesen et al., 2017). Se incubó por 24 h con NECA y pasado ese tiempo, se colectó el sobrenadante (Wang J et al., 2016). El medio de cultivo se diluyó con PBS filtrado y se centrifugó a 1670 rpm por 10 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se centrifugó a 3730 rpm por 20 min a 4°C. Se volvió a colectar el sobrenadante y nuevamente se centrifugó a 5000 rpm por 90 min a 4°C. El sobrenadante fue filtrado usando un filtro Amicon (100kDa) durante 20 min a 5000 rpm a 4°C. Luego el *pellet* obtenido en la base del filtro se colectó y se lavó con PBS centrifugando a 5000 rpm por 20 min a 4°C. Finalmente, el *pellet* obtenido se almacenó a -80°C.

## IV. Caracterización de exosomas

Los exosomas purificados fueron caracterizados mediante la técnica de análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA) (Salomon et al., 2014) en el laboratorio de Ciencia animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Concepción, Chillán. Para esto se utilizó el equipo NanoSight300 que posee un laser de longitud de onda de 488 nm y la cámara sCMOS. Se tomaron 3 videos por muestra cada 60s y los datos fueron analizados utilizando el software NTA analytical versión 3.2 Dev Build 3.2.16.

#### IV.I) Citometría de flujo

Para la citometría de las muestras se utilizó el *kit Exosome-Human CD63 Isolation/Detection (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)*. Se prepararon las muestras incubando 25 µg de proteína total del preparado de exosomas con 20 µl de beads/CD63 durante 18 hrs a 4°C en agitación. Pasado el tiempo se centrifugó brevemente y los exosomas se lavaron con 300 µl de *buffer* de aislamiento, se colocó la muestra en un magneto por 1 min y se eliminó el sobrenadante. Luego se resuspendieron los exosoma unidos a los beads con 300 µl de *buffer* de aislamiento (Cai et al., 2012).

Se transfirieron 2 µl de anticuerpo primario (anti CD63-APC, anti CD81-APC o anti CD34-FITC) a un tubo eppendorf y se agregaron 100 µl de exosomas unidos a los *beads*. Se incubaron durante 60 min a 25°C protegido de la luz, en agitación. Pasado el tiempo, se lavó con 300 µl de *buffer* de aislamiento, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 200 µl de *buffer* de aislamiento.

Para los análisis de citometría de flujo se utilizó el citómetro de flujo BD LSR Fortessa™ X-20. Para determinar la concentración de los *bead* por citometría de flujo se utilizan tantos eventos/análisis y se realizó el análisis estadístico de las muestras. La información obtenida fue analizada con el software FloJo 7.6 (versión 7.6, Tree Star)

## V. Ensayo de internalización de exosomas

Se usó el kit *PKH67 Fluorescent Cell Linker* (Sigma Aldrich). Se ocuparon 40 µg de exosomas y como control negativo PBS. Los exosomas y el PBS fueron diluidos en 150 µl de Diluyente C. Para el ensayo de internalización se mezcló 2 µl de la sonda PKH67 con 300 µl de Diluyente C, se resuspendió suavemente y se tomaron 150 µl para cada muestra. Estas fueron incubadas 15 min en obscuridad, pasado el tiempo se les agregó 200 µl de PBS y fueron centrifugadas usando filtros Amicon (0,5ml, 100Kda) a 2500g durante 20 min. El concentrado se resuspendió en 400 µl de PBS y se repitió la centrifugación. Finalmente el concentrado obtenido se resuspendió en 200 µl de medio de cultivo libre de exosomas (Qiu et al., 2019)

Para el ensayo de internalización de los exosomas usando células ECV304, se prepararon los vidrios agregando 40 µl de Polilisina (1mg/ml, Sciencell). Se sembraron en placa de 24 pocillos 100.000 células ECV304 por pocillo en 500 µl de medio de cultivo. Pasada las 18 h se cambió medio agregando 400 µl de medio sin exosomas con 100 µl de los exosomas marcados durante 6 y 24 h. Posteriormente se fijaron las células con 500 µl de PFA al 4% por 15 min, luego se lavaron 2 veces con 500 µl de PBS por 10 min. Finalmente, las células fijadas fueron montadas sobre 10 µl de medio de montaje Prolong Gold antifade con DAPI (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y observadas en microscopio Olympus BX43 (Paktinat et al., 2019)

## **VI. Cultivo y ensayo de viabilidad de células ECV 304**

### **a) Cultivo de ECV304**

Las células ECV304 fueron sembradas en medio de cultivo M199 (*GIBCO BRL Life Technologies, Bethesda, MD, USA*), suplementado con 20% de SBF (*Biological Industries, Israel*) y penicilina/estreptomicina (100 U/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina, *Gibco, Invitrogen*). Las células fueron cultivadas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **VI. b) Ensayo de viabilidad con células ECV304**

Se usaron 20.000 células ECV304 por pocillo en una placa de 96 pocillos con medio M199 con 20% de SBF. Luego de 24 h, se cambió el medio de cultivo y se incubaron las células con 100 µl de sobrenadante de EPC y EPC/NECA o exosomas (100µg/ml, 500µg/ml, 1000µg/ml) obtenidos de las células EPC tratadas o no con NECA. Pasada las 24 h de incubación se agregaron 38 µl de solución XTT activada (*Biotium*) y luego de 2 h se midió la absorbancia del reactivo XTT Formazan a 475 nm.

## VII.- Ensayo de formación de estructuras tipo capilares

En una placa de 96 pocillos se agregó sobre hielo, 50  $\mu$ l por pocillo de una membrana de matriz (*Matrigel; Becton Dickinson*) y se incubó a 37°C por 45 min. Pasado el tiempo se agregó 30.000 células ECV304 por pocillo en 100  $\mu$ l de distintas condiciones: medio M199 con 20% de SBF, sobrenadante de EPC y EPC/NECA (0,1  $\mu$ M), exosomas (100  $\mu$ g/ml, 600  $\mu$ g/ml) aislados de EPC y EPC/NECA. Luego de 3 y 6 h se tomaron fotos de los capilares formados y la formación de estructuras tipo capilares se analizó con el programa ImageJ (Sun et al., 2018).



## VIII.- Análisis Estadísticos

Los datos fueron procesados con el software *Graph Prism* (San Diego, CA, U.S.A). El análisis de las significancias estadísticas fueron analizadas mediante análisis de varianza (ANOVA), según corresponda. Los valores fueron entregados como promedio más error estándar. Se consideró un  $p < 0,05$  como estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### ***I.- Adenosina favorece la formación de nuevos vasos sanguíneos en EPC de 3 días***

Las EPC-3d muestran una forma redondeada sin características morfológicas sugerentes de célula endotelial, similar a lo descrito por nuestro laboratorio y otros autores (Sipos et al, 2009; Pearson 2010). Estudios de citometría de flujo demuestran que luego de tres días de cultivos existen tres subpoblaciones celulares: CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>-</sup> (0,29%); CD34<sup>+</sup>/KDR<sup>+</sup> (73,2%) y CD34<sup>-</sup>/KDR<sup>+</sup> (24,1%) (Fernandez et al., 2012).



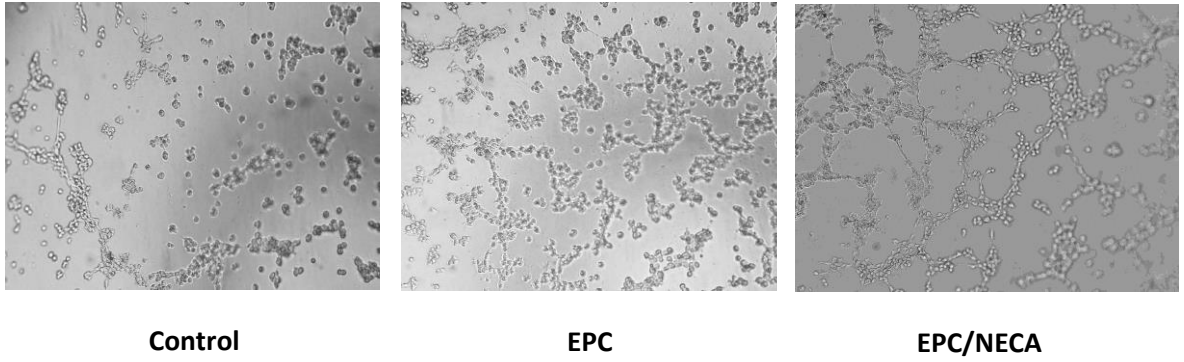
Para analizar el efecto de los productos de secreción de EPC estimuladas con NECA (Agonista general de los receptores de adenosina) sobre la angiogenesis, se realizaron ensayos en matrigel con células ECV304 y los sobrenadantes de EPC estimuladas con NECA. Para esto se recolectó el medio luego de 24h de incubación y se agregaron 100 µl de sobrenadante con una concentración de proteínas de 100 µg/ml. Los resultados demuestran que existe una mayor formación de estructuras tipo capilares en presencia de los sobrenadantes (Figura 1.a) en comparación al control (medio de cultivo para ECV304). Al cuantificar la longitud de las estructuras capilares y los puntos de ramificación, se puede apreciar un aumento en longitud de los capilares formados en presencia del sobrenadante de EPC/NECA (Figura 1.b), mientras

que no se observaron diferencias significativas al analizar los puntos de ramificación (Figura 1.c).

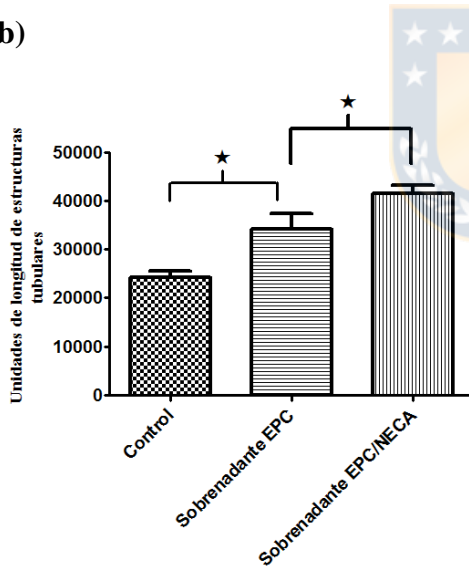




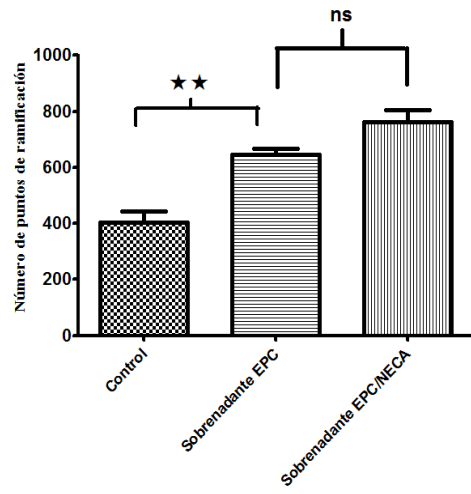
a)



b)



c)



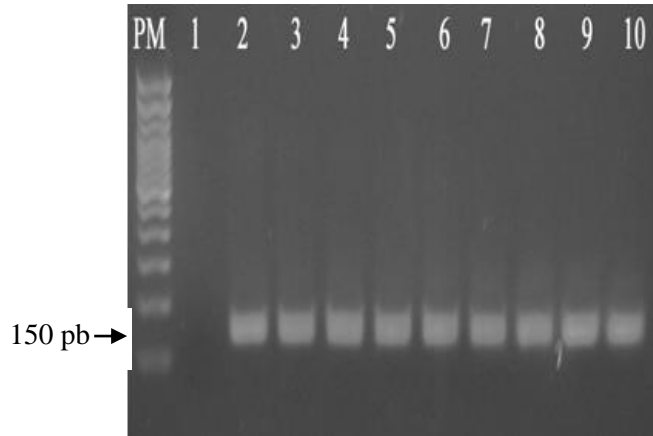
**Figura 1: Formación de estructuras capilares de ECV incubadas con el sobrenadante de EPC.** Formación de estructuras capilares in matrigel de ECV304 estimuladas con sobrenadantes de EPC y EPC/NECA fueron incubadas durante 3 h en matrigel, luego se tomaron fotografías con el microscopio Olympus BX43. En a) imágenes representativas de las estructuras capilares sin estímulo (control) y con sobrenadantes de EPC y EPC/NECA. En b) y c) se observa el gráfico del largo de las estructuras tubulares y los puntos de ramificación, respectivamente, formadas bajo condiciones control y con sobrenadantes EPC y EPC/NECA. Test ANOVA ( $p < 0,05$ ) ( $n = 3$ ).

## ***II.- Expresión y secreción de VEGF de EPC de 3 días estimulados con NECA***

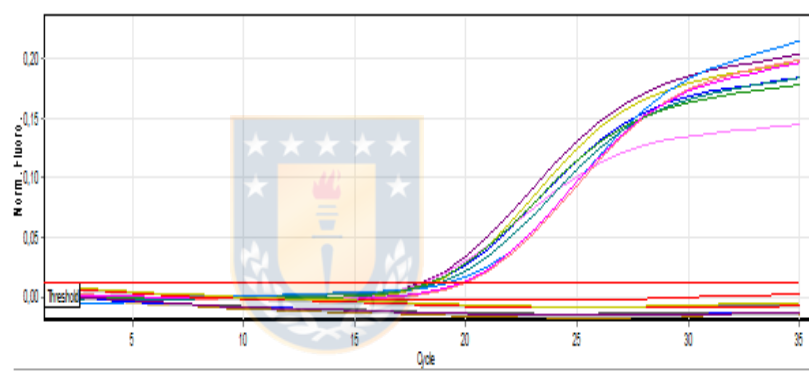
Existen publicaciones previas que indican que adenosina aumenta la expresión y liberación de VEGF desde células endoteliales, favoreciendo el proceso angiogénico (Feoktistov et al., 2003; Feoktistov et al., 2002). Así, se determinó el efecto de NECA sobre los niveles de mRNA para VEGF, para ello se aisló el mRNA usando reactivo Trizol y posteriormente se realizó la síntesis de cDNA. Como se muestra en la Figura 2, las curvas de amplificación para  $\beta$ -Actina demuestran que poseen un Ct < 21 definiendo un Threshold de 0,017. Para la amplificación de VEGF, los datos nos indican que existe amplificación de este gen en todas las muestras analizadas (Figura 3). Al realizar el análisis cuantitativo del PCR en tiempo real utilizando el método de segunda derivada de Ct ( $\Delta\Delta$ Ct), se observó una disminución en la expresión de VEGF-A en las muestras tratadas con NECA (Figura 4).

Al cuantificar los niveles de VEGF A en el sobrenadante de las EPC control y EPC estimuladas con NECA (0,1  $\mu$ M) con bead de captura B8 específico para VEGF y analizadas por citometría de flujo, se observa que el rango de concentración de proteínas presente en el sobrenadante está entre 10 y 50 pg/ml, siendo significativamente mayor en el sobrenadante de EPC tratadas con NECA (Figura 5).

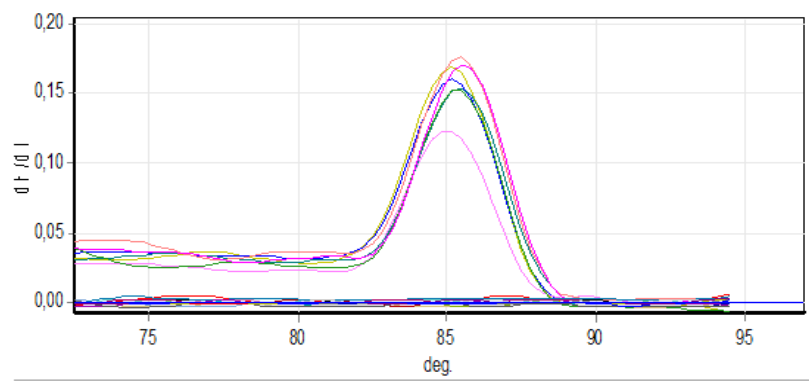
a)



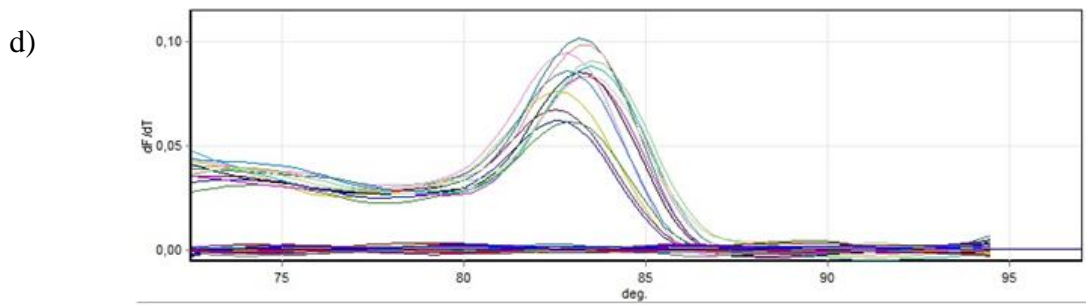
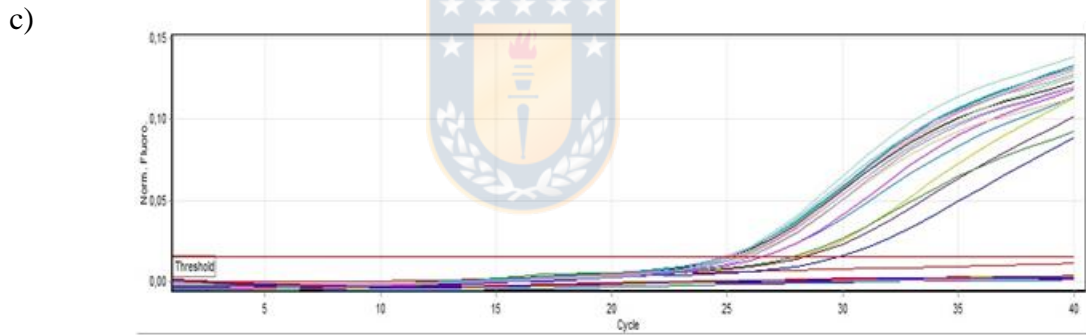
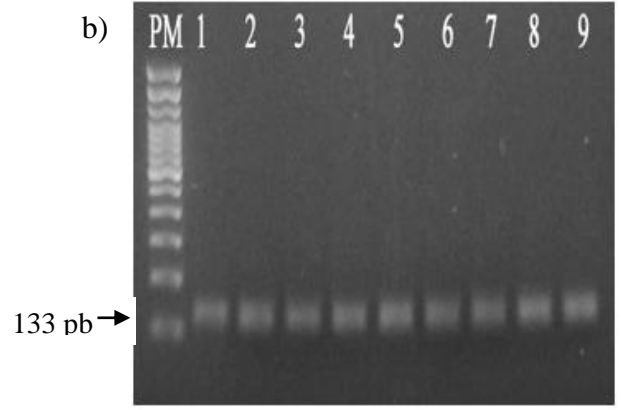
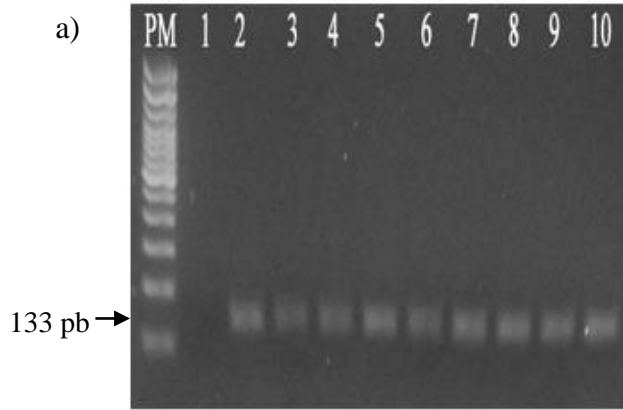
b)



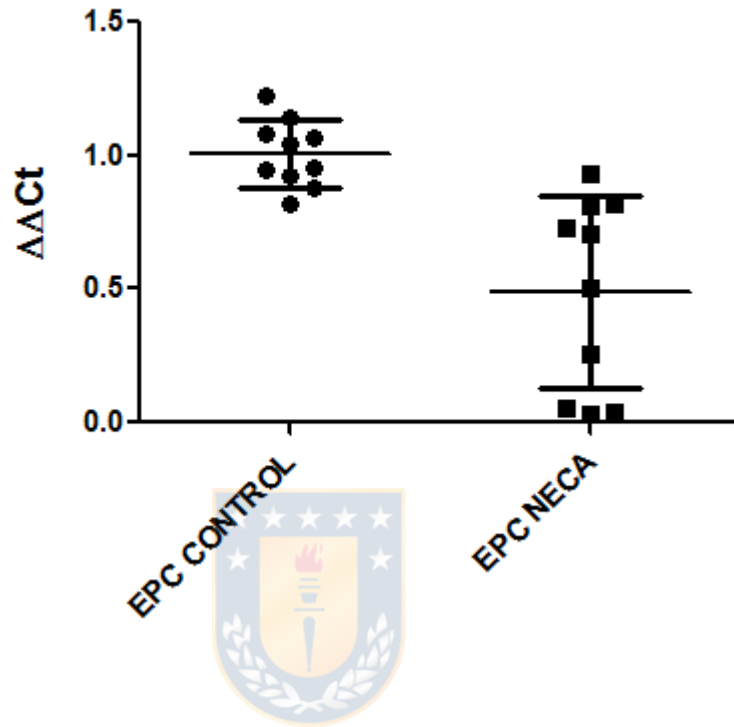
c)



**Figura 2: Análisis expresión de  $\beta$ -actina en células EPC.** El ARN total fue extraído de cultivos de EPC de 3 días, transcrito a cDNA y el PCR en tiempo real fue realizado para  $\beta$ - actina (control interno). En a) se observa los productos de PCR para  $\beta$ -actina (150pb), mientras que en b) se aprecia la curva de amplificación para  $\beta$ - actina. c) Curvas de melting para  $\beta$ -actina. Carril 1= Mix (control negativo), carril 2= cDNA (control positivo), carril 3= muestra 1 EPC, carril 4= muestra 1 EPC/NECA, carril 5= muestra 2 EPC, carril6= muestra 2 EPC/NECA, carril7= muestra3 EPC, carril8= muestra3 EPC/NECA, carril9= muestra 4 EPC, carril 10= muestra 4 EPC/NECA (n=4).

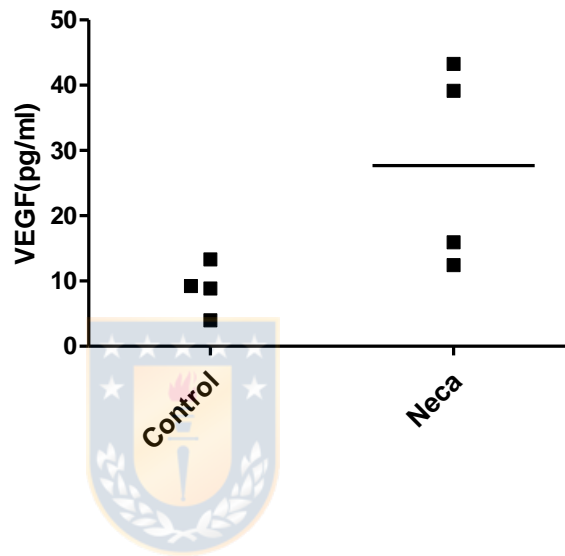


**Figura 3: Análisis de la expresión de VEGF-A en EPC y EPC/NECA.** El ARN total fue extraído de cultivos de EPC de 3 días, transcrito a cDNA y el PCR en tiempo real fue realizado para VEGF-A. En a) se observa los productos de PCR para VEGF-A (131pb); carril 1= Mix (control negativo), carril 2= cDNA (control positivo), carril 3= muestra 1 EPC, carril 4= muestra 1 EPC, carril 5= muestra 1 EPC/NECA, carril 6= muestra 1 EPC/NECA, carril 7= muestra 2 EPC, carril 8= muestra 2 EPC, carril 9= muestra 2 EPC/NECA, carril 10= muestra 2 EPC/NECA. En b) se observa los productos de PCR para VEGF-A (131pb) para las siguientes muestras: carril 1= cDNA (control positivo), carril 2= muestra 3 EPC, carril 3= muestra 3 EPC, carril 4= muestra 3 EPC/NECA, carril 5= muestra 3 EPC/NECA, carril 6= muestra 4 EPC, carril 7= muestra 4 EPC, carril 8= muestra 4 EPC/NECA, carril 9= muestra 4 EPC/NECA y en c) se aprecia la curva de amplificación para VEGF-A. d) Temperaturas de melting de VEGF-A (n=4).



**Figura 4: Análisis de la expresión de VEGF-A.** Los niveles de expresión de VEGF fueron determinados por qPCR en células EPC control y células tratadas con NECA (24h, 0,1  $\mu$ M). Resultados determinados mediante el método de segunda derivada de Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (n=5). \*p<0,05





**Figura 5: Análisis de la secreción de VEGF-A.** Los niveles de VEGF-A fueron determinados por citometría de flujo utilizando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Soluble Protein Master Buffer Kit (*Becton Dickinson*) en los sobrenadantes de EPC y células tratadas con NECA (24h, 0.1  $\mu$ M) (\*  $p < 0,05$ ) (n=4).

Estos resultados sugieren que el sobrenadante de EPC y EPC/NECA contiene factores angiogénicos que estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos, en donde VEGF-A está presente en una mayor concentración luego de estimular con NECA.

Una vez analizados estos resultados se determinó si en los sobrenadantes de EPC existe VE que estimule la formación de nuevos vasos sanguíneos.

### ***III.- Aislamiento y caracterización de los exosomas liberados al medio extracelular por las EPC de 3 días***

#### ***a) Separación de partículas extracelulares y caracterización por ensayo de seguimiento de nanopartículas (NTA)***

Para la obtención de las vesículas, se realizaron dos procedimientos: centrifugación diferenciada y ultrafiltración (Amicon). Como se muestra en la Figura 6, el proceso de centrifugación diferenciada fue evaluado mediante el ensayo de seguimiento de nanopartículas (NTA). Al analizar el tamaño de vesículas obtenidas desde cultivos con  $4 \times 10^6$  EPC y EPC más NECA, nos indica que existen distintas poblaciones de vesículas, con un tamaño entre 89 a los 220 nm de diámetro, y la concentración fue entre los  $70-175 \times 10^6$  partículas/ml (Figura 6). El análisis indica también que el tamaño de la población de partículas es diversa, por lo tanto, no hubo una buena separación

de las vesículas o bien destrucción de las vesículas durante el proceso de ultracentrifugación.

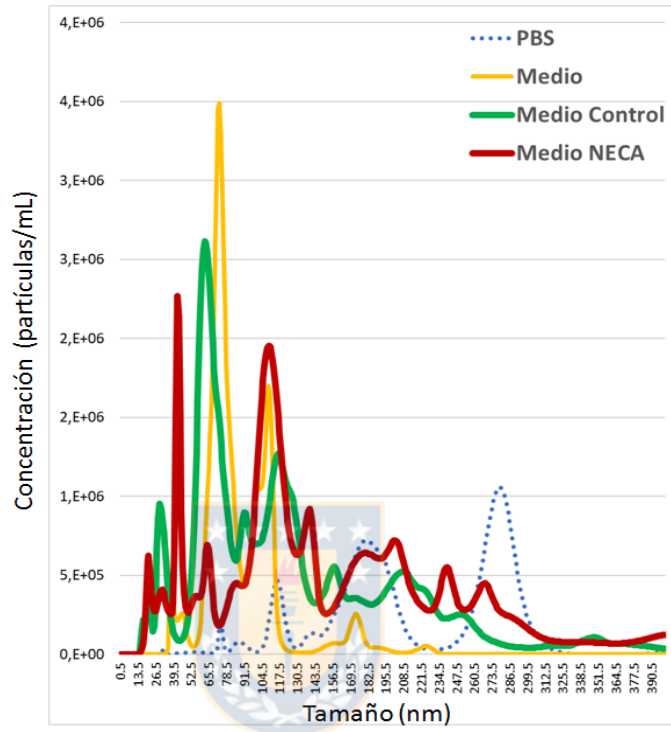
Como no fue posible obtener exosomas puros mediante el proceso de ultracentrifugación, se optó por otro método menos agresivo que consiste en Ultrafiltración con filtros Amicon®. En una primera instancia, se analizó el medio de cultivo basal depletado de exosomas que posee una concentración de vesículas de  $13,2 \times 10^7$  partículas /ml similar a lo observado con PBS usado como control negativo (Figura 7.a).

Los sobrenadante de EPC y EPC/NECA obtenidos de cultivos de  $2 \times 10^6$  células obtenido a partir de 50 ml de sangre periférica (Figura 7) indican que las vesículas de EPC control (sin NECA) poseen un tamaño promedio de 127 nm con una moda de 90 nm y una concentración de  $66,7 \times 10^7$  partículas/ml, en cambio las vesículas del sobrenadante de EPC estimuladas con NECA, tienen un tamaño promedio de 136 nm con una moda de 104 nm y una concentración de vesículas fue de  $77,3 \times 10^7$  partículas/ml (Figura 7.b).

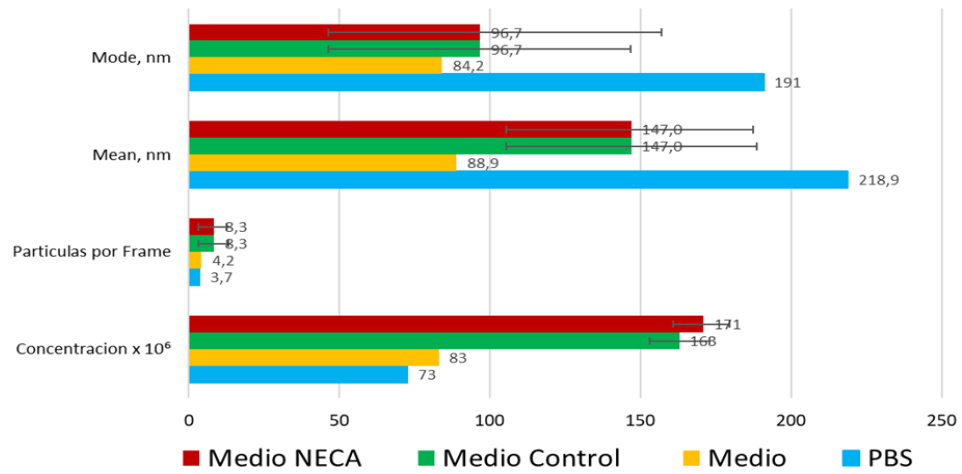
El segundo protocolo de purificación se utilizaron filtros Amicon®, a partir de 100 ml de sangre periférica, de tal forma de obtener una mayor cantidad de EPC ( $4 \times 10^6$  células iniciales). Además, se incluyó el sobrenadante de la línea celular ECV304, para relacionar el número de vesículas de una línea celular (ECV304) y un cultivo primario de EPC (Figura 8). Al analizar los datos obtenidos del NTA para las vesículas de EPC con y sin NECA, se demuestra la

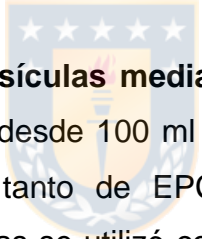
existencia de dos peak, el primero a 80,5 nm y el otro a 150 nm, mientras que el sobrenadante control además aparece un tercer peak a 170 nm. Al cuantificar el número de vesículas presentes en sobrenadantes, se demuestra que existe una mayor cantidad de vesículas en el sobrenadante de las células EPC/NECA (Figura 8.b) en comparación con las células sin estimular. Las vesículas de EPC poseen un tamaño promedio de 125 nm (moda de 106 nm) y una concentración de  $7 \times 10^{10}$  partículas/ml, mientras que las vesículas de EPC/NECA poseen un tamaño de 124 nm (moda de 83) y una cantidad de  $9,5 \times 10^{10}$  partículas/ml (Figura 8.b). Las vesículas obtenidas de la línea celular ECV304 poseen un tamaño promedio de 118 nm (moda de 95 nm) y una concentración de  $2300 \times 10^8$  partículas/ml (Figura 8.b). Es importante señalar que la gran cantidad de vesículas obtenidas desde ECV304 fue debido a que se utilizaron  $10 \times 10^6$  células, a diferencia del sobrenadante de EPC en donde se emplearon  $4 \times 10^6$  células adheridas a la placa de cultivo.

A)



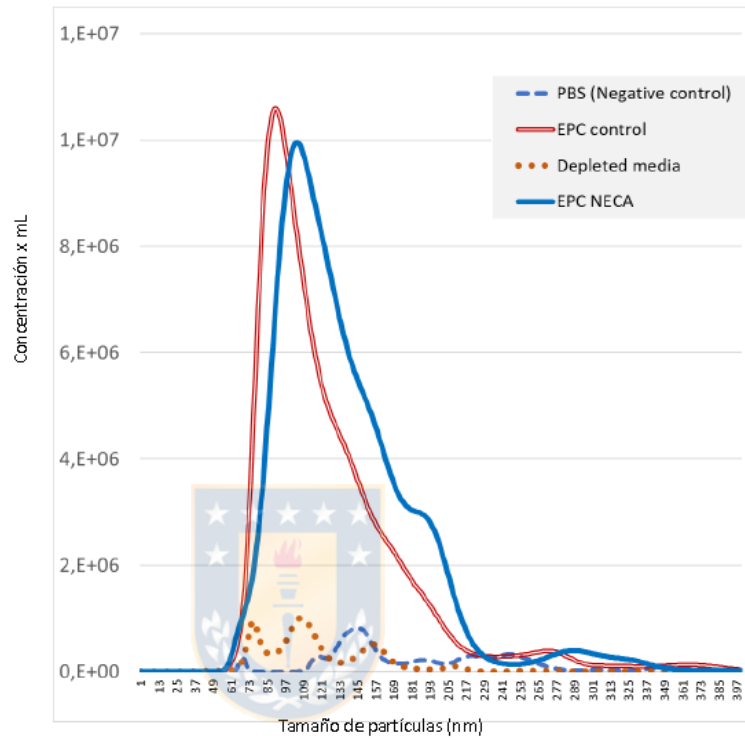
B)



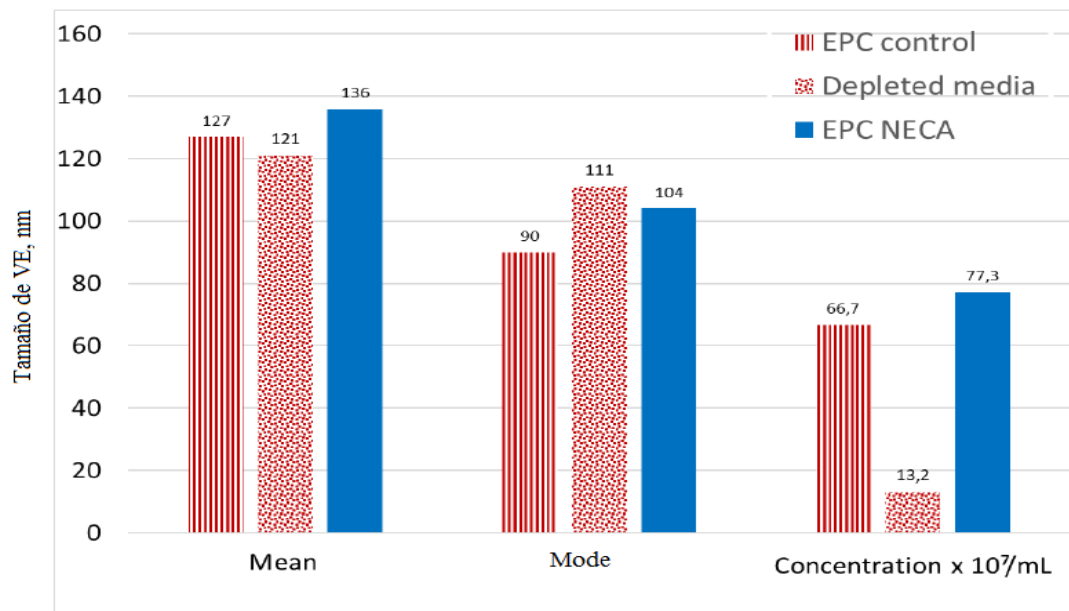


**Figura 6: Obtención de vesículas mediante ultra centrifugación.** Las EPC de 3 días fueron cultivadas desde 100 ml de sangre periférica y se obtuvo un cultivo de  $4 \times 10^6$  células tanto de EPC como de EPC/NECA. Desde el sobrenadante de estas células se utilizó centrifugación diferenciada para poder obtener VE. En A) se observa la curva de concentración (partículas/ml) vs tamaño (nm) de las vesículas aisladas del medio (medio depletado o medio de cultivo), PBS, medio control (Sobrenadante de EPC), medio NECA (Sobrenadante de EPC/NECA), B) Gráficos del Promedio, Moda y la Concentración de las vesículas en el Medio NECA, Medio Control, Medio y en PBS (n=1).

A)



B)



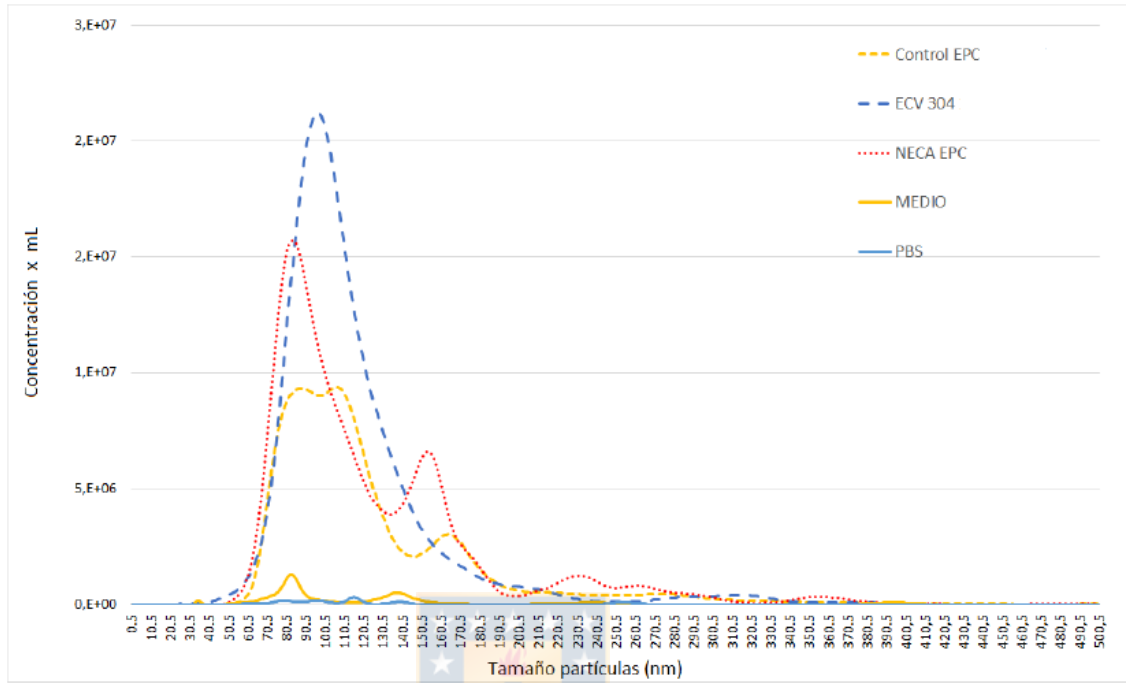
**Figura 7. Obtención de vesículas obtenidas desde EPC por ultra filtración.**

Datos de las vesículas liberadas por EPC y EPC/NECA obtenidas de cultivos de  $2 \times 10^6$  EPC obtenidos desde 50 ml de sangre periférica, en A) se observa el gráfico de concentración (partículas/ml) vs tamaño de partícula (nm), en B) los datos del promedio, moda y concentración de las vesículas obtenidas de EPC control (sobrenadante de EPC), EPC NECA (sobrenadante de NECA) y medio depletado (n=1).

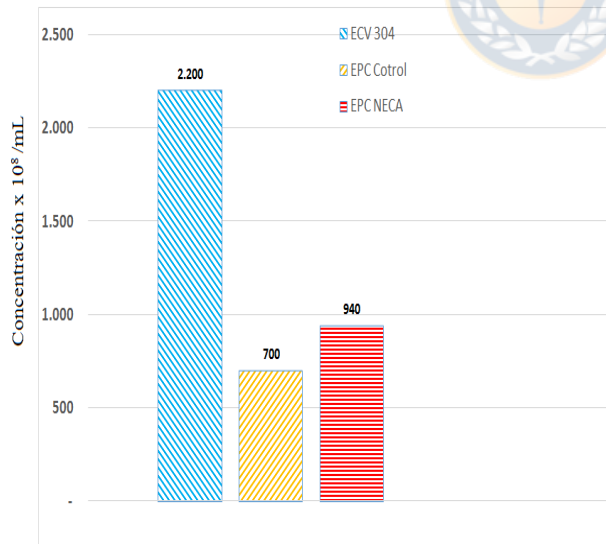




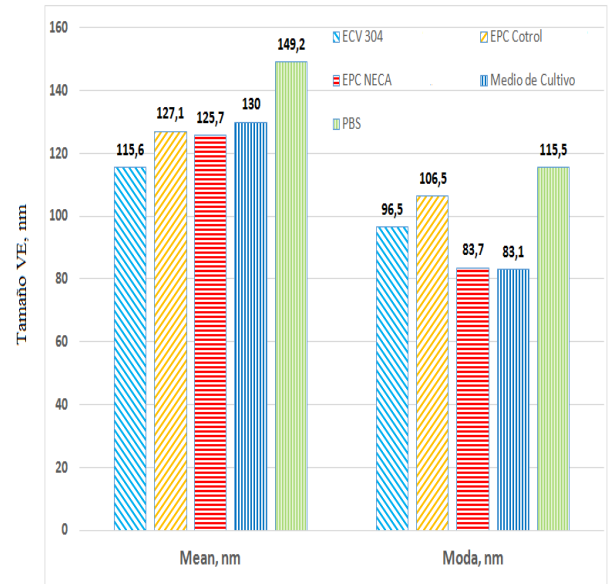
**A)**



**B)**



**C)**

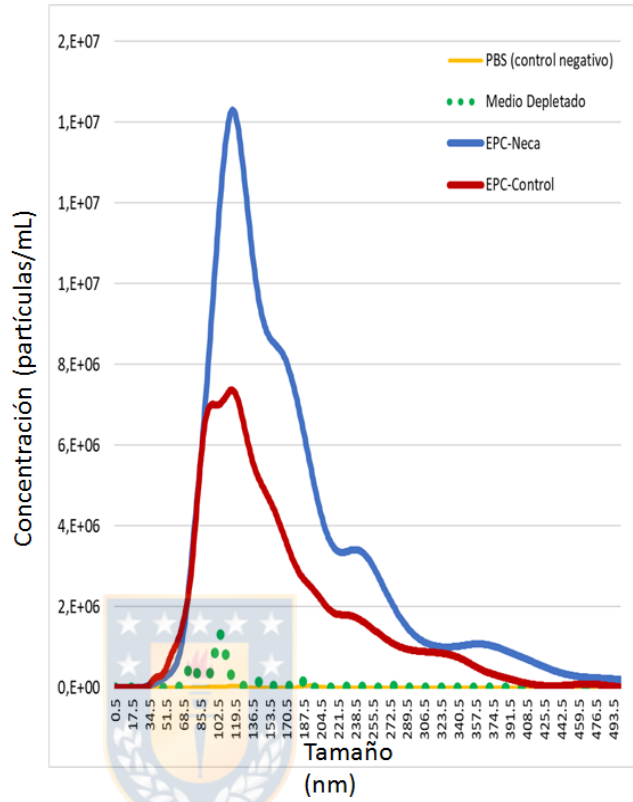


**Figura 8: Obtención de exosomas de EPC (obtenidos de cultivos con 100 ml de sangre periférica) y ECV304 mediante ultra filtración.** Se utilizó un cultivo  $4 \times 10^6$  EPC y EPC/NECA obtenidas desde 100ml de sangre periférica, el sobrenadante de EPC de 3 días fue colectado para posteriormente realizar la ultrafiltración. En A) se observa el gráfico de Concentración (partículas /ml) vs tamaño de partículas (nm) liberadas por ECV304, EPC control, EPC NECA, en B) se aprecia el gráfico de concentración de vesículas y en C) los datos del promedio y moda de vesículas obtenidas de ECV304, EPC control, EPC NECA, medio de cultivo, PBS (n=2).

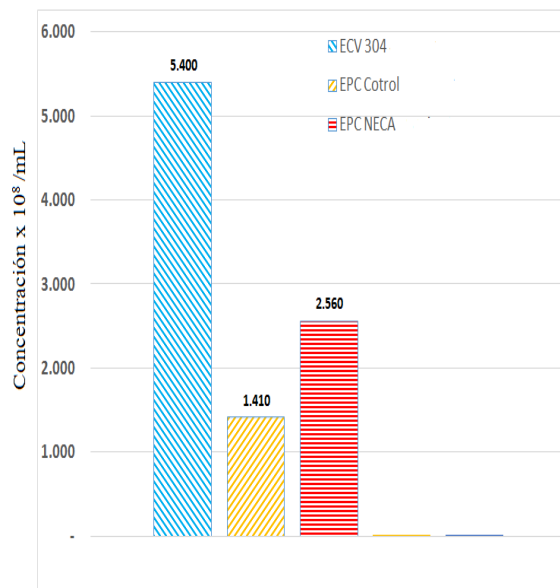
Una nueva separación de partículas extracelulares fue realizada (Figura 9) para ello se usó un cultivo celular de  $8 \times 10^6$  de EPC obtenidos de 200 ml de sangre periférica y se emplearon las ECV304 ( $20 \times 10^6$  células) como control. Como se observa en Figura 9.a el medio de cultivo basal depletado de exosomas posee una concentración de vesículas de  $1,4 \times 10^8$  partículas /ml similar a lo observado con PBS, usado como control negativo. Al analizar la gráfica de la Figura 9.a los análisis de NTA demuestran que el número de vesículas obtenidas de células EPC/NECA es significativamente mayor al número las vesículas obtenidas con EPC. La cantidad de vesículas en EPC/NECA corresponde a  $2,5 \times 10^{11}$ partículas/ml, superior al numero de vesículas obtenidas de EPC control ( $1,4 \times 10^{11}$ particulas/ml). La moda para los exosomas de EPC/NECA y EPC fue de 119 nm (Figura 9.b). Estos datos confirman que al enriquecer la separación con una mayor cantidad de sobrenadantes de EPC, es posible obtener una buena recuperación de vesículas desde Células Progenitoras Endoteliales (Tabla 6).

Como era de esperar la cantidad de vesículas presentes en el sobrenadante de ECV304 se duplicó al haber una mayor cantidad de células. En la Figura 9.b. se muestra que la concentración fue de  $5,4 \times 10^{11}$  vesículas/ml con una moda de 101 nm para las ECv-304.

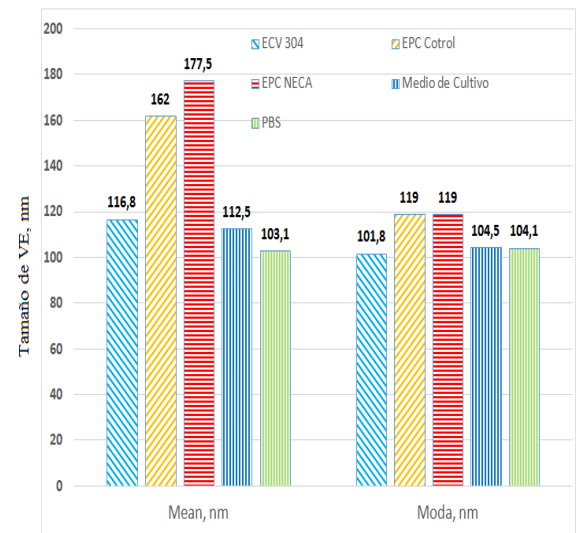
A)



B)



C)



**Figura 9: Obtención de exosomas de EPC (obtenidos de cultivos con 200 ml de sangre periférica), mediante ultra filtración:** Se utilizó un cultivo  $8 \times 10^6$  EPC y EPC/NECA obtenidas desde 200ml de sangre periférica, el sobrenadante de EPC de 3 días fue colectado para posteriormente realizar la ultrafiltración. En A) se observa el gráfico de Concentración (partículas /ml) vs tamaño de partículas (nm) liberadas por ECV304, EPC control, EPC NECA, en B) se aprecia la concentración y tamaño promedio de lasVE y en C) los datos de la moda de vesículas obtenidas de sobrenadante de ECV304, EPC control, EPC tratadas con NECA, medio de cultivo depletado y PBS (n=3).

**Tabla 6. Resumen de los datos de NTA obtenidos de VE de EPC y EPC/NECA**

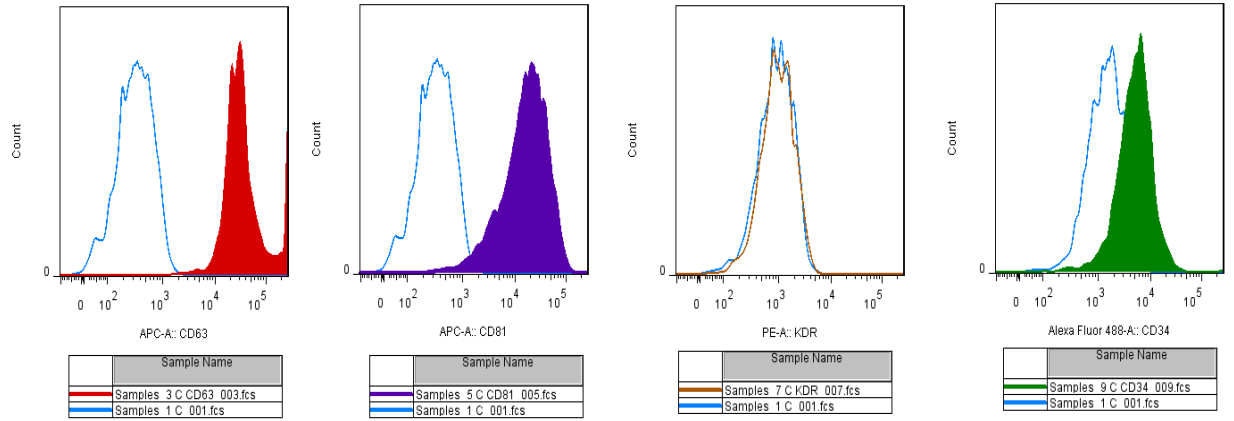
	Extracción con 50 ml de Sangre Periferica		Extracción con 100 ml de Sangre Periferica		Extracción con 200 ml de Sangre Periferica	
	EPC	EPC/NECA	EPC	EPC/NECA	EPC	EPC/NECA
<b>Número de EPC</b>	$2 \times 10^6$	$2 \times 10^6$	$4 \times 10^6$	$4 \times 10^6$	$8 \times 10^6$	$8 \times 10^6$
<b>Moda para el tamaño de VE (nm)</b>	90	104	106	83	119	119
<b>Concentración (partículas/ml)</b>	$66 \times 10^7$	$77 \times 10^7$	$7 \times 10^{10}$	$9,4 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{11}$

III. b) Caracterización de células progenitoras endoteliales por citometría de flujo.

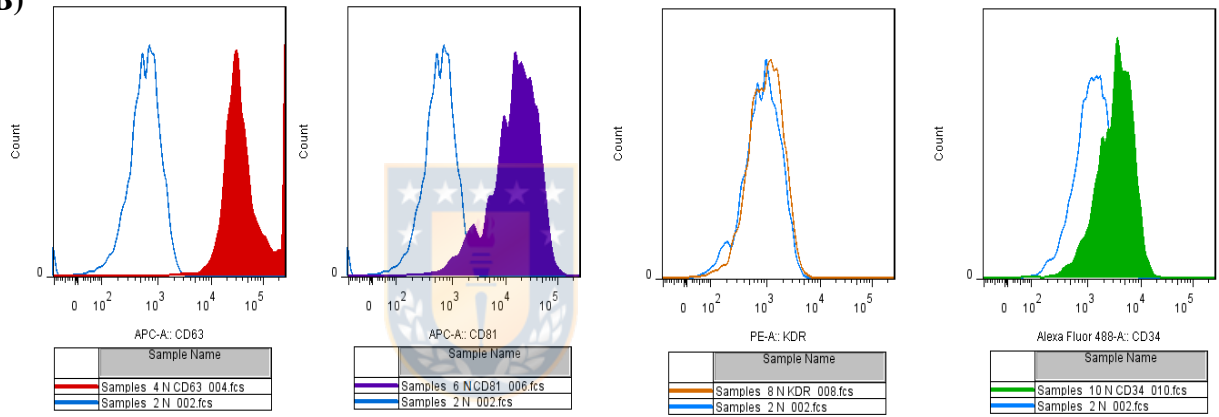
Para evaluar la expresión de marcadores de superficie en los exosomas, primero se determinó su presencia en la superficie de las EPC, esto es debido a que estas VE comparten marcadores con las células que los producen. Se analizaron los marcadores de exosomas CD63, CD81, además de los marcadores endoteliales CD34+ y KDR+ (VEGFR2), tanto en EPC control como en células tratadas con NECA. Además, se analizaron las poblaciones de EPC (Figura 10.a), y la expresión de CD63, CD81, CD34 y KDR (Figura 10). Se observa que las EPC son positivas para CD63, CD81 y débilmente positivas para CD34 y KDR. No se observaron cambios en la expresión de estos marcadores cuando las células fueron tratadas con NECA.

Las figuras 11 y 12 muestran el porcentaje de células positivas para CD34, CD63 y CD81, para las EPC sin tratar el 18,6% de la población total de células es positiva para CD34+, un 0,622% para KDR, un 53% son positivas para CD63 y 52% son para CD81. En cambio, al tratar las células con NECA la población de células EPC positivas para CD34+ (27%), KDR+ (0,785%), CD63+ (50%) y para CD81+ (55%) se observa una tendencia a aumentar la población de EPC positivas para estos marcadores de superficie. Una vez caracterizadas las EPC se procedió a realizar citometría de flujo de las vesículas aisladas mediante beads con un anticuerpo antiCD63.

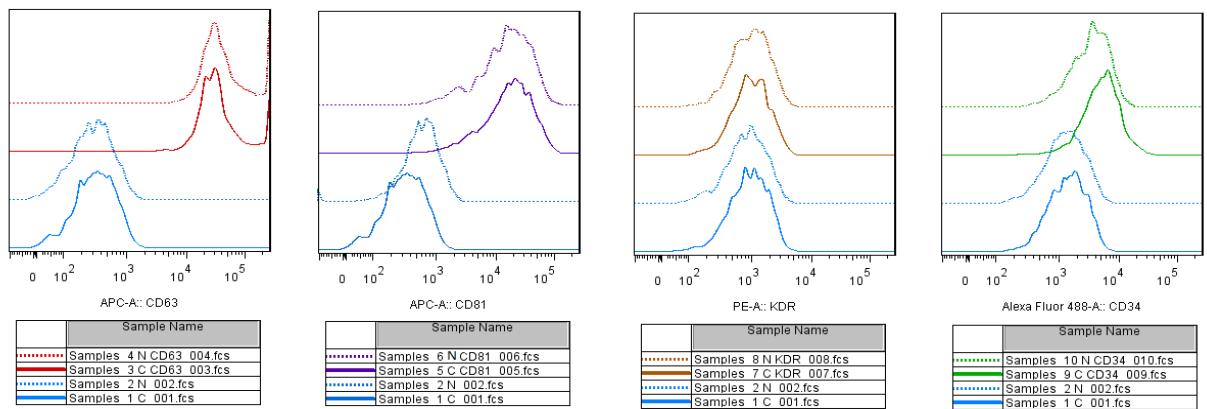
**A)**



**B)**



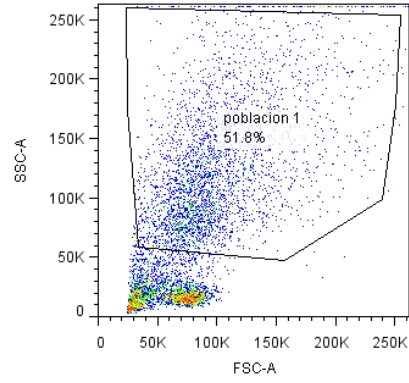
**C)**





**Figura 10: Caracterización fenotípica de las células progenitoras endoteliales.** Las EPC fueron cultivadas por 3 días, recuperadas con tripsina y analizadas por citometría de flujo. En a) EPC y en b) EPC tratadas con NECA. Las células fueron caracterizadas por citometría de flujo empleando los marcadores CD34, KDR, CD63 y CD81. En c) se observa el resumen del análisis de las poblaciones celulares EPC y EPC/NECA para los marcadores CD34, KDR, CD63 y CD81.

A)



B)

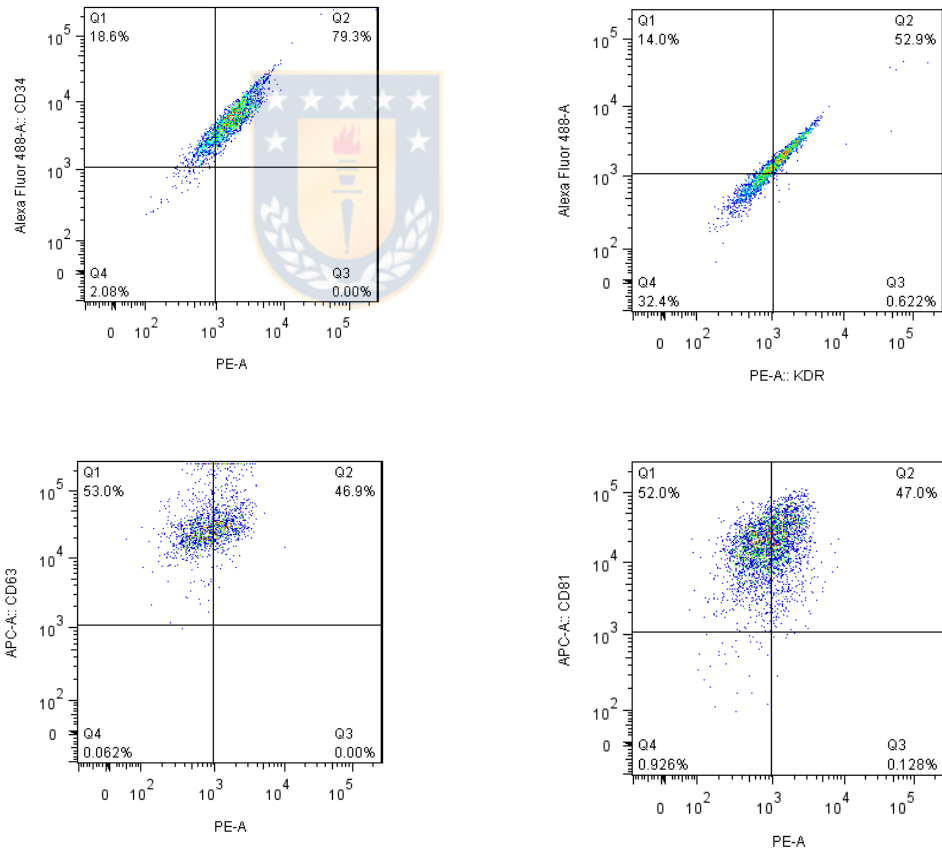
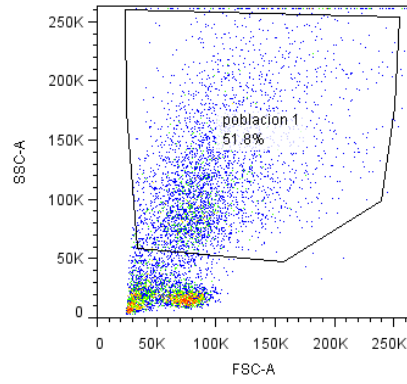


Figura 11: **Cuantificación de la expresión de CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales.** Las células progenitoras fueron cultivadas por 3 días, despegadas con tripsina y analizadas por citometria de flujo. En a) se observa la separación de la población celular (EPC) por granularidad y tamaño y en b) se aprecia la identificación de las proteínas CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales de 3 días.

**A)**



**B)**

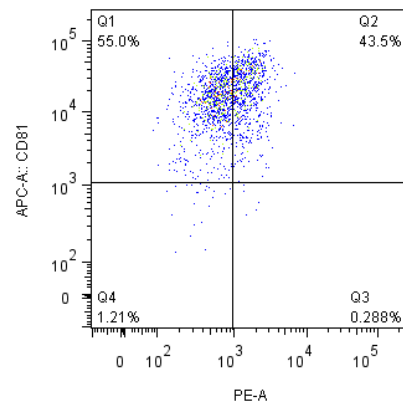
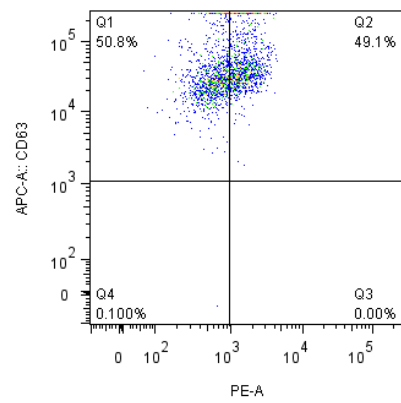
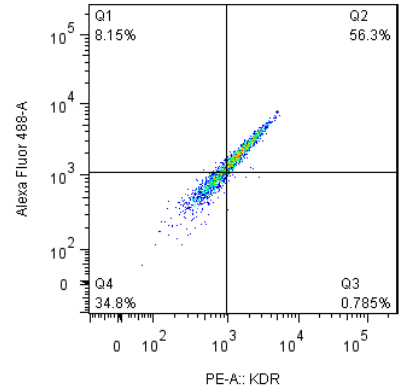
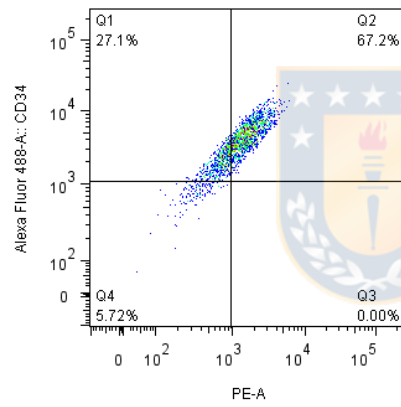


Figura 12: **Cuantificación de la expresión de CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales tratadas con NECA.** Las células progenitoras fueron cultivadas por 3 días, recuperadas con tripsina y analizadas por citometría de flujo. En a) se observa la separación de la población celular (EPC) por granularidad y tamaño y en b) se aprecia la identificación de las proteínas CD34, KDR, CD63 y CD81 en células progenitoras endoteliales estimuladas con NECA.

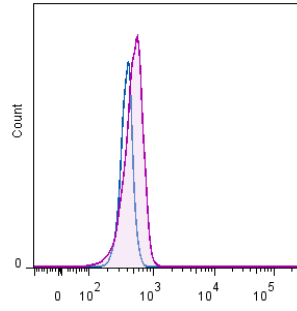
### *III.c) Citometría de flujo de las vesículas proveniente de EPC y EPC tratadas con NECA*

La estandarización de la citometría de flujo se realizó a partir de las vesículas de ECV304 con distinto número de células. Las vesículas aisladas de ECV304 desde sobrenadante de un cultivo celular con  $10 \times 10^6$  células poseen expresión positiva para CD34 (0,187%), CD63 (97,7%) y CD81 (95,7%) (Figura 13). Al comparar estos resultados con las vesículas aisladas desde sobrenadante de  $20 \times 10^6$  células, se puede apreciar una tendencia al aumento en la expresión de CD34 (2,02%) pero sin cambios en los niveles de CD63 y CD81. Una vez establecidos los parámetros para el análisis de la citometría, se realizó la caracterización de los exosomas de EPC a las muestras cuyo NTA dio mejores resultados que fueron las muestras con cultivos de EPC de 100 y 200 ml de sangre periférica. Los análisis con vesículas aisladas de cultivos de EPC desde 100 ml de sangre periférica demuestran que expresan CD34+, CD63+ y CD81+ (Figura 14.a). Al comparar los resultados de las vesículas de EPC obtenidas desde 200 ml de sangre periférica (Figura 14.b), se puede apreciar una mayor tendencia de VE positivas para CD81 (94,4%) y CD63 (92,9%) en comparación con las vesículas aisladas desde cultivos de EPC de 100 ml de sangre periférica CD63 (1,69%) y CD81 (0,160%). Además, existe una mayor tendencia a obtener VE CD34+ con 200 ml de sangre periférica. Al realizar la caracterización por citometría de flujo de las vesículas obtenidas de EPC estimuladas con NECA existe una variación en la expresión de CD63 y CD81 tanto en vesículas provenientes de un cultivo de 100 y 200 ml de sangre

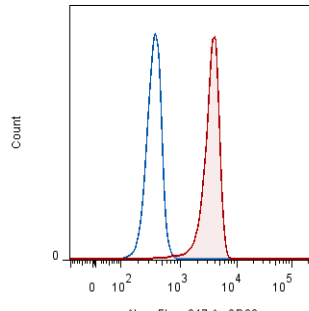
periférica (Figura 15) siendo CD63 y CD81 aparentemente las más variables en las VE aisladas de cultivos de 200ml se sangre periférica. Además, existe una tendencia en la disminución en la expresión de CD34 en las vesículas de EPC tratadas con NECA tanto en 100 y 200 ml de sangre periférica al comparar con las VE aisladas de EPC sin tratar (Figura 14, 15).



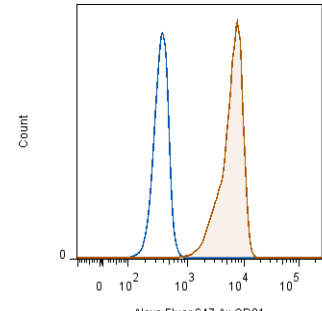
**A)**



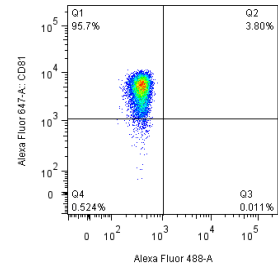
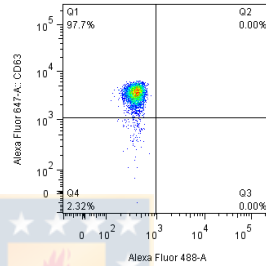
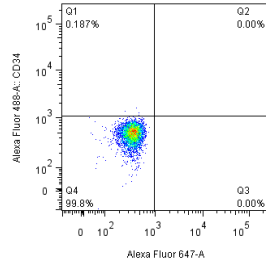
Sample Name	
	ECV 304 2 Beads CD34 002.fcs
	ECV 304 1 Beads 001.fcs



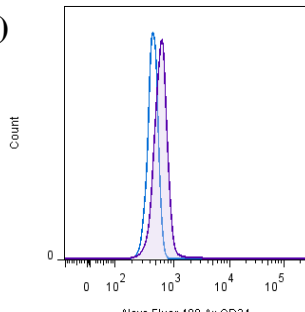
Sample Name	
	ECV 304 4 Beads CD63 004.fcs
	ECV 304 1 Beads 001.fcs



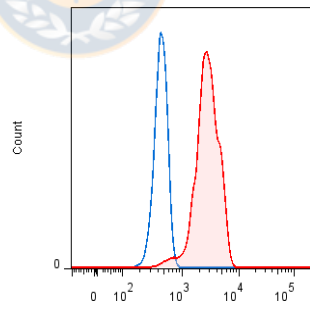
Sample Name	
	ECV 304 3 Beads CD81 003.fcs
	ECV 304 1 Beads 001.fcs



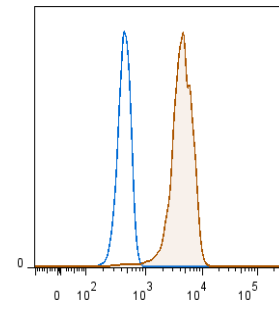
**B)**



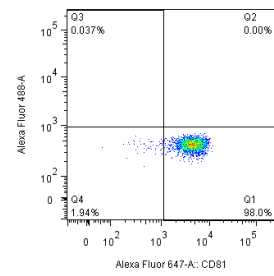
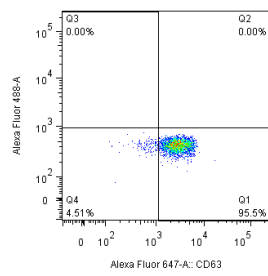
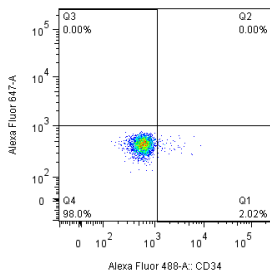
Sample Name	
	20190131 ECV 304 2 CD34 00...
	20190131 ECV 304 1 Control ...



Sample Name	
	20190131 ECV 304 3 CD63 00...
	20190131 ECV 304 1 Control ...



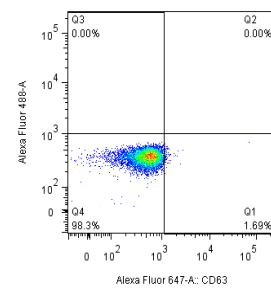
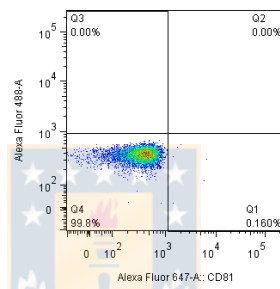
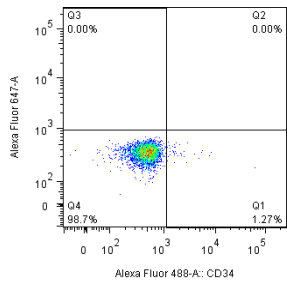
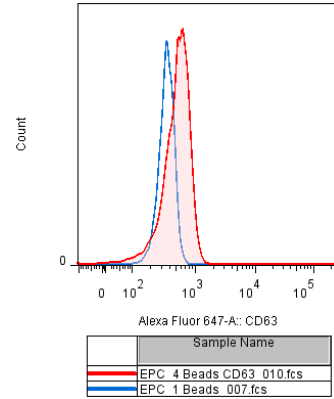
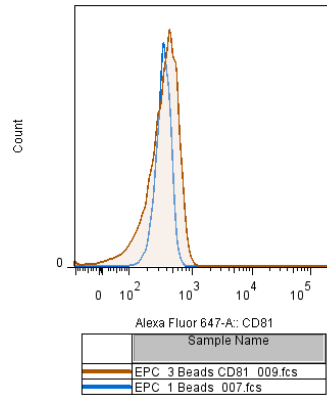
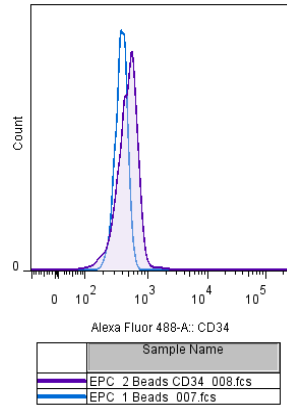
Sample Name	
	20190131 ECV 304 4 CD81 00...
	20190131 ECV 304 1 Control ...



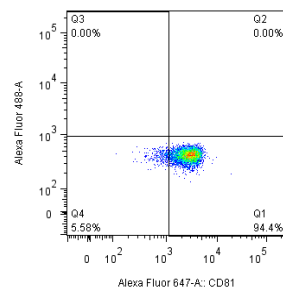
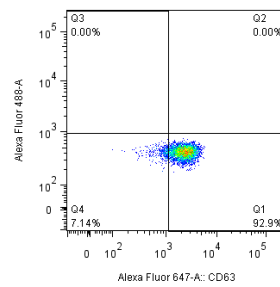
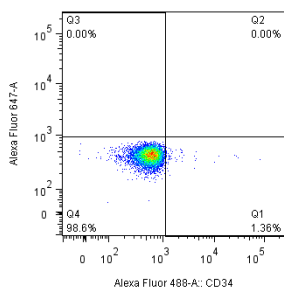
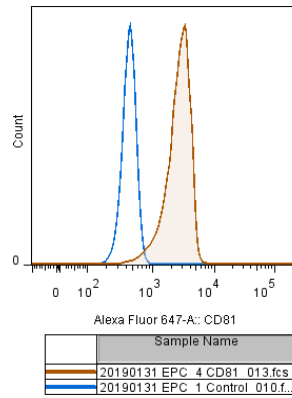
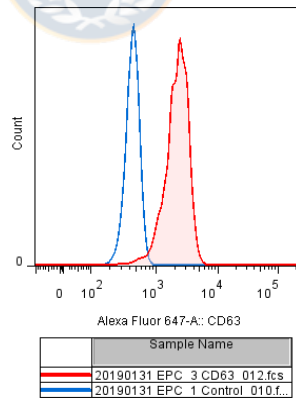
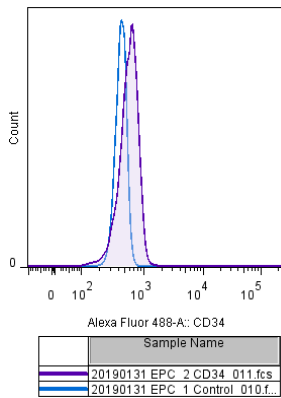


**Figura 13: Expresión de marcadores en microvesículas aisladas de sobrenadante de ECV304.** Las VE de ECV 304 fueron aisladas por ultrafiltración, incubadas con el kit Exosome-Human CD63 Isolation/Detection (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y marcadas con anticuerpo anti CD34, KDR, CD63 y CD81. En a) se observa la cantidad de VE aisladas desde  $10 \times 10^6$  células ECV304. En b) se aprecia la cantidad de VE aisladas desde  $20 \times 10^6$  células ECV304.

**A)**

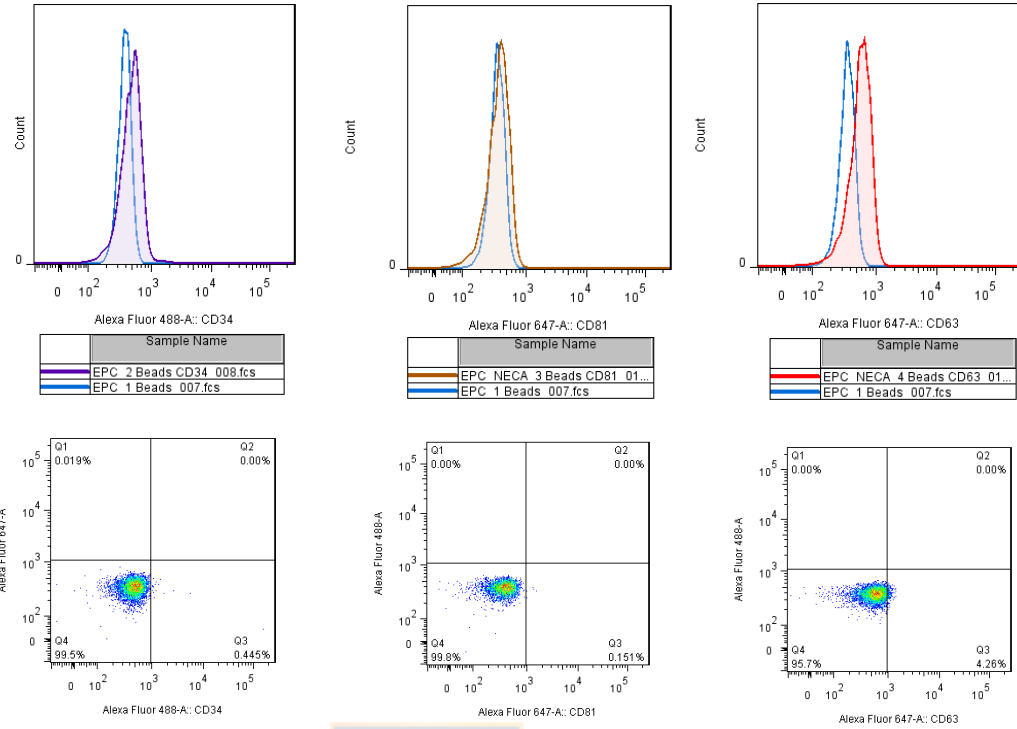


**B)**

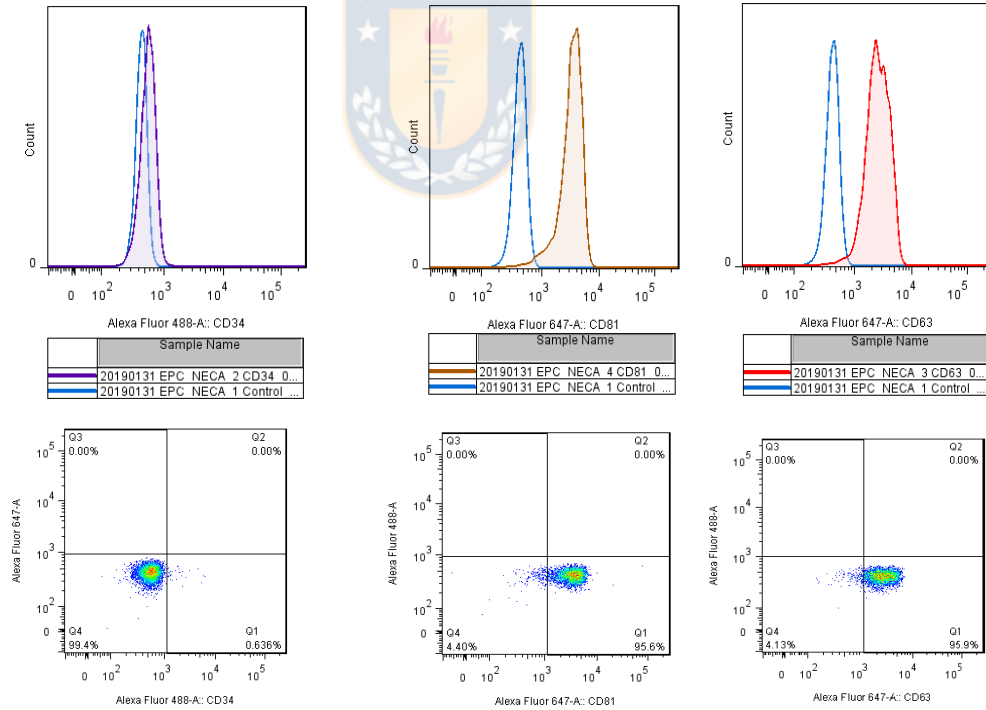


**Figura 14: Caracterización de exosomas proveniente de sobrenadante de EPC.** Las VE de EPC de 3 días fueron aisladas por ultrafiltración, incubadas con el kit Exosome-Human CD63 Isolation/Detection (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y marcadas con anticuerpo anti CD34, CD63 y CD81. En a) se observa la cantidad de VE aisladas desde  $4 \times 10^6$  células EPC obtenidas de 100 ml de sangre periférica. En b) se aprecia la cantidad de VE aisladas desde  $8 \times 10^6$  células EPC obtenidas de 200 ml de sangre periférica.

**A)**



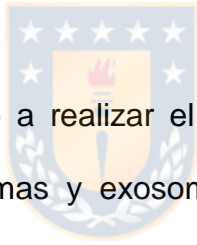
**B)**



**Figura 15: Caracterización de exosomas proveniente de sobrenadante de EPC tratadas con NECA.** Las VE de EPC/NECA de 3 días fueron aisladas por ultrafiltración, incubadas con el kit Exosome-Human CD63 Isolation/Detection (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*) y marcadas con anticuerpo anti CD34, CD63 y CD81. En a) se observa la cantidad de VE aisladas desde  $4 \times 10^6$  células EPC/NECA obtenidas de 100 ml de sangre periférica. En b) se aprecia la cantidad de VE aisladas desde  $8 \times 10^6$  células EPC/NECA obtenidas de 200 ml de sangre periférica.

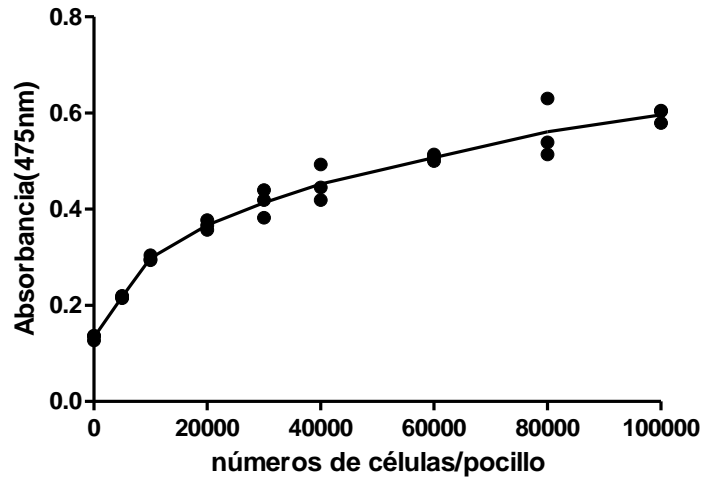
#### ***IV) Cuantificación del efecto de los exosomas liberados sobre la viabilidad de células ECV304.***

Para evaluar el efecto biológico de las exosomas producidos por las EPC, se determinó el efecto de distintas concentraciones de exosomas sobre la viabilidad de las ECV-304. Para ello se realizó una curva de crecimiento celular con el fin de determinar la cantidad de células apropiada para realiza el ensayo de viabilidad celular. Como se muestra en la Figura 21, existe un aumento proporcional en la absorbancia al aumentar el número de células. A partir de estos datos se determinó usar 30000 células/pocillo, ya que se observó una relación lineal.

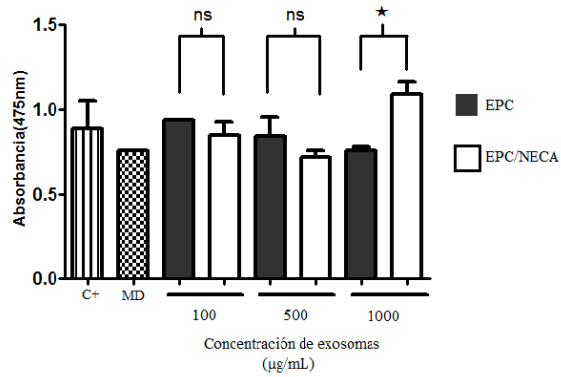


Posteriormente, se procedió a realizar el ensayo de viabilidad celular con el medio depletado de exosomas y exosomas provenientes de EPC control y estimuladas con NECA. Los resultados indican que luego de 24 horas de incubación existe una disminución del 20% en la viabilidad en células ECV304 cuando fueron tratadas con el medio depletado de exosomas. En las células incubadas con 100 o 500  $\mu\text{g/ml}$  de exosomas de EPC, no existe un aumento en la cantidad de las células, ECV304. Al realizar la incubación con 1000  $\mu\text{g/ml}$  de exosomas de EPC, no existen cambios en el número de células ECV304. Pero, cuando estas células fueron incubadas con VE provenientes de EPC tratadas con NECA se observa un aumento estadísticamente significativa de 38% la población de ECV304 ( $p < 0,05$ ) (Figura 16).

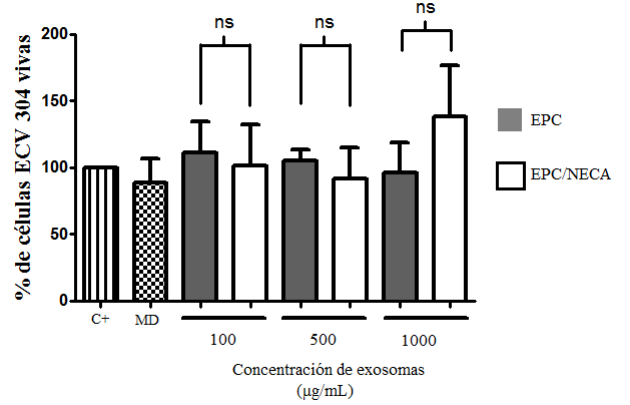
A)



B)



C)



**Figura 16: Efecto de los exosomas sobre la viabilidad de células ECV-304.**

En A) se observa la curva de proliferación celular para ECV304. La Figura B) muestra la absorbancia de reactivo XTT a 475 nm para las distintas concentraciones de exosomas de EPC y EPC/NECA. En C) se observa el porcentaje de células ECV304 vivas en relación al control sin tratar y tratadas con diferentes concentraciones de microvesículas. Los datos analizados corresponde a 2 cultivos realizados en duplicado (test anova, valores  $p < 0,05$ ). C+ = control positivo, MD = medio depletado de exosomas, ns = no significativo.



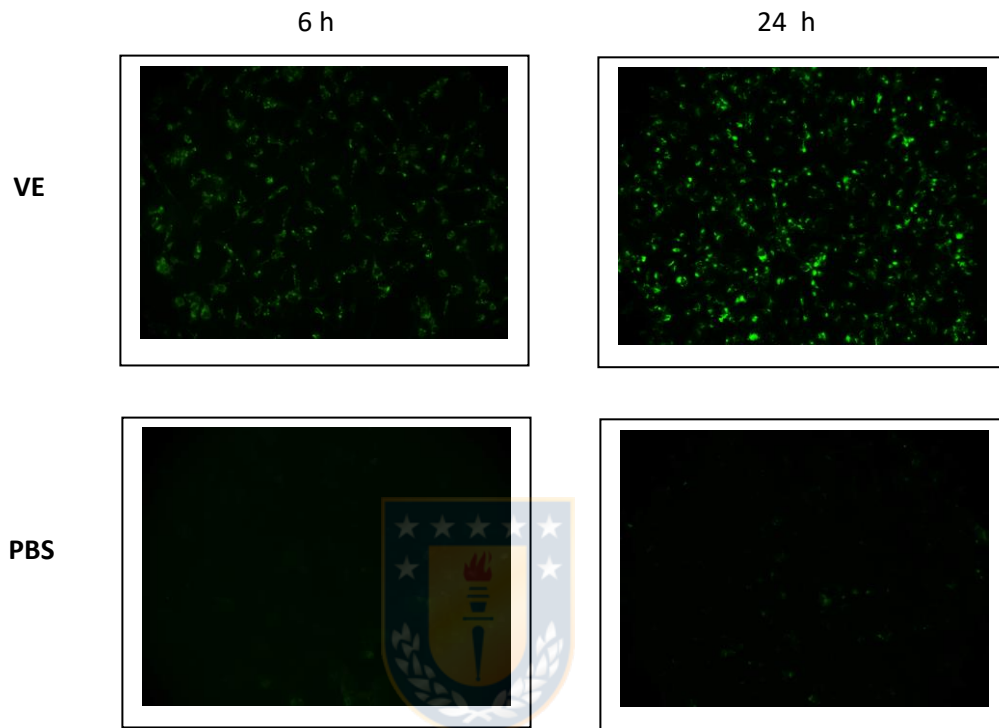
### ***V) Ensayo de internalización de exosomas***

Se realizaron ensayos de internalización de exosomas para confirmar si existe incorporación de las vesículas en la célula. Para realizar la estandarización, se ocupó vesículas provenientes de ECV304, para ello las vesículas (40 µg) fueron incubadas con la sonda fluorescente PKH67 por 15 min y luego lavadas con PBS. Como control negativo se usó PBS. Los resultados mostrados en la figura 17.a demuestran que luego de 6 h de incubación con las vesículas marcadas, se aprecia incorporación de estas a las células ECV304. Mientras el control negativo no existe señal de fluorescente (Figura 17.a) por el contrario, luego de 24 horas de incubación, se observa un aumento significativo en señal fluorescente en las células ECV304, lo que demuestra la internalización de las vesículas, pero el control negativo con PBS también posee señal fluorescente (Figura 17.B). A partir de estos resultados se usará la incubación con 6 h en los ensayos de internalización de las vesículas de EPC y EPC/NECA en las células ECV304.

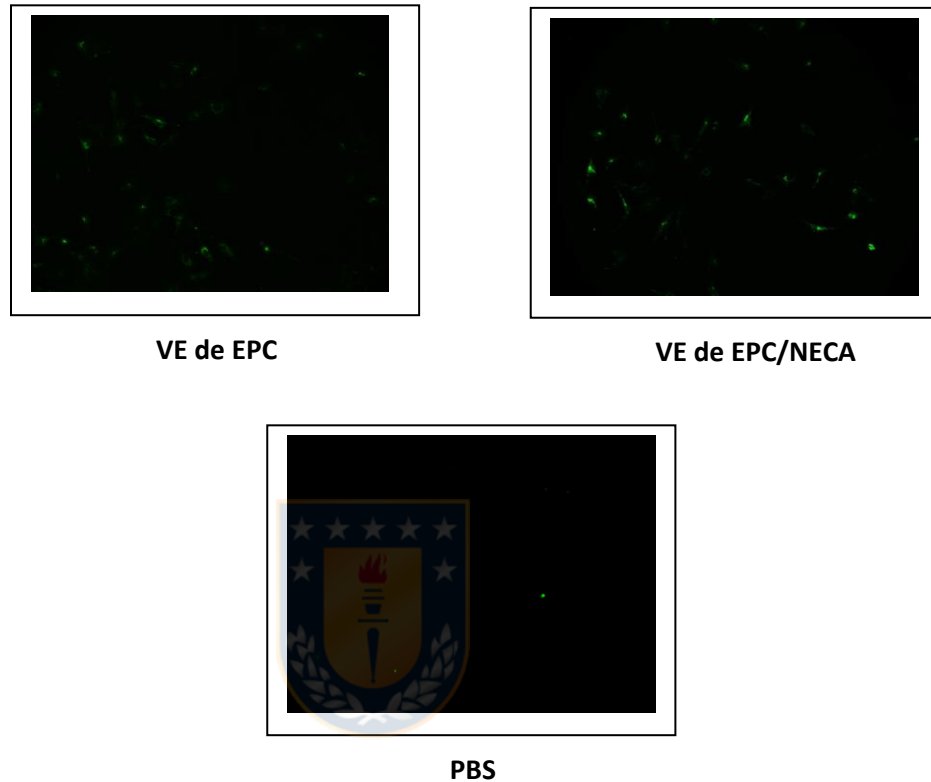
Luego de definir los parámetros de trabajo con la sonda PKH67, se realizó la incubación de las vesículas provenientes de EPC control y estimuladas con NECA. Para esto se ocupó 40 µg de vesículas de cada condición, las que fueron marcadas con PKH67. La incubación de ECV304 con las vesículas marcadas induce un aumento en la internalización de ambas vesículas en las células ECV304 (Figura 18). El control negativo con PBS no emitió señal. No se

observaron diferencias en la internalización de vesículas marcadas en aquellas provenientes de EPC control v/s estimuladas con NECA.





**Figura 17: Incorporación de VE en células ECV304.** Las VE de ECV 304 fueron marcadas con la sonda PKH67 por 15 min, como control negativo se usó PBS. Luego de la internalización de las VE marcadas a las células ECV304 se obtuvieron fotos por microscopía de fluorescencia luego de 6 h y 24 h de incubación (n=3).



**Figura 18: Internalización de VE aisladas desde EPC y EPC tratadas con NECA en células ECV304.** Las VE de EPC y EPC/NECA fueron marcadas con la sonda PKH67 por 15 min y como control negativo se usó PBS. Luego de la internalización de las VE marcadas a las células ECV304 por 6 h se obtuvieron fotos de la señal fluorescente. Se observa la imagen de fluorescencia de ECV 304 tratadas con VE de EPC y VE de EPC EPC estimuladas con NECA (n= 3).

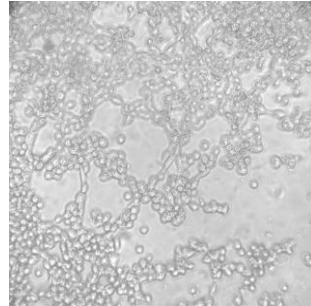
## ***VI) Formación de estructuras tipo capilares***

Para estudiar la formación de estructuras capilares se ocuparon células ECV304 que se han reportado que son capaces de formar capilares similares a los que forma una célula endotelial.

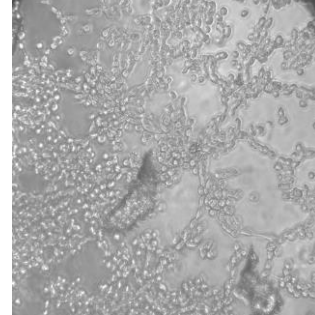
Se utilizaron vesículas de ECV304, EPC control y EPC estimuladas con NECA por 3 y 6 h. Luego de 3 h de incubación, con 100 µg/ml de VE se puede observar que los capilares son gruesos y alargados, además se aprecia una mayor cantidad de capilares en las células tratadas con VE de EPC/NECA en comparación con VE de EPC sin tratar (Figura 19). A las 6 h de incubación existe una mayor formación de capilares, en comparación con las ECV304 tratadas por 3 h (Figura 19 y 20). Además, se aprecia formación de vasos en el control con el medio depletado (MD).

Al analizar las fotografías con el programa ImageJ, se determina cuantitativamente la formación de capilares. Existen diferencias significativas ( $p = 0,0126$ ) sólo en el largo de las estructuras tubulares siendo la incubación con 3 h la que generó una mayor diferencia con VE de EPC/NECA (Figura 19). Los puntos de ramificación de los capilares no presentan diferencias significativas a las 3 h de incubación.

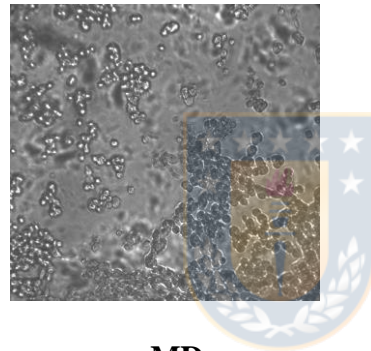
A)



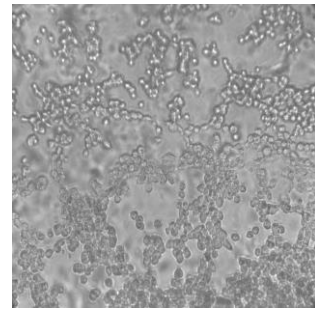
VE de EPC



VE de EPC/NECA

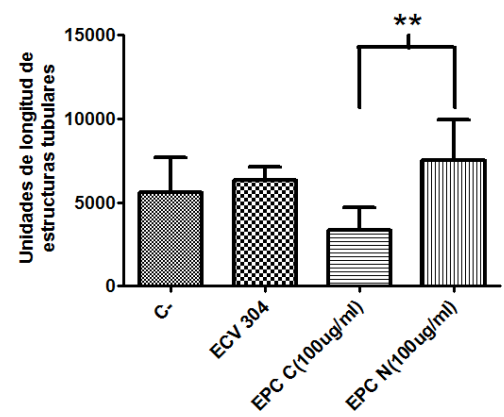
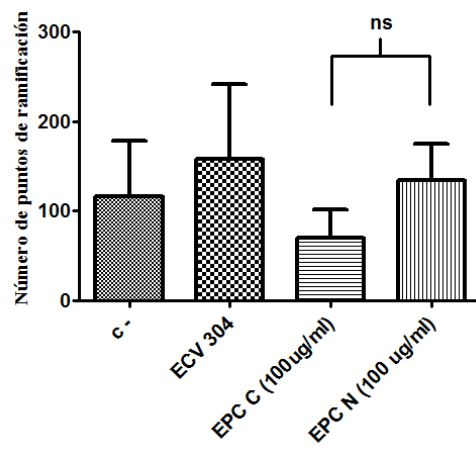


MD



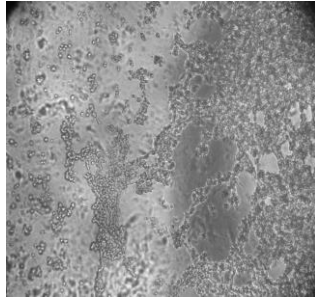
VE de ECV304

B)

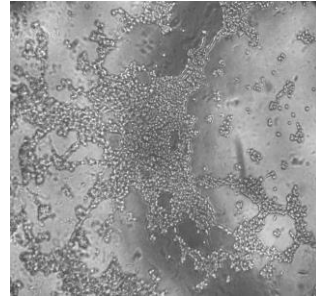


**Figura 19: Formación de estructuras tipo capilares en ECV304 tratadas con microvesículas de EPC durante 3 horas.** Las células ECV 304 se incubaron por 3 h con 100µg/ml de VE de EPC y EPC/NECA. Luego del periodo de incubación se tomaron fotografías de campo claro con el micropio Olympus BX43. En **A)** se observan los capilares formados por las células ECV304 que han sido incubadas con VE provenientes de EPC (EPC C), EPC+ NECA (EPC N), ECV304 y medio depletado (C-). En **B)** se muestra los análisis de los números de puntos de ramificación y las unidades de longitud de las estructuras tubulares formadas. \*  $p < 0,05$  y ns = no significativo (n=3).

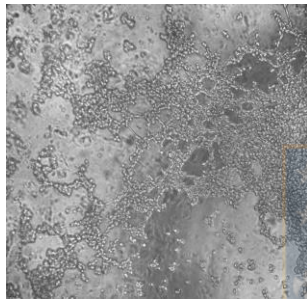
A)



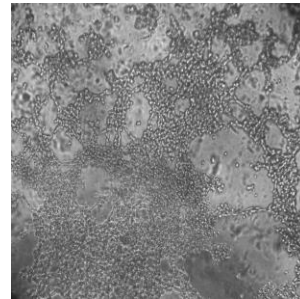
VE de EPC



VE de EPC/NECA



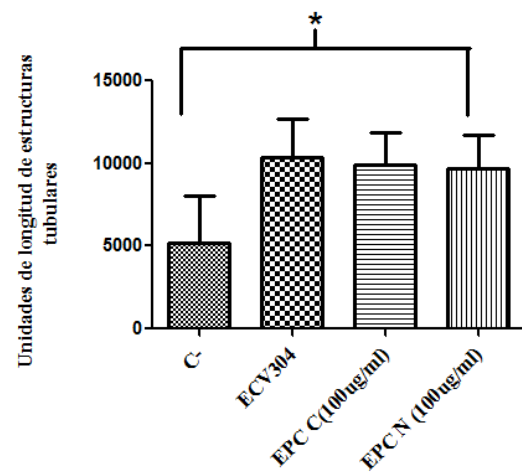
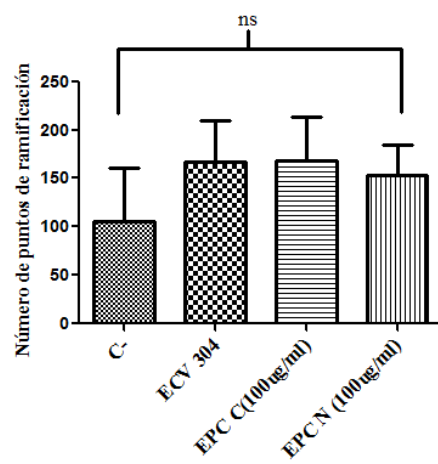
MD



VE de ECV304



B)



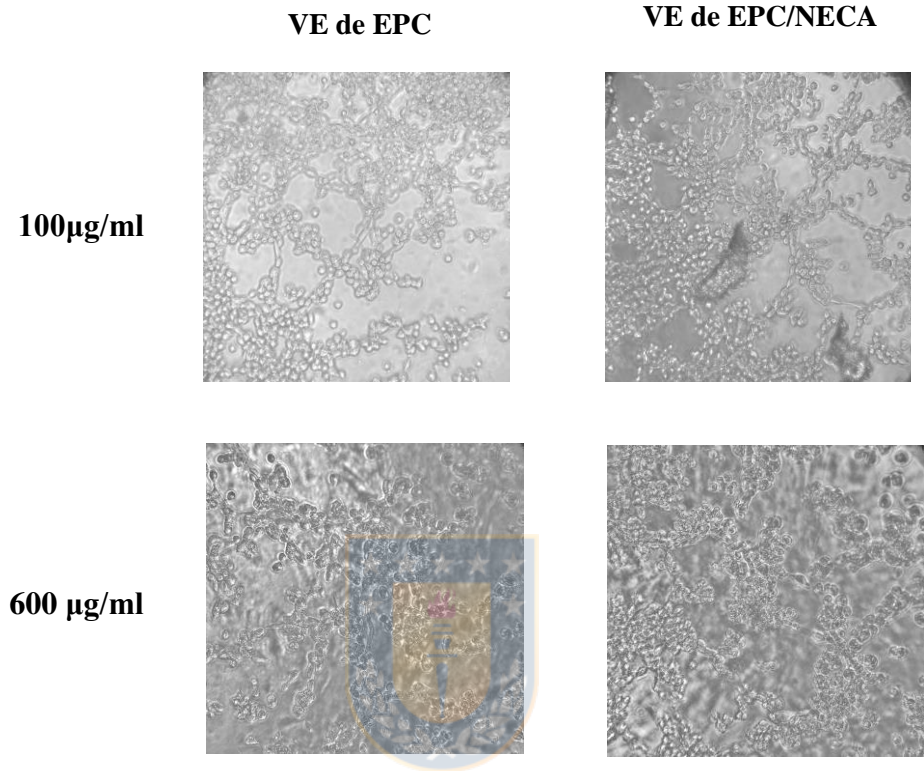


**Figura 20: Formación de estructuras capilares en ECV304 tratadas con vesículas extracelulares de EPC durante 6 horas.** Las células ECV 304 se incubaron por 6 h con 100µg/ml de VE de EPC y EPC/NECA. Luego del periodo de incubación se tomaron fotografías de campo claro con el microscopio Olympus BX43. En **A)** se observan los capilares formados por las células ECV304 que han sido incubadas con VE provenientes de EPC (EPC C), EPC+ NECA (EPC N), ECV304 y medio depletado (C-). En **B)** se muestra la cuantificación de los números de puntos de ramificación y de las unidades de longitud de las estructuras tubulares formadas. \* $p < 0,05$  y ns = no significativo (n = 3).

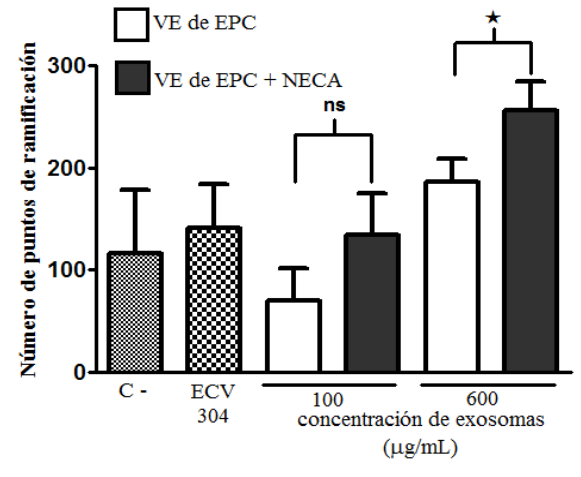
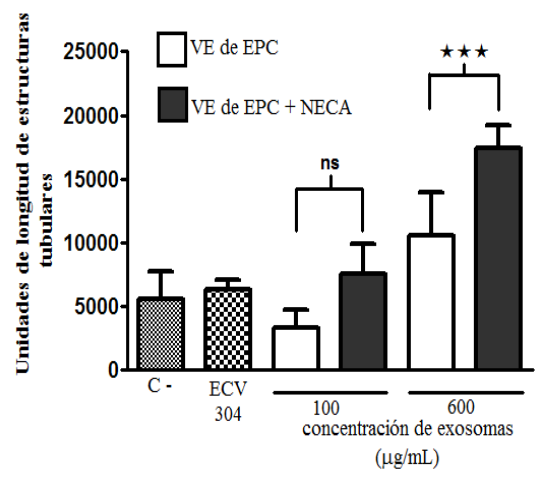
A las 6 horas, no se generan diferencias significativas en los puntos de ramificación de los capilares (Figura 20), sin embargo, el largo de estructuras tubulares es mayor con VE de EPC/NECA en comparación a las células que solo fueron incubadas con medio depletado (Figura 20).

Debido a que sólo hubo diferencias entre los capilares estimulados con microvesículas de EPC y EPC/NECA a las 3 horas, se realizó la incubación con una mayor cantidad de microvesículas, para ellos se emplearon 600 µg/ml y se evaluó la formación de estructuras tipo capilares. Como demuestra la Figura 21, la incubación con 600 µg/ml de microvesicular aumenta la formación de redes de capilares. Además, el largo y los puntos de ramificación de los capilares formados con la estimulación de las VE de EPC/NECA es significativamente mayor ( $p < 0,0001$ ) en comparación con las microvesículas provenientes de EPC sin tratar (Figura 21).

A)



B)



**Figura 21: Formación de estructuras capilares en ECV304 tratadas con distintas concentraciones de microvesículas de EPC.** Las células ECV304 se incubaron con 100 µg/ml y 600µg/ml de VE provenientes de EPC, EPC/NECA, ECV304 y Medio Depletado (c-), luego de 6 horas se tomaron fotografías a los capilares formados mediante el microcopio Olympus BX43. En **A)** se observa los capilares formados por las células ECV304 estimuladas con las distintas VE y en **B)** se aprecia la cuantificación de los números de puntos de ramificación y de las unidades de longitud de las estructuras tubulares formadas. \*p< 0,0001 y ns = no significativo (n =3).

## DISCUSIÓN

### ***Celulas progenitoras endoteliales***

Las características fenotípicas, funcionales y de expresión de genes asociados a la diferenciación celular en las hEPC sugieren que corresponderían a un fenotipo progenitor temprano según lo establecido por Ashara et al, 1997. Las hEPC de tres días de cultivo mostraron ser morfológicamente redondeadas, sin mayores cambios citoplasmáticos. Estos resultados concuerdan con los datos aportados por Hurt et al, 2005 y Guzmán-Gutiérrez et al 2010, puesto que sus evidencias demuestran que estas células en etapas tempranas presentan similar morfología, son células redondeadas de borden bien definidos sin características fenotípicas de célula endotelial (Hur et al, 2004). De igual forma los marcadores de inmadurez celular como CD34<sup>+</sup> (Sipos et al, 2009; Pearson 2010; Guzmán-Gutiérrez et al, 2010) y de fenotipo endoteliales como KDR<sup>+</sup> se expresan en este tipo celular. Los análisis por citometría de flujo indican que a tres días de cultivo el 18% de células su fenotipo es CD34<sup>+</sup> y 0,6% son KDR<sup>+</sup> estos resultados son concordantes con otros estudios que sugieren que las EPC son originalmente definidas por expresar CD34<sup>+</sup> y el receptor de dominio kinasa (KDR<sup>+</sup>) (Guzmán-Gutiérrez et al, 2010). Por lo tanto, se puede establecer que las hEPC-3d son un tipo celular inmaduro con características inmunofenotípicas endoteliales.

### **Adenosina estimula la liberación de VEGF en EPC.**

Como ha sido comentado ampliamente no sólo las EPC participan en fenómenos de vaso regeneración, sino también adenosina contribuye en estos procesos. Adenosina es capaz de modular el sistema cardiovascular mediado por sus 4 receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub>, A<sub>3</sub>. Por ejemplo, la formación de vasos sanguíneos es un mecanismo que es llevado a cabo por la migración, proliferación de células endoteliales y la formación de estructuras tubulares tipo vaso sanguíneos (Adair et al., 2005). En este proceso de angiogenesis se ha determinado que adenosina ejerce efectos mitogénicos sobre las células endoteliales al activar a las receptores A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> (Dubey et al., 2002; Ahmad et al., 2009; Clark et al., 2007). Al activar al receptor A<sub>1</sub> en monocitos de sangre periférica, liberan VEGF lo que aumenta en un 2% al estimular a las células con adenosina. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en esta tesis que sugieren que el tratamiento con NECA aumenta la secreción de distintos factores angiogénicos incluidos VEGF. Similares resultados fueron aportados por estudios in vivo, empleando membrana corioalantoidea de pollo. Estos resultados muestran el efecto angiogenico del receptor A<sub>1</sub>, su activación aumenta la formación de vasos sanguíneos los cuales disminuyen en presencia de un antagonista del receptor A<sub>1</sub> (WRC-0571), no existiendo cambios en la formación de estructuras capilares al activar A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> y A<sub>3</sub>. Otro estudio usando EPC de sangre periférica, indica que al estimularlos con un agonista selectivo de A<sub>2A</sub> (CGC21680) estas células inducen migración y movilización in vitro, lo

que podría ser un mecanismo de estimulación de la formación de nuevos vasos sanguíneo ante una situación de hipoxia (Chen et al., 2018, Fernandez et al, 2012). En un estudio realizado con EPC estimuladas con adenosina y sembradas sobre un biomaterial, se determinó que mejora significativamente la cicatrización de heridas en ratas diabéticas y aumenta la supervivencia de las EPC (Chen et al., 2015). Esto podría aplicarse a pacientes con Diabetes pudiendo mejorar la cicatrización de heridas principalmente en el pie diabético.

El efecto angiogenico de adenosina se genera debido a la estimulación de la liberación de factores angiogénicos y es dependiente del tipo celular que estimule. Es así, como en células endoteliales humanas de cordón umbilical (HUVEC) y células endoteliales de la microvasculatura humana (HMEC-1) estimuladas con un agonista no selectivo de los receptores de adenosina (NECA), solo HMEC-1 libera al medio extracelular IL-8, bFGF, VEGF esto se debe a que la vía de señalización activada por los receptores de adenosina es distinta para cada tipo celular endotelial por lo tanto, la activación de los receptores de adenosina generara diversas respuestas celulares (Feoktistov et al., 2002). Junto con liberar factores angiogenicos, adenosina puede inhibir la secreción de factores anti angiogénicos como Trombospondina-1 (TSP1) al activar específicamente el receptor  $A_{2A}$  en células de la microvasculatura humana (HMVEC) (Desai et al., 2005).

En condiciones de hipoxia existe un aumento de adenosina al medio extracelular que activa a los receptores de adenosina los cuales aumentan la

expresión del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ) el cual activa la transcripción de VEGF al unirse a secuencias específicas en el promotor del gen (Forsythe et al., 1996; Semenza et al., 2001). La expresión ha sido determinada por tratamientos con adenosina o agonistas solos o en combinación con antagonistas y se ha determinado que A<sub>2A</sub> y A<sub>2B</sub> son los principales receptores que estimulan la expresión de esta proteína en células endoteliales (Feoktistov et al., 2003).

En este trabajo hemos realizado el estudio de la expresión de VEGF estimulados con un agonista no selectivo de los receptores de Adenosina, NECA. Los estímulos en las células EPC con NECA fueron realizados a una concentración de 0,1 $\mu$ M y bajo condiciones de normoxia, los niveles de VEGF detectados en esta tesis son de 8-44 pg/ml. La producción de VEGF inducida por la activación de los receptores de adenosina ha sido determinado en HMEC-1 mediante ELISA, los resultados demuestran que en el sobrenadante de estas células existe una concentración < 50 pg/ml (Feoktistov et al., 2002), estos resultados son similares de los detectados en EPC de 3 días estimuladas con NECA. Las cuatro muestras de EPC de distintos pacientes poseen una mayor concentración de VEGF cuando son estimulados con NECA (13-44pg/ml) (Figura 5). En paralelo, se pudo determinar que la expresión del gen de VEGF está disminuida cuando las células EPC fueron incubadas con NECA (Figura 4) pero la proteína presente en el sobrenadante aumenta (Figura 5). Estos resultados nos indican que NECA estaría estimulando la liberación de



esta proteína al sobrenadante de células y se contradice con los resultados presentados por Feoktistov et al., que indica que NECA no estimularía la liberación de VEGF en condiciones de normoxia en HUVEC y células musculares lisas (Feoktistov et al., 2004). Estos tipos celulares normalmente expresan receptores  $A_{2A}$  y  $A_{2B}$ , pero en condiciones de normoxia el receptor  $A_{2A}$  predomina. En cambio, se ha establecido que en condiciones de normoxia los receptores que predominan en las EPC son  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$  (Fernández et al., 2012), por lo tanto el mecanismo de acción de NECA en este tipo celular sería principalmente a través de estas proteínas.

En condiciones de hipoxia las células endoteliales adoptan un fenotipo angiogénico que promueve la expresión de VEGF inducido por adenosina, se ha determinado en células HUVECs y musculares lisas que existe una sobreexpresión del receptor  $A_{2B}$  y una baja expresión en el receptor  $A_{2A}$ , además existe una sobreexpresión de VEGF inducido por adenosina y NECA aumenta su liberación de VEGF entre un 0,5% a un 2,5% (Feoktistov et al., 2004). El mecanismo por el cual adenosina intracelular o extracelular puede activar la angiogénesis es aun desconocido, pero estudios presentados por Xu et al., demostraron que bajo condiciones de hipoxia se estimula el factor inducible por Hipoxia (HIF-1) en células endoteliales (HUVEC, MAECs). Esta proteína reduce la expresión de la enzima ADK (adenosina quinasa) lo que genera un aumento de adenosina intracelular y VEGFR2 promoviendo la proliferación, migración y formación de capilares (Xu et al., 2017).

### **Aislamiento y caracterización de los microvesículas liberados por las EPC de 3 días, en presencia de adenosina, al medio extracelular**

Las *microvesículas* son capaces de mediar la comunicación intercelular e influir en la formación de nuevos vasos sanguíneos (Li et al., 2016). Nuestros resultados muestran que las EPC incubadas NECA sería un estímulo que favorece la liberación de VE, tal como lo demuestra el ensayo NTA realizado. Existe una mayor cantidad de estas vesículas en las muestras de EPC tratadas con el agonista no selectivo de receptores de adenosina lo que podría indicar, que al estimular los receptores de adenosina aumenta la liberación de VE desde las células progenitoras endoteliales. En la actualidad no existe información si adenosina puede estimular la liberación de VE en EPC solo se ha indicado que en condiciones de hipoxia las células mesenquimales generan VE enriquecidas en factores angiogénicos (Chen et al., 2014; Xue et al., 2018; Han et al., 2019; Zhu et al., 2018), aumentando la proliferación de células endoteliales y formación de estructuras capilares (Zhang et al., 2012).

### **Aislamiento de VE desde sobrenadante de EPC y EPC/NECA.**

El primer método usado para aislar las vesículas fue la centrifugación diferenciada, este es un método convencional que permite aislar lipoproteínas, complejos de proteínas pero, no es adecuado para aislar exosomas desde

muestras clínicas debido a que consume mucho tiempo, requiere costosos equipamiento e incluye largos periodos de centrifugación (Gurunathan et al., 2019). Junto con estas limitantes, la ultracentrifugación no puede asegurar la absoluta separación por tamaño de VE debido a que la sedimentación de estas depende de la composición que posean y generalmente ocurre agregación de las vesículas que interfiere con la separación individual de estas. Además, la centrifugación a alta velocidad ( $>100000g$ ) genera contaminantes que pueden eliminarse lavando el *pellet* final con PBS, pero este paso reduce la cantidad de VE obtenidas (Witwer et al., 2013). En esta tesis el uso de la ultracentrifugación no fue efectivo, se obtuvo una pobre separación de exosomas (Figura 6). Por eso se decidió cambiar de metodología y emplear un sistema de *ultrafiltración*.

El método de ultrafiltración utilizando filtros Amicon® (Figura 7) permitió separar las vesículas de EPC similar a lo reportado por Gurunathan et al., 2019; Merchant et al., 2010; Alvarez et al., 2012. Este sistema separa los exosomas usando membranas de filtración y separando por peso molecular o límite de exclusión por tamaño (Zeringer et al., 2015). Este método es rápido, no requiere alto costo de equipamiento. Además, es fácil de integrar en prácticas clínicas y se podría utilizar para obtener los exosomas de una gran cantidad de muestras clínicas como sangre, plasma (Peterson et al., 2015) y medios condicionados. La desventaja de este método es que permite recuperar exosomas de distintos tamaños tal como lo demuestran los resultados obtenidos en la Figura 7a y 8a, donde se aprecian distintos *peak* en la gráfica de NTA que corresponden a

distintas poblaciones de exosomas. Otra desventaja de este método es que podría co-aislar agregados de proteínas junto a las vesículas (Peterson et al., 2015).

### **Liberación de VE en cultivos de EPC tempranas**

Para lograr una buena obtención de vesículas desde las EPC se aislaron exosomas desde cultivo con una muestra de 50, 100 y 200 ml de sangre periférica. Se puede observar que con 50 ml de sangre (Tabla 6) la cantidad de vesículas es menor a  $10^8$  partículas/ml, con 100 ml ( $> 10 \times 10^{10}$  partículas/ml) y con 200 ml de sangre (Figura 9) la concentración promedio fue de  $2 \times 10^{11}$  partículas/ml. Según literatura lo ideal es obtener mas  $10 \times 10^8$  partículas /ml para que el análisis de NTA tenga una mejor precisión (Dragovic et al., 2011), por lo tanto los datos obtenidos con 100 y 200 ml de sangre son confiables que los datos obtenidos con 50 ml de sangre periférica. Con 50 ml de sangre se obtuvo un cultivo de  $2 \times 10^6$  de EPC y EPC/NECA, con 100 ml de sangre periférica se obtuvieron  $4 \times 10^6$  células a diferencia de cultivos con 200 ml de sangre periférica donde obtuvimos  $8 \times 10^6$  células en ambas condiciones, esta diferencia se refleja en la cantidad mayor de VE que se pudo obtener con una mayor cantidad de células (Tabla 6). Además, la moda de las VE obtenidas con los cultivos de EPC de 100ml de sangre periférica corresponde a 106nm y

83nm para las vesículas obtenidas de EPC y EPC/NECA, con 200 ml de sangre periférica las VE de EPC poseen una moda de 119nm al igual que las VE de EPC/NECA. Estos resultados son <130nm y son apoyados por otros investigadores que aislaron VE desde EPC (Li et al., 2016; Cantaluppi et al., 2018; Ranguino et al., 2012) validando los resultados obtenidos.

Existen diferencias significativas en cuanto a la cantidad de las vesículas liberadas por ECV304 en comparación con las EPC. Las vesículas obtenidas por ECV 304 ( $20 \times 10^6$  de células) fue de  $5,4 \times 10^{11}$  partículas/ml, a diferencia de las vesículas obtenidas de cultivos de EPC en donde lo logro una concentración de  $1,4 \times 10^{11}$  partículas/ml obtenidas a partir de  $8 \times 10^6$  células (Figura 9). Existen evidencias que sugieren que la cantidad de células modifica el contenido de exosomas desde el sobrenadante, a mayor confluencia en la placa de cultivo menor es la cantidad de exosomas recuperado (Palviaienm et al., 2019). Además, las VE de este trabajo obtenidos con cultivos de EPC de 3 días contrasta con lo publicado en donde la mayoría de las investigaciones publicadas recuperan microvesiculas desde células progenitoras endoteliales tardías de > 7 días (Li et al., 2016; Deregibus et al., 2007; Zhang et al., 2016; Cantaluppi et al., 2018; Ranguino et al., 2012; Sun et al., 2018). En este trabajo se ha estudiado las VE de EPC de 3 días, este fenotipo no presenta característica de una célula endotelial madura pero si posee características que sugiere una diferenciación de célula inmadura a una célula endotelial dado por los marcadores CD34+KDR+ (Fernandez et al., 2012; Guzmán-Gutiérrez et al.,

2010) y las vesículas de este tipo celular poseen las mismas características que sus células de origen, no existiendo trabajos publicados al respecto.

Por otro lado la concentración de VE liberadas por EPC bajo estimulación de NECA es mayor en comparación con EPC sin estimular (Figura 8 y 9), considerando que la cantidad de células fue la misma para ambas condiciones (EPC, EPC/NECA). Estos resultados sugieren que, NECA y la activación de receptores de adenosina podría estimular la secreción de VE. Estudios publicados sugieren que una serie de factores pueden influenciar la liberación de vesículas, tales como  $Ca^{+2}$  (Savina et al., 2003) o hipoxia (Svensson et al., 2011), por lo tanto adenosina (NECA) podría ser otro factor que induce la liberación de exosomas desde EPC. Actualmente no existen reportes de estimulación de adenosina sobre la liberación de VE al medio extracelular en EPC u otro modelo de célula endotelial, solo se ha documentado que ATP estimula la liberación de VE desde líneas celulares de monocitos/macrófagos (THP-1) (Mackenziet et al., 2001), microglia de rata (Li et al., 2018), células dendríticas de humanos (Pizzirani et al., 2007; Baroni et al., 2007), monocitos/macrófagos de ratones (Qu Y. et al., 2007), macrófagos humanos (Gulinelli et al., 2012) y su efecto está dado por la activación de receptores ionotrópicos P2R.

### *Caracterización de Vesículas liberadas por Células Progenitoras Endoteliales por Citometría de Flujo*

Las vesículas obtenidas desde los sobrenadantes de las células progenitoras endoteliales poseen en su superficie un 120% más de proteínas CD63 y CD81 que las propias EPC (Figuras 10,11, 12, 13). Siendo estos las primeras evidencias que sugieren la expresión de estas proteínas en las superficies de las microvesículas y EPC de 3 días. El uso de Tetraspaninas se han propuesto como posibles marcadores de exosomas (Théry et al., 2018), ya que estas proteínas están ampliamente distribuidas en la superficie de la membrana celular por lo tanto, pueden estar presentes en distintas poblaciones de vesículas. Podríamos especular en el sentido que estos marcadores (CD63 y CD81) podrían ser específicos para las EPC y sus exosomas. Las proteínas CD63 y CD81 pudieran estar presentes en microdominios en la membrana plasmática. Estos microdominios son denominados microdominios enriquecidos en Tetraspaninas (MET) y se ha reportado que pueden participar en: biogénesis de exosomas, cargar proteínas o miRNA al exosoma, ingreso de la vesícula a la célula blanco y en la presentación de antígenos (Yañez-Mó et al., 2014). Para cargar proteínas o miRNA al exosoma, se han determinado la presencia de diferentes miembros de Tetraspaninas que participan en este proceso como por ejemplo, CD63 que se ha visto que está involucrada en cargar la proteína PMLE (proteína del melanosoma) y su ausencia afecta la formación del melanosoma (Nazarenko et al., 2010). CD9 se ha determinado importante en cargar

metaloproteinasas como CD10 (Shen et al., 2011) o ADAM17 (Feng et al., 2010) y los miRNA pueden ser cargados mediante su unión a ribonucleoproteínas A2B1 ya que algunos de estos poseen miRNA poseen motivos EXO (GGAG) que son capaces de unirse a estas ribonucleoproteínas y así ingresar al interior de las vesículas (Yañez-Mó et al., 2014). Estas evidencias sugieren que las VE provenientes de EPC podrían contener proteínas, miRNA que pudiesen contribuir al proceso angiogénico.

En cuanto a la expresión de la proteína CD34, en este trabajo y en otros se ha determinado que las EPC (18,6%) y EPC/NECA (27%) expresan este antígeno, en las vesículas liberadas por estas células existe una mayor expresión de esta proteína en las liberadas por las EPC (1,36%) que las liberadas por las EPC/NECA (0,636%). Esto podría estar asociado al mecanismo de la formación de las vesículas, este proceso ocurre por un mecanismo que es dependiente o independiente de ESCRT, ya sea por cualquiera de los dos, el lugar de la membrana donde se empieza a formar la vesícula intraluminal podría influir en la cantidad de proteínas CD34 presentes en la membrana de las vesículas (Gurunathan et al., 2019). Una serie de otros investigadores han demostrado que la expresión de CD34 en la superficie de las EPC (Li et al., 2016; Li X et al., 2016; Wu et al., 2018; Zhang et al., 2016) y de sus VE es baja (Cantaluppi et al., 2012; Cantaluppi et al., 2018), lo que relaciona con los datos obtenidos en este trabajo. Otras investigaciones con células CD34+ aisladas de sangre periférica, han demostrado que existe un aumento de CD34+ en EPC y en sus



VE en individuos que realizan ejercicio (Ma et al., 2018), como una forma de mejorar la perfusión de sangre en la extremidad isquémica de un ratón (Mathiyalagan et al., 2017), y aumentar la formación de vasos sanguíneos y la viabilidad de célula endoteliales (Sahoo et al., 2011).

Las células ECV304 fueron usadas para estandarizar la extracción de vesículas desde el sobrenadante ya que poseen un alto potencial proliferativo, sus condiciones de cultivo no requieren de factores de crecimiento (Takahashi et al., 1990) y sus vesículas expresan CD63 (Shtam et al., 2012). Se puede apreciar que al caracterizar estas vesículas mediante citometría de flujo, expresan CD34, CD63 y CD81. Cuando se analizan la cantidad de estas proteínas que expresan las vesículas, se puede ver que ante la recuperación de exosomas del sobrenadante de  $20 \times 10^6$  células solo existe un aumento en CD34 (2,02%) y las Tetrapaninas no evidencian cambios.

Según el MISEV (Mínima información para estudios de vesículas extracelulares) 2018 existen algunos mínimos requerimientos para realizar preparaciones de VE estas corresponden a:

- 1) definir la cantidad de la fuente de obtención de VE (número de células secretoras de VE, volumen de fluido, masa del tejido);
- 2) determinar la abundancia de VE (número total de partículas y/o proteínas);

3) evaluar la presencia de componentes asociados con los subtipos específico de VE;

4) analizar la presencia de componentes no vesiculares co-aislados con las VE (Théry et al., 2018).

En el punto 3 se sugiere una caracterización general que consiste en determinar al menos tres proteínas marcadoras de VE, que corresponden a proteínas asociadas con membranas (Tetraspaninas), proteínas citosólicas y además, incluir una proteína usada como control negativo (proteínas de mitocondria, Golgi o nucleares, debido a que los exosomas poseen un tamaño < 200nm y son formados presumiblemente en una región distante de los organelos). En este trabajo falta determinar la proteína citosólica en estas VE y el ítem 4 no se pudo realizar (Théry et al., 2018).

*Los exosomas liberados por las EPC favorecen la formación de nuevos vasos sanguíneo in vitro*

En este trabajo se evaluó la capacidad de las VE de EPC en contribuir a la formación de estructuras tipo capilares in vitro. Como demuestran las figuras 19 y 20, las VE estimulan la generación de nuevos vasos sanguíneo, siendo las VE provenientes de EPC estimuladas con NECA las que más favorecen la formación de capilares ( $p < 0,05$ ). Existen datos publicados que sugiere que las VE provenientes de EPC estimulan la formación de vasos sanguíneos, tal

como lo demuestra Sun et al., 2018, sus resultados muestran los capilares formados por HUVEC y EPC tardías al ser incubadas con exosomas de EPC, aumenta en un 20%. Otros estudios indican que los exosomas de EPC de 7 días aumentan la formación de vasos sanguíneos en células endoteliales peritubulares (Cantaluppi et al., 2012), en células endoteliales de islotes pancreáticos (Cantaluppi et al., 2018), en HUVEC y HMEC (Deregibus et al., 2007; Li et al., 2016; Wu et al., 2018; Zhang et al., 2016), confirmando que las EPC contribuyen al proceso de angiogénico mediado por microvesículas.

El efecto de NECA sobre la liberación de exosomas y su efecto sobre la angiogenesis no ha sido reportado, solo existe información que las VE liberadas por EPC aumentan la formación de vasos sanguíneos y este efecto es potenciado cuando el ensayo angiogénico se realiza en condiciones de hipoxia (Cantaluppi et al., 2012).

## **CONCLUSION**

La activación de receptores de adenosina en EPC de 3 días modula la capacidad angiogénica mediante la secreción del factor de crecimiento endotelal vascular (VEGF) y la liberación de microvesículas (exosomas).

## **PROYECCIONES**

- 1.- Realizar la determinación de proteínas citosólicas (como TSG101, Alix o cavelionas) en las VE y un control negativo que indica el grado de pureza de la preparación de estas VE (Lipoproteínas, Albumina, proteínas ribosomales) para completar los mínimos requerimientos necesarios para poder determinar satisfactoriamente una vesícula extracelular según el MISEV 2018 (Théry et al., 2018).
- 2.- Determinar el contenido de las VE, para evaluar la presencia de VEGF y/o miRNA que podrían contribuir a la formación de nuevos vasos sanguíneos.
- 3.- Determinar que receptor de adenosina influencia la liberación de estas VE en EPC mediante el uso de agonistas y antagonistas de receptor de adenosina (CGS21680, SCH58261, CHA, CI-IB-MECA).

## ANEXO 1

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PACIENTE

**Estimado paciente, le invitamos a participar de esta investigación, su consentimiento es completamente voluntario y su negativa no tendrá ninguna repercusión en su atención de salud. Si después de iniciado el estudio, usted desea retirarse, lo puede hacer sin necesidad de dar ninguna explicación.**

**Declaro** que he sido informado por el investigador acerca del estudio en el que participaré, sus procedimientos y sus riesgos. Me han explicado las posibles alternativas y que puedo revocar mi consentimiento antes que sea realizado.

Estoy **satisfecho** con la información recibida y mis dudas han sido aclaradas.

En consecuencia, doy mi consentimiento para participar del estudio, contestar la encuesta y que se utilice la muestra de estudio.



\_\_\_\_\_  
Firma del Paciente o representante legal\*

RUN:

\_\_\_\_\_  
Firma del Médico

RUN:

\_\_\_\_\_  
Firma del Director del Hospital o un representante

RUN:

\* En caso de incapacidad del paciente, con indicación del carácter con el que interviene (padre, madre, tutor)

Nombre del representante legal:

Concepción,.....de.....de.....

**EN CASO DE QUE EL PARTICIPANTE NO ESTE EN CONDICIONES DE CONSENTIR,**

_____	_____
Nombre del padre o madre o representante	firma
fecha de la firma	
(DD/MM/AAAA)	

RELACIÓN CON PARTICIPANTE

*Yo, el que suscribe, investigador/sub-investigador, confirmo que he entregado verbalmente la información necesaria acerca del estudio, que he contestado toda duda adicional y que no ejercí presión alguna para que el participante ingrese al estudio.*

*Declaro que procedí en completo acuerdo con los principios éticos descritos en las Directrices de GCP (Buenas Prácticas Clínicas) y otras leyes nacionales e internacionales vigentes.*

*Se le proporcionará al paciente una copia de esta información escrita para el participante y formulario de consentimiento firmado.*

-----  
-----

Nombre de la persona que solicita el consentimiento  
Fecha de la firma informado en letra imprenta  
(DDfMM/AAAA)

Firma de la persona que solicita  
el consentimiento informado

## BIBLIOGRAFÍA

**Adair**, T. H., Cotten, R., Gu, J.-wei, Pryor, J. S., Bennett, K. R., McMullan, M. R., McDonnell, P., et al. (2005). Adenosine infusion increases plasma levels of VEGF in humans. *BMC Physiology*, 6, 1-6.

**Adams**, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature*, 8, 464-478.

**Admyre, C.**, Bohle, B., Johansson, S. M., Valenta, R., & Scheynius, A. (2007). B cell – derived exosomes can present allergen peptides and activate allergen-specific T cells to proliferate and produce T H 2-like cytokines. *J Allergy Clin Immunol*, 120, 1418-1424.

**Ahmad**, A., Ahmad, S., Glover, L., Miller, S. M., Shannon, J. M., Guo, X., Franklin, W. A., et al. (2009). Adenosine A2A receptor is a unique angiogenic target of HIF-2 in pulmonary endothelial cells. *PNAS*, 106(26), 10684-10689.

**Akyurekli**, C., Le, Y., Richardson, R. B., Fergusson, D., Tay, J., & Allan, D. S. (2015). A Systematic Review of Preclinical Studies on the Therapeutic Potential of Mesenchymal Stromal Cell-Derived Microvesicles. *Stem Cell Rev and Rep*, 11, 150-160.

**Aliotta**, J. M., Pereira, M., Amaral, A., Sorokina, A., Igbinoba, Z., Hasslinger, A., El-bizri, R., et al. (2013). Induction of pulmonary hypertensive changes by extracellular vesicles from monocrotaline-treated mice. *Cardiovascular research*, 100, 354-362.

**Alvarez-Erviti**, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhai, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4), 341-345.

**Andreu**, Z., & Yáñez-mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*, 5, 1-12.

**Aoki, J.**, Ohashi, K., Mitsuhashi, M., Murakami, T., Oakes, M., & Kobayashi, T. (2014). Posttransplantation Bone Marrow Assessment by Quantifying Hematopoietic Cell – Derived mRNAs in Plasma Exosomes / Microvesicles. *Clinica Chemistry*, 60(4), 675-682.

**Arslan, F.**, Chai, R., Smeets, M. B., Akeroyd, L., Choo, A., Agnor, E. N. E., Timmers, (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K / Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia / reperfusion injury. *Stem Cell Research*, 10(3), 301-312.

**Asahara, T.**, Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., Zee, R. V. D., Li, T., Witzenbichler, B., et al. (1997). Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis. *Science*, 275.

**Baglio, S. R.**, Rooijers, K., Koppers-Ialic, D., Verweij, F. J., Lanzón, M. P., Zini, N., Naaijken, B., et al. (2015). Human bone marrow- and adipose-mesenchymal stem cells secrete exosomes enriched in distinctive miRNA and tRNA species. *Stem Cell Research & Therapy*, 1-20.

**Bang, C.**, Fiedler, J., Thum, T., Bang, C., Batkai, S., Dangwal, S., Gupta, S. K., et al. (2014). Cardiac fibroblast – derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5).

**Bard, M. P.**, Hegmans, J. P., Hemmes, A., Luiders, T. M., Willemsen, R., Severijnen, L.-anne A., Meerbeeck, J. P. V., et al. (2004). Proteomic Analysis of Exosomes Isolated from Human Malignant Pleural Effusions. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 31.

**Barile, L.**, Lionetti, V., Cervio, E., Matteucci, M., Gherghiceanu, M., Popescu, L. M., Torre, T., et al. (2014). Extracellular vesicles from human cardiac progenitor cells inhibit cardiomyocyte apoptosis and improve cardiac function after myocardial infarction. *Cardiovascular research*, 103, 530-541.

**Barile, L.**, Moccetti, T., & Marba, E. (2017). Roles of exosomes in cardioprotection. *European Heart Journal*, 38, 1372-1379.



**Baroni, M., Pizzirani, C., Pinotti, M., Ferrari, D., Adinolfi, E., Calzavarini, S., Caruso, P., et al. (2007).** Stimulation of P2 ( P2X 7 ) receptors in human dendritic cells induces the release of tissue factor-bearing microparticles. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 2, 1926-1933.

**Batista, B. S., Eng, W. S., Pilobello, K. T., Hendricks-mu, K. D., & Mahal, L. K. (2011).** Identification of a Conserved Glycan Signature for Microvesicles. *Journal of Proteome*, 10, 4624-4633.

**Bazigou, E., & Makinen, T.(2013).** Flow control in our vessels : vascular valves make sure there is no way back. *Cell Mol Life Sci*, 70, 1055-1066.

**Beavers, K. M., Brinkley, T. E., & Nicklas, B. J. (2010).** Clinica Chimica Acta Effect of exercise training on chronic inflammation. *Clinica Chimica Acta*, 411(11-12), 785-793.

**Bearzi, C., Rota, M., Hosoda, T., Tillmanns, J., Nascimbene, A., Angelis, A. D., Yasuzawa-amano, S., et al. (2007).** Human cardiac stem cells. *PNAS*, 104(35), 14068-14073.

**Belting, M., & Wittrup, A. (2008).** Nanotubes , exosomes , and nucleic acid – binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells : implications in health and disease. *J. Cell Biol*, 183(7), 1187-1191.

**Beltrami, A. P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., et al. (2003).** Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and Support Myocardial Regeneration. *Cell*, 114, 763-776.

**Berne, M. (1963).** Cardiac nucleotides in hypoxia : possible role in regulation of coronary. *Am J Physiol*, 204, 317-322.

**Bian, S.**, Zhang, L., Duan, L., & Wang, X (2014). Extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells promote angiogenesis in a rat myocardial infarction model. *J Mol Med*, 92, 387-397.

**Böing, A. N.**, Grootemaat, A. E., Frank, A. W., Sturk, A., Nieuwland, R., Böing, A. N., et al. (2014). Single-step isolation of extracellular vesicles by size-exclusion chromatography. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3.

**Burnstock, G.** (2002). Purinergic Signaling and Vascular Cell Proliferation and Death. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 22, 364-373.

**Buzas, E. I.**, György, B., Nagy, G., Falus, A., & Gay, S. (2014). Emerging role of extracellular vesicles in inflammatory diseases. *Nat Rev Rheumatol*, 10, 356-364.

**Bruno, S.**, Grange, C., Deregibus, M. C., Calogero, R. A., Saviozzi, S., Collino, F., Morando, L., et al. (2009). Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury. *J Am Soc Nephrol*, 20, 1053-1067.

**Cai, Z.**, Yang, F., Yu, L., Yu, Z., Jiang, L., Wang, Q., Yang, Y., et al. (2012). Activated T Cell Exosomes Promote Tumor Invasion via Fas Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 188, 1-8.

**Castillo-melendez, M.**, Yawno, T., Jenkin, G., Miller, S. L., & Spencer, S. J. (2013). Stem cell therapy to protect and repair the developing brain : a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells. *Frontiers in Neuroscience*, 7, 1-14.

**Cantaluppi, V.**, Gatti, S., Medica, D., Figliolini, F., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., et al. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia – reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney International*, 82(4), 412-427.

**Cantaluppi, V.**, Biancone, L., Figliolini, F., Beltramo, S., Medica, D., Deregibus, M. C., Galimi, F., et al. (2018). Microvesicles Derived From Endothelial Progenitor Cells Enhance Neoangiogenesis of Human Pancreatic Islets. *Cell Transplantation*, 21, 1305-1320.

**Carmeliet, P.** (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature medicine*, 9(6), 653-660.

**Ceradini, D. J.**, Kulkarni, A. R., Callaghan, M. J., Tepper, O. M., Bastidas, N., Kleinman, M. E., Capla, J. M., et al. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8), 858-864.

**Chang, Z.-tang**, Hong, L., Wang, H., Lai, H.-li, Li, L.-feng, & Yin, Q.-lin. (2013). Application of peripheral-blood-derived endothelial progenitor cell for treating ischemia-reperfusion injury and infarction: a preclinical study in rat models. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, (92), 1-10.

**Chen, T. S.**, Arslan, F., Yin, Y., Tan, S. S., Lai, R. C., Boon, A., Choo, H., et al. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of Translational medicine*, 9, 1-10.

**Chen, J.**, Liu, Z., Hong, M. M., & Zhang, H. (2014). Proangiogenic Compositions of Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *PloS one*, 1, 1-16.

**Chen, W.**, Wu, Y., Li, L., Yang, M., Shen, L., Liu, G., Tan, J., et al. (2015). Adenosine accelerates the healing of diabetic ischemic ulcers by improving autophagy of endothelial progenitor cells grown on a biomaterial. *Scientific Reports*, 1-14.

**Chen, W.**, Xiao, L., Bai, J., Zeng, W., Yang, M., & Shi, B. (2018). The promotion of tissue engineering blood vessel patency by CGS21680 through regulating activities of endothelial progenitor cell. *Journal of Biomedical Material Research*, 106, 2634-2642.

**Cheng, C.-chung, Chang, S.-jyh, Chueh, Y.-neng, Huang, T.-shun, & Huang, P.-hsun. (2013).** Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC genomics*, *14*, 1-10.

**Choi, D., Jang, S. C., Yoon, Y. J., Jung, J. W., Kim, J.-wook, Kang, J. S., et al. (2011).** Proteomic analysis of microvesicles derived from human colorectal cancer ascites. *Proteomics*, *11*, 2745-2751.

**Chopra, H., Hung, M. K., Kwong, D. L., Zhang, C. F., & Pow, E. H. N. (2018).** Insights into Endothelial Progenitor Cells : Origin , Classification , Potentials , and Prospects. *Stem Cells International*, *2018*, 1-24.

**Chou, J., Mackman, N., Merrill-skoloff, G., Pedersen, B., Furie, B. C., & Furie, B. (2004).** Hematopoietic cell-derived microparticle tissue factor contributes to fibrin formation during thrombus propagation. *Blood*, *104*, 3190-3197.

**Clark, A. N., Youkey, R., Liu, X., Jia, L., Blatt, R., Day, Y.-ji, Sullivan, G. W., et al. (2007).** A 1 Adenosine Receptor Activation Promotes Angiogenesis and Release of VEGF From Monocytes. *Circulation Research*, *101*, 1130-1138.

**Cocucci, E., & Meldolesi, J. (2015).** Ectosomes and exosomes : shedding the confusion between extracellular vesicles. *Trends in Cell Biology*, *25*(6), 364-372.

**Colombo, M., Raposo, G., & Thery, C. (2014).** Biogenesis , Secretion , and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, *30*, 255-289.

**Conway, E. M., Collen, D., & Carmeliet, P. (2001).** Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovascular research*, *49*(3), 507-21.

**Cossetti, C., Iraci, N., Mercer, T. R., Leonardi, T., Drago, D., Alfaro-cervello, C., Saini, H. K., et al. (2014).** Extracellular Vesicles from Neural Stem Cells Transfer IFN- $\gamma$  via Ifngr1 to Activate Stat1 Signaling in Target Cells. *Molecular cell*, *56*(2), 193-204.

**Crowley, E., Nicolantonio, F. D., Loupakis, F., & Bardelli, A. (2013).** Liquid Biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 1-13.

**Cusack, N. J., & Hourani, S. M. O. (1981).** 5'- N-ethylcarboxamidoadenosina: a potent inhibitor of human platelet aggregation. *Br. J. Pharmacol*, 72, 443-447

**De Necochea- Campion, R., Gonda, A., & Wall, N. R. (2018).** A practical approach to extracellular vesicle characterization among similar biological samples. *Biomed. Phys. Eng. Express*, 4, 1-18.

**Denzer, K., Kleijmeer, M. J., Heijnen, H. F. G., Stoorvogel, W., & Geuze, H. J. (2000).** Exosome : from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *Journal of cell science*, 113, 3365-3374.

**Desai, A., Victor-vega, C., Gadangi, S., Montesinos, M. C., Chu, C. C., & Cronstein, B. N. (2005).** Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Stimulation Increases Angiogenesis by Down-Regulating Production of the Antiangiogenic Matrix Protein Thrombospondin 1. *Molecular pharmacology*, 67(5), 1406-1413.

**Deregibus, M. C., Cantaluppi, V., Calogero, R., Iacono, M. L., Tetta, C., Biancone, L., Bruno, S., et al. (2007).** Endothelial progenitor cell – derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*, 110(7), 2440-2449.

**Díaz-pérez, F., Radojkovic, C., Aguilera, V., Veas, C., González, M., Lamperti, L., & Escudero, C. (2012).** L-Arginine Transport and Nitric Oxide Synthesis in Human Endothelial Progenitor Cells. *J Cardiovasc Pharmacol*, 60(5), 439-449.

**Dickens, A. M., Tovar-y-romo, L. B., Yoo, S.-wan, Trout, A. L., Bae, M., Kanmogne, M., Megra, B., et al. (2017).** Astrocyte-shed extracellular vesicles regulate the peripheral leukocyte response to inflammatory brain lesions. *Science Signaling*, 10(18), 1-12.

**Diehl, P.**, Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., Ziemann, M., et al. (2012). Microparticles : major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular research*, 93, 633-644.

**Donnini, S.**, & Ziche, M. (2002). Constitutive and Inducible Nitric Oxide Synthase: Role in Angiogenesis. *Antioxidants and Redox Signaling*, 4(5), 817-823.

**Dragovic, R. A.**, Gardiner, C., Brooks, A. S., Tannetta, D. S., Ferguson, D. J. P., Hole, P., Carr, B., et al. (2011). Sizing and phenotyping of cellular vesicles using Nanoparticle Tracking Analysis. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, 7(6), 780-788.

**Duan, P.**, Tan, J., Miao, Y., & Zhang, Q. (2019). Potential role of exosomes in the pathophysiology, diagnosis, and treatment of hypoxic diseases. *Am J Transl Res*, 11(3), 1184-1201.

**Dubey, R. K.**, Gillespie, D. G., & Jackson, E. K. (2002). A2B Adenosine Receptors Stimulate Growth of Porcine and Rat Arterial Endothelial Cells. *Hypertension*, 39, 530-535.

**Emanuelli, C.**, Shearn, A. I. U., Angelini, G. D., & Sahoo, S. (2015). Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascular Pharmacology*, 71, 24-30.

**Escudero, C.**, Roberts, J. M., Myatt, L., Feoktistov, I., Mitchell, B. M., Texas, A., & Health, M. (2014). Impaired adenosine-mediated angiogenesis in preeclampsia: potential implications for fetal programming. *Frontiers in Pharmacology*, 5(June), 1-13.

**Escrevente, C.**, Grammel, N., Kandzia, S., Zeiser, J., Tranfield, E. M., Conrads, S., & Costa, J. (2013). Sialoglycoproteins and N-Glycans from Secreted Exosomes of Ovarian Carcinoma Cells. *PLoS one*, 8(10), 1-11.

**Fargeas, C. A.** (2013). Prominin-2 and Other Relatives of CD133. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1, 25-41

**Feng, D., Zhao, W.-long, Ye, Y.-ying, Bai, X.-chen, Liu, R.-qin, Chang, L.-fu, Zhou . (2010).** Cellular Internalization of Exosomes Occurs Through. *Traffic*, 11(1), 675-687.

**Feoktistov, I., Goldstein, A. E., Ryzhov, S., Zeng, D., Belardinelli, L., Voynoyasenetskaya, T., & Biaggioni, I. (2002).** Differential Expression of Adenosine Receptors in Human Role of A2B Receptors in Angiogenic Factor Regulation. *Circulation Research*, 90, 531-538.

**Feoktistov, I., Ryzhov, S., Goldstein, A. E., & Biaggioni, I. (2003).** Mast Cell-Mediated Stimulation of Angiogenesis Cooperative Interaction Between A2B and A3 Adenosine Receptors. *Circulation Research*, 92, 485-492.

**Feoktistov, I., Ryzhov, S., Zhong, H., Goldstein, A. E., & Matafonov, A. (2004).** Hypoxia Modulates Adenosine Receptors in Human Endothelial and Smooth Muscle Cells Toward an A2B Angiogenic Phenotype. *Hypertension*, 44, 649-654.

**Fernandez, P., Jara, C., Aguilera, V., Caviedes, L., Diaz, F., Radojkovic, C., Veas, C., et al. (2012).** Adenosine A2A and A3 Receptors Are Involved in the Human Endothelial Progenitor Cells Migration. *J Cardiovasc Pharmacol*, 59(5), 397-404.

**Ferrara, N. (2004).** Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 25(4), 581-611.

**Fiandaca, M. S., Kapogiannis, D., Mapstone, M., Boxer, A., Schwartz, J. B., Abner, E. L., Petersen, R. C., et al. (2015).** Identification of pre-clinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally-derived blood exosomes: a case-control study. *Alzheimers Dement.*, 11(6), 600-607.

**Fitzner, D., Schnaars, M., Rossum, D. V., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., et al. (2011).** Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis. *Journal of cell science*, 124, 447-458.

**Flamme, I., & Risau, W. (1992).** Induction of vasculogenesis and hematopoiesis in vitro. *Development*, 116, 435-439.

**Fonsato, V., Collino, F., Herrera, M., & Camussi, G. (2012).** Human Liver Stem Cell-Derived Microvesicles Inhibit Hepatoma Growth in SCID Mice by Delivering Antitumor MicroRNAs. *Stem cells*, 30, 1985-1998.

**Fontana, L., & Klein, S. (2007).** Aging, Adiposity, and Calorie Restriction. *Jama*, 297, 986-994.

**Forsythe, J. O. A., Jiang, B.-hua, Iyer, N. V., Agani, F., Leung, S. W., Koos, R. D., & Semenza, G. L. (1996).** Activation of Vascular Endothelial Growth Factor Gene Transcription by Hypoxia-Inducible Factor 1. *Molecular and Cellular Biology*, 16(9), 4604-4613.

**Frank, A., Bonney, M., Bonney, S., Weitzel, L., Koeppen, M., & Eckle, T. (2012).** Myocardial Ischemia Reperfusion Injury: From Basic Science to Clinical Bedside. *Seminars in Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 16(3), 123-132.

**Fredholm, B. B. (2010).** Adenosine receptors as drug targets. *Experimental Cell Research*, 316(8), 1284-1288.

**Gai, C., Carpanetto, A., & Camussi, G. (2016).** Extracellular vesicle-mediated modulation of angiogenesis. *Histology and Histopathology*, 31, 379-391.

**Gardiner, C., Ferreira, Y. J., Dragovic, R. A., Christopher, W. G., Sargent, I. L., Gardiner, C., Ferreira, Y. J., et al. (2013).** Extracellular vesicle sizing and enumeration by nanoparticle tracking analysis. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2, 1-11.

**Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M. L., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., et al. (2001).** Vascular Trauma Induces Rapid but Transient Mobilization of VEGFR2 + AC133+Endothelial Precursor Cells. *Circulation Research*, 88, 167-174.



**Goodwill**, A. G., Dick, G. M., Kiel, A. M., & Tune, J. D. (2018). Regulation of Coronary Blood Flow. *Compr Physiol.*, 7(2), 321-382.

**Gramont**, A. D., Watson, S., Ellis, L. M., Rodón, J., Tabernero, J., Gramont, A. D., & Hamilton, S. R. (2015). Pragmatic issues in biomarker evaluation for target therapies in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 12, 197-212.

**Grange**, C., Tapparo, M., Collino, F., Vitillo, L., Damasco, C., Deregibus, M. C., Tetta, C., et al. (2011). Microvesicles Released from Human Renal Cancer Stem Cells Stimulate Angiogenesis and Formation of Lung Premetastatic Niche. *Cancer research*, 71, 5346-5357.

**Gregg**, A. R., Veyver, I. B. V. D., Gross, S. J., Madankumar, R., Rink, B. D., & Norton, M. E. (2014). Noninvasive Prenatal Screening by Next-Generation Sequencing. *Annu. Rev. Genomics Hum.*, 15, 327-347.

**Gray**, W. D., French, K. M., Ghosh-choudhary, S., Maxwell, J. T., Brown, M. E., Platt, M. O., Searles, C. D., et al. (2015). Identification of Therapeutic Covariant MicroRNA Clusters in Hypoxia-Treated Cardiac Progenitor Cell Exosomes Using Systems Biology. *Circulation Research*, 116, 255-263.

**Gu**, J.-wei, Ito, B. R., Sartin, A., Frascogna, N. A. N., Moore, M., Adair, T. H., Ito, B. R., et al. (2000). Inhibition of adenosine kinase induces expression of VEGF mRNA and protein in myocardial myoblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 279, 2116-2123.

**Gulati**, R., Peterson, T. E., Chatterjee, S., Shah, V., Vile, R. G., & Simari, R. D. (2003). Diverse Origin and Function of Cells With Endothelial Phenotype Obtained From Adult Human Blood. *Circulation Research*, 93, 1023-1025.

**Gulinelli**, S., Salaro, E., Vuerich, M., & Bozzato, D. (2012). IL-18 associates to microvesicles shed from human macrophages by a LPS / TLR-4 independent mechanism in response to P2X receptor stimulation. *European journal of immunology*, 42, 3334-3345.

**Guzmán-gutiérrez**, E., Sandoval, C., Nova, E., Castillo, J. L., Vera, J. C., Lamperti, L., Krause, B., et al. (2010). Differential expression of functional nucleoside transporters in non-differentiated and differentiated human endothelial progenitor cells. *Placenta*, 31(10), 928-936.

**Harper**, S. J., & Bates, D. O. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nature reviews. Cancer*, 8(11), 880-7

**Hayes**, O., Ramos, B., Rodriguez-alvarez, L., & Castro, F. O. (2005). Cell confluency is as efficient as serum starvation for inducing arrest in the G0 / G1 phase of the cell cycle in granulosa and fibroblast cells of cattle. *Animal Reproduction Science*, 87, 181-192.

**Heissig**, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, R., Crystal, R. G., et al. (2002). Recruitment of Stem and Progenitor Cells from the Bone Marrow Niche Requires MMP-9 Mediated Release of Kit-Ligand. *Cell*, 109(5), 625-637.

**Henne**, W. M., Buchkovich, N. J., & Emr, S. D. (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell*, 21(1), 77-91.

**Herrera**, M. B., Fonsato, V., Gatti, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantarella, D., Calogero, R., et al. (2010). Human liver stem cell-derived microvesicles accelerate hepatic regeneration in hepatectomized rats. *J. Cell Mol.Med*, 14(6), 1605-1618.

**Hergenreider**, E., Heydt, S., Tréguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A. J. G., Zeiher, A. M., Scheffer, M. P., et al. (2012). Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature cell biology*, 14(3), 249-256.

**Hill**, J., Zalos, G., & Finkel, T. (2003). Circulating Endothelial Progenitor Cells, Vascular Function, and Cardiovascular Risk. *The New England journal of medicine*, 348, 593-600.

**Heijnen**, B. H. F. G., Schiel, A. E., Fijnheer, R., Geuze, H. J., & Sixma, J. J. (1999). Activated Platelets Release Two Types of Membrane Vesicles: Microvesicles by Surface Shedding and Exosomes Derived From Exocytosis of Multivesicular Bodies and alpha-Granules. *Blood*, 3791-3800.

**Hood**, J. L., Pan, H., Lanza, G. M., & Wickline, S. A. (2009). Paracrine induction of endothelium by tumor exosomes. *Laboratory Investigation*, 89(11), 1317-1328.

**Hood**, J. L., Roman, S. S., & Wickline, S. A. (2011). Exosomes Released by Melanoma Cells Prepare Sentinel Lymph Nodes for Tumor Metastasis. *Cancer research*, 71(11), 3792-3802.

**Hur**, J., Yoon, C.-hwan, Kim, H.-soo, Choi, J.-ho, Kang, H.-jae, Hwang, K.-kook, Oh, B.-hee, et al. (2004). Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24, 288-293.

**Ibrahim**, A. G.-eldin, Cheng, K., & Marba, E. (2014). Exosomes as Critical Agents of Cardiac Regeneration Triggered by Cell Therapy. *Stem Cell Reports*, 2, 606-619.

**Ingram**, D. A., Caplice, N. M., & Yoder, M. C. (2005). Unresolved questions , changing definitions , and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood*, 106, 1525-1532.

**Ingram**, D. A., Mead, L. E., Tanaka, H., Meade, V., Fenoglio, A., Mortell, K., Ferkowicz, M. J., et al. (2004). Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 104(9), 2752-2760.

**Jeppesen**, D. K., Hvam, M. L., Primdahl-bengtson, B., Boysen, T., Whitehead, B., Dyrskjøt, L., Ørntoft, T. F., et al. (2017). Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation. *Journal of Extracellular Vesicles*, 3078(February), 1-16.

**Ji, Y., Ma, Y., Chen, X., Ji, X., Gao, J., Zhang, L. E. I., Ye, K. A. I., et al. (2017).** Microvesicles released from human embryonic stem cell derived-mesenchymal stem cells inhibit proliferation of leukemia cells. *Oncology Reports*, *38*, 1013-1020.

**Katara, R., Riu, F., Mitchell, K., Gubernator, M., Campagnolo, P., Cui, Y., Fortunato, O., et al. (2011).** Transplantation of Human Pericyte Progenitor Cells Improves the Repair of Infarcted Heart Through Activation of an Angiogenic Program Involving Micro-RNA-132. *Circulation Research*, *109*, 894-906.

**Katsman, D., Stackpole, E. J., Domin, D. R., & Farber, D. B. (2012).** Embryonic Stem Cell-Derived Microvesicles Induce Gene Expression Changes in Müller Cells of the Retina. *PLoS one*, *7*(11).

**Khoa, N. D., Montesinos, M. C., Adrienne, J., Kelly, M., Cronstein, B. N., Cells, E., & Cronstein, B. N. (2003).** Th1 Cytokines Regulate Adenosine Receptors and Their Downstream Signaling Elements in Human Microvascular Endothelial Cells. *Journal of Immunology*, *171*, 3991-3998.

**Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011).** Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical journal*, *437* (2), 169-83.

**Kholia, S., Ranghino, A., Garnieri, P., Lopatina, T., & Chiara, M. (2016).** Extracellular vesicles as new players in angiogenesis. *Vascular Pharmacology*, 1-7.

**Kourembanas, S. (2015).** Exosomes: Vehicles of Intercellular Signaling , Biomarkers , and Vectors of Cell Therapy. *Annu. Rev.Physiol*, *77*, 13-27.

**Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Welch, J. E., Svensson, K. J., & Fredlund, E. (2013).** Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *PNAS*, *110*(18), 7312-7317.

**Lee, C., Mitsialis, S. A., Aslam, M., Sally, H., Vergadi, E., Konstantinou, G., Sdrimas, K., et al. (2012).** Exosomes mediate the cytoprotective action of mesenchymal stromal cells on hypoxia induced pulmonary hypertension. *Circulation*, 126(22), 2601-2611.

**Ledoux, S., Runembert, I., Koumanov, K., Michel, J. B., Trugnan, G., & Friedlander, G. (2003).** Hypoxia Enhances Ecto-5'Nucleotidase Activity and Cell Surface Expression in Endothelial Cells. *Circulation Research*, 92, 848-855.

**Leibovich, S. J., Chen, J.-fan, Pinhal-enfield, G., Belem, P. C., Elson, G., Rosania, A., Ramanathan, M., et al. (2002).** Synergistic Up-Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Murine Macrophages by Adenosine A<sub>2A</sub> Receptor Agonists and Endotoxin. *The American Journal of Pathology*, 160(6), 2231-2244.

**Lesnik, P., & Chapman, M. J. (2006).** A New Dimension in the Vasculoprotective Function of HDL Progenitor-Mediated Endothelium Repair. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 26, 965-967.

**Li, Y.-feng, Ren, L.-na, Guo, G., Cannella, L. A., Chernaya, V., Samuel, S., Liu, S.-xuan, et al. (2015).** Endothelial progenitor cells in ischemic stroke: an exploration from hypothesis to therapy. *Journal of Hematology and Oncology*, 1-17.

**Li, X., Chen, C., Wei, L., Li, Q., Niu, X. I. N., Xu, Y., Wang, Y., et al. (2016).** Exosomes derived from endothelial progenitor cells attenuate vascular repair and accelerate reendothelialization by enhancing endothelial function. *Cytotherapy*, 18(2), 253-262.

**Li, Q., & Barres, B. A. (2018).** Microglia and macrophages in brain homeostasis and disease. *Nature Immunology*, 18(4), 225-242.

**Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2<sup>-CT</sup> Method. *Methods*, 408, 402-408.

**Lin, Y., Solovey, A., Hebbel, R. P., Lin, Y., Weisdorf, D. J., Solovey, A., & Hebbel, R. P. (2000).** Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *The Journal of Clinical Investigation*, 105(1), 71-77.

**Lin, C.-pei, Lin, F.-yen, Huang, P.-hsun, Chen, Y.-lien, Chen, W.-chi, Chen, H.-yi, Huang, Y.-chuen, et al. (2013).** Endothelial Progenitor Cell Dysfunction in Cardiovascular Diseases : Role of Reactive Oxygen Species and Inflammation. *Biomed Research International*, 2013, 1-10.

**Lopatina, T., Bruno, S., Tetta, C., Kalinina, N., Porta, M., & Camussi, G. (2014).** Platelet-derived growth factor regulates the secretion of extracellular vesicles by adipose mesenchymal stem cells and enhances their angiogenic potential. *Cell Communication and Signaling*, 12, 1-12.

**Ma, C., Wang, J., Liu, H., Chen, Y., Bihl, J., & Yang, Y. (2018).** Moderate Exercise Enhances Endothelial Progenitor Cell Exosomes Release and Function. *Medicine & Science in sports& exercise*, (10), 2024-2032.

**Mackenzie, A., Wilson, H. L., Kiss-toth, E., Dower, S. K., North, R. A., Surprenant, A., & Sheffield, S. (2001).** Rapid Secretion of Interleukin-1 by Microvesicle Shedding. *Immunity*, 8, 825-835.

**Marzesco, A.-marie. (2013).** Prominin-1-Containing Membrane Vesicles : Origins, Formation, and Utility. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1, 41-54.

**Masek, L., & Sweetenham, J. (1994).** Isolation and culture of endothelial cells from human bone marrow. *British Journal of Haematology*, 88, 855-865.

**Mathiyalagan, P., Liang, Y., Kim, D., & Sahoo, S. (2017).** Angiogenic Mechanisms of Human CD34+ Stem Cell Exosomes in the Repair of Ischemic Hindlimb. *Circulation Research*, 120(9), 1466-1476.

**Mause, S., & Weber, C. (2010).** Microparticles Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circulation Research*, 107, 1047-1057.

**Medina**, R. J., Neill, C. L. O., Sweeney, M., Guduric-fuchs, J., Gardiner, T. A., Simpson, D. A., & Stitt, A. W. (2010). Molecular analysis of endothelial progenitor cell ( EPC ) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Medical Genomics*, 3, 1-13.

**Miranville**, A., Heeschen, C., Sengenès, C., Curat, C. A., Busse, R., & Bouloumié, A. (2004). Improvement of Postnatal Neovascularization by Human Adipose Tissue – Derived Stem Cells. *Circulation*, 110, 349-355.

**Mittelbrunn**, M., & Sánchez-madrid, F. (2013). Intercellular communication : diverse structures for exchange of genetic information. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 13(5), 328-335.

**Mobius**, W., van Donselaar, E., Slot, J. ., & Geuze, H. . (2003). Recycling Compartments and the Internal Vesicles of Multivesicular Bodies Harbor Most of the Cholesterol Found in the Endocytic Pathway. *Traffic*, 4(1), 222-231.

**Moldovan**, N. I., & Asahara, T. (2003). Role of Blood Mononuclear Cells in Recanalization and Vascularization of Thrombi: Past , Present , and Future. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 13(7), 265-269.

**Montesinos**, M. C., Shaw, J. P., Yee, H., Shamamian, P., & Cronstein, B. N. (2004). Short Communication Adenosine A 2A Receptor Activation Promotes Wound Neovascularization by Stimulating Angiogenesis and. *The American Journal of Pathology*, 164(6), 1887-1892.

**Mukai**, N., Akahori, T., Komaki, M., Li, Q., Kanayasu-toyoda, T., Amagasa, T., & Morita, I. (2008). A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells. *Experimental Cell Research*, 430-440.

**Multhoff**, G., Hall, A. R., & Davidson, S. M. (2015). Plasma Exosomes Protect the Myocardium From Ischemia-Reperfusion Injury. *Journal of the American College of Cardiology*, 65(15), 1525-1536.

**Murohara**, T., Matsui, K., Imaizumi, T., Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., et al. (2000). Transplanted cord blood – derived endothelial

precursor cells augment postnatal neovascularization. *The Journal of Clinical Investigation*, 105, 1527-1536.

**Nazarenko**, I., Rana, S., Baumann, A., Mcalendar, J., Hellwig, A., Trendelenburg, M., Lochnit, G., et al. (2010). Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer research*, 70(21),1668-1678.

**Nolan**, D. J., Ciarrocchi, A., Mellick, A. S., Nolan, D. J., Ciarrocchi, A., Mellick, A. S., Jaggi, J. S., et al. (2007). Bone marrow-derived endothelial progenitor cells are a major determinant of nascent tumor neovascularization. *Genes & development*, 21, 1546-1558.

**O'Loughlin**, A. J., Woffindale, C. A., & Wood, M. J. A. (2012). Exosomes and the Emerging Field of Exosome-Based Gene Therapy. *Current Gene Therapy*, 12, 262-274.

**Orozco**, A. F., & Lewis, D. E. (2010). Flow Cytometric Analysis of Circulating Microparticles in Plasma. *Cytometry A.*, 77A, 502-514.

**Patel** J, D. P. (2016). Concise Review: Functional Definition of Endothelial Progenitor Cells: A Molecular Perspective. *Stem Cell Translational Medicine*, 5, 1302-1306.

**Patel**, J., Wong Yi, H., & Wang, W. (2016). Self-Renewal and High Proliferative Colony Forming Capacity of Late-Outgrowth Endothelial Progenitors Is Regulated by Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Driven by Notch Signaling. *Stem Cell*, 34, 902-912.

**Palviainen**, M., Saari, H., Kärkkäinen, O., Pekkinen, J., Auriola, S., & Yliperttula, M. (2019). Metabolic signature of extracellular vesicles depends on the cell culture conditions. *Journal of Extracellular Vesicles*, 8(1), 1-12.

**Parolini**, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., Milito, A. D., Coscia, C., et al. (2009). Microenvironmental pH Is a Key Factor for Exosome Traffic in Tumor Cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(49), 34211-34222.



**Pearson**, J. D. (2008). Endothelial progenitor cells – hype or hope? *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7, 255-262.

**Peichev**, M., Naiyer, A. J., Pereira, D., Zhu, Z., Lane, W. J., Williams, M., Oz, M. C., et al. (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34 cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*, 95, 952-959.

**Peterson**, M. F., Otoc, N., Sethi, J. K., Gupta, A., & Antes, T. J. (2015). Integrated systems for exosome investigation. *Methods*, 87, 31-45.

**Pinhal-enfield**, G., Ramanathan, M., Hasko, G., Vogel, S. N., Salzman, A. L., Boons, G.-jan, & Leibovich, S. J. (2003). An Angiogenic Switch in Macrophages synergy between toll-like receptors 2,3,7 and Adenosine A 2A Receptors. *The American Journal of Pathology*, 163(2), 711-721.

**Pizzirani**, C., Ferrari, D., Chiozzi, P., Adinolfi, E., Sandona, D., Savaglio, E., & Virgilio, F. D. (2007). Stimulation of P2 receptors causes release of IL-1B – loaded microvesicles from human dendritic cells. *Blood*, 109(9), 3856-3864.

**Poliakov**, A., Spilman, M., Dokland, T., Amling, C. L., & Mobley, J. A. (2008). Structural Heterogeneity and Protein Composition of Exosome-Like Vesicles (Prostasomes) in Human Semen. *The Prostate*.

**Pospichalova**, V., Svoboda, J., Dave, Z., Kotrbova, A., Klemova, D., Ilkovic, L., Hampl, A., et al. (2015). Simplified protocol for flow cytometry analysis of fluorescently labeled exosomes and microvesicles using dedicated flow cytometer. *Journal of Extracellular Vesicles*, 4, 1-15.

**Qu**, Y., Franchi, L., Nunez, G., George, R., Qu, Y., Franchi, L., Nunez, G., et al. (2007). Nonclassical IL-1B secretion stimulated by P2X7 Receptors is Dependent on Inflammasome Activation and Correlated with Exosome Release in Murine Macrophages. *The Journal of Immunology*, 179, 1913-1925.

**Quesenberry**, P. J., Aliotta, J., Deregibus, M. C., & Camussi, G. (2015). Role of extracellular RNA-carrying vesicles in cell differentiation and reprogramming. *Stem Cell Research & Therapy*, 1-10.

**Rafii**, S., Shapiro, F., Rinnarachin, J., Nachrnan, R. L., Ferris, B., Weksler, B., Moore, M. A. S., et al. (1994). Isolation and Characterization of Human Bone Marrow Microvascular Endothelial Cells: Hematopoietic Progenitor Cell Adhesion. *Blood*, 1, 10-19.

**Rafii**, S., Lyden, D., Benezra, R., Hattori, K., & Heissig, B. (2002). Vascular and haematopoietic stem cells : novel targets for anti-angiogenesis therapy ? *Nature*, 2, 826-835.

**Rani**, S., Ryan, A. E., Griffin, M. D., & Ritter, T (2015). Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles : Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular Therapy*, 23(5), 812-823.

**Ranguino**, A., Cantaluppi, V., Grange, C., Vitillo, L., Segoloni, G., & Gamussi, G. (2012). Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 25(1), 75-85.

**Raposo**, G., & Stoorvogel, W.(2013). Extracellular vesicles : Exosomes , microvesicles , and friends. *JCB*, 200(4), 373-383.

**Ratajczak**, J., Miekus, K., Kucia, M., Zhang, J., Reca, R., Dvorak, P., & Ratajczak, M. Z. (2006). Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors : evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 20, 847-856.

**Riazifar**, M., Pone, E. J., Lötvall, J., & Zhao, W. (2017). Stem Cell Extracellular Vesicles: Extended Messages of Regeneration. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 57, 125-154.

**Rehman, J., Li, J., Orschell, C. M., & March, K. L. (2003).** Peripheral Blood “Endothelial Progenitor Cells ” Are Derived From Monocyte / Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation*, 107, 1164-1169.

**Rehman, J., Li, J., Parvathaneni, L., Karlsson, G., & March, K. L. (2004).** Exercise Acutely Increases Circulating Endothelial Progenitor Cells and Monocyte-/Macrophage- Derived Angiogenic Cells. *Journal of the American College of Cardiology*, 43(12), 2314-2318.

**Roberts Jr, C., & Kurre, P. (2013).** Vesicle Trafficking and RNA Transfer Add Complexity and Connectivity to Cell – Cell Communication. *Cancer research*, 35(16), 3200-3206.

**Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014).** Regulation of immune responses by extracellular vesicles. *Nature*, 14(3), 195-208.

**Rose, J., & Erzurum, S. (2016).** Biology and Flow Cytometry of Proangiogenic Hematopoietic Progenitors Cells. *Cytometry A.*, 87(1), 5-19.

**Ryzhov, S., Solenkova, N. V., Goldstein, A. E., Lamparter, M., Fleenor, T., Young, P. P., Greelish, J. P., et al. (2008).** Adenosine Receptor – Mediated Adhesion of Endothelial Progenitors to Cardiac Microvascular Endothelial Cells. *Circulation Research*, 102, 356-363.

**Sahoo, S., Ph, D., Klychko, E., Ph, D., Thorne, T., Misener, S., Shinnick, K., et al. (2011).** Exosomes from Human CD34+ Stem Cells Mediate their Pro-angiogenic Paracrine Activity. *Circulation Research*, 109(7), 724-728.

**Sala-Newby, G. B., Freeman, N. V. E., Curto, M. A., & Newby, A. C. (2003).** Metabolic and functional consequences of cytosolic 5'-nucleotidase-IA overexpression in neonatal rat cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 285, 991-998.

**Salomon, C., Illanes, S. E., Mitchell, M. D., & Rice, G. E. (2014).** Extravillous trophoblast cells-derived exosomes promote vascular smooth muscle cell migration. *Frontiers in Pharmacology*, 5, 1-13.

**Santo, S. D., Seiler, S., Fuchs, A.-lena, Staudigl, J., & Widmer, H. R. (2014).** The Secretome of Endothelial Progenitor Cells Promotes Brain Endothelial Cell Activity through PI3-Kinase and. *PLoS one*, 9(4).

**Savina, A., Furla, M., Vidal, M., & Colombo, M. I. (2003).** Exosome Release Is Regulated by a Calcium-dependent Mechanism in K562 Cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(22).

**Shtam, T. A., Naryzhny, S. N., Landa, S. B., Burdakov, V. S., Artamonova, T. O., & Filatov, M. V. (2012).** Purification and in vitro Analysis of Exosomes Secreted by Malignantly Transformed Human Cells. *Cell and Tissue Biology*, 6(4), 421-429.

**Seeger, F. H., Haendeler, J., Walter, D. H., Rochwalsky, U., Reinhold, J., Urbich, C., Rössig, L., et al. (2005).** p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Downregulates Endothelial Progenitor Cells. *Circulation*, 111, 1184-1191.

**Segura, E., Guérin, C., Hogg, N., Segura, E., Gue, C., Hogg, N., & Amigorena, S. (2007).** CD8+ Dendritic Cells Use LFA-1 to Capture MHC -Peptide Complexes from Exosomes in Vivo. *The Journal of Immunology*, 179, 1489-1496.

**Schmeisser, A., Garlich, C. D., Zhang, H., Eskafi, S., Graffy, C., Ludwig, J., Strasser, R. H., et al. (2001).** Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel® under angiogenic conditions. *Cardiovascular research*, 49, 671-680.

**Sheldon, H., Heikamp, E., Turley, H., Dragovic, R., Thomas, P., Oon, C. E., Leek, R., et al. (2010).** New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by Delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*, 116(13), 2385-2395

**Shen, B., Wu, N., Yang, J.-ming, & Gould, S. J. (2011).** Protein Targeting to Exosomes/Microvesicles by Plasma Membrane Anchors. *The Journal of biological chemistry*, 286(16), 14383-14395.

**Shiojima, I., & Walsh, K. (2002).** Role of Akt Signaling in Vascular Homeostasis and Angiogenesis. *Circulation Research*, 90, 1243-1250.

**Sipos, P. I., Crocker, I. P., Hubel, C. A., & Baker, P. N. (2010).** Endothelial Progenitor Cells: Their Potential in the Placental Vasculature and Related Complications. *Placenta*, 31(1), 1-10.

**Steinman, R. A., Wentzel, A., Lu, Y., Stehle, C., & Grandis, J. R. (2003).** Activation of Stat3 by cell confluence reveals negative regulation of Stat3 by cdk2. *Oncogene*, 22, 3608-3615.

**Suárez, H., Gámez-valero, A., Reyes, R., López-martín, S., Josefa, M., Carrascosa, J.L., Cabañas, C., et al. (2017).** A bead-assisted flow cytometry method for the semi Quantitative analysis of Extracellular Vesicles. *Scientific Reports*, 7, 1-11.

**Sun, J., Zhang, Z., Ma, T., Yang, Z., Zhang, J., Liu, X., Lu, D., et al. (2018).** Endothelial progenitor cell-derived exosomes , loaded with miR-126 , promoted deep vein thrombosis resolution and recanalization. *Stem Cell Research and Therapy*, 9, 1-11.

**Svensson, K. J., Kucharzewska, P., Christianson, H. C., Sköld, S., & Löfstedt, T. (2011).** Hypoxia triggers a proangiogenic pathway involving cancer cell microvesicles and PAR-2 – mediated heparin-binding EGF signaling in endothelial cells. *PNAS*, 108(32), 13147-13152.

**Szataneck, R., Baran, J., Siedlar, M., & Baj-krzyworzeka, M. (2015).** Isolation of extracellular vesicles : Determining the correct approach (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 11-17.

**Szataneck, R., Baj-krzyworzeka, M., Zimoch, J., & Lekka, M. (2017).** The Methods of Choice for Extracellular Vesicles (EVs) Characterization. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 1-18.

**Takayuki, A. (2011).** Concise Review : Circulating Endothelial Progenitor Cells for. *Stem cells*, 29, 1650-1655.

**Takahashi, K., Sawasaki, Y., & Goto, T. (1990).** Spontaneous Transformation and Immortalization of Human Endothelial Cells. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, 26(3), 265-274.

**Tan, C. Y., Lai, R. C., Wong, W., Dan, Y. Y., Lim, S.-kiang, & Ho, H. K. (2014).** Mesenchymal stem cell-derived exosomes promote hepatic regeneration in drug-induced liver injury models. *Stem Cell Research and Therapy*, 5(76), 1-14.

**Théry, C., Duban, L., & Amigorena, S. (2002).** Indirect activation of naïve CD4 + T cells by dendritic cell – derived exosomes. *Nature Immunology*, 3, 1156-1162.

**Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009).** Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Review Immunology*, 9.

**Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., et al. (2018).** Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *Journal of Extracellular Vesicles*, 7, 1-43.

**Tian, Y., Li, S., Song, J., Ji, T., Zhu, M., Anderson, G. J., Wei, J., et al. (2014).** A doxorubicin delivery platform using engineered natural membrane vesicle exosomes for targeted tumor therapy. *Biomaterials*, 35(7), 2383-2390.

**Timmermans, F., Hauwermeiren, F. V., Smedt, M. D., Raedt, R., Plasschaert, F., Buyzere, M. L. D., Gillebert, T. C., et al. (2007).** Endothelial Outgrowth Cells Are Not Derived From CD133+ Cells or CD45+ Hematopoietic Precursors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 27, 1572-1579.

**Todorova, D., Simoncini, S., Lacroix, R., Sabatier, F., & Dignat-george, F. (2017).** Extracellular Vesicles in Angiogenesis. *Circulation Research*, 120, 1658-1673.

**Tugues, S.**, Koch, S., Gualandi, L., Li, X., & Claesson-welsh, L. (2011). Vascular endothelial growth factors and receptors : Anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer. *Molecular aspects of medicine*, 32, 88-111.

**Vallabhaneni, K. C.**, Penfornis, P., Dhule, S., Adams, K. V., Mo, Y. Y., Xu, R., Liu, Y., et al. (2014). Extracellular vesicles from bone marrow mesenchymal stem / stromal cells transport tumor regulatory microRNA, proteins, and metabolites. *Oncotarget*, 6(7), 4953-4967.

**Villarroya-beltri, C.**, Baixauli, F., & Gutiérrez-vázquez, C. (2014). Sorting It Out: Regulation of Exosome Loading. *Seminars in cancer biology*, 28, 3-13.

**Van der Pol, E.**, & Van Leeuwen, T. (2012). Single vs . swarm detection of microparticles and exosomes by flow cytometry. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 10, 919-930.

**Vitillo, L.**, Biancone, L., Deregibus, M. C., Segoloni, G. P., Camussi, G., & Homburg, B. (2012). Endothelial progenitor cell-derived microvesicles improve neovascularization in a murine model of hindlimb ischemia. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 25(1), 75-85.

**Wang, S.**, Aurora, A. B., Johnson, B. A., Qi, X., McAnally, J., Hill, J. A., Richardson, J. A., et al. (2008). The Endothelial-Specific MicroRNA miR-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Developmental Cell*, 15, 261-271.

**Wang, J.**, Chen, S., Ma, X., Cheng, C., Xiao, X., Chen, J., Liu, S., et al. (2013). Effects of Endothelial Progenitor Cell-Derived Microvesicles on Hypoxia / Reoxygenation-Induced Endothelial Dysfunction and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*.

**Wang, X.**, Huang, W., Liu, G., & Fan, G.-C. (2014). Cardiomyocytes mediate anti-angiogenesis in type 2 diabetic rats through the exosomal transfer of miR-320 into endothelial cells. *J Mol Cell Cardiol*, 74, 139-150.

**Wang, Y.**, Zhang, L., Li, Y., Chen, L., Wang, X., Guo, W., Zhang, X., et al. (2015). Exosomes/microvesicles from induced pluripotent stem cells deliver

cardioprotective miRNAs and prevent cardiomyocyte apoptosis in the ischemic myocardium. *International Journal of Cardiology*.

**Wang, X.**, Gu, H., Qin, D., Yang, L., Huang, W., Essandoh, K., Wang, Y., et al. (2015). Exosomal miR-223 Contributes to Mesenchymal Stem Cell-Elicited Cardioprotection in Polymicrobial Sepsis. *Scientific Reports*, 5(13721), 1-16.

**Wang, J.**, Zhong, Y., Ma, X., Xiao, X., Cheng, C., & Chen, Y. (2016). Analyses of Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells Released Microvesicles by Using Microbead and Q-dot Based Nanoparticle Tracking Analysis. *Nature*, 1-10.

**Wang, J.**, Guo, R., Yang, Y., Jacobs, B., Chen, S., Iwuchukwu, I., Gaines, K. J., et al. (2016). The Novel Methods for Analysis of Exosomes Released from Endothelial Cells and Endothelial Progenitor Cells. *Stem cells International*, 2016.

**Weissman, I. L.**, Anderson, D. J., & Gage, F. (2001). Stem and progenitor cells : Origins, Phenotypes, Lineage Commitments, and Transdifferentiations. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 387-403.

**Wendt, S.**, Goetzenich, A., Goettsch, C., Stoppe, C., Bleilevens, C., Kraemer, S., & Benstoem, C (2018). Evaluation of the cardioprotective potential of extracellular vesicles – a systematic review and meta- analysis. *Scientific Reports*, 8(15702), 1-14.

**Whiteside, T. L.** (2015).The potential of tumor-derived exosomes for noninvasive cancer monitoring. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 15(10), 1293-1310.

**Witwer, K. W.**, Buzás, E. I., Bemis, L. T., Bora, A., Lötval, J., Hoen, E. N. N., Piper, M. G., et al. (2013). Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2.



**Wu, X.**, Liu, Z., Hu, L., Gu, W., Liu, Z., Hu, L., Gu, W., et al. (2018). Exosomes derived from endothelial progenitor cells ameliorate acute lung injury by transferring miR-126. *Experimental Cell Research*.

**Würdinger, T.**, Tannous, B. A., Saydam, O., Skog, J., & Grau, S. (2008). miR-296 Regulates Growth Factor Receptor Overexpression in Angiogenic Endothelial Cells. *Cancer Cell*, 14, 382-393.

**Xu, Y.**, Wang, Y., Yan, S., Zhou, Y., Yang, Q., Pan, Y., Zeng, X., et al. (2017). Intracellular adenosine regulates epigenetic programming in endothelial cells to promote angiogenesis. *EMBO Molecular Medicine*, 9, 1263-1278.

**Yañez-Mó, M.**, Siljander, P. R., Andreu, Z., Bedina, A., Borràs, F. E., Buzas, E. I., Buzas, K., et al. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles*.

**Yoon, C.-hwan**, Hur, J., Park, K.-woo, Kim, J.-hyun, Lee, C.-soo, Oh, I.-young, Kim, T.-youn, et al. (2005). Synergistic Neovascularization by Mixed Transplantation of Early Endothelial Progenitor Cells and Late Outgrowth Endothelial Cells. *Circulation*, 112, 1618-1627.

**Yu, J.**, Vodyanik, M. A., Smuga-otto, K., Antosiewicz-bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., et al. (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*, 318.

**Yuan, A.**, Farber, E. L., Rapoport, A. L., Tejada, D., Deniskin, R., Akhmedov, N. B., & Farber, D. B. (2009). Transfer of MicroRNAs by Embryonic Stem Cell Microvesicles. *PloS one*, 4(3), 1-8.

**Zeringer, E.**, Barta, T., Li, M., & Vlassov, A. V (2015). Strategies for Isolation of Exosomes. *Cold Spring Harb Protoc*, 319-324.

**Zhang, H.-chao**, Liu, X.-bin, Huang, S., Bi, X.-yun, Wang, H.-xiang, Xie, L.-xian, Wang, Y.-qi, et al. (2012). Microvesicles Derived from Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Hypoxia Promote Angiogenesis Both In Vitro and In Vivo. *Stem Cells and Development*, 21(18), 3289-3297.

**Zhang, J., Chen, C., Hu, B., Niu, X., Liu, X., & Zhang, G. (2016).** Exosomes Derived from Human Endothelial Progenitor Cells Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis Through Erk1 / 2 Signaling. *International Journal of Biological Sciences*, 12(12), 1472-1487.

**Zhang, B., Wang, M., & Gong, A. (2015).** HucMSC-Exosome Mediated-Wnt4 Signaling Is Required for Cutaneous Wound Healing. *Stem cells*, 33, 2158-2168.

**Zhu, Y.-gang, Feng, X.-mei, & Abbott, J. (2014).** Human Mesenchymal Stem Cell Microvesicles for Treatment of E.coli Endotoxin -Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cell Translational Medicine*, 32(1), 116-125

**Zhu, Y.-gang, Feng, X.-mei, & Abbott, J. (2014).** Human Mesenchymal Stem Cell Microvesicles for Treatment of E.coli Endotoxin -Induced Acute Lung Injury in Mice. *Stem Cell Translational Medicine*, 32(1), 116-125.

**Zuk, P., Angeles, L., Zhu, M., Therapeutics, C., Mizuno, H., & Huang, J. I. (2001).** Multilineage Cells from Human Adipose Tissue : Implications for Cell-Based Therapies. *Tissue Engineering*, 7, 211-228.