

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Tese será disponibilizado
somente a partir de 24/06/2023.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DE microRNA-140 EM VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA SINOVIAL EQUINA**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Botucatu, São Paulo
Junho de 2021.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO
ANIMAL

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO DE microRNA-140 EM VESÍCULAS
EXTRACELULARES SECRETADAS POR CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE MEMBRANA SINOVIAL EQUINA**

JOÃO PEDRO HÜBBE PFEIFER

Tese apresentada junto ao Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia Animal
para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dra Ana Liz Garcia Alves

Botucatu, São Paulo
Junho de 2021.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Pfeifer, João Pedro Hübbe.

Avaliação de microRNA-140 em vesículas extracelulares secretadas por células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina / João Pedro Hübbe Pfeifer. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Ana Liz Garcia Alves

Capes: 50501003

1. Exossomos. 2. Osteoartrite. 3. Nanotecnologia. 4. Proloterapia. 5. MicroRNA. 6. Células-tronco mesenquimais. 7. Membrana sinovial.

Palavras-chave: Exossomos; Nanotecnologia; Osteoartrite; Proloterapia; microRNA.

Autor: João Pedro Hübbe Pfeifer

Data: 24 de junho de 2021.

Comissão Examinadora

Prof.^a Dra. Ana Liz Garcia Alves

Presidente da mesa e orientadora.

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof.^o Dr. Rogério Martins Amorim

Membro Titular

Departamento de Clínica Veterinária

FMVZ, UNESP, Botucatu

Prof.^a Dra. Elenice Deffune

Membro Titular

Departamento de Especialidades Cirúrgicas e Anestesiologia – Laboratório
de Engenharia Tecidual

Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu

Prof.^o Dr. Tiago Lazzaretti Fernandes

Membro Titular

Departamento de Ortopedia e Traumatologia – Instituto de Ortopedia e
Traumatologia

Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina, USP, São Paulo

Prof.^o Dr. Juliano Coelho da Silveira

Membro Titular

Departamento de Medicina Veterinária

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga

Agradecimentos

Agradeço a Deus por todas as situações colocadas em minha vida, muitas difíceis, porém todas serviram de aprendizado, que levarei em meu trajeto profissional e pessoal.

A forma com que lidamos essas situações nos molda, forma nosso caráter, e caráter é uma lapidação constante, que quem começa o primeiro entalho são nossos pais, através dos ensinamentos e principalmente como exemplos a seguir, e aqui em especial agradeço à minha mãe, Maria da Graça, por ser exemplo de força e sempre me mostrar o que é certo, e do que é feito o caráter de um homem de bem, correto e principalmente justo. Agradeço ao meu pai, Luiz Fernando e meus irmãos, Fernando, Luiz Francisco e Luiz Felipe, por serem exemplo de pessoas e grandes profissionais, espelhos a serem seguidos. Agradeço à minha companheira, Marina, por sempre estar de braços abertos em todos os momentos de felicidade ou nos mais sensíveis, longe ou perto.

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Ana Liz, por ter me aceito como aluno de estágio curricular, mestrado e doutorado. Foram anos de convivência e de aprendizado constante. A sua experiência profissional e como pessoa, demonstra força e seriedade, refletido em sua carreira. Levarei comigo seus ensinamentos e seu exemplo como profissional e pessoa, à conheci e convivi como orientadora, hoje tenho certeza de que tenho uma amiga. És um exemplo para todos os seus alunos.

Agradeço aos meus colegas de grupo de pesquisa, pois sem as discussões científicas, os períodos de experimentos práticos, os momentos de aprendizado mútuo e, claro, os momentos de descontração nada disso seria possível. A ajuda de vocês foi essencial para desenvolver este projeto. Portanto, este trabalho também é de vocês. Os conheci colegas, hoje, os tenho como amigos.

Agradeço a todos os professores que passaram em minha vida do ensino básico, graduação e pós-graduação, os quais ajudaram a lapidar minha carreira profissional. E, aos amigos que mesmo longe, estiveram comigo me apoiando em diversos momentos, infelizmente cada vez nos vemos menos, mas amigos de verdade sempre serão os mesmos.

Agradeço ao apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de Doutorado e auxílio para desenvolvimento do projeto. E à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CNPq) pela bolsa durante o período inicial do doutorado.

Obrigado.

SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	8
Capítulo 1	10
1.1. INTRODUÇÃO.....	10
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	12
1.2.1. <i>Células Tronco Mesenquimais, Vesículas Extracelulares e microRNA na Osteoartrite</i>	12
1.2.2. <i>Vesículas Extracelulares</i>	14
1.2.2.1. <i>Biogênese das Vesículas Extracelulares</i>	16
1.2.2.1.1. <i>Mecanismos da Biogênese dos Exossomos</i>	19
1.2.2.1.2. <i>Mecanismos da Biogênese das Microvesículas</i>	21
1.2.3. <i>microRNAs</i>	23
1.2.3.1. <i>Biogênese dos microRNAs</i>	24
1.2.4. <i>Osteoartrite</i>	28
1.2.4.1. <i>microRNA-140 na Osteoartrite</i>	31
1.3. JUSTIFICATIVA.....	35
1.4. HIPÓTESE.....	35
1.5. OBJETIVOS	36
1.5.1. <i>Objetivo Geral</i>	36
1.5.2. <i>Objetivos específicos</i>	37
1.6. REFERÊNCIAS	37
Capítulo 2	47
2.1. ARTIGO CIENTÍFICO.....	47

PFEIFER, J.P.H., Avaliação de microRNA-140 em vesículas extracelulares secretadas por células tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial equina. Botucatu, 2021, 88p, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

RESUMO

A função parácrina das células-tronco (MSCs) é desempenhada também por vesículas extracelulares (VEs). Assim, as VEs têm impacto funcional nas células-alvo e nos mecanismos de controle de enfermidades por meio da entrega de microRNAs. A exemplo, na osteoartrite, em que a homeostase articular é regulada pelo microRNA-140. O objetivo deste trabalho foi caracterizar vesículas extracelulares (VEs) liberadas por células-tronco mesenquimais derivadas de membrana sinovial (eqSMMSC) e avaliar a expressão de microRNA-140 nas VEs e nas eqSMMSC em dois modelos de cultivo celular, além de, comparar a secreção de VEs e a expressão do microRNA-140 em ambiente inflamatório *in vitro*. Quatro grupos experimentais foram definidos. Grupos controle, um cultivo de eqSMMSCs 2D e um cultivo de eqSMMSCs 3D. Grupos induzidos, também divididos em 2D-OA e 3D-OA, porém foram expostos ao meio de cultivo simulando o ambiente inflamatório da osteoartrite “OA-Like” (IL-1 β e TNF- α). Amostras dos meios de cultivo de todos os grupos foram coletadas após 24, 72 e 120 horas de incubação para isolamento e caracterização de VEs. O isolamento de VEs foi realizado com *kit* comercial pelo método de precipitação. A caracterização foi realizada pela NTA, MET e expressão de mRNA das tetraspaninas CD9, CD63 e CD81. A análise da expressão do microRNA-140 em VEs e células por RT-qPCR e do mRNA da ADAMTS5 também por RT-qPCR. As VEs puderam ser isoladas e caracterizadas em todos os grupos e momentos experimentais. A expressão do microRNA-140 nas eqSMMSCs, o grupo 3D-OA teve maior expressão em relação aos demais grupos nos momentos 24 h e em 72 h à ambos os controles e ao 2D-OA; no momento 120 h, houve maior expressão do grupo 3D em relação aos tratados 2D-OA e 3D-OA. Já a expressão do microRNA-140 nas VEs, destaca-se no momento 72 h, onde o grupo 3D teve expressão significativa em relação aos demais, e no momento 120 h, a expressão também significativa foi do 2D-OA em relação aos demais. Na análise

da expressão do mRNA ADAMTS5, pode-se destacar o momento 120 h, onde o grupo 3D-OA obteve maior expressão em relação aos controles 2D e 3D. Os dados obtidos apontaram que o modelo e as técnicas utilizadas foram eficazes para o isolamento e caracterização das VEs e para a identificação da expressão de microRNA nos diferentes grupos e momentos. A expressão do microRNA-140 em resposta ao ambiente inflamatório é desempenhada por eqSMMSCs, sendo que, em células 3D demonstrou-se ser rápida e em VEs oriundas de células cultivadas em 2D tardia.

Palavras-chave: exossomos, microRNA, osteoartrite, proloterapia, nanotecnologia.

PFEIFER, J.P.H., Evaluation of microRNA-140 inside extracellular vesicles secreted by equine synovial membrane-derived mesenchymal stem cells. Botucatu, 2021, 88p, São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho”, School of Veterinary Medicine and Animal Science.

ABSTRACT

The paracrine function of stem cells (MSCs) is mainly performed by extracellular vesicles (EVs). Thus, the EV have functional impact on target cells and mechanisms of disease control through delivery microRNAs. For example, in osteoarthritis, in which joint homeostasis is regulated by microRNA-140. The objective of this work was to characterize extracellular vesicles (EVs) released by synovial membrane derived-mesenchymal stem cells (eqSMMSC) and to evaluate the expression of microRNA-140 in EVs and eqSMMSC cultivated in two cell culture models, in addition to comparing the secretion of EVs and the expression of microRNA-140 in an *in vitro* inflammatory environment. smMSCs were cultured and divided into four experimental groups. Control groups, one cultivation of 2D eqSMMSCs and one cultivation of 3D eqSMMSCs. Treated groups, also divided into 2D-OA and 3D-OA but were exposed to the culture medium simulating the “OA-Like” osteoarthritis inflammatory environment (IL-1 β and TNF- α). Culture media samples from all groups were collected after 24, 72 and 120 hours of incubation for isolation and characterization of EVs. Isolation of EVs was performed with a commercial kit using the precipitation method. Characterization was performed by NTA, TEM and mRNA expression of tetraspanins CD9, CD63 and CD81. Analysis of microRNA-140 expression in EVs and cells by RT-qPCR and ADAMTS5 mRNA in EVs also by RT-qPCR. EVs could be isolated and characterized in all groups and time points. The expression of microRNA-140 in eqSMMSCs, the 3D-OA group had greater expression in relation to the other groups at time points 24 h; and in 72 h for both controls and 2D-OA; at 120 h, there was greater expression in the 3D group compared to those treated 2D-OA and 3D-OA. The expression of microRNA-140 in EVs stands out at 72 h, where the 3D group had significant expression in relation to the others, and at 120 h, the expression was also significant for 2D-OA in relation to the others. In ADAMTS5 analysis of mRNA expression, the 120 h time point can be

highlighted, where the 3D-OA group showed higher expression compared to control 2D and 3D. The data obtained showed that the model and the techniques used were effective for the isolation and characterization of EVs and for the identification of microRNA expression in different groups and time points. The expression of microRNA-140 in response to the inflammatory environment is performed by eqSMMSCs, and it was shown to be early in 3D cells and late in EVs from cells grown in 2D.

Keywords: exosomes, microRNA, osteoarthritis, prolotherapy, nanotechnology.

Conflito de interesses

Todos os autores declararam que não possuem conflito de interesses.

Referências

1. Caplan AI. Mesenchymal stem cells: Time to change the name! *Stem Cells Transl. Med.* 2017. p. 1445–51.
2. Li Z, Zhang Z, Ming WK, Chen X, Xiao XM. Tracing GFP-labeled WJMSCs in vivo using a chronic salpingitis model: An animal experiment. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2017;8:1–11.
3. Carvalho AM, Yamada ALM, Golim MA, Álvarez LEC, Hussni CA, Alves ALG. Evaluation of mesenchymal stem cell migration after equine tendonitis therapy. *Equine Vet J.* 2014;46:635–8.
4. Cassano JM, Schnabel L V., Goodale MB, Fortier LA. The immunomodulatory function of equine MSCs is enhanced by priming through an inflammatory microenvironment or TLR3 ligand. *Vet Immunol Immunopathol* [Internet]. Elsevier; 2018;195:33–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2017.10.003>
5. Lange-Consiglio A, Lazzari B, Perrini C, Pizzi F, Stella A, Cremonesi F, et al. MicroRNAs of Equine Amniotic Mesenchymal Cell-derived Microvesicles and Their Involvement in Anti-inflammatory Processes. *Cell Transplant.* 2018;27:45–54.
6. Ragni E, Perucca Orfei C, De Luca P, Mondadori C, Viganò M, Colombini A, et al. Inflammatory priming enhances mesenchymal stromal cell secretome potential as a clinical product for regenerative medicine approaches through secreted factors and EV-miRNAs: the example of joint disease. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:165.
7. Park KS, Bandeira E, Shelke G V., Lässer C, Lötval J. Enhancement of therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2019;10:1–15.
8. Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney*

- Int [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;78:838–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ki.2010.278>
9. Ratajczak J, Miekus K, Kucia M, Zhang J, Reca R, Dvorak P, et al. Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: Evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*. 2006;20:847–56.
10. Crivelli B, Chlapanidas T, Perteghella S, Lucarelli E, Pascucci L, Brini AT, et al. Mesenchymal stem/stromal cell extracellular vesicles: From active principle to next generation drug delivery system. *J Control Release* [Internet]. Elsevier; 2017;262:104–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.07.023>
11. Miyaki S, Asahara H. Macro view of microRNA function in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*. Nature Publishing Group; 2012;8:543–52.
12. Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, Van Eijndhoven MAJ, Hopmans ES, Lindenberg JL, et al. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:6328–33.
13. Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. 2010;285:17442–52.
14. Qiu G, Zheng G, Ge M, Wang J, Huang R, Shu Q, et al. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles affect disease outcomes via transfer of microRNAs. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2018;9:320.
15. McIlwraith CW, Frisbie DD, Kawcak CE. The horse as a model of naturally occurring osteoarthritis. *Bone Joint Res*. 2012;1:297–309.
16. Kuyinu EL, Narayanan G, Nair LS, Laurencin CT. Animal models of osteoarthritis: Classification, update, and measurement of outcomes. *J Orthop Surg Res* [Internet]. Journal of Orthopaedic Surgery and Research; 2016;11:1–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13018-016-0346-5>
17. Ribitsch I, Baptista PM, Lange-Consiglio A, Melotti L, Patruno M, Jenner F, et al. Large Animal Models in Regenerative Medicine and Tissue Engineering: To Do or Not to Do. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:1–28.
18. Frisbie DD, Ghivizzani SC, Robbins PD, Evans CH, McIlwraith CW. Treatment of experimental equine osteoarthritis by in vivo delivery of the equine interleukin-1 receptor antagonist gene. *Gene Ther* [Internet]. 2002;9:12–20. Available from: <https://www.nature.com/articles/3301608.pdf>

- 943 19. Mobasheri A, Bay-Jensen AC, van Spil WE, Larkin J, Levesque MC.
 944 Osteoarthritis Year in Review 2016: biomarkers (biochemical markers).
 945 Osteoarthr Cartil [Internet]. Elsevier Ltd; 2017;25:199–208. Available from:
 946 <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2016.12.016>
- 947 20. Budd E, Nalesso G, Mobasheri A. Extracellular genomic biomarkers of
 948 osteoarthritis. Expert Rev Mol Diagn [Internet]. Taylor & Francis; 2018;18:55–74.
 949 Available from: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1415757>
- 950 21. Iliopoulos D, Malizos KN, Oikonomou P, Tsezou A. Integrative MicroRNA and
 951 proteomic approaches identify novel osteoarthritis genes and their collaborative
 952 metabolic and inflammatory networks. PLoS One. 2008;3.
- 953 22. Miyaki S, Nakasa T, Otsuki S, Grogan SP, Higashiyama R, Inoue A, et al.
 954 MicroRNA-140 is expressed in differentiated human articular chondrocytes and
 955 modulates interleukin-1 responses. Arthritis Rheum. 2009;60:2723–30.
- 956 23. Nakamura Y, Inloes JB, Katagiri T, Kobayashi T. Chondrocyte-Specific
 957 MicroRNA-140 Regulates Endochondral Bone Development and Targets Dnpep
 958 To Modulate Bone Morphogenetic Protein Signaling. Mol Cell Biol.
 959 2011;31:3019–28.
- 960 24. Buechli ME, LaMarre J, Koch TG. MicroRNA-140 Expression During
 961 Chondrogenic Differentiation of Equine Cord Blood-Derived Mesenchymal
 962 Stromal Cells. Stem Cells Dev [Internet]. 2013;22:1288–96. Available from:
 963 <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2012.0411>
- 964 25. van der Kolk JH, Pacholewska A, Gerber V. The role of microRNAs in equine
 965 medicine: a review. Vet. Q. 2015. p. 88–96.
- 966 26. Yin CM, Suen WCW, Lin S, Wu XM, Li G, Pan XH. Dysregulation of both miR-
 967 140-3p and miR-140-5p in synovial fluid correlate with osteoarthritis severity.
 968 Bone Jt Res. 2017;6:612–8.
- 969 27. Tardif G, Hum D, Pelletier JP, Duval N, Martel-Pelletier J. Regulation of the
 970 IGFBP-5 and MMP-13 genes by the microRNAs miR-140 and miR-27a in human
 971 osteoarthritic chondrocytes. BMC Musculoskelet Disord. 2009;10:1–11.
- 972 28. Miyaki S, Sato T, Inoue A, Otsuki S, Ito Y, Yokoyama S, et al. MicroRNA-140
 973 plays dual roles in both cartilage development and homeostasis. Genes Dev.
 974 2010;24:1173–85.
- 975 29. Kobayashi H, Hirata M, Saito T, Itoh S, Chung U II, Kawaguchi H.

- Transcriptional induction of ADAMTS5 protein by nuclear factor- κ B (NF- κ B) family member RelA/p65 in chondrocytes during osteoarthritis development. *J Biol Chem* [Internet]. © 2013 ASBMB. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.; 2013;288:28620–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M113.452169>
30. Sandy JD, Chan DD, Trevino RL, Wimmer MA, Plaas A. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;23:1939–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2015.03.027>
31. Glasson SS, Askew R, Sheppard B, Carito B, Blanchet T, Ma H-L, et al. Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis. *Nature* [Internet]. Macmillan Magazines Ltd.; 2005;434:644. Available from: <https://doi.org/10.1038/nature03369>
32. Karlsen TA, de Souza GA, Ødegaard B, Engebretsen L, Brinchmann JE. microRNA-140 Inhibits Inflammation and Stimulates Chondrogenesis in a Model of Interleukin 1 β -induced Osteoarthritis. *Mol Ther - Nucleic Acids*. 2016;5:e373.
33. Tao SC, Yuan T, Zhang YL, Yin WJ, Guo SC, Zhang CQ. Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. *Theranostics*. 2017;7:180–95.
34. He L, He T, Xing J, Zhou Q, Fan L, Liu C, et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomes protect cartilage damage and relieve knee osteoarthritis pain in a rat model of osteoarthritis. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:1–15.
35. Duan L, Liang Y, Xu X, Xiao Y, Wang D. Recent progress on the role of miR-140 in cartilage matrix remodelling and its implications for osteoarthritis treatment. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*; 2020;22:1–9.
36. Santos VH, Pfeifer JPH, de Souza JB, Milani BHG, de Oliveira RA, Assis MG, et al. Culture of mesenchymal stem cells derived from equine synovial membrane in alginate hydrogel microcapsules. *BMC Vet Res* [Internet]. BMC Veterinary Research; 2018;14:114. Available from: <https://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12917-018-1425-0>
37. Santos VH Dos, Pfeifer JPH, Souza JB De, Stievani FDC, Hussni CA, Golim

- MDA, et al. Evaluation of alginate hydrogel encapsulated mesenchymal stem cell migration in horses. *Res Vet Sci*. 2019;124:38–45.
38. Théry C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina R, et al. 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. *J Extracell Vesicles*. 2018;7.
39. Sylvester J, El Mabrouk M, Ahmad R, Chaudry A, Zafarullah M. Interleukin-1 induction of aggrecanase gene expression in human articular chondrocytes is mediated by mitogen-activated protein kinases. *Cell Physiol Biochem*. 2012;30:563–74.
40. Westacott CI, Barakat AF, Wood L, Perry MJ, Neison P, Bisbinas I, et al. Tumor necrosis factor alpha can contribute to focal loss of cartilage in osteoarthritis. *Osteoarthr Cartil*. 2000;8:213–21.
41. Lässer C, Eldh M, Lötval J. Isolation and characterization of RNA-containing exosomes. *J Vis Exp*. 2012;1–6.
42. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25:402–8.
43. Sun L, Wang X, Kaplan DL. A 3D cartilage - Inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;32:5581–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.028>
44. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2012;37:106–26.
45. Cassano JM, Schnabel L V., Goodale MB, Fortier LA. Inflammatory licensed equine MSCs are chondroprotective and exhibit enhanced immunomodulation in an inflammatory environment. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2018;9:1–13.
46. Lange-Consiglio A, Romele P, Magatti M, Silini A, Idda A, Martino NA, et al. Priming with inflammatory cytokines is not a prerequisite to increase immune-suppressive effects and responsiveness of equine amniotic mesenchymal stromal cells. *Stem Cell Res Ther. Stem Cell Research & Therapy*; 2020;11:1–14.
47. Barrachina L, Remacha AR, Romero A, Vázquez FJ, Albareda J, Prades M,

- et al. Priming Equine Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells with Proinflammatory Cytokines: Implications in Immunomodulation-Immunogenicity Balance, Cell Viability, and Differentiation Potential. *Stem Cells Dev.* 2017;26:15–24.
48. Zech D, Rana S, Büchler MW, Zöller M. Tumor-exosomes and leukocyte activation: An ambivalent crosstalk. *Cell Commun Signal.* 2012;10:1–17.
49. Mulcahy LA, Pink RC, Carter DRF. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles.* 2014;3:1–14.
50. Van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. Nature Publishing Group; 2018;19:213–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2017.125>
51. Hwang WL, Lan HY, Cheng WC, Huang SC, Yang MH. Tumor stem-like cell-derived exosomal RNAs prime neutrophils for facilitating tumorigenesis of colon cancer. *J Hematol Oncol. Journal of Hematology & Oncology*; 2019;12:1–17.
52. Viñuela-Berni V, Doníz-Padilla L, Figueroa-Vega N, Portillo-Salazar H, Abud-Mendoza C, Baranda L, et al. Proportions of several types of plasma and urine microparticles are increased in patients with rheumatoid arthritis with active disease. *Clin Exp Immunol.* 2015;180:442–51.
53. Johnson CI, Argyle DJ, Clements DN. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;209:40–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011>
54. Deregibus MC, Figliolini F, D'Antico S, Manzini PM, Pasquino C, De Lena M, et al. Charge-based precipitation of extracellular vesicles. *Int J Mol Med.* 2016;38:1359–66.
55. Klymiuk MC, Balz N, Elashry MI, Heimann M, Wenisch S, Arnhold S. Exosomes isolation and identification from equine mesenchymal stem cells. *BMC Vet Res. BMC Veterinary Research*; 2019;15:1–9.
56. Patel GK, Khan MA, Zubair H, Srivastava SK, Khushman M, Singh S, et al. Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications. *Sci Rep.* 2019;9:1–10.
57. Chairoungdua A, Smith DL, Pochard P, Hull M, Caplan MJ. Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *J Cell Biol.* 2010;190:1079–91.

- 1075 58. Stuffers S, Sem Wegner C, Stenmark H, Brech A. Multivesicular endosome
1076 biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*. 2009;10:925–37.
- 1077 59. Edgar JR, Eden ER, Futter CE. Hrs- and CD63-Dependent Competing
1078 Mechanisms Make Different Sized Endosomal Intraluminal Vesicles. *Traffic*.
1079 2014;15:197–211.
- 1080 60. Lange-Consiglio A, Lazzari B, Pizzi F, Stella A, Girani A, Quintè A, et al.
1081 Different culture times affect MicroRNA cargo in equine amniotic mesenchymal
1082 cells and their microvesicles. *Tissue Eng. - Part C Methods*. 2018. p. 596–604.
- 1083 61. Nakamura Y, He X, Kato H, Wakitani S, Kobayashi T, Watanabe S, et al.
1084 Sox9 is upstream of microRNA-140 in cartilage. *Appl Biochem Biotechnol*.
1085 2012;166:64–71.
- 1086 62. Boeuf S, Graf F, Fischer J, Moradi B, Little CB, Richter W. Regulation of
1087 aggrecanases from the ADAMTS family and aggrecan neoepitope formation
1088 during in vitro chondrogenesis of human mesenchymal stem cells. *Eur Cells*
1089 *Mater*. 2012;23:320–32.
- 1090 63. Fosang AJ, Rogerson FM, East CJ, Stanton H. ADAMTS-5: The story so far.
1091 *Eur Cells Mater*. 2008;15:11–26.
- 1092 64. Liu S, Nigam C, Koh EY, Stains JP. Connexin43 mediated delivery of
1093 ADAMTS5 targeting siRNAs from mesenchymal stem cells to synovial
1094 fibroblasts. *PLoS One*. 2015;10:1–15.
- 1095 65. Hu N, Gao Y, Jayasuriya CT, Liu W, Du H, Ding J, et al. Chondrogenic
1096 induction of human osteoarthritic cartilage-derived mesenchymal stem cells
1097 activates mineralization and hypertrophic and osteogenic gene expression
1098 through a mechanomiR. *Arthritis Res Ther. Arthritis Research & Therapy*;
1099 2019;21:1–14.
- 1100