



FACULTADE DE CIENCIAS DA SAÚDE

MESTRADO EN ASISTENCIA E INVESTIGACIÓN SANITARIA

**ESPECIALIDADE: FUNDAMENTOS DE INVESTIGACIÓN
BIOMÉDICA**

Curso académico 2017-2018

TRABALLO DE FIN DE MESTRADO

**Papel de la ruta mTOR sobre el
envejecimiento de las células madre**

Miriam Morente López

21 de Junio de 2018



La Dra. María del Carmen Arufe Gonda, investigadora principal del grupo de Terapia celular y Medicina Regenerativa de la Universidad de A Coruña

CERTIFICA QUE

La presente memoria de Trabajo de Fin de Grado “Papel de la ruta mTOR sobre el envejecimiento de las células madre” presentada por Miriam Morente López, fue realizada bajo su dirección en el instituto de investigación biomédica de A Coruña (INIBIC), fue revisada y se encuentra en disposición de ser presentada.

Para que así conste, firman el presente certificado en A Coruña, a 14 de Junio de 2018.

Asdo. Maria del Carmen Arufe Gonda

Asdo. Miriam Morente López

Resumen

Las células madre mesenquimales (CMMs) tienen una amplia capacidad de auto-renovación, un amplio potencial de diferenciación y propiedades inmunosupresoras. Una desventaja en las aplicaciones clínicas es su limitada viabilidad cuando existe un microambiente adverso. Las vesículas extracelulares (VEs), tales como los exosomas y microvesículas, son liberadas por las células en el medio, participando en la interacción entre ellas, facilitando la presentación de antígenos, la señalización trans a las células vecinas y la transferencia de ARN y proteínas.

Se seleccionaron CMMs procedentes de médula ósea de individuos juveniles y adultos de ratas Wistar y sus VEs fueron aisladas, y caracterizadas por citometría de flujo. Se trataron las células con las VEs obtenidas de las diferentes poblaciones, juvenil y adulta. El objetivo fue determinar si estas VEs modificaban la ruta de mTOR de las CMM donde se introducían, demostrando así su capacidad comunicativa. Se realizaron estudios proteómicos mediante Western Blot y génicos mediante qPCR-RT para determinar el nivel de expresión de los genes y proteínas de la ruta mTOR. Además, se intentó evaluar el papel de RICTOR en dicha ruta mediante la inhibición del miR-188-3p a través de VEs en una población juvenil de CMMs.

Las VEs internalizan en las CMMs independientemente de la edad y producen cambios en la expresión de genes y proteínas relacionados con el envejecimiento en la ruta de mTOR. La transfección de las CMMs juveniles con el miR-188-3p reveló que sus VEs modificaban la senescencia de las CMMs adultas tratadas con las mismas. Nuevos experimentos deben ser realizados para demostrar que el microRNA está actuando sobre el RICTOR.

Resumo

As células nai mesenquimais (CNMs) teñen unha ampla capacidade de auto-renovación, un amplo potencial de diferenciación e propiedades inmunosupresoras. Unha desventaxe nas aplicacións clínicas é a súa limitada viabilidade cando existe un microambiente adverso. As vesículas extracelulares (VEs), tales coma os exosomas e microvesículas, son liberadas polas células no medio, participando na interacción entre elas, facilitando a presentación de antíxenos, a sinalización trans ás células veciñas e a transferencia de ARN e proteínas.

Seleccionáronse CNMs procedentes de médula ósea de individuos xuvenís e adultos de ratas Wistar e as súas VEs foron illadas, e caracterizadas por citometría de fluxo. Tratáronse as células coas VEs obtidas das diferentes poboacións, xuvenil e adulta. O obxectivo foi determinar se estas VEs modificaban a ruta de mTOR das CNM onde se introducían, demostrando así a súa capacidade comunicativa. Realizáronse estudos proteómicos, a partir destas CNMs modificadas, estudos proteómicos mediante Western Blot e xénicos mediante qPCR-RT para determinar o nivel de expresión dos xenes e proteínas da ruta mTOR. Ademais, intentouse avaliar o papel do RICTOR na ruta mediante a inhibición do miR-188-3p a través de VEs nunha poboación xuvenil de CNMs.

As VEs internalizan nas CNMs independentemente da idade e producen cambios na expresión de xenes e proteínas relacionados co avellantamento na ruta de mTOR. A transfección das CNMs xuvenís co miR-188-3p revelou que as súas VEs modificaban a senescencia das CNMs adultas tratadas coas mesmas. Novos experimentos deben ser realizados para demostrar que o microRNA está actuando sobre o RICTOR.

Abstract

Mesenchymal stem cells (MSCs) have a broad capacity for self-renewal, a broad potential for differentiation and immunosuppressive properties. A disadvantage in clinical applications is their limited viability when there is an adverse microenvironment. Extracellular vesicles (EVs), such as exosomes and microvesicles, are released by the cells in the medium, participating in the interaction between them, improving their antigen retrieval, trans- signaling to neighboring cells and the transfer of RNA and proteins.

Bone marrow MSCs from young and adult Wistar rats were selected and their EVs were isolated, and characterized by flow cytometry. The cells were treated with the EVs obtained from the different populations, young and adult. The objective was to determine if these EVs modified the mTOR pathway, involved in senescence, of the CMM where they were introduced, thus demonstrating their communicative capacity. From these modified CMMs, proteomic and genetic studies were carried out by Western Blot and qPCR-RT respectively were done. In addition, an attempt was made to evaluate the role of RICTOR in this route by inhibition miR-188-3p through VEs in a juvenile population of CMMs.

The VEs internalize in the CMMs regardless of age and produce changes in the expression of genes and proteins related to aging in the mTOR pathway. The transfection of the young CMMs with the miR-188-3p revealed that their Evs modified the senescence of the adult CMM treated with them. New experiments must be performed to show that miRNA is working through the RICTOR.

Índice

1. Introducción.....	1
1.1. Células madre.....	1
1.2. Células madre mesenquimales.....	5
1.3. Envejecimiento celular.....	5
1.4. Vesículas extracelulares (VEs).....	7
1.5. miRNAs.....	10
1.6. Aplicaciones de las células madre y de los tratamientos con VEs.....	11
2. Objetivos	13
3. Material y métodos	14
3.1. Aislamiento y cultivo de CMMs	14
3.2. Caracterización de las CMMs por citometría de flujo.....	15
3.3. Extracción de exosomas.....	16
3.4. Cultivo de CMMs con VEs.....	16
3.5. Extracción de proteína y ARN de CMMs.....	17
3.6. Tinción con Plata de las proteínas	18
3.7. Western Blot.....	19
3.8. Retro transcripción y análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real con Syber Green	20
3.9. Transfección.....	21
3.10. Retro transcripción y análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real con Sondas Taqman (qRT-PCR).....	¡Error! Marcador no definido.
3.11. Tinción de Beta-galactosidasa asociada a la senescencia	23
3.12. Estadística	23
4. Resultados	24

4.1.	Caracterización de las CMMs por citometría de flujo	24
4.2.	Tinción con Plata de las proteínas	25
4.3.	Efecto de las VEs sobre las CMMs	26
4.3.1.	Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con Syber Green	26
4.3.2.	Western Blot.....	30
4.4.	Efecto del miR-188-3p sobre la ruta mTOR.....	34
4.4.1.	Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con sondas Taqman	34
4.4.2.	Western Blot.....	35
4.4.3.	Tinción con β -galactosidasa	36
5.	Discusión	38
6.	Conclusiones	40
7.	Bibliografía.....	41
8.	Anexos.....	47

1. Introducción

1.1. Células madre

Las células madre son células indiferenciadas, inmaduras, autorrenovables y capaces de diferenciarse en distintos tipos de células especializadas (1).

La especialización tiene lugar en el desarrollo embrionario. Una vez fecundado el óvulo, la célula o cigoto comienza a dividirse rápidamente dando lugar a nuevas células. A medida que el cuerpo del embrión se va desarrollando las células comienzan la especialización celular que es un proceso irreversible que da lugar a la clasificación de las células madre según su potencial de diferenciación tal y como se muestra en la Figura 1 (2):

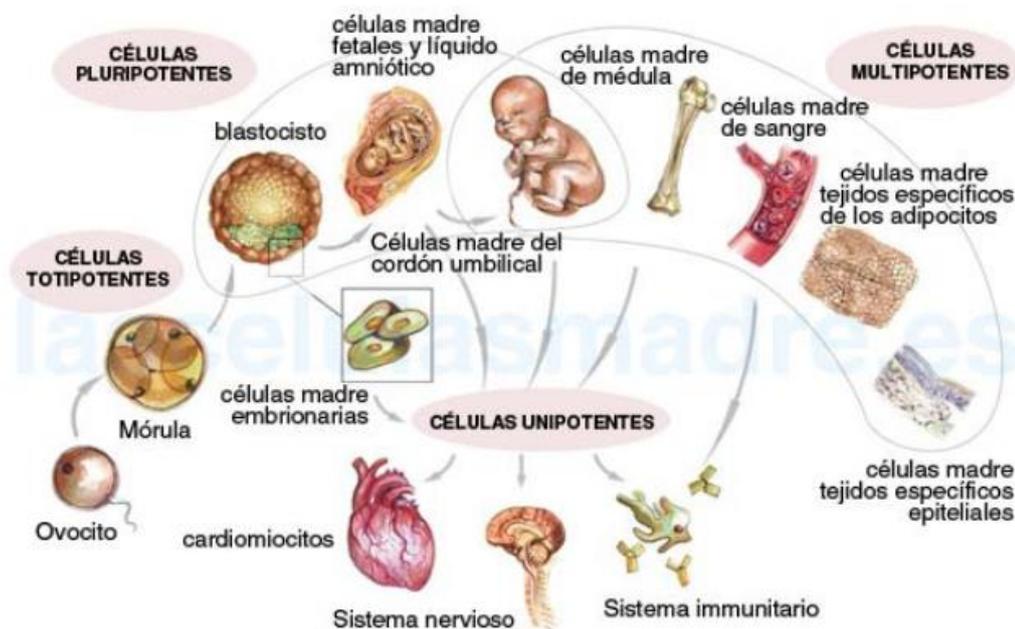


Figura 1. Clasificación de las células madre según el potencial de diferenciación (2).

- **Células madre totipotentes:** Pueden ser obtenidas y observadas en las primeras etapas del desarrollo embrionario (blastómeros, células de la mórula y cigoto, el cual constituye la célula madre totipotente por excelencia) (3-5). Éstas tienen la capacidad de crear nuevos embriones y formar un organismo completo, ya que pueden diferenciarse en cualquier tipo celular (Figura 2): tejido embrionario (ectodermo, mesodermo y endodermo) y tejido extraembrionario (placenta, amnios, saco vitelino, alantoides y corion) (6,7).
- **Células madre pluripotentes:** Se localizan en el polo embrionario del blastocisto. Poseen la capacidad de diferenciarse en cualquier tejido o tipo celular correspondiente a los 3 linajes embrionarios (Figura 2) (endodermo, ectodermo y mesodermo), incluyendo las células sexuales o germinales (3, 4,7) que componen un organismo adulto (4, 6,7). Por consiguiente, no pueden formar un organismo completo.
- **Células madre multipotentes:** Son aquellas capaces de generar células de su propia capa embrionaria (tejidos del endodermo, ectodermo y mesodermo) (5-7). Pueden generar un órgano en su totalidad, sea en el embrión o en el individuo adulto (3-4). Este tipo de células puede obtenerse de una gran variedad de fuentes (cerebro, la piel, el músculo cardíaco y esquelético, la retina y el páncreas) entre las que destacan la médula ósea y la sangre del cordón umbilical (8).
- **Células madre unipotentes:** A diferencia de los demás tipos de células madre, las unipotenciales, también llamadas oligopotenciales, presentan la menor potencialidad debido a que solo pueden especializarse a un solo linaje celular (9).

Además de por su potencialidad, tal y como se muestra en la Tabla I, las células madre pueden clasificarse dependiendo de su lugar de origen o procedencia en: células madre embrionarias (CME) y células madre adultas (CMA) o también conocidas como células madre mesenquimales (CMM) (10). Recientemente se ha logrado identificar un nuevo tipo, las células madre pluripotenciales inducidas (iPS), descubiertas por John B. Gurdon y Shinya Yamanaka (11).

- **Células madre embrionarias:** Son las que se encuentran en las primeras fases del desarrollo embrionario y son capaces de producir cualquier clase de célula del cuerpo; en otras palabras, son células pluripotentes.
- **Células madre adultas:** Se clasifican como células madre multipotentes y unipotentes, donde el proceso celular de diferenciación, después de formadas las 3 capas embrionarias, es irreversible. El papel de estas células es conservar y restaurar el tejido donde se encuentren (12); prácticamente todos los tejidos presentan una población de CMA que no se dividen pero ayudan a la conservación del tejido, las más conocidas son las pertenecientes a la médula ósea y la piel, que sí suelen dividirse constantemente.
- **Células pluripotentes inducidas (iPS):** Células somáticas que han sido sometidas a un proceso de reprogramación nuclear mediante la expresión ectópica de factores de transcripción específicos y que adquiere características moleculares y funcionales de pluripotencia que la hacen semejante a una célula madre embrionaria (13).

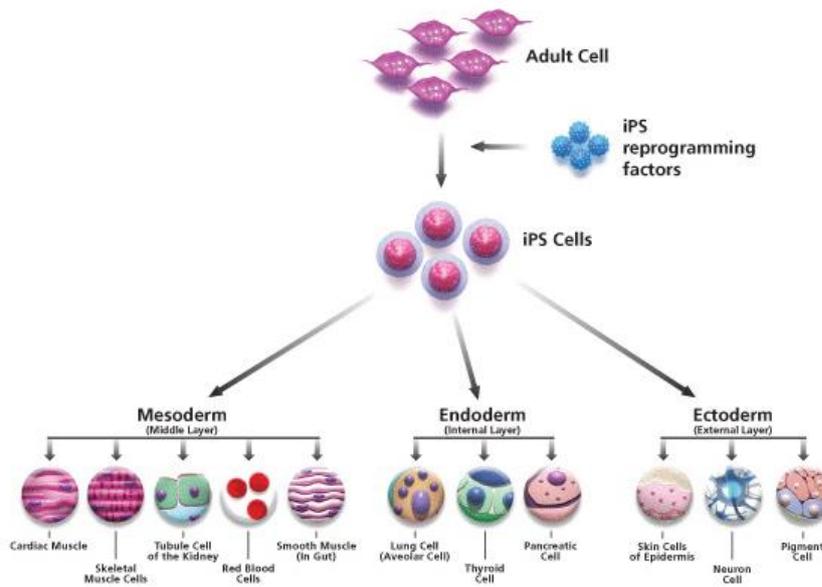


Figura 2. Clasificación de las células madre adultas según los tejidos o tipos celulares a los que pueden diferenciarse (1).

Tabla I. Principales diferencias entre células adultas y embrionarias (1).

ADULTAS	EMBRIONARIAS
Multipotentes	Pluripotentes
Versátiles	Poco versátiles
Numerosas	Poco numerosas y repartidas por todo el cuerpo
Fáciles de obtener	Difíciles de obtener
Favorecen el crecimiento celular descontrolado y la aparición del cáncer	Crecimiento celular normal y sin riesgo tumoral
Se obtienen de tejidos adultos o del cordón umbilical sin necesidad de destruir embriones	Se obtienen destruyendo embriones

1.2. Células madre mesenquimales

Las células madre mesenquimales (CMMs), son un grupo de células madres adultas adherentes, de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos, condrocitos y adipocitos (14,15). En el año 2006, la Sociedad Internacional de Terapia Celular propuso tres criterios para definir las CMMs:

- Las células deben ser adherentes en cultivo.
- Deben expresar los antígenos CD73 (marcador de mecanismos de adhesión celular) (16), CD90 (marcador de precursores mesenquimales tempranos que pueden diferenciarse en osteoblastos) (17) y CD105 (marcador de procesos de angiogénesis y reparación vascular) (18) y mostrar ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45.
- Deben ser capaces de diferenciarse in vitro en osteoblastos, adipocitos y condrocitos bajo condiciones estándar de cultivo (19,20).

También se debe tener en cuenta los procesos de autorenovación y de diferenciación hacia tejidos de diferentes capas embrionarias como ectodermo y endodermo (21,22).

1.3. Envejecimiento celular

El envejecimiento celular representa la acumulación progresiva con los años de lesiones celulares subletales que pueden conducir a la muerte celular o, al menos, a una disminución de la capacidad de la célula para responder a la lesión. Las señas del envejecimiento celular son (23):

- La fosforilación oxidativa por las mitocondrias se ve reducida, como lo está también la síntesis de los ácidos nucleicos, de las proteínas

estructurales y enzimáticas, de los receptores celulares y de los factores de transcripción (24).

- Acumulación progresiva de daño en el ADN llevando a una inestabilidad genómica (25).
- Acortamiento de los telómeros debido a la supresión de la actividad de la telomerasa (26).
- Daño en las macromoléculas causadas por Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) (24-27).
- Cambios en el patrón de expresión provocados por alteraciones epigenéticas que incluyen cambios influenciados por el entorno (27).

En lo que más nos vamos a centrar en este estudio es en la activación de las rutas de señalización celular como la diana de rapamicina en células de mamífero mTOR (28), la cual está asociada con la pérdida de quiescencia y envejecimiento prematuro. Esta ruta es una red proteica de regulación de procesos involucrados en el crecimiento y la diferenciación celular, que constituye un interruptor funcional entre el metabolismo anabólico y catabólico de la célula mediante dos complejos moleculares con funciones diferentes: mTORC1 (sensible a la rapamicina y asociado con la proteína Raptor que regula de forma positiva el crecimiento celular y la síntesis proteica) y mTORC2 (insensible a la rapamicina, y asociado a la proteína Rictor que regula y modula el desarrollo del citoesqueleto y la supervivencia celular) (29). Además la pérdida de AKT y mTOR, proteínas procedentes de esta ruta, puede estar reduciendo la acumulación de daños en el DNA durante el envejecimiento celular. Todos estos defectos epigenéticos y mutagénicos acumulados provocan cambios en las células madre (30):

- Morfológicos: El incremento del tamaño está relacionado con la senescencia (31).
- Proliferación: Disminución de la proliferación durante el envejecimiento (32).

- **Diferenciación:** La capacidad de las CMMs para diferenciarse en varios tipos de tejido cambia con la edad, aumentando el potencial adipogénico y disminuyendo el osteogénico (33).

1.4. Vesículas extracelulares

Un papel importante para la validación de nuestro estudio es el de las vesículas extracelulares (VE), que son partículas formadas por una membrana lipídica que pueden transmitir señales biológicas reguladoras mediante la transferencia de proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, miRNA, DNA mitocondrial y DNA genómico que regulan diversos procesos fisiológicos, así como en el desarrollo y progresión de enfermedades (34-37). Se originan tanto en el interior de las células como en la membrana plasmática (38,39).

En el contexto fisiológico, todas las células pueden producir VE como mecanismo habitual de comunicación paracrina/endocrina, si bien en el momento en que tiene lugar un daño la producción de VE se ve aumentada y el contenido vesicular modificado para alertar a las células adyacentes, progenitoras y del sistema inmunitario. Todo ello, para intentar restablecer la homeostasis del tejido dañado. Solamente las células progenitoras y las CMMs pueden generar VE con capacidad protectora o regeneradora intrínseca.

El origen y tamaño de las VE nos permite diferenciar entre exosomas (EX) y microvesículas (MV) (Figura 3).

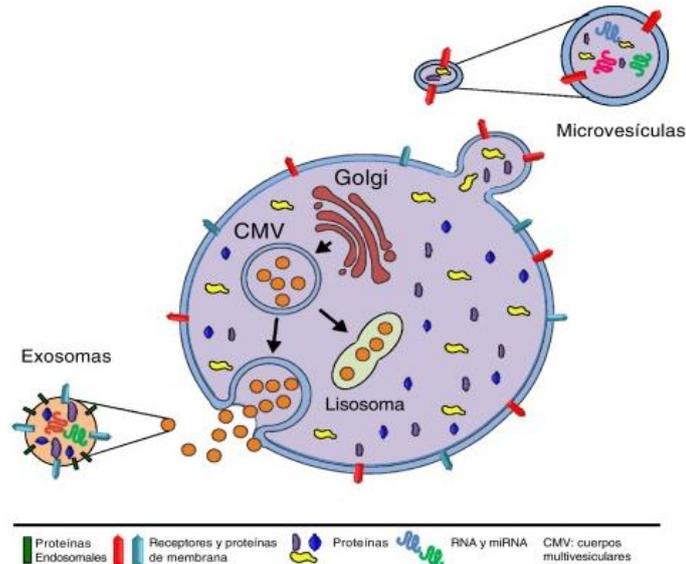


Figura 3. Origen y composición de las vesículas extracelulares (38,39).

Los exosomas son vesículas de tamaño pequeño (70-150 nm) y tienen un origen endosomal. En cambio, las microvesículas tienen un tamaño mayor (150-1.000 nm), se generan como resultado de evaginaciones de la membrana plasmática y su composición depende del tipo celular del que proceden (40,41) (Tabla II). Las VEs pueden actuar mediante 3 mecanismos (Figura 4):

- I) Activando una vía de señalización de la célula diana por su adhesión con elevada especificidad en la superficie de la célula diana (sin fusión de membrana), mediante las moléculas de adhesión y los receptores presentes en la superficie celular (42).
- II) Transfiriendo mRNA, miRNA, proteínas y moléculas de señalización, mediante la fusión de la membrana (43).
- III) Incorporando su contenido mediante endocitosis en las células diana y procesado de su contenido en el compartimento endosomal (44).

I. Introducción

Tabla II. Características de las vesículas extracelulares (40,41)

Características	Exosomas	Microvesículas
Tamaño en nanómetros (nm)	70-150	150-1.000
Composición lipídica	Poca exposición de fosfatidilserina. Ácido lisobifosfatídico. Colesterol y ceramida	Elevada exposición de fosfatidilserina. Colesterol
Marcadores proteicos	Alix, TSG101, HSC70, CD63, CD81, CD9	Selectinas, integrinas, CD40, metaloproteinasas
Origen	Cuerpo multivesicular	Membrana plasmática
Mecanismos de secreción	Exocitosis del cuerpo multivesicular	Evaginación de la membrana plasmática
Composición	Proteínas, mRNA y miRNA	Proteínas, mRNA y miRNA

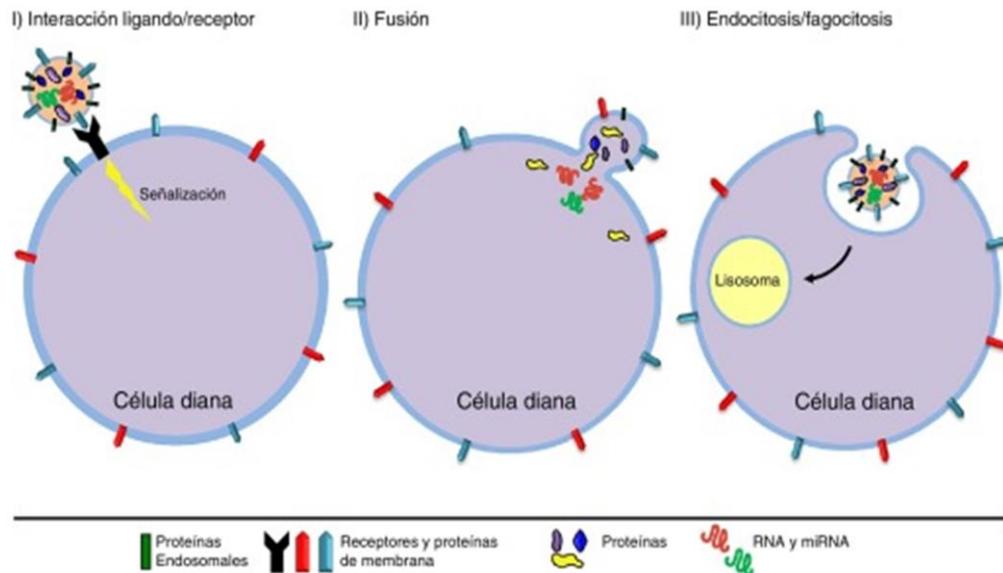


Figura 4. Mecanismos de actuación de las vesículas extracelulares (42-44).

1.5. miRNAs

Los microARN (miARN) son una clase de pequeñas moléculas de ARN no codificante, de aproximadamente 21-25 nucleótidos de longitud. Son parcialmente complementarios a una o más moléculas de ARN mensajero (ARNm), y su función principal es regular la expresión génica de muchas maneras, incluida la represión traduccional, la escisión del ARNm y la desadenilación. Fueron descritos por primera vez en 1993 por Lee y sus colegas, y el término microARN se acuñó en 2001 (45).

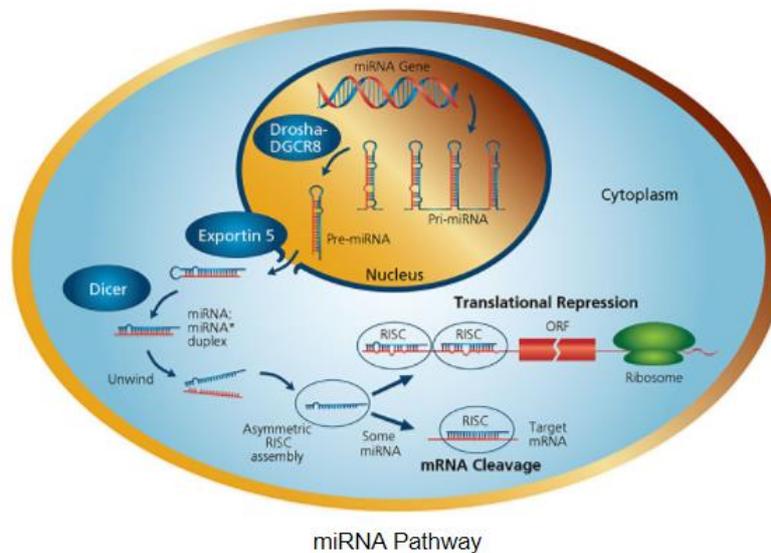


Figura 5. Ruta miRNA (45).

Los genes que codifican miRNAs son mucho más largos que la molécula de miRNA madura procesada. Se sabe que muchos miRNAs residen en intrones de sus genes de hospedador pre-mRNA y comparten sus elementos reguladores, la transcripción primaria y tienen un perfil de expresión similar. Para el resto de los genes miARN que se transcriben a partir de sus propios promotores, se han identificado completamente pocos transcritos primarios.

La ruta de biogénesis de miARN, tal y como se muestra en la Figura 5, comienza en el núcleo (186). Los microARN son transcritos por la ARN

polimerasa II como grandes precursores de ARN llamados pri-miRNA y comprenden una cápsula 5' y una cola poli-A (46). Los pri-miRNAs se procesan en el núcleo mediante la enzima RNasa III Droscha y la proteína de unión a ARN de doble cadena, Pasha / DGCR8 (47). Los pre-miRNAs resultantes tienen aproximadamente 70 nucleótidos de longitud y se pliegan en estructuras imperfectas stem-loop. Los pre-miRNAs luego se exportan al citoplasma mediante la exportin 5 (Exp5) y el complejo Ran-GTP (48). Ran (proteína nuclear relacionada con ras) es una pequeña proteína de unión a GTP esencial para la translocación de ARN y proteínas a través del complejo de poros nucleares. La Ran GTPasa se une a Exp5 y forma un heterotrímero nuclear con pre-miRNAs (49). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNAs se someten a un paso de procesamiento adicional por la enzima RNase III Dicer (50) que genera el miRNA, un ARN bicatenario de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. Dicer también inicia la formación del complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC). RISC es responsable del silenciamiento génico observado debido a la expresión de miRNA y la interferencia de RNA (51).

1.6. Aplicaciones de las células madre y de los tratamientos con VEs

Las CMMs tienen características favorables a la regeneración tales como la capacidad de diferenciación en multilinaje celular, dirigirse y llegar a los sitios de lesión e inflamación, y las funciones de inmunomodulación, proangiogénica, antiapoptótica, y por la capacidad de modular el sistema inmune, objetivos de la terapia celular regenerativa (52).

Por ello, actualmente son consideradas como posibles vehículos de genes terapéuticos para el tratamiento de diferentes enfermedades, tanto por las interacciones célula-célula (autocrina) como por medio de la secreción de moléculas mediadoras que actúan en los tejidos circundantes (acción paracrina) habiéndose publicado ya numerosos estudios preclínicos que demuestran los beneficios de esta aplicación de

MSCs transducidas con genes terapéuticos en modelos animales de interés clínico. Fundamentalmente las funciones celulares primordiales son la proliferación, la diferenciación y la migración, en donde el secretoma celular normal y patológico está directamente relacionado con la regulación de este proceso (53,54).

En las últimas décadas, las células madre han sido uno de los temas principales a debatir por su importancia científica y social, ya que su implementación en el campo de la medicina ofrece alternativas para el tratamiento de enfermedades por su creciente interés en la capacidad regenerativa, antiinflamatoria y terapéutica.

Aunque la controversia o polémica referente a la investigación con células madre presenta muchos problemas, debido a todas las dificultades políticas y éticas que representa su estudio, especialmente en los trabajos y tratamientos realizados con CME humanas, el interés por su utilización, ha aumentado de manera exponencial en los últimos años (55).

2. Objetivos

- Estudiar la ruta de mTOR a nivel molecular en las CMMs y su relación con el envejecimiento.
- Estudiar el efecto de las VEs sobre la ruta de mTOR en las CMMs durante el envejecimiento.
- Estudiar el papel del miR-188-3p sobre el envejecimiento de las CMMs.

3. Material y métodos

3.1. Aislamiento y cultivo de CMMs

Se realizaron dos grupos de estudio: 4 ratas adultas machos Wistar de diferentes edades, 9 meses (adultos) y 14 días (jóvenes) respectivamente, en el Servicio Animal del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, asistidos por los veterinarios del servicio. Se sacrificaron los animales empleando dióxido de carbono de acuerdo a las directrices de la ley española (32/2007) y con la aprobación del Comité Ético de Galicia (Figura 15).

Se extrajeron CMMs de la médula ósea del fémur siguiendo el protocolo de Karaoz y cols. (56). Brevemente, se extrajo la médula ósea del fémur con una aguja de calibre 20G (Life Technologies, Madrid, ES), se lavó la médula ósea con una solución salina y se esterilizó a través de un filtro de nylon de diámetro de poro 70µm (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU), se centrifugó la suspensión 1000 rpm durante 7 minutos. Se descartó el sobrenadante (trombocitos y eritrocitos) y el pellet celular obtenido se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10 % y 100 IU/ml penicilina-100 mg/ml Estreptomina (todo de Sigma-Aldrich, Madrid, ES). Las CMMs se cultivaron en placas de 100 cm² (Sigma-Aldrich, Madrid, ES) y se mantuvieron a 37 °C y 5% CO₂ hasta que alcanzaron el 70% de confluencia, cambiándoles el medio cada tres días, tal y como se muestra en la Figura 6.

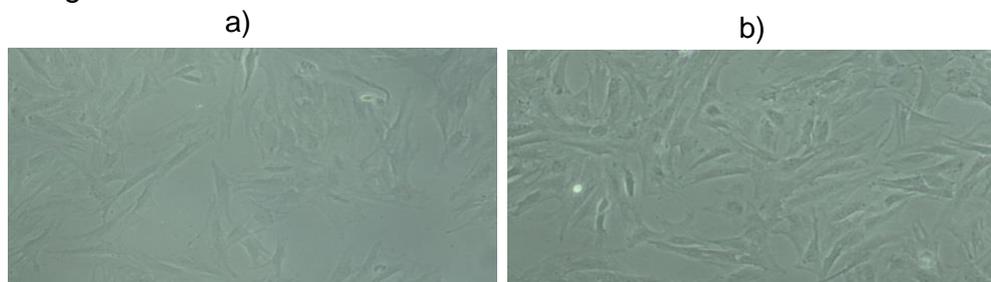


Figura 6. Cultivo de CMMs. a) Población de CMMs de ratas jóvenes (sacrificadas a los 14 días de edad). b) Población de CMMs de ratas adultas (sacrificadas a los 9 meses de edad).

3.2. Caracterización de las CMMs por citometría de flujo

Para caracterizar las dos poblaciones de CMMs, se lavaron con PBS (Sigma-Aldrich, Madrid, ES) y se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, en oscuridad y esterilidad con los anticuerpos que se muestran en la Tabla III, separando una cantidad de CMMs para establecer un control de población:

Tabla III. Anticuerpos utilizados para la caracterización de las CMMs de los dos grupos de edad (poblaciones joven y adulta) mediante citometría de flujo FAC'S ARIA.

<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa comercial</i>
Isotipo FICT	(ABCAM, Cambridge, UK)
Isotipo PE	(ABCAM, Cambridge, UK)
Isotipo APC	(ABCAM, Cambridge, UK)
Ratón anti -CD45 FITC rata (1:20)	(BD Pharmingen, New Jersey, EE.UU)
Ratón anti-CD90 PE (1:20)	(Inmunostep, Salamanca, ES).
Ratón anti-CD34 PE humano (1:20)	(Dako Cytomation, Barcelona, ES)
Ratón anti-CD29 APC rata (1:20)	(Inmunostep, Salamanca, ES)

Se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos y se resuspendieron en 200µL de PBS. A continuación, se analizaron en un citómetro separador FACS de BD (BD Bioscience, Madrid, ES). Los datos de citometría de flujo se generaron en el programa informático DIVA (BD Bioscience, Madrid, ES).

3.3. Extracción de exosomas

Se quitaron los medios de cultivo de las CMMs, se lavaron con PBS (MP biomedical, LLC, EE.UU) y se añadieron 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal libre de exosomas (Life technologies, Madrid, ES) y se mantuvieron de nuevo en incubación durante 48 horas para, posteriormente, recoger los exosomas.

Se recogieron los medios de cultivo y se centrifugaron a 1000 rpm durante 10 minutos (Allegra X-22R centrifuge, Beckman Coulter Life Sciences, EE.UU), se filtraron con un filtro de 0,22 μm esterilizado a unos tubos de ultracentrifugación (Biogen Idec, Massachusetts, EE.UU) y se ultracentrifugaron (Optima L-90K Ultracentrifuge, Beckman Coulter Life Sciences, EE.UU) a 100000 xg (36800 rpm) durante 2 horas a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes, puesto que son medios sin exosomas y el pellet celular se resuspendió en 15 mL de PBS y se volvió a ultracentrifugar a 100000 xg (36800 rpm) durante 2 horas y a 4°C. Por último el pellet se resuspendió en 200 μL de PBS y se guardó a -80°C.

3.4. Cultivo de CMMs con VEs

Las CMMs adheridas a las placas se levantaron y se sembraron de nuevo en placas de 6 pocillos. Se sembraron $2,5 \times 10^5$ CMMs en cada pocillo procedentes de individuos adultos y en tres de los pocillos se añadieron 2×10^7 VEs extraídas a partir de CMMs de individuos juveniles y en los otros tres no se añadieron VEs. Se realizó, paralelamente, lo mismo con CMMs procedentes de individuos juveniles a las que se les añadieron VEs procedentes de individuos adultos. Se usaron como controles de ambas poblaciones CMMs juveniles y adultas sin VEs. A los 0, 2, 3 y 6 días se extrajo el ARN mensajero (ARNm) para estudios génicos y proteínas para los estudios proteómicos.

3.5. Extracción de proteína y ARN de CMMs

Se llevaron a cabo dos tratamientos tal y como se muestra en la Figura 7:

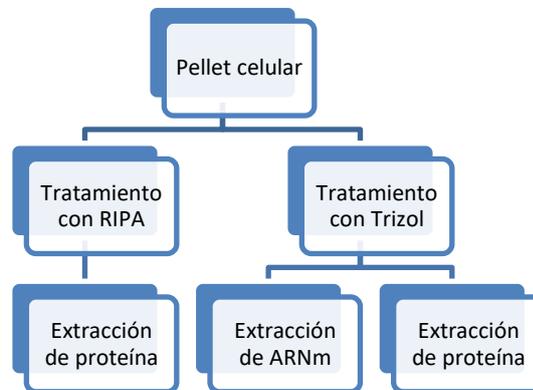


Figura 7. Esquema de los métodos utilizados para la extracción de ARN y proteína de las CMMs.

Se levantaron las células, se centrifugaron y se lavaron tres veces con PBS para eliminar los restos de medio.

Para el tratamiento con RIPA, seguimos el protocolo descrito por la casa comercial (Thermo Fischer Scientific, EE.UU). Conservamos el pellet (proteínas) en 100µL del tampón de lisis RIPA proteínas a -80°C.

Para el tratamiento con Trizol, seguimos el protocolo descrito en el manual de instrucciones de TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU). La extracción tanto de proteína (fase orgánica) como de ARNm (fase acuosa), se llevó a cabo en la campana de químicos por la toxicidad de los compuestos orgánicos y en frío, sobre todo, el etanol que ayuda a mejorar la precipitación del ARN mensajero. Para obtener una buena extracción, las muestras se hirvieron a 100°C durante 18 horas en un bloque térmico para disolver las proteínas precipitadas en el etanol. Para la cuantificación de las concentraciones de ARNm de las distintas muestras, utilizamos técnicas espectrofotométricas, en este caso el Nanodrop (Nanodrop ND-1000, Thermo Fischer Scientific, EE.UU)

midiendo ratios de absorbancia de 280/260 nm y 260/230 nm para evaluar la pureza de las muestras.

Para la cuantificación de las proteínas, seguimos el protocolo descrito en el manual de instrucciones del BCA (Pierce Rapid Gold BCA Protein Assay Kit, Thermo Fischer Scientific, EE.UU), midiendo la absorbancia en el espectrofotómetro del biobanco (NanoQuant Infinite M200, Tecan Männedorf, Suiza) a 480 nm.

Las muestras cuantificadas se guardaron a -20 °C.

3.6. Tinción con Plata de las proteínas

Para evaluar la calidad de la extracción de las proteínas, se llevó a cabo una electroforesis desnaturalizante en un gel de acrilamida al 10% (SDS-PAGE) de 1,5 mm de grosor (Sigma-Aldrich, Madrid, ES). Se cargó en cada pocillo del gel 2 µg de proteínas diluidas en tampón de carga 1x y previamente hervidas a 100°C y 1 µL de marcador de pesos moleculares (Bio-Rad, California, EE.UU) en el primer pocillo. Se dejó correr el gel entre 80-120 V durante 1 h y 30 minutos en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad, California, EE.UU). El gel se fijó durante 20 minutos en etanol absoluto: ácido acético glacial: agua en una proporción 40:10:50. A continuación se lavó el gel durante 10 minutos con agua destilada y se sensibilizó durante 1 minuto con tiosulfato sódico 0,02%. Se volvió a lavar varias veces con agua durante 1 minuto y se impregnó con Nitrato de Plata 0,2% con Formalina 0,075% aproximadamente 45 minutos para teñir las proteínas. Se lavó de nuevo con agua, y posteriormente se reveló con Carbonato Sódico 3%, Formalina 0,025% y tiosulfato sódico 12,5 mg/l, esperando el tiempo necesario hasta que se vieron las bandas correspondientes a las proteínas (color marrón). Se paró el revelado con una solución de STOP de Tris 3% y ácido acético 10% (todos de Sigma-Aldrich, Madrid, ES). Como no fue necesario un resultado cuantitativo, no hizo falta escanear el gel para procesarlo posteriormente, si no que se hizo el análisis proteómico correspondiente.

3.7. Western Blot

La detección y cuantificación de las proteínas procedentes de las CMMs que forman parte de la ruta de mTOR que está asociada con la pérdida de quiescencia y envejecimiento prematuro (57) se realizó mediante la técnica de Western Blot.

La separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular se llevó a cabo, por tanto, mediante electroforesis desnaturizante en geles de acrilamida (SDS-PAGE) de 1,5 mm de grosor. Se utilizaron geles al 8% y 10% de acrilamida (Sigma-Aldrich, Madrid, ES). Se cargó en cada pocillo de los geles 45 µg de proteínas tratadas con tampón de carga 1X de cada muestra, hervidas durante 5 minutos a 100 °C. Se dejó correr el gel entre 80-120 V durante 1 h y 30 min en una cubeta de electroforesis (Bio-Rad, California, Estados Unidos). Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de 6x9 cm² (Bio-Rad, California, Estados Unidos) previamente activadas en lavados continuados en metanol y en agua destilada y en tampón de transferencia 1X al 20% en metanol. También se añadió al gel y a los filtros el tampón de transferencia durante 15 min a 4 °C. La transferencia se realizó durante 1 hora y 15 minutos a 0,15 mA empleando el aparato Trans-Blot semi-dry Transfer Cell (Bio-Rad, California, EE.UU). A continuación se bloquearon las membranas usando tampón de bloqueo (3% BSA en tampón de lavado 1X con 0,1% Tween) (todo Sigma-Aldrich, Madrid, ES) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se prepararon los anticuerpos primarios (Tabla IV) en diluciones 1:1000 en tampón de bloqueo y se incubaron durante toda la noche a 4 °C en rotación.

Una vez finalizado el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con tampón de lavado 1X con 0,1% Tween. A continuación se prepararon los anticuerpos secundarios (Tabla IV) en una dilución 1:1000 en tampón de bloqueo. Se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios durante 1 hora a temperatura ambiente en rotación. Transcurrido este tiempo se realizaron 3 lavados de 5 minutos

cada uno con tampón de lavado 1X con 0,1% Tween. Finalmente se visualizaron las proteínas usando el kit comercial de quimioluminiscencia Luminol ECL Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, Amersham Biotechnology, UK). Las imágenes se visualizaron usando una cámara de revelado Amersham Imager 600 (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU). Los datos y el análisis por densitometría de la intensidad de las bandas se realizó utilizando el programa informático ImageQuant™ TL (Millipore Corporation, Massachusetts, EE.UU). Los análisis por Western Blot se hicieron también por triplicado.

3.8. Retro transcripción (RT) y análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con Syber Green

Se analizaron los niveles de expresión génica a partir del ARNm extraído de las CMMs con qPCR-RT.

La retro transcripción del ARNm a ADN complementario (ADNc) se llevó a cabo para minimizar los efectos de una cantidad de comienzo de ARN desigual y para eliminar potenciales fuentes de inconsistencia para que los niveles de expresión relativa de cada gen se pudiesen normalizar con la expresión del gen HPRT (Invitrogen, California, EE.UU) en la PCR-real time. Se siguió el protocolo descrito en el manual de instrucciones del kit NZY Frist-Strand cDNA Synthesis (NZYTECH, Lisboa, Portugal), utilizando 1 µg de muestra de ARNm.

El proceso fue el siguiente: 10 minutos a 37 °C, 10 minutos a 65 °C, 10 minutos a 25 °C, 30 minutos a 50 °C, 5 minutos a 85 °C para inactivar la reacción, 20 minutos a 37 °C y finalmente la reacción se mantuvo a 4 °C.

El termociclador utilizado para las retrotranscripciones fue el Termociclador de gradiente (Applied Biosystems VERETI 96-V, Thermo Fischer Scientific, EE.UU).

Posteriormente, tuvo lugar la amplificación del ADNc mediante PCR a tiempo real, usando el equipo LightCycler 4800 (Instrument Roche Applied Science).

3.9. Transfección

Se transfectaron CMMs de ratas jóvenes utilizando el inhibidor rno-miR-188-3p (Ambion Inc, Thermo Fischer Scientific, EE.UU) y su respectivo control negativo miRNA mimic (Ambion Inc, Thermo Fischer Scientific, EE.UU) mediante lipofectamina. Paralelamente se mantuvieron CMMs sin tratar como controles.

Brevemente, las CMMs se cultivaron en medio RPMI 1640 (con glutamina) sin suero bovino fetal y con 100 IU/ml penicilina-100 mg/ml Estreptomina (todo de Sigma-Aldrich, Madrid, ES) para tener un medio antibiótico. Se mantuvieron en incubación en la estufa a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 horas. Al día siguiente, se añadieron 300 µL del inhibidor de miR- 188-3p (Tabla VII) para ayudar a la apertura de los poros en las membranas celulares y 300 µL de mimic (Tabla VII), cada uno en su respectivo cultivo.

Se mantuvo en incubación 24 horas en la estufa a 37 °C y 5% CO₂. A continuación, se quitó el medio de cultivo, se lavó con PBS (MP biomedical, LLC, EE.UU) y se añadieron 3 mL de medio RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero bovino fetal libre de exosomas (Life technologies, Madrid, ES) para permitir a las células su recuperación y se mantuvo de nuevo en incubación durante 48 horas para, posteriormente, recoger los exosomas y realizar el mismo tratamiento que en el apartado 3.3 y 3.5 de la sección de Material y métodos. Este procedimiento se puede ver esquemáticamente a continuación en la Figura 8:

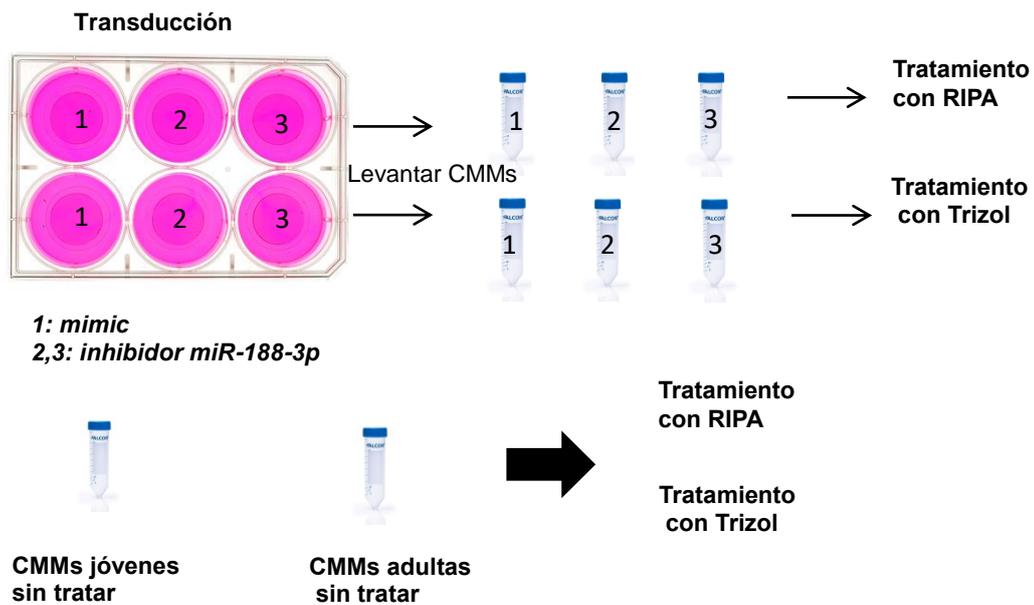


Figura 8. Esquema sobre el protocolo utilizado para la extracción de ARNm y proteína.

3.10. Retro transcripción (RT) y análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con sondas Taqman

Las RT con sondas taqman se hicieron para enriquecer las muestras con U6 (gen de referencia específico para el miR) (Biosystems, Thermo Fischer Scientific, EE.UU) y con miR-188-3p. El producto de la RT enriquecida con U6 tuvo la misma finalidad que la del HPRT y el producto de la RT enriquecida con miR-188-3p, actuó como muestra problema para ver el nivel de expresión de las proteínas de la ruta mTOR. El proceso fue el siguiente: 40 minutos a 16 °C, 40 minutos a 42 °C, 5 minutos a 85 °C y finalmente la reacción se mantuvo a 4 °C.

El programa de amplificación con sondas Taqman consistió en una incubación inicial de un ciclo a 50°C durante 2 minutos, una activación de un ciclo a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 1 minuto, y enfriamiento en un ciclo a 40°C durante 10 segundos.

3.11. Tinción de Beta-galactosidasa asociada a la senescencia

Se realizó la tinción citoquímica de X-Gal para SA- β -gal. Las células se fijaron y a continuación se tiñeron con solución de tinción de SA- β -gal preparada a 37 ° C de acuerdo con los protocolos del fabricante (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EE. UU.). El número de células positivas para SA- β -gal en campos seleccionados al azar se expresó como un porcentaje de todas las células contadas.

3.12. Estadística

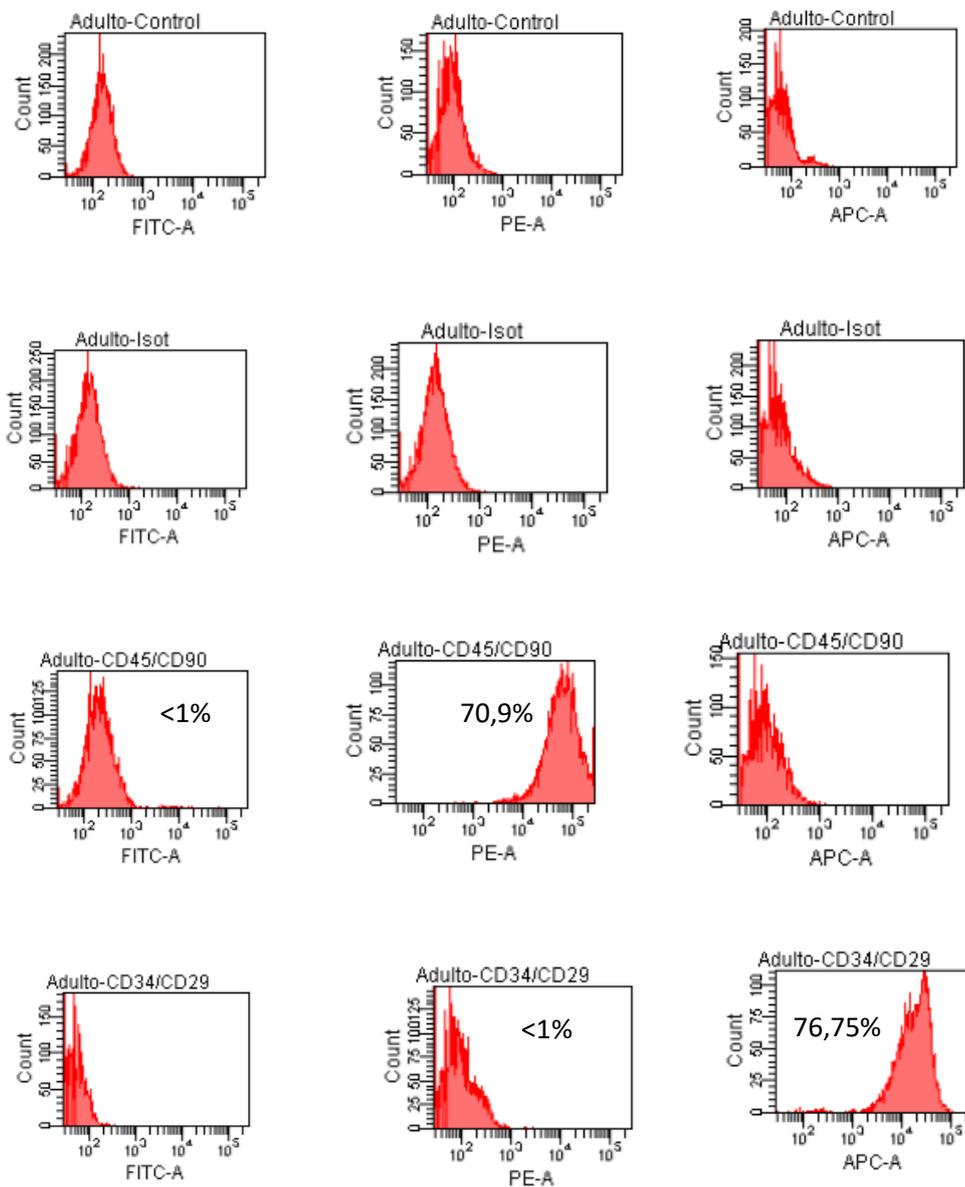
Todos los experimentos se hicieron por triplicado y fueron analizados mediante un test t de Student usando GraphPad Prism5 (GraphPad Software, La Jolla, CA). Cada grupo fue comparado con el grupo previo. Se consideró estadísticamente significativo un p valor menor de 0.05. Todos los datos fueron presentados con error estándar de la media.

4. Resultados

4.1. Caracterización de las CMMs por citometría de flujo

La caracterización de las poblaciones de CMMs procedentes de los dos grupos de edad reveló que las células positivas para los marcadores de células hematopoyéticas CD45 y CD34 fueron menos del 1%, las células positivas para CD29 fueron $76,75\pm 3\%$, y las positivas para CD90 fueron $70,9\pm 2\%$ en ambas poblaciones (Figura 9).

a)



b)

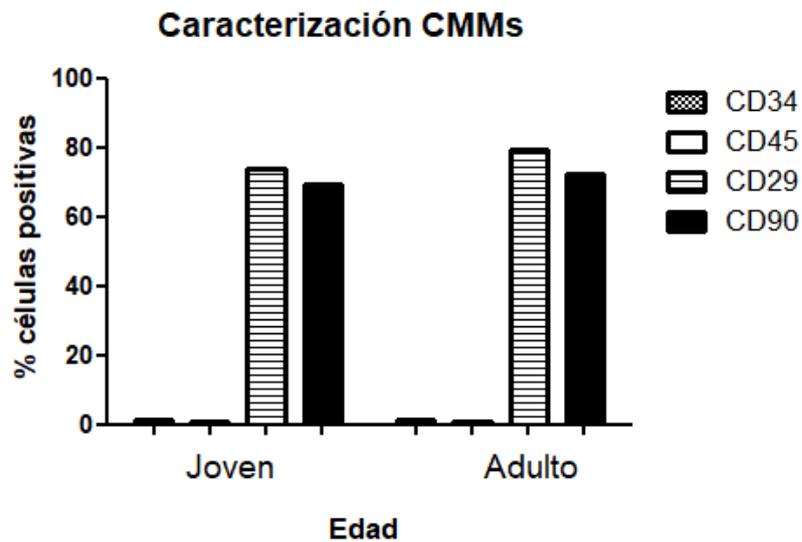


Figura 9. Caracterización de las CMMs por citometría de flujo. A) Caracterización por citometría de flujo de la población adulta, número de células positivas para los marcadores de células madre mesenquimales (CD29 y CD90) y negativas para marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45). B) Histograma de la caracterización por citometría de células positivas para los marcadores de CMMs (CD90 y CD29) y para marcadores de células hematopoyéticas (CD45 y CD34) en las dos poblaciones adulta y juvenil.

4.2. Tinción con Plata de las proteínas

Los resultados obtenidos en la Figura 10 muestran la presencia de proteínas en nuestras muestras de CMMs:

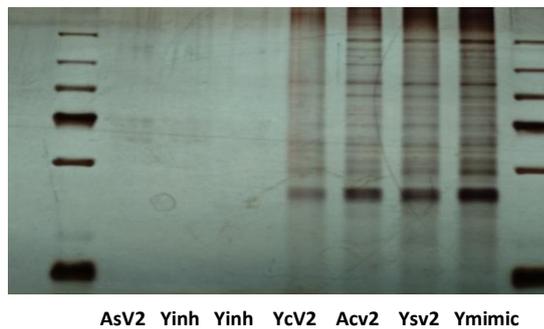
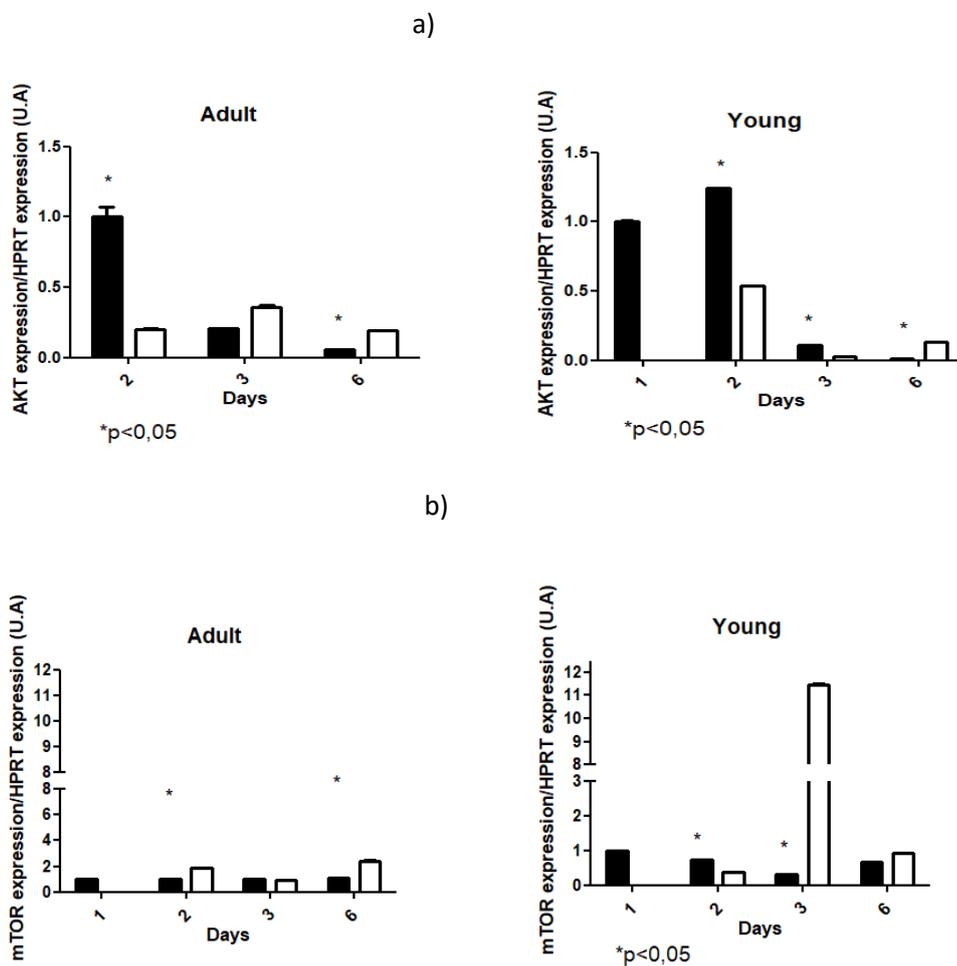


Figura 10. Tinción de plata. AsV2: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 2, Yinh: CMMs jóvenes con inhibidor miR-188-3p, YcV2: CMMs jóvenes con VEs adultas a día 2, Acv2: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 2, Ysv2: CMMs jóvenes sin VEs adultas a día 2 y mimic: CMMs jóvenes tratadas con mimic (control negativo del miR-188-3p).

4.3. Efecto de las VEs sobre las CMMs

4.3.1. Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con Syber Green

Se procesaron los datos obtenidos de qPCR-RT con el método del Syber Green de las muestras de ARNm de las CMMs de las dos poblaciones de estudio tratadas con y sin exosomas a diferentes días (Tabla V), en forma de histogramas, tal y como se muestra en la Figura 11:



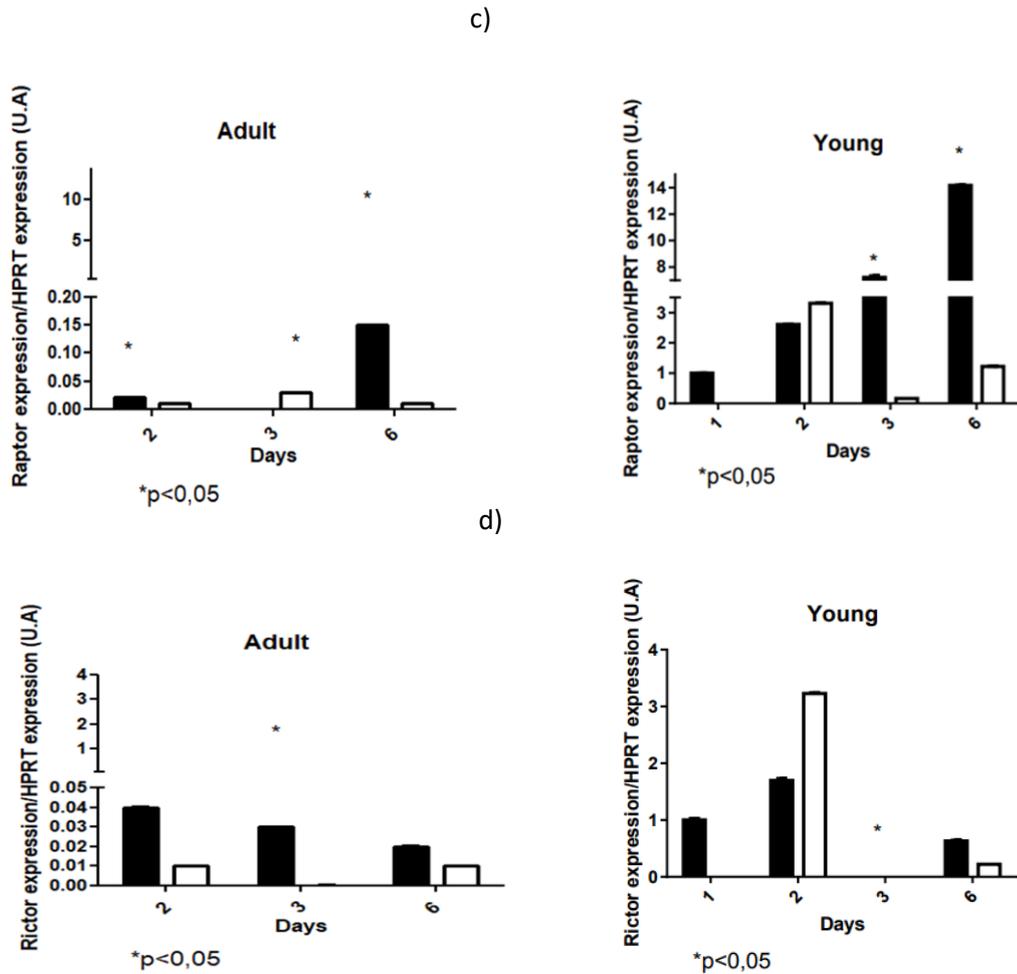


Figura 11. Niveles de expresión de las proteínas de la ruta mTOR de CMMs con y sin VEs. a) Histograma representando la expresión de AKT en CMMs adultas y juveniles con y sin VEs.. b) Histograma representando la expresión de mTOR en CMMs adultas y juveniles con y sin VEs. c) Histograma representando la expresión de Raptor en CMMs adultas y jóvenes con y sin VEs. d) Histograma representando la expresión de Rictor en CMMs adultas y juveniles con y sin VEs. Análisis mediante qRT-PCR normalizado usando el gen HPRT. Se consideró estadísticamente significativo un valor $*P < 0,05$ usando el test t de student comparado con la expresión del gen HPRT y se empleó un tamaño muestral $N=3$ en todos los experimentos. Las barras negras indican las muestras de CMMs sin VEs y las blancas las de CMMs con VEs.

- **AKT:** Al comparar las dos poblaciones, a día 2 presentan la misma tendencia (las CMMs sin VEs de adultas presentan mayores niveles de expresión que las CMMs con las VEs) aunque los niveles de expresión son más altos en la población juvenil. A día 3 la tendencia es opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es más alta que la de las CMMs sin VEs, en la población juvenil sucede lo contrario,

mostrándose un los niveles más elevados en la población adulta. A día 6 la tendencia vuelve a ser la misma, las CMMs con VEs tienen mayores niveles de expresión que las CMMs sin VEs aunque es un poco más alta en la población adulta. Por último, al comparar los datos dentro de la propia población, en la adulta la expresión a día 2 de CMMs sin VEs es mayor que con VEs, igual que lo que sucede en la población contraria. A día 3, la expresión de las CMMs sin VEs es menor que con VEs mientras que en la población juvenil sucede lo contrario y a día 6 es menor en las CMMs sin VEs que con VEs igual que lo que reflejan los datos de la población juvenil. Estas diferencias en los niveles de expresión, son significativamente estadísticas en la población adulta en los días 2 y 6 y en la juvenil en los días 2,3 y 6.

- mTOR: En todos los casos, los niveles de expresión en la población juvenil son mucho mayores que en la población adulta. Al comparar las dos poblaciones, a día 2 presentan una tendencia opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es más alta que la de las CMMs sin VEs, en la población juvenil sucede lo contrario. A día 3 la tendencia vuelve a ser opuesta ya que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es menor que la de las CMMs sin VEs y en la población juvenil sucede lo contrario. A día 6 la tendencia vuelve a ser la opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es más alta que la de las CMMs sin VEs, en la población juvenil sucede lo contrario. Por último, al comparar los datos dentro de la propia población, en la adulta la expresión a día 2 de CMMs sin VEs es menor que con VEs, mientras que en la población juvenil sucede lo contrario. A día 3, la expresión de las CMMs sin VEs es mayor que con VEs mientras que en la población juvenil sucede lo contrario y a día 6 es menor en las CMMs sin VEs que con VEs

igual que lo que reflejan los datos de la población juvenil. Estas diferencias en los niveles de expresión, son significativamente estadísticas en la población adulta en los días 2 y 6 y en la juvenil en los días 2 y 3.

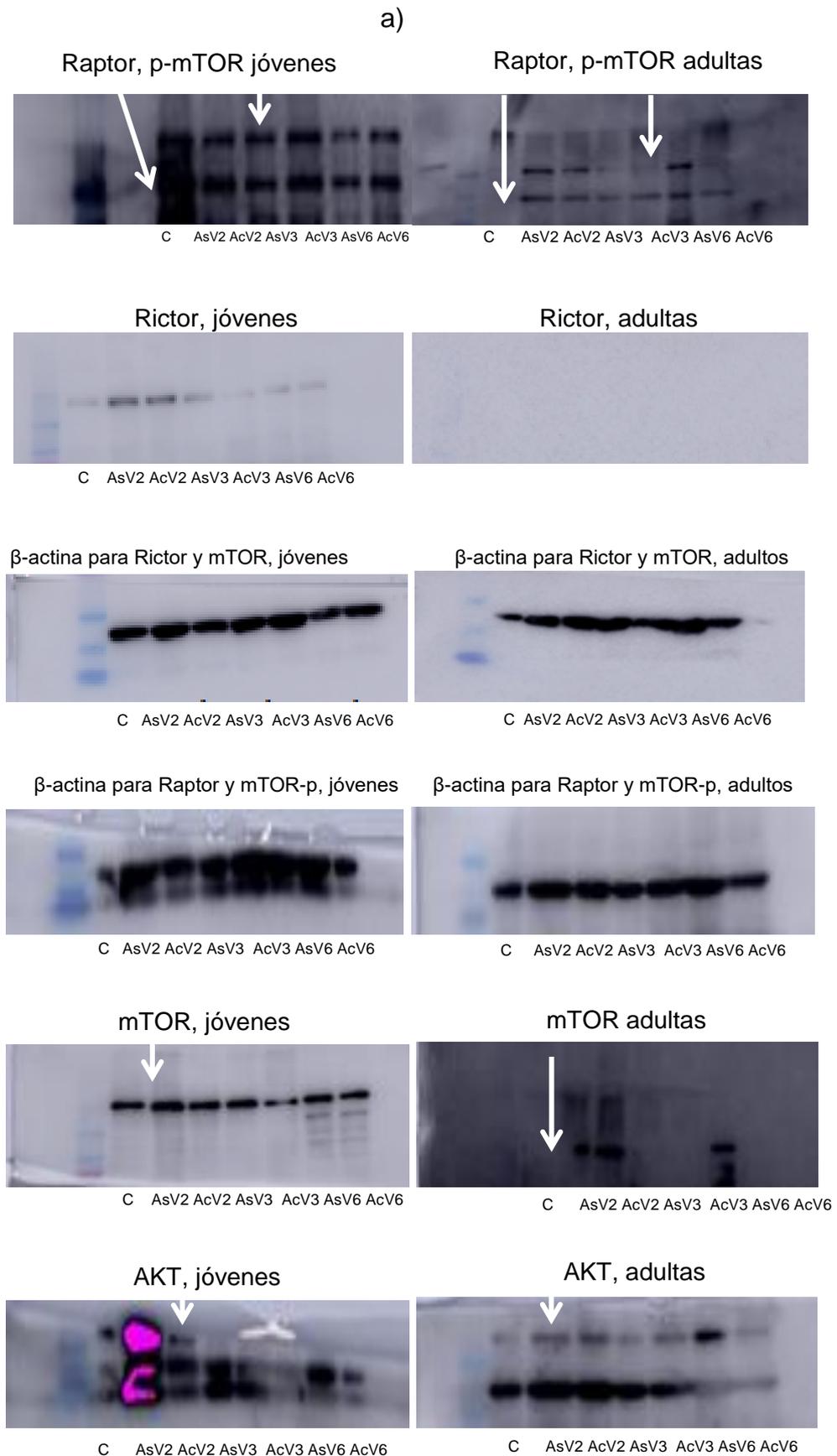
- Raptor: Presenta niveles de expresión mucho más altos en la población juvenil que en la población adulta. Al comparar las dos poblaciones, a día 2 la tendencia es opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es menor que la de las CMMs sin VEs, en la población juvenil sucede lo contrario. A día 3 la tendencia vuelve a ser opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs con VEs de jóvenes es más alta que la de las CMMs sin VEs, en la población juvenil sucede lo contrario. A día 6 la tendencia pasa ser la misma, las CMMs sin VEs tienen mayores niveles de expresión que las CMMs con VEs. Por último, al comparar los datos dentro de la propia población, en la adulta la expresión a día 2 de CMMs sin VEs es mayor que con VEs, mientras que en la población contraria sucede lo opuesto. A día 3, la expresión de las CMMs sin VEs es mayor que con VEs mientras que en la población juvenil no se aprecian datos y a día 6 es mayor en las CMMs sin VEs que con VEs igual que lo que reflejan los datos de la población juvenil. Estas diferencias en los niveles de expresión, son significativamente estadísticas en la población adulta en los días 2,3 y 6 y en la juvenil a día 6.
- Rictor: Presenta niveles de expresión mucho más elevados en la población juvenil que en la adulta. Al comparar las dos poblaciones, a día 2 la tendencia es opuesta ya que mientras que en la población adulta, la expresión de CMMs sin VEs de jóvenes es más alta que la de las CMMs con VEs, en la población juvenil sucede lo

contrario. A día 3 no son comparables debido a que este gen no se expresa en la población juvenil. A día 6 la tendencia es la misma, las CMMs sin VEs tienen mayores niveles de expresión que las CMMs con VEs. Por último, al comparar los datos dentro de la propia población, en la adulta la expresión a día 2 de CMMs sin VEs es mayor que con VEs, al contrario de lo que sucede en la población juvenil. A día 3, la expresión de las CMMs sin VEs es mayor que con VEs mientras que en la población juvenil no se observan datos de nivel de expresión del gen y a día 6 es menor en las CMMs con VEs que sin VEs igual que lo que reflejan los datos de la población juvenil. Estas diferencias en los niveles de expresión, son significativamente estadísticas en la población adulta y joven a día 3.

4.3.2. Western Blot

Para poder establecer los niveles de expresión de las diferentes proteínas de la ruta mTOR relacionada con el envejecimiento, se realizaron análisis proteómicos a partir de las muestras recogidas en la Tabla V.

Las imágenes de las membranas incubadas con los anticuerpos correspondientes (Tabla IV) y las densitometrías, se muestran en la Figura 12, donde se observó que existen diferencias significativas entre las condiciones.



IV. Resultados

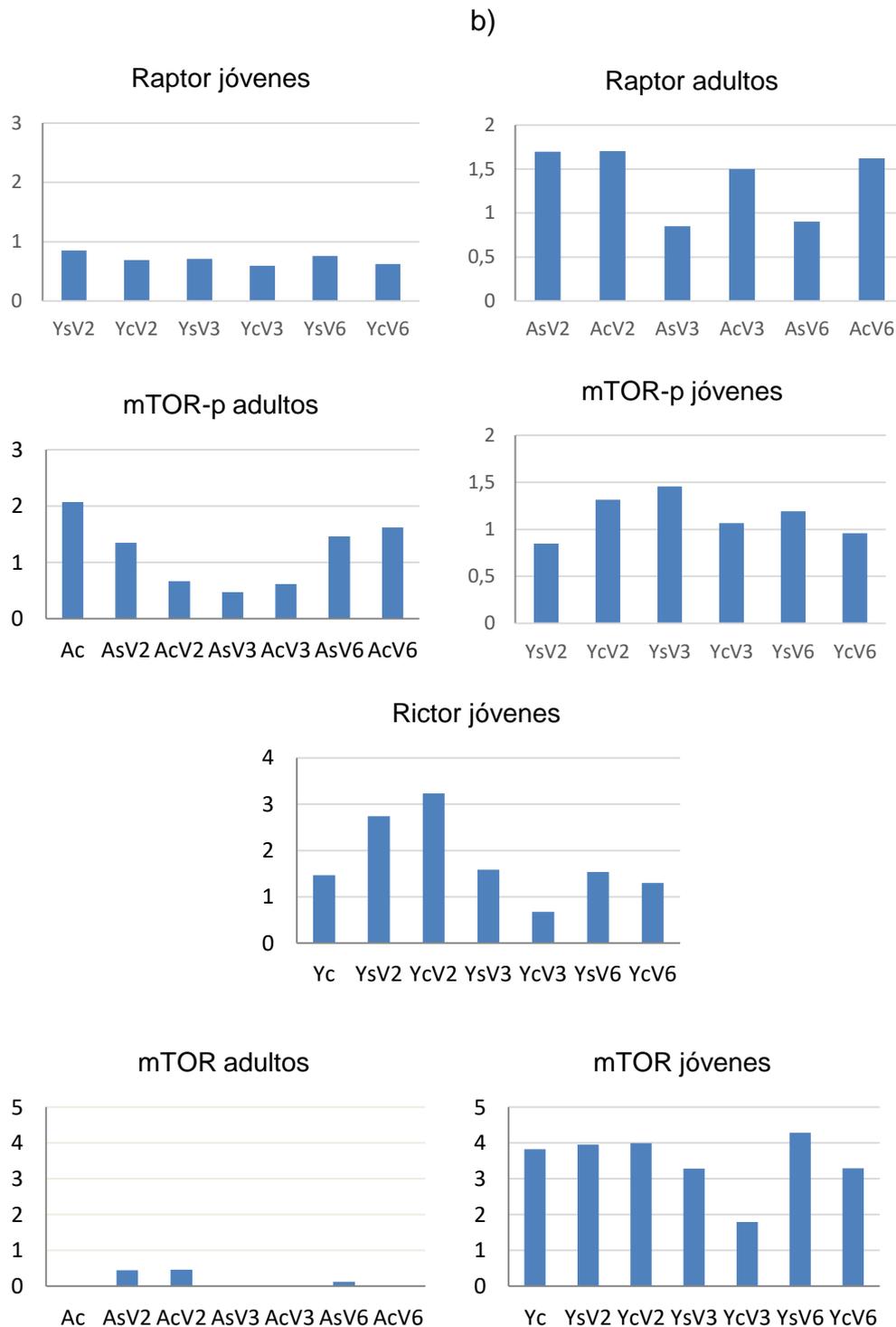


Figura 12. Niveles de expresión de las proteínas de la ruta mTOR extraídas de las CMMs (Tabla V) y medidos por Western Blot. a) Membranas incubadas con los anticuerpos correspondientes que muestran cualitativamente el nivel de expresión las proteínas de la ruta mTOR en las condiciones de la Tabla V. Los KDa de las proteínas se muestran en la Tabla VI. b) Histogramas que recogen los datos de las densitometrías procedentes del Western Blot. Ac: CMMs adultas sin tratar a día 0, AsV2: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 2, AcV2: CMMs adultas sin VEs jóvenes a día 2, AsV3: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 3, AcV3: CMMs adultas sin VEs

IV. Resultados

juveniles a día 3, AsV6: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 6, AcV6: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 6, Yc: CMMs jóvenes sin tratar a día 0, YsV2: CMMs jóvenes sin VEs adultas a día 2, YcV2: CMMs jóvenes con VEs adultas a día 2, YsV3: CMMs jóvenes sin VEs adultas a día 3, YcV3: CMMs jóvenes con VEs adultas a día 3, YsV6: CMMs jóvenes sin VEs adultas a día 6, YcV6: CMMs jóvenes con VEs adultas a día 6.

- El Raptor, comparando ambas poblaciones, en general, presenta niveles de expresión más elevados en CMMs adultas que en jóvenes, pero al evaluar el efecto de las VEs dentro de la misma población, deducimos que no es eficiente en la población juvenil ya que los niveles de expresión no varían entre las CMMs con VEs de adultas y sin VEs. Sin embargo, en la población adulta, a pesar de que a día 2 tampoco se observen cambios en el nivel de expresión entre las CMMs sin VEs y con VEs de jóvenes, a día 3 las VEs de individuos jóvenes hacen que los niveles de expresión de las CMMs adultas sean mayores, tendencia que se mantiene a día 6.
- El mTOR-p, presenta una tendencia opuesta entre las dos poblaciones, aunque los niveles de expresión son más altos en la población juvenil. En la población adulta, las CMMs sin VEs juveniles a día 2 y a día 6 con y sin VEs presentan un nivel de expresión más alto que en la población joven, mientras que a día 2 las CMMs adultas con VEs juveniles y a día 3 con y sin VEs, se muestra la tendencia contraria. Así mismo, el efecto de las VEs jóvenes dentro de la población adulta, se manifiesta a día 3 y 6 ya que las CMMs tratadas con VEs muestran mayores niveles de expresión que las que no las contienen, mientras que a día 2 hay menos nivel de expresión en las CMMs con VEs. En la población juvenil, mientras que a día 2 se observa el efecto de las VEs adultas, a día 3 y 6 no se muestra.

- El Rictor no se expresa en CMMs adultas mientras que en jóvenes si lo hace, mostrando un pico de expresión a día 2 en las CMMs jóvenes con VEs de adulto. A día 3, las VEs de adulto disminuyen el nivel de expresión de las CMMs jóvenes al compararlo con las CMMs sin VEs, tendencia que se mantiene a día 6 aunque con menor variación en cuanto a los niveles de expresión de la proteína.
- El mTOR, comparando ambas poblaciones, presenta niveles de expresión más elevados en la población adulta que en la juvenil, pero al evaluar el efecto de las VEs dentro de la misma población, vemos que no resulta eficiente en las CMMs adultas a día 2 ni a día 3 ya que los niveles de expresión no se ven modificados por la presencia de las mismas, mientras que a día 6 se observa una mayor expresión en CMMs adultas sin VEs que con VEs juveniles. En la población juvenil, a día 2 tampoco se observan cambios entre las CMMs sin VEs y con VEs de adultos, pero a día 3 las VEs de individuos jóvenes hacen que los niveles de expresión sean menores, tendencia que se mantiene a día 6, aunque en este caso, los niveles están más altos que antes.

4.4. Efecto del miR-188-3p sobre la ruta mTOR

4.4.1. Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR-RT) con sondas Taqman

En cuanto a los resultados de PCR en tiempo real con sondas Taqman realizadas sobre las CMMs tratadas con el control negativo del miR-188-3p y con el inhibidor del miR-188-3p (Tabla V) y normalizadas con dos genes de referencia (U6 y HPRT), solo obtuvimos los datos de amplificación de las muestras que contenían los genes de referencia, ya que las muestras con las sondas del miR-188-3p no amplificaron.

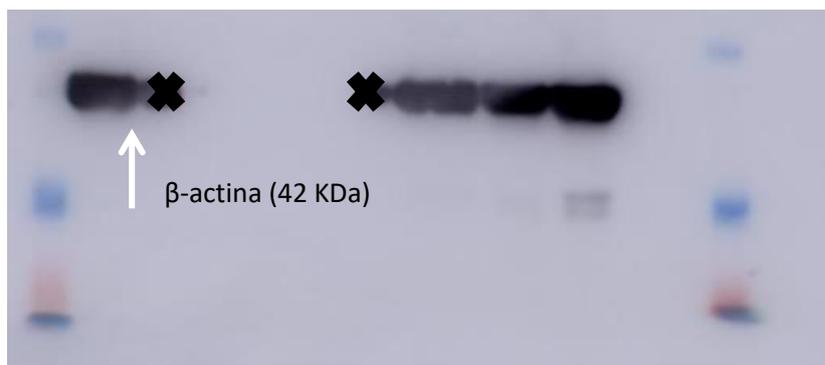
4.4.2. Western Blot

Para poder comparar los niveles de expresión de las proteínas modificadas con el microRNA miR-188-3p, los controles y las CMMs tratadas con VEs (tabla V) se realizaron análisis proteómicos incubando las membranas con la proteína diana RICTOR. Las imágenes de las membranas incubadas y las densitometrías, se muestran en la Figura 13, dónde se observó que existen diferencias significativas entre las condiciones.

a)



AsV2 Yinh Yinh YcV2 AcV2 YsV2 mimic



AsV2 Yinh Yinh YcV2 AcV2 YsV2 mimic

b)

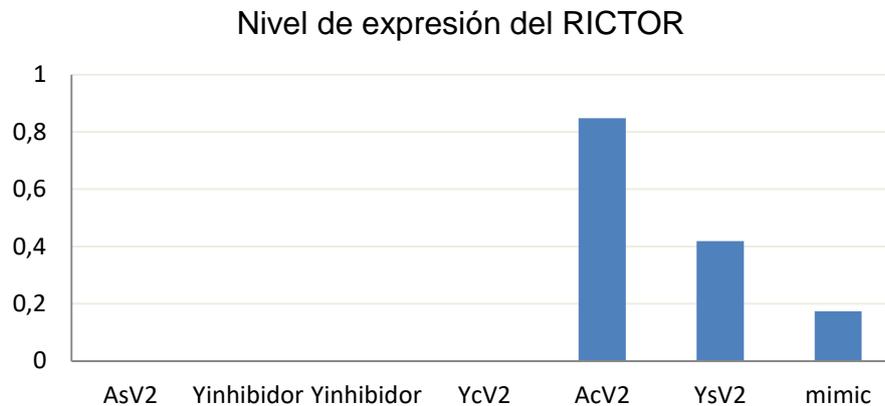
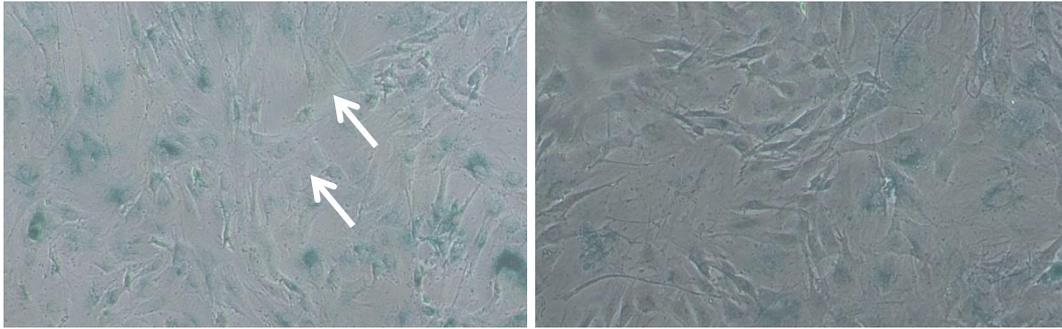


Figura 13. Western Blot incubado con RICTOR. a) Membrana incubada con el RICTOR y β -actina a diferentes condiciones. b) Densitometría hecha con los datos obtenidos del nivel de expresión del RICTOR en las diferentes muestras. AsV2: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 2, Yinhib: CMMs jóvenes con inhibidor miR-188-3p, YcV2: CMMs jóvenes con VEs adultas a día 2, AcV2: CMMs adultas sin VEs juveniles a día 2, YsV2: CMMs jóvenes sin VEs adultas a día 2 y mimic: CMMs jóvenes tratadas con mimic (control negativo del miR-188-3p). Las cruces en la membrana de la β -actina indican carriles vacíos (que no se cuentan).

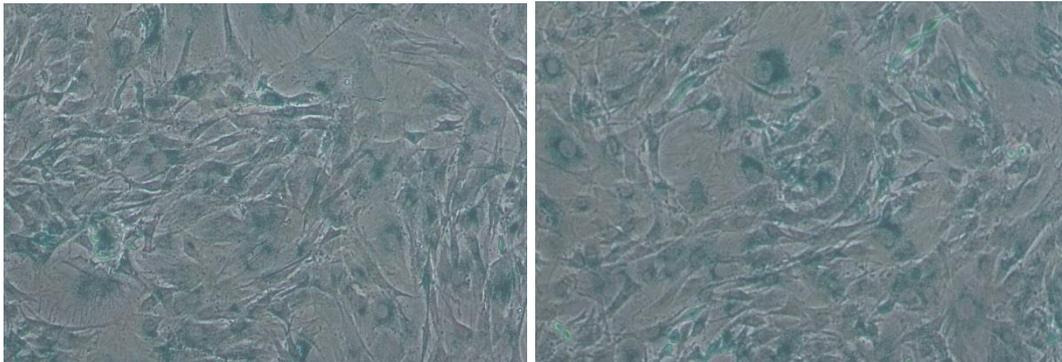
Las proteínas extraídas de las CMM transfectadas con el inhibidor no se transfirieron a la membrana, ya que esos carriles tampoco presentaban señal para la B-actina, aunque si se pudieron observar en la tinción de plata. Podemos indicar que las células transfectadas con el mimic control-negativo tienen los mismos niveles de RICTOR que las estas mismas CMM sin vesículas.

4.4.3. Tinción con β -galactosidasa

Los resultados de la tinción con β -galactosidasa que se muestran en la Figura 14 revelan que la población CMM adultas tratadas con las vesículas modificadas con el mir-188-3p presentan una disminución en este marcador de envejecimiento.



a)



b)

Figura 14. Tinción con β -galactosidasa de las CMMs adultas. a) Población de CMMs adultas con VEs juveniles modificados con el inhibidor miR-188-3p. b) Población de CMMs adultas sin VEs juveniles.

5. Discusión

La caracterización de las CMMs de los dos grupos de edad es positiva para marcadores mesenquimales y negativa para marcadores de precursores hematopoyéticos (Figura 9) lo que nos indica que cumplen los criterios adecuados de la Sociedad Internacional de Terapia Celular (16-22).

Estudiamos la modulación de la ruta de señalización celular mTOR (28), la cual está asociada con el envejecimiento. Resultados publicados por nuestro grupo (57) indicaron que mTOR presenta niveles de expresión mayores en poblaciones adultas, partiendo de este hecho, nos centramos en la expresión de RICTOR como proteína regulada por mTOR y su papel en el envejecimiento. Además, en la bibliografía se ha descrito que los niveles de expresión de RICTOR están modulados negativamente por mTOR, (58) siendo p-mTOR y RICTOR los que se ajustan a los niveles de expresión génicos y proteómicos encontrados en la bibliografía.

También se aislaron las VEs de las CMMs de ambas poblaciones (juvenil y adulta) siguiendo el protocolo de ultracentrifugación descrito por Del Fattore, A *et al.* [60], para estudiar el efecto de las VEs en los niveles de expresión de los genes y proteínas de la ruta mTOR sobre las CMMs adultas (Figuras 11 y 12). Se tomaron como referencia los resultados obtenidos en (59). En este artículo se observó que las VEs influenciaban de alguna forma cambios en la expresión de proteínas y genes de las CMMs tratadas con ellos. En nuestro estudio hemos observado cambios en la expresión tanto a nivel génico como proteómico de los componentes de la ruta mTOR, aunque estos resultados son preliminares, llegando a estar significativamente incrementados los niveles de mTOR en la población juvenil tratadas durante 3 días con VEs de adultos.

El RICTOR es una proteína diana del miR-188-3p, (58) en este trabajo, sus autores publican que aumentan los niveles de RICTOR usando el inhibidor mir-188-3p, para regular la diferenciación hacia osteoblastos o

adipocitos tiempo-dependiente en CMMs procedentes de médula ósea de ratón. Basándonos en estos datos, transfectamos el miR-188-3p en las CMMs juveniles con el propósito de aumentar los niveles de RICTOR en nuestras CMM adultas para saber si afectaba a la senescencia de las mismas. Aunque nuestra validación de la transfección en las CMM y sus exosomas no ha sido concluyente por problemas técnicos si hemos observado que los niveles de B-galactosidasa como marcador de envejecimiento se ha reducido en las CMMs tratadas con estas vesículas.

6. Conclusiones

- El complejo mTOR2 está modulado en las CMMs a lo largo del tiempo.
- Las VEs modifican los niveles de expresión génica y proteómica de la ruta de mTOR en las CMMs dependiendo del tiempo.
- El miR-188-3p disminuye la expresión del marcador de senescencia en CMM adultas.

7. Bibliografía

1. G.A. Pimentel-Parra, B. Murcia-Ordoñez. Células madre, una nueva alternativa médica. *Perinatol y Reprod Humana*. 2017; 31(1):28–33.
2. Tema Fantástico, S.A.: Las células madre. Disponible en: <http://delatandoalaciencia2.blogspot.com.es/p/definicion-y-tipos.html>
3. R. Gomis. ¿El final de la diabetes?: Células madre, la esperanza de la biomedicina. Valencia (España) : Editorial Maite Simón; 2011
4. G. Marañez. Potencialidad queratinocítica de las células madre de la gelatina de wharton para su utilización en ingeniería tisular [Tesis doctoral] Universidad de Granada, Bogotá, Colombia; 2010
5. M.L. Condic. Totipotency: What it is and what it is not. *Stem Cells Dev*. 2014; 23(8): 796-812
6. International Society For Stem Cell Research . Guidelines for stem cell research and clinical translation. Washington, D.C: ISSCR; 2016.
7. B.K. Motwani, M. Singh, G. Kaur, S. Singh, P.O.Gangde. Stem cells: A new paradigm in dentistry. *JOADM*. 2016; (2):139-145
8. C. Nombela. Células madre: Encrucijadas biológicas para la Medicina: del tronco embrionario a la regeneración adulta. Madrid, España: Editorial Edaf; 2007
9. R. Lucas. Explícame la bioética: Guía explicativa de los temas más controvertidos sobre la vida humana. 4.ª edición. Madrid, España: Editorial Palabra; 2013
10. H. Gary, A. Helen. Transcriptional and translational regulation of stem cells. Springer Science & Business Media. Australia: Clayton; 2013
11. Okita K, Yamanaka S. Induced Pluripotent Stem Cells. Handbook of Stem Cells. *Elsevier*. 2013; (18):227–35.

VII. Bibliografía

12. L. Shan, J. Zhou, X. Zhang, Y. Liu, J. Chen, B. Hu. Strategies to optimize adult stem cell therapy for tissue regeneration. *Int J Mol Sci.* 2016; (17):982-997.
13. Chaparro O, Beltrán O. Reprogramación Nuclear y Células Pluripotentes Inducidas. 2009; 252(172):252–63.
14. Beyer N, Da Silva L. Mesenchymal Stem Cells: Isolation in vitro Expansion and Characterization. *Handb Exp Pharmacol.* 2006; (174):249-282.
15. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal Stem Cells for bone, cartilage, tendon and skeletal repair. *Bone.* 2006; (39):678-683
16. Airas L, Niemelä J, Salmi M, Puurunen T, Smith DJ, Jalkanen S. Differential Regulation and Function of CD73, a Glycosyl Phosphatidylinositol-linked 70-kD Adhesion Molecule, on Lymphocytes and Endothelial Cells. *J Cell Biol.* 1997; (136):421-431.
17. Wiesmann A, Buhning HJ, Mentrup C, Wiesmann HP. Decreased CD90 expression in human mesenchymal stem cells by applying mechanical stimulation. *Head Face Med.* 2006; (31): 2-8.
18. Fonsatti E, Maio M. Highlights on endoglin (CD105): from basic findings towards clinical applications in human cancer. *J Transl Med.* 2004; (2):18-24.
19. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Staper Cortenbach I, Marini F, Krause D et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; (8):315-317
20. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 2006; (312):2169-2179.
21. Lakshmi U, Verfaillie C. Stem Cell Plasticity. *Blood Rev.* 2005; (19):29-38.
22. Rodríguez V. Células Madre: Conceptos Generales y Perspectivas de Investigación. *Universitas Scientiarum.* 2005; (10):5-14.

VII. Bibliografía

23. López-Otín, C., et al., The hallmarks of aging. *Cell*. 2013; 153(6): 1194-1217.
24. Min-Wen, J.C., E.T. Jun-Hao, and N. Shyh-Chang. Stem cell mitochondria during aging in *Seminars in cell & developmental biology*. 2016. Elsevier.
25. Vijg, J. and Y. Suh, Genome instability and aging. *Annual review of physiology*. 2013; (75):645-668.
26. Yunis, E.J., et al., Stem cells in aging: Influence of ontogenic, genetic and environmental factors. *Journal of stem cells*. 2006; 1(2): 125.
27. Guerrero-Bosagna, C. and M.K. Skinner, Environmentally induced epigenetic transgenerational inheritance of phenotype and disease. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012; 354(1): 3-8.
28. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004; (18): 1926-45.
29. Cybulski N, Hall M. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem. Sci*. 2009; (34): 620-27.
30. Gharibi B, Farzadi S, Ghuman M, Hughes FJ. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2014; 32(8):2256–66.
31. Pollina, E. and A. Brunet, Epigenetic regulation of aging stem cells. *Oncogene*. 2011; 30(28): 3105-3126.
32. Baxter, M.A., et al., Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*. 2004; 22(5): 675-682.
33. Ross, S.E., et al., Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. *Science*. 2000; 289(5481):950-953.
34. A. Rustom, R. Saffrich, I. Markovic, P. Walther, H.H. Gerdes. Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science*. 2004; 303(5660):1007-1010

VII. Bibliografía

35. N.M. Sherer, W. Mothes. Cytonemes and tunneling nanotubules in cell-cell communication and viral pathogenesis. *Trends Cell Biol.* 2008; 18(9):414-420
36. H. Valadi, K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J.J. Lee, J.O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9(6):654-659
37. M. Guescini, D. Guidolin, L. Vallorani, L. Casadei, A.M. Gioacchini, P. Tibollo, *et al.* C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Exp Cell Res.* 2010; 316(12):1977-1984
38. CloAlde Théry *et al.* Vesículas Extracelulares. 2009
39. Robbins PD, Morelli AE.
40. C. Thery, L. Zitvogel, S. Amigorena. Exosomes: Composition, biogenesis and function. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2 (8) 569-579
41. V. Muralidharan Chari, J. Clancy, C. Plou, M. Romao, P. Chavrier, G. Raposo, *et al.* ARF6-regulated shedding of tumor cell-derived plasma membrane microvesicles. *Curr Biol.* 2009; 19 (22):1875-1885.
42. Clayton, A. Turkes, S. Dewitt, R. Steadman, M.D. Mason, M.B. Hall *et al.* Adhesion and signaling by B cell-derived exosomes: The role of integrins. *Faseb J.* 2004; 18(9):977-979.
43. M. Mittelbrunn, C. Gutierrez-Vazquez, C. Villarroya-Beltri, S. Gonzalez, F. Sanchez-Cabo, M.A. Gonzalez, *et al.* Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2011 (2):282.
44. B. Fevrier, G. Raposo. Exosomes: Endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol.* 2004; 16 (4): 415-421.
45. Ruvkun, G. Molecular Biology: Glimpses of a Tiny RNA World. *Science.* 2001; (294):797-799.

VII. Bibliografía

46. Lee Y. et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004; (23):4051–4060.
47. Han, J. et al. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* 2004; (18):3016–3027.
48. Moore, M. S. et al. The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature.* 1993; (365): 661–663.
49. Bernstein, E. et al. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001; (409):363–366.
50. Hammond, S. M. Dicing and slicing: The core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* 2005; (579):5822–5829.
51. Hammond S. M. et al. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000; (404):293–296.
52. A.I. Caplan. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol.* 2007; (213):341-347.
53. M.F. Pittenger, A.M. Mackay, S.C. Beck. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science.* 1999; (284):143-147.
54. J.M. Gimble, A.J. Katz, B.A. Bunnell. Adipose-derived stem cells for regenerative medicine. *Circ Res.* 2007; (100):1249-1260
55. Hao L, Zou Z, Tian H, Zhang Y, Zhou H, Liu L. Stem cell-based therapies for ischemic stroke. *BioMed Research International.* 2014.
56. Karaoz, E., et al., Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology.* 2009; 132(5):533-546.
57. Fafián Labora JA. Influence of aging on proliferation, pluripotency, immunogenic profiles from bone marrow mesenchymal stem cells. 2016.
58. Li C-J, Cheng P, Liang M-K, Chen Y-S, Lu Q, Wang J-Y. MicroRNA-

VII. Bibliografía

188 regulates age-related switch between osteoblast and adipocyte differentiation. *J Clin Invest.* 2015; 125(4):1509–22.

59. Fafián-Labora J, Lesende-Rodríguez I, Fernández-Pernas P, Sangiao-Alvarellos S, Monserrat L, Arntz OJ. Effect of age on pro-inflammatory miRNAs contained in mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Sci Rep.* 2017; (7):43923.

8. Anexos

Tabla IV. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la técnica proteómica de Western Blot.

Anticuerpos primarios	Casa comercial
Conejo monoclonal Anti-Raptor rata	(Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
Conejo monoclonal Anti-Phospho-mTOR rata	Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
Conejo monoclonal Anti-mTOR rata	(Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
Conejo monoclonal Anti-Rictor rata	(Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
Conejo monoclonal Anti-AKT rata	(Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
conejo monoclonal Anti-Phospho-AKT rata	Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
ratón anti β actina humano	(Sigma-Aldrich, Madrid, ES)
Anticuerpos secundarios	Casa comercial
Cabra Anti-rata	(Cell signalig, <u>Danvers, Massachusetts, EE.UU</u>)
Anti-ratón	(GE Healthcare, Amersham Biotechnology, UK)

Tabla V. Muestras de todos los experimentos.

Muestras
CMMs jóvenes y adultas sin VEs modificadas (control, día 0)
CMMs jóvenes y adultas sin VEs modificadas (día 2)
CMMs jóvenes y adultas con VEs modificadas (día 2)
CMMs jóvenes y adultas sin VEs modificadas (día 3)
CMMs jóvenes y adultas con VEs modificadas (día 3)
CMMs jóvenes y adultas sin VEs modificadas (día 6)
CMMs jóvenes y adultas con VEs modificadas (día 6)
CMMs jóvenes tratadas con mimic (control negativo del miR-188-3p)
CMMs jóvenes tratadas con el inhibidor miR-188-3p

Tabla VI. Proteínas procesadas en la técnica de Western Blot.

Proteína	KDa	% acrilamida en gel
Rictor	200	10
Raptor	150	8
p-mTOR	289	8
mTOR	289	10
AKT	60	10
p-AKT	60	8
β -actina	42	8,10

Tabla VII. Modo de preparación de reactivos de transducción.

Reactivos	Preparación
Inibidor de miR-188-3p	Medio de cultivo RPMI 1640 sin suero bovino fetal con 100 IU/ml penicilina-100 mg/ml Estreptomicina y lipofectamina RNA max Reagent (Invitrogen, California, EE.UU)
Mimic (control negativo)	Medio de cultivo RPMI 1640 sin suero bovino fetal con 100 IU/ml penicilina-100 mg/ml Estreptomicina y lipofectamina RNA max Reagent (Invitrogen, California, EE.UU)

CERTIFICADO

D. Alberto Centeno Cortés y D.ª Nieves Domenech García en calidad de presidente y vicepresidente del Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) del Complejo Hospitalario Universitario A Coruña (CHUAC) y en virtud de lo dispuesto en el Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos:

CERTIFICAN:

- Que D.ª M.ª del Carmen Arufe Gonda ha presentado para su evaluación por el CEEA el proyecto de investigación titulado: *Estudio del perfil pluripotente y proliferativo de las células madre mesenquimales procedentes de la médula ósea de ratas a diferentes edades.*
- Que una vez evaluado dicho proyecto por todos los miembros del CEEA ha obtenido por unanimidad la valoración de APTO conforme a la legislación vigente.
- Que la totalidad del proyecto va a realizarse en las instalaciones de la Unidad de Investigación y la Unidad de Cirugía Experimental del CHUAC inscrita en el Libro de Registro de la Consellería de Agricultura de la Xunta de Galicia como Centro Usuario de Animales de Experimentación con el nº ES150300014801 // 150002AE.
- Que todos los procedimientos de cuidado, manipulación, quirúrgicos y eutanásicos a los que se someta a los animales, serán realizados por el personal de la Unidad de Cirugía Experimental. Dicho personal está cualificado en todos los grupos profesionales: A, B, C, D1 y D2.

Lo cual firmamos y sellamos en A Coruña a 25 de marzo de 2014.


D. Alberto Centeno Cortés
Presidente del CEEA



D.ª Nieves Domenech García
Vicepresidente del CEEA

Figura 15. Certificado de la aprobación del Comité de ética animal.