

**Efecto de las vesículas extracelulares sobre las características de las células madre mesénquimales durante el envejecimiento**

**Effect of extracellular vesicles on the characteristics of mesenchymal stem cell during aging**

**Efecto das vesículas extracelulares sobre as características das células nais mesenquimais durante o envellecemento**

**Ingrid Vishnoff Suárez**

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Universidad da Coruña

Septiembre 2018

Facultad de Ciencias de la Universidad de la Coruña

Realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de A  
Coruña. *En el Grupo de Terapia Celular y Medicina  
Regenerativa*

**Efecto de las vesículas extracelulares sobre las  
características de las células madre mesénquimales  
durante el envejecimiento**

**Effect of extracellular vesicles on the characteristics of  
mesenchymal stem cell during aging**

**Efecto das vesículas extracelulares sobre as  
características das células nais mesenquimais durante o  
envellecemento**

La Dra. María del Carmen Arufe como tutora de este trabajo,  
autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador

**María del Carmen Arufe**

## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
<b>MARCO TEORICO</b> .....	<b>7</b>
<b>1. Células Madre</b> .....	<b>7</b>
1.1 Células Madre Mesénquimales (CMM). .....	8
<b>2. Senescencia o Envejecimiento celular</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Vesículas Extracelulares</b> .....	<b>11</b>
<b>4. Expresión Génica</b> .....	<b>12</b>
4.1 LMNA.....	12
4.2 mTOR.....	12
4.3 AKT.....	13
4.4 RAPTOR Y RICTOR .....	14
<b>HIPOTESIS</b> .....	<b>14</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>15</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	<b>15</b>
<b>5. Cultivo de CMMs con y sin Vesículas</b> .....	<b>15</b>
<b>6. Extracción de ARNm</b> .....	<b>16</b>
<b>7. Amplificación de ADN complementario ADNc mediante Retrotrascipción. RT</b> .....	<b>16</b>
<b>8. Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)</b> .....	<b>17</b>
<b>9. Estadística</b> .....	<b>18</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>19</b>
<b>10. Análisis de la expresión génica de CMM adultas tratadas con VEs jóvenes</b> .....	<b>19</b>
10.1 LMNA .....	19
10.2 RAPTOR .....	19
10.3 AKT .....	20
10.4 mTOR.....	21
<b>11. Expresión génica en CMM jóvenes tratadas con VE adultas</b> .....	<b>23</b>
11.1 LMNA .....	23
11.2 RAPTOR .....	24
11.3 AKT .....	25
11.4 mTOR.....	26
11.5 RICTOR.....	27
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>28</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>30</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>31</b>

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1. DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE LINAJES DE DIFERENCIACIÓN DE CMM .....	9
FIGURA 2. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN LMNA EN CMM DE INDIVIDUOS ADULTOS SIN VE JÓVENES (ASVEJ) CMM ADULTAS TRATADAS CON VE DE INDIVIDUOS JÓVENES (ACVEJ). .....	19
FIGURA. 3 HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN RAPTOR EN CMM DE INDIVIDUOS ADULTOS SIN VE JÓVENES (ASVEJ) Y CMM ADULTAS CON VE DE INDIVIDUOS JÓVENES (ACVEJ). .....	20
FIGURA 4. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN AKT EN CMM DE INDIVIDUOS ADULTOS SIN VE JÓVENES (ASVEJ) Y CMM ADULTAS TRATADAS CON VE DE INDIVIDUOS JÓVENES (ACVEJ). .....	21
FIGURA 5. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN MTOR EN CMM DE INDIVIDUOS ADULTOS SIN VE JÓVENES (ASVEJ) Y CMM ADULTAS TRATADAS CON VE DE INDIVIDUOS JÓVENES (ACVEJ). .....	22
FIGURA 6. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN RICTOR EN CMM DE INDIVIDUOS ADULTOS SIN VE JÓVENES (ASVEJ) Y CMM ADULTAS TRATADAS CON VE DE INDIVIDUOS JÓVENES (ACVEJ).. .....	23
FIGURA 7. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN LMNA EN CMM DE INDIVIDUOS JÓVENES SIN VE DE ORGANISMOS ADULTOS (JSVEA) Y CMM JÓVENES CON VE DE INDIVIDUOS ADULTOS (JCVEA). .....	24
FIGURA 8. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN RAPTOR EN CMM DE INDIVIDUOS JÓVENES SIN VE ADULTAS (JSVEA) Y CMM JÓVENES CON VE DE INDIVIDUOS ADULTOS (JCVEA). .....	25
FIGURA 9. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN AKT EN CMM DE INDIVIDUOS JÓVENES SIN VE ADULTAS (JSVEA) Y CMM JÓVENES CON VE DE INDIVIDUOS ADULTOS (JCVEA). .....	26
FIGURA 10. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN MTOR EN CMM DE INDIVIDUOS JÓVENES SIN VE ADULTAS (JSVEA) Y CMM JÓVENES CON VE DE INDIVIDUOS ADULTOS (JCVEA). .....	27
FIGURA 11. HISTOGRAMA DE LA EXPRESIÓN GÉNICA RELATIVA DEL GEN RICTOR EN CMM DE INDIVIDUOS JÓVENES SIN VE ADULTAS (JSVEA) Y CMM JÓVENES CON VES DE INDIVIDUOS ADULTOS (JCVEA). .....	28

**LISTA DE TABLAS**

TABLA 1. PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN DEL ADNC .....	17
TABLA 2. SECUENCIAS DE PRIMERS UTILIZADOS. ....	18

## RESUMEN

*En el sector científico ha crecido el interés por descubrir la raíz de muchas enfermedades que afligen a ser humano, gracias a ese interés se han desarrollado nuevos campos en la medicina como es el caso de la medicina regenerativa la cual trabaja principalmente con células madres en la regeneración de tejidos y órganos dañados como consecuencia del envejecimiento, daño congénito y factores ambientales ect; a pesar de los esfuerzos y los estudios que se han realizado hasta la fecha, la información que se tiene es muy fluctuante y se hace necesario conocer mas a fondo sobre las interacciones de las células madres con el microambiente. Con el presente trabajo se pretendió demostrar que la vesículas extracelulares pueden llegar en generar cambios en la expresión genética de las Células madres mesénquimas (CMM) durante el envejecimiento. Se trabajo con Celulas Madre Mesénquimales CMM de medula ósea de rata Wistar y vesículas extracelular de individuos adultos y individuos jóvenes. Se realizaron dos experimentos, el primero las CMM adultas fueron tratadas con VE de organismos jóvenes y en el segundo experimento a las CMM jóvenes fueron tratadas con VE de individuos adultos. Mediante un qPCR se evaluó la expresión de cinco genes LMNA, RAPTOR, AKT, mTOR y RICTOR. Se puede evidenciar que la presencia de vesículas extracelulares (VE) si pueden afectar a la expresión genética en CMM. Es necesario realizar un estudio mas a fondo que implique otros métodos por ejemplo un Wester Blot para observar la cantidad de proteínas y poder corroborar las datos generados de la expresión genética.*

*Palabras Claves: Células madres Mesénquimas (CMM), Vesículas Extracelulares (VE), Envejecimiento, Expresión Génica*

## ABSTRACT

*In the reserach sector has grown the interest in discovering the root of many diseases that afflict human being, thanks to this interest have developed new fields in medicine, how is the case of regenerative medicine, which works mainly with stem cells in the regeneration of damaged tissues and organs as a result of aging, congenital damage and environmental factors ect; Despite the efforts and studies that have been carried out until today, the information available is very fluctuating and it is necessary to know more about the interactions of stem cells with the microenvironment. The aim of this study was to demonstrate that extracellular vesicles can generate changes in the genetic expression of mesenchymal stem cells (MSC) during aging. We worked with Wistar rat bone marrow MSC and extracellular vesicles (EV) of adult organism and Young organism. Two experiments were carried out. The first, the adult MSC were treated with EV of young organisms and in the second experiment the young MSC were treated with EV of adult organism. Through a qPCR the expression of five gens LMNA, RAPTOR AKT, mTOR and RICTOR was evaluated. We demostrated that the presence of extracelula vesicles can affect the genetic expession of the MSC. It is necesary to make a deeper study that involves others methos such as Wester Blot to oberve the amount of proteins and helps to corroborate the data was generated from the genetic expression.*

*Key Words: Mesenchymal Stem Cell (MSC), Extracelular Vesicles, Aging, Genic Expresion.*

## RESUMO

*No sector científico creceu o interese por descubrir a raíz de moitas enfermidades que afectan ao ser humano, grazas a este interese desenvolveronse novos campos na medicina como é o caso da medicina rexenerativa que traballa principalmente con células nai na rexeneración de tecidos e órganos danados como consecuencia do envellecemento, do dano conxénito e factores ambientais. A pesar dos esforzos e estudos que se realizaron ata o de agora, a información dispoñible é moi fluctuante e é necesario coñecer máis sobre as interaccións das células nai co microambiente. O obxectivo deste traballo foi demostrar que as vesículas extracelulares poden xerar cambios na expresión xénica das células nais mesenquimáis (CMM) durante o avellentamento. Traballamos con CMM de médula ósea de ratos Wistar e vesículas extracelulares de individuos adultos e individuos novos. Dous experimentos foron realizados. Primeiro, as CMMs adulta foi tratada con VE de microorganismos e no segundo experimento os CMM novos foron tratados con VE de individuos adultos. Mediante un qPCR, evaluouse a expresión de cinco xenes LMNA, RAPTOR, AKT, mTOR e RICTOR. Pódese evidenciar que a presenza de vesículas extracelulares (VE) poden afectar a expresión xénica en CMMs. É necesario realizar un estudo máis profundo que implique outros métodos como o Wester Blot para observar a cantidade de proteínas e para corroborar os datos xerados a partir da expresión xénica.*

*Palabras clave: células nai mesenquimáis (CMM), Vesículas extracelulares (VE), avellentamento, expresión xenética*

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años, en el sector científico ha crecido el interés por entender a fondo la causa de enfermedades como el cáncer, párkinson, alzhéimer, esclerosis entre otras. Debido a ello, nació una nueva rama en la medicina, la medicina regenerativa la cual trabaja principalmente con células madres en la regeneración de tejidos u órganos dañados de manera estructural o funcional como consecuencia del envejecimiento, daño o defecto congénito, factores ambientales y como terapia modificadora de enfermedades (Coelho et al., 2012). Sin embargo los resultados obtenidos hasta la fecha son muy ambiguos, se hace necesario comprender acerca de las interacciones de las células madres con el microambiente. Además en la terapia celular existes varias complicaciones como la respuesta inmune (allogénica) y la edad (autóloga y allogénica). Por lo tanto es necesario comprender componentes de las células madres con funciones reguladoras, como la senescencia y el las vesículas extracelulares (exosomas).

Los exosomas son vesículas de membrana que se originan en el interior de la célula en compartimentos endosomales, estos son secretados por las células al ambiente extracelular donde interactúan con otras células. La secreción de los exosomas ha sido reportado por varios tipos de células, como líneas celulares de tumorales, células neuronales y células madres, además de ha encontrado en algunos fluidos biológicos como la orina (Bang & Thum, 2012).

La senescencia celular es una serie de cambios fisiológicos y anatómicos en la célula, la cual se caracteriza por la detención de la proliferación de las células post-mitóticas como respuesta a algún daño celular (Rodier & Campisi, 2011). La senescencia ha sido objetivo de numerosas investigaciones ya que esta se le relacione con enfermedades como el cáncer, enfermedades degenerativas y síndromes progeroides (trastornos genéticos raros que imitan el envejecimiento fisiológico).

En este presente trabajo se hace énfasis en el efecto de las vesículas extracelulares sobre la expresión genética de la células madres mesénquimas durante el envejecimiento, basándonos en la ruta metabólica de mTOR. Es necesario hacer un estudio más a fondo donde se pueda evaluar si las vesículas extracelulares pueden promover mecanismos de tolerancia inmunológica y regeneración tisular, con el fin de tener un conocimiento más amplio del papel que juegan las vesículas extracelulares en las células madres mesénquimas y sus posible aplicaciones en la medicina regenerativa.

El presente estudio se ejecuto bajo el marco del Grupo de Investigación de Medicina Regenerativa del Instituto de Investigaciones Biomédicas de A Coruña (INIBIC), entidad que suministro el apoyo logístico y financiero para su ejecución.

## MARCO TEORICO

### 1. Células Madre

Las células madre (CM) o células trocales, son células indiferenciadas con una alta capacidad de proliferación y autorrenovación, las cuales pueden diferenciarse en diferentes tipos de células especializadas (Weissman, 2000). Las CM se puede clasificar según su potencial y capacidad de diferenciación: Las CM **Totipotenciales** son capaces de producir tejido embrionario y extraembrionario, con la capacidad de formar un embrión completo y el trofoblasto de la placenta (Mitalipov & Wolf, 2009); las CM **Pluripotenciales** tienen la habilidad de diferenciarse en tejidos procedentes de las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo, ectodermo) y, por último, las CM **Multipotenciales** son capaces de diferenciarse en distintos tipos de linajes células diferenciadas de acuerdo a la localización. Sin embargo las CM también se pueden clasificar según su fuente de origen: **las Células Madre Embrionarias (CME)** que provienen de la masa de la capa interna del blastocisto y **las Células Madres Adultas (CMA)** derivan de tejidos adultos siendo las CMA mas estudiadas las Células Madre Hematopoyeticas (CMH) y Células Madre Mesénquimales (CMM).

En el 2006 los científicos japoneses Takahashi y Yamanaka realizaron los primeros experimentos de reprogramación de fibroblastos de ratón hacia CME mediante la inducción de cuatro genes, oct3/4, Sox2, c-Myc y Kf4, con la idea de crear células madres a partir de células somáticas. A este tipo de células madres modificadas genéticamente se le conoce como (IPS). El desarrollo de las IPS ha sido un gran avance para la ciencia debido a que tienen las características típicas de una CME, resolviendo un problema ético y moral que conlleva realizar estudios con CME. Sin embargo las IPS presentan una serie de problemas debido a que se pueden generar teratomas. En la actualidad se siguen trabajando para mejorar los procedimientos de reprogramación celular y así poder eliminar la formación de teratomas.

### 1.1 Células Madre Mesénquimales (CMM).

Las CMM fueron descritas por primera vez por Freidenstein y colaboradores en 1974. La CMM son un grupo de células adherentes pluripotentes y de morfología fibroblastoide, capaces de diferenciarse hacia células de origen mesodérmico como osteocitos (Chen et al 2001), condrocitos (Johnstone et al., 1998), adipocitos (Allan et al 2003), neuronas (Song et al 2004), cardiomiocitos (Jackson et al., 2001) y hepatocitos (Kang et al 2005) *in vivo* o *in vitro* (Figura 1). Las CMM principalmente derivan de una de las tres capas germinales, específicamente del mesodermo, tejido conectivo blando que se desarrolla en la formación del embrión, y que da lugar a la mayoría de las células del tejido conectivo en adultos (Roufosse et al., 2004).

Según la sociedad internacional de terapia celular o ISCT (International Society Cellular Therapy) y Dominici et al 2006, las CMMs deben tener las siguientes características: Adherirse al plástico en cultivo,  $\geq 95\%$  de la población de CCM deben expresar los antígenos CD73, CD90 y CD105, ausencia de antígenos hematopoyéticos como CD34, CD45, CD14 o CD11b y CD79 $\alpha$ , y deben ser capaces de diferenciarse *in vitro* en osteocitos, adipocitos y condrocitos.

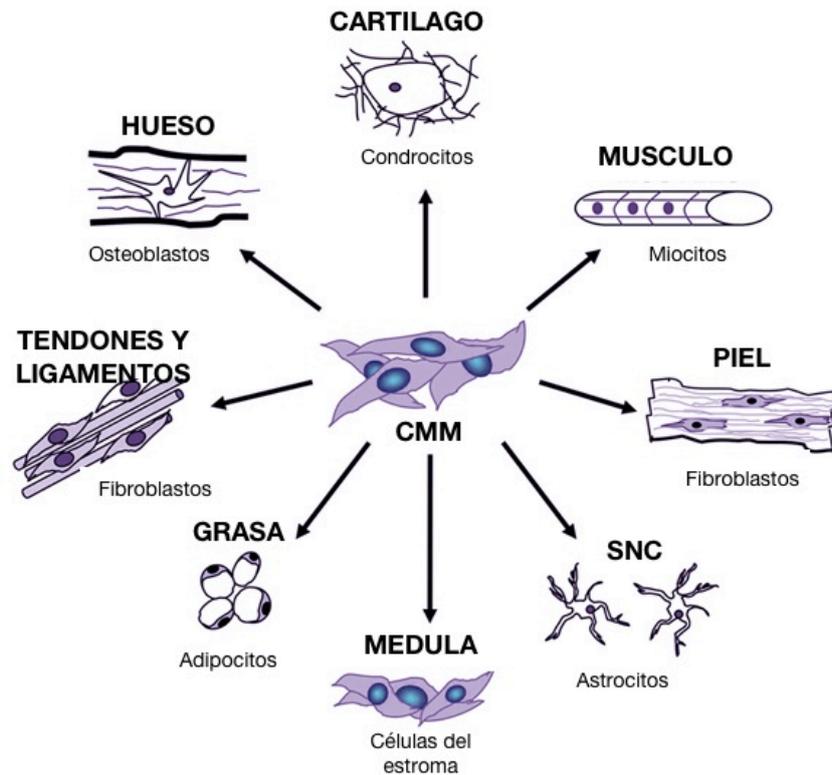


Figura 1. Diagrama esquemático de linajes de diferenciación de CMM .Tomada y Modificada de Convesant Healthcar Systems, INC. <http://www.sci-therapies.info/mesenchymal-stem-cells.jpg>.

## 2. Senescencia o Envejecimiento celular.

El envejecimiento celular, son una serie de cambios anatómicos y fisiológicos de la célula, que llevan a la pérdida progresiva de las funciones fisiológicas, disminuyendo la capacidad de reacción sobre daños o lesiones incrementando el riesgo de muerte. (López-Otin et al., 2013) además es el causante de diferentes patologías como el cáncer (Kennedy 1988), diabetes (Halter, 2012), enfermedades neurodegenerativas (Hung et al., 2010) y cardiovasculares (Strait & Lakatta, 2012).

La senescencia celular se reconoce como el estado de detención irreversible del ciclo celular en respuesta a una variedad de tensiones celulares. Fue descrita por primera vez en la década de los 60s por Hayflick, donde las células tienen una habilidad limitada de proliferación “senescencia replicativa”. La senescencia puede ser causada por una serie de mecanismos como: acumulación de estrés oxidativo o Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), disminución de la funcionalidad de la

mitocondria, disfuncionalidad de los telómeros, alteraciones en la reparación del ADN, alteraciones epigenéticas causadas por factores del entorno y señales mitogénicas (Hayflick, 1965).

El proceso de envejecimiento o senescencia de las CMM aun sigue siendo desconocido, debido a que no se tiene un conocimiento profundo de los mecanismos que interfieren. Además las CMM senescentes no expresan los mismo marcadores fenotípicos y los genes y las vías de señalización que regulan este proceso se desconocen (Li et al.,

Las CMM en estado de senescencia se caracterizan por tener una morfología alargada y ensanchada, detención del ciclo celular en la fase G1 (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007), aumento de la expresión de la B-galactosidasa (SA-B-gal), causado por el incremento de las actividades lisosómicas y el PH citólico alterado (Stenderup et al., 2003).

El estrés oxidativo es una de las principales causas del envejecimiento celular, este se describe como un desequilibrio entre la producción de radicales libre /ERO y antioxidantes (Reuter 2010). En el año 1956 fue propuesta la teoría del los radicales libres (Harman, 1956). Los radicales libre son moléculas que tiene un electrón impar, como por ejemplo oxido nítrico (NO), ERO y sus productos reactivos. Dentro de los ERO encontramos aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), peróxido de hidrogeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), los cuales son generados en la células mediante la cadena respiratoria de la mitocondria (Balaban et at 2005), y la familia de oxidasa NADPH Nox (Bedard & Krause, 2007). Existe factores intrínsecos que causan la producción de ERO tales como la radiación, la luz ultravioleta y factores de crecimiento. La acumulación de ERO en las CMM contribuye a la pérdida de la homeostasis, lo que lleva a la senescencia (Passos et al., 2007). Una de las principales vía de señalización en las que esta involucrados los ERO es la PI3K / AKT / mTOR / FOXO3. Esta vía es un regulador crítico de las respuestas de estrés, por ejemplo estudios demuestran que en presencia de altos niveles de ERO, se activa la expresión de FOXO3, y la inhibición de FOXO3 da como resultado un menor número de células apoptóticas y

una mejor viabilidad, además el proceso oxidativo lleva al daño del ADN, daño se proteínas y disfunción mitocondrial. (Zhang et al., 2015).

Las células tienen una capacidad finita de proliferación hasta que salen del ciclo celular a la senescencia replicativa. Se ha desmostado que la erosión de los telómeros asociada a los daños del ADN son el causante de la senescencia replicativa. La vida útil de las CMM en condiciones *in vitro* es en promedio entre 20 – 40 duplicaciones (Hwang, 2014). Se estima que los telómeros se acortan en ~17 pb durante el envejecimiento (Harley et al., 1990).

Con respecto a la expresión génica se tiene conocimiento que existes varios genes que están involucrados en la senescencia de las CMM, como por ejemplo de los genes que codifican para las proteínas supresoras de tumores p16INK4a / CDKN2A y p14 / p19ARF (Rayess et al 2012). el factor de transcripción HMGA2, el gen RB (Galderisi et al 2016) y el gen LMNA (Liu et al, 2005).

Es importante destacar que las células senescente no son solamente células que detiene su ciclo celular, sino que también afectan a las células circundantes a través de la secreción de moléculas bioactivas (citocinas inflamatorias quimiocinas y metaloproteínas) al espacio extracelular, esto se le conoce como fenotipo secretor asociado a la Senescencia (SASP) (Coppe et al, 2008) El SASP está regulado transcripcionalmente por NF- $\kappa$ B y CEBP /  $\beta$  y actúa de manera autocrina (*Chien et al., 2011*). El SASP esta implicado en el desarrollo de fibrosis, tumorigénesis y además también puede inducir la senescencia celular (Storer et al., 2013; van Deursen, 2014). Por ejemplo la señalización mediante p38 $\alpha$  MAPK 12 y la respuesta persistente al daño del ADN (DDR) asociada a la senescencia contribuyen a la inducción de SASP (Rodier et al, 2009).

### 3. Vesículas Extracelulares

Las Vesículas extracelulares (VE) fueron descritas por primera vez en los años 30, tienen un diámetro aproximado de 50 nm a 100 nm, se forman por dentro los compartimiento endosomáticos intracelulares tardíos por la incrustación interna de

las membranas endosomales y son secretadas de las células después de la fusión de estos compartimientos con la membrana plasmática (Bobrie, et al, 2012). Las VEs a menudo se clasifican como exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, según su tamaño, biogénesis y mecanismos de secreción (Raposo y Stoorvogel, 2013). Las VES juegan un papel crucial en la comunicación intracelular, al servir como vía de transferencia de una amplia variedad de moléculas como microARN, ARN mensajeros, ADN y proteínas que pueden contribuir a las fusiones fisiológicas y a la patología de algunas enfermedades (Kosaka et al., 2010).

Estudios han demostrado que la senescencia no solo aumenta la secreción de VE sino que también altera su calidad, incluso las VE secretadas por células senescentes tienen una composición proteica altamente alterada y ejercen una función proliferativa en algunas líneas celulares de cáncer (Takasugi et al., 2017) y además se les relaciona con el factor SASP en enfermedades pulmonares relacionadas con la edad (Kadota et al., 2018).

#### 4. Expresión Génica

##### 4.1 LMNA

El gen LMNA codifica para las proteínas Lamina. La Lamina de tipo A y de tipo B son proteínas filamentosas que componen principalmente la lámina celular, la cual es una especie de malla proteica que recubre la superficie nucleoplásmica de la membrana nuclear interna y sirve como marco para organizar la estructura de la envoltura nuclear y como sitio de anclaje de la cromatina.

##### 4.2 mTOR

mTOR es una proteína serina-quinasa de 289 kDA perteneciente a la familia de las quinasas relacionada con la fosfoinositol 3 quinasa (P13K) (Guertin y Sabatini, 2007), conservada evolutivamente, se caracteriza por integrar señales de factores de crecimiento, nutrientes y estrés para regular múltiples procesos como la traducción del ARNm, la progresión del ciclo celular, la autofagia y supervivencia

(Sarbasov et al., 2005, Laplante y Sabatini, 2009). mTOR consta al menos de dos complejos distintos de proteínas múltiples, el complejo multiprotéico sensible a rapamicina complejo 1 (mTORC1) (Hara et al, 2002) y complejo multiprotéico insensible a la rapamicina complejo 2 (mTORC2) (Jacinto et al, 2004).

El complejo 1 mTORC1 está compuesto por: mTOR como unidad catalítica del complejo, Raptor proteína asociada a la regulación de mTOR, la proteína mLST8 / GβL, el sustrato AKT rico en prolina (PRAS40) y proteína que interactúan con mTOR que contiene un dominio DEP (Deptor) (Peterson et la 2009). mTORC1 controla el crecimiento celular y la proliferación celular mediante la fosforilación del factor de iniciación eucariótico 4E (eIF4E) - proteína de unión 1 (4E-BP1) y la S6 quinasa 1 (S6K1). La fosforilación de 4E-BP1 evita su unión a eIF4E, permitiendo que eIF4E promueva la traducción (Richter y Sonenberg, 2005).

En el caso del complejo 2 mTORC2 contiene mTOR, mLST8 / GβL, Deptor, pero en lugar de Raptor y PRAS40, tiene las proteínas Rictor, mSin1 y Protor -1 (Peterson et la 2009). mTORC2 desempeña un papel clave en diversos procesos biológicos como la supervivencia celular, metabolismo y proliferación, los cuales depende principalmente de la en respuesta a factores de crecimiento mediante la fosforilación de sus efectores aguas abajo AKT / PKB y Suero / Glucocorticoide Regulada quinasa 1 (SGK1). (Guertin y Sabatini, 2007; Manning y Cantley 2007). Además mTORC2 esta implicado en la organización del citoesqueleto debido ha que mTORC2 controla la actina fomentando la fosforilacion de la proteína quinasa Ca (PKCa) y la fosforilacion de la paxilina (Jacinto at al., 2004).

#### 4.3 AKT

La proteína quinasa B (PKB), también conocida como la AKT juega un papel importante en la regulación del metabolismo, la supervivencia celular, la motilidad, la transcripción y el ciclo celular (Fayard et al, 2005). La proteína Akt tiene tres isoformas de mamíferos (Akt1, Akt2, Akt3), las cuales son productos de genes distintos y comparten una estructura conservada. La AKT promueve la

supervivencia celular al fosforilar factores apoptóticos tales como los factores de transcripción FOXO, GSK-3 $\beta$ , Caspasa-9 y BAD. AKT también fosforila p27, un regulador negativo del ciclo celular, lo que impide el arresto del ciclo celular. Además la activación de AKT conduce a la fosforilación y activación del objetivo mamífero de la rapamicina (mTOR) (Bhatt et al., 2010).

#### 4.4 RAPTOR Y RICTOR

RAPTOR es una proteína evolutivamente conservada de 149 kDA, su nombre deriva de “Regulatory associated protein of mTOR ” por sus siglas en inglés. RAPTOR es un componente primordial de la vía de mTOR, se asocia con mTOR para formar un complejo sensible a nutrientes, el cual cambia con la actividad de la vía. Por ejemplo en condiciones pobres de nutrientes la asociación de complejo mTOR-RAPTOR se estabiliza, mientras que en condiciones de ricas en nutrientes la asociación es más débil (Kim et al., 2002). RAPTOR cumple un papel primordial en la vía de mTOR que regula el crecimiento celular (Kim & Sabatini, 2004). RAPTOR hace parte del complejo 1 mTORC1, funciona como una proteína de andamiaje que facilita el reclutamiento de sustratos a mTOR (Foster et al., 2010). Mientras que RICTOR (Rapamycin-insensitive companion of mTOR) por sus siglas en inglés, es una proteína que hace parte del complejo 2 de mTORC2, de 200 kDA, la cual no es sensible a la rapamicina y de la cual hasta hace poco tiempo poco se ha empezado a entender su función celular (Sarbasov et al., 2004).

#### HIPOTESIS

Estudios previos han demostrado que exosomas, microvesículas y otras vesículas extracelulares pueden directa o indirectamente facilitar la transferencia de información que influya en el comportamiento celular (Qian et al., 2015 ) además los exosomas son capaces de modular la respuesta inmune y sus efectos varían fuertemente dependiendo del estado fisiológico de las células que los secretan

(Thery, 2011; Chaput & Thery, 2011). A partir de esta información nos propusimos la siguiente pregunta:

H<sub>0</sub>: Las vesículas extracelular generan cambios en la expresión genética de las células madres mesénquimales.

H<sub>1</sub>: Las vesículas extracelulares No generan cambios en la expresión genética de las células madres mesénquimales.

## **OBJETIVOS**

Analizar la expresión genética de células madres mesénquimas de rata, bajo la presencia de vesículas extracelulares.

## **MATERIALES Y METODOS**

Para este trabajo se utilizaron CMMs de medula ósea de rata Wistar, y vesículas extracelulares (VE) de individuos con diferentes edades, jóvenes (14 días) y adultos (dos meses). Las células y al igual que las vesículas fueron suministradas por el grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto de Biomedicina INIBIC bajo el estudio de la influencia de la edad en las células madres mesénquimas de medula ósea de ratas Wistar. Se realizaron dos experimentos. En el primer experimentos a las CMM de individuos adultos se les suministraron VEs de los individuos jóvenes y en el segundo experimento a las CMM de los organismos jóvenes se le suministraron las VEs de los organismos adultos.

### **5. Cultivo de CMMs con y sin Vesículas**

En placas de seis pocillos, se sembraron 250000 CMMs de individuos adultos e individuos jóvenes por pocillo, posteriormente se añadieron  $2 \times 10^7$  VE de individuos

juveniles a tres de los pocillos de la placa con las células de individuos adultos y de igual manera se agregaron  $2 \times 10^7$  VEs de individuos adultos a tres pocillos de la placa de las células de individuos juveniles. Los otros 3 pocillos solo tenían las células. Después de los dos, tres y seis días de cultivo, se extrajo el ARNm mensajero (ARNm), para analizar la expresión genética de las CMMs.

## 6. Extracción de ARNm

Para la extracción de ARNm se utilizó el protocolo de TRIZOL Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, Estados Unidos). Las muestras se lavaron tres veces con PBS, después se añadió 1 ml de Trizol y se homogenizó, posteriormente se incubaron durante 5' a  $15^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ . Una vez incubadas se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se agitado por 15'' y se incubó por 2' a  $15^{\circ} - 30^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó las muestras a 3000 rpm 15'' a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se separa 600  $\mu\text{l}$  de sobrenadante en tubos nuevos, se añadió 500  $\mu\text{l}$  de Isopropanol y se incubaron las muestras durante 10' a  $15 - 30^{\circ}\text{C}$ . Se centrifugó nuevamente las muestras 10000 rpm por 10' a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se desechó y en el tubo se añadieron 1 ml de ETOH 75% y se centrifugó a 5000 rpm 5' a  $4^{\circ}\text{C}$ , se dejó secar al aire por 5' y por último se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de agua y guardaron a  $4^{\circ}\text{C}$ .

La cuantificación de la concentración de ARNm extraído se determinó mediante la técnica de espectrofotométrica (Nanodrop ND-1000) a 260 nm y la pureza hallando el ratio entre la absorbancia a 260 nm y 280nm.

## 7. Amplificación de ADN complementario ADNc mediante Retrotranscripción. RT

La Amplificación del ADNc se realizó mediante una retrotranscripción (RT) siguiendo el protocolo del manual de Instrucción del kit NZY First-Strand cDNA Synthesis (NZYTECH, Lisboa, Portugal). En tubos Eppendorf para PCR se agregaron 1  $\mu\text{g}$  de RNA extraído las muestras, más 1  $\mu\text{g}$  de 10 x DNase I reacción Buffer, 1  $\mu\text{l}$  de DNase I Amp Grande 1v/ $\mu\text{l}$  y se añadió agua DEPC hasta complementar un volumen de 10  $\mu\text{l}$ . Posteriormente se incubó en un termociclador a  $37^{\circ}\text{C}$  por 40', después a  $4^{\circ}\text{C}$  por 10' y durante este tiempo se agregó 0,5  $\mu\text{l}$  de EDTA 50, luego se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  por 10', y entre un tiempo de 10' a  $4^{\circ}\text{C}$  se agregaron 10  $\mu\text{l}$  NEYRT 2x

Master Mix, 2  $\mu$ l NZRT ENZYME mix, y se completo hasta 20  $\mu$ l con agua DEPEC. Nuevamente se incubo 25 $^{\circ}$ C por 10', a 50 $^{\circ}$ C por 30', y por 5'a 85 $^{\circ}$ C. Durante un tiempo de 10'a 4 $^{\circ}$ C se añadieron 1  $\mu$ l NZY RNase H (*E. Coli*). Por ultimo se incubo durante 20'a 37 $^{\circ}$ C y después de cumplido ese tiempo de incubación las muestras se dejaron a 4 $^{\circ}$ C mientras se sacan del termociclador. El ADNc se guardo a -20 $^{\circ}$ C.

#### 8. Análisis de la expresión génica mediante PCR a tiempo real (qPCR)

Para el análisis de la expresión de los genes LAMINA, RAPTOR, AKT, mTOR y RICTOR, se utilizo el equipo *LightCycler 4800 Instrument Roche Applied Science* y *Light Cycler 4800 SYBR Green I Master kit (Roche, Basilea, Suiza)*. Para el análisis con al PCR cada set de ensayo se hizo por triplicado. En una placa de PCR de 96 pocillos se agregaron 2  $\mu$ l de ADNc, mas 10 ul de Syber Green 0,3  $\mu$ l del primer forward (del gen), 0,3  $\mu$ l del primer reverse (del gen) y se completo hasta 20  $\mu$ l de agua DEPC. El programa de amplificación de ADNc consistio:

PROCEDIMINETO	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
<b>Preincubación</b>	95 $^{\circ}$ C	10 minutos	1
<b>Amplificación</b>	95 $^{\circ}$ C	10 segundos	55
	60 $^{\circ}$ C	10 segundos	
	72 $^{\circ}$ C	10 segundos	
<b>Melting</b>	95 $^{\circ}$ C	5 segundos	1
	65 $^{\circ}$ C	1 minuto	
<b>Enfriamiento</b>	40 $^{\circ}$ C	1 minuto	

Tabla 1. Programa de Amplificación del ADNc

Los primers de cada gen para la PCR fueron diseñados por medio del Universal ProbelLibrary Assay Desing Center desarrollado por ROCHE Diagnosis Corp (Indianapolis, USA) Tabla 2.

GEN	SECUENCIA FORWARD	SECUENCIA REVERSE
LMNA	GAGCAAAGTGCGTGAGGAGT	TCCCCTCCTTCTTGGTATT
RAPTOR	GAAGGCTCCAAATCTTTAGCA	CACACTGACGGTCTTCATCC
AKT	GACGTAGCCATTGTGAAGGAG	CCATCATTCTTGAGGAGGAAGT
mTOR	ATCAGGCAAGCGACATCTCA	CAGGCCTTGGTTACCAGAAA
RICTOR	GTTGAAAAAATGGCACAAGG	CTGTATGTAGTGAGGGCTTCGTT

Tabla 2. Secuencias de Primers utilizados.

Se utilizo como gen Houskeeping el HPRT, el cual nos sirvió como control debido a que se expresa de igual manera en todas las condiciones y además nos permitió normalizar los datos. Para calcular la expresión relativa de los genes se utilizó el método delta Ct ( $\Delta\Delta Ct$ ) (Livak & Schmittgen, 2001) (Ecuación 1). Los datos de la expresión relativa de cada gen se graficaron en histogramas, con el fin de detectar si existe alguna tendencia de incremento o disminución de la expresión.

$$expR = 2^{-((CpGOI - CpRef)Exp - (CpGOI - CpRef)Ctl)}$$

Donde expR es la expresión relativa del gen; Ctl el grupo control; Exp grupo tratamiento experimental; GOI gen de interés; Ref gen de referencia.

## 9. Estadística

Las expresión relativa de los genes se grafico mediante histogramas de barras. Para determinar si existe alguna diferencia significativas entre el las CMMs sin VE en el día 1 (control) y las CMMs con VEs en los experimentos a y b, se utilizo una prueba *Anova de 1 via.* por medio del programa Prism 6 (GraphPad Softeare, La Jolla, CA). Considerándose que existe diferencias estadísticamente significativas con un *p valor* < 0,05.

## RESULTADOS

### 10. Análisis de la expresión génica de CMM adultas tratadas con VEs jóvenes

#### 10.1 LMNA

En la figura 2 se puede observar que la expresión del gen LMNA en las CMMs adultas sin vesículas de organismos jóvenes (AsVEJ) tiene su mayor expresión en el día 3 y la menor en el día 3. Mientras tanto se observa que la expresión de LMNA en CMM adultas con vesículas jóvenes (AcVEJ) es mayor en el día 3 y la menor expresión en el día 2. Según la prueba ANOVA de una vía SI existe diferencia significativas entre CMMs adultas sin VE jóvenes y CMM adultas tratadas con VE jóvenes durante los días con un *p* valor de 0.00435.

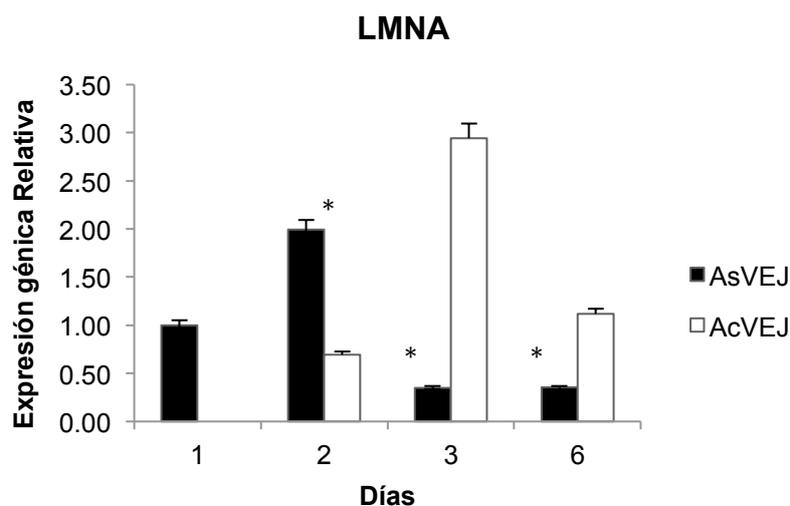


Figura 2. Histograma de la expresión génica relativa del gen LMNA en CMM de individuos adultos sin VE Jóvenes (AsVEJ) CMM adultas tratadas con VE de individuos Jóvenes (AcVEJ). Acorde con la prueba ANOVA de una vía si existen SI existe diferencia significativa entre las AsVEJ y AcVEJ un *\*p* valor de 0.00435.

#### 10.2 RAPTOR

La expresión relativa del gen RAPTOR en CMM adultas sin VE jóvenes tiene su mayor expresión en el día 2, mientras que durante los siguientes días 3 y 6 la expresión de RAPTOR disminuye. Sin embargo en las CMM adultas con VE

jóvenes se evidencia un aumento en la expresión del gen en el día 3 (Figura 3). Según la prueba ANOVA de una vía si existe diferencia significativas entre CMM adultas sin VE y las CMM adultas con VE de individuos jóvenes durante los días con un de 0.00033.

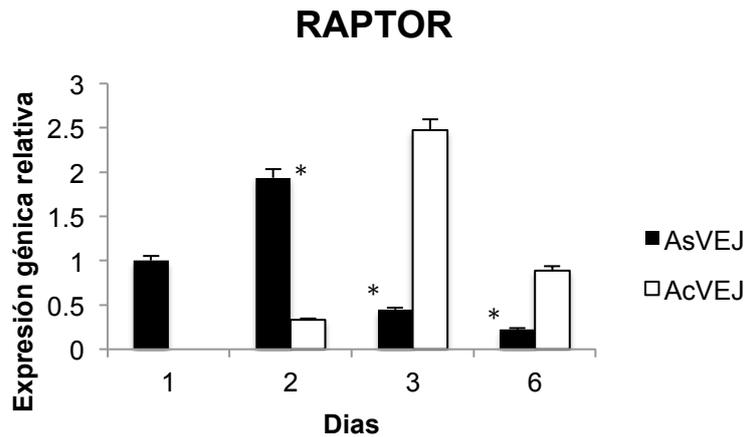


Figura. 3 Histograma de la expresión génica relativa del gen RAPTOR en CMM de individuos adultos sin VE jóvenes (AsVEJ) y CMM adultas con VE de individuos Jóvenes (AcVEJ). Según la prueba ANOVA de una vía si existe diferencia significativas entre AsVEJ y AcVEJ durante los días con un \**p valor* de 0.00033.

### 10.3 AKT

En la Figura 4 se evidencia que la expresión del gen AKT en células CMM de adultas tratadas con VE jóvenes va aumentando hasta el día 3 con valor de  $2^{-DDct}$  de 82.42, mientras que disminuye en el día 6. En las CMM adultas sin VE jóvenes se observa el mismo patrón que el CMM adultas con VE jóvenes, un aumento de la expresión de AKT en el día 3 y disminución en el día 6. Además se puede evidenciar que la expresión del gen AKT es mayor en el CMM adultas tratada con VE jóvenes que en CMM adultas sin VE jóvenes. Según la prueba ANOVA de una vía SI existe diferencia significativas entre CMM adultas con y sin VE jóvenes durante los días con un *p valor* de 0.0014 .

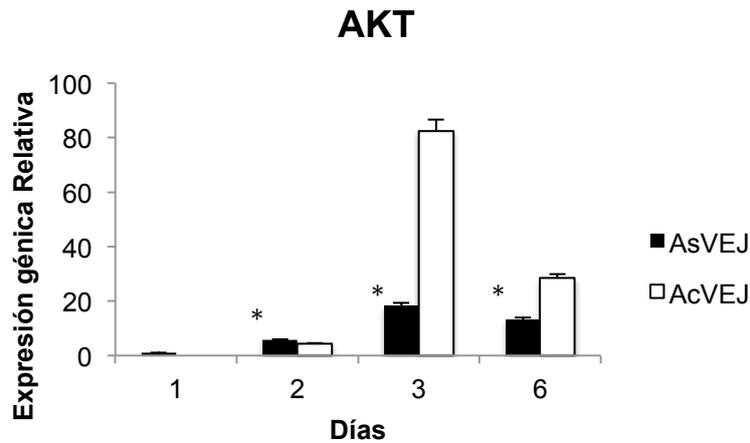


Figura 4. Histograma de la expresión génica relativa del gen AKT en CMM de individuos adultos sin VE jóvenes (AsVEJ) y CMM adultas tratadas con VE de individuos jóvenes (AcVEJ). Según la prueba ANOVA de 1 vía SI existe diferencia significativas entre AsVEJ y AcVEJ durante los días con un \**p* valor de 0.0014 .

#### 10.4 mTOR

La expresión del gen mTOR en las CMM adultas sin tratar con VE juvenes es mayor en el día 3 que en el resto de los días, mientras que la expresión de mTOR en CMM adultas con VE jóvenes es mayor en el día 2. Además la expresión de mTOR es mayor en las CMM adultas sin VE jóvenes con respecto a las CMM adultas tratadas con VE jóvenes. En cuanto a la prueba de ANOVA de una vía SI existe diferencia significativa entre la CMM adultas sin VE jóvenes y CMM adultas con VE jóvenes durante los días con un *p* valor de 0.0166.

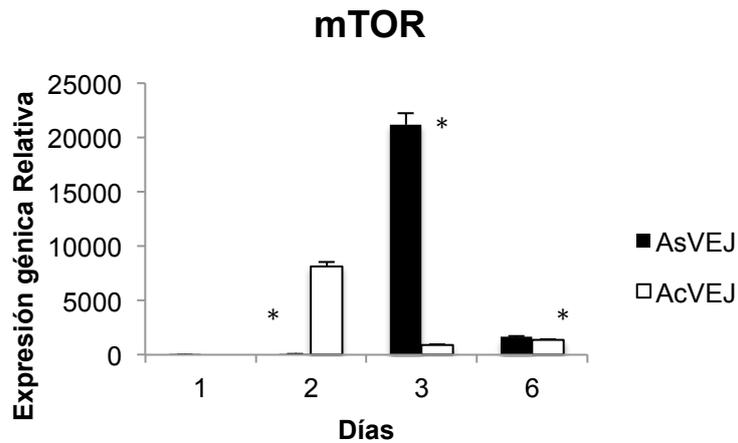


Figura 5. Histograma de la expresión génica relativa del gen mTOR en CMM de individuos adultos sin VE jóvenes (AsVEJ) y CMM adultas tratadas con VE de individuos jóvenes (AcVEJ). En cuanto a la prueba de ANOVA de una vía SI existe diferencia significativa entre AsVEJ y AcVEJ durante los días con un *\*p valor* de 0.0166.

### 10.5 RICTOR

En la figura 6 se puede observar que la expresión relativa del gen RICTOR es similar entre las CMM adultas sin VE jóvenes y CMM adultas con VE jóvenes en el día 2. Sin embargo el gen RICTOR tiene una mayor expresión en el día 3 en las CMM adultas sin VE jóvenes. Según la prueba ANOVA de una vía NO existen diferencia significativa de la expresión del gen RICTOR entre las CMM adultas con y sin VE jóvenes durante los días con un *p valor* de 0.1379.

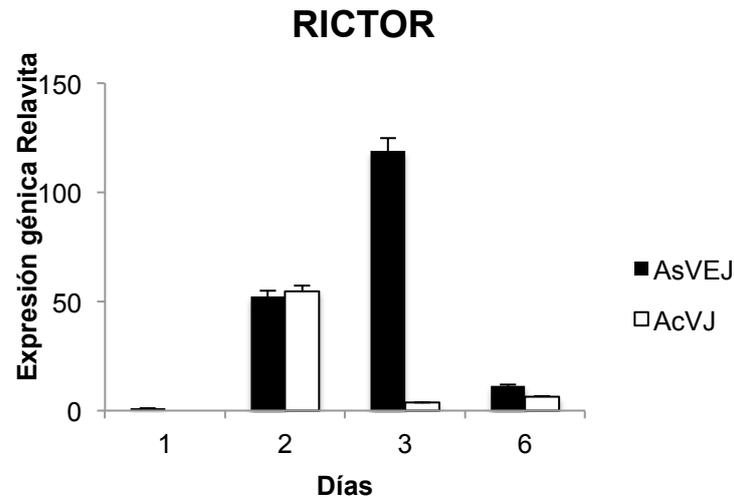


Figura 6. Histograma de la expresión génica relativa del gen RICTOR en CMM de individuos adultos sin VE jóvenes (AsVEJ) y CMM adultas tratadas con VE de individuos jóvenes (AcVEJ). Según la prueba ANOVA de una vía NO existen diferencia significativa de la expresión del gen RICTOR AsVEJ y AcVEJ durante los días con un \**p* valor de 01379.

## 11. Expresión génica en CMM jóvenes tratadas con VE adultas.

### 11.1 LMNA

La expresión del gen LMNA en las CMM jóvenes sin VE adultas es menor en los días 2, 3, 6 en referencia al día 1. Mientras que la expresión de LMNA en CMM jóvenes tratadas con VE de individuos adultos es mayor en el día 3 y menor en el día 6. Cabe resaltar que la expresión de el gen LMNA es mayor en las CMM jóvenes sin VE adultas que en las CMM jóvenes con VE adultas (Figura 7). De acuerdo con la prueba de ANOVA de una vía si existe diferencia significativas entre CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes tratadas con VE adultas durante los días con un *p* valor de 0.0007.

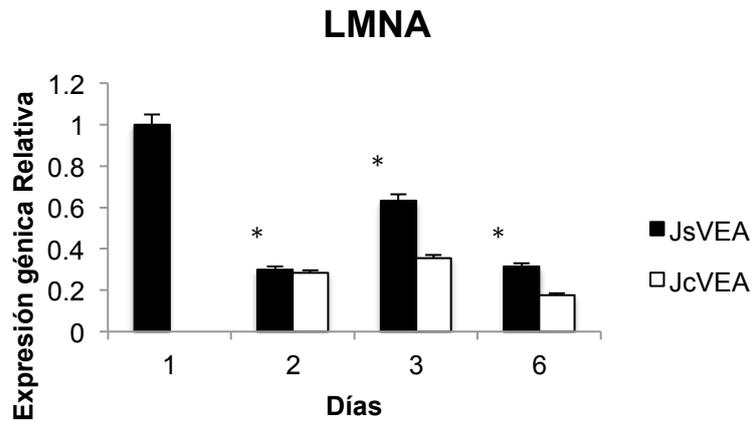


Figura 7. Histograma de la expresión génica relativa del gen LMNA en CMM de individuos jóvenes sin VE de organismos adultos (JsVEA) y CMM jóvenes con VE de individuos adultos (JcVEA). De acuerdo con la prueba de ANOVA de una vía si existe diferencia significativas entre JsVEA y JcVEA CMM durante los días con un \**p* valor de 0.0007.

## 11.2 RAPTOR

En la figura 8 se observa que la expresión del gen RAPTOR es mayor en CMM jóvenes sin VE adultas que en CMM jóvenes tratadas con VE adultas. En las CMM jóvenes con VE adultas la expresión de RAPTOR va disminuyendo durante el transcurso de los días, siendo el día 2 el de mayor expresión y el día 6 el de menor. Con referencia a la prueba ANOVA de una sola vía, Si existe diferencia significativas entre CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes tratadas con VE adultas durante los días con un *p* valor de 0.0014.

## RAPTOR

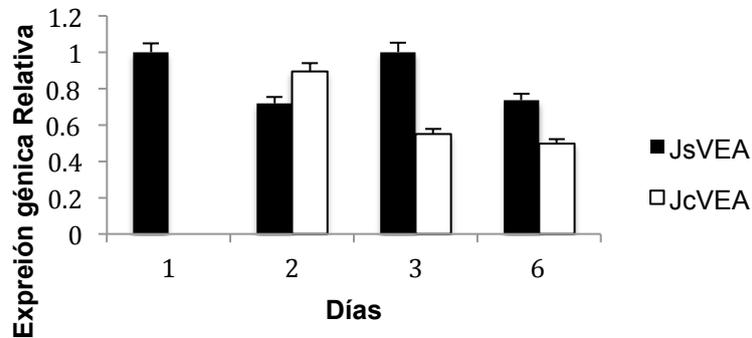


Figura 8. Histograma de la expresión génica relativa del gen RAPTOR en CMM de individuos jóvenes sin VE adultas (JsVEA) y CMM jóvenes con VE de individuos adultos (JcVEA). Con referencia a la prueba ANOVA de una sola vía, Si existe diferencia significativas entre JsVEA y JcVEA durante los días con un \**p* valor de 0.0014.

### 11.3 AKT

La expresión del gen AKT en CMM jóvenes sin VE adultas y en CMM jóvenes con VE adultas va disminuyendo durante el transcurso de los días. El día 1 es el día con la mayor expresión del gen AKT en CMM jóvenes sin VE adultas y el día 6 el de menor expresión de AKT. Sin embargo en CMM jóvenes tratadas con VE adultas la mayor expresión de AKT se presentó en el día 2 y la menor expresión en el día 6 (Figura 9). De acuerdo con la prueba ANOVA de una sola vía, Si existe diferencia significativas entre CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes tratadas con VE adultas durante los días con un *p* valor de 0.0006.

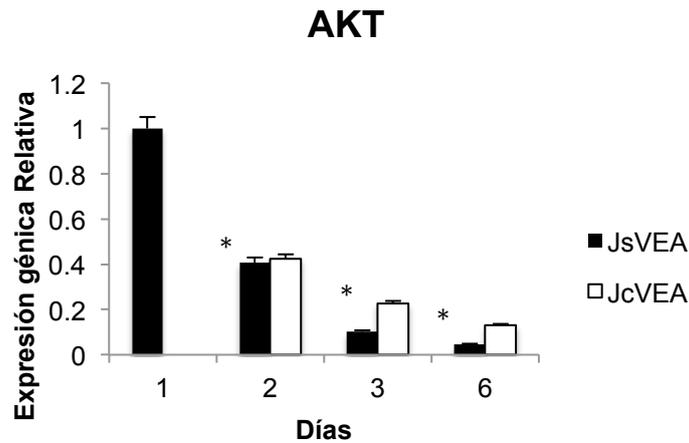


Figura 9. Histograma de la expresión génica relativa del gen AKT en CMM de individuos jóvenes sin VE adultas (JsVEA) y CMM jóvenes con VE de individuos adultos (JcVEA). De acuerdo con la prueba ANOVA de una sola vía, SI existe diferencia significativas entre JsVEA y JcVEA durante los días con un \**p valor* de 0.0006.

#### 11.4 mTOR

En la figura 10 se puede observar que las CMM jóvenes sin VE adultas y en CMM jóvenes tratadas con VE adultas el gen mTOR casi no se expresa. Sin embargo a diferencia del día 1 y el día 3 el gen mTOR tiene una mayor expresión en CMM jóvenes sin VE adulta. Con respecto a la expresión del mTOR en CMM jóvenes con VE adultas, el día 6 fue en el que presento mayor expresión del gen mTOR. Conforme a la prueba estadística ANOVA de una vía, SI existe diferencia significativas entre CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes con VE adultas durante los días con un *p valor* de 0.00326.

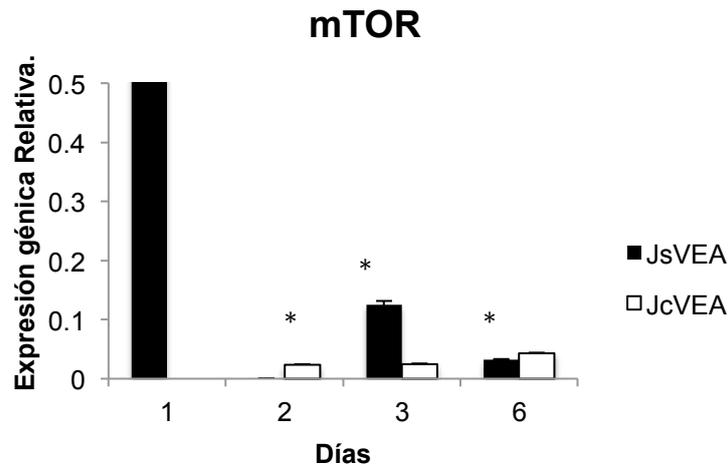


Figura 10. Histograma de la expresión génica relativa del gen mTOR en CMM de individuos jóvenes sin VE adultas (JsVEA) y CMM jóvenes con VE de individuos adultos (JcVEA). Conforme a la prueba estadística ANOVA de una vía, SI existe diferencia significativas entre JsVEA y JcVEA durante los días con un de 0.00326.

### 11.5 RICTOR

La expresión de RICTOR en las CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes tratadas con VE adultas es muy baja o casi nula. Sin embargo la expresión de este gen es mayor en las CMM jóvenes tratadas con VE adultas que en las CMM jóvenes sin tratar (Figura 11). Según la prueba de ANOVA de una vía, SI existe diferencia significativas entre CMM jóvenes sin VE adultas y CMM jóvenes con VE adultas durante los días con un p valor de 0.0005.

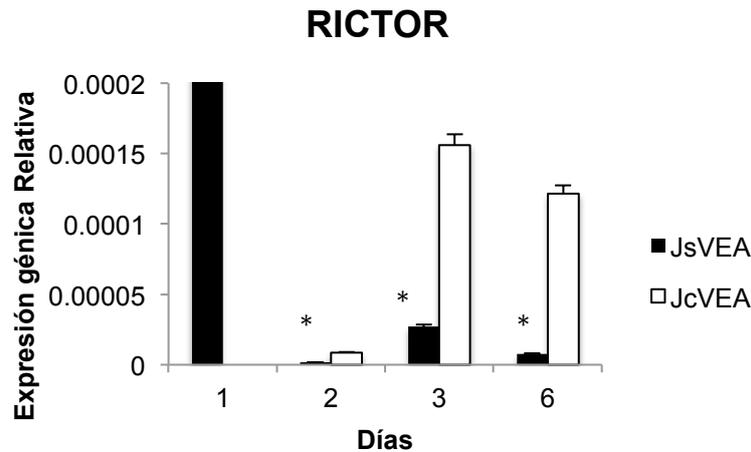


Figura 11. Histograma de la expresión génica relativa del gen RICTOR en CMM de individuos jóvenes sin VE adultas (JsVEA) y CMM jóvenes con VEs de individuos adultos (JcVEA). Según la prueba de ANOVA de una vía, SI existe diferencia significativas entre JsVEA y JcVEA jóvenes durante los días con un \*p valor de 0.0005.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se analizó la expresión de los genes LMNA, AKT, RAPTOR, mTOR y RICTOR de células madres mesénquimas de rata, bajo la presencia de vesículas extracelulares, donde se puede observar que la presencia de las VE si afecta la expresión génica. Las VE están involucradas en muchos procesos celulares tales como la señalización inmune, la angiogénesis, la respuesta al estrés, la senescencia, la proliferación y la diferenciación celular (Van Balkom et al 2013, Xu & Tahara, 2013, Gutzeit et al., 2014), además se sabe que las VE tienen efectos sobre otras células.

En este estudio se evidenció que la expresión del gen LMNA en CMM adultas disminuye cuando VE jóvenes están en el medio, demostrando que la expresión de LMNA se ve afectada por la presencia de vesículas. La expresión de laminas tipo A mutadas, aceleran el envejecimiento al imponer un programa senescente sobre las células en división o al contribuir a la debilidad y muerte celular de las células diferenciadas (Broers et al, 2006), esto se corrobora con en el estudio en CMM realizado por Raz y colaboradores en el 2008, en el cual observaron cambios espaciales en la forma de la lamina, sugiriendo que la morfología de la lamina puede

usarse como una marcadores temprano para identificar células senescentes, además encontraron que la agregación de telómeros está asociada con las estructuras intranucleares de la lamina las cuales podrían tener un efecto estructural en la organización nuclear.

En este trabajo se demostró un aumento en la expresión de AKT en las CMM adultas sin añadir vesículas de organismo jóvenes y además que la expresión de AKT también es mayor en células de adultas sin vesículas jóvenes en comparación de las células de adulto con vesículas de organismos jóvenes, debido a que las vesículas jóvenes puede llevar una series de proteínas que disminuyen en envejecimiento celular. Mientras que la expresión de AKT va disminuyendo en transcurso de los días en CMMs Jóvenes con y sin vesículas adultos. Estudios han demostrado que AKT está involucrado en la senescencia celular, específicamente mediante la vía P13K / AKT. En células humanas por ejemplo la activación consecutiva de la ruta PI3K /AKT da como resultado la acumulación de la proteína supresora de tumores p53 y la inducción rápida de senescencia celular (Astle et al., 2012). En fibroblastos de ratón, la inactivación aguada de PTEN principal regulador negativo de la vía PI3K/AKT induce la detención del crecimiento a través de la ruta de senescencia celular dependiente de p53 (Chen et al., 2005). De igual manera la expresión consecutiva de AKT induce a la senescencia en células endoteliales humanas (Miyachi., 2004). La información que se tiene sobre los mecanismo subyacentes de la inducción de la senescencia por AKT son muy escasos, sin embargo se cree que las ERO juegan un papel principal en la activación de AKT induciendo a la senescencia prematura (Nogueira et al, 2008). Adicionalmente mTOR1 es un mediador esencial de la inducción de la senescencia dependiente de p53 por AKT en fibroblastos humanos (Astle et al., 2012).

En los resultados se observo que la expresión de mTOR no es muy alta, esto puede ser debido a que mTOR está involucrado en varias actividades metabólicas como el crecimiento celular, traducción de proteínas, la senescencia y la esperanza de vida o ya sea por problemas de pipeteo a la hora de hacer la qPCR .

Uno esperaría que la expresión de RAPTOR cumpliera un patrón de expresión similar al del mTOR, debido a que el estudio de Kim y colaboradores se demostró que tanto la expresión de mTOR y RAPTOR parecen estar regulada de forma coordinada porque los niveles reducidos de cualquier proteína inducida por su ARNs<sub>i</sub> específico también disminuyeron el nivel del otro sin afectar la cantidad de su ARNm. En nuestro estudio la expresión de mTOR fue muy bajo, y no se pudo evidenciar un patrón similar de expresión entre RAPTOR y mTOR por lo tanto fue imposible corroborar lo expuesto por Kim y colaboradores. Aún no se tiene un conocimiento claro de los mecanismo moleculares por los que RAPTOR regula a mTOR. Sin embargo se pudo evidenciar que la presencia de vesículas si afecta la expresión de RAPTOR ya que la expresión disminuye en las células jóvenes con vesículas adultas y aumenta en células adultas con vesículas jóvenes. Esto puede ser debido a que RAPTOR juega un rol principal en la vía de mTOR que regula el crecimiento celular.

Con respecto a la expresión de RICTOR se puede apreciar que esta no es muy alta, esto puede ser debido a problemas de pipeteo en el montaje de la placa para qPCR, sin embargo se evidencia que en las CMMs de adulto con vesículas de jóvenes la expresión disminuye. RICTOR hace parte del complejo mTORC2 el cual no es sensible a la rapamicina y no es dependiente de los nutrientes y está involucrado en el reordenamiento del citoesqueleto, crecimiento tisular y supervivencia celular. (Sarbasov et al 2004).

## CONCLUSIONES

Las vesículas extracelulares influyen en la expresión de los genes (LMNA, AKT, RATOR, mTOR y RICTOR), además la expresión de los genes también se ve impactada por la edad del animal del que proceden las CMMs. Se recomienda realizar un estudio más detallado donde se incluya Wester blot para observar la cantidad de proteínas y poder corroborar los datos generados de la expresión genética.

## BIBLIOGRAFIA

1. Allan, E.H., Ho, P.Q., Umezawa, A., Hata, J., Makishima, F., Gillespie M.T., et al. (2003). *Differentiation potencial of mouse bone marrow stromal cell line*. J Cell Biochem. 1:158-169.
2. Astle, M.V., Hannan, K.M, Ng, P.Y., Lee, R.S., George, A.J., Hsu, A.K., Haupt, Y., Hannan, R.D & Pearson, R.B. (2012). *AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy*. Oncogene 31, 1949-1962.
3. Bhatt, A.P., Bhende, P.M., Sin, S.H., Roy, D., Dittmer, D.P. & Damania, B. (2010). *Dual inhibition of PI3K and mTOR inhibits autocrine and paracrine proliferative loops in PI3K/Akt/mTOR-addicted lymphomas*. Blood. 3; 115(22): 4455-63.
4. Balaban RS, Nemoto S & Finkel T. (2005). *Mitochondria, oxidants, and aging*. Cell 120: 483-495.
5. Bang, C. & T. Thum. (2012). *Exosomes: new players in cell-cell communication*. Int J Biochem Cell Biol. 44(11): p. 2060-4.
6. Bedard, K. & Krause, K.H. (2007). *The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology*. Physiol Rev. 87(1): 245-313.
7. Benjamin, D. & Hall, M.N. (2013). *TSC on the peroxisome controls mTORC1*. Nat Cell Biol. 15(10): 1135-6.
8. Bobrie, A., Colombo, M., Krumeich, S., Raposo, G. & Théry, C. (2012). *Diverse subpopulations of vesicles secreted by different intracellular mechanisms are present in exosome preparations obtained by differential ultracentrifugation*. J. Extracell Vesicles. 1é 10.3402/jev.v1i0.18397.

9. Broers, J.L., Ramaekers, F.C., Bonne, G., Yaou, R.B. & Hutchison, C.J. (2006) *Nuclear lamins: laminopathies and their role in premature ageing*. *Physiol Rev.* 86: 967 - 1008.
10. Campisi, J. & d'Adda di Fagagna, F. (2007). *Cellular senescence: when bad things happen to good cells*. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729e740.
11. Chaput, N. & Thery, C. (2011). *Exosomes: immune properties and potential clinical implementations*. *Semin Immunopathol*, 33(5): 419 - 40.
12. Chen, T.L., Shen W.J. & Kraemer, F.B. (2001). *Human BMP-7/OP-1 induces the growth and differentiation of adipocytes and osteoblast in bone marrow stromal cells cultures*. *J Cell Biochem.* 2: 187-99.
13. Chien, Y., Scuoppo, C., Wang, X., Fang, X., Balgley, B., Bolden., J.E., Premririt P., Luo, W., Chicas, A., Lee, C.S., Kogan, S.C & Lowe, S.W. (2011). *Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF- $\kappa$ B promotes senescence and enhances chemosensitivity*. *Genes Dev.* 15; 25(20):2125-36.
14. Chen, Z., Trotman, L.C., Shaffer, D., Lin, H.K, Dotan, Z.A., Niki, M., Koutcher, J.A., Scher, H.I., Ludwig, T., Gerald, W., Cordon-Cardo, C. & Pandolfi, P.P. (2005). *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. *Nature.* 4; 436(7051):725-30.
15. Coelho, M.B., J.M. Cabral. & J.M. Karp. (2012). *Intraoperative stem cell therapy*. *Annu Rev Biomed Eng.* 14: p. 325-49.
16. Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Muñoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P-Y. & Campisi, (2008). *Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell- nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor*. *PLoS Biol.* 6(12): e301.
17. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D.J. & Horwitz, E. (2006). *Minimal criteria for*

- defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy. 8(4):315-7.*
18. Fayard, E., Tintignac, L.A., Baudry, A. & Hemmings, B.A. (2005). *Protein kinase B/Akt at a glance. Journal of Cell Science 118, 5675-5678.*
  19. Foster, K.G., Acosta-Jaquez, H.A., Romeo, Y., Ekim, B., Soliman, G.A., Carriere, A., Roux, P.P., Ballif, B.A., & Fingar, D.C. (2010). *Regulation of mTOR Complex 1 (mTORC1) by Raptor Ser863 and Multisite Phosphorylation. J Biol Chem.1; 285(1): 80–94.*
  20. Galderisi, U., Cipollaro, M & Giordano, A. (2006) *The retinoblastoma gene is involved in multiple aspects of stem cell biology. Oncogene 25: 5250-5256.*
  21. Guertin, D. A. & Sabatini, D. M. (2007). *Defining the Role of mTOR in Cancer. Cancer Cell 12, 9-22.*
  22. Gutzeit, C., Nagy, N., Gentile, M., Lyberg, K., Gumz, J., Vallhov, H., et al. (2014) *Exosomes derived from Burkitt's lymphoma cell lines induce proliferation, differentiation, and class-switch recombination in B cells. J Immunol 192(12):5852–62.*
  23. Halter, J.B. (2012). *Diabetes Mellitus in an aging population the challenge ahead. J Gerontol A Bio Sci Med Sci. 67(12): 1297-99.*
  24. Harley, C.B., Futcher, A.B. & Greider, C.W. (1990). *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345: 458-460.*
  25. Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., & Yonezawa, K. (2002). *Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR) mediates TOR Action. Cell 110, 177–189.*
  26. Harman D.(1956). *Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. J Gerontol 11: 298-300.*

27. Hayflick, L. (1965). *The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains*. Exp. Cell Res. 37, 614–636.
28. Herranz, N., Gallage, S., Mellone, M., Wuestefeld, T., Klotz, S., Hanley, C.J., et al. (2015). *mTOR regulates MAPKAPK2 translation to control the senescence-associated secretory phenotype*. Nat Cell Biol 17:1205-1217.
29. Hung, C.W., Chen, Y.C., Hsieh, W.L., Chiou, S.H. & Kao. (2010). *Ageing and neurodegenerative diseases*. Ageing Res Rev. Suppl 1:S36-46.
30. Hwang E.S. (2014). *Senescence suppressors: Their practical importance in replicative lifespan extension in stem cells*. Cell Mol Life Sci 71: 4207-4219,
31. Jacinto, E., Loewith, R., Schmidt, A., Lin, S., Rugg, M. A., Hall, A. & Hall, M. N. (2004). *Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive*. Nat. Cell Biol. 6, 1122-1128.
32. Jackson, K.A., Majka, H., Pocius, J., Hartley, C.J., Majesky, M.W., Entman, M.L., Mitchael, L.H., Hirschi, K.K & Goodell, M.A. (2001). *Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells*. J Clin Invest. 107(11):1395-402.
33. Johnstone, B., Hering, T.M., Caplan, A.L., Goldberg, V.M. & Yoo, J.V. (1998). *In vitro chondrogenesis of bone marrow derived mesenchymal progenitor cells*. Exp Cell Res. 238(1): 265-72.
34. Kadota, T., Fujita, Y., Yoshioka, Y., Araya J., Kuwano K. & Ochiya T. (2018). *Emerging role of extracellular vesicles as a senescence-associated secretory phenotype: Insights into the pathophysiology of lung diseases*. Molecular Aspects of Medicine 60: 92—103.
35. Kang, X.Q., Zang, W.J., Song T.S., Xo, X.L., Yu, X.J., Li, D.L., et al. (2005). *Rat bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into hepatocytes in vivo*. World J Gastroenterol. 11(22): 3479-84.

36. Kenedy, B.J. (1988). *Aging and Cancer*. Journal of Clinical Oncology. 6(2): 1903-
37. Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. (2002). *mTOR Interacts with Raptor to Form a Nutrient-Sensitive Complex that Signals to the Cell Growth Machinery*. Cell 110(2): 163-175.
38. Kim, D.H. & Sabatini D.M. (2004) *Raptor and mTOR: subunits of a nutrient-sensitive complex*. Curr Top Microbiol Immunol. 279:259-70.
39. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y. & Ochiya, T. (2010). *Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells*. J. Biol. Chem. 285, 17442e17452.
40. Laplante, M. & Sabaitini, D.M. (2009). mTOR signaling at a glance. Journal of Cell Science 122, 3589-3594.
41. Lehmann, B. D. et al (2008). *Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells*. Cancer Res. 68, 7864–7871
42. Liu, B., Wang, J., Chan, K.M., Tjia, W.M., Deng, W., Guan, X., Huang, J.D., Li, K.M., Chau, P.Y., Chen DJ, et al. (2005). *Genomic instability in lami- nopathy-based premature aging*. Nat Med 11: 780-785.
43. López-Otín, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. (2013). *The hallmarks of aging*. Cell. 153(6):1194-217.
44. Manning, B. D. & Cantley, L. C. (2007). *AKT/PKB signaling: navigating downstream*. Cell 129, 1261-1274.
45. Mitalipov, S. & Wolf, D. (2009). *Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming*. Adv Biochem Eng Biotechnol. 114:185-99.

46. Miyauchi, H., Minamino, T., Tateno, K., Kunieda, T., Toko, H. & Komuro, I. (2004) *Akt negatively regulates the in vitro lifespan of human endothelial cells via a p53/p21-dependent pathway*. EMBO J. 23(1):212-20.
47. Nogueira, V., Park, Y., Chen, C.C., Xu, P.Z., Chen, M.L, Tonic, I., Unterman, T. & Hay, N. (2008) *Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis*. Cancer Cell. 14(6):458-70.
48. Passos JF, Saretzki G, Ahmed S, Nelson G, Richter T, Peters H, Wappler I, Birket MJ, Harold G, Schaeuble K, et al. (2017). *Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere- dependent senescence*. PLoS Biol 5:110.
49. Peterson, T.R., Laplante, M., Thoreen, C.C., Sancak., Y., Kang, S.A., Kuehl, W.M., Gray, N.S & Sabatini, D.M. (2009). *DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival*. Cell. 137(5): 873-86.
50. Qian, Z., Shen, Q., Yang, X., Qiu, Y. and Zhang, W. (2015). *The Role Of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment*. Biomed Rest Int. 649161.
51. Raposo, G. & Stoorvogel, W. (2013). *Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends*. J. Cell Biol. 200, 373e383.
52. Rayess, H., Wang, M.B & Srivatsan, E.S. (2012). *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. Int J Cancer 130: 1715-1725.
53. Raz, V., Vermolen, B.J., Garini, Y., Onderwater, J.J.M, Mommaass-Kienhuis, M.A., Koster, A.J., Young, I.T., Tanke, H. & Dirks, R.W. (2008). *The nuclear lamina promotes telomere aggregation and centromere peripheral localization during senescence of human mesenchymal stem cells*. J Cell Sci. 121: 4018-4028.

54. Richter, J. D. & Sonenberg, N. (2005). *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature 433, 477-480.
55. Rodier, F., Coppé, J-P. Patil, C.K., Hoeijmakers, W.A.M., Muñoz, D.P., Raza, S.R., Freund, A., Campeau, E., Davalos, A.R & Campisi, J. (2009). *Persistent DNA damage signaling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol. 11(8): 973–979.
56. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM & Aggarwal BB. (2010). *Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?* Free Radic. Biol Med 49: 1603-1611.
57. Rodier, F. & Campisi J. (2011). *Four faces of cellular senescence*. J Cell Biol. 192(4): 547-56.
58. Roufosse, C., Direkse, N., Otto, W. & Wright, N. (2004). *Circulating mesenchymal stem cells*. Int J Biochem Cell Biol. 36:585-97.
59. Stenderup K, Justesen J, Clausen C & Kassem M. (2003). *Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells*. Bone 33: 919-926.
60. Strait, J.B. & Lakatta, E.G (2012). *Aging-associated cardiovascular changes and their relationship to heart failure*. Heart Fail Clin. 8(1): 143-164.
61. Sarbassov, D.D., Ali, S.M, Kim, D.H, Guertin, D.A., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Sabatini, D.M. (2004) *Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton*. Curr Biol. 14(14):1296-302.
62. Sarbassov, D.D., Ali, S.M., Sabatini, D.M. (2005). *Growing roles for the mTOR pathway*. Curr Opin Cell Biol. 17:596–603.
63. Song, S., Kamath, S., Mosquera, D., Zigova, T., Sanberg, P., Vessely, D.L., et al. (2004). *Expression of brain natriuretic peptide by human bone marrow stromal cells*. Exp Neurol. 1: 191-7.

64. Storer, M., Mas, A., Robert-Moreno, A., Pecoraro, M., Ortells, M.C., Di Giacomo, V., Yosef, R., Pilpel, N., Krizhanovsky, V., Sharpe, J. & Keyes, W.M., (2013). *Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning*. Cell 155, 1119e1130.
65. Takashi, K. & Yamakata, S. (2006). *Induction of pluripotent stem cells from mouse and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell. 126(4): 663-76.
66. Takasugi, M., Okada, R., Takahashi, A., Virya Chen, D., Watanabe, S & Hara, E. (2017). *Small extracellular vesicles secreted from senescent cells promote cancer cell proliferation through EphA2*. NATURE COMMUNICATIONS. 8:15728.
67. Thery, C. (2011). *Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications*. Biol Rep, 3: p. 15.
68. Van Balkom, B.W., de Jong, O.G., Smits, M., Brummelman, J., den Ouden, K., de Bree, P.M, et al. (2013). *Endothelial cells require miR-214 to secrete exosomes that suppress senescence and induce angiogenesis in human and mouse endothelial cells*. Blood 121(19):3997–4006.
69. van Deursen, J.M. (2014). *The role of senescent cells in ageing*. Nature 509, 439e446.
70. Weissman, I.L. (2000). *Stem Cells: Units of Development, Units of Regeneration and Units In Evolution*. Cell, 100: 157-68.
71. Xu, D. & Tahara, H. (2013). *The role of exosomes and microRNAs in senescence and aging*. Adv Drug Deliv Rev 65(3):368–75.
72. Zhang, F., Cui, J., Liu, X., Bo Lv., Liu, X., Xie, Z & Yu, B. (2015). *Roles of microRNA-34a targeting SIRT1 in mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther 6: 195, 2015.