



UNIVERSIDADE
DA CORUÑA

Efecto de la sobre-expresión de miR-21 en el perfil inmunológico de las Células Madre Mesenquimales

María del Pilar Miranda Quintana

Máster en Biología Molecular, Celular y Genética

Universidade da Coruña

(Curso 2020-2021)

Universidade da Coruña

Facultade de Ciencias

INIBIC

Efecto de la sobre-expresión del miR-21 en el perfil inmunológico de las células madre mesenquimales

Efecto da sobre-expresión do miR-21 no perfil inmunolóxico das células nai mesenquimais

Effect of miR-21 over-expression on immunology profile of mesenchymal stem cells

María del Pilar Miranda Quintana

A Coruña, Julio 2021

Dra. María del Carmen Arufe Gonda y Dr. Juan Antonio Fafián Labora en calidad de tutor/es de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

ARUFE GONDA
MARIA DEL
CARMEN -
36116727B

Firmado digitalmente
por ARUFE GONDA
MARIA DEL CARMEN
- 36116727B
Fecha: 2021.07.16
15:50:04 +02'00'

Dra. María del Carmen Arufe Gonda

FAFIAN LABORA
JUAN ANTONIO
- 47387789S

Digitally signed by
FAFIAN LABORA JUAN
ANTONIO - 47387789S
Date: 2021.07.16
16:07:26 +02'00'

Dr. Juan Antonio Fafián Labora



María del Pilar Miranda Quintana

ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS	8
INTRODUCCIÓN	10
1.CÉLULAS MADRE	10
1.1Definición.....	10
1.2. Clasificación	10
1.3 Aplicaciones.....	11
2.CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	12
3.MicroARNs.....	12
3.1. Biogénesis de los miARN	12
3.2. Funciones	13
3.3. Modulación de los niveles de miARN in vitro	14
3.4. miR-21.....	15
4. DAMP Y SAPS.....	15
4.1. DAMPs.....	15
4.1.1 <i>High Mobility group box 1 proteins (HMGB1)</i>	16
4.1.2. S100	16
4.2 SASP	16
4.2.1. Receptor de Tipo Toll-4 (TLR4).....	17
4.2.2. Interleuquina-6 (IL-6)	17
4.2.3. Interleuquina 1 β (IL-1 β)	17
4.2.4. Metaloproteínasa de la Matriz (MMP)	17
4.2.5. P65.....	18
OBJETIVOS	19
5. MATERIAL Y MÉTODOS	20
5.1 Aislamiento de células madre mesenquimales procedentes del estroma del cordón umbilical.....	20
5.2 Cultivo de células madre mesenquimales	21
5.3 Detección de micoplasma	21
5.4 Caracterización de CMM mediante citometría de flujo	22
5.5 Transfección del mir-21-5p en las CMM.....	23
5.6 Extracción de ARN	24
5.7 Cuantificación de ARN.....	25
5.8 Síntesis de ADN complementario (ADNc) Retrotranscripción.....	25
5.9 qPCR.....	25
5.10 Extracción de proteínas.....	26
5.11 Cuantificación de proteínas	27
5.12 Tinción con nitrato de plata.....	27
5.13 Detección de proteínas mediante Western Blot.....	28

5.14 Análisis estadístico	29
5.15 Revisión bibliográfica	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
6.1 Caracterización de células madre mesenquimales mediante citometría de flujo.....	30
6.2 Evaluación morfológica de CMM a partir del estroma de cordón umbilical.....	30
6.3 Evaluación de la presencia de Mycoplasma en los cultivos de CMM.....	31
6.4 Evaluación de la generación de la línea de células madre mesenquimales con la sobre-expresión del miR-21-5p.....	32
6.5 Expresión génica de las componentes de DAMPs en el modelo de sobre-expresión de miR-21-5p en células madre mesenquimales	32
6.6 Evaluación génica de los componentes de SASP en el modelo de sobre-expresión de miR-21-5p en células madre mesenquimales	33
6.7 Evaluación de la integridad de la proteína aislada de CMM con tinción de nitrato de plata	35
6.8 Análisis de la expresión de la proteína asociada con el miR-21-5p mediante Western Blot.....	35
CONCLUSIONES	37
BIBLIOGRAFÍA	38

RESUMEN

Las células madre son células indiferenciadas que están presentes en la vida embrionaria, fetal y adulta y que dan lugar a células bien diferenciadas que son los componentes básicos de los tejidos y órganos. Cada vez son más utilizadas en medicina regenerativa para reemplazar células dañadas o para regenerar órganos, y abarca el empleo de diversas estrategias que van desde la administración de moléculas biológicamente activas (proteínas y microARN) hasta la implantación de células aisladas de tejidos adultos que pueden dar lugar a la regeneración estructural del tejido u órgano afectado.

En cuanto a los microRNA (miARN), son pequeños fragmentos de ARN no codificante de 14 a 21 nucleótidos que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional. Cada vez se investigan más a fondo debido a que se consideran candidatos prometedores para el desarrollo de biomarcadores. Los “imitadores” (mimic) y los inhibidores de miARN que se están desarrollando actualmente se han mostrado como agentes con gran potencial como nuevos agentes terapéuticos

Entre todos los microARNs descritos hasta el momento, miR-21 juega un papel muy importante en multitud de funciones biológicas, en determinados tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares y en la inflamación. El miR-21 es inducido por multitud de estímulos proinflamatorios, tanto PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) como DAMP (Patrones Moleculares Asociados al Daño), que activan el circuito inflamatorio, así como la acción de las células del sistema inmunológico. Debido a su papel omnipresente en tantos procesos biológicos, el interés por el miR-21 ha aumentado de manera considerable en los últimos años.

En este estudio, nos centraremos en el papel que juega la sobreexpresión de miR-21 en el perfil inmunológico a partir de cultivos de células madre mesenquimales (CMM) de cordón umbilical. El estudio realizado tiene como objetivo valorar si el efecto de la sobreexpresión de miR-21 conlleva un aumento de marcadores asociados con inflamación y envejecimiento en CMM.

Palabras clave: Células Madre Mesenquimales, microRNA, miR-21, inflamación

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells that are present in embryonic, fetal and adult life and give rise to well-differentiated cells that are the building blocks of tissues and organs. They are increasingly used in regenerative medicine to replace damaged cells or to regenerate organs, and encompass the use of various strategies ranging from the administration of biologically active molecules (proteins and microRNAs) to the implantation of cells isolated from adult tissues that can lead to structural regeneration of the affected tissue or organ.

As for microRNAs (miRNAs), they are small non-coding RNA fragments of 14 to 21 nucleotides that regulate gene expression at the post-transcriptional level. They are increasingly being investigated in depth because they are considered promising candidates for biomarker development. The "mimics" (mimic) and miRNA inhibitors currently under development have been shown to have great potential as new therapeutic agents.

Among all the microRNAs described so far, miR-21 plays a very important role in a multitude of biological functions, in certain types of cancer, cardiovascular diseases and in inflammation. miR-21 is induced by many pro-inflammatory stimuli, both PAMP (Pathogen-Associated Molecular Patterns) and DAMP (Damage-Associated Molecular Patterns), which activate the inflammatory circuit, as well as the action of the cells of the immune system. Due to its ubiquitous role in so many biological processes, the interest in miR-21 has increased considerably in recent years.

In this present study, we will focus on the role of miR-21 overexpression in immune profiling from cultured umbilical cord mesenchymal stem cells (MSCs). The aim of this study was to assess whether the effect of miR-21 overexpression leads to an increase in markers associated with inflammation and aging in MSCs.

Keywords: Mesenchymal stem cells, microRNA, miR-21, inflammation.

RESUMO

As células nai son células indiferenciadas que están presentes na vida embrionaria, fetal e adulta e que dan lugar a células ben diferenciadas que son os compoñentes básicos dos tecidos e órganos. Cada vez son máis utilizadas en medicina rexenerativa para substituír células danadas ou para rexenerar órganos, e abarca o emprego de diversas estratexias que van desde a administración de moléculas bioloxicamente activas (proteínas e microARN) ata a implantación de células illadas de tecidos adultos que poden dar lugar á rexeneración estrutural do tecido ou órgano afectado. En canto aos microRNA (miARN), son pequenos fragmentos de ARN non codificante de 14 a 21 nucleótidos que regulan a expresión xénica a nivel postranscripcional. Cada vez investiganse máis a fondo debido a que se consideran candidatos prometedores para o desenvolvemento de biomarcadores. Os “imitadores” (mimic) e os inhibidores de miARN que se están desenvolvendo actualmente mostráronse como axentes con gran potencial como novos axentes terapéuticos. Entre todos os microARNs descritos ata o momento, miR-21 xoga un papel moi importante en diferentes funcións biolóxicas, en determinados tipos de cancro, doenzas cardiovasculares e na inflamación. O miR-21 é inducido por multitude de estímulos proinflamatorios, tanto PAMP (Patróns Moleculares Asociados a Patóxenos) como DAMP (Patróns Moleculares Asociados ao Dano), que activan o circuíto inflamatorio, así como a acción das células do sistema inmunolóxico. Debido ao seu papel omnipresente en tantos procesos biolóxicos, o interese polo miR-21 aumentou de xeito considerable nos últimos anos. Neste estudo, amosamos o papel que xoga a sobreexpresión de miR-21 no perfil inmunolóxico a partir de cultivos de células nai mesenquimais (CMM) de cordón umbilical. O estudo realizado ten como obxectivo valorar se o efecto da sobreexpresión de miR-21 leva un aumento de marcadores asociados con inflamación e envellecemento en CMM.

Palabras chave: Células Nai Mesenquimais, microRNA, miR-21, inflamación

ABREVIATURAS/ACRÓNIMOS

µg	Microgramos
µl	Microlitros
µm	Micras
µM	Micromolar
A	amperios
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AgNO₃	nitrato de plata
ARN	Ácido ribonucleico
bp	bases pairs
BSA	Bovine serum albumin
Ca²⁺	Ión Calcio
CD105	Endoglobin
CD14	CD14
CD29	Integrin β1
CD34	Hematopoyec progenitor cell antigen cluster of diferentiation 34
CD45	Protein Tyrosine phosphatase, receptor type C
CD73	5'-Nucleotidase
CD90	Thy-1 cell surface antigen
cDNA	DNA complementario
CM	Células madre
CMA	Células Madre adultas
CME	Células madre embrionarias
CMM	Células Madre Mesenquimales
CN	Control negativo
CO₂	Dióxido de Carbono
CP	Control positivo
DAMP	Damage-associated molecular patterns
DMEN	Dulbecco's Modification of Eagle Medium
FBS	Fetal Bovine Serum
g	gramos
HGMB1	High mobility box 1
HPRT	Hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase
IL-1β	Interleukina 1β
IL-6	Interleukina 6
iPS	Células madre pluripotenciales inducidas
kDa:	kilodalton (s)
mg	miligramos
mM	micromolar
Mimic NC	mimic control negativo
miR-21	microARN miR-21
ml	mililitros

MM	Máster mix
mm²	milímetros cuadrados
MMP	Metalorproteinasas de matriz
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13
MMP9	Metaloproteinasa de matriz 9
Molar	molar
msA	miliamperios
NaCl	Cloruro de sodio
ng	nanogramos
°C	grados centígrados
Oct4	Octomer-binding transcription factor 4
P/S	penicilina streptomycin
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
RIPA	Radioinmunoorecipitación
rpm	revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT	retrotranscripción
S100 A4	S100 calcium-binding protein A4
S100	S100 calcium-binding protein
S100A2	calcium-binding protein A2
S100A3	calcium-binding protein A3
S100A6	calcium-binding protein A6
SASP	Senescence- Associated Secretory Phenotype
SDS-PAGE	SDS gel de poliacrilamida
Sox2	(sex determinig región Y)-box 2
SSF	Suero salino fisiológico
TLR4	Toll-like receptor Type 4
v/v	volumen/volumen
V	voltios
WB	Western Blot

INTRODUCCIÓN

1. CÉLULAS MADRE

1.1 Definición

Las células madre (CM) son células indiferenciadas, inmaduras, autorenovables y capaces de diferenciarse a uno o más tipos celulares, caracterizadas por dos propiedades esenciales: su capacidad de autorenovación (basada en una proliferación ilimitada y conservación como células indiferenciadas), y de generar diferentes tipos celulares (células óseas, sanguíneas, epidérmicas, cutáneas, neuronales...) [5] (**Figura 1**).

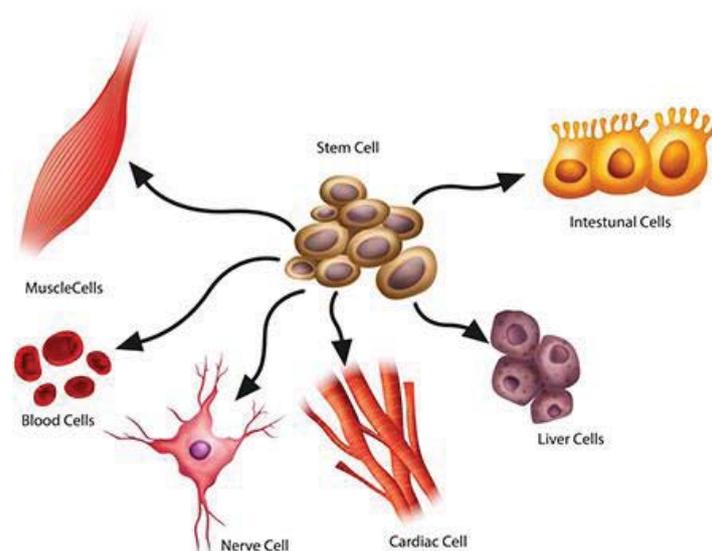


Figura 1. Pluripotencia de las células madre. Imagen tomada de <https://www.cryo-cell.com/cord-blood/about-stem-cells-es>.

1.2. Clasificación

Dependiendo de su capacidad o potencial de diferenciación se clasifican en **Totipotentes**, que proceden del embrión y tienen la capacidad de crear nuevos embriones o un individuo completo ya que pueden diferenciarse en cualquier tipo celular, tanto embrionario como extraembrionario. En este sentido, la célula madre por excelencia es el cigoto, ya que de ella saldrán el resto de las células que forman los tejidos y órganos de un individuo. Las CM **Pluripotentes** poseen la capacidad de diferenciación a cualquier de los tejidos que corresponden a los 3 linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo). Las CM **Multipotentes** son aquellas con capacidad para generar células de su propia capa embrionaria (endodermo, ectodermo y mesodermo) y pueden generar, por lo tanto,

un órgano en su totalidad, bien en el embrión o en el individuo adulto. Las CM **Unipotentes** (u oligopotentes) sólo pueden especializarse a un único linaje celular. Por lo tanto, son las que presentan una menor potencialidad [5]

En cuanto a su procedencia, hay varias clasificaciones dependiendo de los autores. Se encuentran divididas en **Células Madre Embrionarias** (CME) y **Células Madre Adultas** (CMA). Una de las diferencias entre ellas radica en la capacidad para generar las líneas germinales de un organismo [4]. Las CME derivan de la masa interna del blastocisto. Son pluripotentes y pueden diferenciarse en tejido de las 3 capas germinales, pero tienen la característica de que se pueden mantener en un estado indiferenciado durante un período de tiempo prolongado en un cultivo

Las CMA son multipotentes o unipotentes. Este tipo de células se encuentra en los tejidos adultos y el cordón umbilical [1,5] y son capaces de generar todos los tipos celulares de la sangre y del sistema inmune, entre otros [4]

Por último, los investigadores John B. Gurdon y Shinya Yamanaka (ganadores del premio Nobel de fisiología y Medicina en 2012, han generado otro tipo de **Células Madre Pluripotentes inducidas** (iPS)[5]. Generaron por primera vez CM con propiedades parecidas a las CME transformadas a partir de un cultivo de fibroblastos de ratón mediante la introducción retroviral de diferentes factores de transcripción de pluripotencia o *Yamanaka* (Oct3/4, Sox2, Klf4 c-Myc), en las mismas condiciones de cultivo que las CME [15].

1.3 Aplicaciones

Las células madre se pueden utilizar en terapia celular para reemplazar células dañadas o regenerar órganos. Aparte, han sido de gran ayuda para ayudarnos a comprender el desarrollo y la patogenia de las enfermedades, debido a que las células de las líneas celulares específicas de la enfermedad también se pueden propagar y usarse por lo tanto para el desarrollo de fármacos [4] De esta forma, su implementación en el campo de la medicina ofrece alternativas para el tratamiento de un gran número de enfermedades, entre ellas, la diabetes, infarto de miocardio, leucemias, Alzheimer, Parkinson... [1].

El interés por el uso de las células madre ha aumentado de forma considerable en los últimos años con motivo del gran avance alcanzado en su identificación, caracterización y aislamiento y las propiedades inmunogénicas que tienen [5].

2. CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Son células que pueden expandirse fácilmente *in vitro* como cultivos adherentes de forma estable, tienen la capacidad de migrar de forma selectiva hacia los tejidos lesionados, evadir el reconocimiento del sistema inmunológico y secretar factores tróficos para la reparación de tejidos [40]. Aparte las CMM, pueden diseñarse para el suministro de genes terapéuticos. Las fuentes de CMM son los tejidos derivados de la línea germinal mesodérmica, principalmente médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical [3].

Al no existir un criterio único para identificar las CMMs, se han propuesto una serie de criterios mínimos basados en una serie de marcadores y de características celulares según la *International Society of Stem Cells and Gene Therapy (ISCT)*: deben tener capacidad de autorenovación, ser multipotentes, con lo cual pueden diferenciarse a osteocitos, adipocitos y condrocitos [3,11].

Por otro lado, fenotípicamente, deben expresar marcadores de superficie mesenquimales como CD29 (*Integrin $\beta 1$*), CD73 (*5'-Nucleotidase*), CD90 (*Thy-1 cell surface antigen*) y CD105 (*Endoglin*), y ser negativas para marcadores de precursores hematopoyéticos como CD14 (*CD14*), CD34 (*Hematopoietic progenitor cell antigen cluster of differentiation 34*) y CD45 (*Protein Tyrosine phosphatase, receptor type C*) [10]. También deben presentar un crecimiento adherente al plástico y poder expandirse *in vitro* con alta tasa de proliferación [3,11].

Las CMM son candidatas prometedoras para el estudio de varias enfermedades, debido a su relativa facilidad de obtención y disponibilidad, capacidad de diferenciación a diferentes linajes y a su función inmunomoduladora [12].

3. MicroARNs

3.1. Biogénesis de los miARN

Los miARN regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la unión a la región 3' no traducida de los ARNm diana, lo que dará lugar a la degradación o represión de la traducción [6].

La biogénesis de miARN comienza en el núcleo. La transcripción es dependiente de la ARN-polimerasa II de un transcrito relativamente grande, conocido como miARN primario o pri-miARN. Este pri-miARN es procesado por la endonucleasa RNasa III, Drosha, y su cofactor, Dgcr8, formando estructuras en forma de horquillas más pequeñas conocidas como precursores de miRNA o pre-miARN. Estos pre-miARN es transportados fuera del núcleo al citosol por la Exportina 5, donde sufre

otro procesamiento adicional por la ARNasa III, Dicer, generándose de esta forma, el miARN maduro. El cual tendrá las dos hebras separadas y se asociará con el complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC). Como consecuencia de ello, el ARNm diana estará reprimido, lo cual dará lugar al silenciamiento de la traducción o de la inducción de la degradación de ARNm por las ARNasas (**Figura 2**) [7,10].

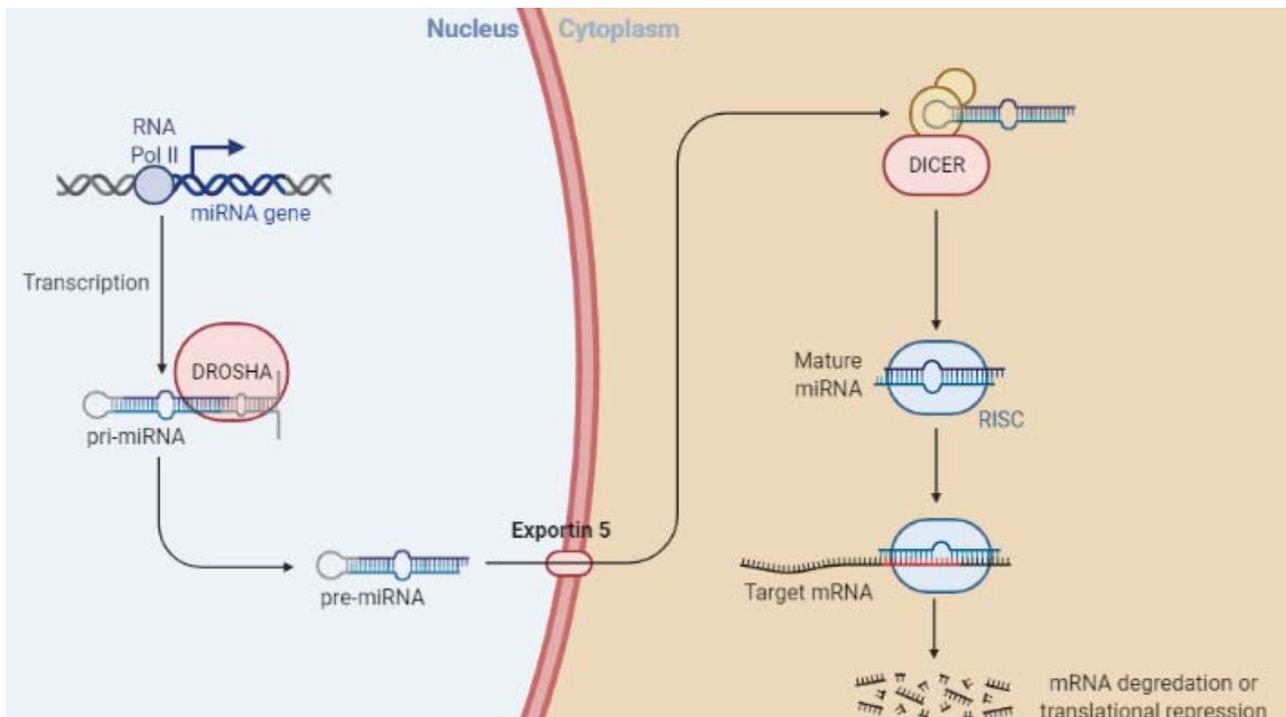


Figura 2. Biogénesis de los miRNA [8]. Imagen procedente de Biorender.com. La transcripción es dependiente de la ARN-polimerasa II (RNA Pol II) de miARN primario o pri-miARN, el cual es procesado por la endonucleasa RNasa III (Drosha), formando estructuras en forma de horquillas más pequeñas conocidas como precursores de miRNA o pre-miARN, los cuales son transportados fuera del núcleo al citosol por la Exportin 5, donde sufre otro procesamiento adicional por la ARNasa III, (Dicer), generándose de esta forma, el miARN maduro. El cual tendrá las dos hebras separadas y se asociará con el complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC). Como consecuencia de ello, el ARNm diana estará reprimido, lo cual dará lugar al silenciamiento de la traducción o de la inducción de la degradación de ARNm por las ARNasas.

3.2. Funciones

Los microARN intervienen en múltiples funciones fisiológicas en la diferenciación celular, proliferación, metabolismo... También están involucrados en múltiples procesos fisiopatológicos. Se ha confirmado que algunos de los miARN también están involucrados en procesos inflamatorios [13]. En cuanto a esto, un pequeño grupo de mi-ARN involucrados en procesos inflamatorios se

identificaron como inflamatorios-miARN [26]. Algunos de estos inflamatorios-miR son el miR-21, miR-155 y miR-146a [27].

También se ha relacionado los miARN con diversas enfermedades relacionadas con la edad, influyendo en el proceso de la senescencia y el envejecimiento de las CMM [25]. El envejecimiento se caracteriza por la pérdida progresiva de la integridad fisiológica, lo que conduce a una función deteriorada, siendo un factor de riesgo de muchas patologías, entre ellas el cáncer, diabetes y enfermedades degenerativas y cardiovasculares. [32]. Esto puede deberse a lo que se conoce como inmunosenescencia, que es la disminución de la eficacia inmunitaria (del sistema innato y del adaptativo). El deterioro inmunológico relacionado con la edad se relaciona con el envejecimiento inflamatorio, denominado *Inflamm-aging* [33]. Con lo cual, es probable que los miARN y la senescencia tengan un papel entrelazado en la conducción de estos estados patológicos. Una de las características de las células senescentes es que se encuentran bien caracterizadas por su secretoma alterado, consistente en citocinas proinflamatorias, quimiocinas y proteínas de matriz extracelular, conocido como fenotipo secretor asociado a la senescencia o en inglés Senescence- Associated Secretory Phenotype) (SASP) [25].

Los miARN pueden ejercer, por lo tanto, dos funciones opuestas: activando o inhibiendo las vías inflamatorias. La acción inhibidora se relaciona con la necesidad de activar los mecanismos antiinflamatorios para contrarrestar las señales proinflamatorias potentes, como la vía del factor nuclear Kappaβ (NF-κβ) para prevenir la destrucción de células y tejidos, lo cual tiene un papel fundamental durante el envejecimiento, donde es probable que el secretoma de la senescencia celular y la activación progresiva de las células inmunes a lo largo del tiempo mantenga un estado de cronicidad pro-inflamatorio de bajo nivel [27].

En resumen, los mi-ARN, tienen el potencial de ser biomarcadores de relevancia clínica para procesos fisiopatológicos, incluidas las respuestas inflamatorias y las afecciones relacionadas con la inflamación [14], así como en las principales enfermedades relacionadas con la edad que comparten un estado pro-inflamatorio crónico común, como la enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus, enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, artritis reumatoide y cáncer [27] [32].

3.3. Modulación de los niveles de miARN in vitro

Los niveles de miRNA pueden ser modulados *in vitro* realizando transfecciones transitorias de imitadores (*mimic*) o de antagonistas de miRNA. La eficiencia de la transfección y su naturaleza

transitoria limitará el tipo de estudio funcional que se podrá realizar. Es muy importante, por lo tanto, seleccionar de manera correcta los promotores que impulsan la expresión génica [2].

Como se conoce las células madre mesenquimales son un tipo de células con alto potencial para ser empleadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y asociadas a la edad como la artrosis. Los microARNs, debido a su capacidad de regular diferentes rutas tienen un alto potencial en terapia génica. Por ello, en este trabajo se determina el papel que puede jugar un microARN como el miR-21 en el perfil pro-inflamatorio de las células madre mesenquimales para su empleo como diana terapéutica.

3.4. miR-21

MiR-21 se expresa de forma moderada en células progenitoras hematopoyéticas. Sin embargo, su expresión aumenta de forma significativa a medida que varios tipos de células como los mastocitos derivados de la médula ósea, los neutrófilos y las células T activadas maduran a un estado activo [14]. Por lo tanto, los niveles elevados de miR-21 son un marcador de las células inmunes. Su expresión está regulada dinámicamente por vías de señalización complejas y puede potenciarse mediante señales extracelulares durante el desarrollo de las células inmunes. MiR-21 es inducido por varios estímulos pro-inflamatorios, tanto PAMP (del inglés Pathogen-Associated Molecular Patterns) como DAMP (del inglés Damage-Associated Molecular Patterns) que activan el proceso inflamatorio [21].

4. DAMP Y SAPS

4.1. DAMPs

El organismo reacciona al daño tisular activando el sistema inmunológico en respuesta a las moléculas intracelulares liberadas por los tejidos lesionados (patrones moleculares asociados al daño o DAMPs). Son moléculas que tienen un papel fisiológico dentro de la célula. Sin embargo, son capaces de adquirir funciones adicionales cuando se exponen al ambiente extracelular: alertan al organismo sobre el peligro, estimulan la respuesta inflamatoria y promueven el proceso de regeneración. Algunos DAMPs pueden ser secretados o expuestos por células vivas que sufren un estrés potencialmente mortal [34].

4.1.1 *High Mobility group box 1 proteins (HMGB1)*

Es una proteína nuclear que son muy abundantes unidas a la cromatina en la parte no-histónica. Juega un papel muy importante en varios procesos celulares, incluida la inflamación, la diferenciación celular y la migración de células tumorales. Se han identificado varios pseudogenes de este gen [16]. La proteína codificada está altamente conservada sus funciones tanto intra- como extracelularmente [17]. Este último se ha estudiado de forma extensa por liberar moléculas endógenas producidas por células sanas cuando resultan dañadas (alarminas), lo que hará que se produzcan la activación respuestas innatas [18].

4.1.2. S100

Las proteínas S100 participan en la regulación de varios procesos intercelulares (como el crecimiento y la motilidad celular), la regulación del ciclo celular, la transcripción, y la diferenciación. Son una familia de proteínas de unión al Ca^{2+} [37]. Se localizan en el citoplasma y/o núcleo de una amplia gama de células [19]. Una de sus características es que cada uno de sus miembros se localizan en compartimentos celulares específicos. Las proteínas S100 cada vez adquieren mayor importancia debido a que se les relaciona con diversas patologías, incluidas la miocardiopatía, los trastornos neurodegenerativos y el cáncer.

4.2 SASP

La senescencia es un fenotipo celular presente en el organismo con papel positivo o negativo a nivel fisiopatológico. Se caracteriza por un arresto estable del ciclo celular y una respuesta inflamatoria denominada fenotipo de senescencia asociado al secretoma (SASP). La senescencia es activada como respuesta a diferentes estímulos celulares con el fin de prevenir la propagación de las células dañadas. El SASP puede actuar reclutando células inmunes con el fin de eliminar las células senescentes o contribuir al aumento del daño tisular y la inducción de la inflamación y la proliferación del cáncer [23].

4.2.1. Receptor de Tipo Toll-4 (TLR4)

Los receptores de mamíferos homólogos de Toll (TLRs) son una familia de proteínas implicadas en el reconocimiento de PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), capaces de activar tanto la respuesta inmunológica innata como la adaptativa. [20]. TLR4 es activado por el lipopolisacárido (LPS), un componente de las bacterias gramnegativas para inducir la producción de mediadores pro-inflamatorios con el objetivo de erradicar la bacteria. La desregulación de las respuestas del huésped al LPS puede dar lugar a una afección inflamatoria sistémica (sepsis). [21] Además, las DAMPs también pueden activar la ruta del TLR4 [41].

4.2.2. Interleuquina-6 (IL-6)

La interleuquina 6 (IL-6) es producida de forma rápida y transitoria en respuesta a infecciones y lesiones tisulares. Contribuye a la defensa del huésped mediante la estimulación de respuestas de fase aguda, hematopoyesis y reacciones inmunes. Aunque su expresión está estrictamente controlada por mecanismos transcripcionales y postranscripcionales, la síntesis continua desregulada de IL-6 tiene un efecto patológico sobre la inflamación crónica y la autoinmunidad [24]. Además, se ha determinado como un marcador de senescencia celular y un componente de SASP.

4.2.3. Interleuquina 1 β (IL-1 β)

Es una citocina y es un mediador muy importante de la respuesta inflamatoria. Está involucrada en múltiples actividades celulares, como la proliferación, diferenciación y apoptosis celular. También guarda relación con la patogénesis de la osteoartritis [31].

4.2.4. Metaloproteinasa de la Matriz (MMP)

La familia de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) participan en la degradación de la matriz extracelular en procesos fisiológicos normales (desarrollo embrionario, reproducción y remodelación tisular), así como en procesos patológicos como la artritis y la metástasis. participa de manera importante en la destrucción de los tejidos pulpaes y apicales en el proceso de la inflamación [22]. **MMP9** (en inglés, Matrix Metaloproteinase 9) es una proteasa que desempeña funciones vitales en

muchos procesos biológicos. Puede escindir muchas proteínas de la matriz extracelular para regular la remodelación de la misma. También puede escindir muchas proteínas de superficie del plasma para liberarlas de la superficie celular. MMP9 está relacionada con la patología del cáncer, entre otras, con lo cual es un buen biomarcador en diferentes tipos de cáncer. La sobreexpresión de MMP9 se ha observado en diferentes tumores malignos [27]. Se ha comprobado in vitro que la expresión de MMP9 se reduce de forma importante en respuesta a la estimulación del factor de necrosis tumoral- α con el aumento de la edad. [38] **MMP13** (en inglés, Matrix Metaloproteinase 13) presenta una potente actividad de degradación contra un gran número de elementos de la matriz extracelular. Se ha descrito su expresión en algunos carcinomas humanos, donde juega un papel importante en la progresión tumoral y de metástasis [36]. También está involucrada en otros procesos como el recambio del cartílago articular y en la fisiopatología del cartílago asociada con osteoartritis [22].

4.2.5. P65

Se ha comprobado que p65 se activa durante la senescencia celular y la activación de la inflamación de las CMM del cordón umbilical de humanos. Su inhibición produce, entre otros, la inactivación de moléculas pro-inflamatorias del SASP, así como el establecimiento de la senescencia celular [35].

OBJETIVOS

Como se conoce, las células madre mesenquimales son un tipo de celular con alto potencial para ser empleadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y asociadas a la edad como la artrosis. Los microARNs, debido a su capacidad de regular diferentes rutas tienen un alto potencial en terapia génica. Por ello, en este trabajo se determina el papel que puede jugar un microARN como el miR-21 en el perfil pro-inflamatorio de las células madre mesenquimales para su empleo como diana terapéutica.

- Aislamiento y caracterización de Células Madre Mesenquimales procedentes del estroma de cordón umbilical.
- Transfección transitoria de una línea de Células Madre Mesenquimales procedente del estroma de cordón umbilical con sobre-expresión de miR-21.
- Evaluación del perfil pro-inflamatorio en células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical en la línea con el mir-21 sobre-expresado.
- Validación de la expresión de una proteína asociada con la expresión del miR-21 en células madre mesenquimales procedentes del estroma de cordón umbilical.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Aislamiento de células madre mesenquimales procedentes del estroma del cordón umbilical

Los cordones para el aislamiento de CMM del estroma de cordón umbilical, fueron donados por pacientes del Hospital Materno Infantil de A Coruña bajo consentimiento e información previa de las pacientes siguiendo las guías de la Declaración de Helsinki y aprobado por el Comité Ético del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (CHUAC) (2019/026 y 21/01/2019). La extracción del cordón se realizó en aquellas pacientes que fueron sometidas a cesárea programada para mantener la esterilidad del cordón umbilical. Los cordones umbilicales se recogieron en medio RMPI (*Roswell Park Memorial Institute Medium*) (Thermo Fisher, California, EE.UU) sin suero bovino fetal (SBF), suplementado con penicilina/estreptomicina (P/S) al 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y gentamicina en proporción 1:1000 (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

Luego se procedió a la digestión mecánica del cordón. Para ello, se seccionó longitudinalmente y se hicieron trozos de 1 cm del estroma del cordón umbilical. Los fragmentos de cordón se lavaron varias veces con suero salino (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para eliminar en lo posible los restos de sangre. Posteriormente, se procedió a una digestión enzimática empleando el cóctel de enzimas proteolíticas (dispasa y colagenasa a 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se hicieron 3 incubaciones de 5 minutos cada una. Este proceso se hizo en agitación y a 37°C.

Después, los fragmentos de cordón ya digeridos se pusieron en varias placas de 100 mm² (Thermo Fisher, California, EE.UU) a razón de 10 a 15 fragmentos/placa, asegurando que la parte del estroma quedaba en contacto con la superficie de la placa. Se introdujeron en el incubador durante 3 minutos para eliminar los restos de humedad y favorecer que los fragmentos del estroma del cordón umbilical se adhirieran a la placa. Por último, se les añadió a las placas medio DMEM (Dulbecco's Modification of Eagle Medium) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v) y se dejaron incubando en estufa a 37°C y 5% (v/v) de CO₂.

Se les fue añadiendo 1 ml de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v) cada día, durante 5 días. Cuando las CMM procedentes del estroma del cordón umbilical se adhirieron a la placa, se procedió a retirar los trozos de estroma de cordón umbilical y eliminar los restos de tejido mediante lavados con suero salino. Las CMM fueron cultivadas en DMEM suplementado con SBF al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v).

5.2 Cultivo de células madre mesenquimales

Una vez aisladas las CMM del estroma del cordón umbilical, se mantuvieron en medio DMEM suplementado con SBF 10% (v/v) y P/S 1% (v/v). Se les cambió el medio cada 2 días. Cuando alcanzaban una confluencia del 80% en la placa de cultivo, se levantaban para hacer un subcultivo. Para levantarlas, se utilizó tripsina al 1% (v/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Para ello, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células 2 veces con suero salino, se les añadió 2 ml tripsina para cubrir la superficie de la placa de 100 mm² y se dejaron incubando 5 minutos a 37°C en el incubador. Después, se observó si las CMM se separaron de la superficie de la placa de cultivo y se le añadió la misma cantidad de medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v) que de tripsina para neutralizar la actividad de la tripsina.

El contenido de las placas se pasó a un tubo cónico de 50 ml (Falcon, Madrid, España) que se centrifugó durante 5 minutos a 1500 rpm (revoluciones por minuto). Una vez centrifugadas las células, se decantó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en DMEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v) y se hizo el sub-cultivo de la suspensión a varias placas (de 1 placa de 100 mm² a 2 placas de 100 mm²). Las células se dejaron creciendo en el incubador en las condiciones anteriormente descritas.

5.3 Detección de micoplasma

A las células se les realizaron de forma periódica controles de Mycoplasma, por ser una fuente muy importante de contaminación en los cultivos celulares, siguiendo el protocolo de Short, B., & Wagey, R., 2013, empleando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se recogieron 5 ml de medio procedente de las CMM en cultivo, se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos celulares. Se recogió 1 ml del sobrenadante, que fue centrifugado a 13000 rpm durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se re-suspendió en la resina Chelex 10 % (m/v) (Sigma-Aldrich, Madrid, España), y se calentó a 95°C durante 10 min. Posteriormente, se procedió a la preparación de la PCR empleando PCR Master Mix (2X) (ThermoFisher, Madrid, España) y los cebadores a 1 μM. Las secuencias de los cebadores son los que se muestran en la **Tabla 1**.

Myco-5'	Myco-3'
CGCCTGAGTAGTACGTWCGC	GCGGTGTGTACAARACCCGA
TGCCTGRGTAGTACATTCGC	GCGGTGTGTACAAACCCCGA
CRCCTGAGTAGTATGCTCGC	
CGCCTGGGTAGTACATTCGC	

Tabla 1. Secuencia de los cebadores para la detección de mycoplasma.

La PCR se realizó en un termociclador Applied Biosystems VERETI 96-W (Applied Biosystems, California, EE.UU) con el siguiente programa:

1 ciclo inicial de 96 °C durante 2 min, 35 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 65 °C y 31 segundos a 72 °C. Por último, 1 ciclo de 72 °C durante 7 min. Las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta llevar a cabo la evaluación del resultado de la PCR.

Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1,5 % (m/v) con Sybr Safe DNA Stain al 0,01% (v/v) (Thermo Fisher, California, EE.UU) durante 1 hora a 80 V. Las bandas de PCR del gel fueron observadas en el transiluminador de la cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE HealthCare, Little Chalfont, United Kingdom)

Las células se mantenían en cuarentena en un incubador y cuando daban negativas en el control de Mycoplasma se pasaban a otro incubador para células no contaminadas.

5.4 Caracterización de CMM mediante citometría de flujo

Para comprobar la presencia de células mesenquimales y ausencia de células hematopoyéticas en los cultivos, se procedió a la caracterización mediante citometría de flujo. Para ello, se levantaron las células y se resuspendieron 1×10^6 de las mismas en 200 μ l de suero (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Se hizo el mismo procedimiento para cada una de las poblaciones celulares y para cada marcador. Luego, se centrifugaron las muestras a 1900 rpm, durante 7 minutos, descartando el sobrenadante y se volvieron a resuspender en 50 μ l de suero. A cada muestra se le añadió un tipo de anticuerpo según la **tabla 2** y se dejaron incubando toda la noche a 4°C. Al día siguiente se incubaron una hora a temperatura ambiente. Se lavaron las células dos veces con suero y se resuspendieron en suero para luego proceder al análisis mediante FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter). El análisis se hizo en un Citómetro FACSAria (BD Science, Madrid, España). Los datos obtenidos fueron generados por un BD FACSDiVA (BD Science, Madrid, España).

Anticuerpo	Cantidad
Isotipo FICT	0,5 μ l
Isotipo PE	0,5 μ l
Isotipo PECy5	0,5 μ l
Isotipo APC	0,5 μ l
CD45 FICT	2 μ l
CD90 PECy5	4 μ l
CD34 PE	2 μ l
CD73 APC	4 μ l

Tabla 2. Relación de los diferentes marcadores para la caracterización de CMM mediante FACS. Los marcadores CD 29 y CD 90 representan las células que nos interesa, mientras que los marcadores CD34 y CD45 representan los marcadores de células hematopoyéticas

5.5 Transfección del mir-21-5p en las CMM

Se levantaron las células con tripsina, se contaron en la cámara de Neubauer (Thermo Fisher, California, EEUU) y se cultivaron en placas de 6 pocillos mm^2 (Thermo Fisher, California, EE.UU), a razón de 200000 células/pocillo. Se sembraron con medio DMEM suplementado con SBF al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v). A las 24 horas se lavaron las células con suero salino y se les cambió el medio. Cuando alcanzaron una confluencia del 75% en los pocillos se procedió a la transfección con mimic control negativo (CN) y mimic miR-21 (miR-21-5p OE) (Ambion, Thermo Fischer Scientific, EE.UU).

Para la transfección, se prepararon los reactivos del CN y del miR-2-5p OE por separado. Aparte, se añadió lipofectamina (ThermoFisher, Madrid, España).

Se prepararon las siguientes mezclas por separado:

- Disolución A: RPMI sin SBF, P/S + 9 nM mimic CN
- Disolución B: RPMI sin SBF, P/S + 9 nM Lipofectamina
- Disolución C: RPMI sin SBF, P/S + 9 nM mimic miR-21-5p OE
- Disolución D: RPMI sin SBF, P/S + 9 nM Lipofectamina

Luego, se procedió a mezclar la muestra A + B y la muestra C+D y cada una de ellas se dejó incubando 5 minutos antes de proceder a la transfección de las CMM. Después de añadir a cada pocillo la mezcla, se añadió a cada uno de los pocillos medio RPMI sin SBF y con P/S.

A las 24 de horas de la transfección, se eliminó el medio RPMI y se añadió medio DMEM suplementado con SFB al 10% (v/v) y P/S al 1% (v/v) y 48 horas más tarde, se procedió a la extracción del ARN y de proteínas (**Figura 3**)

Una vez realizada la transfección, se procedió a la extracción de ARN y de proteínas con el fin de realizar las técnicas de qPCR-RT (en el caso del ARN) Y detectar la proteína diana usando Western Blot, respectivamente.

En ambos casos, antes de proceder a la extracción, se lavaron las células varias veces con PBS frío y las placas se mantuvieron en hielo durante todo el procedimiento. Los dos procesos se llevaron a cabo en una campana de extracción de químicos debido a que algunos de los reactivos usados para la extracción presentaban toxicidad (**Figura 3**)

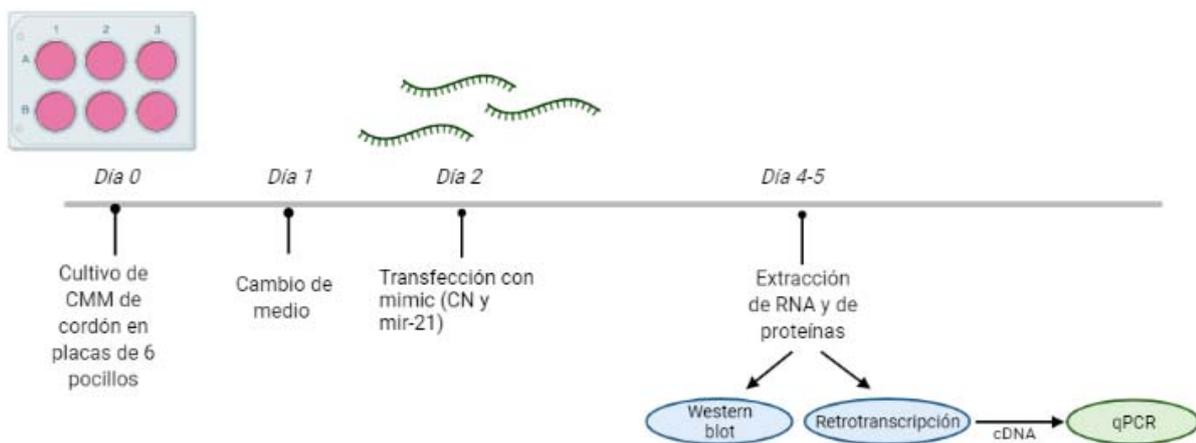


Figura 3. Esquema del protocolo para la transfección con mimic CN y mir-21-5p OE en CMM. CMM: Células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical, CN: Control Negativo, ARN: ácido ribonucleico, ADNc: ADN complementario, qPCR: PCR cuantitativa.

5.6 Extracción de ARN

Después de los lavados con suero, se hizo el protocolo de extracción de ARN con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, EEUU). Se añadió Trizol directamente en los pocillos y se dejó actuar durante 5 minutos. Después de homogenizarlo se recogió el contenido y se guardó a -80°C hasta su uso.

Al día siguiente, se añadió a cada una de las muestras cloroformo 100 % (v/v) (Applichem Panreac, Illinois, EE.UU) homogenizando bien y dejando reposar 2 minutos y se mantuvo toda la noche a -80°C . Se centrifugaron las muestras a 3000 rpm, durante 15 minutos y a 4°C . Luego, se recogió la fase acuosa y se le añadió isopropanol al 100 % (v/v) (Applichem Panreac, Illinois, EE.UU). Se

homogeneizó y se dejó durante toda la noche a -80 °C con el propósito de asegurar la precipitación de los todos los tipos de ARN.

Al día siguiente se centrifugaron las muestras a 11000 rpm, durante 30 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con etanol (Applichem Panreac, Illinois, EE.UU) al 75% (v/v). Se centrifugaron las muestras a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y se dejó evaporar los restos de etanol a temperatura ambiente.

Se re-suspendieron las muestras en agua libre de ARNasas (Becton Dickinson S.A., Madrid, España).

5.7 Cuantificación de ARN

La cuantificación de la concentración del ARN de las muestras se llevó a cabo mediante un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Fischer Scientific, EE.UU). Para ello, se utilizó 1 µl de muestra.

5.8 Síntesis de ADN complementario (ADNc) Retrotranscripción

Antes de realizar el análisis de la expresión génica mediante reacción en cadena de la polimerasa qPCR, se llevó a cabo una retrotranscripción del ARN a ADNc(ADN complementario) empleando el *Kit* comercial *NZY Reverse Transcriptase* (NZYTech, Lisboa, Portugal). Para la retrotranscripción se utilizó 1 µg de ARN de cada una de las muestras. Se mezclaron con 50 ng/µl de *random hexamer* y 10 mM de dNTP. Las mezclas se incubaron a 65°C durante 10 minutos, para añadir luego 1 µl de retrotranscriptasa inversa con 1 µl de buffer. Las muestras se incubaron a 50°C, 30 minutos, seguido de 5 minutos a 80°C y para finalizar, a 4°C, son el Termociclados Applied Byoisistems VERETI 96-W (Applied Byosistems, California, EE.UU)

5.9 qPCR

El ensayo de amplificación mediante PCR cuantitativa (qPCR) fue realizado usando como fluoróforo SYBR green (Light Cycle 4800 SYBR Green I Máster Kit) para el análisis de la expresión génica de: *IL-6*, *IL-1β*, *TLR4*, *HMGB1*, *S100A2*, *S100A3*, *S100A4*, *MMP9*, *MMP13* y *p65* (**Tabla 3**). La qPCR-RT se llevó a cabo en el analizador el Light Cyclers 480 Real Time PCR (Roche Diagnostics International, Rotkreuz, Suiza). El gen control empleado fue *HPRT*. Las condiciones empleadas para

la PCR fueron: una incubación inicial a 95 °C durante 10 min, un programa de amplificación de 60 ciclos de: 10 segundos a 95 °C para desnaturalización, 6 segundos a 61 °C para el anillamiento y finalmente 7 segundos a 72 °C para la extensión.

Gen	Cebador Sentido (5'-3')	Cebador antisentido (5'-3')
<i>p65</i>	TTCCCGATCTGAGTCCAGGT	GCTTGTCTCGGGTTTCTGGA
<i>IL6</i>	CCAGGAGCCCAGCTATGAAC	CCCAGGGAGAAGGCAACTG
<i>IL8</i>	GAGTGGACCACACTGCGCCA	TCCACAACCCTCTGCACCCAGT
<i>HPRT</i>	ATGACCAGTCAACAGGGGACA	GCTTGCGACCTTGACCATCT
<i>IL-1β</i>	TGCACGCTCCGGGACTCACA	CATGGAGAACACCACTTGT
<i>MMP13</i>	CCTTGATGCCATTACCAGTCTCC	AAACAGCTCCGCATCAACCTGC
<i>MMP9</i>	AACTTTGACAGCGACAAGAAGT	ATTCACGTCGTCCTTATGCAAG
<i>HMGB1</i>	GCCAAACCGATAGGAAACG	GCATAAAACTTTGCTCCAAAAAG
<i>S100A4</i>	AGCTACTGACCAGGGAGCTG	CTGGAATGCAGCTTCGTCT
<i>S100A6</i>	TGATCCAGAAGGAGCTCACC	AGATCATCCATCAGCCTTGC
<i>S100A3</i>	CATCTGGTTCAGGTTCC	ACATTCCC GAAACTCAGTCG
<i>TLR4</i>	GCAGAAAATGCCAGGATGATG	AAGTACCTCTATGCAGGGATTAG

Tabla 3. Relación de cebadores para la SYBR Green utilizados

Con respecto a la detección de la expresión del *miR-21-5p* (**4427975**) empleando las sondas Taqman (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, España) y la *TaqMan universal PCR master mix* (Applied Biosystems, Thermo Fisher, Madrid, España) usando el analizador Light Cycler 480 Real Time PCR Roche Diagnostics International, Rotkreuz, Suiza). El gen control empleado fue *U6* (**4427975**). Las condiciones empleadas para la PCR fueron: una incubación inicial a 95 °C durante 10 minutos, un programa de amplificación de 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C y 1 minuto a 60 °C.

5.10 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se hizo según un protocolo estandarizado con tampón de lisis RIPA (Radioimmunoprecipitation) compuesto por NaCl (150 mM), Tritón 1% (v/v), Desoxiclorato de sodio 0,5 % (v/v), SDS 0,1 % (v/v) y 50 mM Tris-Base con pH=8 (todo de Thermo Fisher, California, EE.UU) al que se le añadió un inhibidor de proteasas (Thermo Fisher, California, EE.UU) a una concentración 1 μ g/ μ l. Se añadió 100 μ l de tampón de lisis por 100000 células, se re-suspendió la

mezcla y se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Por último, se cogió el sobrenadante donde se encuentran contenidas las proteínas y se guardó a -80 °C hasta su uso.

5.11 Cuantificación de proteínas

Después se cuantificaron las proteínas mediante un Kit comercial BCA (Ácido bicinonínico) (ThermoFisher, Madrid, España) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para calcular la concentración de proteínas se realizó antes una recta de calibrado a partir de 9 diluciones de albúmina de suero bovino con las cantidades descritas en la **tabla 4**. Se mezclaron luego los reactivos proporcionados en el kit de ensayo (A y B) en una proporción 1:50. Las muestras de la recta de calibrado y las muestras a analizar se cargaron en una placa de 96 pocillos (Corning, Pozuelo de Alarcón, Madrid) y se leyeron los resultados en un lector de placas Nanoquant (Tecan Trading, Männerdof, Suiza) a 480 nm.

Absorbancias	Concentración (µg/mL)
1	2500
2	1500
3	1000
4	750
5	500
6	250
7	125
8	25
9	0

Tabla 4. Diluciones de la albúmina de suero bovino para realizar la recta de calibrado. A partir de la recta, se calculan las concentraciones de las muestras

5.12 Tinción con nitrato de plata

Para comprobar la integridad de las proteínas se realizó una tinción con nitrato de Plata. Se hizo para ello un gel de acrilamida con un separador y otro concentrador al 15% (v/v) (SDS-PAGE) y se cargaron 2 µg de muestra de muestra con tampón de carga 1x (Thermo Fisher, California, EE.UU) . Se corrió el gel a 80-120 V en una cubeta de electroforesis.

Luego, se prepararon los reactivos para revelar el gel. Para ello, se prepararon 4 reactivos diferentes (algunos de ellos en campana debido a que presentaban toxicidad). En primer lugar, el gel se sumergió en el **fijador** (etanol (40% (v/v), ácido acético glacial (10% (v/v), agua destilada (50%(v/v)) (todos los reactivos de ThermoFisher, California, EEUU)) durante 20 minutos. Se hicieron lavados durante 10 minutos con agua destilada; y 1 minuto en el **sensibilizador** (tiosulfato sódico (0,02% (m/v)), agua destilada). Se volvieron a hacer varios lavados con agua destilada; y se impregó en el **reactivo de plata** (nitrato de plata (0,2% (m/v)) y formalina (0,075% (v/v) (todos los reactivos de ThermoFisher, California, EEUU)) durante 40 min, seguido de varios lavados con agua destilada. Posteriormente, el gel se introdujo en el **revelador** (carbonato sódico (3% (m/v) hasta que se observaron las bandas correspondientes a las proteínas en el gel hasta un máximo de 15 minutos.

Por último, se sumergió en una **solución de paro** (30 minutos) (3% (m/v) tris en 10% (v/v) ácido acético) (todos los reactivos de ThermoFisher, California, EEUU) para que no se tiñera más el gel. Tras el revelado, se procedió a escanear el gel. Las bandas de las proteínas se leyeron con el programa informático “Image.J” (<https://imagej.nih.gov/ij/>) para normalizar la concentración de las proteínas obtenidas con el BCA y así obtener la concentración real. Una vez comprobada la integridad de las proteínas, se procedió a realizar el Western Blot.

5.13 Detección de proteínas mediante Western Blot

Para ello, se emplearon 40 µg de proteína de cada condición en tampón de carga 1x (Thermo Fisher, California, EE.UU). Para ello, las muestras se corrieron en un gel de SDS-PAGE (al 10% (v/v) el gel separador y al 15% (v/v) el gel concentrador) para la separación de las proteínas según su peso molecular y se corrió a 80 V mientras las muestras se encontraban en el gel concentrador y a 120 V cuando entraron en el separador. Las proteínas separadas en el gel se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) a 120 V durante 1 hora empleando un trans-blot (Bio-Rad, California, EE.UU). Las membranas fueron activadas previamente con lavados alternos de metanol al 100 % (v/v) (ThermoFisher, California, EEUU) y agua pura (Labesfal, SA, Portugal) para luego mantenerla en tampón de transferencia, formado por glicina (0,001 g/ml), Tris-base (0,002 g/ml), SDS (0,001 g/ml), metanol (10 % (v/v) (todos los reactivos de ThermoFisher, California, EEUU). Hasta hacer la transferencia, la membrana se mantuvo en el tampón de transferencia a 4°. Después de la transferencia, se hizo una tinción de la membrana con Rojo Ponceau (Sigma-Aldrid, Madrid, España) para comprobar el éxito de la transferencia. Para eliminar el Rojo Ponceau, la membrana se lavó varias veces con agua destilada.

Luego, se bloqueó la membrana con 10 % (m/v) de albúmina de suero bovino en tampón de lavado (tampón de bloqueo) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

En esa hora, se prepararon los anticuerpos primarios a razón de una dilución 1:1000 (v/v) en 10 % (m/v) de albúmina de suero bovino en tampón de bloqueo. Las membranas se incubaron en unas bolsas de plástico selladas conteniendo dentro la dilución del anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C en rotación.

Al día siguiente, se lavaron 3 veces durante 5 minutos cada uno con tampón de lavado.

Se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios en la misma proporción que los primarios (dilución 1:1000 en tampón de bloqueo) y durante 1 hora a temperatura ambiente y en rotación. Se realizaron 3 lavados a las membranas de 5 minutos en tampón de lavado. Por último, se procedió al revelado de la membrana usando el sustrato a base de luminol (50% v/v) y solución de peróxido (50% v/v) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) basándonos en la quimioluminiscencia en la cámara de revelado Amersham Imager 600 (GE HealthCare, Little Chalfont, United Kingdom)

5.14 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado realizando la prueba t de student que se especifica en el pie de figura de los gráficos en la sección de resultados y discusión. Se realizaron tres experimentos independientes con la misma línea celular de CMM. Los resultados son representados por la media ± Desviación estándar (DS). Un p-valor fue considerado significativo * $p < 0.05$.

5.15 Revisión bibliográfica

Para la obtención de la bibliografía utilizada en este trabajo se usaron las plataformas digitales como Google Académico (<https://scholar.google.es/>) y PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Caracterización de células madre mesenquimales mediante citometría de flujo

Una vez realizada la caracterización de las células cultivadas a partir del estroma de los cordones umbilicales, los resultados demostraron que el número de marcadores positivos de células hematopoyéticas (CD34 y CD45) fueron muy bajos mientras que el de los marcadores característicos de las CMM (CD73 y CD90) fueron positivos en un alto porcentaje de células. El número de ambos tipos celulares se consideró dentro de los criterios aceptables. Con esos resultados, se pudo concluir que el aislamiento y cultivo de células del estroma cordón umbilical fue, como era de esperar, de células madre mesenquimales y no de células hematopoyéticas. Estos resultados se confirman con los resultados previamente publicados por el grupo Mato-Basalo R *et al.* 2021 [35], Fernández-Perna P *et al.* 2016 [42] (Figura 4).

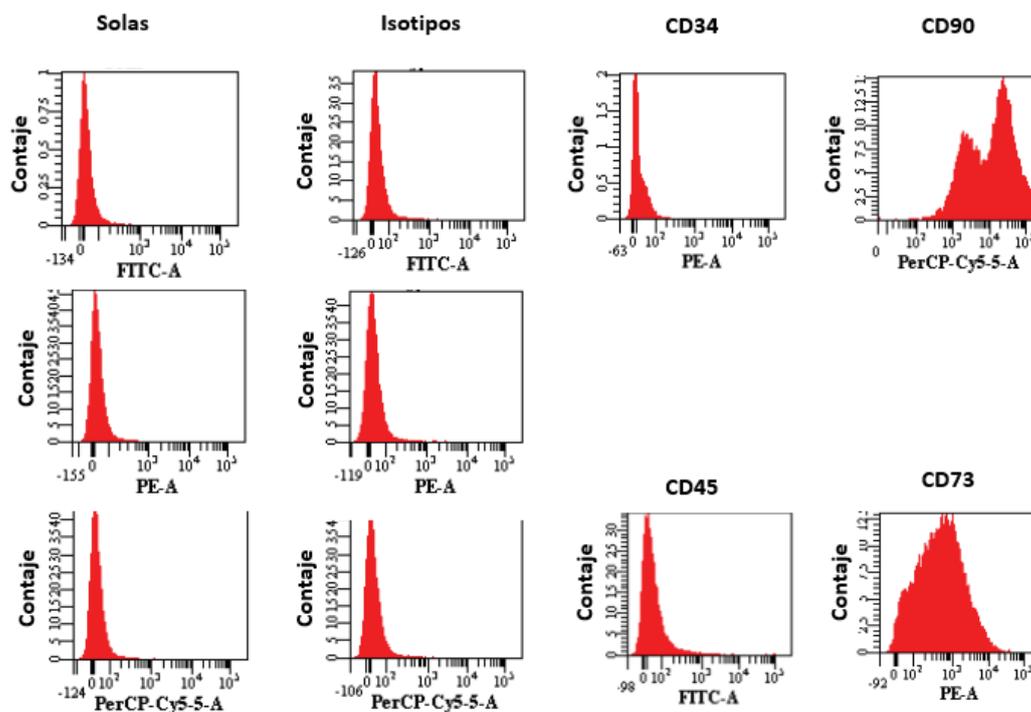


Figura 4. Caracterización por citometría de flujo. Histogramas representativos de la positividad para los marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) y marcadores mesenquimales (CD90 y CD73) en CMM

6.2 Evaluación morfológica de CMM a partir del estroma de cordón umbilical

Los resultados de la citometría de flujo descritos en el punto anterior, reveló que Los cultivos de CMM a partir del estroma de cordón umbilical fueron aptos para realizar los sub-cultivos y llevar a

cabo los experimentos. Por otro lado, se obtuvo un número de células suficiente para llevar a cabo los mismos. Las CMM aisladas mostraron una morfología fibroblástica (**Figura 5**)

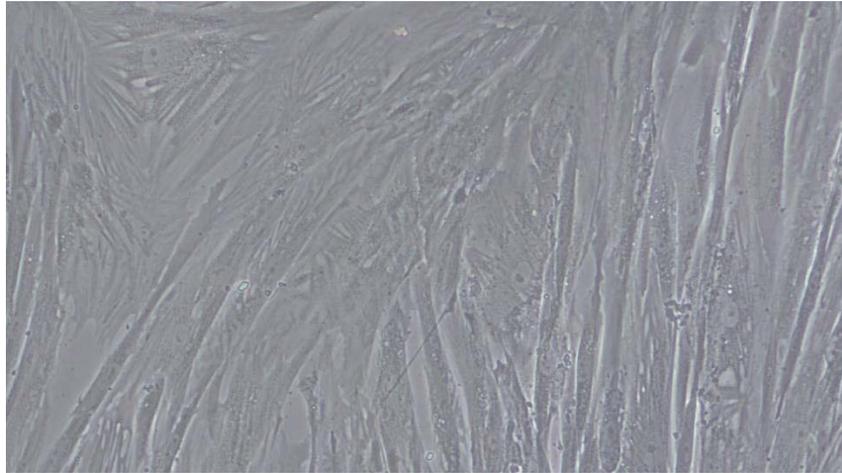


Figura 5. CMM procedentes del estroma del cordón umbilical cultivadas en una placa de diámetro de 100 mm. Imagen en campo visible adquirida con un microscopio Nikon Eclipse TS100 (Nikon, Tokio, Japón) a 10x.

6.3 Evaluación de la presencia de Mycoplasma en los cultivos de CMM

Los controles periódicos de Mycoplasma en las diferentes líneas celulares fueron negativos, porque solo presentan la banda del control positivo de técnica (1000 bp) y no la de 500 bp, con lo cual, las células fueron aptas en todo momento para continuar con su cultivo y para proceder a realizar los experimentos (**Figura 6**)

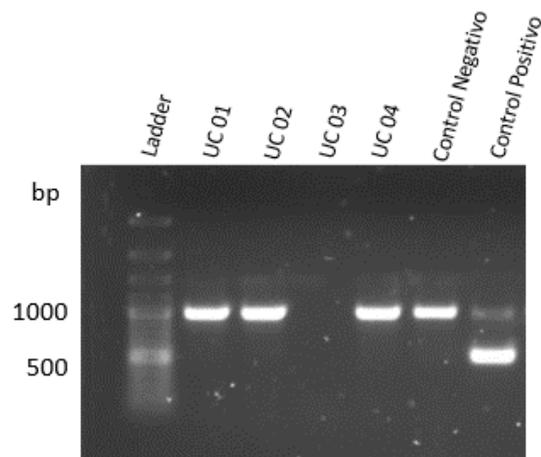


Figura 6. Resultados de la PCR de Mycoplasma en gel de agarosa. Se puede observar el control positivo que presenta una banda a 500 bp y una banda 1000 bp correspondiente al control interno de la PCR y las diferentes líneas de CMM procedentes del estroma de cordón umbilical (UC) y a la izquierda de todo el *ladder* (guía de pesos moleculares).

6.4 Evaluación de la generación de la línea de células madre mesenquimales con la sobre-expresión del miR-21-5p

Los resultados obtenidos mediante qPCR-RT del gen *miR-21* se normalizaron usando como gen control *U6* (Figura 7). Como se puede observar, la expresión de *miR-21* aumentó significativamente cuando las CMM habían sido transfectadas con miR-21-5p OE. Los resultados obtenidos, por lo tanto, nos indicó que la transfección del miR-21-5p-OE en CMM de cordón umbilical se realizó con éxito y con estos resultados procedimos a evaluar los marcadores asociados con el perfil pro-inflamatorio.

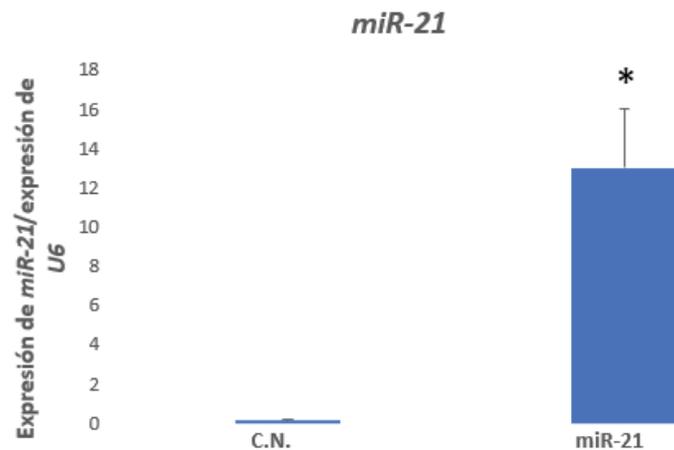


Figura 7. Resultados de la expresión génica del CN y del miR-21-5pOE del gen *miR-21* frente a *U6* C.N: CMM transfectadas con un control negativo, miR-21: CMM transfectadas con el miR-21-5p. La prueba t-test fue realizada entre el CN y mR-21 OE y fueron considerados estadísticamente significativos valores * $p < 0,05$.

6.5 Expresión génica de las componentes de DAMPs en el modelo de sobre-expresión de miR-21-5p en células madre mesenquimales

Los resultados obtenidos mediante qPCR-RT se normalizaron usando como gen control el *HPRT*. Los resultados de la normalización de cada uno de los genes frente al *HPRT* se representaron en la Figura 8. Como se puede observar, en todos los componentes de DAMPs (*S100A3*, *S100A6*, *S100A4* y *HMGB1*), la expresión aumentó significativamente cuando las CMM habían sido transfectadas con miR-21-5p OE. En todos ellos, se pudo apreciar diferencias significativas, excepto en el *S100A2*. Los resultados obtenidos demuestran una relación directa del miR-21 con la actividad inflamatoria. Se corrobora así los resultados obtenidos con anterioridad del grupo de TCMR (Terapia Celular y Medicina Regenerativa), donde se determinó que el miR-21-5p está implicado en el proceso de envejecimiento de las CMM en un modelo de médula ósea de rata [10]. (Por ello, podemos demostrar que la expresión del miR-21 está implicado en la activación de rutas inflamatorias en CMM que

pueden afectar a su empleo con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad como la artrosis.

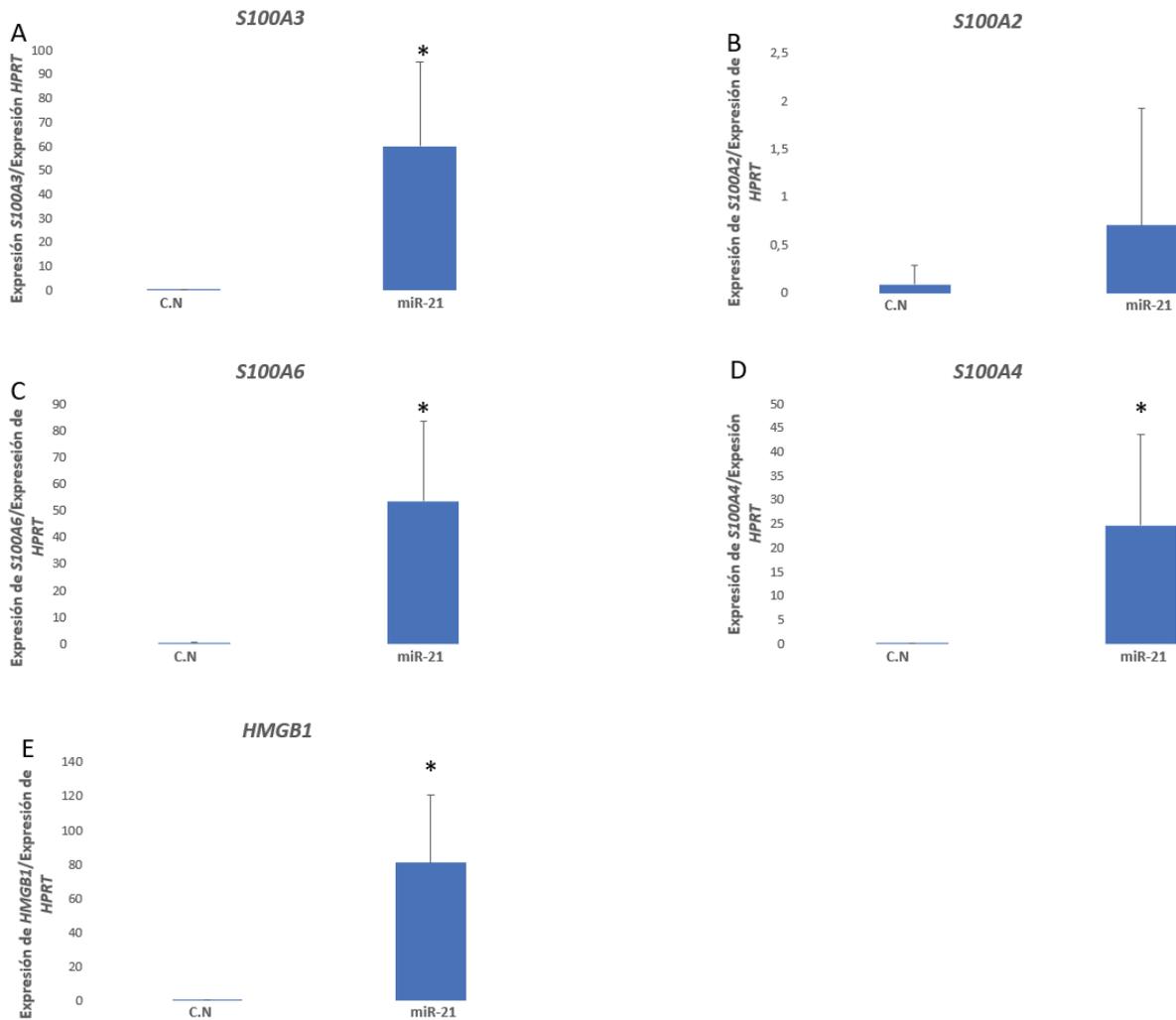


Figura 8. Expresión génica en CMM transfectadas con miR-21-5pOE de los genes relacionados con los DAMPs frente a HPRT. (A) *S100A3*, (B) *S100A2*; (C) *S100A4*; (D) *S100A6* y (E) *HMGB1*. C.N: CMM transfectadas con un control negativo, miR-21: CMM transfectadas con el miR-21-5p. La prueba t-test fue realizada para comparar CN vs miR-21 OE y fueron consideradas diferencias estadísticamente significativa valores * $p < 0,05$.

6.6 Evaluación génica de los componentes de SASP en el modelo de sobre-expresión de miR-21-5p en células madre mesenquimales

Los resultados obtenidos mediante qPCR-RT se normalizaron usando como gen control el HPRT. Los resultados de la normalización de cada uno de los genes frente al HPRT se representaron en la Figura x. Como se puede observar, en todos los componentes de SASP (*MMP9*, *MMP13*, *p65*, *TLR4*, *IL-6* e *IL-1 β*), la expresión aumentó significativamente cuando las CMM habían sido transfectadas con miR-21-5p OE. En todos ellos, se pudo apreciar diferencias significativas, excepto en la *IL-1 β* .

Los resultados obtenidos demuestran de esta forma, que existe una relación directa del miR-21 con los marcadores asociados el proceso de inflamación y envejecimientos. Se confirman estos resultados obtenidos con el estudio del miR-21 como un microARN asociado con la senescencia en células endoteliales [39]

Por ello, podemos demostrar que la expresión del miR-21 está implicado en el envejecimiento y senescencia celular en CMM que pueden afectar a su empleo con potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades asociadas a la edad como la artrosis.

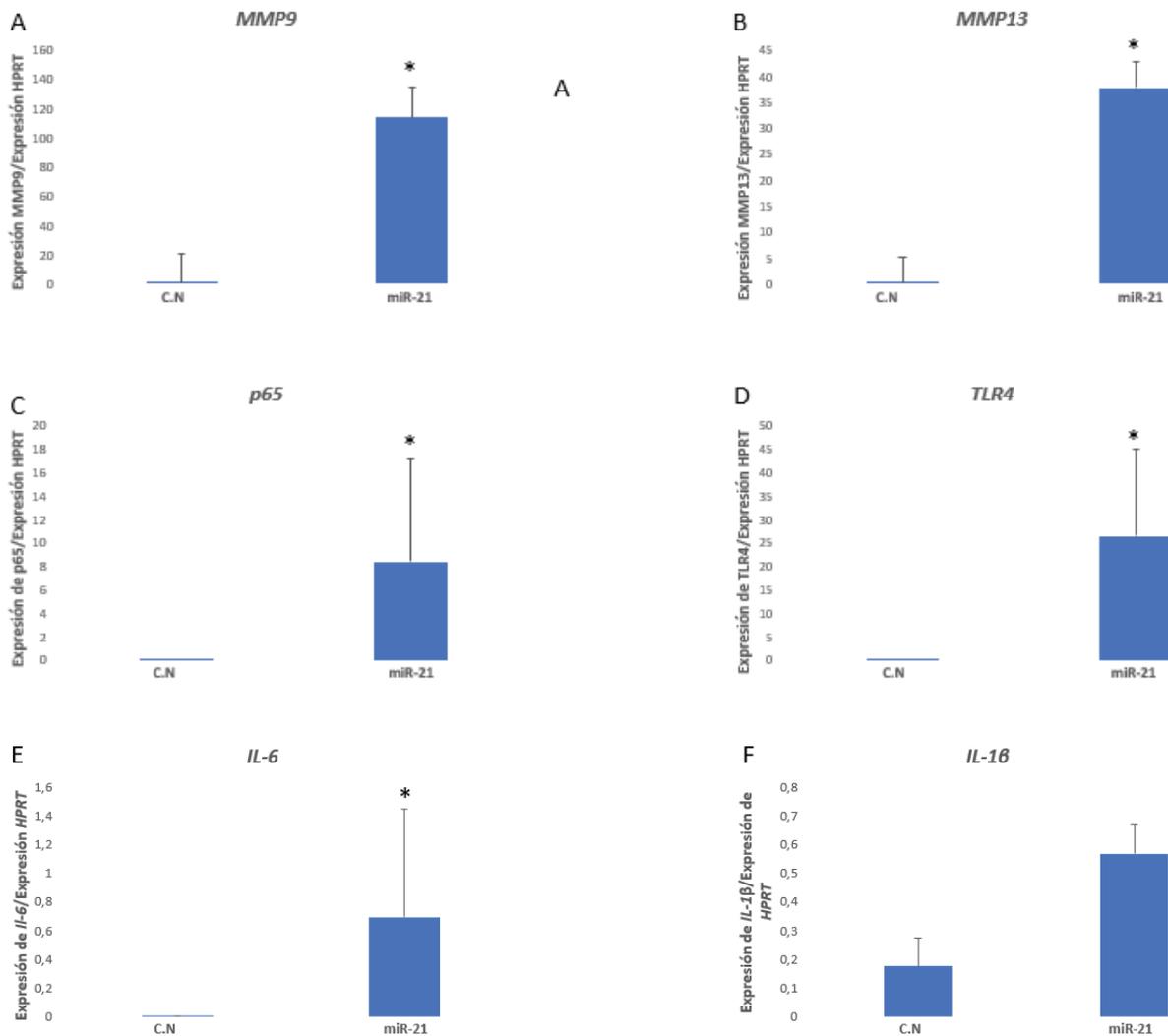


Figura 9. Resultados de la expresión génica del CN y del miR-21-5pOE de los genes relacionados con los SASP frente a HPRT (A) MMP9, (B) MMP13, (C) p65, (D) TLR4, (E) IL-6 y (F) IL-1β). C.N: CMM transfectadas con un control negativo, miR-21: CMM transfectadas con el miR-21-5p. La prueba t-test fue realizada para comparar CN vs miR-21 OE y fueron consideradas diferencias estadísticamente significativa valores *p< 0,05.

6.7 Evaluación de la integridad de la proteína aislada de CMM con tinción de nitrato de plata

Los resultados obtenidos con la tinción con Nitrato de Plata demostraron la buena integridad de proteínas en los cultivos procedentes de CMMs, tanto en los de control negativo (C.N) como en los de miR-21-5p OE (miR-21) (**Figura z**). Con el gel se comprobó que la extracción de proteínas se había realizado de forma correcta y que las muestras eran aptas para realizar el Wester Blot.

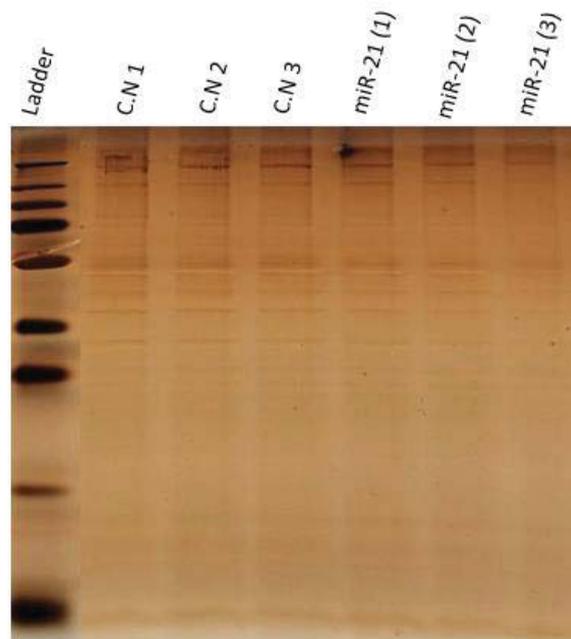


Figura 10. Gel de acrilamida teñido con nitrato de plata. La columna de la izquierda pertenece al marcador molecular de proteínas (Thermo scientific, Vilnius, Lituania). El resto de las muestras pertenecen a varias réplicas del Control Negativo y de miR-21-5p OE en una línea de células madre mesenquimales con miR-21-5p sobre-expresado.

6.8 Análisis de la expresión de la proteína asociada con el miR-21-5p mediante Western Blot

En la representación de una muestra de Proteína A frente a un gen control de carga (en este caso, la β -actina), la expresión de la proteína a estudiar (en este caso, la “proteína A”) aumentó en el caso de las CMM que habían sido transfectadas con el miR-21-5p OE en comparación con el control negativo teniendo la β -actina como control (**Figura 11**)

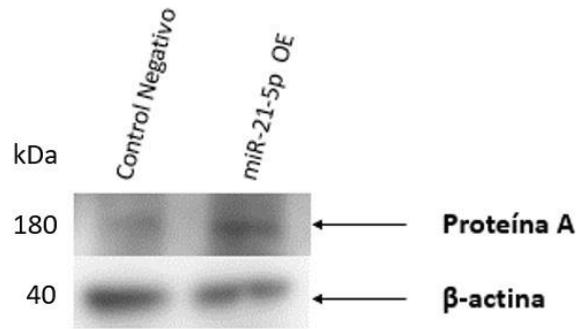


Figura 11. Expresión de la proteína A mediante western-blot. Imagen representativa de la proteína A en la parte superior y empleando como control de carga la β -actina en la parte inferior de la imagen.

Con lo obtenido podemos llegar a la conclusión de que el miR-21 tiene un potencial para poder desarrollar terapia génica con esta diana para la mejora de las propiedades pro-inflamatorias y asociadas al envejecimiento en células madre mesenquimales para su empleo en el tratamiento de enfermedades asociadas al envejecimiento.

CONCLUSIONES

El objetivo principal de nuestro trabajo era comprobar si la transfección transitoria con el imitador del microRNA miR-21 producía cambios en la expresión de las células madre mesenquimales del cordón umbilical. El miR-21 está implicado en múltiples funciones tanto fisiológicas como patológicas relacionadas con diferentes estados celulares, entre ellos la inflamación y la senescencia. Según los objetivos del estudio que establecimos en un primer momento, podemos llegar a las siguientes conclusiones:

- Se obtuvieron células madre mesenquimales de cordón umbilical, esto se confirmó por la expresión de marcadores mesenquimales, morfología fibroblástica.
- Se generaron varias líneas de células madre mesenquimales procedentes de cordón umbilical con la sobre-expresión de miR-21 mediante una transfección transitoria.
- Las células madre mesenquimales después de la transfección con miR-21 sufrieron una modificación en su perfil inmunológico, aumentando la expresión de genes relacionados con la inflamación (DAMPs) y con la senescencia (SASP).
- Se pudo validar que las células madre mesenquimales con el miR-21 guardan relación con la proteína A propuesta como candidato para estudiar su potencial terapéutico en enfermedades asociadas a la edad.

Los resultados obtenidos en este estudio indican que es un buen candidato para el estudio de muchos de los procesos tanto fisiológicos en los que está implicado.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to stem cells and regenerative medicine. *Respiration; international review of thoracic diseases*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
2. Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2018). MicroRNA. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 141(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08>.
3. Domínguez, L. M., Fiore, E. J., & Mazzolini, G. D. (2020). Células madre/estromales mesenquimales. Su potencial terapéutico en medicina [Mesenchymal stem/stromal cells. Its therapeutic potential in medicine]. *Medicina*, 80(6), 696–702
4. Mata-Miranda, Maribel, Vázquez-Zapién, Gustavo J, & Sánchez-Monroy, Virginia. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199. Recuperado en 13 de julio de 2021, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-53372013000300009&lng=es&tlng=es
5. G.A. Pimentel-Parra, B. Murcia-Ordoñez (2017) *Células madre, una nueva alternativa médica. Perinatología y Reproducción Humana*, Volume 31, Issue 1, Pages 28-33
6. Trakunram, K., Champoochana, N., Chaniad, P., Thongsuksai, P., & Raungrut, P. (2019). MicroRNA Isolation by Trizol-Based Method and Its Stability in Stored Serum and cDNA Derivatives. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 20(6), 1641–1647. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6>.
7. Hajarnis S, Lakhia R, Patel V (2015). MicroARN y enfermedad renal poliquística. En: Li X, editor. *Enfermedad renal poliquística Brisbane (AU): Publicaciones Codon. Capítulo 13*
8. Jung, Hwa & Suh, Yousin. (2014). *Regulation of IGF -1 signaling by microRNAs. Frontiers in genetics*. 5. 472. 10.3389/fgene.2014.00472.
9. Mohr, A. M., & Mott, J. L. (2015). Overview of microRNA biology. *Seminars in liver disease*, 35(1), 3–11. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1397344>
10. Fafián, J.A (2016). *Influence of aging on proliferation, pluripotency, immunogenic profiles from bone marrow mesenchymal stem cells*. <http://hdl.handle.net/2183/17767>
11. Mushahary, D., Spittler, A., Kasper, C., Weber, V., & Charwat, V. (2018). Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 93(1), 19–31. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.23242>
12. Mortada, I., & Mortada, R. (2018). Epigenetic changes in mesenchymal stem cells differentiation. *European journal of medical genetics*, 61(2), 114–118. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.10>.
13. Giner, M., Montoya, M.J., Vázquez, M.A., Miranda, C., Miranda, M.J., & Pérez-Cano, R.. (2016). ¿Qué son los microARNs?: posibles biomarcadores y dianas terapéuticas en la enfermedad osteoporótica. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8(1), 40-44. Recuperado en 11 de julio de 2021
14. Sheedy F. J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a Key Switch in the Inflammatory Response. *Frontiers in immunology*, 6, 19. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00019>

15. Takashi Aoi. (2016). Décimo aniversario de las células iPS: los desafíos que se avecinan, *The Journal of Biochemistry*, volumen 160, número 3, septiembre de 2016, páginas 121–129, <https://doi.org/10.1093/jb/mvw044>
16. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3146#bibliography>
17. Yang, H., Wang, H., & Andersson, U. (2020). Targeting Inflammation Driven by HMGB1. *Frontiers in immunology*, 11, 484. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00484>
18. <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/Education-Inmunologia-inmidades-innata-y-adaptativa>
19. NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3146>
20. C. García-Rodríguez, (2007) *Toll-like receptor 4-dependent pathways as sensors of endogenous “danger” signals. New evidences and potential therapeutic targets.* *Inmunología*, Volume 26, Issue 4, Pages 210-215, [https://doi.org/10.1016/S0213-9626\(07\)70090-2](https://doi.org/10.1016/S0213-9626(07)70090-2).
21. Płóciennikowska, A., Hromada-Judycka, A., Borzęcka, K., & Kwiatkowska, K. (2015). Co-operation of TLR4 and raft proteins in LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 72(3), 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>
22. Zhang, H., Liu, L., Jiang, C., Pan, K., Deng, J., & Wan, C. (2020). MMP9 protects against LPS-induced inflammation in osteoblasts. *Innate immunity*, 26(4), 259–269. <https://doi.org/10.1177/1753425919887236>
23. Borghesan, M., Fafián-Labora, J., Eleftheriadou, O., Carpintero-Fernández, P., Paez-Ribes, M., Vizcay-Barrena, G., Swisa, A., Kolodkin-Gal, D., Ximénez-Embún, P., Lowe, R., Martín-Martín, B., Peinado, H., Muñoz, J., Fleck, R. A., Dor, Y., Ben-Porath, I., Vossenkamper, A., Muñoz-Espin, D., & O’Loghlen, A. (2019). Small Extracellular Vesicles Are Key Regulators of Non-cell Autonomous Intercellular Communication in Senescence via the Interferon Protein IFITM3. *Cell reports*, 27(13), 3956–3971.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.05.095>
24. Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6(10), a016295. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>
25. Potter, M. L., Hill, W. D., Isales, C. M., Hamrick, M. W., & Fulzele, S. (2021). MicroRNAs are critical regulators of senescence and aging in mesenchymal stem cells. *Bone*, 142, 115679. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2020.115679>
26. Giuliani, A., Gaetani, S., Sorgentoni, G., Agarbati, S., Laggetta, M., Maccacchione, G., Gobbi, M., Rossi, T., Galeazzi, R., Piccinini, G., Pelliccioni, G., Bonfigli, A. R., Procopio, A. D., Albertini, M. C., Sabbatinelli, J., Olivieri, F., & Fazioli, F. (2021). Circulating Inflammation-miRs as Potential Biomarkers of Cognitive Impairment in Patients Affected by Alzheimer's Disease. *Frontiers in aging neuroscience*, 13, 647015. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2021.647015>
27. Olivieri, F., Rippo, MR, Procopio, AD y Fazioli, F. (2013). Inflammation circulating in the aging and related diseases. *Frontiers in genetics*, 4, 121. <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00121>
28. Huang H. (2018). Metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9) como biomarcador de cáncer y biosensores de MMP-9: avances recientes. *Sensores (Basilea, Suiza)*, 18 (10), 3249. <https://doi.org/10.3390/s18103249>
29. <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MMP9>
30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4322>

31. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3553>
32. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell*, *153*(6), 1194–1217. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.039>
33. Lu, R. J., Wang, E. K., & Benayoun, B. A. (2021). Functional genomics of inflamm-aging and immunosenescence. *Briefings in functional genomics*, elab009. Advance online publication. <https://doi.org/10.1093/bfpg/elab009>
34. Vénéreau, E., Ceriotti, C., & Bianchi, M. E. (2015). DAMPs from Cell Death to New Life. *Frontiers in immunology*, *6*, 422. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00422>
35. Mato-Basalo, R., Morente-López, M., Arntz, O. J., van de Loo, F., Fafián-Labora, J., & Arufe, M. C. (2021). Therapeutic Potential for Regulation of the Nuclear Factor Kappa-B Transcription Factor p65 to Prevent Cellular Senescence and Activation of Pro-Inflammatory in Mesenchymal Stem Cells. *International journal of molecular sciences*, *22*(7), 3367. <https://doi.org/10.3390/ijms22073367>
36. del Casar Lizcano, J. M., Vizoso Piñeiro, F., González Sánchez, L. O., Martín Suárez, A., Gava, R., Cuesta Fernández, E., & Díez Santisteban, M. C. (2003). Expresión y significación clínica de la MMP-13 (colagenasa-3) en el cáncer gástrico [Expression and clinical significance of collagenase-3 (MMP-13) in gastric cancer]. *Gastroenterología y hepatología*, *26*(1), 1–7. [https://doi.org/10.1016/s0210-5705\(03\)70332-x](https://doi.org/10.1016/s0210-5705(03)70332-x)
37. Heizmann, C. W., Fritz, G., & Schäfer, B. W. (2002). S100 proteins: structure, functions and pathology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, *7*, d1356–d1368.
38. Moon, S. K., Cha, B. Y., Lee, Y. C., Nam, K. S., Runge, M. S., Patterson, C., & Kim, C. H. (2004). Age-related changes in matrix metalloproteinase-9 regulation in cultured mouse aortic smooth muscle cells. *Experimental gerontology*, *39*(1), 123–131. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.09.019>
39. Mensà, E., Guescini, M., Giuliani, A., Bacalini, MG, Ramini, D., Corleone, G., Ferracin, M., Fulgenzi, G., Graciotti, L., Prattichizzo, F., Sorci, L., Battistelli, M., Monsurrò, V., Bonfigli, AR, Cardelli, M., Recchioni, R., Marcheselli, F., Latini, S., Maggio, S., Fanelli, M.,... Olivieri, F. (2020). Las vesículas extracelulares pequeñas liberan miR-21 y miR-217 como efectores de pro-senescencia a las células endoteliales. *Revista de vesículas extracelulares*, *9* (1), 1725285. <https://doi.org/10.1080/20013078.2020.1725285>
40. Fafián-Labora, J., Morente-López, M., Sánchez-Dopico, M. J., Arntz, O. J., van de Loo, F., De Toro, J., & Arufe, M. C. (2020). Influence of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in vitro and their role in ageing. *Stem cell research & therapy*, *11*(1), 13. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1534-0>
41. Ebert, R., Benisch, P., Krug, M., Zeck, S., Meißner-Weigl, J., Steinert, A., Rauner, M., Hofbauer, L., & Jakob, F. (2015). Acute phase serum amyloid A induces proinflammatory cytokines and mineralization via toll-like receptor 4 in mesenchymal stem cells. *Stem cell research*, *15*(1), 231–239. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.06.008>
42. Fernández-Pernas, P., Fafián-Labora, J., Lesende-Rodríguez, I., Mateos, J., De la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro Santos, J., Blanco García, F., & Arufe, M. C. (2016). 3, 3', 5-triiodo-L-thyronine Increases In Vitro Chondrogenesis of Mesenchymal Stem Cells From Human Umbilical Cord Stroma Through SRC2. *Journal of cellular biochemistry*, *117*(9), 2097–2108. <https://doi.org/10.1002/jcb.25515>

