



Memoria Trabajo de Fin de Máster

**ESTUDIO DE NUEVOS REGULADORES EN
*INFLAMM-AGING***

**ESTUDO DE NOVOS REGULADORES EN
*INFLAMM-AGING***

**STUDY OF NEW REGULATORS IN
*INFLAMM-AGING***

Máster de Biotecnología Avanzada

Curso 2021-2022

Sergio Lucio Gallego
Febrero 2022



ESTUDIO DE NUEVOS REGULADORES EN *INFLAMM-AGING*

ESTUDO DE NOVOS REGULADORES EN *INFLAMM-AGING*

STUDY OF NEW REGULATORS IN *INFLAMM-AGING*

Universidade da Coruña

Facultad de Ciencias

Instituto de Investigación biomédica de A Coruña (INIBIC)

Grupo de Terapia Celular y Medicina Regenerativa



Grupo de
Terapia Celular y
Medicina Regenerativa

Sergio Lucio Gallego

A Coruña, Febrero 2022

La Dra María del Carmen Arufe Gonda y el Dr Juan Antonio Fafian Labora en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el tribunal evaluador.



INDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	6
ABSTRACT	6
RESUMO	7
1. INTRODUCCIÓN	8
<i>Inflamm-aging</i>	8
Senescencia e <i>inflamm-aging</i>	9
Células madre mesenquimales (hMSC)	10
Ruta de las purinas	12
ANPEP y Bestatin	13
microARN-21 (mir-21)	13
Syndecan-1 (SDC-1)	14
Synstatin (SSTN)	14
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAL	16
Material biológico	16
Material no biológico	17
4. Métodos.....	19
Manipulación de cultivos celulares	19
Aislamiento de células madre mesenquimales.....	19
Tinción cristal violeta.....	20
Extracción de proteínas	20
Cuantificación de proteínas.....	21
Western blot (WB)	21
Extracción de ARN	24
Síntesis de ADN complementario (ADNc).....	24
PCR cuantitativa	24
Gel de agarosa.....	25
Tratamiento con bestatin.....	25
Tratamiento con SSTN.....	26
Transfección con mir-21.....	27
Análisis estadístico.....	28
5. RESULTADOS.....	29
Proliferación en T/C y OVCA en presencia de bestatin.....	29
Evaluación marcadores de senescencia y purinas por WB	31
Viabilidad del inhibidor de syndecan-1, SSTN en hMSC.....	32

6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	38
8. BIBLIOGRAFÍA.....	39

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de célula senescente.....	10
Figura 2. hMSC visualizadas al microscopio	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Capacidad de diferenciación de las hMSC.....	¡Error! Marcador no definido.
Figura 4. Esquema de la activación de la ruta de las purinas.	12
Figura 5. Estructura primaria SSTN.	14
Figura 6. Ensamblaje de sándwich	23
Figura 7. Esquema de la realización de los tratamientos con bestatin-	25
Figura 8. Esquema de siembra para el experimento de proliferación	26
Figura 9. Esquema de siembra para el experimento de viabilidad.	27
Figura 10. Esquema de trabajo para la transfección	28
Figura 11. Imagen obtenida a 3 días con el tratamiento.....	29
Figura 12. Imagen obtenida a 6 días con el tratamiento.....	30
Figura 13. Gráfica que representa la cuantificación del cristal violeta..	30
Figura 14. Imagen de la proteínas PRPS1 y vinculina tras el revelado.....	31
Figura 15. Imagen de la proteínas p21 y vinculina tras el revelado..	31
Figura 16. Imagen de cristal violeta obtenida tras el tratamiento con SSTN	32
Figura 17. Gráficas que representan la cuantificación del cristal violeta	33
Figura 18. Gráficas que representan la cuantificación del <i>Cell Counting</i>	33
Figura 19. Imagen obtenida tras la exposición a luz ultravioleta del gel de agarosa.	34

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de la recta de calibrado.	21
Tabla 2. Mezclas utilizadas para la formación de los geles separadores de acrilamida	22
Tabla 3. Mezclas utilizadas para la formación del gel concentrador de acrilamida.....	22

ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ANPEP/CD13	Aminopeptidasa N /CD13
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BCA	Ácido bicinconínico
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDKN1A CDKN2A CDKN2B	Inhibidor de las quinasas dependientes de ciclina
CHUAC	Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña
DAMPs	<i>Damaged- associated molecular patterns</i>
DMEM	<i>Dulbecco 's modified eagle medium</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
g	Gramos
G	Fuerza centrífuga
HGMB1	<i>High group mobility box 1</i>
hMSC	<i>Human mesenchymal stem cells</i>
IL 6	Interleucina 6
IL 8	Interleucina 8
IMP	Inosina monofosfato
INF γ	Interferón gamma
ISCT	<i>International Society Cell & Gen Therapy</i>
mL	Mililitro
mm ²	Milímetros cuadrados
MMP2	Metaloproteinasa de la matriz 2
NaCl	Cloruro sódico
nM	Nanomolar
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
P/S	Penicilina / estreptomycin
p/v	Peso/ volumen
p100	Placa de 100 mm ²
PAMPS	Pathogens-associated molecular patterns
PHR	Peroxidasa de rábano
ppCO ₂	Presión parcial dióxido de carbono
PRPP	Fosforribosil pirofosfato
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	<i>Roswell park memorial institute medium</i>
SASP	<i>Senescent-associated secretory phenotype</i>
SDC-1	Syndecan-1
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSTN	Synstatin
SV40	<i>Simian virus 40 (vector retroviral)</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA
TEF	Tampón de electroforesis

TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TT	Tampón transferencia
TTBS	Tampón de lavado
V	Voltios
v/v	Volumen/ volumen

RESUMEN

Comprender el envejecimiento y mejorar la calidad de vida de las personas en las últimas etapas de su vida se ha convertido en uno de los retos más relevantes de la medicina moderna. Existe una gran variedad de enfermedades asociadas a la edad que a día de hoy no se termina de conocer su procedencia. En múltiples estudios se señala a la inflamación crónica, conocido como *inflamm-aging*, como el posible origen de estas. La senescencia celular, asociada con este proceso inflamatorio cobra un papel relevante durante el envejecimiento. A lo largo de este trabajo se evalúa mediante proliferación celular y expresión de marcadores de senescencia la capacidad de un dipéptido conocido como bestatin de interferir en la ruta metabólica de las purinas con el fin de producir senescencia. Esto nos permite conocer rutas que se pueden ver alteradas en el envejecimiento y poder estudiar sobre ellas para posibles terapias celulares. Por otro lado, el péptido synstatin inhibe específicamente una región de syndecan-1. Esta proteína participa en diversos procesos inflamatorios e interactúa con múltiples moléculas una de ellas es el microARN-21, cuya modulación estudiamos en este trabajo. Usaremos el péptido synstatin para inhibir la unión del microARN-21 al syndecan-1 y describir su papel *inflamm-aging*. En definitiva, este trabajo busca rutas metabólicas que puedan aportar información sobre inflamación y senescencia y por consiguiente sobre *inflamm-aging* para el desarrollo de futuras terapias.

Palabras clave: bestatin, synstatin, senescencia, inflamación, *inflamm-aging*

ABSTRACT

Understanding aging and improving the quality of life of people in the last stages of their lives has become one of the most important challenges of modern medicine. There is a wide variety of age-related diseases whose origin is still unknown. Multiple studies point to chronic inflammation, *inflamm-aging*, as the possible origin of these diseases. Cellular senescence associated with this *inflamm-aging* process, plays a relevant role during aging. Throughout this work, the capacity of a dipeptide known as bestatin to interfere in the purine metabolic pathway to produce senescence is evaluated by means of cell proliferation and expression of senescence markers. This allows us to learn about pathways that may be altered in aging and to study them for possible cellular therapies. On the other hand, we have the synstatin peptide that specifically inhibits a region of syndecan-1. This protein participates in several inflammatory processes and interacts with multiple molecules, one of them is microRNA-21, whose modulation we study in this work. We will use the peptide synstatin to inhibit the binding of microRNA-21 to syndecan-1 and describe its *inflamm-aging* role.

Ultimately, this work seeks metabolic pathways that can provide information on inflammation and senescence and therefore on inflamm-aging for the development of future therapies.

Key words: bestatin, synstatin, senescence, inflammation, inflamm-aging

RESUMO

Comprender o envelhecimento e mellorar a calidade de vida das persoas nas últimas etapas da súa vida converteuse nun dos retos máis relevantes da medicina moderna. Existe unha gran variedade de enfermidades asociadas á idade que a día de hoxe non se termina de coñecer a súa procedencia. En múltiples estudos sinalase á inflamación crónica, *inflamm-aging*, como un posible orixe destas patoloxías. A senescencia celular, asociada con este proceso inflamatorio cobra un papel relevante durante o envelhecimento. Ao longo deste traballo avalíase mediante proliferación celular e expresión de marcadores de senescencia a capacidade dun dipéptido coñecido como bestatin de interferir na ruta metabólica das purinas co fin de producir senescencia. Isto permítenos coñecer rutas que se poden ver alteradas durante o envelhecimento e poder estudar sobre elas para posibles terapias celulares. Por outro lado, temos o péptido synstatin que inhibe especificamente unha rexión de syndecan-1. Esta proteína participa en diversos procesos inflamatorios e interactua con múltiples moléculas sendo unha delas o microARN-21, cuxa modulación estudamos neste traballo. Usaremos o péptido synstatin para inhibir a unión do microARN-21 ao syndecan-1 describindo o seu papel en *inflamm-aging*. En definitiva, este traballo busca rutas metabólicas que poidan aportar información sobre inflamación e senescencia. Consecuentemente sobre *inflamm-aging* para o desenvolvemento de futuras terapias.

Palabras chave: bestatin, synstatin, senescencia, inflamación, *inflamm-aging*

1. INTRODUCCIÓN

Inflamm-aging

Es bien conocido que al envejecer aumenta el riesgo de padecer ciertas enfermedades crónicas como pueden ser la diabetes tipo 2 o enfermedades cardiovasculares entre otras, que afectan negativamente la calidad de vida en las personas ancianas (de Oliveira Neto *et al.*, 2021). Entre los objetivos de los estudios más recientes está la búsqueda de biomarcadores que permitan identificar cuando se van a presentar estas enfermedades. Si bien no se ha encontrado un biomarcador que determine esta predisposición, si se ha visto que moléculas inflamatorias, como por ejemplo interleucina-6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), tienden a acumularse tanto en suero como en tejidos a medida que avanza la edad (Alberro *et al.*, 2021).

La inflamación es un proceso beneficioso en los organismos puesto que nos protege de agentes dañinos como pueden ser los patógenos, proteínas mal plegadas o restos celulares entre otras. Las células del sistema inmune detectan a través de sus receptores lo que se conocen como PAMPs y DAMPs que vienen del inglés *pathogen-associated* y *damage-associated molecular patterns* respectivamente. Las PAMPs hacen referencia a restos virales o de bacterias y en el caso de DAMPs a posibles moléculas como podrían ser las proteínas S100 o HGMB1 (*high-mobility group box 1*) que cuando se pliegan o posicionan de forma aberrante inducen procesos de estrés e inflamación. En las edades más tempranas existe un balance entre las moléculas proinflamatorias y las antiinflamatorias con el fin de resolver la inflamación correctamente. A medida que pasan los años, el deterioro del sistema inmune provoca que este balance se rompa a favor de un aumento de las moléculas proinflamatorias. Así, *inflamm-aging* hace referencia al estado inflamatorio, alcanzado debido a la presencia de moléculas proinflamatorias que se cronifica como consecuencia del envejecimiento. Si bien esta condición es de bajo grado acaba causando estrés en los organismos y conlleva a producir esas enfermedades ligadas a la edad. (Franceschi *et al.*, 2017).

A medida que aumenta la edad ocurre un declive en los distintos órganos y sistemas, si bien se necesita aumentar el estudio en este campo tanto en factores internos como externos que influyen en este deterioro, se sabe que el sistema inmune tiene una alta relevancia y que pierde eficacia con los años. Este fenómeno se denomina inmunosenescencia y se debe a que las células del sistema inmune entran en un estado senescente perdiendo la capacidad de discernir tanto DAMPs como PAMPs. Las células del sistema inmune no conforman los anticuerpos correctamente, siendo la respuesta inmunitaria menos eficaz contra las

moléculas dañinas, impidiendo que se solventa correctamente y se produzca daño en los tejidos. Este fenómeno está relacionado con la aparición del *inflamm-aging* con el fracaso de las vacunas y con mayor riesgo de sufrir infecciones más graves (Del Giudice *et al.*, 2018).

Senescencia e *inflamm-aging*

El deterioro que sufren los órganos y tejidos con la edad está asociado también con la entrada de las células en un estado conocido como senescencia celular y la acumulación de las mismas en los tejidos y órganos (Sanada *et al.*, 2018).

Las células senescentes tienen una serie de características que las diferencian de las no senescentes. La característica más representativa de este tipo de células sería la relacionada con el ciclo celular. Las células no senescentes tienen un ciclo completo mientras que las senescentes presentan una interrupción debido a la expresión de inhibidores de las quinasas dependientes de las ciclinas del ciclo celular como CDKN1A (p21), CDKN2A (p16), CDKN2B (p15) (J. A. Fafián-Labora & O’Loghlen, 2021) lo que provoca una disminución de la proliferación celular. Además, su metabolismo se ve modificado por ejemplo en la actividad de la β -galactosidasa, que se ve aumentada en este tipo de células llegando a ser considerado el marcador de senescencia universal (J. Fafián-Labora *et al.*, 2019) (**Figura 1**).

Por otro lado, las células poseen un fenotipo de senescencia asociado a su secretoma característico, se denomina SASP del inglés *Secretory associated senescent phenotype* y se caracteriza no solo por el aumento de citoquinas y otras moléculas proinflamatorias sino también por proteínas, lípidos, mediadores celulares e incluso ácidos nucleicos diferentes a los que secretan las células no senescentes. Además, este SASP tiene la capacidad de transmitir y perpetuar el estado de senescencia celular a otras células fomentando el desarrollo de enfermedades ligadas a la edad (Borghesan *et al.*, 2019).

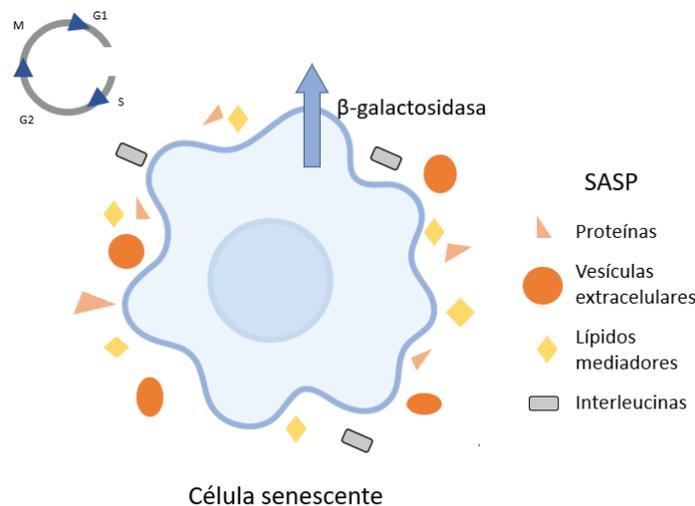


Figura 1. Esquema de célula senescente. Se representan los aspectos que las diferencian de las células no senescentes como son el ciclo interrumpido, la mayor actividad de la β -galactosidasa y los productos de SASP.

El proceso de senescencia celular en el sistema inmune se denomina inmunosenescencia y tiene un papel relevante en la aparición del estado de *inflamm-aging*, ya que la mala resolución de la respuesta inmune aumenta la cantidad de mediadores proinflamatorios en el medio y por tanto el daño a las células del organismo (Del Giudice *et al.*, 2018).

Células madre mesenquimales

Las células madre son las precursoras de otros tipos celulares y según su capacidad de diferenciarse se pueden clasificar como totipotentes, pluripotentes, multipotentes o unipotentes. Así mismo su origen, sería otra forma de clasificarse, pueden ser embrionarias, adultas o inducidas (iPSC del inglés *induced pluripotency stem cells*). En nuestro laboratorio se trabaja con células madre adultas o mesenquimales humanas (hMSC, del inglés *human mesenchymal stem cells*) obtenidas a partir de cordón umbilical, pero se pueden obtener de tejidos mesenquimales como médula ósea o tejido adiposo entre otros (Weinberger *et al.*, 2016).



Figura 3 hMSC visualizadas al microscopio de campo visible (20X), (Nikon, Japón) se aprecia la forma fibroblástica en su cultivo.

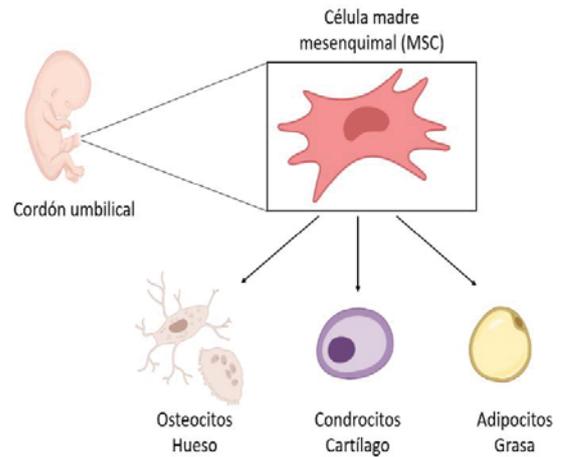


Figura 2. Capacidad de diferenciación de las hMSC. Obtenidas de estroma de cordón umbilical. Imagen editada con Biorender.

Para caracterizar las hMSC cuando se cultivan *in vitro*, se recurre a las normas de la ISCT (*International Society Cell & gen Therapy*). Entre estas normas figuran la capacidad de proliferación, adherencia a las placas de cultivo, presentar una forma fibroblástica (**Figura 2**), y como son células multipotentes tienen que poder diferenciarse a tejidos del linaje mesodérmico como son los osteocitos, condrocitos y adipocitos bajo las condiciones determinadas (**Figura 3**). Por otro lado, deben mostrar la presencia de marcadores mesenquimales en la membrana (CD73, CD90, CD105) y no expresar otros como son los marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34 y CD14) entre otros.

Las hMSC tienen un papel destacable en la progresión de este *inflamm-aging* ya que cuando se vuelven senescentes pierden la capacidad de proliferación y multipotencia. Además, su capacidad inmunomodulatoria se ve modificada debido a que las hMSC senescentes poseen un SASP compuesto por interleucinas como la IL6 o la IL8 interferón-gamma (INF- γ), metaloproteinasas de la matriz como MMP2 y restos celulares que desatan la respuesta inmune de forma continua (Lee & Yu, 2020).

Ruta de las purinas

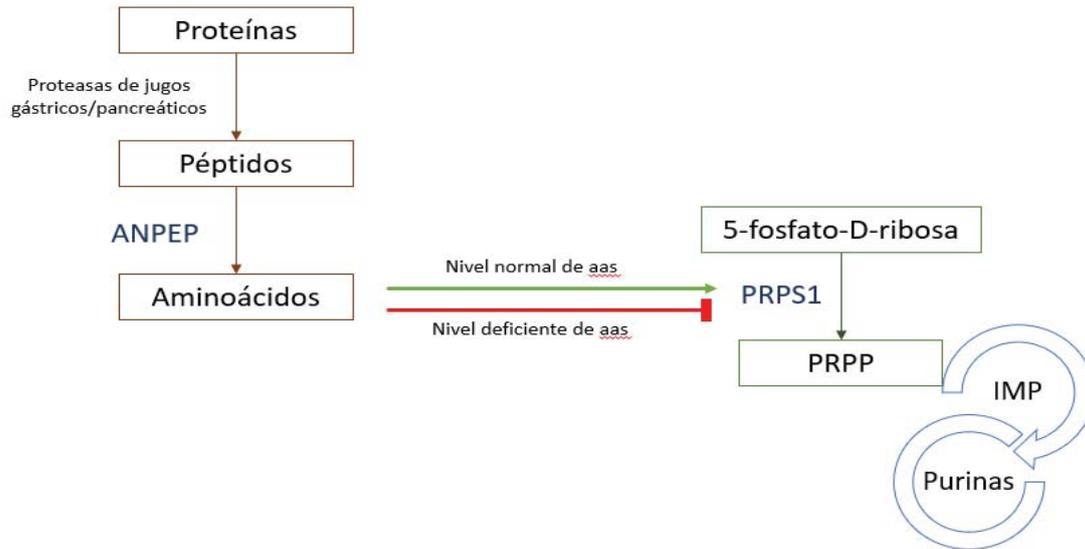


Figura 4. Esquema de la activación de la ruta de las purinas.

Las células para su desarrollo y crecimiento requieren de un aporte de nutrientes que les permita obtener el material molecular que ellas necesitan para su metabolismo. Una de las rutas principales en el metabolismo celular es la ruta de las purinas (guanina y adenina). Esta ruta se encarga de obtener las bases púricas que forman parte de los ácidos desoxirribonucleico (ADN) y ribonucleico (ARN). Sintetizar estas purinas *de novo* es necesario para la replicación del ADN, y aunque el metabolismo para su obtención es muy variable en los diferentes tejidos y en las diferentes especies, tienen en común la transformación de fosforribosil pirofosfato (PRPP) hasta inosina monofosfato (IMP) a través de una cascada de señalización (Adam, 2005). Para la formación de este PRPP, es necesaria la acción de la fosforribosil pirofosfato sintetasa (PRPS1) utilizando como sustrato la 5-fosfato-D-ribosa (**Figura 4**). Esta enzima se ve limitada por la concentración de su sustrato y también por condiciones de falta de aminoácidos. Esta misma falta de aminoácidos hace que tampoco se forme la 5-fosfato-D-ribosa a través de la ruta de las pentosas fosfato (Boss, 1984).

Para obtener los aminoácidos a través de las proteínas de la dieta se requiere la digestión con proteasas, siendo una de las últimas en actuar la metaloproteasa ANPEP (o CD13) (Mateos *et al.*, 2018).

ANPEP y Bestatin

La metaloproteasa ANPEP (aminopeptidasa N), conocida como CD13, es un receptor transmembrana con un importante rol en los procesos de metástasis e invasión de tejidos. Tiene 3 funciones principales; enzimática, receptor, y molécula señal. Como enzima con acción ectopeptidasa dependiente de zinc participa en la degradación de matriz extracelular facilitando la invasión tumoral. Como receptor en procesos de endocitosis y como molécula señal está implicada en procesos de adhesión y angiogénesis (Kis *et al.*, 2021). Por sus características se ha propuesto como marcador de enfermedades inflamatorias y como marcador cancerígeno en ciertos tipos de tumores en los que está sobre expresado (Kis *et al.*, 2021).

Estudios clínicos han demostrado que el dipéptido bestatin presenta una inhibición con alta especificidad en el centro activo de dicho receptor. Además, se ha visto que es citotóxico para los tumores CD13 positivos. Por ejemplo, en la línea OVCA ES-2, que presenta una alta actividad de CD13, tras añadir bestatin se vio reducida la actividad de dicho receptor además de la proliferación celular. Sin embargo, la línea OVCA HRA cuya expresión de CD13 es inferior no se vieron afectadas en cuanto a la proliferación celular la adición del dipéptido (Terauchi *et al.*, 2007). Si bien se conoce su actividad como antitumoral, nosotros lo queremos estudiar es la capacidad del dipéptido para inducir senescencia, la disminución de la proliferación puede ser debida a que estas células interrumpen su ciclo celular, y por ello líneas que no expresan CD13 en altas cantidades no sufren esta interrupción al no volverse senescentes y continúan proliferando.

En un estudio proteómico desarrollo en nuestro grupo se descubrió que la expresión del CD13 está disminuida en envejecimiento prematuro (Mateos and Fafian Labora *et al.*, 2018). Por tanto, la inhibición de CD13 nos podría llevar a un escenario en el que no existan suficientes aminoácidos para activar la ruta de las purinas y, así impedir la división celular. Esta interrupción en el ciclo celular puede asociarse con senescencia por lo que el estudio de esta enzima puede ser interesante en cuanto a envejecimiento y por consiguiente en *inflamm-aging*.

microARN-21 (mir-21)

Los microARN se encargan de regular la expresión génica a nivel postranscripcional al unirse a un ARN mensajero (ARNm) por complementariedad dando lugar a una degradación del ARNm o impidiendo su traducción a proteína (Trakunram *et al.*, 2019). Esta capacidad

de impedir expresión proteica hace que estén presentes en varias funciones celulares como el metabolismo crecimiento y diferenciación y en funciones fisiopatológicas ya que algunos actúan en procesos inflamatorios (Giner *et al.*, 2016). Entre los microARNs involucrados en inflamación se encuentra el mir-21 cuya expresión se ve aumentada significativamente cuando células como neutrófilos o células T maduran a su estado activo (Sheedy, 2015) debido a la inducción por estímulos pro-inflamatorios como los PAMPs o DAMPS (Płóciennikowska *et al.*, 2015).

Syndecan-1 (SDC-1)

Syndecan-1 (SDC-1) es un proteoglicano heparán sulfato transmembrana que participa en funciones de proliferación migración e interacción celular. SDC-1 se une a diversos factores que regulan la respuesta inflamatoria (Teng *et al.*, 2012) y su presencia ayuda a la resolución de la inflamación.

Los datos de un estudio proteómico cuantitativo del grupo que fueron depositados en *MassIVE repository* (www.massive.ucsd.edu) con el código de acceso <http://massive.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=7de2f5d81265401cbb8796f290d6baa6> se identificó que disminuían estadísticamente los niveles de SDC-1 en vesículas extracelulares procedentes de hMSC con el mir-21 *knock down*. La interacción entre mir-21 y SDC-1 llamó la atención puesto que puede estar íntimamente ligada a la respuesta inmune y senescencia en hMSC.

Synstatin (SSTN)

Synstatin (SSTN) es un péptido diseñado como homólogo de una parte de la secuencia del dominio ectomembrana de syndecan-1 (SDC-1) humano y del cual es específico. Es un péptido bastante novedoso del que no se tiene todavía mucha información. Lo que se sabe es que interrumpe la unión de SDC-1 a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ regulando procesos de adhesión, invasión y proliferación celular (Beauvais *et al.*, 2009). La secuencia utilizada fue la que aparece en la **Figura 5**.

⁸⁹ STSTLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLTAREQE ¹²⁰

Figura 5. Estructura primaria SSTN. Secuencia de aminoácidos que conforman el péptido SSTN. Los números hacen referencia a la secuencia de aminoácidos que bloquean en la región ectomembrana del SDC-1.

Con el bloqueo de SDC-1 por medio de la SSTN se busca impedir que mir-21 active SDC-1 y por tanto se vea afectada la transmisión de la respuesta inmune.

2. OBJETIVOS

Los objetivos específicos del presente trabajo fueron:

- Evaluar la proliferación celular en un modelo de senescencia basado en el metabolismo de las purinas.
- Validar la inducción de senescencia en el modelo basado en el metabolismo de las purinas.
- Determinar la citotoxicidad de un inhibidor selectivo de syndecan-1.
- Valorar el papel de syndecan-1 en el proceso inflamatorio a través de la vía de mir-21.

3. MATERIAL

Material biológico

Células eucariotas

hMSC (del inglés human mesenchymal stem cells). Cultivo primario de células madre mesenquimales obtenidas de cordón umbilical de cesáreas programadas a mujeres sanas de la unidad de maternidad del Complejo Hospitalario de la Universidade da Coruña (CHUAC) bajo consentimiento e información previa y aprobado por el comité de ética del CHUAC (2019/026, 21/01/2019)

T/C (TC28a2). Línea celular humana de condrocitos inmortalizados procedentes de cartílago costal de una mujer de 15 años, que expresan del vector retroviral SV40 (SCC042, Sigma-Aldrich, España).

OVCA (OVCA SKVO3). Línea celular humana de adenocarcinoma epitelial ovárico procedente de una mujer de 64 años (HTBB-77TM, ATCC, España).

Anticuerpos

Anti-vinculina (#V4505, Merck, Alemania). Anticuerpo primario procedente de ratón que detecta la proteína vinculina. La vinculina se utiliza como proteína de referencia ya que no se modifica su expresión con estos estímulos.

Anti-p21 (#ab109520, Abcam, Estados Unidos). Anticuerpo primario procedente de conejo que detecta la proteína p21. Es un inhibidor del ciclo celular y se utiliza como marcador de senescencia (J. Fafián-Labora *et al.*, 2019).

Anti-PRPS1 (#ab137577, Abcam, Estados Unidos). Anticuerpo primario procedente de conejo que detecta la proteína PRPS1. PRPS1 es la proteína que comienza la cascada de reacciones de la ruta de las purinas (Adam, 2005).

Anti-conejo-PHR (#ab6721, Abcam, Estados Unidos). Anticuerpo secundario procedente de cabra detecta los anticuerpos de conejo y además lleva una enzima peroxidasa de rábano (PHR) que al añadir un sustrato da una reacción quimioluminiscente detectada por la cámara de revelado.

Anti-ratón-PHR (#ab6728, Abcam, Estados Unidos). Anticuerpo secundario procedente de conejo detecta los anticuerpos de ratón y además lleva una enzima peroxidasa de rábano

(PHR) que al añadir un sustrato da una reacción quimioluminiscente detectada por la cámara de revelado.

Material no biológico

Medios de cultivo, disoluciones y tampones.

FBS. Del inglés *Fetal bovine seroalbumin* (Sigma-Aldrich, España). Suero bovino fetal que se utiliza para dar el aporte de nutrientes necesarios para el desarrollo de los cultivos.

P/S. Penicilina/ estreptomycin (ThermoFisher Gibco, Estados Unidos). 10.000 units/mL penicilina, 10.000 µg/mL estreptomycin. Se usa para la preparación de medios y evitar aparición de posibles contaminaciones bacterianas.

DMEM. *Dulbecco modified eagle's medium* (Lonza, España) con 4,5 g/L glucosa y glutamina. Este medio se suplementa con FBS a concentraciones de 10% (v/v) para las líneas celulares (T/C y OVCA) y 20% (v/v) para los cultivos primarios de hMSC, además se añade un 1% (v/v) de P/S.

RPML. *Roswell park memorial institute medium 1640* (ThermoFisher Gibco, Estados Unidos). Este medio se utiliza durante la extracción de las hMSC sin suplementar con FBS y con un 1% P/S.

Colagenasa y dispasa (Sigma-Aldrich, España). 2 mg/mL de colagenasa y 1,15 mg/mL de dispasa. Se utilizan como digestión enzimática del estroma de cordón umbilical durante el proceso de aislamiento de las hMSC.

Suero salino (Fresenius Kabi, España). 0,9 g de cloruro sódico (NaCl) cada 100 mL. Se utiliza durante los lavados al presentar características isotónicas con las células.

Tampón RIPA. 150 mM NaCl, 50 mM Tris-base, 0,1% (p/v) dodecilsulfato sódico (SDS), tritón 1% (v/v). (Todos los productos son de Fisher, Bélgica).

Tampón electroforesis (TEF) 1X. 0,014 g/mL glicina, 0,003 g/mL Tris-base y 0,001 g/mL SDS. Todos los productos son de Fisher, Bélgica. Se utiliza durante la electroforesis para que las proteínas se migren en el gel.

Tampón Transferencia (TT) 1X. 0,001 g/mL glicina, 0,002 g/mL Tris-base, 0,001 g/mL SDS, 10%(v/v) metanol (Merk, Alemania). Se utiliza durante el western blot para llevar a cabo la transferencia de las proteínas del gel de poliacrilamida a la membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Merck, Alemania).

Tampón de lavado (TTBS) 1X. 0,2 mM Tris-base, 15 mM NaCl y 0,05% de Tween 20 (Fisher, Bélgica). Se utiliza para lavar las membranas del western blot después de las incubaciones de las membranas con los anticuerpos.

Instrumentos

Cabina de flujo laminar (Telstar AV 30/70). Es un espacio en el que circula una corriente de aire continua que atraviesa unos filtros para impedir el paso de partículas de tamaño superior a 0,1 micrómetros.

Cámara de Neubauer (ThermoFisher, España). Es un dispositivo que nos permite contar el número de células en suspensión con ayuda de un microscopio. La cámara se rellena con 10 μ L del medio que presenta las células y se cuentan en los cuatro cuadrantes. Se hace la media de estos y este valor lo multiplicamos $\times 10^4$ que hace referencia a la superficie y profundidad de la cámara para conocer el valor de células en nuestra suspensión. En caso de diluir la suspensión habrá que multiplicar por el factor de dilución.

4. MÉTODOS

Manipulación de cultivos celulares

Toda actividad realizada con los cultivos celulares durante su crecimiento y expansión se lleva a cabo en condiciones de esterilidad proporcionadas por una cabina de flujo laminar. Todo lo que estuvo en contacto con nuestras células debe estar esterilizado previamente para evitar contaminaciones. Las células con las que se desarrolló este trabajo se cultivan sobre placas de cultivo de 100mm² de superficie (p100) (Corning, España). Estas crecen formando una monocapa y cuando presenta una confluencia alta, entorno al 90%, es necesario levantarla, para esto se usa tripsina 1x (ThermoFisher, España) durante 4 minutos. Tras levantar las células e inactivar la tripsina con medio de cultivo, se centrifugan a 1.500 revoluciones por minuto (rpm) (1.250 G) durante 5 minutos y resuspenden en un volumen conocido. Las células en suspensión se pueden congelar, sembrar para experimentos a una densidad celular determinada o expandir en varias placas para continuar su cultivo.

Cuando queremos sembrar una densidad celular determinada en los experimentos. Se cogen de la suspensión de células 10 µL para una cámara de Neubauer que nos permite contar las células existentes en dicha suspensión. Se calcula el volumen necesario para sembrar en los pocillos y se añade medio suplementado para permitir el crecimiento de las células.

Durante el desarrollo de las líneas celulares el medio se cambia cada varios días para continuar aportando los nutrientes necesarios. Además, crecen en el interior de incubadores acondicionados a las características que necesitan en cuanto a temperatura (37°C), humedad (95%) o presión parcial de CO₂ (ppCO₂) (5%).

Aislamiento de células madre mesenquimales

Para el desarrollo de algunos experimentos se requiere del uso de hMSC. Se obtienen directamente de muestras de pacientes, en este caso de estroma del cordón umbilical de mujeres con cesáreas programadas. Lo que llega al laboratorio es una muestra del estroma del cordón umbilical en medio RPMI. Primeramente, se realizan una serie de lavados con suero salino para que quede lo más limpio posible y se continua con una digestión mecánica cortando el cordón en pequeños trozos seguido de tres digestiones enzimáticas durante 10 minutos a 37°C con colagenasa y dispasa cada una. Los trozos digeridos se colocan sobre placas p100 con medio suplementado de hMSC. Durante los siguientes 7 días se les añade 2 mL de este medio suplementado a diario. Tras finalizar este tiempo los restos del cordón son eliminados de la placa. El sobrenadante se filtra empleando una gasa estéril sobre otra placa.

Se hace pasar 2 mL de medio a través de la gasa para intentar arrastrar posibles células que se hayan quedado adheridas. El sobrenadante filtrado se pone en una placa de cultivo p100. Las placas se guardan en incubadores de cuarentena hasta que se comprueba que las hMSC se adhieren a la placa de cultivo y no están contaminadas por micoplasma o bacterias (Arufe *et al.*, 2011).

Tinción cristal violeta

La proliferación celular se puede evaluar recurriendo al método de tinción mediante cristal violeta. Una vez se acaba el tiempo de desarrollo del experimento se retira el medio a las células, se lavan con agua destilada 2 veces y se procede a fijarlas a los pocillos con paraformaldehído al 4% (p/v) (Sigma-Aldrich, España) durante 5 minutos en rotación a temperatura ambiente. Luego se retira el fijador, se vuelven a lavar con agua destilada y se añade el cristal violeta 0,5% (v/v) (Sigma-Aldrich, España) durante al menos 30 minutos en rotación a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se les retira este colorante y se dejan secar. Cuando esté seco se escanea la placa. Posteriormente, se disolverá el cristal violeta teñido con ácido acético al 30% (v/v) (Merk, Alemania) durante 30 minutos en rotación a temperatura ambiente. Por último, leemos la placa en el espectrofotómetro NanoQuant (Tecan infinite M200, Estados Unidos) de absorbancia a una longitud de onda de 590 nm.

Extracción de proteínas

Las proteínas son biomoléculas esenciales en los organismos vivos por sus diversas funciones tanto estructurales como transportadoras o reactivas y su expresión varía dependiendo de las circunstancias en las que se encuentran (Uetz & Finley, 2005). Analizar la expresión tras añadir un estímulo y compararlo con un control es un buen método para conocer cómo afecta dicho estímulo a las funciones celulares. Para obtener las proteínas esperamos a finalizar el experimento con las células sometidas a diferentes tratamientos. A continuación, se procede a retirar el medio y lavar 3 veces con suero salino frío para eliminar los restos del medio que puedan afectar a la extracción proteica, además de que el frío detiene el metabolismo celular. A partir de este momento la placa del experimento debe mantenerse sobre hielo. Se añade el tampón RIPA, un tampón de lisis celular, y cóctel inhibidor de proteasas al 1X (Sigma-Aldrich, España), que inactiva a las proteasas para mantener las proteínas sin degradar. Con ayuda de una pipeta se raspa el pocillo de la placa ayudando a la lisis celular por métodos físicos. Se recoge el volumen y centrifuga a 13.000 rpm (15.000 G) 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se recoge y puede guardarse a -80°C hasta la cuantificación o detección.

Cuantificación de proteínas

La cantidad proteica presente en el sobrenadante obtenido en el proceso de extracción se cuantifican mediante el kit comercial BCA (ácido bicinconínico) (ThermoFisher, España). Para conocer nuestra concentración de proteínas se hace una recta de calibrado con cantidades diluidas de albúmina conocidas (**Tabla 1**) El kit proporciona los reactivos A y B que se mezclan en proporción 1:50. Tanto las muestras a analizar como la recta de calibrado se cargan en una placa de 96 pocillos (Corning, España) y se leen en el lector de placas NanoQuant a 480 nm. Una vez sabemos la concentración de la muestra se preparan para western blot siendo necesario desnaturalizarlas.

Tabla 1. Concentraciones de albúmina utilizadas para la realización de la recta de calibrado.

Dilución	Concentración $\mu\text{g/ml}$
1	2.500
2	1.500
3	1.000
4	750
5	500
6	250
7	125
8	25
9	0

Los extractos proteicos se mezclan con Laemmli 1X (Biorad *laboratories*, Estados Unidos) y se desnaturaliza las proteínas a 95°C durante 5 minutos. Luego se dejan en hielo durante 10 minutos. El color azul del Laemmli permite ver el avance del proceso de electroforesis.

Western blot (WB)

Previamente es necesario preparar los geles de poliacrilamida formados por una parte separadora y otra concentradora. La fase separadora se hace en diferentes concentraciones en función del tamaño de las proteínas que se quieren ver. Una mayor concentración de poliacrilamida separará mejor las proteínas más pequeñas ya que los poros del gel tienen mayor tamaño y las proteínas grandes presentan mayor dificultad al atravesar el gel. El porcentaje usado fue de 10% (v/v) y de 15% (v/v) de acrilamida y se preparan como indica la **Tabla 2**.

Tabla 2. Mezclas utilizadas para la formación de los geles separadores de acrilamida. Persulfato amónico (APS) (Fisher, España) tetrametiletilenodiamina (TEMED) (Sigma-Aldrich, España).

Gel separador	15%	10%
Agua destilada (mL)	3,4	5,9
Acrilamida (mL)	7,5	5
1,5M Tris pH 8,8 (mL)	3,8	3,8
10% (p/v) SDS (μ L)	150	150
10% (p/v) APS (μ L)	150	150
TEMED (μ L)	6	6

La parte concentradora es en la que se añade un peine que dará forma a los pocillos de carga de muestra y se realiza una vez polimeriza la fase anterior. Con esta fase se pretende juntar todas las proteínas para que entren a la vez en la fase separadora. El gel concentrador se prepara de la forma indicada en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Mezclas utilizadas para la formación del gel concentrador de acrilamida.

Gel concentrador	
Agua destilada (mL)	6,8
Acrilamida (mL)	1,7
1 M Tris pH 6,8 (mL)	1,25
10% SDS (μ L)	100
10% APS (μ L)	100
TEMED (μ L)	10

Una vez hecho el gel se coloca en una cubeta de electroforesis que se rellena con tampón de electroforesis (TEF) y se retira el peine para cargar las muestras y un marcador de pesos moleculares (PageRuler, ThermoFisher, España) conocidos que nos funcione de referencia de peso para nuestras proteínas de las muestras. La cubeta se conecta a una fuente eléctrica que hace que las proteínas migren a través del gel, primero concentrándose (a 80 voltios (V)) y luego separándose (a 120 V) hasta que veamos que las muestras corrieron hasta el final.

Tras acabar la electroforesis el siguiente paso consiste en la transferencia de estas proteínas que se encuentran en el gel de acrilamida a una membrana de transferencia PVDF. Esta membrana debe ser previamente activada a temperatura ambiente con 5 minutos en metanol 5 minutos agua, se repite la secuencia y por último se deja en TT 1X. Para la transferencia montamos lo que se denomina un sándwich y tendría la estructura de la **Figura 6**.

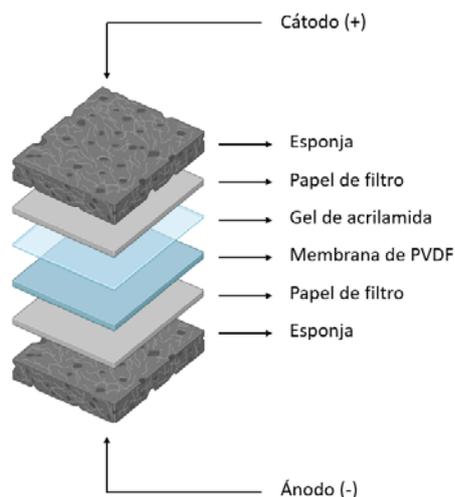


Figura 6. Ensamblaje de sándwich para la transferencia de proteínas de gel a membrana. Imagen editada con biorender.

La parte más cercana al gel debe estar hacia el electrodo de color negro que representa el cátodo y la membrana debe estar hacia el ánodo para que al poner una corriente las proteínas se dirijan del gel a la membrana. La transferencia se hace a 120 V durante 1 hora y 20 minutos con la cubeta llena de TT 1X y siempre es un proceso que se debe hacer en frío por lo que nos ayudamos de un refrigerador en el interior de la cubeta y hielo en el exterior de esta.

Finalizada la transferencia, la membrana se bloquea en 5% (p/v) BSA (del inglés *bovine serum albumine*) y se incuba con el anticuerpo primario toda la noche para que detecte la proteína que queremos analizar. Al día siguiente se hacen 3 lavados con TBS-Tween y se añade el anticuerpo secundario ligado a la enzima peroxidasa, este anticuerpo reconoce el primario. Para revelar la membrana se requiere de un sustrato ECL (*Inmobilon classico western HRP substrate*, Milipore corporation, Estados Unidos) que reaccione con la peroxidasa dando una reacción quimioluminiscente que será detectada por la cámara de revelado (*Amersham Imager 600*, Reino unido). Los anticuerpos se usaron a una dilución 1:1.000.

Extracción de ARN

El ARN tiene un papel destacable en la participación de la formación de las proteínas entre otros y su estudio nos puede mostrar indirectamente que proteínas se van a sintetizar. Para su obtención, se sigue un proceso similar al de proteínas. Primeramente, se detiene el metabolismo con frío al lavar las células con suero salino frío tres veces y a continuación se añade Trizol[™] *reagent* (Thermo-Fisher, Estados Unidos), un compuesto que lisa las células y conserva los ácidos nucleicos y proteínas impidiendo que se degraden. A este compuesto se añade cloroformo (Fisher, Bélgica), se agita y centrifuga a 3.000 rpm (1.750 G) 15 minutos. Tras la centrifugación se forman dos fases una orgánica y otra acuosa desecharmos la fase orgánica y nos quedamos con la fase acuosa en donde está el ARN. A continuación, se añade isopropanol (Fisher, Bélgica) que precipita el ARN, se centrifuga a 13.000 rpm (15.000 g) durante 30 minutos y se decanta el sobrenadante. Sobre el pellet se añade etanol 75% (v/v) (ThermoFisher, España) y se vuelve a centrifugar a 7.500 rpm (5.000 G) 5 minutos. Por último, se retira el sobrenadante se seca bien el pellet y se añade un volumen de agua libre de nucleasas (Fisher, España) para resuspender el ARN. En el Nanodrop (Nanodrop *ND-1000 spectrophotometer*, NanoDrop *technologies*, Estados Unidos) se cuantifica la concentración de ARN presente.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Cuando se tiene el ARN lo siguiente es pasarlo a ADNc. Para ello se recurre a un kit de *NZY reverse transcriptase* (NZYtech, Portugal). Al ARN de nuestra muestra se añade un oligómero aleatorio de 6 nucleótidos (2,5 ng/μL) que funciona como cebador y los diferentes nucleótidos libres (0,5 mM). Se calientan a 65°C durante 5 minutos para eliminar estructuras secundarias que se pudieran formar y luego se les añade la transcriptasa inversa (200 unidades) y un tampón de reacción 1X. Las muestras se incuban a 25°C 10 minutos, luego a 50°C durante 50 minutos y por último 5 minutos a 85°C para inactivar la reacción y finalizar el proceso de transcripción inversa, obteniendo nuestro ADNc que se guarda a -80°C hasta su uso.

PCR cuantitativa

El ADNc obtenido se mezcla con cebadores específicos del ARN que quieres detectar. En este caso fue necesario añadir los cebadores tanto de U6 como de mir-21 (ThermoFisher, España). Además de estos se necesita la Taqman (ThermoFisher, España) que llevará a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). La mezcla se carga en

una placa de 96 pocillos opaca que posteriormente se lleva al LightCycler (480 II Real Time PCR, Roche *Diagnostics International*, Suiza) donde tendrá lugar la PCR donde a medida que se van amplificando las muestras emite una luz detectada por el dispositivo.

Gel de agarosa

Primeramente, se prepara un gel de agarosa utilizando 2 gramos de agarosa disueltos en 200 mL de Tris-*acetate*-EDTA 1X (TAE) (Fisher, España) con ayuda del microondas se va disolviendo sin llegar a hervir. Cuando esté disuelto se deja atemperar, y luego se le añaden 2 μ L de *SYBR SAFE DNA* (Invitrogen probes, Estados Unidos) que nos permitirá visualizar el gel posteriormente.

Preparamos la cubeta de electroforesis junto con un peine y vertemos la agarosa hasta que cubra buena parte del peine y se deja polimerizar. Se añade TAE hasta cubrir el gel polimerizado, se quita el peine formando los pocillos que luego se cargan con un marcador y con nuestras muestras. Ponemos a correr el gel a 80 V durante 1 hora. El gel se visualiza en la cámara de revelado utilizando luz ultravioleta.

Tratamiento con bestatin

Para evaluar el proceso de proliferación de las células en presencia de la bestatin se decidió tratarlas durante 3 y 6 días basándonos en la literatura, donde se nos describe una reducción de masas celulares entorno a los 7 días en modelos *in vivo*, por lo que se decidió reducir el número de días para modelos *in vitro*. Las concentraciones de bestatin usadas fueron de 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M. En el caso de las placas a 6 días, se realiza un cambio de medio a los 3 días, en el que se vuelven a añadir las concentraciones de bestatin del primer día. Tras pasar estos días se fijan las células y se tiñen mediante la tinción cristal violeta.

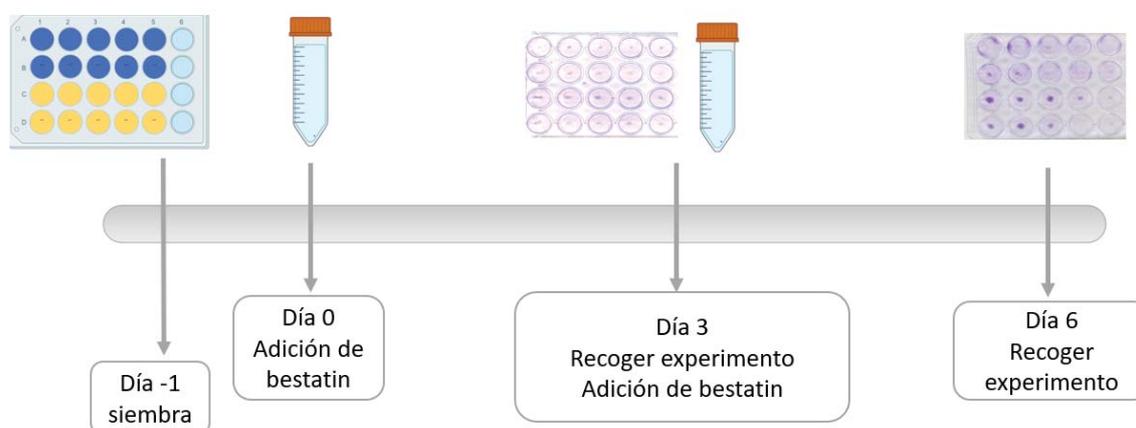


Figura 7. Esquema de la realización de los tratamientos con bestatin. Recoger experimento hace referencia a la fijación y posterior tinción de las células.

En principio, se sembraron 2.000 células de cada uno de los tipos celulares siguiendo el esquema de la **Figura 8**. Tras realizar el primer experimento se decidió aumentar el número de células a 5.000 en el caso de T/C y 10.000 para las OVCA para que las células estuvieran a una confluencia más adecuada para el desarrollo del experimento. Se hacen 2 réplicas técnicas en cada uno de los experimentos. Una vez se siembran las células se dejan reposar aproximadamente 24 horas para que se adhieran a la superficie de los pocillos de la placa. Después de esperar estas horas se añade el tratamiento, y un pocillo con control que llevará DMSO en la misma relación v/v que la concentración más alta de bestatin. Se añade el DMSO puesto que la bestatin se disolvió en dicho disolvente y así comprobamos que el efecto que observamos es debido al péptido (**Figura 8**).

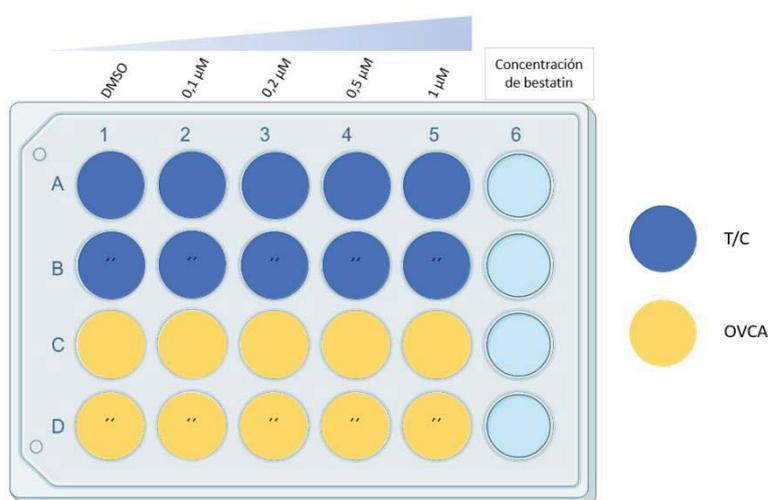


Figura 8. Esquema de siembra para el experimento de proliferación con bestatin en placas de 24 pocillos. (Corning, España)

Obtenidas las imágenes de las placas teñidas se disolvieron con ácido acético para su cuantificación y análisis. El cristal violeta se cuantifica a una longitud de onda de 590 nm en el NanoQuant. Los datos obtenidos se normalizan frente al control con DMSO y en función del tipo celular y días de exposición a la bestatin para su posterior análisis estadístico empleando una *T de student* para la que se consideró significativo un valor de $p < 0.05$.

Tratamiento con SSTN

Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos (Corning, España) con 15.000 células por pocillo con tres réplicas técnicas por experimento. Después de dejar 24 horas para que las células se puedan adherir a la placa se realiza la primera estimulación con SSTN. Se escogieron concentraciones similares a las del estudio de referencia (Beauvais *et al.*, 2009) 0,05 μM, 0,5 μM, 1 μM, 10 μM de SSTN. En cuanto a los tiempos se emplearon 1, 2, 5 y 6 horas y se sembraron como indica la **Figura 9**. La estimulación se realiza de forma gradual

comenzando con la de 6 horas luego 5, 2 y finalmente 1 hora para finalizar la estimulación con todos a la vez.

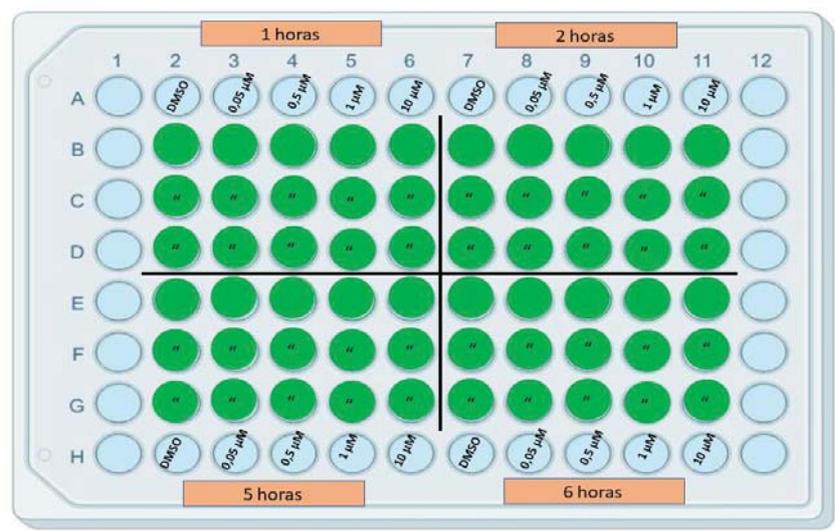


Figura 9. Esquema de siembra para el experimento de viabilidad con SSTN en placa de 96 pocillos.

Pasadas las horas se comprueba la viabilidad utilizando el *Cell Counting kit 8* (Dojindo laboratories, Japón) y posteriormente se elimina este, fijando las células y tiñéndolas con cristal violeta. El método de *Cell Counting* se usa para validar los resultados del cristal violeta y sencillamente consiste en añadir 10 µL del kit con 100 µL de medio de cultivo, incubar 2 horas y cuantificar en el NanoQuant a 450 nm de longitud de onda.

Transfección con mir-21

Se cultivaron en dos placas de 6 pocillos (Corning, España) hMSC y tras dejarlas reposar durante un día, se procedió a la transfección con mimic control negativo y mimic mir-21 (mir-21-5p OE) (Ambion, Thermo Fischer, Estados Unidos).

Para la transfección, se prepararon los reactivos del mimic control negativo y del mimic mir-21 por separado a una concentración de 50 nM en medio de cultivo DMEM sin FBS y se añadieron sobre lipofectamina (ThermoFisher, Madrid, España) previamente preparada a 50 nM en medio de cultivo DMEM sin FBS. Se dejaron reposar 5 minutos y se procede a transfectar. Para transfectar, la mezcla de mimic mir-21 se añade sobre una placa, y la mezcla mimic control sobre la otra añadiéndose después el medio de cultivo. Al día siguiente se hace un cambio de medio para añadir un medio DMEM con 20% (v/v) FBS libre de vesículas extracelulares (exosomas) y 1%P/S. Pasados 3 días se añade la SSTN en la concentración elegida y se recoge el experimento para ARN (**Figura 10**).

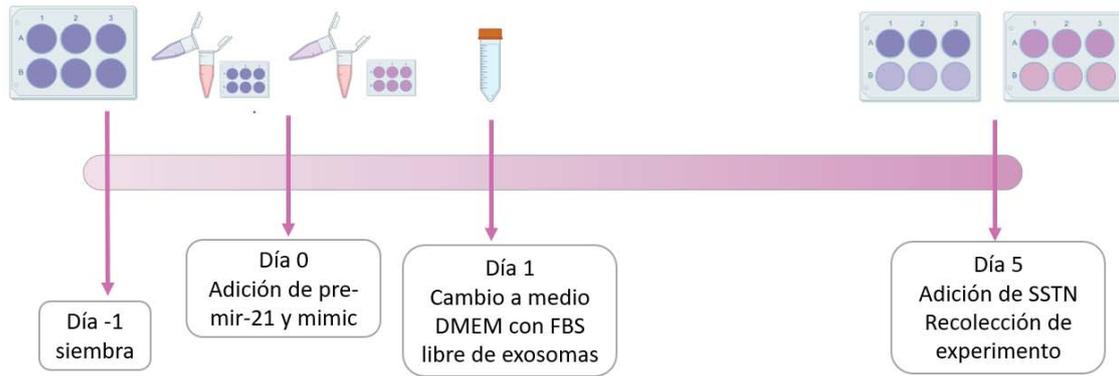


Figura 10. Esquema de trabajo para la transfección con mimic mir-21 y mimic control y tratamiento con SSTN. Tras un día de la transfección, se le cambia el medio suplementado por medio suplementado con 10% FBS libre de vesículas extracelulares y 1% P/S. Transcurridos 3 días se realiza la adición del estímulo con SSTN. Puesto que la viabilidad no se vio estadísticamente modificada por las concentraciones ni los tiempos, se decidió usar la concentración más alta al mayor tiempo, es decir, 10 μ M a 6 horas.

Análisis estadístico.

Para comprobar si nuestro experimentos tras realizar 3 réplicas técnicas son estadísticamente significativas se recurre a la herramienta de análisis de datos de Excel en la que escogemos la opción de realizar la *T de student*. Estos datos se comprobaron también en el programa de estadística Prism (GraphPad, Estados unidos) donde se realizaron los histogramas que aparecen en las figuras de este trabajo.

5. RESULTADOS

Proliferación en T/C y OVCA en presencia de bestatin

La bestatin es un dipéptido conocido por su uso en terapia antitumoral debido a la capacidad de impedir y reducir el crecimiento de ciertos tumores como el de ovario (Terauchi *et al.*, 2007). En este trabajo la intención es comprobar que esta acción se puede deber a la capacidad de la bestatin de producir senescencia en diferentes tipos celulares. La pérdida de la capacidad proliferativa es una característica de la senescencia. Para observar este efecto se decidió probar en 2 líneas celulares los T/C y las OVCA. Los primeros al ser una línea de condrocitos, derivados directos de hMSC de las cuales estudios previos del laboratorio observaron un efecto senescente con el tratamiento con bestatin. La segunda línea celular es de células epiteliales que provienen de cáncer de ovario donde se quiere determinar si el proceso de inhibición tumoral está relacionado con la entrada de las células en senescencia.

Tras llevar a cabo los cultivos, a los tiempos y concentraciones del tratamiento siguiendo lo indicado en la **Figura 7** y la **Figura 8**, se obtuvieron para el cristal violeta los siguientes resultados que se pueden observar en las **Figura 11** y **12**. Tanto en T/C como OVCA a los 3 días de tratamiento apenas se observan diferencias en la proliferación con el control (**Figura 11**), mientras que a los 6 días de tratamiento si se observa un decrecimiento en la tinción de cristal violeta en las diferentes concentraciones de bestatin para ambas líneas celulares (**Figura 12**).

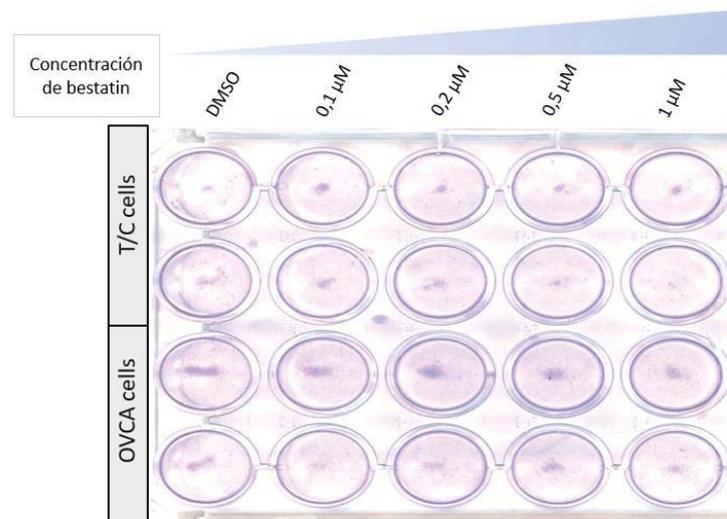


Figura 11. Imagen representativa de un experimento obtenida tras la fijación y tinción con cristal violeta de las células a 3 días con el tratamiento.

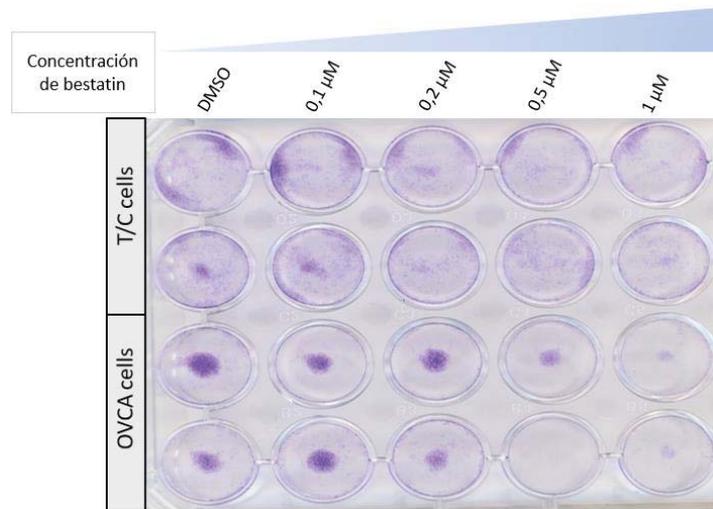


Figura 12. Imagen representativa de un experimento obtenida tras la fijación y tinción con cristal violeta de las células a 6 días con el tratamiento.

Los resultados de absorbancia normalizados obtenidos se sometieron a análisis estadístico para conocer si hay una disminución de la proliferación estadísticamente significativa. En las gráficas de la **Figura 13A y 13B** observamos que para 3 días de tratamiento no hay cambios en la proliferación de T/C y OVCA. Sin embargo, al realizar el análisis a 6 días de tratamiento con bestatin obtuvimos un valor estadísticamente significativo en la reducción de la proliferación en concentraciones de 0,5 μM y 1 μM para la línea de T/C (**Figura 13C**) y en 1 μM para la línea de OVCA (**Figura 13D**).

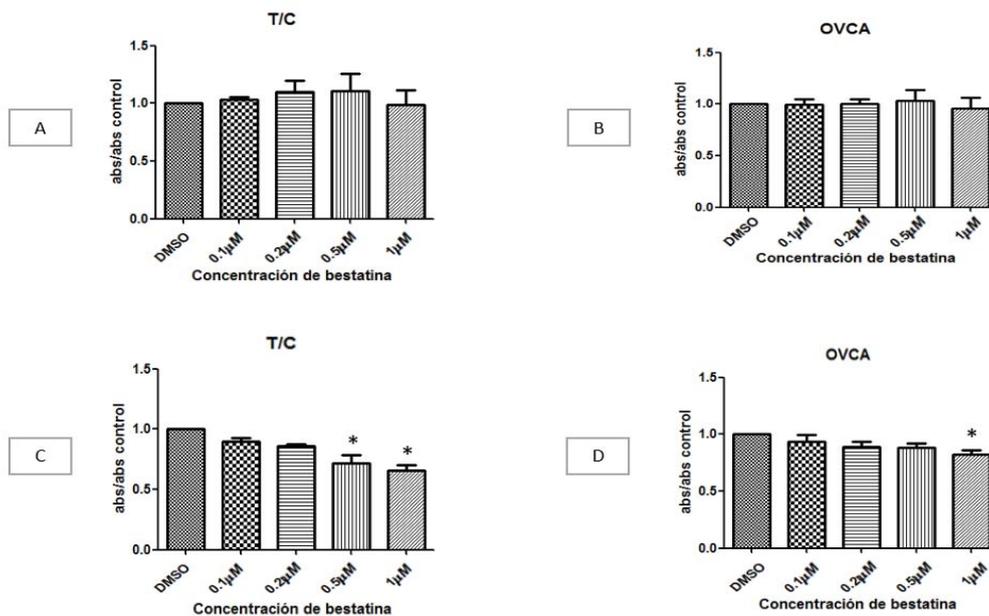


Figura 13. Gráfica que representa la cuantificación del cristal violeta. Se representa los valores de la media y desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con bestatin. **A y B** hacen referencia al tratamiento con bestatin a 3 días para T/C y OVCA respectivamente. **C y D** hacen referencia al tratamiento con bestatin a 6 días para T/C y OVCA respectivamente. * significa que el p valor es inferior a 0,5.

Evaluación de marcadores de senescencia y purinas

Conocidas las concentraciones que mostraron una pérdida de la capacidad de proliferación significativamente estadística se prosiguió con el siguiente experimento que consiste en ver la expresión a nivel proteico del marcador de senescencia p21, así como el marcador del metabolismo de las purinas PRPS1 en T/C y OVCA tratadas con 0,5 μ M y 1 μ M de bestatin durante 6 días. La vinculina se utiliza como proteína control ya que no se ve afectada por los estímulos empleados en este trabajo.

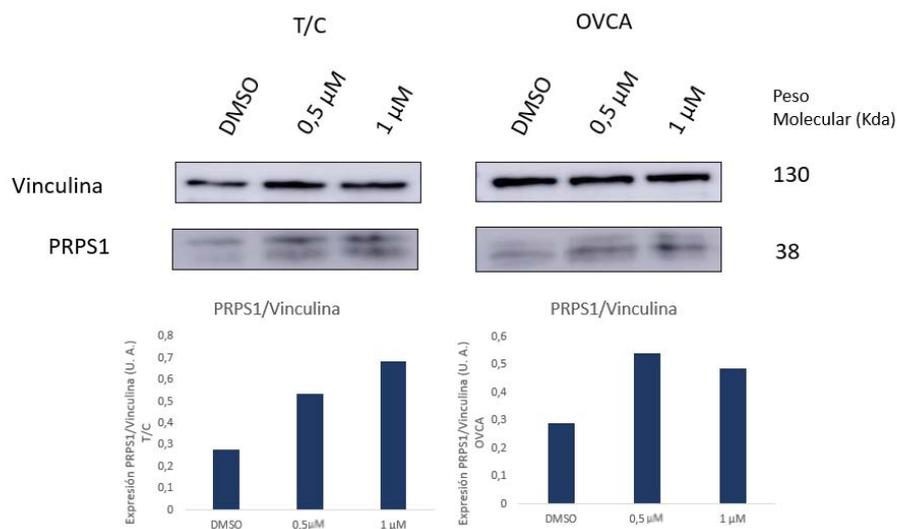


Figura 14. En la parte superior imágenes de las proteínas PRPS1 y vinculina tras el revelado. En la parte inferior está la gráfica de la densitometría de PRPS1 respecto a la proteína control vinculina. Derecha línea celular OVCA. Izquierda T/C. U.A. Unidades Arbitrarias. Resultados obtenidos de un experimento.

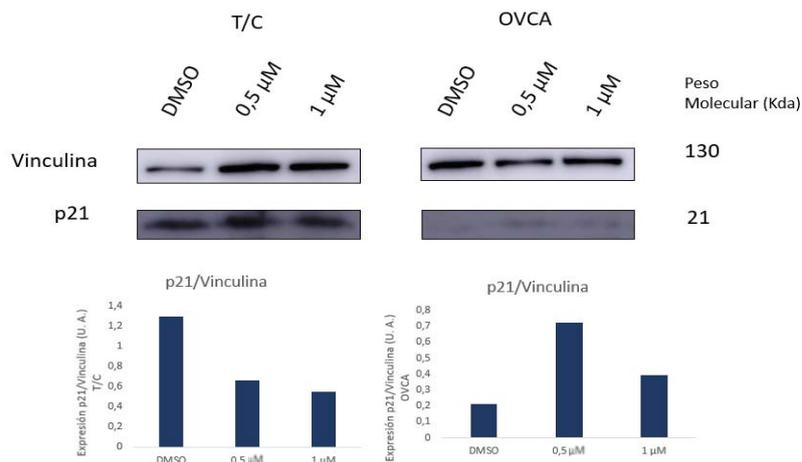


Figura 15. Imagen de la proteínas p21 y vinculina tras el revelado. En la parte inferior está la gráfica de la densitometría de p21 respecto a la proteína control vinculina. Derecha línea celular OVCA. Izquierda T/C.

En la gráfica de la figura 14 vemos como PRPS1 se ve aumentado respecto al control con DMSO tanto en la línea de T/C como OVCA a concentraciones de 0,5 μM y 1 μM de bestatin después de 6 días de tratamiento. Por otro lado, en la figura 15 p21 se ve disminuido a estas concentraciones en T/C mientras que se ve aumentado en OVCA.

Viabilidad del inhibidor de syndecan-1, SSTN en hMSC

El péptido SSTN inhibidor de syndecan-1, es un compuesto bastante novedoso, el artículo de (Beauvais *et al.*, 2009) menciona como desarrolló el péptido y las concentraciones usadas que rondaban entre 0,5 y 3 μM en células de carcinoma mamario humano.

Se quiso comprobar los efectos de este inhibidor en un tipo de células como son las hMSC para conocer cómo puede afectar en células que no sufran una patología a diferencia de las células de la literatura de la que disponemos. Como no hay nada descrito sobre hMSC primeramente fue necesario buscar una concentración y tiempo que no afectase la viabilidad de las células. Tras realizar el tratamiento se hizo el cristal violeta. obteniendo los resultados de la **Figura 16**.

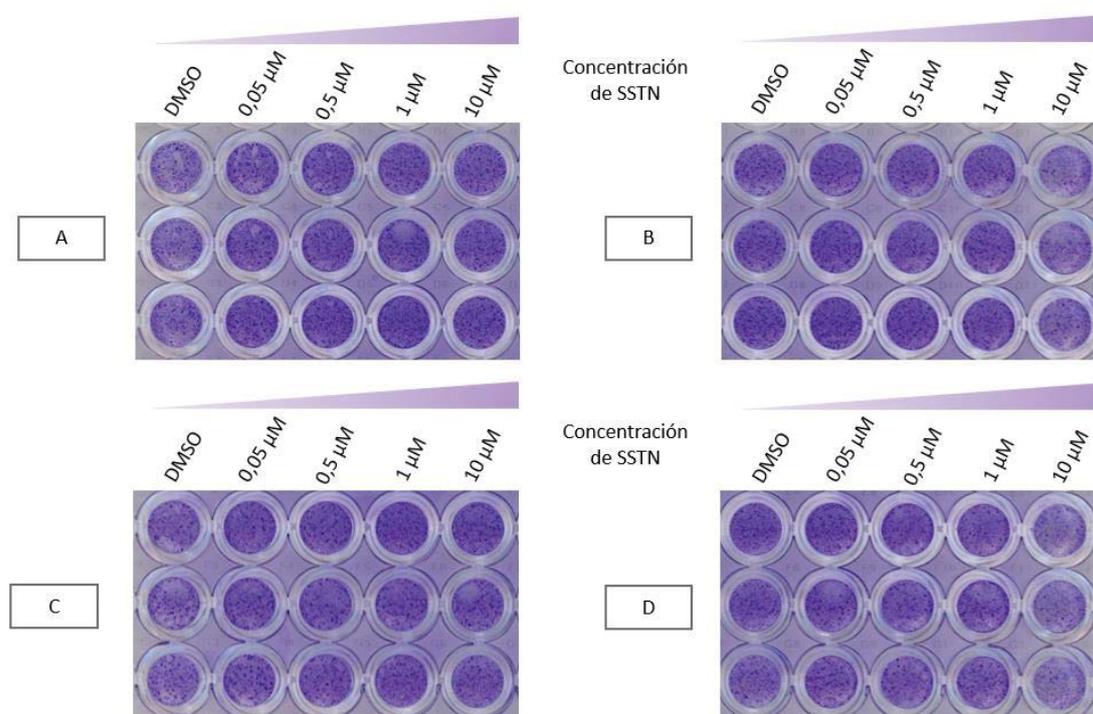


Figura 16. Imágenes representativas de un experimento de cristal violeta obtenida tras el tratamiento con SSTN a diferentes concentraciones y tiempos en la prueba de viabilidad. (A) 1 hora, (B) 2 horas, (C) 5 horas, (D) 6 horas. Se realizaron tres experimentos independientes.

El experimento se hizo por triplicado para poder realizar un análisis estadístico. Tras disolver y cuantificar el cristal violeta, los datos obtenidos se normalizaron frente al control con

DMSO. El resultado obtenido se sometió a un análisis estadístico donde se comprobó que para cada uno de los tiempos y concentraciones no había diferencias significativas con el control (**Figura 17**).

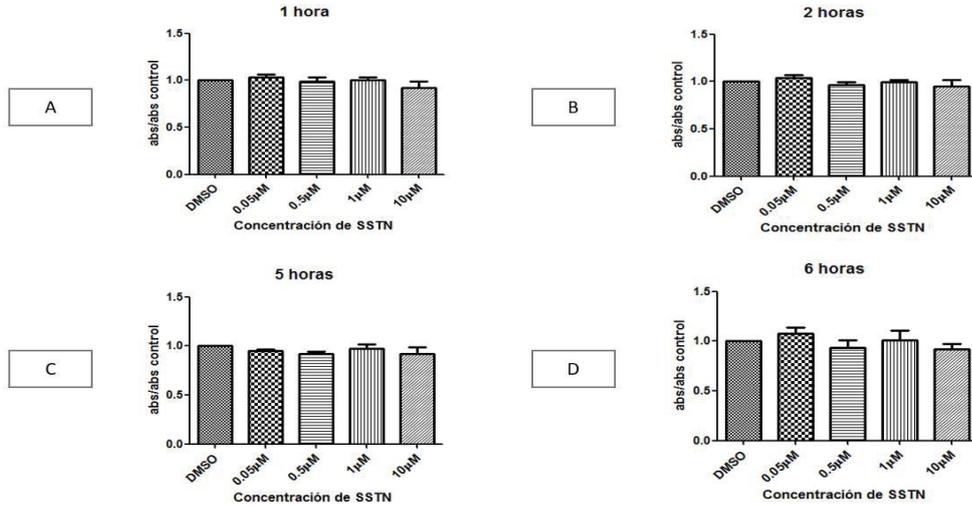


Figura 17. Gráficas que representan la cuantificación del cristal violeta. Se representa los valores de la media y desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con SSTN. (A) 1 hora, (B) 2 horas, (C) 5 horas, (D) 6 horas.

Además de comprobar la viabilidad con el cristal violeta se validaron estos resultados utilizando el kit comercial *Cell Counting kit 8*, que evalúa la actividad metabólica de las células, para el que se obtuvieron las gráficas de la **Figura 18**.

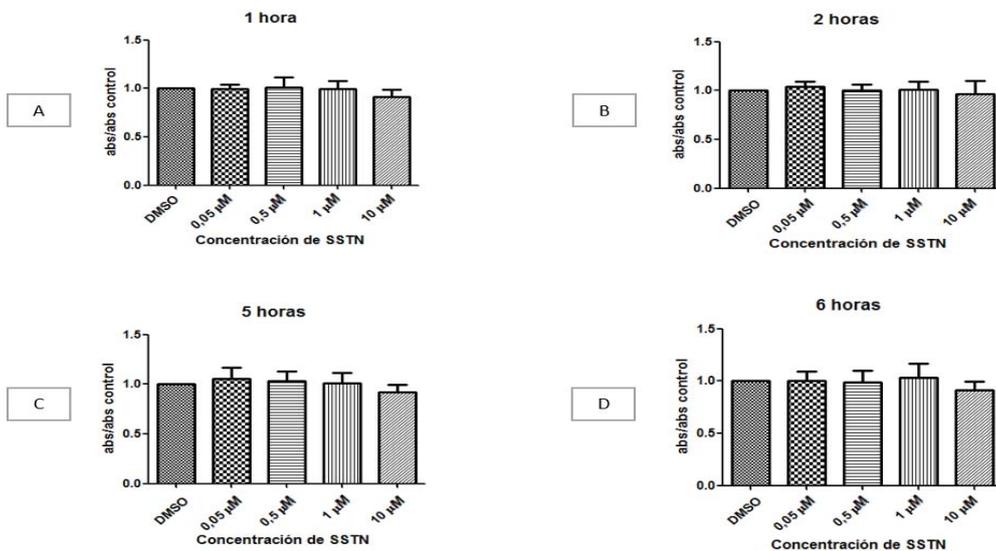


Figura 18. Gráficas que representan la cuantificación del *Cell Counting*. Se representa los valores de la media y desviación estándar obtenidos con los valores normalizados de los 3 experimentos independientes realizados con SSTN. (A) 1 hora, (B) 2 horas, (C) 5 horas, (D) 6 horas.

Una vez probamos el efecto de la SSTN sobre las células, nuestro siguiente experimento consistió en comprobar si la adición de la SSTN bloquea la interacción de SDC-1 con el mir-21. Para ello se sobreexpresó el mir-21 en las hMSC mediante una transfección transitoria por medio de liposomas que contengan el mimic del mir-21 y un mimic usado como control negativo.

Se procedió a la extracción de ARNm y a la síntesis de ADNc para evaluar la expresión del mir-21 mediante qPCR para confirmar la sobre-expresión en las hMSC empleando como control interno U6. No se obtuvo expresión del mir-21 ni del control interno U6 en las muestras a estudio.

Por lo tanto, se realizó una evaluación de la integridad del ARN empleando un gel de agarosa. En la imagen no se observaron las bandas de integridad del ARN debido a que la concentración de ARN es muy baja (**Figura 19**).

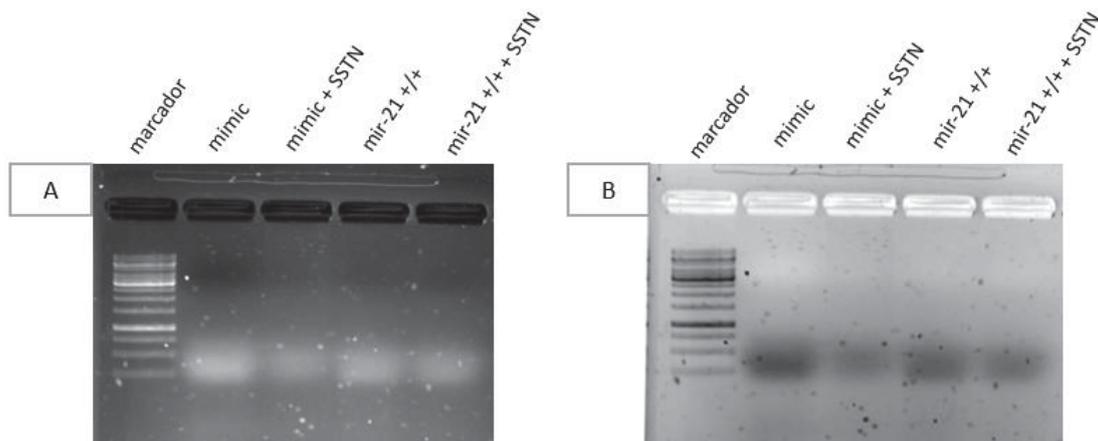


Figura 19. Imagen obtenida tras la exposición a luz ultravioleta del gel de agarosa. Apenas podemos ver la banda que corresponde a nuestro ARN. La imagen B es una imagen en negativo de la imagen A.

6. DISCUSIÓN

Gracias a los avances en ciencia y medicina la esperanza de vida se ha incrementado, provocando que la población esté cada vez más envejecida. Este envejecimiento suele llevar asociado enfermedades crónicas tales como las que mencionamos en el apartado de introducción la diabetes tipo 2, aterosclerosis, hipertensión entre otras. Todo esto disminuye la calidad de vida de las personas y supone un mayor coste para la sanidad.

En los últimos años han aumentado el número de estudios que tratan de entender el proceso de envejecimiento. Dicho aumento tiene el objetivo de desarrollar nuevas terapias contra enfermedades asociadas a la edad, mejorando la calidad de vida de las personas y reduciendo los costes de los tratamientos actuales. Como se ha tratado a lo largo de esta memoria, la inflamación persistente, o *inflamm-aging*, que se da en los organismos causa un estrés y acaba siendo perjudicial para la salud. Esta inflamación está vinculada tanto al aumento de las células senescentes como a la respuesta inflamatoria incompleta que ocurre a edades avanzadas. Por tanto, el estudio y regulación de células senescentes es una parte importante en el proceso de entender el envejecimiento y en este trabajo se buscaba aportar nuevas rutas metabólicas implicadas en los procesos de senescencia celular e inflamación y darle uso como terapias celulares.

Por un lado, el grupo ha descubierto que la ruta de las purinas se ve afectada por la regulación de la metaloproteasa CD13 (Kis *et al.*, 2021). La inhibición de dicha proteína por parte de la bestatin es conocida en el mundo de la biomedicina por su capacidad antitumoral (Terauchi *et al.*, 2007). Sin embargo, no se conoce con precisión que lleva a las células a disminuir su proliferación. Por lo que en este trabajo se propone a la bestatin como un inductor de senescencia, el producir senescencia en células tumorales impide su expansión, facilitando que el sistema inmune reaccione frente al tumor y mejorar así el pronóstico. Además, la inducción de senescencia mediante bestatin podría corroborar datos publicados por nuestro grupo donde se observó que existe una disminución del metabolismo de las purinas en un modelo de envejecimiento prematuro (Materos *et al.*, 2018) e indicarnos que la inhibición de dicha ruta puede verse afectada con la edad haciendo que las células se vuelvan senescentes y tengan un fenotipo más inflamatorio.

Comprobamos que tanto los condrocitos como las células epiteliales de cáncer de ovario sufren una disminución de su proliferación cuando añadimos la bestatin a los 6 días, sin embargo, a 3 días no fue posible ver esta disminución. Esto podría indicarnos que es

necesaria una inhibición continua en el tiempo para que se llegue a producir la inhibición de la ruta, o que no se dio el tiempo necesario para que las células creciesen de forma natural y observar las diferencias entre las células tratadas y el control. Con la proliferación no podemos asegurarnos que ocurra senescencia ya que puede ser que únicamente estemos inhibiendo el ciclo celular y este se pueda recuperar de forma normal una vez se deje de estimular con el inhibidor peptídico.

A priori, lo que pudimos observar es que la ruta de las purinas se ve modificada por el aumento de expresión en PRPS1 en ambas líneas celulares tratadas con bestatin como posible efecto de compensación tras la inhibición de la actividad CD13. Sin embargo, el marcador de senescencia p21 solo se vio aumentado en la línea OVCA. Únicamente se realizó un experimento en el que cuantificamos las proteínas por lo que no se puede confirmar que las líneas celulares entrasen en un estado de senescencia. Es necesario aumentar el número de experimentos y evaluar más marcadores de senescencia e inflamación para poder determinar que existe una variabilidad tanto en marcadores de senescencia como en marcadores de inflamación que nos confirmen que han entrado en dicho estado una vez las líneas celulares son tratadas con la bestatin. Además, estos estudios proteicos deberían ser acompañados de estudios cuantitativos del ARNm celular para validar los resultados de inducción de senescencia. En definitiva, solo se puede confirmar el arresto de proliferación tras el tratamiento con bestatin a las concentraciones de $0,5\mu\text{M}$ y $1\mu\text{M}$ en T/C y OVCA respectivamente.

Por otro lado, tenemos el péptido SSTN, diseñado hace unos años por el grupo de C. Rapraeger (Beauvais *et al.*, 2009) con el fin de bloquear SDC-1 específicamente al ser homólogo a parte de la secuencia de este receptor. Primeramente, se comprobó la viabilidad celular en presencia del péptido y se comprobó que no está afectado estadísticamente independientemente de las concentraciones y tiempos estudiados. Esta información se usará para los siguientes experimentos, ya que podremos usar la concentración y el tiempo más alto probado. Esta línea de investigación todavía se está empezando a desarrollar, pero lo que ya sabemos por resultados previos proteómicos cuantitativos del grupo, no publicados todavía, es que con la sobreexpresión de mir-21, aumenta la cantidad de SDC-1 expresada en las células hMSC y que esto hace que aumente la cantidad de marcadores asociados a senescencia e inflamación.

En el experimento desarrollado para determinar la relación directa del mir-21 y SDC-1, empleando hMSC que sobreexpresen mir-21 no se obtuvo ARN suficiente. La integridad del ARN no pudo ser determinada en el gel de agarosa por las bajas concentraciones de ARN.

En conclusión, se necesita continuar repitiendo experimentos y así poder determinar la inducción de senescencia por bestain en T/C y OVCA. Además, obtener una cantidad e integridad adecuada de ARN para los estudios genéticos y desvelar la relación entre mir-21 y SDC-1 en la transmisión de la senescencia y respuesta inflamatoria en el organismo.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos previstos y tras el desarrollo experimental y análisis de los resultados se puede concluir que:

- La proliferación de las líneas celulares de condrocitos (T/C) y epiteliales de cáncer de ovario (OVCA) disminuye tras el tratamiento durante 6 días con el inhibidor de la ruta de las purinas bestatin a las concentraciones de 0.5 μ M y 1 μ M respectivamente.
- Se validó el incremento de la expresión del marcador de senescencia CDKN1A (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A) en células epiteliales de cáncer de ovario OVCA.
- Se comprobó que la synstatin no afecta la viabilidad de las células madre mesenquimales a diferentes concentraciones (0,05 μ M, 0,5 μ M, 1 μ M, 10 μ M) y tiempos de estimulación (1, 2, 5, 6 horas).

Sin embargo, en este estudio no se lograron cumplir todos los objetivos marcados al comienzo:

- No se logró establecer la senescencia en las líneas celulares de condrocitos (T/C) y cáncer de ovario epitelial (OVCA) debido a la falta de réplicas biológicas.
- No pudo determinarse el papel de syndecan-1 en el proceso inflamatorio a través de la vía de mir-21 ya que la concentración e integridad de ARNm extraído no fue óptima para desarrollar el estudio genotípico de marcadores asociados con inflamación y senescencia.

En el futuro se continuarán repitiendo experimentos para validar la senescencia asociada a la ruta de las purinas en estas líneas celulares e incluso otras. Respecto al último objetivo será necesario mejorar la extracción del ARNm para los estudios genotípicos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adam, T. (2005). Purine de novo synthesis - Mechanisms and clinical implications. *Klinicka Biochemie a Metabolismus*, 13(4), 177–181.
- Alberro, A., Iribarren-Lopez, A., Sáenz-Cuesta, M., Matheu, A., Vergara, I., & Otaegui, D. (2021). Inflammaging markers characteristic of advanced age show similar levels with frailty and dependency. *Scientific Reports*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83991-7>
- Arufe, M. C., de la Fuente, A., Fuentes, I., De Toro, F. J., & Blanco, F. J. (2011). Umbilical cord as a mesenchymal stem cell source for treating joint pathologies. *World Journal of Orthopedics*, 2(6), 43–50. <https://doi.org/10.5312/wjo.v2.i6.43>
- Beauvais, D. M., Ell, B. J., McWhorter, A. R., & Rapraeger, A. C. (2009). Syndecan-1 regulates α v β 3 and α v β 5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. *Journal of Experimental Medicine*, 206(3), 691–705. <https://doi.org/10.1084/jem.20081278>
- 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’Loughlen, 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>
- Boss, G. R. (1984). Decreased phosphoribosylpyrophosphate as the basis for decreased purine synthesis during amino acid starvation of human lymphoblast. *Journal of Biological Chemistry*, 259(5), 2936–2941. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(17\)43239-x](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(17)43239-x)
- de Oliveira Neto, L., Tavares, V. D. de O., Agrícola, P. M. D., de Oliveira, L. P., Sales, M. C., de Sena-Evangelista, K. C. M., Gomes, I. C., Galvão-Coelho, N. L., Pedrosa, L. F. C., & Lima, K. C. (2021). Factors associated with inflamm-aging in institutionalized older people. *Scientific Reports*, 11(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97225-3>
- Del Giudice, G., Goronzy, J. J., Grubeck-Loebenstien, B., Lambert, P. H., Mrkvan, T., Stoddard, J. J., & Doherty, T. M. (2018). Fighting against a protean enemy: immunosenescence, vaccines, and healthy aging. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, 4(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41514-017-0020-0>
- Fafián-Labora, J. A., & O’Loughlen, A. (2021). NF- κ B/IKK activation by small extracellular vesicles within the SASP. *Aging Cell*, May, 1–16. <https://doi.org/10.1111/accel.13426>
- Fafián-Labora, J., Carpintero-Fernández, P., Jordan, S. J. D., Shikh-Bahaei, T., Abdullah, S. M., Mahenthiran, M., Rodríguez-Navarro, J. A., Niklison-Chirou, M. V., & O’Loughlen, A. (2019). FASN activity is important for the initial stages of the induction of senescence. *Cell Death and Disease*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1550-0>
- Franceschi, C., Garagnani, P., Vitale, G., Capri, M., & Salvioli, S. (2017). Inflammaging and ‘Garb-aging.’ *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 28(3), 199–212. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.09.005>
- Giner, M., Montoya, M. J., Vázquez, M. A., Miranda, C., Miranda, M. J., & Pérez-Cano, R. (2016). What are microRNAs? Potential biomarkers and therapeutic targets in osteoporosis. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 8(1), 40–44. <https://doi.org/10.4321/s1889-836x2016000100007>
- Kis, A., Dénes, N., Szabó, J. P., Arató, V., Beke, L., Matolay, O., Enyedi, K. N., Méhes, G., Mező, G., Bai, P., Kertész, I., & Trencsényi, G. (2021). In Vivo Molecular Imaging of the Efficacy of Aminopeptidase N (APN/CD13) Receptor Inhibitor Treatment on Experimental Tumors Using 68Ga-NODAGA-c(NGR) Peptide. *BioMed Research International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/6642973>
- Lee, B. C., & Yu, K. R. (2020). Impact of mesenchymal stem cell senescence on inflammaging. *BMB Reports*, 53(2), 65–73. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2020.53.2.291>
- Mateos, J., Fafián-Labora, J., Morente-López, M., Lesende-Rodríguez, I., Monserrat, L., Ódena, M. A., De Oliveira, E., De Toro, J., & Arufe, M. C. (2018). Next-Generation Sequencing and Quantitative Proteomics of Hutchinson- Gilford progeria syndrome-derived cells point to a role of nucleotide metabolism in premature aging. *PLoS ONE*, 13(10), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205878>

- 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*, 72(3), 557–581. <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1762-5>
- Sanada, F., Taniyama, Y., Muratsu, J., Otsu, R., Shimizu, H., Rakugi, H., & Morishita, R. (2018). Source of Chronic Inflammation in Aging. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 5(February), 1–5. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00012>
- Sheedy, F. J. (2015). Turning 21: Induction of miR-21 as a key switch in the inflammatory response. *Frontiers in Immunology*, 6(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00019>
- Teng, Y. H. F., Aquino, R. S., & Park, P. W. (2012). Molecular functions of syndecan-1 in disease. *Matrix Biology*, 31(1), 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2011.10.001>
- Terauchi, M., Kajiyama, H., Shibata, K., Ino, K., Nawa, A., Mizutani, S., & Kikkawa, F. (2007). Inhibition of APN/CD13 leads to suppressed progressive potential in ovarian carcinoma cells. *BMC Cancer*, 7, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-7-140>
- 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*, 20(6), 1641–1647. <https://doi.org/10.31557/APJCP.2019.20.6.1641>
- Uetz, P., & Finley, R. L. (2005). From protein networks to biological systems. *FEBS Letters*, 579(8), 1821–1827. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.02.001>
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: Naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 17(3), 155–169. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.28>