Universidad de Valparaíso.
Facultad de Farmacia.
Escuela de Química y Farmacia

EFECTO DEL PRE-ACONDICIONAMIENTO DE CELULAS MADRE MESENQUIMALES CON RAPAMICINA Y METFORMINA SOBRE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA *IN VITRO* E *IN VIVO* EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITIS REUMATOIDE.

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

CHRISTIAN EDUARDO DÍAZ ESCOBAR

Director de Tesis: Flavio Carrión A.
Co-Director de Tesis: Caroline Weinstein O.

2015

Índice

Resumen 4

Summary 5

Introducción 7

Artritis Reumatoide 7

Célula Madre Mesenquimal. 9

Caracterización de MSCs. 11

Efecto inmunomodulador. 12

Mecanismo de Inmunomodulación. 14

Aplicaciones y desafíos. 15

Rapamicina. 17

Metformina. 19

Hipótesis. 21

Objetivos. 22

Objetivo General 22

Objetivos Específicos 22

Materiales y Métodos. 23

1. Cultivo y Caracterización. 23
2. Pre-acondicionamiento de MSCs. 25
3. Efecto inmunomodulador de las MSCs y MSCs pre-acondicionadas 26
4. Efecto sobre la expresión de genes mediante técnica real time PCR 31
5. Modelo *in vivo* de AR. 34
6. Efecto del estado de fosforilación de S6K1 mediante Western Blot. 36

7. Análisis estadístico. 38

Resultados 39

1. Caracterización de MSCs murinas extraídas desde medula ósea. 39

2. Evaluación de la capacidad inmunosupresora de las MSCs. 41

3. Efecto del pre-acondicionamiento de MSCs. 42

4. Determinación de la concentración de nitritos en sobrenadantes de ensayos de co-cultivo. 45

5. Determinación de la capacidad inmunosupresora de MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL y Metformina 5 µM. 47

6. Determinación de la expresión de genes relacionados con la capacidad inmunosupresora de las MSCs. 48

7. Determinación del estado de fosforilación de la vía de señalización mTOR en células MSCs pre-acondicionadas. 50

8. Artritis inducida por colágeno. 52

Discusión 56

Conclusiones 60

Bibliografía. 61

Anexos. 69

Resumen

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad sistémica autoinmune de etiología desconocida de curso progresivo, la cual conduce a un daño articular irreversible. Una novedosa estrategia terapéutica es la terapia con Células Madre Mesenquimales (MSCs). Estas células poseen un potente efecto inmunosupresor, aunque algunos estudios muestran resultados controversiales *in vivo.* Investigaciones recientes han propuesto que el pre-acondicionamiento con compuestos bioactivos, modulan este efecto. Akt/mTOR es una vía de señalización que regula aspectos importantes del metabolismo celular y es sensible a la inhibición por Rapamicina. En MSCs se ha demostrado que el bloqueo de Akt/mTOR por largo plazo, previene un fenotipo senescente, manteniendo alta clonogenicidad y bajo daño celular, sin embargo, se desconoce el efecto que pueda tener el bloqueo a tiempos cortos con Rapamicina. En este trabajo se demostró que el bloqueo, durante una hora con Rapamicina a 50 ng/mL, mejora el efecto inmunosupresor de las MSCs *in vitro*. No obstante, luego de la infusión *in vivo* en un modelo de Artritis inducida por colágeno (CIA), no se observo una mejora clínica de la enfermedad. En contraste, el pre-acondicionamiento durante una hora con Metformina a 5 µM, otro agente de bloqueo Akt/mTOR, no aumenta el efecto inmunosupresor *in vitro*, pero si induce una mejoría significativa de la enfermedad. Estos resultados proveen evidencia de que el ambiente pro-inflamatorio puede modificar el efecto observado *in vitro* y demuestra que el bloqueo a corto plazo con Metformina es suficiente para inducir un aumento de la capacidad inmunosupresora de las MSCs *in vivo*.

Summary

PRE-CONDITIONING EFFECT OF MESENCHYMAL STEM CELLS, WITH RAPAMYCIN AND METFORMIN ON THEIR IMMUNOSSUPPRESIVE CAPACITY, EVALUATED *IN VITRO* AND *IN VIVO* IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF RHEUMATOID ARTHRITIS.

The Rheumatoid Arthritis (RA) is a systemic autoimmune disease of unknown etiology; the course is progressive and finally leads to irreversible joint damage. A novel therapeutic strategy for RA is cell therapy. Mesenchymal stem cells (MSCs) are capable to produce an immunosuppressive effect; although some studies show paradoxical results after infusion *in vivo*, latest researches have proposed pre-conditioning with bioactive compounds modulate this effect. Akt/mTOR is a pathway that regulates temporal aspects of cell growth, ribosome biogenesis and autophagic process and is sensitive to be inhibited by Rapamycin. In MSCs it has been demonstrated long term blocking Akt/mTOR pathway prevents the development of an age related phenotype, with high clonogenic frequency and lower DNA damage by the reduction in the production of cytoplasmic reactive oxygen species. Here we demonstrate that short term blocking Akt/mTOR pathways with Rapamycin 50 ng/mL during one hour, enhance immunosuppressive effect of MSCs *in vitro*, this preconditioning does not increase de release of nitric oxide as an immunosuppressive mechanism and neither improved mean clinical signs after infusion in a model of RA induced by collagen (CIA). However, Metformin 5 µM pre-conditioning, other blocking agent of Akt/mTOR pathway does not enhance immunosuppressive effect *in vitro,* but improve mean clinical signal. These results provide evidence that the *in vivo* environment can change MSCs effect observed *in vitro* and raise the hypothesis that short

term blocking is not enough to establish an immunosuppressive effect, lasting after infusion *in vivo*.

Introducción

Artritis Reumatoide

Es una enfermedad sistémica inflamatoria autoinmune de etiología desconocida, que afecta principalmente las articulaciones. En la mayoría de los casos el curso es progresivo y conduce al daño articular irreversible [1]. En Individuos genéticamente susceptibles, factores del medioambiente pueden activar reacciones inmunes patogénicas y también linfocitos CD4+ los que estarían implicados en la patogénesis de Artritis Reumatoide (AR), en particular, el linfocito T *helper* 1 (Th1) productor de IFN-γ y linfocito T *helper* 17 (Th17) productor de IL-17, que promueven la inflamación sinovial y la formación de osteoclastos que con el tiempo conducirá a la destrucción de las articulaciones [2]. Eventos adicionales como traumas o infecciones pueden contribuir al desarrollo de la enfermedad por reacciones inmunes focales en las articulaciones, resultando una inflamación [3]. Si la inflamación se vuelve crónica, el fenotipo podría cumplir con los criterios para AR establecidos por la *American Rheumatism Association* [4], criterios que también fueron tomados por la guía clínica de Artritis Reumatoide del ministerio de salud del gobierno de Chile (Tabla 1). No existen datos epidemiológicos que determinen la incidencia y prevalencia de la AR en Chile, sin embargo no hay razones que hagan suponer que Chile tenga características epidemiológicas diferentes al resto del mundo[5]. Por lo tanto, según la información disponible y extrapolada con los datos del Censo del año 2002, entre los hombres se espera que existan entre 1.700 a 5.200 nuevos casos cada año y en las mujeres entre 2.700 y 9.900 nuevos casos cada año [6,7]. El único estudio a nivel poblacional realizado en Chile estimó la prevalencia de la enfermedad en 0,46% [8]. Considerando estos últimos valores y población del censo del año 2002, ello implicaría que el número de individuos con AR en Chile estaría entre 27.000 y 90.000 pacientes [5]. La enfermedad afecta de manera predominante a las mujeres y se ha reportado una relación de 3 y hasta 8 veces más frecuente en las mujeres que en los hombres [9]. Del total de los pacientes que padecen de AR, entre 60 al 90% tienen una evolución clínica de deterioro progresivo [10] y de aquellos pacientes que tienen trabajo remunerado al inicio de la AR,

10% de ellos deja de trabajar dentro del primer año de inicio de la enfermedad y un 50% están incapacitados después de 10 años [11].

Tabla 1: Criterios diagnósticos para Artritis Reumatoide. Se dice que un paciente tiene Artritis Reumatoide si se reconoce al menos cuatro de estos criterios. Arnett FC *et al.* 1988.
1. Rigidez matutina presente por al menos 1 hora por 6 semanas
2. Al menos 3 áreas articulares simultáneamente con hinchazón de tejido blanco o fluidos, por 6 semanas.
3. Al menos una zona inflamada de la muñeca, articulación metacarpofalángica o articulación proximal interfalángica, por 6 semanas.
4. Participación simultánea de la misma área articular en ambos lados del cuerpo, por al menos 6 semanas.
5. Nódulos subcutáneos vistos por un doctor.
6. Examen Positivo para factor reumatoide.
7. Cambios radiográficos de mano y en la muñeca.

El desarrollo de drogas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes ha seguido cursos similares al entendimiento de sus mecanismos patogénicos (Figura 1)[12]. Los nuevos tratamientos en desarrollo para la AR apuntan a tres áreas principalmente: 1.citoquinas, 2.células y 3.vías de señalización. Células en sí mismas con función inmunosupresora, han sido desarrolladas como herramienta terapéutica, una de ellas son las Células Madre Mesenquimales (MSCs)[13].

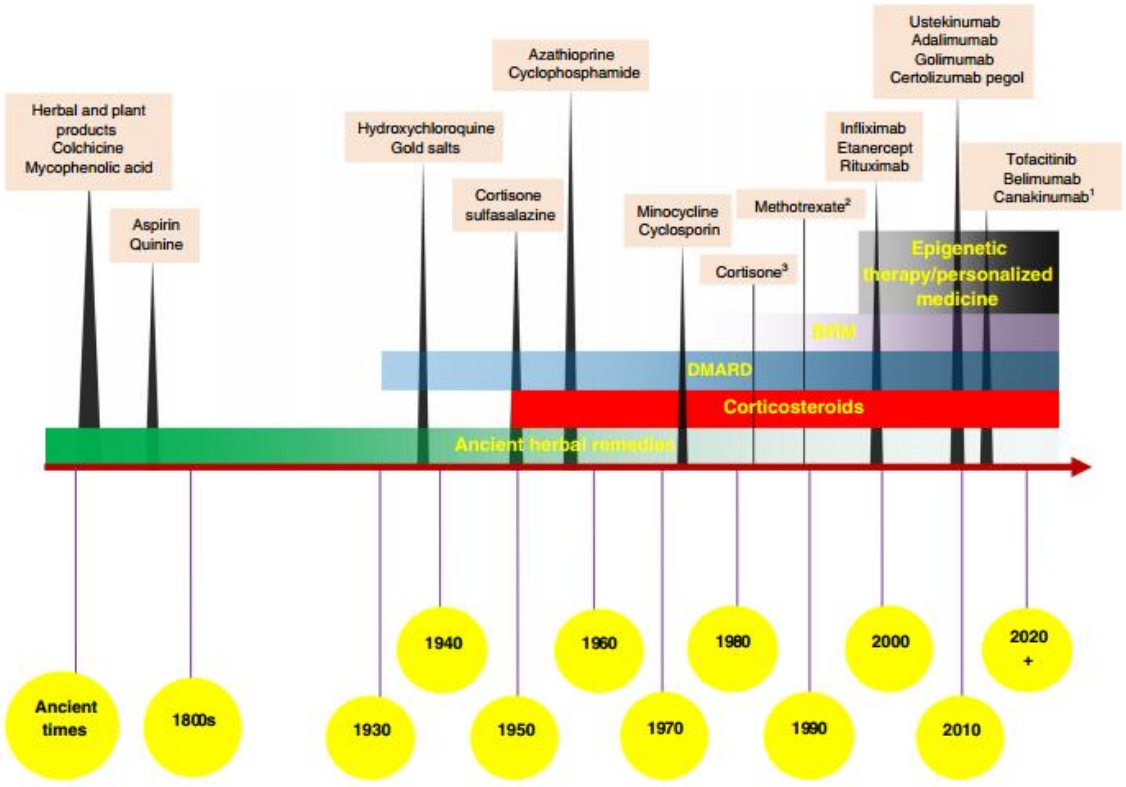


Figura 1: Línea de tiempo del descubrimiento de drogas para enfermedades autoinmunes. 1. Canakinumab fue aprobado para el uso de síndrome periódico asociado a criopirina. 2. Metotrexato ha sido conocido desde 1940, pero solo aprobado para el tratamiento de enfermedades autoinmunes en 1998. 3. El uso inicial de Ciclosporina fue en medicina de trasplantes; sus efectos inmunosupresores la han llevado a ser utilizados en el tratamiento de enfermedades autoinmunes. DMARD, fármacos antireumaticos modificadores de la enfermedad; BRM, modificadores de la respuesta biológica. Chang C. *et al* 2013.

Célula Madre Mesenquimal.

Es una célula progenitora multipotencial no hematopoyética, con capacidad de auto-renovación y capaz de diferenciarse hacia distintos tipos celulares (Figura 2)[14,15]. Tanto en etapas embrionarias como en etapas adultas, tienen por función la formación, reparación y renovación de tejido [16]. Las MSCs están presentes en la medula ósea, de donde pueden ser aisladas e inducidas a diferenciarse en adipocitos, osteocitos o condrocitos[17]. Sin embargo, también pueden obtenerse desde otros tejidos como la pulpa dental [18], sangre fetal [19] y tejido adiposo [20,21] entre otros. Las funciones fisiológicas de las MSCs son variadas, reconstituyen el microambiente hematopoyético favoreciendo la maduración, diferenciación y sobrevida de células sanguíneas nacientes

[22]. Además tienen un efecto inmunosupresor, incluso en etapas avanzadas de diferenciación en variados tipos celulares, lo que se traduce en un potente efecto inmunomodulador de gran interés científico y potencial clínico [23,24].Las MSCs, además son capaces de producir una variedad de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas [25]. Es probable que la expresión de estas citoquinas y quimioquinas jueguen un rol importante en la capacidad inmunomoduladora y en la quimiotaxis de las MSCs *in vivo* [26].

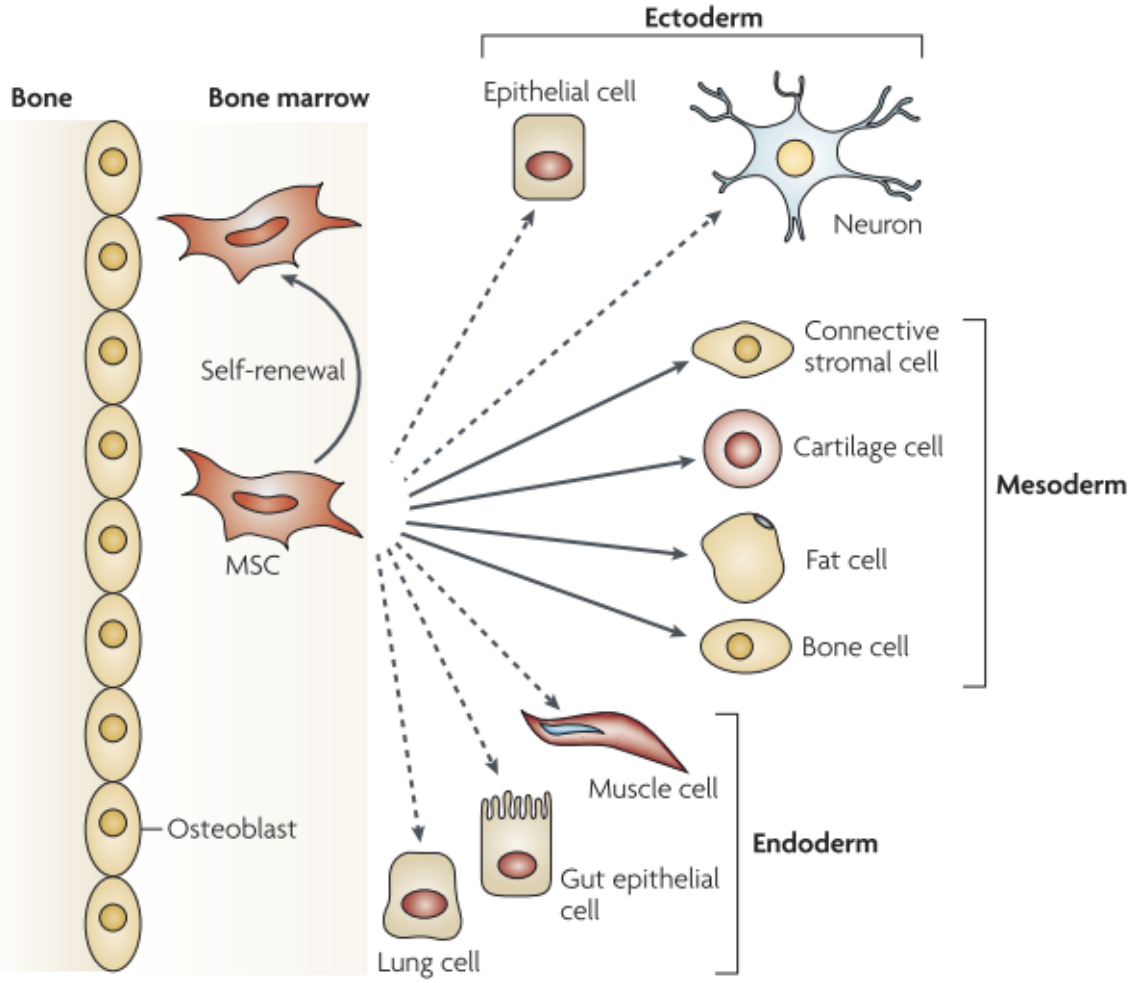


Figura 2: Esta figura muestra la habilidad de la Célula madre Mesenquimal (MSCs) en la cavidad de la médula espinal, para auto-renovarse (flecha curva) y para diferenciarse (Flechas continuas y rectas) a través del linaje mesodermo. El reporte de la habilidad para trans-diferenciarse en células de otros linajes (ectodermo y endodermo) es mostrado con líneas discontinúas, la trans-diferenciación es controversial *in vivo*. Ucelli *et al.* 2008.

Caracterización de MSCs.

Debido a su potencial terapéutico y al creciente interés científico, la Sociedad Internacional de Terapia Celular, estableció 3 criterios mínimos que definen a la MSCs, de origen humano, utilizadas en terapia celular como: 1. adherencia al plástico 2. Expresión de antígenos de membrana específicos y ausencia de marcadores hematopoyéticos y 3. diferenciación multipotencial (Tabla 2)[27].La expresión de marcadores específicos en MSCs en cultivo es variable según diferencias de especies, fuente de tejido y condiciones de cultivo [14].

Debido a su actividad inmunosupresora, las MSCs han sido utilizadas como tratamiento celular en diversas patologías autoinmunes y pro-inflamatorias, y tienen buena tolerancia al tratamiento debido a que expresan débilmente MHC clase I y no presentan MHC clase II, así como tampoco moléculas co-estimuladoras, por lo que son consideradas hipo-inmunogénicas [28]. Sin embargo, bajo algunos estímulos inflamatorios, las moléculas anteriormente mencionadas aumentan su expresión, lo que corrobora que la interacción con citoquinas pro-inflamatorias puede modificar la expresión de genes [29,30]. Así mismo ocurre con moléculas de adhesión que permiten la unión con las células progenitoras hematopoyéticas en su nicho. MSCs incubadas con linfocitos T de sangre periférica, han mostrado mayor unión con linfocitos activados que con linfocitos no activados [29], esta función es compatible con su capacidad para establecer interacciones adhesivas firmes con progenitores hematopoyéticos [23].

Tabla 2: Resumen de criterios de identificación MSCs humana. Dominici *et al.*2006		
1. Adherencia al plástico bajo condiciones de cultivo estándar.		
2. Fenotipo	Positivo(≥95% +) CD105 CD73 CD90	Negativo (≤2% +) CD45 CD34 CD14 o CD11b CD79α o CD19 HLA-DR
3. Diferenciación *in vitro* hacia: osteoblasto, adipocito y condrocito.(demostrada por tinción de cultivo celular *in vitro*)		

Efecto inmunomodulador.

Las MSCs tienen efectos sobre distintas células del sistema inmune (Figura 3). Su capacidad de disminuir la proliferación linfocitaria es dosis dependiente y se logra un mayor efecto cuando la exposición es en etapas tempranas del proceso de proliferación y maduración [31].

Cuando las MSCs hacen contacto con células T estimuladas por células dendríticas (DC) y linfocitos de sangre periférica se produce una reducción significativa, dosis dependiente en la proliferación de células T, tanto para linfocitos CD4+ como CD8+, ya sea debido al contacto célula-célula, como a factores solubles [32].

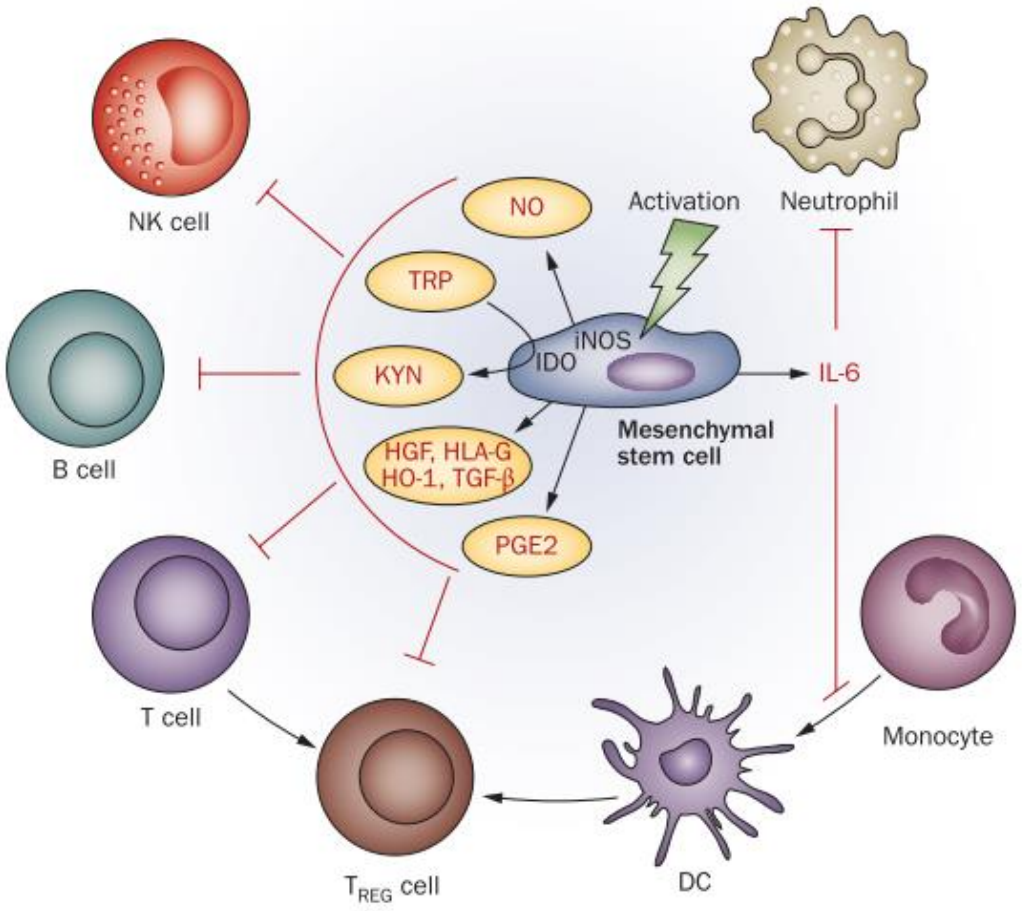


Figura 3.Ilustración esquemática de la interacción entre MSCs y células del sistema inmune. Después de la activación, MSCs inhiben la proliferación de células *natural killer* (NK), células B (B cell) y células T (T cell). Este efecto es mediado a través de la secreción de varios factores, como PGE_2 (prostaglandina 2), HGF (factor de crecimiento de hepatocitos), HLA-G (antígeno leucocitario humano-G)y TGF-β (factor de crecimiento transformante-β); la expresión de HO-1 (hemo oxigenasa); la producción de NO (oxido nítrico) por iNOS (oxido nítrico sintasa inducible) o la depleción de TRP (triptófano) en KYN (kynurenina) por IDO (indoleamina 2,3-dioxigensa). Secreción de IL-6 (interleuquina 6) puede estar involucrada en la inhibición de neutrofilos o prevenir la generación y maduración de células dendríticas (DC) desde monocitos. DC inmaduras podrían ser inducidas a la generación de células T reguladoras (Treg). Djouad F. *et al.* 2009.

Los efectos inmunomoduladores de las MSCs están fuertemente coordinados por factores del microambiente y pueden responder a citoquinas inflamatorias como IL-1β (producidas por monocitos) [33], IL-17 (producida por linfocitos Th17) [34] y más importante a interferón gamma (IFN-γ). El IFN-γ es capaz de aumentar la inmunosupresión ejercida por las MSCs, proceso conocido como licenciamiento [35].

Mecanismo de Inmunomodulación.

La modulación inmune por las MSCs, ocurre tanto por señales contacto dependiente como de factores solubles, en diferentes circunstancias [36]. La supresión de proliferación de células T es mediada por factores solubles, como por ejemplo: factor de crecimiento transformante (TGF-β), Kynurenina [37], Prostaglandinas E_2 (PGE_2) [36,38,39], Óxido Nítrico [40], productos de Hemo-Oxigenasa y proteína de unión del factor de crecimiento tipo insulina [36], entre otros [41].

Las prostaglandinas son uno de los factores implicados en la modulación de la actividad de células T [42] y en el proceso de inducción de linfocitos Treg [36]. MSCs humanas y murinas expresan constitutivamente la isoforma inducible de ciclooxigenasa (COX2) y la producción de PGE_2 aumenta después del co-cultivo de MSCs humanas con células mononucleares de sangre periférica [43]. La adición de inhibidores de prostaglandinas suprime sustancialmente la inmunosupresión mediada por MSCs [39]. Estos resultados sugieren que PGE_2 es una de las moléculas involucradas en el efecto inmunomodulador de MSCs [44].

La enzima indolamine 2, 3-dioxigenasa (IDO) es una enzima que cataliza la conversión de triptófano en Kynurenina. La expresión de IDO es inducida por IFN-γ en MSCs humanas y es responsable de una inhibición en la proliferación y un significativo aumento en la muerte de células T. Además de alterar la función de las DC [45], la depleción de triptófano también ha sido propuesto como mecanismo de inhibición de proliferación de células T [46,47].

En MSCs la inducción de la enzima Óxido Nítrico Sintasa Inducible (iNOS) está involucrada en la inhibición de proliferación de células T. Inhibidores de iNOS restituyen la proliferación de células T, lo que sugiere que el Oxido Nítrico (NO) producido por MSCs, es uno de los mediadores de la supresión en la proliferación de células T [40]. Investigaciones recientes demuestran que la vía de NO puede jugar un rol importante en los diferentes efectos inmunomoduladores de las MSCs, al contrario PGE_2 no estaría relacionada [48].

Aplicaciones y desafíos.

La investigación pre-clínica ha demostrado que las MSCs derivadas de médula ósea, tejido adiposo, tejido sinovial y el cordón umbilical, suprimen las funciones de diferentes células del sistema inmune, lo que plantea la posibilidad de nuevas terapias para las enfermedades autoinmunes incluyendo la AR [49]. Por ejemplo se ha demostrado que la administración de MSCs en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) suprime marcadamente la osteoclastogénesis según análisis histológico, estos datos sugieren que el reclutamiento de MSCs limita la destrucción inflamatoria en el área articular [50].

Las MSCs pueden ser un efectivo tratamiento en AR. La infusión sistémica de MSCs *in vivo*, reduce la severidad de CIA [51]. Las MSCs mejoraron significativamente los signos generales en torno a los 21 días después de recibir la inyección y desaparecieron por completo en el día 34 después del tratamiento en el mismo modelo animal [52].

A pesar de la evidencia de los potenciales usos terapéuticos y de los mecanismos moleculares descritos hasta el momento, la administración de MSCs en algunos modelos muestra resultados opuestos, dependiendo del estadio de la enfermedad (*in vivo)* y la razón entre MSCs:células efectoras (*in vitro)* [53-55]. Los datos que han sido publicados respecto al efecto terapéutico de las MSCs son contradictorios, algunos no demuestran efectos *in vivo* [56] o incluso muestran empeoramiento de los síntomas de la enfermedad [57,58] mientras que otros demuestran claros beneficios de la terapia celular con MSCs [51,59]. El avance de la terapia celular con MSCs está severamente limitado por la pobre sobrevida de las células implantadas [60].

Algunas drogas inmunosupresoras han sido utilizadas en el pre-acondicionamiento de MSCs con el objetivo de potenciar su efecto *in vivo* [61,62]. Además se ha demostrado que las MSCs pre-acondicionadas con citoquinas pro-inflamatorias logran un aumento en su capacidad inmunosupresora [35,63].

Por otro lado, el envejecimiento celular está asociado con la reducción en la capacidad auto-renovación y potencial de diferenciación de MSCs y estos cambios relacionados con

la edad son similares o incluso más pronunciados durante el cultivo de MSCs *in vitro [64]*. La reducción en el número y función de MSCs con la edad, puede ser asociada con la acumulación de daño celular [65,66].

El mayor desafío para el éxito del trasplante de células madre es mejorar la tasa de sobrevida de MSCs trasplantadas *in vivo* contra el ambiente perjudicial producido por condiciones patológicas específicas [67]. El receptor mamífero de Rapamicina (mTOR), ha sido postulado como un blanco farmacológico que regula la sobrevida de las MSCs y su efecto antiinflamatorio [60,64]. Estudios recientes han propuesto que la activación de mTOR promueve senescencia y sugieren que la vía de señalización de Akt/mTOR está asociada a una pérdida de quiescencia, envejecimiento prematuro y disminución del *pool* de MSCs auto-renovantes [68-71] (Figura 4). Por lo que la vía Akt/mTOR es una vía atractiva de pre-acondicionamiento de MSCs.

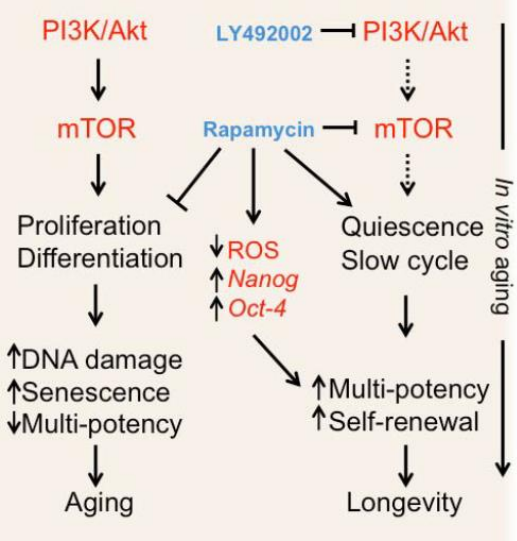


Figura 4 Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos sugeridos que participan en la prevención del envejecimiento MSCs por la inhibición de Akt/mTOR. El cultivo a largo plazo de MSC lleva a la pérdida de la auto-renovación y diferenciación, la acumulación de daño en el ADN y senescencia. La inhibición de las vías Akt/mTOR mantiene MSCs en quiescencia, regula la generación de ROS citoplasmática y la expresión de genes de pluripotencia. Esto se traduce en la promoción de la auto-renovación y el potencial de diferenciación de MSC que se pierde durante el envejecimiento. Gharibi *et al.* 2013.

Rapamicina.

La Rapamicina fue aislada a principios de los años 70 en una muestra de suelo obtenida en Isla de Pascua, Chile [72]. La Rapamicina es un fármaco con propiedades inmunosupresoras y anti-proliferativas, utilizado en prevención del rechazo de trasplante de riñón y en la enfermedad de injerto contra hospedero [73-75] y algunos cánceres [76]; y ejerce su acción mediante la inhibición de mTORC1.

El receptor de Rapamicina tiene importancia en la regulación de la proliferación celular [77] (Figura 5). La actividad inhibidora de Rapamicina se produce tras la formación del complejo Rapamicina-FKBP12. Los eventos que siguen rio abajo a la inactivación de mTOR resultan en el bloqueo de la progresión del ciclo celular entre la fase G1 y S[76]. Estudios en levaduras demuestran que mTOR tiene dos funciones esenciales: regular cuándo y dónde las células proliferan, según las condiciones del microambiente [78].

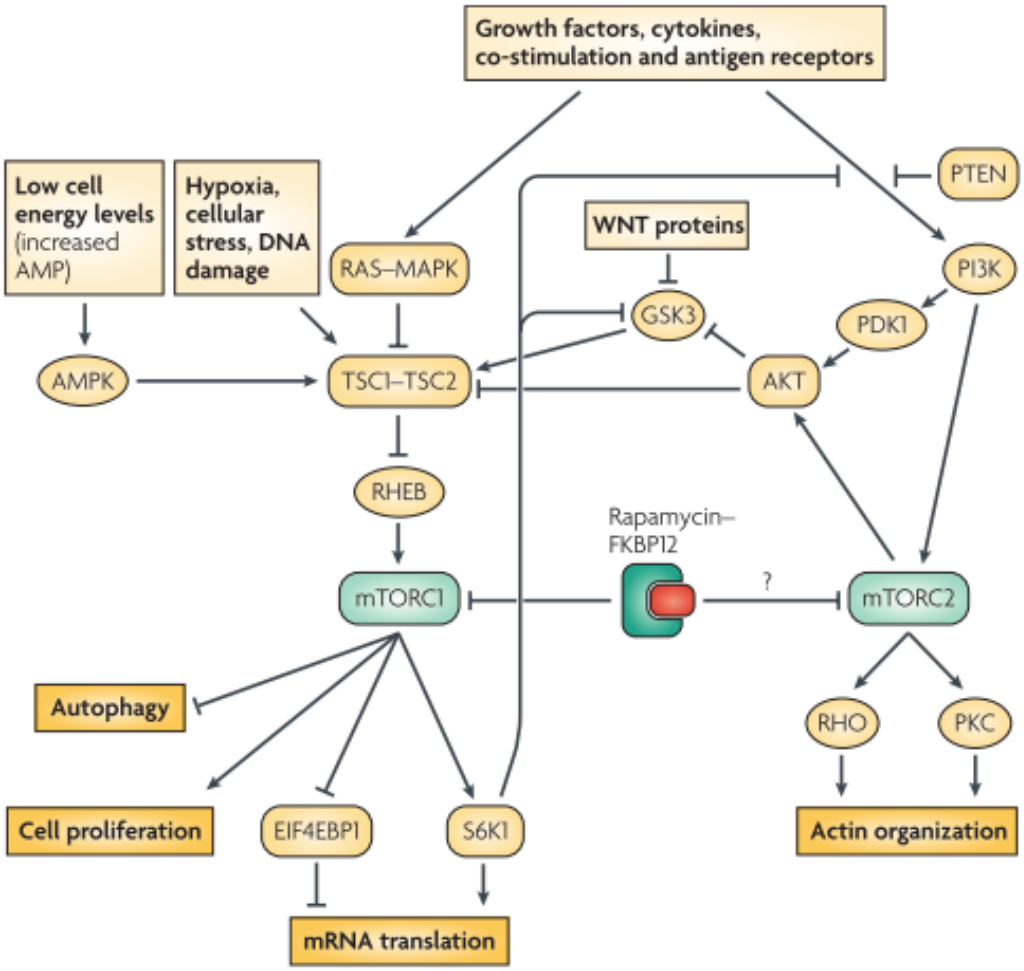


Figura 5: Via de señalización de mTORC1 y mTORC2. Complejo del receptor mamifero de Rapamicina 1 (mTORC1) regula el crecimiento celular y el tamaño por control de traducción de ARNm, biogénesis de ribosomas y autofagia. Diversas señales surgen desde factores de crecimiento, varias citoquinas, ligando de moléculas co-estimuladoras y receptor de antígenos, proteinas WNT, niveles de energía celular, asi como hipoxia, estrés celular y daño de ADN determinan la actividad de mTORC1. Estas señales median todos los efectos a través del complejo de esclerosis tuberosa 1 y 2 (TSC1-2), que es el principal regulador negativo de mTORC1. Activación de señalización RAS-MAPK (Proteina quinasa activada por mitógenos) y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K)-AKT, resulta en la inhibición de la fosforilación de TSC2 y remueve la represión de RHEB (RAS homologo enriquecido en el cerebro) que es el estimulador de mTORC1. Activación de señalización PI3K-AKT es regulado negativamente por fosfatasa homóloga de tensina (PTEN). Activación de mTORC1 promueve la transducción de ARNm por estimulación de quinasa S6 1 (S6K1; también conocido como RPS6KB1) e inhibido por EIF4EBP1 (proteína de unión de iniciación de traducción eucariota 1). Activación de S6K1 también puede retroalimentar negativamente la entrada de PI3K-AKT por facilitar la degradación de los intermediarios de señalización entre receptores de membranas (como receptor de insulina) y PI3K. Una disminución de los niveles de energía y nutrientes (señalizado por proteína quinasa activada por AMP; AMPK), así como condición de hipoxia, incrementa la inhibición mediada por TSC1-TSC2 de mTORC1 que está río abajo de la entrada desde quinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3). mTORC2 no es inhibido directamente por Rapamicina, pero la administración a largo plazo interrumpe su ensamblaje en algunas células. mTORC2, activado por PI3K, directamente fosforila AKT. mTORC2 también regula la dinámica del citoesqueleto a través de pequeña homologa RAS GTPasa (RHO) y proteína quinasa C (PKC). PDK1, quinasa dependiente de fosfoinositol 1.**Thomson *et al.* 2009.**

Metformina.

La Metformina es la droga más ampliamente utilizada en el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (DM2). La Metformina, suprime la producción de glucosa hepática y aumenta la sensibilidad a insulina, reduce la lipolisis en adipocitos y la absorción de glucosa por el intestino, estos efectos estimulan la traslocación del transportador GLUT4 en la membrana plasmática del musculo esquelético [79,80]. La Proteína Quinasa activada por AMP (AMPK) parece ser el intermediario de mayor acción farmacológica de esta droga para suprimir la lipogénesis e inducir la oxidación de ácidos grasos [81,82]. Lejos de sus efectos hipoglicémicos, la Metformina emerge como un potencial agente en quimio-prevención del cáncer. Recientes estudios epidemiológicos relacionan la administración de Metformina con reducción de la incidencia, recurrencia y mortalidad de variados tipos de cáncer en pacientes con DM2 [83-88]. La Metformina puede reducir el riesgo de cáncer por dos principales mecanismos: 1.- supuesto efecto de restricción de calorías, apoyado por la activación de AMPK, mecanismo por el cual se activan procesos catabólicos y se reducen todos los procesos que consumen energía, incluyendo la proliferación celular [89,90] y 2.- la reducción de insulino-resistencia y por lo tanto de niveles de insulina [91]. La activación de AMPK inhibe la activación de mTOR a través de la función de TSC2 [92,93] (Figura 6). Estos mecanismos promueven, acorde al tipo y la extensión de la injuria, mecanismos supresivos adicionales, contribuyendo a la detención de la progresión del tumor o inducción de muerte celular [94]. Investigaciones de pre-acondicionamiento con Metformina en MSCs solo evalúan las diferencias en los potenciales de diferenciación [95,96].

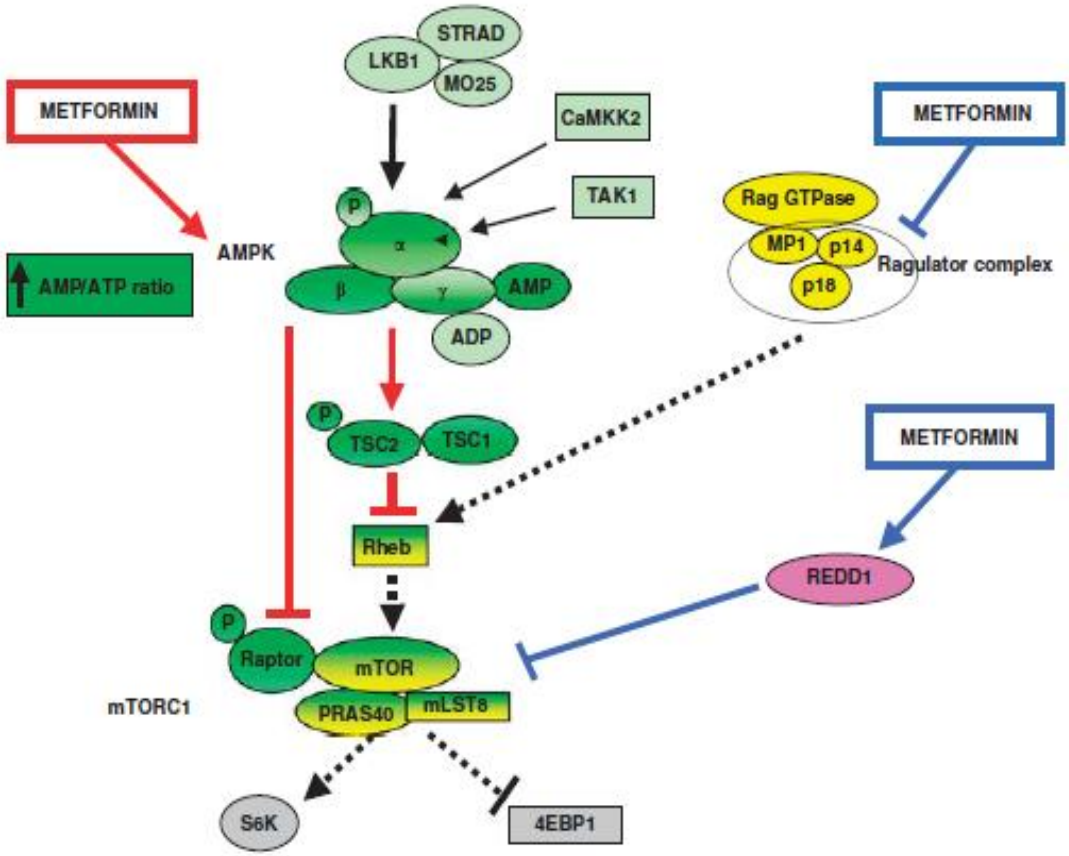


Figura 6: Mecanismo de acción de Metformina. Supresión de señalización de mTORC1 ocurre a través de un mecanismo dependiente de AMPK (en líneas rojas y proteínas en verde) e independiente de AMPK (en líneas azules y proteínas amarillas y rosadas). El mecanismo dependiente de AMPK a su vez puede ser sostenido por una activación directa (verde) o indirecta (verde claro). La activación directa o activación alostérica es gobernada por unión de AMP, mientras que la activación indirecta es lograda a través de la fosforilación Thr172 (P en círculo verde) por complejo trimérico LKB1, quinasa 2 quinasa dependiente de calmodulina (CaMKK2) o quinasa 1 activada por TGF-β (TAK1), y el efecto protectivo de ADP, quien produce la desfosforilación insensible de Thr172. Ambos tipos de activación de AMPK resultan en la supresión de señalización de mTORC1 mediado por eje TSC1/TSC2/RHEB/Raptor/mTOR. Se conocen dos mecanismos independientes de la activación AMPK: el primero (proteínas en amarillo) es regulada por proteínas Rag a través de un complejo trimérico llamado "Complejo Regulador", el cual mueve mTORC1 desde la ubicación perinuclear, donde está ubicado el activador RHEB, para la supresión citoplasmática de la señalización de mTORC1 y el segundo es dependiente de REDD1 (rosado). [94]

Hipótesis.

El pre-acondicionamiento de Células Madre Mesenquimales con Rapamicina y Metformina durante una hora, aumenta su capacidad inmunosupresora *in vitro* y su actividad terapéutica *in vivo* en un modelo experimental de Artritis inducida por colágeno en ratones machos de la cepa DBA/LacJ.

Objetivos.

Objetivo General

Estudiar la capacidad inmunosupresora de las células madre Mesenquimales pre-acondicionadas con Rapamicina y Metformina, durante una hora, *in vitro* e *in vivo* en un modelo experimental de Artritis Reumatoide inducida por colágeno.

Objetivos Específicos

1. Obtener, cultivar y caracterizar MSCs desde medula ósea de ratones C57BL/6.
2. Determinar la capacidad inmunosupresora *in vitro* de MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina y Metformina durante una hora y comparar este efecto inmunosupresor con el obtenido por MSCs no pre-acondicionadas.
3. Evaluar el efecto *in vivo* de MSCs pre-acondicionadas, sobre la progresión de signos clínicos y del diámetro articular, en un modelo de enfermedad de Artritis Reumatoide inducida por colágeno en ratones machos DBA/LacJ.

Materiales y Métodos.

1. Cultivo y Caracterización.

- Modelo animal.

Ratones C57BL/6 de 5-8 semanas, provenientes del bioterio del Instituto de Salud Pública de Chile (ISP) fueron mantenidos en micro aisladores con comida y agua autoclavada, en una habitación termorregulada, y foto periodo 12h luz/12h oscuridad. Los animales fueron mantenidos según las normas internacionales de mantención de animales de experimentación, Manual de Animales de Laboratorio (NIH) y manipulados de acuerdo a la Guía del *Institutional Animal Care and Use Committe* (IACUC).

- Obtención de MSCs.

Células provenientes de medula ósea fueron obtenidas a partir de fémur y tibia de 3 ratones hembras adultas C57BL/6 y fueron cultivadas a $1x10^6$ células/cm^2 en medio de cultivo (α-MEM, GLUTAMAX™, no nucleósidos, LifeTechnology©) suplementado con: 10% suero fetal bovino certificado, (SFB, calificado para MSCs, Biological Industries©), 1.000 U/mL Penicilina y 100 ug/mL Estreptomicina (Penicilina-Estreptomicina 10X, 100.000 U/mL Penicilina G sal sódica y 100 mg/mL Estreptomicina sulfato, Biological Industries©) a 37°C con 5% de CO_2. Luego de 4 días de cultivo, las células no adherentes fueron removidas y cuando las células adherentes alcanzaron 80% de confluencia, se procedió al pasaje de células mediante proceso de tripsinización (Solución C Tripsina EDTA 0,05%, EDTA 0,02% con rojo Fenol, Biological Industries©) a un nuevo frasco de cultivo. Luego del quinto pasaje se procedió a purificar las MSCs mediante selección negativa con el kit BEAT anti CD45 (CD45 microbeads, mouse, MACS MiltenyiBiotec©).

- Inmunotipificación.

Después del pasaje número diez, se realizó la Inmunotipificación de MSCs mediante citometría de flujo, con un citómetro BD FACSCANTO II™, BD Biosciencies©, utilizando anticuerpos control de isotipo: IgG2ak-FITC, IgG2bk-PE, IgMλ1-FITC y anticuerpos de marcadores de membrana específicos para MSCs: CD34-FITC, CD45-PE, Sca1-FITC, CD44-PE, CD29-FITC.Todos los anticuerpos utilizados fueron adquiridos en BD Biosciencies© (Figura 9).

- Diferenciación celular.

Las MSCs se diferenciaron hacia linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico de acuerdo a protocolos pre-establecidos (Carrión *et al*.)[54].

Para la formación de osteoblastos, se sembraron las células en una placa de 24 pocillos a 10.000 células/cm^2 utilizando el medio de diferenciación (Osteogenesis Differentiation Medium StemPro®, LifeTechnology©) durante 14 días. A continuación se realizó una tinción con Alizarin Red 40 mM (Sigma Aldrich©), y luego se observó por microscopía óptica (Microscopio Invertido Olympus IX51) y se tomó fotografías con aumento 40X (Cámara Micrometrics® 516 CU y software para cámaras de alta resolución Micrometric SE premium) para registrar los depósitos de calcio teñidos.

Para la formación de adipocitos, se sembraron las células en una placa de 24 pocillos a 10.000 células/cm^2 utilizando el medio de diferenciación (Adipogenesis Differentiation Medium StemPro®, LifeTechnology©) durante 14 días. A continuación se realizó una tinción con Oil Red 60% v/v (Sigma Aldrich©), y luego se observó por microscopía óptica (Microscopio Invertido Olympus IX51) y se tomó fotografías con aumento 40X (Cámara Micrometrics® 516 CU y software para cámaras de alta resolución Micrometric SE premium) para registrar los depósitos de lípidos teñidos.

Para la formación de condrocitos, se sembraron las células en una placa de 24 pocillos desde un conglomerado de células utilizando el medio de diferenciación (Chondrogenesis

Differentiation Medium, StemPro®, LifeTechnology©) durante 14 días. A continuación se realizó una tinción con Safranina O 0,1% p/v (Sigma Aldrich©), y luego se observó por microscopía óptica (Microscopio Invertido Olympus IX51) y se tomó fotografías con aumento 40X (Cámara Micrometrics® 516 CU y software para cámaras de alta resolución Micrometric SE premium) para registrar tejido cartilaginoso teñido.

2. Pre-acondicionamiento de MSCs.

Las drogas se reconstituyeron según las indicaciones del fabricante. Rapamicina (Rapamycin from Streptomyces hygroscopicus ≥95% (HPLC), poder, Sigma Aldrich©) y Metformina (Metformin - CAS 1115-70-4 - Calbiochem®, Merck©). Luego de la reconstitución de las drogas, estas fueron mantenidas a -80°C y alícuotadas en buffer fosfato salino (PBS) (Phospate Buffer Saline, Cornin©), estas alícuotas no presentaron la formación de precipitados, por lo que se asume que están en solución. En el caso de Rapamicina, esta droga fue reconstituida en Dimetilsufoxido (DMSO) (Sigma Aldrich©) la concentración de DMSO en cultivo es de 0,005% v/v, por lo tanto se asume que no representa una variable a evaluar en los posteriores ensayos.

- Rapamicina.

Se sembraron las MSCs a 2500 células/cm^2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 manteniéndose en medio de cultivo por tres días. Se procedió al pre-acondicionamiento de células MSCs, luego de dos lavados con PBS, se agregó en dosis entre 10 y 50 ng/mLdisueltas en medio de cultivo y se mantienen de acuerdo a los tiempos de exposición 1 y 24 h.

- Metformina.

Se sembraron células MSCs a 2500 células/cm^2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 manteniéndose en medio de cultivo por tres días. Se procedió al pre-acondicionamiento de células MSCs, luego de dos lavados con PBS, se agregó en dosis entre 5 y 10 µM disueltas en medio de cultivo y se mantienen de acuerdo a los tiempos de exposición 1 y 24 h.

- Combinación Rapamicina y Metformina.

Se sembraron células MSCs a 2500 células/cm^2 en frascos de cultivo de 25 cm^2 manteniéndose en medio de cultivo por tres días. Se procedió al pre-acondicionamiento de células MSCs, luego de dos lavados con PBS, se agregó dosis de Rapamicina 50 ng/mL y Metformina 5 µM disueltas en medio de cultivo y se mantienen por 1 hora de exposición al estímulo.

3. Efecto inmunomodulador de las MSCs y MSCs pre-acondicionadas.

3.1. Efecto sobre la proliferación de esplenocitos.

- Obtención de esplenocitos.

Se obtuvo el bazo desde ratones machos adultos C57BL/6 en sala de procedimientos del Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB) de la Universidad de Los Andes, bajo normas de asepsia adecuadas y se mantuvo en PBS estéril suplementado con 2 U/mL Penicilina y 2 ug/mL Estreptomicina. Bajo campana de flujo laminar, se disgregó el tejido y se hizo pasar por un filtro 70 µm (CellStrainer,Falcon®). Luego se centrifugaron las células obtenidas por 7 min. a 1700 rpm. Luego de eliminar sobrenadante, se re-suspendieron las células mecánicamente en 10 mL de Medio RPMI (RPMI Medium 1640 GlutaMAX™,LifeTechnologies©) suplementado con 10% FBS. Luego se realizó una separación por gradiente de densidad (Ficoll-Histopaque®-1083, Sigma-Aldrich©) a temperatura ambiente, con una centrifugación a 1400 rpm por 20 minutos, para separar fases de linfocitos/monocitos, eritrocitos, plaquetas, plasma y otros granulocitos.

- Tinción con Kit de proliferación celular.

La tinción con Kit de proliferación celular (CellTrace™ Violet CellProliferation Kit, for flow cytometry, LifeTechnology©) se realizó bajo las indicaciones del fabricante (Figura 7).

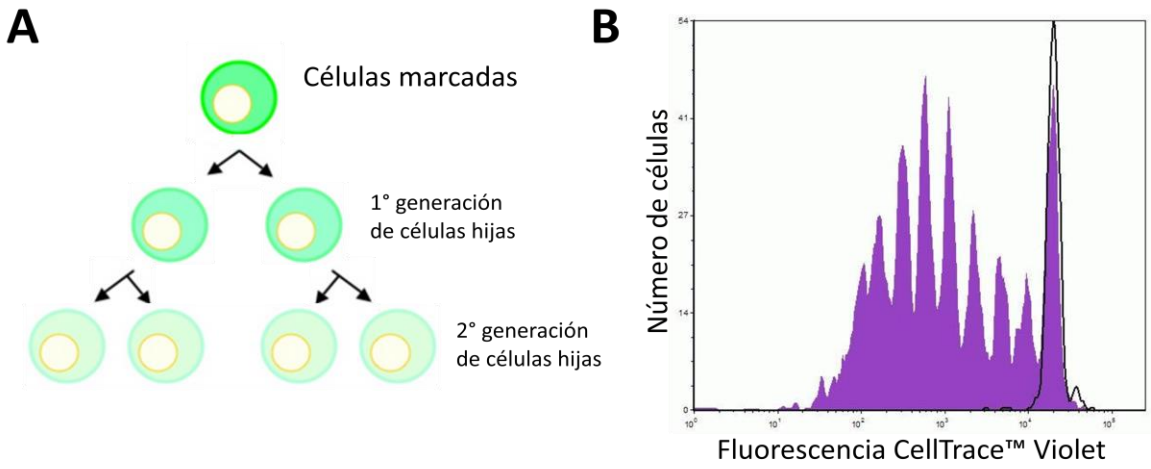


Figura 7: Representación gráfica de la dilución y marcaje del Kit de proliferación celular. A) Dilución de marcaje a través de las generaciones celulares. B) Linfocitos de sangre periférica humana fueron cosechados y teñidos con CellTrace™ Violet y analizados por Citometría de Flujo. Los *peaks* violeta representan sucesivas generaciones de células estimuladas con anti CD3 humano e IL2 y cultivadas por 7 días. El *peak* delineado en negro representan células que fueron cultivadas por 7 días sin estimulo.

- Co-cultivo de MSCs pre-acondicionadas.

Para visualizar la inhibición en la proliferación celular de esplenocitos marcados previamente con el kit de proliferación celular, se sembraron en placas de 96 pocillos colocando 200.000 esplenocitos y 20.000 MSCs (relación 1:10) o 400.000 esplenocitos y 20.000 MSCs (relación 1:20) por pocillo. Luego se agregó mitógeno policlonal Concanavalina A (0,5 ug/mL). Se consideraron los respectivos controles: negativo de proliferación (sin Concanavalina A), proliferación basal (sin mMSC), controles de marcaje anti-CD3, control de marcaje de CellTraceViolet (Figura 8).

- Tinción con anti-CD3 y análisis de proliferación por citometría de flujo

Al término del cultivo, se tomó una alícuota de sobrenadante para la posterior medición de nitritos. A continuación se marcaron las células con anticuerpo monoclonal anti-mouse anti-CD3 (APC anti-mouse CD3 Antibody, Biolegend®) según instrucciones del fabricante. Para marcaje de viabilidad se utilizó el ensayo de viabilidad de Ioduro de Propidio 0.5

ug/ml (Sigma Aldrich). Finalmente se leen las muestras por citometría de flujo, con un citómetro BD FACSCANTO II™, BD Biosciencies©.

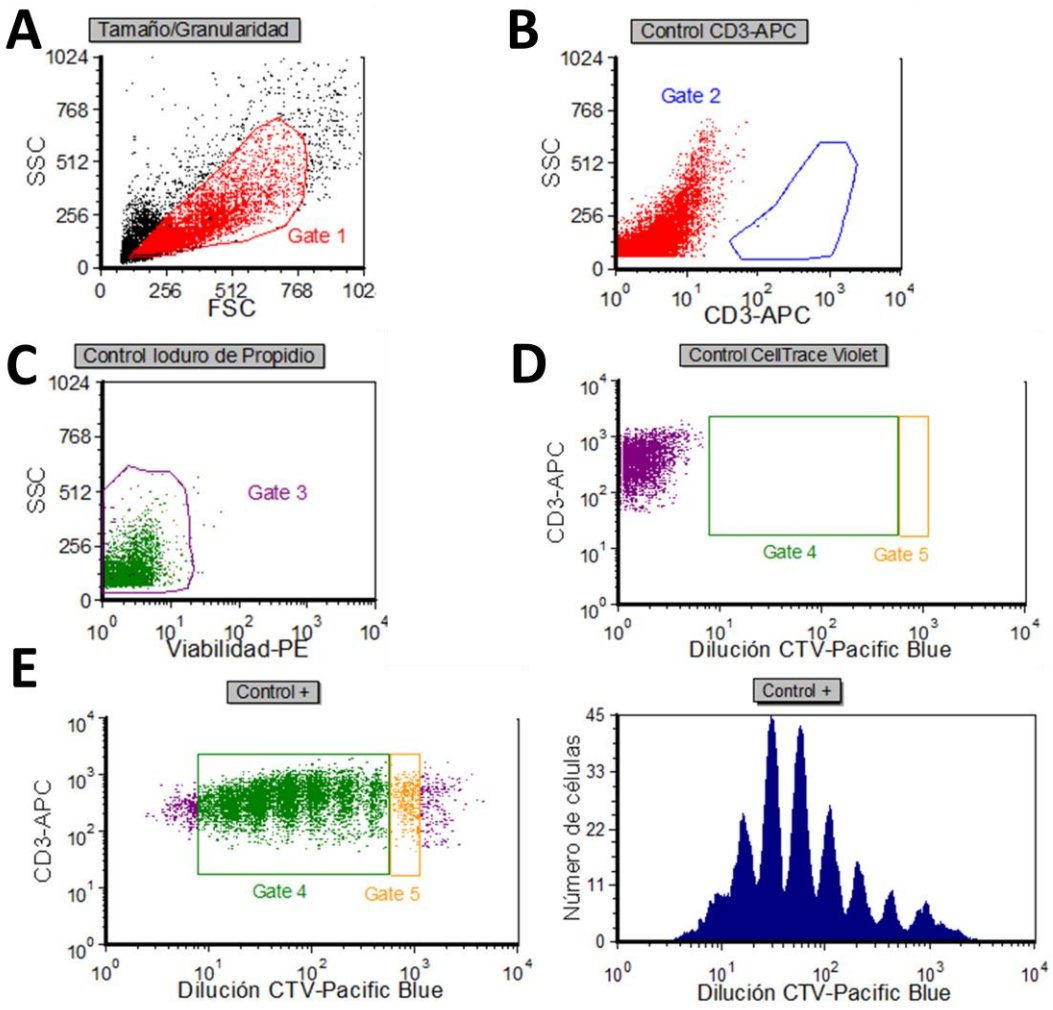


Figura 8: Gráficos representativos de los controles incluidos en ensayos de efecto sobre la capacidad de proliferativa de esplenocitos en co-cultivo con MSCs pre-acondicionadas. A) Gráfico de tamaño/granularidad en donde se seleccionan las células que corresponde a los linfocitos. B) Gráfico tubo control de marcaje con CD3-APC, en este control las células no se marcan con el anticuerpo por lo tanto se observa que las células no marcadas se encuentran fuera de la región de análisis seleccionado. C) Gráfico del tubo control para marcaje con ioduro de propidio, se seleccionan las células no marcadas en la región de análisis *3*. D) Gráfico tubo control de marcaje de CellTrace™violet en donde se observa que las células no presentan marcaje. E) Gráfico tubo control positivo se observa el marcaje CD3+, marcaje Ioduro de Propidio +, y la dilución de CellTrace™violet además se presenta un histograma donde se grafican las distintas generaciones celulares.

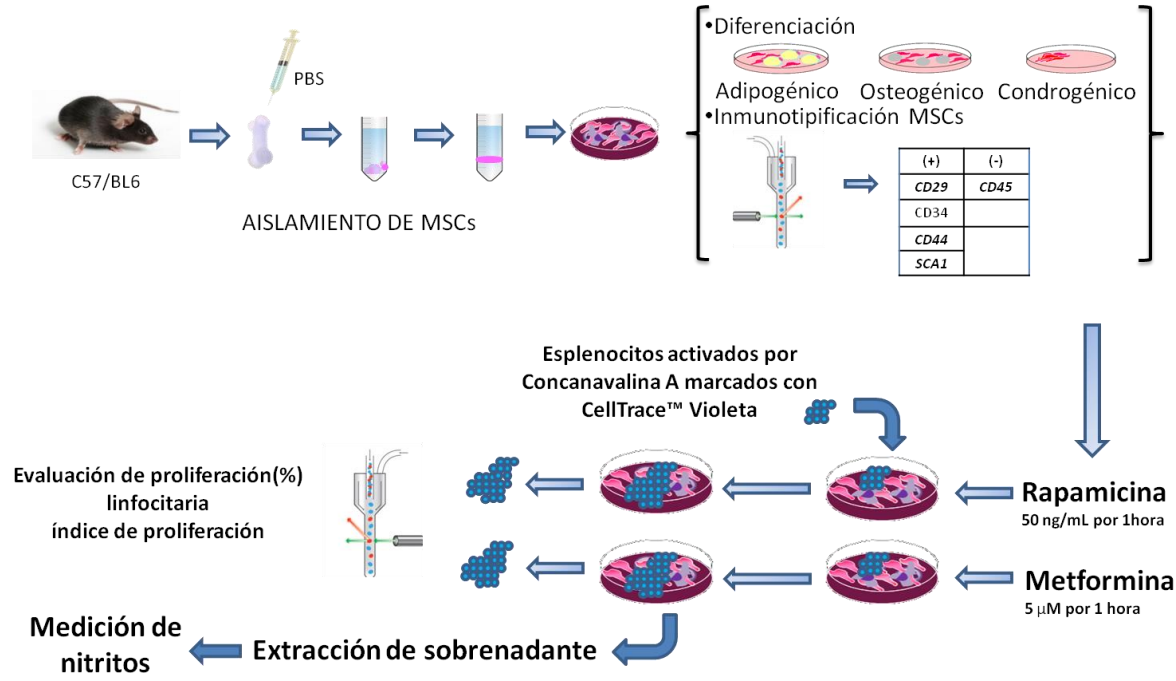


Figura 9: Diseño experimental de Extracción, Caracterización, Pre-acondicionamiento y Evaluación de la capacidad Inmunosupresora de MSCs en ausencia o presencia de pre-acondicionamiento durante una hora con Rapamicina y Metformina.

3.2. Efecto sobre la producción de Nitritos.

- Medición de Nitritos en sobrenadante de MSCs por espectrofotometría.

La medición de Nitritos, producto de Óxido Nítrico (NO), se realizó mediante la reacción colorimétrica de Griess. Esta reacción involucra la formación de un cromóforo mediante la diazoación de la sulfanilamida con ácido nitroso, seguido de una copulación con una amina bicíclica [97] (Figura 10). Una alícuota del sobrenadante de cada pocillo descrito en la sección anterior es centrifugada por 5 min. a 1800 rpm. a temperatura ambiente, para obtener el sobrenadante libre de células. Se cargan placas de 96 pocillos con las muestras del sobrenadante y se procede a agregar el reactivo de Griess (GRIESS-ILOSVAY de Merck©) y de esta forma se obtendrá el producto coloreado que es leído espectrofotométricamente después de 15 minutos de reacción en agitación. La placa se lee a 492 nm (Infinite® F50 / Robotic–Absorbance microplate readers, TECAN®). Todas las mediciones se realizan en triplicado con un blanco de medio de cultivo, control negativo con MSCs sin pre-acondicionamiento, y un control positivo de concentración conocida de óxido nítrico. Se realiza una curva de calibración ocupando la solución stock de $NaNO_2$ (Sigma-Aldrich©).

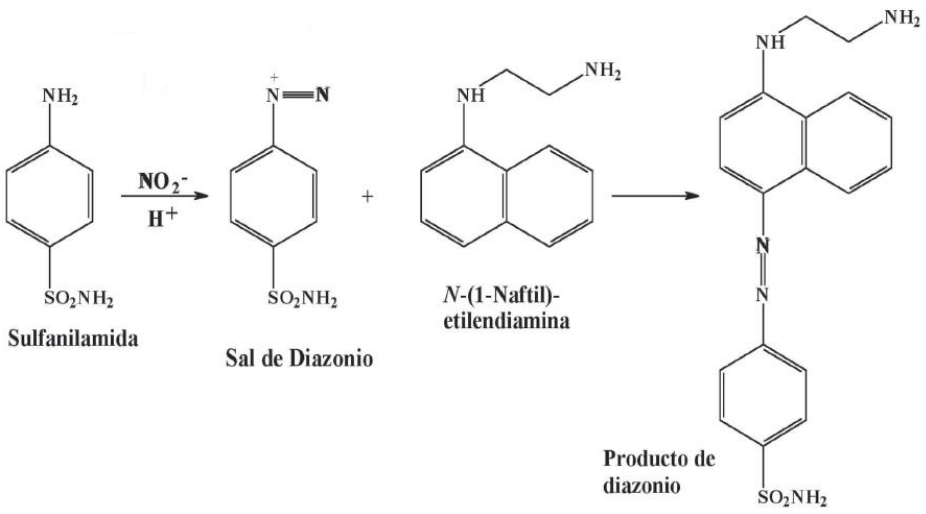


Figura 10: Reacción de Griess para la detección de nitritos. Tomada y adaptada de *Fermín A.et al[97]*

4. Efecto sobre la expresión de genes mediante técnica real time PCR

- Extracción de ARN por kit QIAGEN.

Se sembraron MSCs en pasaje 14 a 2500 células/cm^2 en frascos de cultivo de 75 cm^2, luego de tres días en medio de cultivo, se eliminó el medio y se lavaron las células con PBS, luego se realizó el pre-acondicionamiento en medio de cultivo durante una hora. Después de cumplido el tiempo de estímulo se descartó el medio, se lavó las células y se tripsinizaron. Luego se centrifugaron a 4000 rpm por 5 min a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se mantiene el concentrado de células a -80°C hasta el procedimiento de extracción de ARN que se realizó según las indicaciones del fabricante del kit de extracción de ARN (RNAEasy mini Kit, QIAGEN©).

- Síntesis de ADNc.

A través de un espectrofotómetro (NanoDrop 2000™, ThermoScientific©), se determinó las absorbancias a 260, 280 y 230 nm para determinar la concentración de ARN y su pureza en las muestras. Se usaron 2 µg de ARN para la síntesis de ADNc y se utilizó tratamiento previo con DNasa I para eliminar ADN contaminante en las muestras para lo cual se incubó por 30 minutos a 37°C en Termociclador (MaxigenTermociclador™, Axygen®). Para la detención de actividad de la enzima, se usó EDTA 50 mM. Luego se incubo las muestras a 65°C por 10 minutos. En seguida se incubó las muestras con partidores específicos para cualquier sección de ARN (RandomPrimers, Promega©) para comenzar la etapa de retro-transcripción (Improm II R.T, Promega©), siguiendo las instrucciones del fabricante en Termociclador (MaxigenTermociclador™, Axygen®).

- Partidores.

El diseño de partidores se realizó mediante secuencia FASTA y diseño de partidores en software AmplifX versión 1.7.0; de acuerdo a los genes de interés para establecer relación con la actividad inmunosupresora de MSCs (Tabla 3).

Tabla 3: Diseño de partidores de acuerdo a genes de interés relacionados con la capacidad inmunosupresora de MSCs.

Proteína codificante	Secuencia del partidor sentido	Secuencia del partidor *Anti*-sentido
Enzima Oxido Sintasa Inducible murina (iNOs)	AGTTCTGCGCCTTTGCTCAT	AGTGAAGCGTTTCGGGATCT
Enzima Ciclo Oxigenasa 2 murina (COX-2)	AGATGTATGGCGGGAAGGAA	AACTTGCCCTCACGGACAAT
Interleuquina 6 murina (IL-6)	CCTTCCTACCCCAATTTCCA	GGCATAACGCACTAGGTTTG
Interleuquina 8 murina (IL-8)	GGCTACTGTTGGCCCAATTA	GAGGTCTCCCGAATTGGAAA
18s (gen normalizador)	ATCGCCAGTCGGCATCGTTTAT	GCCGCTAGAGGTGAAATTCTTGGA

- Curva de eficiencia.

Primero se diluyeron los partidores del gen a amplificar a una concentración de 2,5 µM. Luego se preparó el MIX del PCR utilizando GoTaq PCR Master Mix (Promega©), Primer *sense/antisense* 2,5 µM y agua DEPC y se agregaron a los pocillos adecuados. Por otro

lado, se realizaron las diluciones seriadas de la muestra elegida de ADNc para realizar la curva estándar (Diluciones: 1/1000, 1/10000, 1/100000, 1/1000000, 1/10000000, 1/100000000, 1/1000000000). Finalmente se colocan las muestras en el sistema de PCR en tiempo real (Mx3000p™, Stratagene, AgilentTechnology©) y se configura a las temperaturas deseadas y una vez finalizado el procedimiento se procesarán los datos de las amplificaciones, obteniendo la pendiente, el r^2 y el % de eficiencia para cada gen (Figura 11).

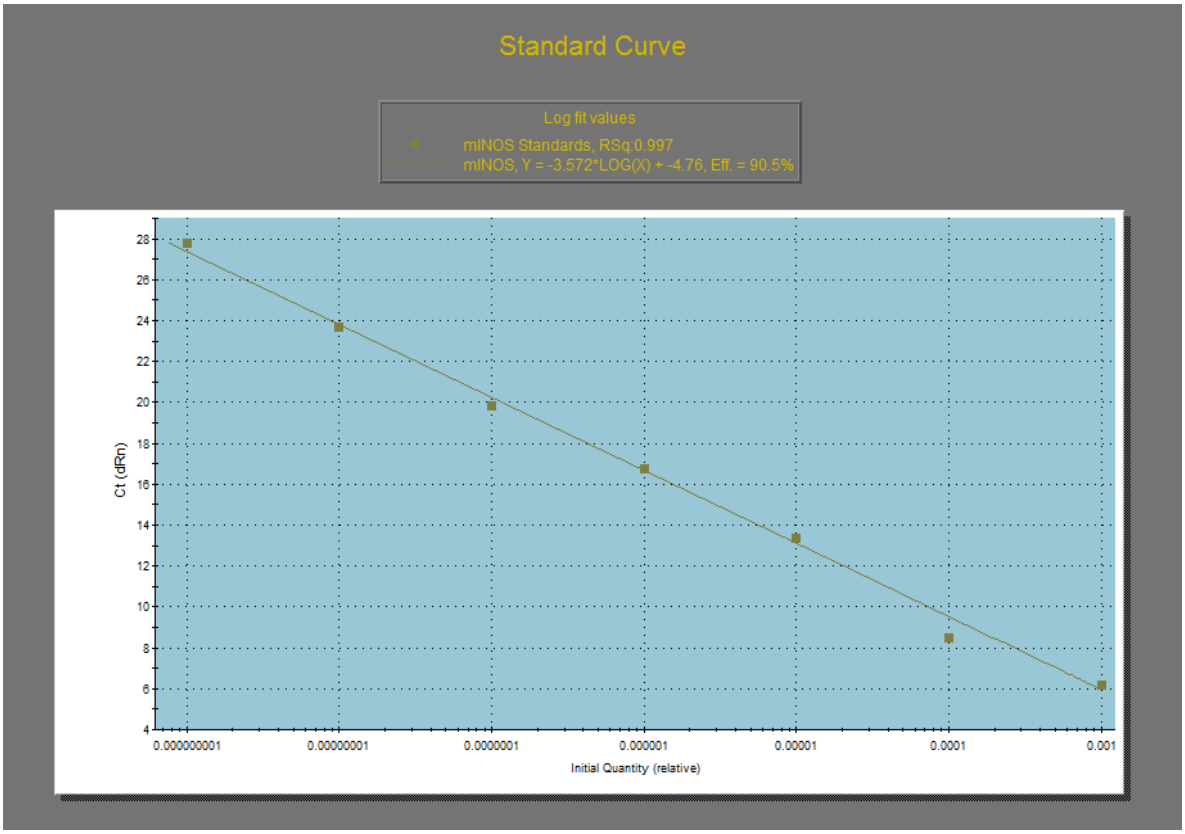


Figura 11: Representación grafica de una curva de calibrado para la determinación de eficiencia de los partidores y posterior determinación de la expresión relativa.

- RTqPCR para genes: iNOs, PGE_2, IL6 e IL8.

A partir de los resultados obtenidos de las curvas de eficiencia para cada uno de los genes, se realizó RTqPCR a través del mismo procedimiento con las concentraciones de los partidores óptimas, utilizando método 2-delta-Ct.

5. Modelo *in vivo* de AR.

- Artritis Inducida por colágeno (CIA).

Ratones machos DBA/1LacJ (The Jackson Laboratory, JAX®) de 8-12 semanas fueron inoculados con una inyección intradermal (i.d.)a 1,5 cm distal desde la base de la cola, con 100 ug de Colageno tipo II (CII) (Chondrex inc.) emulsionado con adyuvante completo de Freund (CFA) (Invitrogen©) y suplementado con Mycobacterium tuberculosis H37RA inactivado por calor (DifcoLaboratories©). Al día 21 post inducción se inoculó un refuerzo de CII que consistió en una inyección intradermal (i.d.) a 1,5 cm distal de la primera inyección, con 100 ug de CII emulsionado con adyuvante incompleto de Freund. Al día 28 post inducción se inoculó una solución de Lipopolisacarido LPS 50 ug (Sigma Aldrich©) en PBS para sincronizar la aparición de los signos clínicos (Figura 12).

- Tratamiento con MSCs

Los ratones DBA/1LacJ fueron tratados vía intra-peritoneal con $2,5x10^6$ MSCs previamente pre-acondicionadas con los distintos estímulos y diluidas en 100 µL de PBS en los días 18 y 24 post inducción. Animales controles fueron inyectados sólo con vehículo por vía intra-peritoneal a los mismos tiempos. Se evaluó 3 veces por semana el score clínico y la hinchazón articular según caliper (ABSOLUTE DigimaticCaliper Series 500, Mitutoyo©)[98].

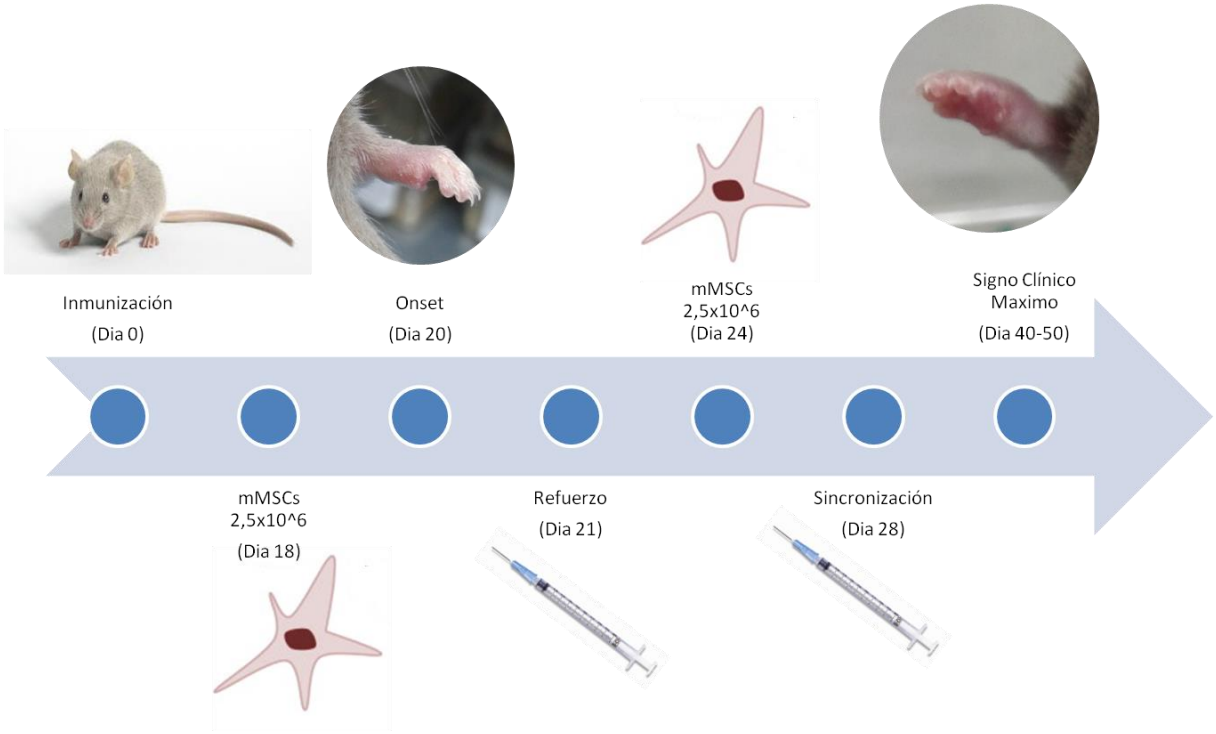


Figura 12: Diseño experimental de Artritis Inducida por Colágeno

- Evaluación de CIA.

Los signos clínicos de la enfermedad fueron medidos 2-3 veces por semana mediante un score clínico visual subjetivo utilizando el siguiente criterio, establecido por Kim SH y col. 2000 : (0) sin evidencia de eritema e hinchazón; (1) eritema e hinchazón leve limitada a la articulación media del pie o del tobillo; (2) eritema e hinchazón leve extendida desde el tobillo hasta la articulación media del pie (tarsal); (3), eritema e hinchazón moderada extendida desde el tobillo hasta la articulación metatarsal; (4)eritema e hinchazón severa que abarca los tobillos, el pie y los dedos [99] (Figura 13). Además de la medición de la hinchazón articular utilizando un caliper registrando la hinchazón en milímetros (mm) de grosor articular. Los ratones severamente afectados por la enfermedad, y de acuerdo a las normas nacionales e internacionales de cuidado de animales, fueron eutanasiados bajo la supervisión de un veterinario. El puntaje clínico se calculó mediante la suma de los puntajes clínicos de cada pata del ratón de un grupo, y luego dividido por el número total

de animales (score clínico máximo: 16). El puntaje máximo y la hinchazón articular fue evaluado para cada ratón y expresados como Promedio±SEM.

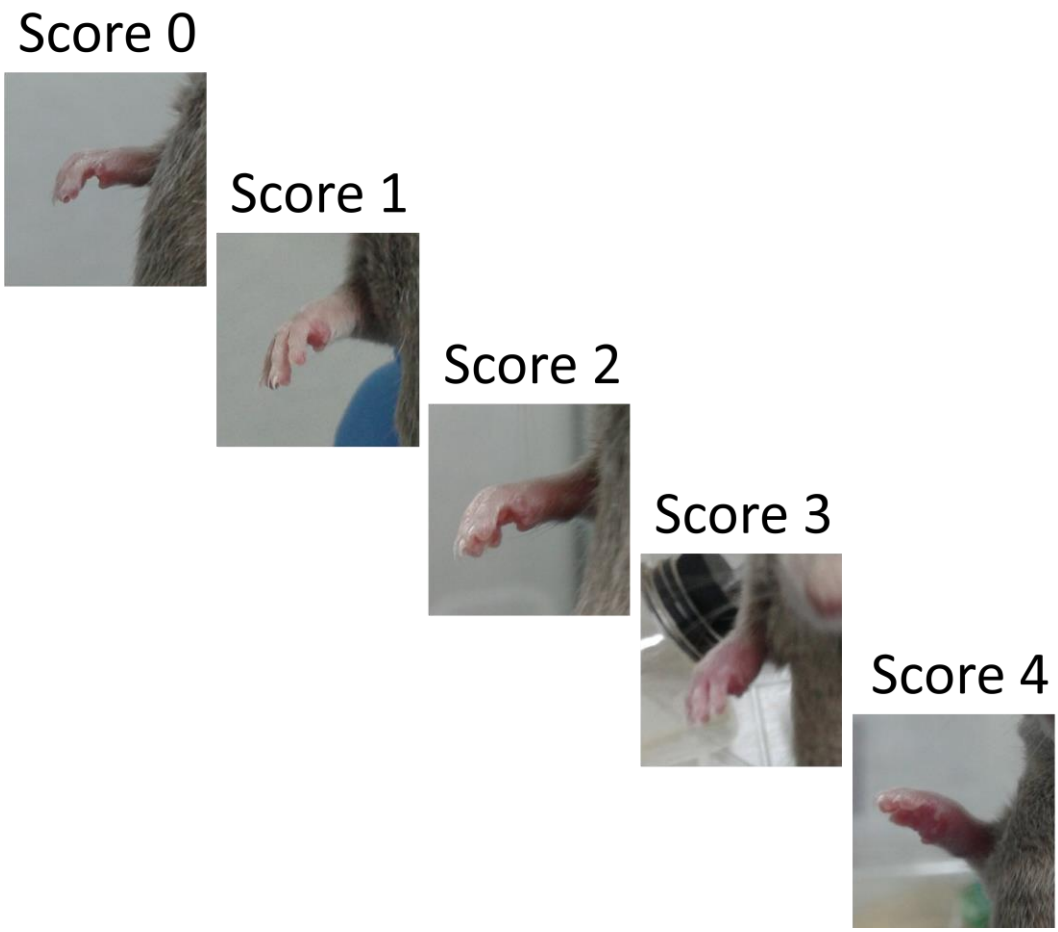


Figura 13: Imágenes representativas de los distintos score clínicos, según severidad de la enfermedad.

6. Efecto del estado de fosforilación de S6K1 mediante Western Blot.

Se sembraron células MSCs en pasaje 14 a 2500 células/cm^2 en frascos de cultivo de 175cm^2. Luego de 5 días se tripsinizaron para sembrar 20.000 células/cm^2 en placas de Petri 100 mm (Falcon©) en medio de cultivo. Después de 24 hrs. se eliminó el medio y se colocó medio de cultivo en ausencia de FBS por 16 horas. A continuación de la deprivación de suero, se restituyó el medio de cultivo con 10 % FBS y los distintos estímulos (Figura 14). Se cosecharon las células por arrastre con *cellscraper* (Falcon©) y buffer de lisis (complete Lysis-M, 1mM EDTA en 10mL, Roche). Se centrifugaron los lisados celulares a

13.500 rpm. por 10 minutos, para luego cuantificar las proteínas por medio de reacción de Ácido Bicinchonico (BCA) con su respectiva curva de calibrado (R^2: 0.9945) para posterior lectura espectrofotométrica (Infinite® 200 PRO NanoQuant, TECAN©). Una vez cuantificadas las proteínas se agregó buffer de carga (Biorad©) para luego denaturar las proteínas a 100°C por 5 minutos (Dry Bath, RockerScientific©). Una vez denaturadas las proteínas se realizaron geles de poliacrilamida al 8% y se corrieron durante 1,5 horas a 120 V en buffer de corrida. Una vez separadas las proteínas, estas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, una vez transferidas las proteínas, se incuban con anticuerpos anti-pS6K1 (Phospho-p70 S6 Kinase (Thr389) (108D2) RabbitmAb, CellSignalingTechnology®) en dilución 1:10.000. Luego de la incubación se procede a la incubación con el anticuepro secundario *anti-Rabbit* (Goat anti-RabbitIgG (H+L) SecondaryAntibody, Alexa Fluor® 750 conjugate, (LifeTechonology©) en dilución 1:5000. Se utilizó α-Tubulina (Anti-alpha Tubulin antibody [DM1A] - Loading Control (ab7291), ABCAM©) como control de carga y como marcador de peso se utilizó *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Standards* (BIORAD©).

Figura 14: Modelo experimental

7. Análisis estadístico.

Se asume que los datos obtenidos no siguen una distribución normal (Distribución Gaussiana) por lo que se aplican test estadísticos no paramétricos para el análisis. En primera instancia se utiliza el Test de Friedman para comparar tres o más grupos pareados. Se asume que ningún otro factor diferente al de interés, ha afectado los grupos de datos. Para comparar dos grupos se utiliza el test no paramétrico de Mann Withney two tails. Se consideró una diferencia significativa en valores $P<0,05$.

Resultados

1. Caracterización de MSCs murinas extraídas desde medula ósea.

Para determinar si las células obtenidas de medula ósea de ratón C57BL/6 corresponden a células de tipo Mesenquimales, es necesario caracterizarlas, este proceso consiste en determinar morfología, adherencia al plástico, marcadores de membrana y capacidad de tri-diferenciación. El solo proceso de tripsinización es una forma de purificar el cultivo celular, sin embargo, en este caso también fue necesario utilizar una selección negativa de células positivas para el marcador hematopoyético CD45. Luego de este proceso las células seleccionadas, presentan homogeneidad en la población celular de morfología plana y fibroblástica, además de ser adherentes al plástico (Figura 15 A). Las MSCs extraídas de ratones de cepa C57BL/6 presentan el siguiente fenotipo de marcadores de membrana CD34 en 83,04%; CD45 en 0,97%; SCA1 en 70,20%; CD44 en 99,36%; CD29 en 99,84% de las células analizadas (Figura 15 B). La capacidad de diferenciación es una característica propia de MSCs, en este caso, las células fueron capaces de diferenciarse a los tres linajes mesodérmicos según los protocolos de diferenciación establecidos. Se observó la formación de vacuolas de lípidos propias de la diferenciación adipogénica (Figura 16 A), la formación de depósitos minerales, propias de la diferenciación osteogénica (Figura 16 B) y se observó una micromasa de células marcadas con la tinción de tejido cartilaginoso, propias de la diferenciación condrogénica (Figura 16 C). Se pudo observar que los controles de diferenciación no presentan las estructuras antes mencionadas y mantienen la morfología anteriormente descrita.

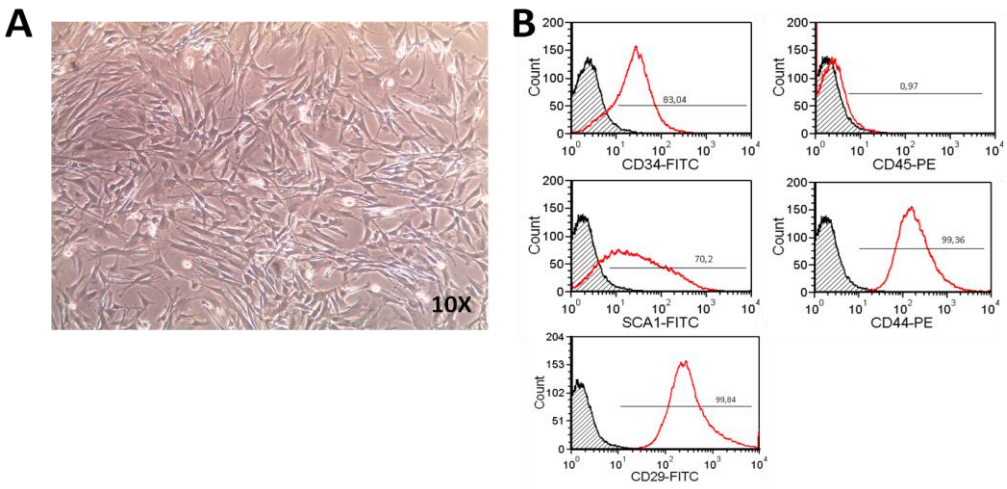


Figura 15: MSCs obtenidas de medula ósea, presentan marcadores de membrana propios de este tipo celular. Las células madre, una vez obtenidas, fueron cultivadas en medio normal de crecimiento hasta el pasaje 10 para su posterior Inmunotipificación por citometría de flujo. A) muestra células homogéneas fibroblásticas planas y adherentes al plástico. B) muestra histogramas del análisis de citometría de flujo en que se grafica el porcentaje de células marcadas para cada anticuerpo: CD34 en 83,04%; CD45 en 0,97%; SCA1 en 70,20%; CD44 en 99,36%; CD29 en 99,84% de las células analizadas. Las determinaciones se establecieron mediante marcaje con control de isotipo correspondiente.

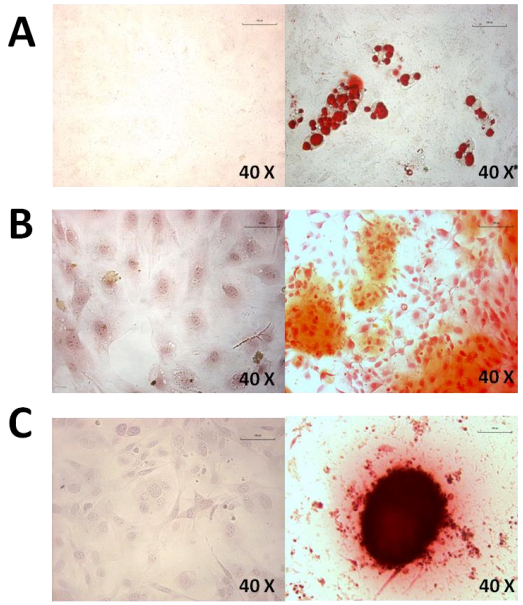


Figura 16: MCSs obtenidas de medula ósea son capaces de diferenciarse en adipocitos, osteocitos y condrocitos. Las células fueron sembradas a 10.000 células/cm^2 y estimuladas con medio basal y medio de diferenciación por 14 días hasta la tinción celular. Las fotografías fueron tomadas en microcoscopía óptica a un aumento 40X. A la izquierda muestra células control no estimuladas y a la derecha células cultivadas con medios de diferenciación. A) Muestra de vacuolas de lípidos teñidos con Oil Red propios de adipocitos. B) Muestra de depósitos minerales teñidos con Alizarin Red propios de osteocitos. C) Muestra de tejido cartilaginoso teñido con Safranin O propios de condrocitos.

2. Evaluación de la capacidad inmunosupresora de las MSCs.

Otra característica importante de las MSCs es la capacidad de ejercer un efecto inmunosupresor. Se determinó el efecto inmunosupresor de MSCs mediante la capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos expuestos a mitógeno policlonal Concanavalina A (0,5 ug/mL) en co-cultivo con MSCs en razones 1:10 y 1:20 (Figura 17 A y B) mediante una marca de proliferación (CellTrace™ Violet) que se diluye según los sucesivos ciclos de proliferación. La intensidad del marcaje es medido por citometría de flujo. Otra forma de evidenciar este efecto es la distribución de las células según los ciclos de dilución de la marca de proliferación (Figura 17 C). Un aumento en la relación MSCs:Esplenocitos aumenta la inmunosupresión ejercida por las MSCs. Por lo tanto se determinó la razón 1:10, como la relación óptima para evaluar el pre-acondicionamiento de MSCs con una inhibición de la proliferación de un 54% en promedio.

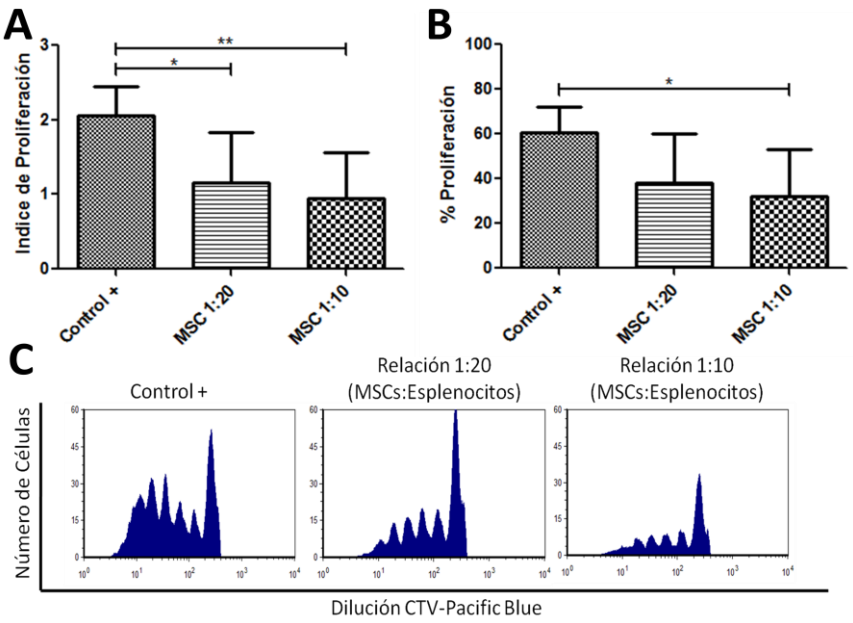


Figura 17: MSCs en relación 1:10 (MSCs:Esplenocitos) mostró un aumento de sus capacidades inmunosupresoras. MSCs fueron incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/ml) en relación 1:10 y 1:20 por 3 días, siendo la relación 1:10 la que mostró un mayor efecto inmunosupresor, expresado en A) la disminución del índice de proliferación de linfocitos y en B) el porcentaje de linfocitos proliferantes. Se grafican X±DS. C) se muestra la distribución del número de células según ciclo de dilución de CellTrace™ Violet. Se grafica mediante histograma. **Análisis estadístico *Test Friedman* *P<0,05 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test*. (N=3; n=3)**

3. Efecto del pre-acondicionamiento de MSCs.

Una vez seleccionada la relación MSCs:Esplenocitos y determinado el nivel de inmunosupresión de MSCs no pre-acondicionadas, es necesario evaluar el efecto inmunosupresor de MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina 10 y 50 ng/mL. MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL por una hora, mostraron un aumento en capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos activados, en comparación con MSCs sin pre-acondicionamiento en relación 1:10 (Figura 18). Por lo tanto, se determinó que Rapamicina a 50 ng/mL como la dosis necesaria para aumentar las capacidades inmunosupresoras y en estudios posteriores se evidenció de mejor manera este efecto, aumentando en un 28% en promedio la capacidad inmunosupresora de MSCs sin pre-acondicionamiento (Figura 19).

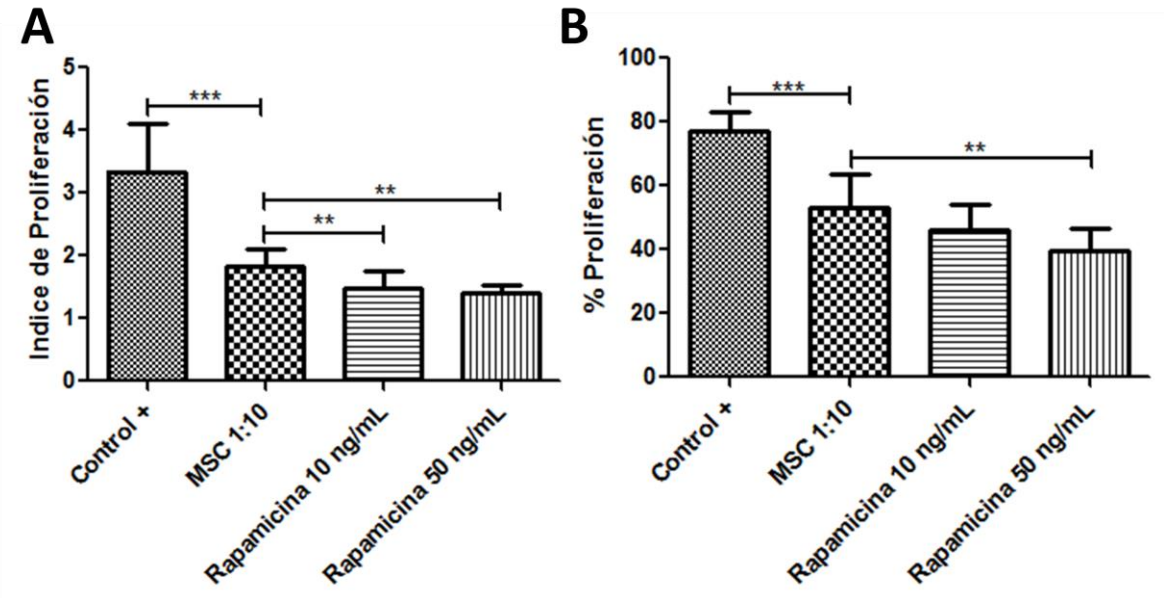


Figura 18: Evaluación del pre-acondicionamiento de MSCs a dosis de Rapamicina 10 y 50 ng/mL. MSCs fueron pre-acondicionadas por 1 hora en dosis de 10 ng/mLy 50 ng/mLde Rapamicina, luego incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) en relación 1:10 por 3 días. El efecto inmunosupresor se expresa en A) la disminución del índice de proliferación de linfocitos y en B) el porcentaje de linfocitos proliferantes. Se grafican X±DS. **Análisis estadístico *Test Friedman* ***P<0,0001 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test* ***P<0,0005 **P<0,005. (N=3; n=3)**

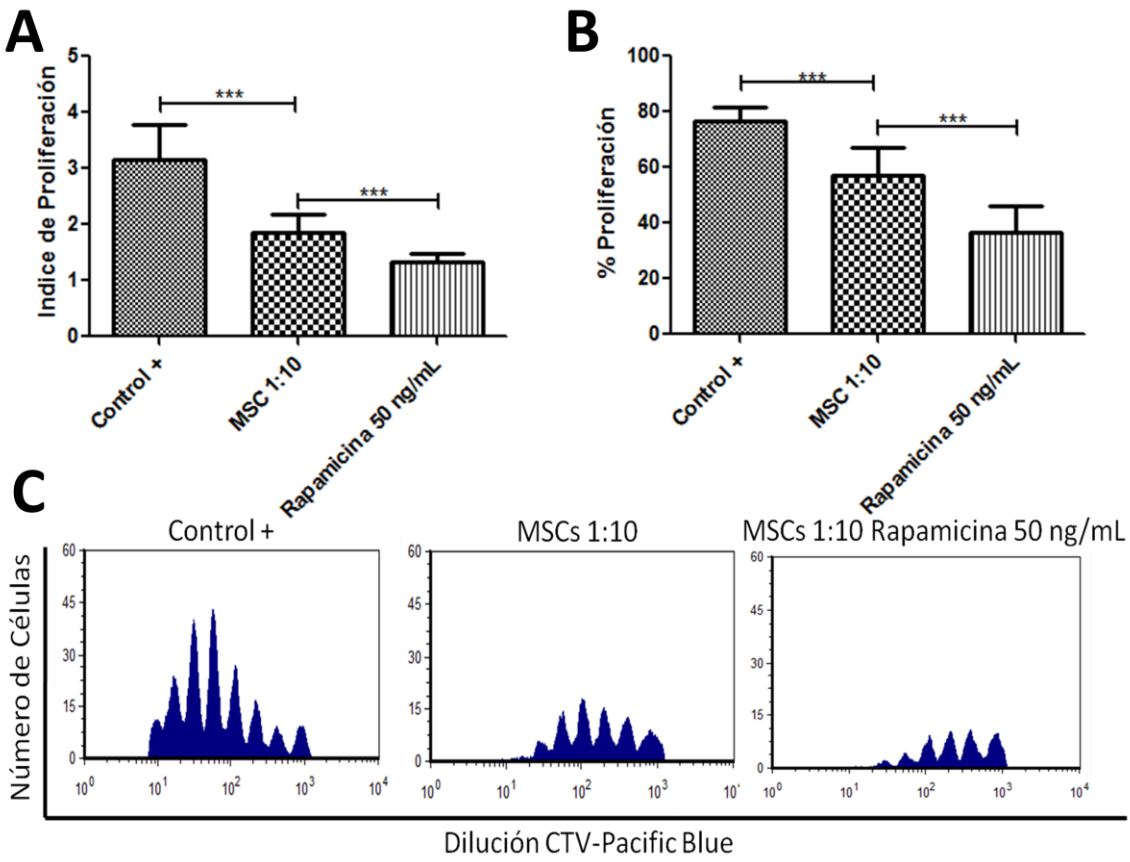


Figura 19: Pre-acondicionamiento con Rapamicina 50 ng/mL por 1 hr. Aumenta la capacidad inmunosupresora de MSCs. MCSs fueron pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL por una hora, luego incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) por 3 días, siendo el pre-acondicionamiento con 50 ng/mLde Rapamicina la que mostró un mayor efecto inmunosupresor expresado como la A) disminución del índice de proliferación de linfocitos y B) la disminución del porcentaje de linfocitos proliferantes**.** Se grafican X±DS. C) se muestra la distribución del número de células según ciclo de dilución de CellTrace™ Violet. Se grafica mediante histograma. **Análisis estadístico *Test Friedman* ***P<0,0001 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitneytwotail T test* ***P<0,0005. (N=6; n=3)**

Una vez establecida la concentración óptima para aumentar el efecto inmunosupresor, se determinó que no existen diferencias signicativas entre el pre-acondicionamiento de una hora o de veinticuatro horas con Rapamicina 50 ng/mL, en cuanto a la capacidad de inhibir la proliferacion de linfocitos activados (Figura 20).

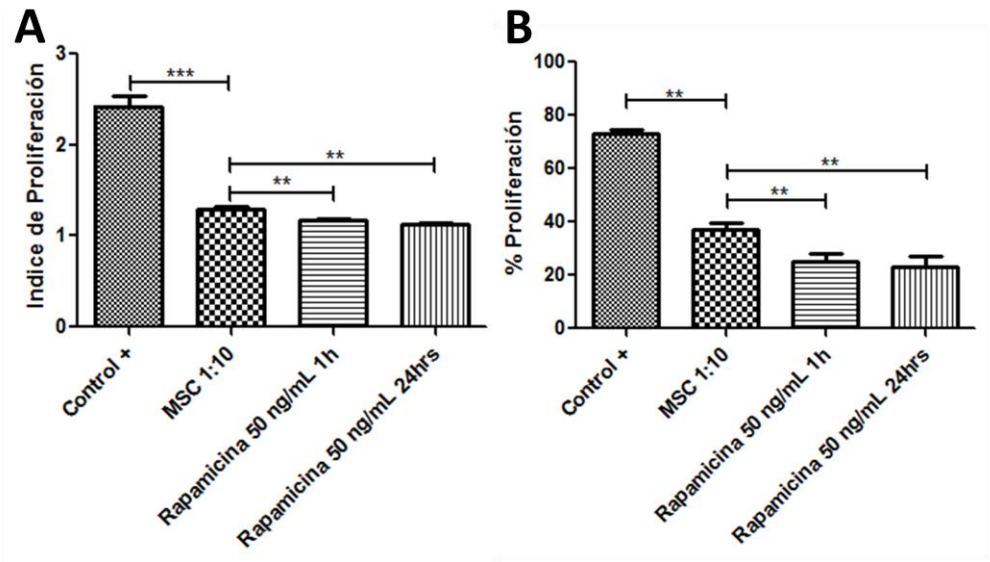


Figura 20: Pre-acondicionamiento con Rapamicina 50 ng/mL por 1 hr o 24 hrs. no presenta diferencias en la capacidad inmunosupresora de MSCs. MCSs fueron pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mLpor 1 o 24 horas, luego incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) por 3 días, no se observa diferencias a distintos tiempos de pre-acondicionamiento en el efecto inmunosupresor expresado como la A) disminución del índice de proliferación de linfocitos y B) la disminución del porcentaje de linfocitos proliferantes. Se grafica X±DS. **Análisis estadístico *Test Friedman* ***P<0,0001 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test* **P<0,005. (N=2; n=3)**

Metformina se ha establecido como otro inhibidor de la vía de señalización mTOR, pero a diferencia de Rapamicina, este inhibidor lo hace activando el intermediario AMPK ubicado rio arriba de mTOR. Se evaluó la capacidad de MSCs pre-acondicionadas con Metformina 5 y 10 µM, de inhibir la proliferación de linfocitos activados en comparación con MSCs sin pre-acondicionamiento. Se determinó que en ninguna condición antes mencionada se evidencia un aumento en las capacidades inmunosupresoras de MSCs (Figura 21).

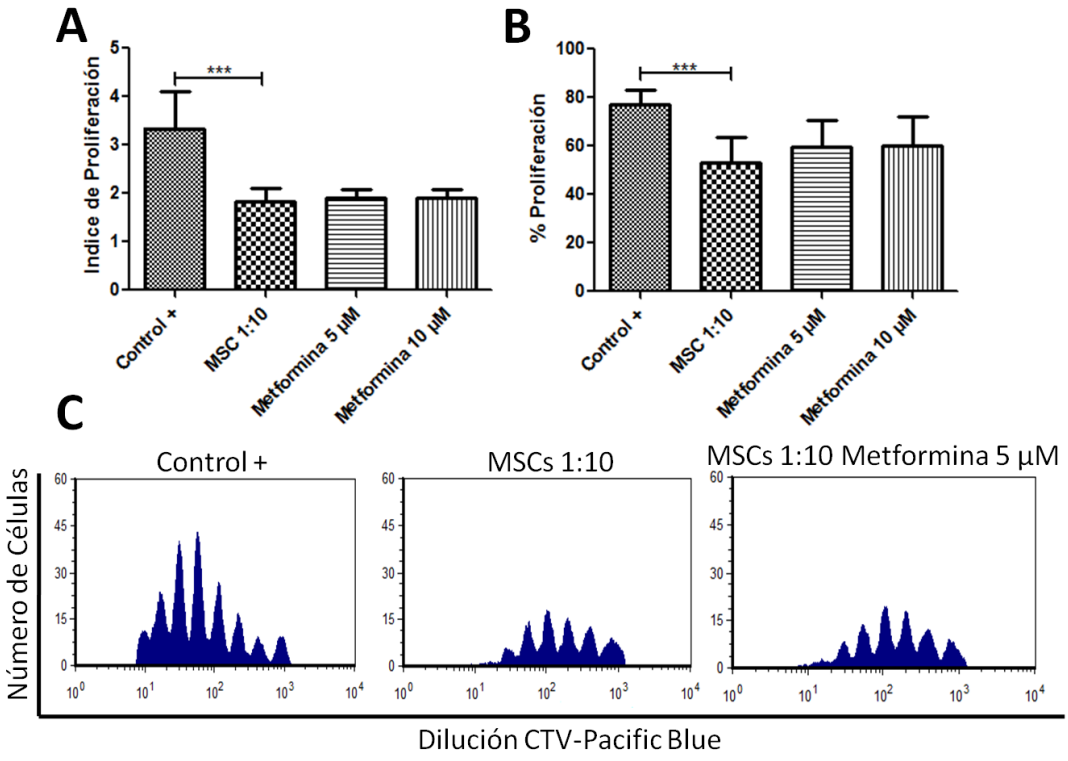


Figura 21: Evaluación del pre-acondicionamiento de MSCs a dosis de Metformina 5 y 10 µM. MSCs fueron incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) en relación 1:10 por 3 días, luego de ser pre-acondicionadas por 1 hora en dosis de 5 µM y 10 µM de Metformina. El efecto inmunosupresor se expresa en A) la disminución del índice de proliferación de linfocitos y en B) el porcentaje de linfocitos proliferantes. Se grafican X±DS. C) se muestra la distribución del número de células según ciclo de dilución de CellTrace™ Violet. Se grafica mediante histograma. **Análisis estadístico *Test Friedman* ***P<0,0001 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitneytwotail T test* ***P<0.0005 (N=3; n=3)**

4. Determinación de la concentración de nitritos en sobrenadantes de ensayos de co-cultivo.

Según estudios previos, la secreción de NO por parte de las células madre Mesenquimales murinas, sería uno de los principales mecanismos por los cuales ejerce su efecto inmunosupresor. El NO es un metabolito bastante reactivo y permanece por muy corto tiempo como tal, pudiendo oxidarse o reducirse dependiendo las condiciones del medio. Se determinó la concentración de nitritos en sobrenadante de ensayos de co-cultivo de MSCs con linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL), mediante reacción de Griess. No se evidencian diferencias de concentración de nitritos en los sobrenadantes de ninguno de los pre-acondicionamientos comparados con la producción de nitritos por

parte de MSCs no pre-acondicionadas. Por lo tanto en este caso la generación de nitritos, producto de NO, no estaría relacionado con la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos ni seria modulada por el pre-acondicionamiento de MSCs (Figura 22).

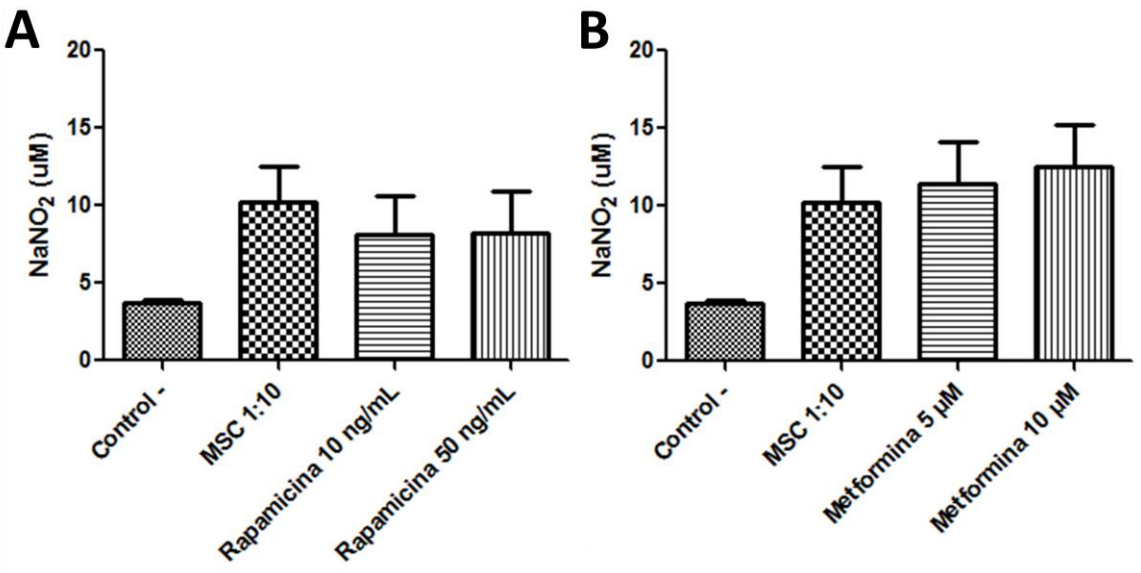


Figura 22: Secreción de nitritos no está modulada por el pre-acondicionamiento de MSCs. Cuantificación de nitritos por reacción de Griess en sobrenadantes de co-cultivo de MSCs con linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) por 3 días. **Análisis estadístico *One Way ANOVA* y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test*. (N=3; n=3)**

5. Determinación de la capacidad inmunosupresora de MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL y Metformina 5 µM.

Para determinar si existe sinergismo entre la acción farmacológica de los dos compuestos se procedió a realizar un pre-acondicionamiento conjunto con Rapamicina 50 ng/mL y Metformina 5 µM lo que no representa un aumento significativo, comparado con el efecto obtenido con el pre-acondicionamiento con Rapamicina por sí sola (Figura 23).

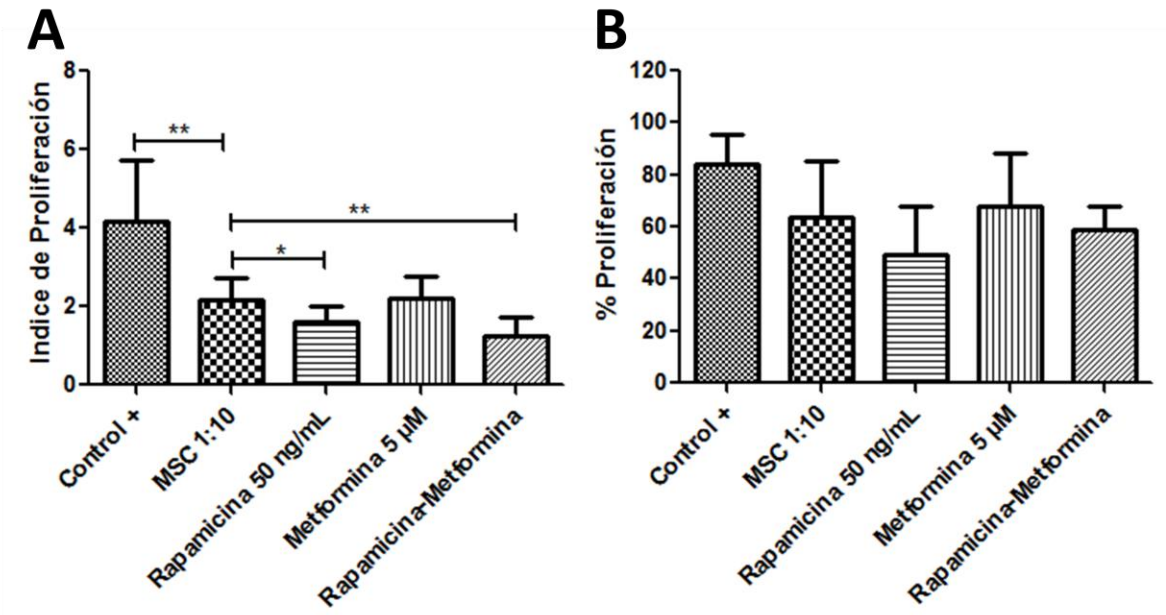


Figura 23: Evaluación del pre-acondicionamiento con Rapamicina 50 ng/mLen conjunto con Metformina 5 µM por 1 hr. Las MCSs fueron pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mLy Metformina 5 µM por una hora, luego incubadas en presencia de linfocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) por 3 días. El pre-acondicionamiento con ambas drogas no mostró un mayor efecto inmunosupresor expresado como la A) disminución del índice de proliferación de linfocitos y B) la disminución del porcentaje de linfocitos proliferantes. Se grafica X±DS. **Análisis estadístico *Test Friedman* **P<0,001 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitneytwotail T test* *P<0,05 **P<0,005. (N=2; n=3)**

6. Determinación de la expresión de genes relacionados con la capacidad inmunosupresora de las MSCs.

Se determinó la expresión relativa de algunos genes que codifican proteínas que se han propuesto como responsables del mecanismo por el que MSCs ejercen su efecto inmunosupresor. Se evidenció que el pre-acondicionamiento modula la expresión de estos genes pero no tienen relación coherente con un fenotipo inmunosupresor, se observa un aumento en la expresión tanto de genes anti-inflamatorios (iNOS y COX2) como de genes pro-inflamatorios (IL6 e IL8) en células pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL al igual que el pre-acondicionamiento de Rapamicina más Metformina. El pre-acondicionamiento con Metformina por si sola parece no modular en la misma medida que lo hace el pre-acondicionamiento con Rapamicina, sin embargo cuando se somete a las MSCs al pre-acondicionamiento de ambas drogas, existe un sinergismo en cuanto a la modulación de genes relacionados a la capacidad inmunosupresora de MSCs (Figura 24).

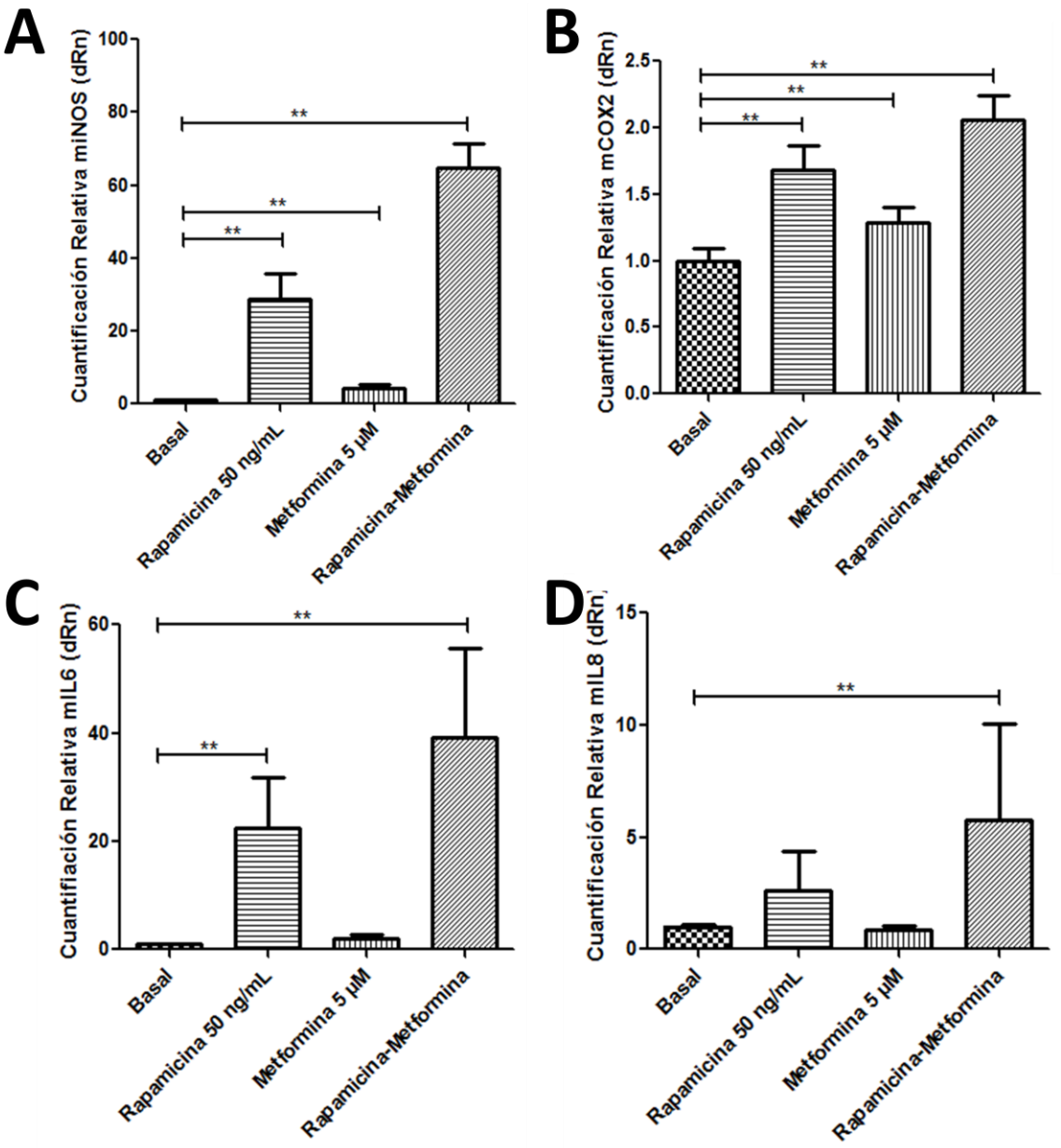
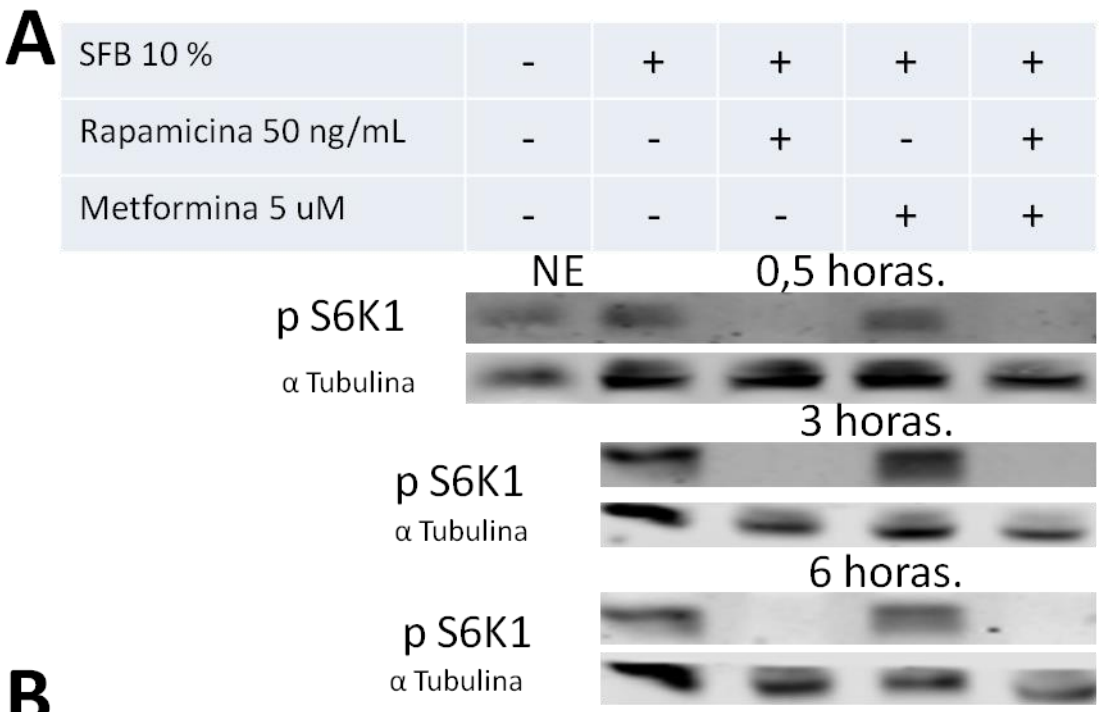


Figura 24: Aumento de la expresión relativa de iNOS y COX2 en MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina (Rapa) 50 ng/mLy en conjunto con Metformina (Met) 5 µMpor 1 hr se relaciona con aumento en la capacidad inmunosupresora. A) Las MSCs fueron sembradas 10.000 celulas/cm^2 por 24hrs para luego pre-condicionar las MSCs por 1 hora para la cosecha de células luego de 24 hrs. Resultados de la expresión relativa de A) iNOS B) COX2 C) IL6 C) IL8 por RT-PCR en tiempo real. Se grafica X±DS. **Análisis estadístico *OneWay ANOVA* *P<0,05 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitneyonetail T test* *P<0,05. (N=2; n=3)**

7. Determinación del estado de fosforilación de la vía de señalización mTOR en células MSCs pre-acondicionadas.

Se determinó el estado de forsforilación mediante Western Blot del intermediario río abajo de la vía de señalización Akt/mTOR. Los resultados demuestran que el estímulo de factores tróficos contenidos en SFB es capaz de fosforilar la proteína S6K1, lo que da cuenta de la capacidad de censar nutrientes que tiene esta vía de señalización. Además se evidencia que Rapamicina 50 ng/mL es capaz de inhibir la fosforilación del intermediario, lo que sería concordante con su efecto inhibidor de mTOR. Sin embargo, Metformina no fue capaz de revertir la fosforilación del intermediario. La acción conjunta de las drogas logra revertir la fosforilación pero sería un efecto atribuible a Rapamicina. Por otro lado, se observó que este efecto se mantiene durante 0,5; 3 y 6 horas después del pre-acondicionamiento (Figura 25).



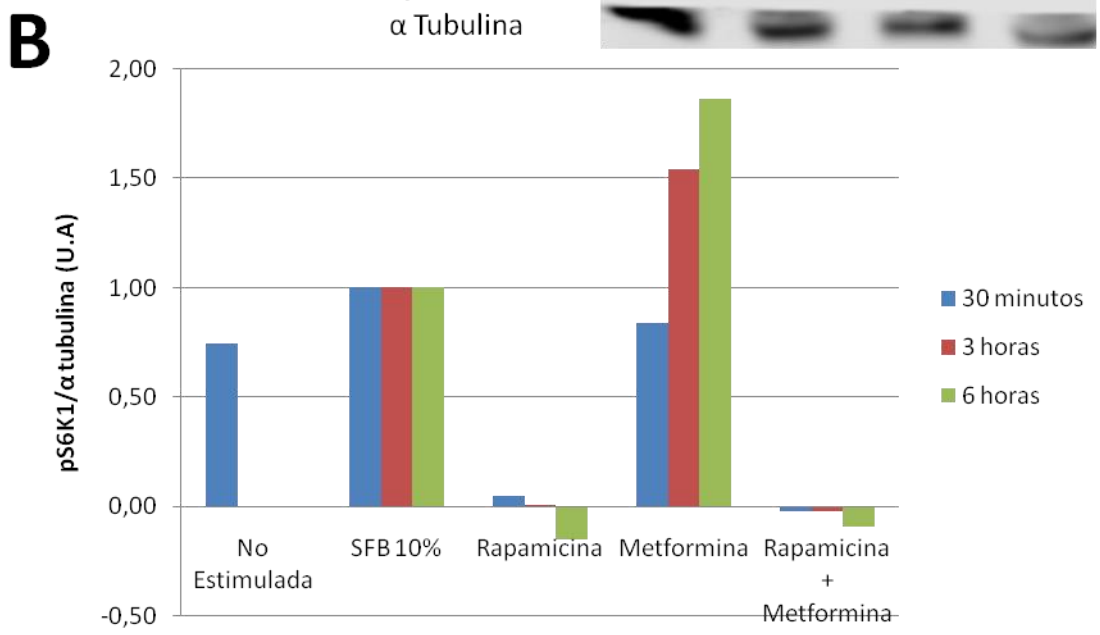


Figura 25: A) Rapamicina 50 ng/mLes capaz de revertir la fosforilación que producen los factores tróficos contenidos en el SFB 10% en el que se cultivan las MSCs. Se sembraron 20.000 células/cm2 por 24 hrs para proseguir con una deprivación de suero por 16 horas, para luego pre-condicionar las células en medio normal de cultivo (10% SFB) a 0,5; 3 , 6 horas. NE no estimulado. B) Grafico de la razón de señales obtenidas por las muestras en comparación con el control de carga α Tubulina.

8. Artritis inducida por colágeno.

Se evaluó el potencial terapéutico de las MSCs pre-acondicionadas en un modelo de artritis reumatoide murino inducida por colágeno. La inyección i.p. de MSCs logró disminuir los signos clínicos, sin embargo no de manera significativa, se observa una disminución en el promedio de los signos clínicos durante el curso posterior a la sincronización, comparado con el grupo inyectado con PBS. Paradójicamente a lo observado *in vitro* el pre-acondicionamiento con Rapamicina 50 ng/mL no mostró un comportamiento diferente en la disminución de signos clínicos en comparación con el grupo de MSCs no pre-acondicionadas, mientras que el grupo de MSCs pre-acondicionadas con Metformina 5 µM lograron disminuir significativamente los signos clínicos de la enfermedad (Figura 26). El pre-acondicionamiento en conjunto con Rapamicina y Metformina, logró disminuir los signos clínicos, sin embargo no en la misma magnitud que lo hizo el tratamiento con MSCs pre-acondicionadas con Metformina 5 µM.

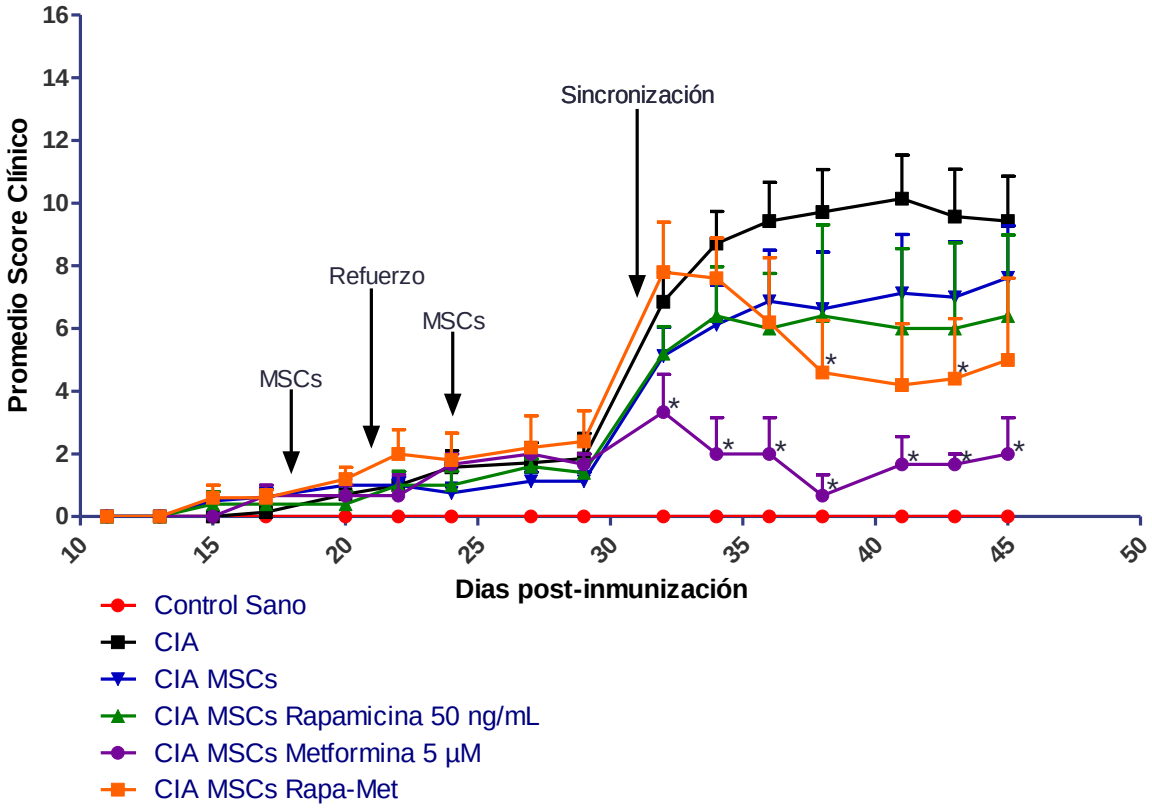


Figura 26: Pre-acondicionamiento con Metformina 5 µM aumenta las capacidades inmunosupresoras de MSCs expresado en la capacidad de disminuir signos clínicos en Artritis inducida por colágeno. Cada grupo experimental tiene 3-8 ratones. Se pre-condicionaron las MSCs como se indica por 1 hora para posterior inyección de 2,5X10^6 de MSCs en los días post-inmunización 18 y 24.Medición de Score según el siguiente esquema 0=sin hinchazón,1= hinchazón de los tobillos, 2= hinchazón de huesos tarsales, 3= hinchazón y edema en pata completa y 4=máximo edema y deformación. Se gráfica X±SEM. **Análisis estadístico *One Way ANOVA* *P<0,05 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test* *P<0,05.**

También se evaluó la hinchazón articular producida por la generación de artritis inducida por colágeno, procedimiento que se llevó a cabo en conjunto con la medición de los signos clinicos. Los hallazgos medidos por signos clinicos aparentes se correlacionan con lo obtenido al medir la hinchazon articular, ya que se muestra que el diámetro articular de los ratones tratados con MSCs pre-acondicionadas con Metformina 5 µM disminuye en comparación con los ratones no tratados, además se hace más evidente el efecto del pre-acondicionamiento de ambas drogas, efecto atribuido al pre-acondicionamiento con Metformina (Figura 27).

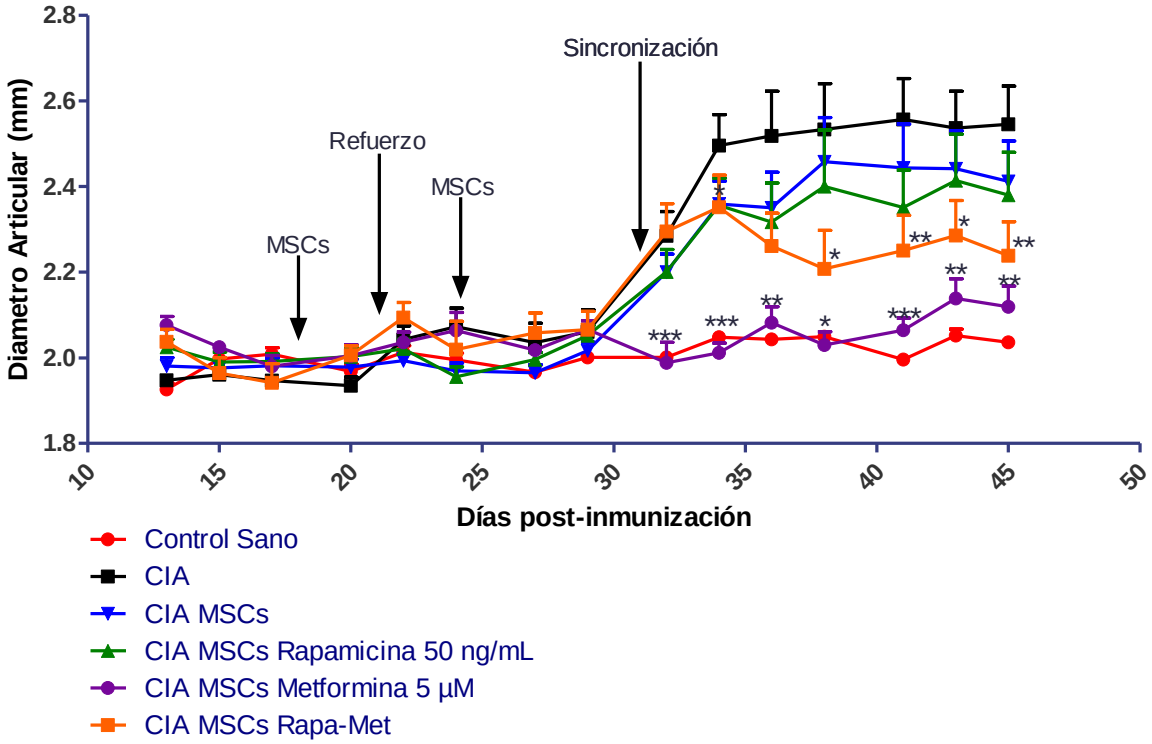


Figura 27: Pre-acondicionamiento con Metformina 5 µM aumenta las capacidades inmunosupresoras de MSCs expresado en la capacidad de disminuir el diametro articular en Artritis Reumatoide inducida por colágeno. Cada grupo experimental tiene 3-8 ratones. Se pre-condicionaron MSCs como se indica por 1 hora para posterior inyección de $2{,}5X10^6$ de MSCs en los días post-inmunización 18 y 24. Se determinó el diámetro articular mediante Caliper digital. Se grafica X±SEM. **Análisis estadístico *One Way ANOVA* *P<0,05 y la comparación entre grupos experimentales por *Mann Whitney two tail T test* ***P<0,0005, **P<0,005, *P<0,05.**

También se registró la disminución del peso de los ratones. No se observan diferencias significativas entre los distintos grupos experimentales con CIA y el grupo control sano no evidencia una pérdida de peso que pudiese sugerir la existencia de alguna enfermedad subyacente. De esta forma se confirma que los efectos medidos forman parte de los efectos de la inducción de artritis y no por un efecto de la disminución del peso de los animales o de otras factores que pudiesen alterar este parámetro (Figura 28).

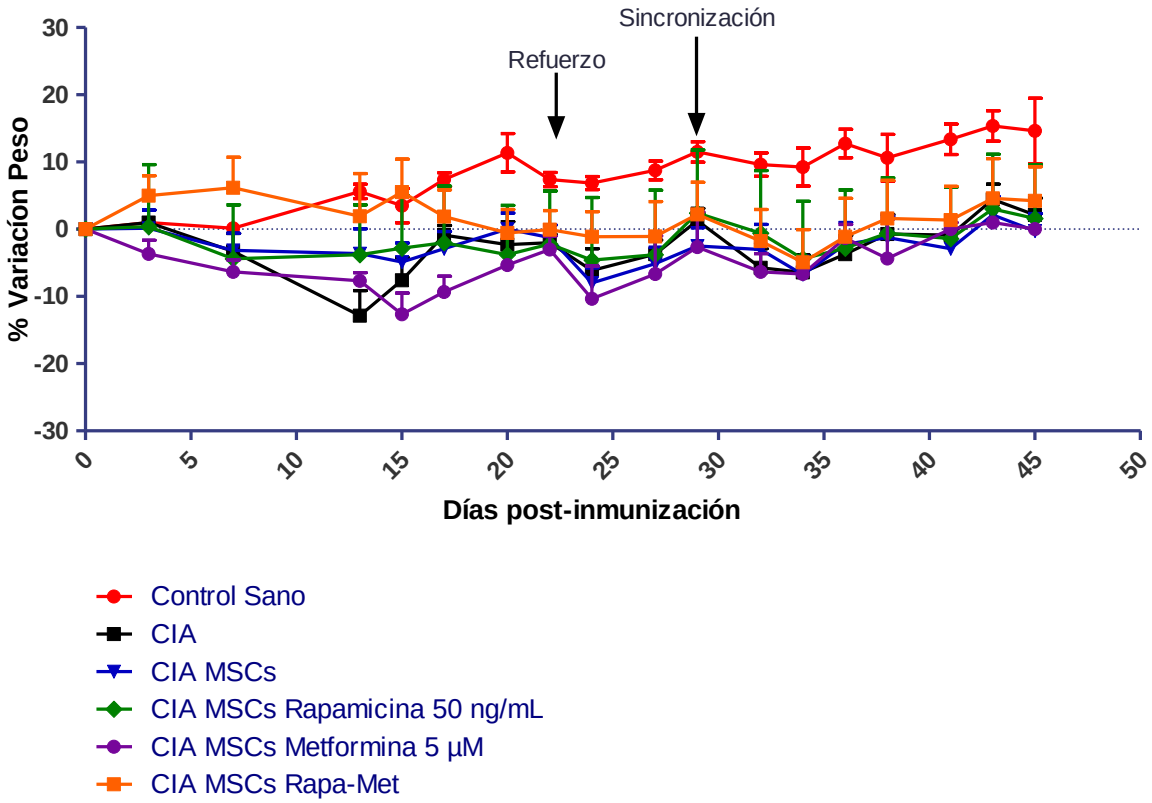


Figura 28: Efecto sobre el peso de los animales por grupo experimental, a lo largo del modelo de artritis reumatoide murina inducida por colágeno. . Cada grupo experimental tiene 3-8 ratones. Se pre-condicionaron MSCs como se indica por 1 hora para posterior inyección de $2{,}5X10^6$ de MSCs en los días post-inmunización 18 y 24. Se grafica X±SEM.

Discusión

Durante los últimos años, el uso de las células madre mesenquimales se ha convertido en una excelente estrategia terapéutica para el tratamiento de diversas patologías pro-inflamatorias y autoinmunes. Sin embargo, los mecanismos por los cuales las MSCs ejercen su acción aún son desconocidos, aunque se han propuesto algunas alternativas. Es necesario una mejor comprensión de las interacciones que se producen entre MSCs y células especializadas del sistema inmune, para optimizar las aplicaciones terapéuticas y para validar el fuerte potencial de las MSCs en el tratamiento de enfermedades reumatológicas [100]. Esto sumado a que algunos trabajos científicos describen un efecto opuesto en patologías autoinmunes, ha impulsado la búsqueda de nuevos enfoques para la obtención de MSCs con capacidades inmunosupresoras potenciadas. En este contexto el objetivo de este trabajo fue estudiar si el bloqueo farmacológico de la vía de señalización de Akt/mTOR pudiese estar modulando el efecto inmunosupresor de las MSCs. Para el bloqueo farmacológico se utilizó Rapamicina y Metformina, considerando que son drogas seguras, aprobadas por la *Food and Drug Administration*, y utilizadas ya sea para el tratamiento de la enfermedad de injerto contra hospedero en el caso de Rapamicina, o para el tratamiento de DM2 en el caso de Metformina. En primera instancia, se demostró que las células obtenidas de médula ósea cumplen con los criterios descritos por la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ICST) y para esto, hay que considerar que los marcadores de membrana en MSCs pueden mostrar diferencias según su origen humano o murino, incluso distintas cepas murinas presentan variación en los niveles de expresión en marcadores de membrana [101]. La expresión de los marcadores de membrana descritos como hematopoyéticos en cepas C57BL/6 son: CD34+ (más del 75%), CD45- (menos del 2%) y SCA1 (más del 75%) [101], por otro lado se han determinado marcadores propios de MSCs son: CD34-, CD45-, CD117- (cKit), HLA- (menos del 2%), CD13+, CD29+, CD44+, CD73+, CD90+, CD105+, y CD166+ (más del 75%) [102]. Además, la capacidad inmunosupresora se establece como un criterio de caracterización, es así como MSCs tienen la capacidad de disminuir la respuesta inmune, en cuanto a la

capacidad de disminuir la proliferación de linfocitos en co-cultivo con MSCs, establecida primeramente por *Bartholomew et al.2002* quien disminuyó la reactividad linfocitaria ante células alogénicas poniéndolas en co-cultivo con MSCs [31]. Los resultados presentados en este estudio, demuestran que MSCs obtenidas de medula ósea de ratón C57BL/6 presentan la morfología, la adherencia al plástico y los marcadores de membranas descritos para este tipo celular, además son capaces de inhibir la proliferación linfocitaria de linfocitos activados por el mitógeno policlonal Concanavalina A (0,5 ug/mL).

La vía de señalización de mTOR ha captado el interés científico de los recientes años debido a que es un circuito de control de los más fundamentales aspectos del metabolismo, tales como: crecimiento celular, proliferación, sobrevida y diferenciación; a un nivel celular y de sistemas [103]. mTORC1, isoforma sensible a la disponibilidad de nutrientes, es también el mayor regulador de procesos de autofagia, que es una respuesta celular adaptativa a la deprivación de nutrientes, y que permite la muerte celular [104]. La desregulación de la vía de señalización de Akt/mTOR es comúnmente evidenciada en la progresión de algunos canceres y se ha establecido una relación entre los factores inflamatorios comúnmente liberados por células cancerígenas (TNF-α) y la activación de mTOR [105]. Por otro lado, se ha establecido una relación entre el envejecimiento celular y la actividad de mTOR [78,106,107]. El envejecimiento celular está asociado a una pérdida de la auto-renovación y potencial de diferenciación en MSCs, estos cambios son similares o más pronunciados durante el cultivo celular *in vitro* [107]. Está pérdida de la auto-renovación y funciones de MSCs está asociada a la acumulación de daño celular [65,108] algunos estudios demuestran que la inhibición a largo plazo de Akt/mTOR con Rapamicina mantiene un estado indiferenciado, manteniendo alta clonogenicidad y disminuyendo el daño al ADN en MSCs [107]. Por otro lado, se ha establecido que Metformina podría reducir la apoptosis en MSCs durante la isquemia e Hipoxia/deprivación de suero, debido a que reducen procesos de autofagia por medio de inhibición de mTOR [109]. Con estos antecedentes, en este estudio se identificó la vía de señalización de mTOR, como un potencial blanco farmacológico que podría modificar la

capacidad inmunosupresora de MSCs. Según los resultados obtenidos, el pre-acondicionamiento a corto plazo (una hora) con Rapamicina (50 ng/mL) es capaz de aumentar las capacidades inmunosupresoras de MSCs *in vitro* a pesar que el estímulo inhibitorio de mTOR a corto plazo no ha sido estudiado y no se podría atribuir este efecto a la generación de un fenotipo quiescente, una disminución en la autofagia o a una disminución en el daño celular, lo que podría explicar el aumento en la capacidad inmunosupresora. A pesar de aumentar las capacidades inmunosupresoras *in vitro* la infusión de MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina, en un modelo de AR *in vivo,* no logró disminuir los signos clínicos de la enfermedad. Este efecto se puede producir debido a que tanto en el torrente sanguíneo como en el lugar en donde se alojan las MSCs, existen muchos factores que podrían revertir el efecto del pre-acondicionamiento o modificar otros aspectos del metabolismo de MSCs. Está descrito que el nivel de citoquinas presentes en circulación en un modelo *in vivo,* pueden cambiar el efecto que tienen las MSCs según el estadio de la enfermedad [57,110] y esta discrepancia entre los eventos que se demuestran *in vivo* e *in vitro* en un modelo de CIA también fue descrita por *Schurger y col. 2010* [56].

Mediante la cuantificación relativa de la expresión de genes relacionados con fenotipos pro o anti-inflamatorios se intentó proponer un mecanismo por el cual el pre-acondicionamiento con Rapamicina ejerce el aumento en la capacidad inmunosupresora, sin embargo, no es posible concluir un factor debido a que después del pre-acondicionamiento con Rapamicina, aumenta la expresión de genes relacionados con un fenotipo anti-inflamatorio como COX2 o iNOS y también los relacionados con un fenotipo pro-inflamatorio como IL6, sin embargo, existe evidencia que plantea que IL6 podría ser considerado como un producto anti-inflamatorio [111].

Metformina por otro lado, no logró aumentar las capacidades inmunosupresoras de MSCs *in vitro* a pesar que, al igual que Rapamicina, virtualmente anula la activación de mTOR (medido como la fosforilación de S6K1 en Thr^{389}) [112]. En esta investigación, la evaluación del estado de fosforilación del intermediario S6K1 en MSCs con pre-

acondicionamiento de Metformina, no logró revertir la fosforilación de este intermediario. Este resultado paradójico puede explicarse debido a que las publicaciones que reportan a Metformina como un inhibidor de la vía de mTOR utilizan concentraciones de 1 mM y cuando se evalúan concentraciones más pequeñas como 50 µM se revierte el efecto inhibidor evidenciado por la fosforilación de S6K1, por lo tanto, la concentración 5 µM utilizada de Metformina para el pre-acondicionamiento, no es suficiente para lograr la inhibición de la vía de señalización de mTOR, por lo que se explica su incapacidad de aumentar las capacidades inmunosupresoras de MSCs como lo hizo Rapamicina. Interesantemente, la infusión de MSCs pre-acondicionadas con Metformina (5 µM) por una hora, indujo una disminución significativa de los signos clínicos de la enfermedad, esto plantea la interrogante que, a la dosis utilizada, estaría ejerciendo una acción farmacológica a un nivel distinto de la via de Akt/mTOR y que permitió la disminución de signos clínicos en el modelo de AR. Por otro lado, reafirma la proyección de que es necesario optimizar el modelo *in vitro*, en cuanto al efecto del licenciamiento de MSCs por las citoquinas e interleucinas presentes en el circulación en un modelo *in vivo,* variable que podría aumentar la representatividad de los efectos demostrados *in vitro*.

Conclusiones

1. Las células extraídas de medula ósea de ratón cepa C57BL/6 cumplen con lo descrito para ser consideradas MSCs.
2. Las MSCs logran inhibir la proliferación de Esplenocitos activados por Concanavalina A (0,5 ug/mL) en relación 1:10 (MSCs:Esplenocitos), lo que demuestra su efecto inmunosupresor.
3. El pre-acondicionamiento de las MSCs con Rapamicina 50 ng/mL por una hora, es capaz de aumentar las capacidades inmunosupresoras comparadas con MSCs sin pre-acondicionamiento, mientras que el pre-acondicionamiento con Metformina no modifica las capacidades inmunosupresoras.
4. El pre-acondicionamiento de las MSCs no altera la concentración de nitritos, producto de NO, como posible mecanismo inmunosupresor.
5. Las MSCs pre-acondicionadas en conjunto con Metformina 5 µM y Rapamicina 50 ng/mL no muestran un aumento en sus capacidades inmunosupresoras comparadas con las células pre-acondicionadas con Rapamicina por sí sola.
6. Las MSCs inducen una disminución de los signos clínicos de AR, aunque los cambios no fueron significativos.
7. MSCs pre-acondicionadas con Rapamicina 50 ng/mL por una hora no lograron disminuir los signos clínicos en el modelo de AR.
8. MSCs pre-acondicionadas con Metformina 5 µM lograron disminuir los signos clínicos de AR de manera significativa.
9. El pre-acondicionamiento de MSCs con la asociación Rapamicina-Metformina lograron disminuir los signos clínicos en el modelo de AR, sin embargo no en la misma magnitud que lo hizo las MSCs pre-acondicionadas con Metformina por sí sola.
10. Los resultados obtenidos *in vitro* no reflejan los efectos en la progresión de signos clínicos de AR, debido a que las condiciones de cultivo no reúnen los factores que permitan prever el comportamiento de MSCs infundidas en un modelo *in vivo.*

Bibliografía.

[1] Tornero Molina J, Sanmarti Sala R, Rodriguez Valverde V, Martin Mola E, Marenco de la Fuente JL, Gonzalez Alvaro I, Munoz Fernandez S, Gomez-Reino Carnota J, Carreno Perez L, Batlle Gualda E, Balsa Criado A, Andreu JL, Alvaro-Gracia JM, Martinez Lopez JA, Loza Santamaria E. [Update of the Consensus Statement of the Spanish Society of Rheumatology on the management of biologic therapies in rheumatoid arthritis]. Reumatol Clin 2010;6:23-36.

[2] Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Type 17 T helper cells-origins, features and possible roles in rheumatic disease. Nat Rev Rheumatol 2009;5:325-331.

[3] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis. Lancet 2009;373:659-672.

[4] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 1988;31:315-324.

[5] GUÍA CLÍNICA ARTRITIS REUMATOIDEA. In: Ministerio de Salud M, editor: Santiago, 2007.

[6] CENSO. In: INE, editor, 2002.

[7] Silman AJ, Hochberg MC, Cooper C. Epidemiology of the rheumatic diseases. Oxford University Press: Oxford,2001.

[8] Riedemann J, Maluje V. Epidemiología de las Enfermedades Reumatologicas en Chile. Proyecto Fondecyt 1930390 1993.

[9] Spector TD. Rheumatoid arthritis. Rheum Dis Clin North Am 1990;16:513-537.

[10] Pincus T. Assessment of long-term outcomes of rheumatoid arthritis. How choices of measures and study designs may lead to apparently different conclusions. Rheum Dis Clin North Am 1995;21:619-654.

[11] Newhall-Perry K, Law NJ, Ramos B, Sterz M, Wong WK, Bulpitt KJ, Park G, Lee M, Clements P, Paulus HE. Direct and indirect costs associated with the onset of seropositive rheumatoid arthritis. Western Consortium of Practicing Rheumatologists. J Rheumatol 2000;27:1156-1163.

[12] Chang C. Unmet needs in the treatment of autoimmunity: From aspirin to stem cells. Autoimmun Rev 2014;13:331-346.

[13] Reynolds G, Cooles FA, Isaacs JD, Hilkens CM. Emerging immunotherapies for rheumatoid arthritis. Hum Vaccin Immunother 2014;10.

[14] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nat Rev Immunol 2008;8:726-736.

[15] Malgieri A, Kantzari E, Patrizi MP, Gambardella S. Bone marrow and umbilical cord blood human mesenchymal stem cells: state of the art. Int J Clin Exp Med 2010;3:248-269.

[16] Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991;9:641-650.

[17] Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human

mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147.

[18] Kawashima N. Characterisation of dental pulp stem cells: a new horizon for tissue regeneration? Arch Oral Biol 2012;57:1439-1458.

[19] Campagnoli C, Roberts IA, Kumar S, Bennett PR, Bellantuono I, Fisk NM. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood 2001;98:2396-2402.

[20] Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? Osteoarthritis Cartilage 2005;13:845-853.

[21] Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell 2002;13:4279-4295.

[22] Muguruma Y, Yahata T, Miyatake H, Sato T, Uno T, Itoh J, Kato S, Ito M, Hotta T, Ando K. Reconstitution of the functional human hematopoietic microenvironment derived from human mesenchymal stem cells in the murine bone marrow compartment. Blood 2006;107:1878-1887.

[23] Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. Eur J Immunol 2006;36:2566-2573.

[24] Jones S, Horwood N, Cope A, Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. J Immunol 2007;179:2824-2831.

[25] Kim DH, Yoo KH, Choi KS, Choi J, Choi SY, Yang SE, Yang YS, Im HJ, Kim KH, Jung HL, Sung KW, Koo HH. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. Cytokine 2005;31:119-126.

[26] Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. J Cell Biochem 2006;98:1076-1084.

[27] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy 2006;8:315-317.

[28] Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. J Inflamm (Lond) 2005;2:8.

[29] Majumdar MK, Keane-Moore M, Buyaner D, Hardy WB, Moorman MA, McIntosh KR, Mosca JD. Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. J Biomed Sci 2003;10:228-241.

[30] Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. Exp Hematol 2003;31:890-896.

[31] Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol 2002;30:42-48.

[32] Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. Blood 2002;99:3838-3843.

[33] Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koc ON. Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. Exp Hematol 2005;33:928-934.

[34] Huang W, La Russa V, Alzoubi A, Schwarzenberger P. Interleukin-17A: a T-cell-derived growth factor for murine and human mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006;24:1512-1518.

[35] Krampera M, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. Stem Cells 2006;24:386-398.

[36] English K, Ryan JM, Tobin L, Murphy MJ, Barry FP, Mahon BP. Cell contact, prostaglandin E(2) and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4+CD25(High) forkhead box P3+ regulatory T cells. Clin Exp Immunol 2009;156:149-160.

[37] Zaher SS, Germain C, Fu H, Larkin DF, George AJ. 3-hydroxykynurenine suppresses CD4+ T-cell proliferation, induces T-regulatory-cell development, and prolongs corneal allograft survival. Invest Ophthalmol Vis Sci 2011;52:2640-2648.

[38] Ermert L, Ermert M, Goppelt-Struebe M, Walmrath D, Grimminger F, Steudel W, Ghofrani HA, Homberger C, Duncker H, Seeger W. Cyclooxygenase isoenzyme localization and mRNA expression in rat lungs. Am J Respir Cell Mol Biol 1998;18:479-488.

[39] Jarvinen L, Badri L, Wettlaufer S, Ohtsuka T, Standiford TJ, Toews GB, Pinsky DJ, Peters-Golden M, Lama VN. Lung resident mesenchymal stem cells isolated from human lung allografts inhibit T cell proliferation via a soluble mediator. J Immunol 2008;181:4389-4396.

[40] Sato K, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. Blood 2007;109:228-234.

[41] Selmani Z, Naji A, Zidi I, Favier B, Gaiffe E, Obert L, Borg C, Saas P, Tiberghien P, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Deschaseaux F. Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4+CD25highFOXP3+ regulatory T cells. Stem Cells 2008;26:212-222.

[42] Aggarwal S, Pittenger MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood 2005;105:1815-1822.

[43] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, Egalka MC, Guinan EC. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. Transplantation 2003;75:389-397.

[44] Yagi H, Soto-Gutierrez A, Parekkadan B, Kitagawa Y, Tompkins RG, Kobayashi N, Yarmush ML. Mesenchymal stem cells: Mechanisms of immunomodulation and homing. Cell Transplant 2010;19:667-679.

[45] Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood 2004;103:4619-4621.

[46] Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma,

indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J 1991;5:2516-2522.

[47] Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol 2000;164:3596-3599.

[48] Lei J, Hui D, Huang W, Liao Y, Yang L, Liu L, Zhang Q, Qi G, Song W, Zhang Y, Xiang AP, Zhou Q. Heterogeneity of the biological properties and gene expression profiles of murine bone marrow stromal cells. Int J Biochem Cell Biol 2013;45:2431-2443.

[49] El-Jawhari JJ, El-Sherbiny YM, Jones EA, McGonagle D. Mesenchymal Stem Cells, Autoimmunity & Rheumatoid Arthritis. QJM 2014.

[50] Takano T, Li YJ, Kukita A, Yamaza T, Ayukawa Y, Moriyama K, Uehara N, Nomiyama H, Koyano K, Kukita T. Mesenchymal stem cells markedly suppress inflammatory bone destruction in rats with adjuvant-induced arthritis. Lab Invest 2014;94:286-296.

[51] Liu Y, Mu R, Wang S, Long L, Liu X, Li R, Sun J, Guo J, Zhang X, Yu P, Li C, Huang Z, Wang D, Li H, Gu Z, Liu B, Li Z. Therapeutic potential of human umbilical cord mesenchymal stem cells in the treatment of rheumatoid arthritis. Arthritis Res Ther 2010;12:R210.

[52] Greish S, Abogresha N, Abdel-Hady Z, Zakaria E, Ghaly M, Hefny M. Human umbilical cord mesenchymal stem cells as treatment of adjuvant rheumatoid arthritis in a rat model. World J Stem Cells 2012;4:101-109.

[53] Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringden O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand J Immunol 2003;57:11-20.

[54] Carrion F, Nova E, Luz P, Apablaza F, Figueroa F. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4+ T cell activation. Immunol Lett 2010;135:10-16.

[55] Bocelli-Tyndall C, Bracci L, Schaeren S, Feder-Mengus C, Barbero A, Tyndall A, Spagnoli GC. Human bone marrow mesenchymal stem cells and chondrocytes promote and/or suppress the in vitro proliferation of lymphocytes stimulated by interleukins 2, 7 and 15. Ann Rheum Dis 2009;68:1352-1359.

[56] Schurgers E, Kelchtermans H, Mitera T, Geboes L, Matthys P. Discrepancy between the in vitro and in vivo effects of murine mesenchymal stem cells on T-cell proliferation and collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2010;12:R31.

[57] Djouad F, Fritz V, Apparailly F, Louis-Plence P, Bony C, Sany J, Jorgensen C, Noel D. Reversal of the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells by tumor necrosis factor alpha in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum 2005;52:1595-1603.

[58] Sullivan C, Murphy JM, Griffin MD, Porter RM, Evans CH, O'Flatharta C, Shaw G, Barry F. Genetic mismatch affects the immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells in vitro and their ability to influence the course of collagen-induced arthritis. Arthritis Res Ther 2012;14:R167.

[59] El-Denshary ES, Rashed LA, Elhussiny M. Mesenchymal stromal cells versus betamethasone can dampen disease activity in the collagen arthritis mouse model. Clin Exp Med 2013.

[60] Fan W, Cheng K, Qin X, Narsinh KH, Wang S, Hu S, Wang Y, Chen Y, Wu

JC, Xiong L, Cao F. mTORC1 and mTORC2 play different roles in the functional survival of transplanted adipose-derived stromal cells in hind limb ischemic mice via regulating inflammation in vivo. Stem Cells 2012;31:203-214.

[61] Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AM, Eijken M, Maat LP, Balk AH, Weimar W, Baan CC. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. Transplantation 2008;86:1283-1291.

[62] Buron F, Perrin H, Malcus C, Hequet O, Thaunat O, Kholopp-Sarda MN, Moulin FT, Morelon E. Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells. Transplant Proc 2009;41:3347-3352.

[63] Sheng H, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, Shen B, Yin S, Liu W, Cui L, Li N. A critical role of IFNgamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. Cell Res 2008;18:846-857.

[64] Gharibi B, Farzadi S, Ghuman M, Hughes FJ. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. Stem Cells 2014.

[65] Zhou S, Greenberger JS, Epperly MW, Goff JP, Adler C, Leboff MS, Glowacki J. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. Aging Cell 2008;7:335-343.

[66] Alves H, Munoz-Najar U, De Wit J, Renard AJ, Hoeijmakers JH, Sedivy JM, Van Blitterswijk C, De Boer J. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. J Cell Mol Med 2010;14:2729-2738.

[67] Mamidi MK, Pal R, Govindasamy V, Zakaria Z, Bhonde R. Treat the graft to improve the regenerative ability of the host. Med Hypotheses 2011;76:599-601.

[68] Yu JM, Wu X, Gimble JM, Guan X, Freitas MA, Bunnell BA. Age-related changes in mesenchymal stem cells derived from rhesus macaque bone marrow. Aging Cell 2010;10:66-79.

[69] Chakkalakal JV, Jones KM, Basson MA, Brack AS. The aged niche disrupts muscle stem cell quiescence. Nature 2012;490:355-360.

[70] Castilho RM, Squarize CH, Chodosh LA, Williams BO, Gutkind JS. mTOR mediates Wnt-induced epidermal stem cell exhaustion and aging. Cell Stem Cell 2009;5:279-289.

[71] Gan B, DePinho RA. mTORC1 signaling governs hematopoietic stem cell quiescence. Cell Cycle 2009;8:1003-1006.

[72] Sehgal SN, Baker H, Vezina C. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. J Antibiot (Tokyo) 1975;28:727-732.

[73] Thomson AW, Turnquist HR, Raimondi G. Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. Nat Rev Immunol 2009;9:324-337.

[74] Armand P, Gannamaneni S, Kim HT, Cutler CS, Ho VT, Koreth J, Alyea EP, LaCasce AS, Jacobsen ED, Fisher DC, Brown JR, Canellos GP, Freedman AS, Soiffer RJ, Antin JH. Improved survival in lymphoma patients receiving sirolimus for graft-versus-host disease prophylaxis after allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation with reduced-intensity conditioning. J Clin Oncol 2008;26:5767-5774.

[75] Saunders RN, Metcalfe MS, Nicholson ML. Rapamycin in transplantation: a review of the evidence. Kidney Int 2001;59:3-16.

[76] Sehgal SN. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. Transplant Proc 2003;35:7S-14S.

[77] Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 1991;253:905-909.

[78] Wullschleger S, Loewith R, Hall MN. TOR signaling in growth and metabolism. Cell 2006;124:471-484.

[79] Cheng JT, Huang CC, Liu IM, Tzeng TF, Chang CJ. Novel mechanism for plasma glucose-lowering action of metformin in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes 2006;55:819-825.

[80] Wiernsperger NF, Bailey CJ. The antihyperglycaemic effect of metformin: therapeutic and cellular mechanisms. Drugs 1999;58 Suppl 1:31-39; discussion 75-82.

[81] Zhou G, Myers R, Li Y, Chen Y, Shen X, Fenyk-Melody J, Wu M, Ventre J, Doebber T, Fujii N, Musi N, Hirshman MF, Goodyear LJ, Moller DE. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. J Clin Invest 2001;108:1167-1174.

[82] Lochhead PA, Salt IP, Walker KS, Hardie DG, Sutherland C. 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside mimics the effects of insulin on the expression of the 2 key gluconeogenic genes PEPCK and glucose-6-phosphatase. Diabetes 2000;49:896-903.

[83] Evans JM, Donnelly LA, Emslie-Smith AM, Alessi DR, Morris AD. Metformin and reduced risk of cancer in diabetic patients. BMJ 2005;330:1304-1305.

[84] Bowker SL, Yasui Y, Veugelers P, Johnson JA. Glucose-lowering agents and cancer mortality rates in type 2 diabetes: assessing effects of time-varying exposure. Diabetologia 2010;53:1631-1637.

[85] Home PD, Kahn SE, Jones NP, Noronha D, Beck-Nielsen H, Viberti G. Experience of malignancies with oral glucose-lowering drugs in the randomised controlled ADOPT (A Diabetes Outcome Progression Trial) and RECORD (Rosiglitazone Evaluated for Cardiovascular Outcomes and Regulation of Glycaemia in Diabetes) clinical trials. Diabetologia 2010;53:1838-1845.

[86] Hsieh MC, Lee TC, Cheng SM, Tu ST, Yen MH, Tseng CH. The influence of type 2 diabetes and glucose-lowering therapies on cancer risk in the Taiwanese. Exp Diabetes Res 2012;2012:413782.

[87] Monami M, Colombi C, Balzi D, Dicembrini I, Giannini S, Melani C, Vitale V, Romano D, Barchielli A, Marchionni N, Rotella CM, Mannucci E. Metformin and cancer occurrence in insulin-treated type 2 diabetic patients. Diabetes Care 2010;34:129-131.

[88] Landman GW, Kleefstra N, van Hateren KJ, Groenier KH, Gans RO, Bilo HJ. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes: ZODIAC-16. Diabetes Care 2009;33:322-326.

[89] Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Cufi S, Martin-Castillo B, Menendez JA. Metformin and energy metabolism in breast cancer: from insulin physiology to tumour-initiating stem cells. Curr Mol Med 2010;10:674-691.

[90] Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:774-785.

[91] Pollak M. Insulin and insulin-like growth factor signalling in neoplasia. Nat Rev Cancer 2008;8:915-928.

[92] Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. Cell 2003;115:577-590.

[93] Shaw RJ, Bardeesy N, Manning BD, Lopez L, Kosmatka M, DePinho RA, Cantley LC. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. Cancer Cell 2004;6:91-99.

[94] Pierotti MA, Berrino F, Gariboldi M, Melani C, Mogavero A, Negri T, Pasanisi P, Pilotti S. Targeting metabolism for cancer treatment and prevention: metformin, an old drug with multi-faceted effects. Oncogene 2012;32:1475-1487.

[95] Barriere G, Tartary M, Rigaud M. Metformin: a rising star to fight the epithelial mesenchymal transition in oncology. Anticancer Agents Med Chem 2012;13:333-340.

[96] Bandow K, Kusuyama J, Kakimoto K, Ohnishi T, Matsuguchi T. AMP-activated protein kinase (AMPK) activity negatively regulates chondrogenic differentiation. Bone 2014;74C:125-133.

[97] Tenorio L. FA, del Valle M, Leonardo, Pastelín H., Gustavo. . Validación de un método analítico espectrofotométrico para la cuantificación de metabolitos estables de óxido nítrico en fluidos biológicos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas, 2005.

[98] Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. Nat Protoc 2007;2:1269-1275.

[99] Kim SH, Evans CH, Kim S, Oligino T, Ghivizzani SC, Robbins PD. Gene therapy for established murine collagen-induced arthritis by local and systemic adenovirus-mediated delivery of interleukin-4. Arthritis Res 2000;2:293-302.

[100] Djouad F, Bouffi C, Ghannam S, Noel D, Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. Nat Rev Rheumatol 2009;5:392-399.

[101] Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. Blood 2004;103:1662-1668.

[102] Maurer MH. Proteomic definitions of mesenchymal stem cells. Stem Cells Int 2011;2011:704256.

[103] Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt. Dev Cell 2007;12:487-502.

[104] Kamada Y, Sekito T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast: a TOR-mediated response to nutrient starvation. Curr Top Microbiol Immunol 2004;279:73-84.

[105] Lee DF, Hung MC. All roads lead to mTOR: integrating inflammation and tumor angiogenesis. Cell Cycle 2007;6:3011-3014.

[106] Blagosklonny MV. Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough. Aging (Albany NY) 2011;3:685-691.

[107] Gharibi B, Farzadi S, Ghuman M, Hughes FJ. Inhibition of Akt/mTOR attenuates age-related changes in mesenchymal stem cells. Stem Cells 2014;32:2256-2266.

[108] Alves H, Munoz-Najar U, De Wit J, Renard AJ, Hoeijmakers JH, Sedivy JM, Van Blitterswijk C, De Boer J. A link between the accumulation of DNA damage and loss of multi-potency of human mesenchymal stromal cells. J Cell Mol Med;14:2729-2738.

[109] Zhang Q, Yang YJ, Wang H, Dong QT, Wang TJ, Qian HY, Xu H. Autophagy activation: a novel mechanism of atorvastatin to protect mesenchymal stem cells from hypoxia and serum deprivation via AMP-activated

protein kinase/mammalian target of rapamycin pathway. Stem Cells Dev 2012;21:1321-1332.

[110] Gonzalez MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Buscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum 2009;60:1006-1019.

[111] Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. Biochim Biophys Acta 2011;1813:878-888.

[112] Soares HP, Ni Y, Kisfalvi K, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. Different patterns of Akt and ERK feedback activation in response to rapamycin, active-site mTOR inhibitors and metformin in pancreatic cancer cells. PLoS One 2013;8:e57289.

Anexos.

- Certificado de manejo de animales de experimentación
- Certificado de Bioseguridad
- Certificado de Bioética