

UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



“Estudio del efecto metabólico de las células Madre mesenquimales sobre sus propiedades condroprotectoras: Modulando su metabolismo para mejorar su potencial terapéutico para el tratamiento de osteoartritis”

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

Luna Alessandra Martínez Viola

Director de Seminario de Título:

Dra. Patricia Luz Crawford

Centro de Investigación Biomédica - Facultad de Medicina – Universidad de los Andes

Co-Director de Seminario de Título:

Dr. Roberto Elizondo Vega

Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad de Concepción

Director Patrocinante:

Dr. Andrés Marcoleta

Facultad de Ciencias – Universidad de Chile

Octubre 2018

Santiago – Chile

**UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE
PREGRADO**



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la **Srta. Luna Alessandra Martínez Viola**:

“Estudio del efecto metabólico de MSCs sobre sus propiedades condroprotectoras y regenerativas: Modulando su metabolismo para mejorar su potencial terapéutico para el tratamiento de osteoartritis”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Patricia Luz Crawford
Directora Seminario de Título

Dr. Andrés Marcoleta
Patrocinante Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dra.
Presidente Comisión

Dra.
Evaluador

Santiago, Octubre 2018.

BIOGRAFÍA

Mi nombre es poco común, hay muchas historias de por qué me pusieron así. No sé cuál será real o si son todas. Yo me quedé con que mi mamá tenía un gusto especial por la Luna, que siempre quiso tatuarse una y que le gustaba la canción del grupo Mecano "Hijo de la Luna". Soy la mayor de tres hermanos, recuerdo que me preguntaban: ¿Quieres una hermanita o un hermanito? La primera vez pedí un hermanito y nació Lucas. La segunda vez, pedí una hermanita y nació Luz. Al colegio donde fuimos nos decían los hermanos "Lulu" –claro, todos empezamos con Lu–, aunque recientemente descubrí otra manera de nombrarnos que me causó mucha gracia: Los Trululú. Crecí con ellos en distintas ciudades de Chile, como Chillán y San Felipe, donde aprendimos a andar en bicicleta, disfrutar de los amigos del barrio y también entre nosotros. Cuando creábamos mundos nuevos, obras de teatro, películas o bandas de música, siempre encontrábamos la manera de divertirnos gozando de una gran imaginación. Disfrutamos con nuestros papás de algunos viajes, quedándonos en una linda cabaña o salidas a acampar. Fue una muy bella infancia. Finalmente, volvimos a Santiago, la gran ciudad, donde nos tocó batallar con la enfermedad de mi mamá. Entré a la universidad a estudiar biotecnología, poco después de su partida. Fue muy difícil para mí y para toda mi familia seguir adelante. Eso también significó que nunca me di el tiempo de analizar si realmente me gustaba lo que estaba estudiando, solo seguí adelante y quise terminar mi carrera. Hoy estoy en el último escalón de esta etapa de mi vida. Tuve la suerte de encontrar a Paty, quien me recibió en su laboratorio para cumplir con esta tarea. Un lugar donde siempre me sentí apoyada en las distintas situaciones que se presentaron y también muy valorada como parte del equipo. Sé que, tras esta experiencia, tendré una gran herramienta para enfrentarme al mundo y continuar con nuevos desafíos en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que me han acompañado en mi camino.

Agradezco a Paty mi tutora por su recibimiento en su grupo de trabajo, por su comprensión y preocupación y por la valoración del trabajo realizado. Gracias a Rafa que con mucha paciencia me enseñó todo desde cero y me dio la confianza para creer en lo que estaba haciendo, además de poder contar siempre con su apoyo, aunque estuviese lejos. Agradezco también a Robert de quien también aprendí mucho, tanto técnicas de laboratorio y hacer una presentación, pero también de relajarme y pasarlo bien, siempre dispuesto a ayudar en lo que necesitara. Agradezco especialmente a Cote ya que sin ella terminar este trabajo habría sido muy difícil, gracias Cote por todo el apoyo, por cada empujón a seguir adelante, por toda la empatía y contención y el gran cariño y amistad que sentí siempre de tu parte. Gracias a ustedes y a todos los integrantes del laboratorio de inmunología, a Pamina, Mauro, Claudia, Aliosha, Noymar, Manuel, Maripa, Karina, Darío y Mónica por la disposición a ayudar siempre que lo necesité y por todos los buenos momentos compartidos, conversaciones, risas, celebraciones y la confianza para ser uno mismo y disfrutar de esta experiencia.

Agradezco a Pamina, mi gran amiga de universidad y del laboratorio, gracias por tu apoyo incondicional, por todo el cariño y la confianza, por compartir siempre conmigo, ayudarme siempre que lo necesité y ser una gran amiga.

Gracias a mis amigas y amigos de la universidad con quienes compartí muchas penas y alegrías especialmente con Antonia con la que realicé prácticamente todos los trabajos en los 5 años de carrera y compartimos toda esta experiencia universitaria.

Agradezco a mis amigas del colegio, Jose, Sole, Cata, Michu y Cami que siempre han estado ahí, son años compartiendo experiencias, son como mis hermanas y sé que siempre podré contar con ellas. Y a mis amigas de la vida, Dani y Manu, con las que

también he compartido infinitas experiencias y que han sido parte importantes para formar la persona que soy hoy.

Quiero agradecer a mi familia con los que juntos hemos superado muchos obstáculos, a mi papá, Jaime, por darme la posibilidad de estudiar y vivir esta experiencia, por su apoyo constante y la confianza que ha tenido siempre en mí. A mis hermanos Lucas y Luz por compartir toda una vida de juegos, de crecimiento, de cambios, de momentos difíciles y también de momentos felices, por las conversaciones y frases de aliento. A mi mamá, Angela, que lo que me alcanzo a enseñar lo atesorare siempre y hasta hoy sigo aprendiendo de ello a medida que crezco y entiendo nuevas cosas. Agradezco enormemente a mi tía Alla que ha sido el apoyo más grande para salir adelante y que siempre me ha enseñado a valorarme y a disfrutar de las cosas simples de la vida, entregándonos siempre su infinito amor y junto al tío Torino nos han esperado siempre con las puertas abiertas.

Gracias a todos y a otros que no alcanzo a nombrar, por ser parte de mi vida y aportar en este camino que he recorrido para llegar a ser quien soy el día de hoy.

FINANCIAMIENTO

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Inmunología del Centro de Investigación Biomédica (CIB) de la Universidad de los Andes y contó con el financiamiento del proyecto FONDECYT iniciación 11160929.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iii
FINANCIAMIENTO	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
1 RESUMEN	1
2 ABSTRACT	2
3 INTRODUCCIÓN	3
3.1 Osteoartritis (OA)	3
3.2 Células Madre Mesenquimales	5
3.2.2 Mecanismo de regeneración de MSCs	7
3.2.3 MSCs en osteoartritis	8
3.2.4 Cordón umbilical como fuente de MSCs para tratamiento de OA	10
3.2.5 Metabolismo de las MSCs.....	12
3.2.5.1 Modulación de metabolismo de MSCs como estrategia terapeutica	15
4 HIPÓTESIS	18
5 OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo General	19
5.2 Objetivos Específicos	19
6 MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Diseño experimental	20
6.2 Aislación de MSCs derivadas de cordón umbilical bajo GMP.....	20
6.3 Caracterización fenotípica por citometría	21
6.4 Diferenciación osteogénica y adipogénica	21
6.5 Ensayo de diferenciación condrogénica	22
6.6 Tinción con Safranina O.....	24

6.7 Evaluación del potencial de diferenciación hacia tejido condrogénico.....	24
6.8 RT-qPCR	24
6.9 Ensayo de proliferación.....	25
6.10 Ensayo de apoptosis de MSCs y HC-a	25
6.11 Ensayo preventivo y de Condrotección	26
6.12 Evaluación del efecto apoptótico de a 2DG y oligomicina	27
6.13 Cuantificación de factores secretados.....	27
6.14 Análisis Estadístico	28
7 RESULTADOS.....	29
7.1 Caracterización fenotípica de CU-MSCs	29
7.2 Efecto de los tratamientos con 2DG y oligomicina en la supervivencia y fenotipo de las CU-s.....	32
7.3 Efectos de los tratamientos con 2DG y oligomicina sobre la diferenciación hacia linaje condrogénico.....	35
7.4 Resistencia de las CU-MSCs y HC-a a distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno.....	37
7.5 Resistencia de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina a estrés oxidativo	39
7.6 Ensayo de condrotección de HC-a en co-cultivo con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.....	41
7.7 Ensayo de proliferación de HC-a en co-cultivo con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina	44
7.8 Expresión y liberación de factores tróficos de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina.....	46
8 DISCUSIÓN.....	50
9 CONCLUSIONES.....	56
10 REFERENCIAS.....	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Caracterización de Células Madre Mesenquimales.	6
Figura 2	Diseño experimental.	20
Figura 3	Caracterización fenotípica de CU-MSCs.	31
Figura 4	Efecto de los tratamientos a distintas concentraciones sobre la supervivencia de las CU-MSCs.	33
Figura 5	Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC control y tratadas con 2DG u oligomicina.	34
Figura 6	Diferenciación condrogénica de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina.	37
Figura 7	Resistencia a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno de CU-MSCs y HC-a.	39
Figura 8	Resistencia a 300 μ M de peróxido de hidrógeno de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.	40
Figura 9	Efecto preventivo de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina sobre muerte celular de HC-a.	42
Figura 10	Ensayo de condroprotección co-cultivando HC-a con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.	43
Figura 11	Ensayo de proliferación de HC-a co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.	45
Figura 12	Determinación mediante RT-qPCR de factores tróficos de CU-MSCs tratadas con 2 DG u oligomicina.	47
Figura 13	Cuantificación de la expresión de FGF y HGF humanos en CU-MSCs tratadas con 2DG u oligomicina.	48
Figura 14	ELISA de factores tróficos de co-cultivo de HC-a y MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I	Lista de genes medidos por RT-qPCR y secuencias de partidores utilizados	25
----------------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

2DG	2-deoxi-glucosa
ADSC	Célula madre derivada de adipocitos
AKT	Serina-treonina cinasa
APC	Alofocianina
ATP	Adenosín trifosfato
BM-MSC	Células madre mesenquimales de medula ósea.
DAMP	Patrones moleculares asociados a daño
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FGF	Factor de crecimiento fibroblasto
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAGs	Glicosaminoglicanos sulfatados
GLUT 1	Transportador facilitativo de hexosas 1
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESC	Célula madre embrionaria
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos
HIF-1a	Factor inducido por hipoxia 1
HK2	Hexoquinasa 2
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN- γ	Interferón – γ
IGF	Factor de crecimiento de insulina
IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
iPSC	Célula madre pluripotente inducida
LDH	Lactato deshidrogenasa
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad - clase II
MMP	Metaloproteinasa de matriz
MSC	Células Madre mesenquimales
NO	Óxido nítrico
OA	Osteoartritis
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
P38 MAPK	Proteína kinasa activada por mitógeno p38
PE	Ficoeritrina
PBS	Buffer fosfato salino

PE-Cy7	Ficoeritrina cianina-7
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa 1
PFK1	Fosfofructoquinasa 1
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PerCP	Peridinin-clorofila
RNA	Ácido Ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa, cuantitativa
SFB	Suero Fetal Bovino
STC1	Staniocalcina 1
TCA	Ciclo de Krebs
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
TGF- β	Factor de crecimiento transformante β
TGF- β3	Factor de crecimiento tumoral β 3
Th1	Célula T- <i>helper</i> 1
Th2	Célula T- <i>helper</i> 2
CU-MSC	Células madre de cordón umbilical
VEGF	Factor de crecimiento vascular

1 RESUMEN

Las células madre mesenquimales (MSCs) son células estromales multipotentes que poseen propiedades regenerativas e inmunoreguladoras lo que las ha propuesto como terapia celular en el área de medicina regenerativa. Dentro de los mecanismos asociados a su potencial regenerativo, se encuentra su capacidad de diferenciación hacia diferentes linajes celulares, así como la producción de factores paracrinos, que promueven la supervivencia y la proliferación de las células que forman parte de los tejidos dañados. Por otro lado, su capacidad de regular la respuesta inmunológica les permite inhibir la inflamación asociada al daño de tejidos, promoviendo eficiente y coordinadamente la regeneración tisular. Interesantemente, en los últimos años se ha observado que funciones biológicas de las MSCs, tales como su potencial de diferenciación, se encuentra estrechamente regulado por cambios metabólicos, pasando desde un estado glicolítico hacia uno de fosforilación oxidativa, gobernado por la mitocondria, lo que sugiere que cambios en su estado metabólico también podría estar regulando su potencial terapéutico. Por lo tanto, la hipótesis del presente seminario de título es que la inducción de un estado glicolítico en las MSCs promoverá su potencial de diferenciación condrogénica así como sus propiedades condroprotectoras. Estos resultados contribuirán aportando conocimientos sobre cómo promover el efecto terapéutico de las MSC en enfermedades como la osteoartritis, en donde la etiología de la enfermedad se encuentra asociada a la inflamación y destrucción tisular de la articulación.

2 ABSTRACT

Mesenchymal stem cells (MSC) are multipotent stromal cells with wide regenerative and immunomodulatory properties whereby they have been proposed to be use in regenerative medicine. Among the mechanisms associated with their therapeutic potential are their abilities to differentiate into several cell lineages, as well as the production of paracrine factors, which promote the survival and proliferation of cells form damaged tissues. On the other hand, their capacity to regulate the immune response, allows them to inhibit the inflammation associated with tissue damage, promoting efficient and coordinated tissue regeneration. Interestingly, in recent years it has been observed that biological functions of MSCs, such as their differentiation potential, are closely regulated by metabolic changes, going from a glycolytic state to one of oxidative phosphorylation, governed by the mitochondria, suggesting that changes in their metabolic state could also be regulating their therapeutic potential. Therefore, the hypothesis of the present study is that the enhancement of a glycolytic state on MSCs will promote their chondrogenic differentiation, as well as their chondroprotective properties. These results will contribute by providing knowledge on how to increase the therapeutic effect of MSCs in diseases such as osteoarthritis, where the etiology of the disease is associated with inflammation and tissue destruction of the joint.

3 INTRODUCCIÓN

3.1 Osteoartritis (OA).

La osteoartritis (OA) es una enfermedad crónica de alta prevalencia (10-15 % de la población sobre 60 años), que se caracteriza por la degeneración del cartílago, la formación reactiva de hueso en los márgenes articulares e inflamación de la articulación, produciendo rigidez articular y dolor (Rahmati y col., 2016). En la OA se activan señales inflamatorias innatas, las que incluyen citoquinas, quimioquinas y alarminas. Por otro lado, existe lesión biomecánica y estrés oxidativo que comprometen la viabilidad de los condrocitos residentes de la articulación, llevándolos a una diferenciación hipertrófica y respuestas procatabólicas que terminan en la degradación de la matriz extracelular (ECM) del cartílago hialino (Pers y col., 2015). La capacidad de regeneración del cartílago articular es inherentemente baja, debido a una baja tasa de proliferación de los condrocitos y a la ausencia de vascularización en el cartílago, dejando en evidencia una falta de regulación sistémica lo que produce una ineficiente respuesta de reparación (Freitag, 2016).

La OA afecta a las articulaciones sinoviales, principalmente a las caderas y rodillas, lo que lleva a una pérdida de movilidad y discapacidad física, generando una disminución de la calidad de vida. Debido a que esta enfermedad afecta principalmente a la población de la tercera edad, es esperable que debido al continuo aumento de la esperanza de vida, este porcentaje continúe en ascenso (Kong y col., 2017). Producto del envejecimiento, los condrocitos de la matriz del cartílago pierden la habilidad de mantener la homeostasis entre las vías inflamatorias y metabólicas

(catabólicas y anabólicas), impidiendo la capacidad de adaptarse al estrés mecánico externo, generando un estado pro-catabólico que favorece la degradación de la matriz. (Freitag, 2016).

Si bien, la edad es uno de los principales factores de riesgo de la OA, existen otros factores de riesgo que contribuyen a esta patología. Entre estos factores de riesgo podemos mencionar el sexo, en el cual existe una mayor incidencia de la patología para el género femenino. Por otro lado, el grupo étnico, la densidad ósea, la terapia de reemplazo de estrógeno, la predisposición genética y nutrición siguen siendo importantes factores que influyen en la progresión de la enfermedad. Otros factores asociados a la incidencia de la OA son daños biomecánicos asociados a obesidad, lesiones articulares, deformidad articular, participación en deportes y debilidad muscular (Chang y col., 2015).

Actualmente, los tratamientos farmacológicos apuntan a disminuir el dolor causado por la destrucción e inflamación del tejido, tales como el acetaminofén, drogas antiinflamatorias opioides, analgésicos tópicos, corticosteroides y ácido hialurónico, mientras que, en estadios avanzados de la enfermedad, el único tratamiento es la cirugía. La cirugía consiste en reemplazar la articulación completa (artroplastia articular total), tratamiento que permite restaurar la función de la articulación casi a su normalidad (Chang y col., 2015), sin embargo, al menos el 20% de los pacientes continúan sufriendo de dolor articular luego del reemplazo total de la articulación, la que además puede estar acompañada de importantes complicaciones como, embolia pulmonar, infecciones que requirieron nuevamente hospitalización lo que puede conllevar, incluso a la muerte (Freitag, 2016).

En los últimos años se ha propuesto el uso de MSCs para el tratamiento de enfermedades articulares, debido principalmente a sus propiedades de diferenciación hacia múltiples linajes, entre ellos hacia condrocito, a la producción de factores anti-hipertróficos y de sobrevivencia, así como sus funciones inmunomoduladoras, lo que se podría traducir en la generación de un ambiente anti-inflamatorio que promueva la regeneración de la articulación (Pers, 2015).

3.2 Células Madre Mesenquimales.

Las células troncales o madre mesenquimales (del inglés *Mesenchymal Stem Cells*, MSCs) son células estromales multipotentes capaces de autorrenovarse y de diferenciarse tanto *in vitro* como *in vivo* hacia distintos linajes celulares de tejido adulto (Le Blanc & Pittenger, 2005). Se caracterizan por su fácil aislamiento desde su principal nicho que es la médula ósea, pero también se pueden aislar exitosamente de tejido adiposo, cordón umbilical, placenta, tejido dental y sangre menstrual (Mitrano, 2010);(Alcayaga-Miranda., 2015). Además, se caracterizan por su fácil expansión en cultivo, presentando un fenotipo de células adherentes, las que proliferan en presencia de suero bovino fetal (SBF). La sociedad internacional de terapia celular (ISCT por sus siglas en inglés) ha establecido que el criterio mínimo para identificar una célula como MSCs es que presente morfología fibroblastoide, que sea adherente al plástico en condiciones estándar de cultivo, que exprese marcadores de superficie mesodermales como CD90, CD105 y CD73 y no exprese marcadores hematopoyéticos como CD45, CD34 y CD14; y que sea capaz de diferenciarse al menos a adipocitos, condrocitos y osteoblastos (Dominici, 2006). Además, se ha observado que bajo condiciones específicas de cultivo las MSCs también se pueden diferenciar en otros tipos celulares

tales como miocitos, fibroblastos y otras células del tipo mesodermal (Ma, 2014). Además, las MSC no presentan inmunogenicidad debido a la baja expresión en su superficie (<2%) del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I y II, y la ausencia de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, por lo que pueden hacerse trasplantes alógenos sin que se presente un rechazo por el receptor (Aggarwal & Pittenger, 2005). Estas características se ven complementadas en la capacidad de las MSCs de hacer “*homing*”, es decir, ser atraídas al tejido dañado, los que permite poder realizar una administración intra-arterial o intra-venosa (Barbash et al., 2003).

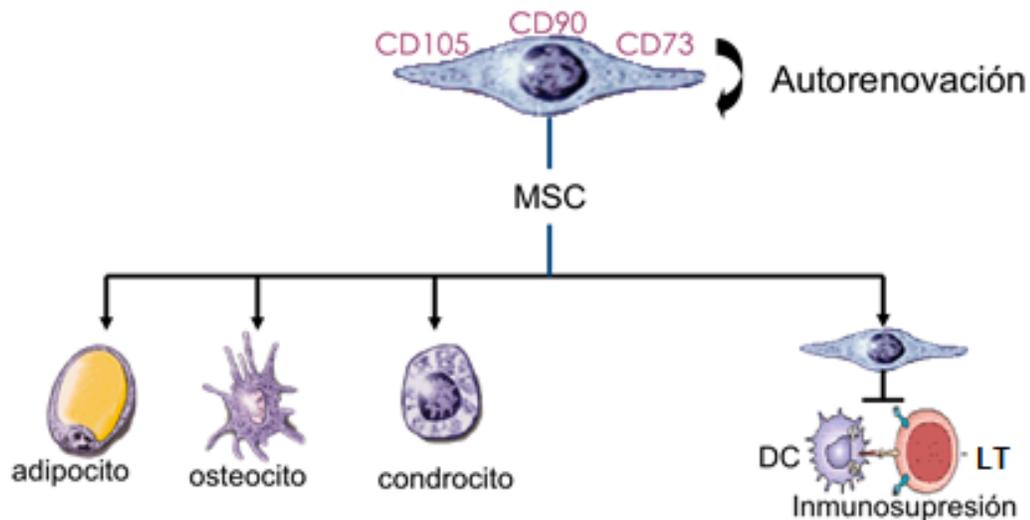


Figura 1. Caracterización de Células Madre Mesenquimales. Las MSCs se caracterizan por su morfología fibroblastoide, capacidad de autorenovación, expresión de marcadores de superficie como CD105, CD73 y CD90, por su potencial de diferenciación hacia linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico y por su capacidad inmunosupresora (DC: célula dendrítica. LT: linfocito T).

3.2.1 Mecanismos de regeneración de MSCs.

A nivel fisiológico, el principal rol que cumplen las MSCs es mantener la homeostasis de un tejido, función que realizan a través de la liberación de factores tróficos que promueven el recambio y restitución de las células que lo conforman (Pekovic & Hutchison, 2008). Dentro de estos factores, se encuentran diversos factores de crecimiento y citoquinas, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento insulínico (IGF), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento transformante (TGF- β 3), entre otros (Wang y col., 2014). Estas moléculas promueven la angiogénesis, inhiben la apoptosis, la remodelación fibrótica y promueven la proliferación celular (Wang y col., 2014), características que han permitido proponer a las MSCs, dentro del campo de la terapia celular, como la fuente celular ideal para su utilización en el área de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos.

El potencial de regeneración de tejidos asociado a la utilización de MSCs, se encuentra asociado principalmente a que las MSCs pueden ejercer un rol regulatorio sobre la respuesta inmune o efecto inmunomodulador, a través de la inhibición de células pro-inflamatorias, así como por su capacidad de inducir fenotipos anti-inflamatorios (Uccelli & de Rosbo, 2015). El mecanismo mediante el cual las MSCs ejercen su potencial inmunomodulador, es gatillado por la presencia de citoquinas inflamatorias presentes en un tejido dañado, particularmente IFN- γ en combinación con TNF- α e IL-1 β , las que inducen la liberación de distintos factores inmunosupresores que orquestarán la respuesta de células del sistema inmune innato y adaptativo, suprimiendo así una respuesta inmune patológica (Wang y col., 2014).

En resumen, el mecanismo mediante el cual las MSCs inducen la reparación de un tejido, se basa en su potencial de diferenciación, según el cual luego de que las MSCs son reclutadas al tejido dañado, se diferencian en células funcionales reemplazando las no funcionales. Además, en respuesta a la presencia de citoquinas inflamatorias en el tejido dañado, las MSCs activan su función inmunoreguladora, liberando factores inmunosupresores que van a modular la progresión de la inflamación lo que prepara al tejido para su posterior reparación. Estos factores son interleuquina 6 (IL-6), TGF- β 1 y 3, prostaglandina E₂ (PGE₂), HGF, factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), VEGF, IGF, factor derivado de células estromales (SDF) 1, indolamina 2,3 diooxigenasa (IDO), entre otros (Pers, 2015). Además, las MSCs tienen la capacidad de rescatar células de la apoptosis inducida por trauma y proteger de un ambiente oxidativo, radiación o daño químico a través de la liberación de IGF-1, IL-6, staniocalcina (STC) 1, VEGF, HGF y TGF- β 1 (Pers, 2015). Todos estos factores en conjunto pueden inhibir la respuesta inflamatoria, promover la actividad de células endoteliales y fibroblastos, inducir la angiogénesis, facilitar la proliferación y diferenciación de células progenitoras del tejido *in situ* y proteger contra el stress oxidativo (Somoza y col., 2014).

3.2.2 MSCs en osteoartritis.

La reparación y regeneración de cartílago articular ha sido todo un desafío dentro del campo de la medicina regenerativa, debido a la gran complejidad morfológica y mecánica que presenta de manera intrínseca el cartílago hialino. Fisiopatológicamente, la inflamación de la articulación se produce debido a que los productos catabólicos de la matriz del cartílago producen la activación de macrófagos y

otras células del sistema inmune innato, las que en respuesta liberan citoquinas pro-inflamatorias (Van Lent PL y col., 2008). Esta señalización, altera la función de los condrocitos, promoviendo la progresión del daño en el cartílago. Los productos catabólicos o fragmentos generados por la degradación de la ECM se conocen como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs), los cuales corresponden a proteoglicanos, proteínas o DNA (Liu-Bryan, 2013). Los DAMPs inducen la liberación de alarminas por parte de los monocitos, contribuyendo a la inducción de la cascada inflamatoria (Pers, 2015). Por tanto, para lograr una reparación de la articulación, es necesario contrarrestar las citoquinas inflamatorias al mismo tiempo que promover la supervivencia de los condrocitos residentes y la formación de neocartílago. En este contexto, y dada sus propiedades inmunomoduladoras y regenerativas, se ha propuesto como terapia celular promisorio el uso de MSCs.

La utilización de MSCs en OA, ha sido reportada desde el año 1998, en un estudio en el cual se trasplantaron MSCs derivadas de medula ósea (BM-MSCs) autólogas (del mismo paciente) en la rodilla afectada. La utilización de MSCs mejoraron significativamente la sintomatología asociada al dolor, aumentando la capacidad de caminar en los pacientes tratados (Wakitani, 2004). Posteriormente, un estudio comparativo en pacientes con OA de rodilla, determinó que el implante de BM-MSCs en láminas de gel y colágeno mejoraron significativamente los parámetros de recuperación funcional y fuerza muscular, en comparación al grupo control con tratamiento placebo. Estos hallazgos, indican que la terapia celular utilizando BM-MSCs es efectiva y segura, ya que luego de un período de seguimiento no se observó formación de tumor o infección (Wakitani, 2011). Sin embargo, no en todos los casos

de pacientes con OA se pudo revertir la progresión de la enfermedad (Kristjánsson & Honsawek, 2014).

Ensayos clínicos más recientes destacan que la inyección intraarticular de MSCs derivadas de tejido graso (ADSCs), mejora significativa la funcionalidad de la articulación de la rodilla, en conjunto con una disminución de los síntomas de dolor, sin presentar efectos adversos (Nordberg & Lobo, 2015). Estudios que utilizan MSCs derivadas de cordón umbilical (CU-MSCs), han reportado que el implante de CU-MSCs induce la regeneración del cartílago durante su proceso de diferenciación (Detamore, 2013);(Marmotti, 2014). Al respecto, CU-MSCs diferenciadas, expresan elevados niveles de ácido hialurónico, glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs) y colágeno, cuya composición es similar a la del cartílago nativo (Valiyaveetil y col., 2004).

3.2.3 Cordón umbilical como fuente de MSCs para tratamiento de OA.

Diversos antecedentes sugieren que las BM-MSCs, se encuentran predeterminadas intrínsecamente para la formación de un cartílago transitorio, típico de procesos endocondrales, tales como la formación de hueso y la curación de fracturas en lugar de cartílago articular hialino. El cartílago resultante de la diferenciación condrogénica de las BM-MSCs, difiere mucho del cartílago articular en términos de estructura, composición química, fenotipo celular y función (Hillel, 2009);(Scotti, 2010);(Somoza, 2014). Este riesgo de hipertrófia y osificación al utilizar BM-MSCs, podría reducirse al seleccionar otras fuentes de MSCs como las CU-MSCs, las que han demostrado un mayor potencial de diferenciación hacia cartílago hialino (Fong, 2012)(Chang, 2015). Además, las CU-MSCs son células de fácil aislamiento desde distintas partes del cordón o el cordón completo, lo que representa una ventaja sobre

las BM-MSCs, ya que extraer médula ósea de la cresta ilíaca, la tibia o el fémur es un procedimiento doloroso e invasivo que puede implicar complicaciones y morbilidad (Chang, 2015). Finalmente, es importante tener en consideración que la expansión *in vitro* de las MSCs produce senescencia y reducción de su capacidad proliferativa y terapéutica a medida que aumenta el tiempo en cultivo. Al respecto, las CU-MSCs poseen una mayor tasa de proliferación *in vitro comparado con las* BM-MSCs lo que reduce los tiempos de su expansión, facilitando de esta manera la mantención de sus propiedades terapéutica (Palomäki, 2013).

En su nicho las MSC permanecen en condiciones de hipoxia donde la baja tensión de oxígeno activa la transcripción del factor inducido por hipoxia (HIF) 1, la principal molécula inducida en respuesta a hipoxia de las células (Kaelin & Ratcliffe, 2008). En presencia de oxígeno HIF-1 es degradado, pero en hipoxia este escapa de la degradación y trasloca al núcleo iniciando la transcripción de varios genes, entre ellos genes glicolíticos como el transportador de glucosa 1 (Kaelin & Ratcliffe, 2008). De esta forma, HIF-1 activa una señal de hipoxia que permite mantener un estado glicolítico de las MSCs, el cual se ha visto que juega un rol importante en mantener la pluripotencia de estas células y un estado indiferenciado (Folmes y col. , 2012)

En este contexto, se ha determinado que las CU-MSCs tienen una mayor capacidad de estabilizar HIF-1 *in vitro* en condiciones de normoxia, una vez extraídas de su nicho, en comparación a MSCs de tejido adulto (Palomäki, 2013). La mantención de un estado glicolítico a través de HIF-1, permite la obtención de elevados niveles de energía, biomasa y antioxidantes, permitiendo reducir el estrés oxidativo, protegiendo y manteniendo las propiedades innatas de las MSCs antes de su "*homing*" al tejido dañado (Liu & Ma, 2015).

Actualmente, existen resultados promisorios de seguridad y efectividad a nivel de ensayos preclínicos y clínicos, demostrando el potencial de las MSCs para detener el progreso de la enfermedad e incluso revertir el daño articular (Freitag, 2016). Sin embargo, se ha observado una baja tasa de supervivencia de las MSCs, producido por los elevados niveles de especies reactivas derivadas del oxígeno (ROS) del tejido dañado, disminuyendo la capacidad de regeneración de la articulación (Lepetsos & Papavassiliou, 2016). Estos antecedentes, plantean la necesidad de mejorar los efectos terapéuticos de las CU-MSCs, al potenciar las propiedades inmunosupresoras y condroprotectoras, para así promover la regeneración tisular, permitiendo mantener sus beneficios a largo plazo.

3.2.4 Metabolismo de las MSC.

Recientemente se ha demostrado que el estado metabólico y la actividad mitocondrial presente en las MSCs, es capaz de modular sus funciones fisiológicas. Debido a sus propiedades mitocondriales únicas y su gran flexibilidad metabólica, las MSCs se adaptan rápidamente a condiciones de isquemia o falta de flujo sanguíneo (Mylotte, 2008). A nivel fisiológico, las MSCs dependen fuertemente de la glicólisis como soporte energético durante su proliferación y mantención de un estado no diferenciado. Esto debido a que en un estado glicolítico, la célula utiliza su energía para la síntesis de macromoléculas y en mantener los niveles de intermediarios glicolíticos necesarios para la división celular, en desmedro de la generación de ATP (Lunt & Vander Heiden, 2011). Por otro lado, la glicólisis permite mantener el equilibrio redox durante la proliferación celular, siendo esto fundamental para mantener la multipotencia de las MSCs (Ladurner, 2006). Sin embargo, el panorama cambia

rápidamente a un metabolismo oxidativo/fosforilativo (OXPHOS), el cual es capaz de inducir su diferenciación hacia osteoblastos y adipocitos, efecto contrario a lo que se ha descrito en su diferenciación a condrocito, la cual requiere de la mantención de un elevado flujo glicolítico (Pattappa y col., 2011). Durante el proceso de diferenciación hacia adipocitos y osteoblastos, la activación mitocondrial y la remodelación del sistema bioenergético son esenciales (Folmes, 2011) (Folmes y col., 2012). Cuando existe un incremento de la demanda energética, la mitocondria sufre una serie de cambios entre los que se encuentran, un aumento de su masa, aumento en la expresión de las enzimas del ciclo de Krebs (TCA), aumento del consumo de oxígeno y producción de ROS, acompañado de un aumento de la producción de antioxidantes (Armstrong, 2010). El conjunto de estos cambios, permiten a las MSCs cambiar desde un estado metabólico predominantemente glicolítico, a un estado metabólico donde predomina la fosforilación oxidativa que acompaña los procesos de diferenciación celular. A diferencia de la diferenciación osteogénica y adipogénica, la diferenciación condrogénica tiene una baja significativa en el consumo de oxígeno y OXPHOS, indicando una gran dependencia de actividad glicolítica (Pattappa y col., 2011). Por lo tanto, estos estudios demuestran que el estado metabólico de las MSCs se puede reconfigurar durante su diferenciación, permitiendo de este modo satisfacer el incremento de la demanda energética requerido en cada fenotipo diferenciado (Chen y col., 2008). Se ha reportado que al cultivar MSCs en condiciones de hipoxia, se induce la expresión del factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), el cual induce la transcripción de diversos genes glicolíticos, como el transportador facilitativo de hexosas 1 (GLUT 1), las enzimas hexoquinasa 2 (HK2), piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1), fosfofructoquinasa 1 (PFK1) y lactato deshidrogenasa (LDH) (Tormos

& Chandel, 2010). Bajo estas condiciones, se produce una inhibición de la senescencia, aumento de la tasa de proliferación y un potenciamiento de la diferenciación hacia células condrogénicas (Malladi y col., 2006);(Ito & Suda, 2014). Además, HIF-1 también incrementa la estabilidad genética, reduce el estrés oxidativo y preserva el potencial multipotente de las MSCs durante la expansión en cultivo, preservando así sus propiedades terapéuticas (Liu & Ma, 2015).

Consecuentemente, se ha observado que la condrogénesis es promovida por hipoxia en MSCs de ratas a través de mecanismos mediados por HIF1 α , donde se produce un incremento de la fosforilación tanto de AKT como de la p38 MAPK así como la sobreexpresión de colágeno II, Sox-9, y un incremento en la deposición de proteoglicano (Kanichai y col., 2008). Finalmente, antecedentes aún no publicados de nuestro laboratorio, demuestran que la inducción de un estado glicolítico, mediante la utilización de drogas específicas que inhiben la cadena respiratoria, incrementa el potencial inmunomodulador de las MSCs, promoviendo su capacidad de inhibir la proliferación y la generación de linfocitos T proinflamatorios (Contreras, en preparación).

En conjunto, todos estos antecedentes nos sugieren que el estado metabólico y la actividad mitocondrial en MSCs, se encuentra regulando su función fisiológica, siendo, por ende, la regulación del estado metabólico celular, una interesante aplicación terapéutica para diversas enfermedades como la OA. Como ya se mencionó, las propiedades regenerativas y condroprotectoras de las MSCs en el contexto de OA, se deben principalmente a la secreción de factores tróficos bioactivos que tienen fuertes efectos pro-angiogénicos, anti-apoptóticos, anti-fibróticos y antiinflamatorios (Gupta y col., 2012), por lo que, potenciar estas propiedades a través

de la regulación del estado metabólico de las MSCs, podrían promover la protección de condrocitos residentes de una mayor destrucción en la articulación dañada y facilitar la regeneración condral, lo que se traduciría en una mejor terapia para el tratamiento de OA.

3.2.4.1 Modulación de metabolismo de MSCs como estrategia terapéutica.

Algunas de las estrategias que se han utilizado para maximizar las propiedades terapéuticas de las MSCs, incluyen exponer las células a hipoxia (0,5% a 1% de O₂) y suplementación de glucosa entre otros (Deschepper, 2013). Con esto se ha conseguido avanzar en la mejorar de la supervivencia de las MSCs durante su trasplante, su adaptación *in vivo* y sus funciones regenerativas (Liu & Ma, 2015).

Resultados recientes de nuestro laboratorio, demuestran que el estado metabólico de las MSCs regula significativamente la función inmunosupresora de las MSCs, promoviendo o disminuyendo su capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria, dependiendo si las MSCs se encuentran en estado glicolítico o de OXPHOS respectivamente (Contreras et al en preparación).

Con respecto a las drogas más utilizadas, se ha reportado que oligomicina, el cual es un inhibidor de la ATP sintasa mitocondrial, es capaz de promover la glicólisis al inhibir la fosforilación oxidativa, mientras que el uso de la droga 2-deoxi-glucosa (2-DG), análogo no metabolizable de la glucosa, es capaz de inhibir la glicólisis y promover la OXPHOS. En este contexto la infusión de oligomicina en forma directa en ratas a altas dosis (1mg/kg animal), es capaz de aumentar la cantidad de ROS a niveles citotóxicos y por ende inducir muerte celular (Vaamonde-García, 2017). Sin embargo, ROS se induce como un subproducto normal del metabolismo del oxígeno

por lo que también cumple un rol importante como molécula de señalización, además de ayudar a mantener la homeostasis a nivel celular. Las células poseen adecuados mecanismos de protección contra los radicales libres y sus efectos perjudiciales (Devasagayam, 2004). Cuando existe estrés oxidativo la célula activa o silencia genes que codifican enzimas defensoras, factores de transcripción y proteínas estructurales. El aumento de ROS activa NF- κ B lo que resulta en la activación de varios genes relacionados con las defensas antioxidantes (Birben y col., 2012). Esto puede tener efectos positivos en las células a utilizar en este trabajo ya que, en este caso, buscamos aumentar propiedades terapéuticas en células que llegaran a un ambiente hostil con altos niveles de ROS, por lo que estas adaptaciones previas al estrés oxidativo pueden hacer a las células más resistentes a dicho ambiente. (Suganuma, 2010).

Además, resultados previos del laboratorio han demostrado que la inhibición de la fosforilación oxidativa en MSCs aisladas de ratón utilizando oligomicina en dosis adecuadas, promueve significativamente su potencial inmunosupresor. Dicho aumento de las propiedades inmunosupresoras al pretratar MSCs murinas con una dosis de 1ug/ml de oligomicina no induce muerte celular ni a corto ni a largo plazo en comparación a células control que no fueron pretratadas con ninguna droga (Contreras, en preparación).

Estos antecedentes nos permiten proponer que el metabolismo celular en las MSCs, regulan su capacidad terapéutica, sin embargo, es necesario profundizar en el efecto que tiene la modulación del metabolismo en las MSCs sobre sus funciones celulares. Para ello en el presente seminario de título, estudiaremos el efecto del pretratamiento de CU-MSCs con oligomicina y 2-DG, sobre

su potencial condrogénico y condroprotector, con el fin de proporcionar más información que permitan avanzar hacia el uso de MSC para el tratamiento de enfermedades como la OA.

4 HIPÓTESIS.

La inducción farmacológica de la glicólisis en MSCs derivadas de cordón umbilical, incrementa su rol condroprotector y promueve su diferenciación hacia cartílago.

5 OBJETIVOS.

5.1 Objetivo General.

Evaluar si la inducción farmacológica de glicólisis usando oligomicina y su inhibición utilizando 2DG, regula las propiedades condroprotectoras de las CU-MSCs *in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos.

5.2.1 Estudiar el efecto *in vitro* de la inducción o inhibición de la glicólisis en las CU-MSCs sobre su potencial de diferenciación condrogénico.

5.2.2 Determinar el rol del metabolismo de CU-MSCs *in vitro* sobre su potencial condroprotector.

5.2.3 Analizar el efecto de la inducción o inhibición de la glicólisis en CU-MSCs sobre la producción de factores tróficos y condroprotectores.

6 MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Diseño experimental

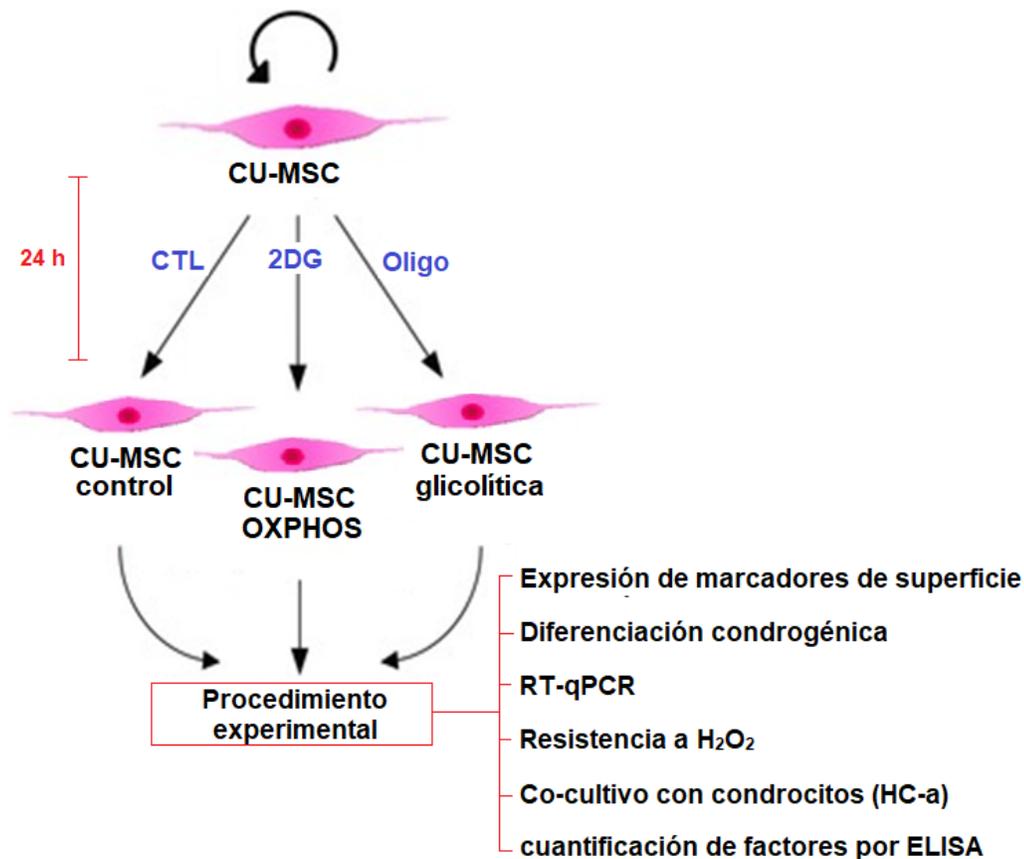


Figura 2. Diseño experimental. Se realizó un tratamiento con 2DG u oligomicina a CU-MSCs 24 horas previo a cada experimento realizado.

6.2 Aislamiento de MSCs derivadas del cordón umbilical bajo buenas normas de manufactura (GMP).

Las CU-MSCs fueron donadas por la empresa *Cells for Cells*, quienes obtuvieron estas células siguiendo los criterios GMP (good manufacturing product). En total se utilizaron 5 códigos que pertenecían a 5 donantes diferentes. Las células fueron sembradas en T-Flasks (Falcon) de 75 cm² para permitir su adherencia y expansión

clonal en DMEM *high glucose*, con piruvato de sodio, rojo fenol y sin glutamina (Corning), suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF); (Gibco), L-glutamina (Biological Industries), penicilina (100 U/ml); (Corning) y estreptomicina (100 µg/ml); (Corning), suplementos necesarios para el crecimiento de las MSCs. Una vez alcanzada la confluencia celular, las células fueron disgregadas mediante el uso de 50µL por cm² de tripsina (Corning). Posteriormente, mediante citometría de flujo, las CU-MSCs fueron caracterizadas mediante la expresión de antígenos mesodérmicos CD73, CD90, CD105, como la ausencia de los antígenos CD45 y CD34. Además, se evaluó su capacidad de diferenciación a adipocitos, condrocitos y osteoblastos.

6.3 Caracterización fenotípica por citometría.

Mediante citometría de flujo, se evaluó diferentes marcadores de superficie para cada código de CU-MSCs tratadas con 1mM 2DG (Sigma) o con 1 µg/ml oligomicina-CAS 1404-19-9 (Mezcla de isómeros A, B y C) (Calbiochem). Para ello CU-MSCs fueron pre-tratadas por 24 horas con las diferentes drogas y se incubaron con los diferentes anticuerpos, tales como CD73-BV421, CD90-APC, CD105-PE, CD45-PerCP, CD44-FITC y CD34-PE-Cy7 (BD Pharmingen). Los análisis se realizaron en un citómetro de flujo Facs Canto II (BD Pharmingen).

6.4 Diferenciación osteogénica y adipogénica.

Se evaluó la capacidad de diferenciación hacia osteoblastos y adipocitos, para lo cual se sembraron células a una densidad celular de 2×10^4 y 1×10^4 células/cm² respectivamente en placas de 12 pozos (Corning) en medio normal. Se incubaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ atmosférico, por 24 horas, para luego agregar 600 µl de

medio control o de diferenciación. El medio de diferenciación osteogénico contenía DMEM (Corning) con 10 % SBF (Gibco), 100 U/mL penicilina (Corning), 100 ug estreptomicina (Corning), 2mM L-glutamina (Biological Industries), 100 nM dexametasona (Sigma), 40 ng/mL ácido ascórbico (Sigma) y 3mM NaH₂PO₄ (Sigma). El medio de diferenciación adipogénica contenía DMEM (Corning) con 5% SBF (Gibco), 100 U/mL penicilina, 100 ug estreptomicina, 2mM L-glutamina, 1 uM dexametasona (Sigma), 250 μM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX); (Sigma), 5μg/mL insulina (Gibco) y 60μM indometacina (Sigma). Se incubaron a 37°C con 5% CO₂ atmosférico y se cambió medio control y de diferenciación respectivos cada dos días. Se tomaron fotos de las células diferenciadas con microscopio invertido.

6.5 Ensayo de diferenciación condrogénica.

La evaluación de la capacidad de diferenciación hacia tejido condrogénico, se realizó de la siguiente manera. Las células CU-MSC fueron pre-tratadas con 2DG y oligomicina, para posteriormente ser sembradas a una densidad celular de 3x10⁴ células/10 μl en forma de microgota. Se incubaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ atmosférico, durante 90 min, para luego agregar lentamente 500 μl de medio control o de diferenciación, el cual contiene medio DMEM suplementado con 5% SBF, 100 U/mL penicilina, 100 ug estreptomicina, 100 nM dexametasona Sigma), 1mM piruvato de sodio (Gibco), 170 μM ácido ascórbico (Sigma) y 10 ng/mL TGF-β3 (R&D). Se agregaron tratamientos según correspondía de 1 μg/ml oligomicina o 1mM 2DG. Se incubaron en estufa a 37°C con 5% CO₂ atmosférico y se cambió medio cada dos días agregando TGF-β3 (R&D) y tratamientos cada vez. Se terminó la diferenciación el día 11 verificando la formación de una estructura tridimensional conocida como

micromasa. Se sacaron fotos de las células diferenciadas y luego se utilizarán algunas como muestra para realizar tinción con Safranina O (Sigma) y otras para transcripción reversa cuantitativa de PCR (RT-qPCR) de genes condrogénicos, ambos para comprobar la diferenciación a condrocitos.

6.6 Tinción con Safranina O.

Se preparó una solución de Safranina O (Sigma) al 0,1% p/v en agua (0,1 g Safranina O más 100 ml de agua bidestilada). Las células fueron lavadas con solución salina tamponada con fosfato (PBS) (Calbiochem) 1X y luego fijadas con 0,15 mL/cm² de etanol 70% v/v por 10 minutos. Posteriormente, se lavaron con PBS 1X y se tiñeron con 0,15 mL/cm² de solución Safranina O al 0,1%. Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente y se lavaron con 0,15 mL/cm² de agua destilada. Posteriormente se lavaron con 0,15 mL/cm² de 100% etanol absoluto (Merck), durante 5 oportunidades. Finalmente, se eliminó el exceso de etanol con 15 mL/cm² de PBS 1X y se tomaron fotografías de las células con un microscopio de luz invertido con contraste de fase.

6.7 Evaluación del potencial de diferenciación hacia tejido condrogénico

El efecto de la activación glicolítica de las CU-MSCs sobre la diferenciación hacia tejido condrogénico, fue determinado mediante la inhibición del metabolismo oxidativo/fosforilativo al incubar las células durante 24 h con 1 µg/ml de oligomicina o 1 mM de 2DG.

6.8 RT-qPCR.

Para evaluar la expresión de genes condrogénicos: Agrecan (Agg) y Colagéno II (Col2) una vez terminada la diferenciación, se retiró el medio y se agregó 500 μ L de TRIzol™ (Invitrogen), luego de 5 min se disgregaron las micromasas para liberar y colectar la muestra. Se evaluó la expresión de los genes: TGF β 3, FGF, HGF, TIM1, MMP1 y MMP9. Para ello se colectaron las distintas muestras luego de 24 horas de incubación de MSCs tratadas con 2DG u oligomicina. Para ello se aisló ARN total utilizando Trizol (Invitrogen), para posteriormente realizar un tratamiento con DNasa I (Thermo scientific), para eliminar ADN genómico contaminante. La transcripción reversa fue realizada de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante de M-MULV transcriptasa reversa (New England BioLab, USA). Un total de 2 μ g de RNA por cada muestra, fueron incubados en un volumen final de 20 μ L, el cual contiene 10X del buffer M-Mulv Transcriptasa Reversa (New England BioLab), 20 U Inhibidor de RNAsa (New England BioLab), 1 mM dNTPs, 0,5 ug/uL de Random primers (Promega) y 200 U M-MulV de transcriptasa reversa (New England BioLab) durante 5 min a 37°C, seguido de una incubación por 60 min a 42°C y 10 min a 70°C. Se realizaron reacciones en paralelo en ausencia de transcriptasa reversa, como control para evaluar la presencia de contaminantes de DNA. La reacción de PCR se realizó a partir de muestras de cDNA (diluido 1:1) usando 1 μ L de cada primer (IDT) y 2 μ L de Máster Mix 5x HOT FIREPol EvaGreen (Solis Biodyne) por muestra. Perfil de temperatura del ciclo de qPCR: 25°C por 1 segundo, 95°C por 15 minutos, 95°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos, 72°C por 20 segundos, 95°C por 1 minuto, 70°C por 15 segundos, 95°C por 15 segundos, 25°C por 1 segundo; que se realizó en termociclador convencional (Axygen) y *real time* (Mx3000P QPCR System). Los resultados fueron

normalizados al gen *housekeeping* 18s y se obtuvo la expresión relativa de los genes utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Rao y col., 2013).

Tabla I. Lista de genes medidos por RT-qPCR y secuencias de partidores utilizados. En la tabla se detalla la secuencia de partidores *Forward* y *Reverse* usados para los análisis de expresión génica mediante RT-qPCR de los distintos genes en estudio

Primer	Sentido	Antisentido
18s	GCCCGAAGCGTTTAC TTTGA	TTGCGCCGGTCCAAGAATTT
Colágeno II	GGCAATAGCAGGTTACGTACA	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT
Aggrecan	TCGAGGACAGCGAGGCC	TCGAGGGTGTAGCGTGTAGAGA
TIM1	GTGACAACAACACTGTCTCTACCT	CTGGTGGGTTCTCTCCTTATTG
MMP1	GCCTTCCAACCTCTGGAGTAATG	GAATGGGAGAGTCCAAGAGAATG
MMP9	CGGACCAAGGATACAGTTTGT	GCCATTCACGTCGTCCTTAT
HGF	TGGCCATGAATTTGACCTCTAT	AGCTGTGTTGCGTGTGGTATC
FGF1	GAAGCCCAAACCTCTACTG	GGTGTCTGTGAGCCGTATAAA
TGFb3	CCTTTCAGCCCAATGGAGATA	GAGGATTAGATGAGGGTTGTGG

6.9 Ensayo de proliferación.

Se sembraron condrocitos humanos articulares (HC-a) obtenidos del laboratorio ScienCell Research, a baja densidad (4×10^4 células/pozo) en placas de 24 pocillos (Corning) y se co-cultivaron con CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina o 2DG (2×10^4 células/inserto), utilizando insertos de cultivos celulares (membrana semipermeable de sistema Transwell (Falcon) con poros de $0,4 \mu\text{m}$). Luego de 24 horas de incubación y luego de 3 días se evaluó el número de condrocitos mediante espectrofotometría, a través del análisis de absorbancia, de acuerdo con el ensayo de WST1 (BioVision) siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.10 Ensayo de apoptosis de CU-MSC y HC-a.

Se evaluó la sobrevivencia de las mesenquimales y los condrocitos a 0, 100, 200 y $300 \mu\text{M}$ de H_2O_2 (Merck). Para ello, se sembraron células a una densidad de 1×10^4

células /cm² y se incubaron con medio normal. Luego de 24 horas se cambió el medio y se agregó α MEM (Gibco) con penicilina y estreptomicina, en conjunto con las distintas concentraciones de H₂O₂ (observando que las células no tengan más de un 60% de confluencia) y se incubaron por 24 horas. Las células fueron tripsinizadas y juntadas con sus sobrenadantes respectivos para completar la muestra y se marcaron con un anticuerpo conjugado a anexina-FITC y o ioduro de propidio (PI), para evaluar apoptosis temprana y tardía, respectivamente, mediante citometría de flujo utilizando el kit detección de apoptosis Anexina V-FITC (BD Pharmingen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Luego se evaluó si el pre-tratamiento durante 24 horas con 2DG u oligomicina, altera la respuesta a apoptosis, inducida por 300 μ M de H₂O₂, en MSCs.

6.11 Ensayo preventivo y de Condroprotección.

Para la evaluación de la capacidad de CU-MSCs en diferentes estados metabólicos, en la protección de condrocitos inducidos a apoptosis, se realizaron ensayos de co-cultivo entre ambos tipos celulares en presencia de una membrana semipermeable de sistema Transwell (Falcon) (poro: 0,4 μ m). Para el ensayo preventivo, se co-cultivaron células HC-a a una densidad de 14×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos con 2×10^4 células/inserto de MSC pre-tratadas durante 24 horas con 2DG u oligomicina. Luego de 24 horas, se removieron las MSCs, y se realizó un cambio de medio a los condrocitos con α MEM, suplementado con 300 μ M H₂O₂, incubándolas durante 24 horas. Los condrocitos fueron disgregados (y juntados con su respectivo sobrenadante para tomar las células muertas y completar la muestra), y se realizó un marcaje con el anticuerpo conjugado a anexina-FITC y o

ioduro de propidio (PI), para evaluar apoptosis temprana y tardía, respectivamente, mediante citometría de flujo utilizando el kit detección de apoptosis Anexina V-FITC (BD Pharmingen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el ensayo de condroprotección se sembraron HC-a a una densidad de 12×10^4 células/pocillo en placas de 24 pocillos y se incubaron por 24 horas. Luego se inició el co-cultivo sembrando 2×10^4 células/inserto de MSCs al mismo tiempo que se cambió el medio por α MEM, suplementado con $300 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, luego de 24 horas de incubación se evaluó apoptosis por citometría siguiendo el mismo procedimiento.

6.12 Evaluación de efecto apoptótico de 2DG y oligomicina.

Las MSCs fueron tratadas con distintas concentraciones de 2DG ($100 \mu\text{M}$, 1 mM , 50 mM) y oligomicina (0.1 , 1 , 10 y $100 \mu\text{g/ml}$). Luego de 24 horas de incubación se analizó la sobrevivencia por citometría de flujo.

6.13 Cuantificación de factores secretados.

El sobrenadante de MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina y el del co-cultivo de estas con HC-a fueron utilizados para cuantificar HGF y FGF (R&D) por ELISA siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.14 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm desviación estándar de la media (SD). Los análisis estadísticos se realizaron con la prueba Wilcoxon para muestras pareadas, considerando los pequeños grupos experimentales con distribuciones no normales. Un valor de $p < 0.05$ fue considerado como significativo.

7 RESULTADOS

7.1 Caracterización fenotípica de CU-MSCs.

Las MSCs utilizadas en este estudio fueron derivadas de cordón umbilical. Estas células para ser consideradas como MSC deben seguir los criterios de la ISCT que incluye adherencia al plástico, morfología fibroblastoide, expresión de marcadores de superficie como CD90, CD105 y CD73 y potencial de diferenciación hacia adipocitos, osteoblastos y condrocitos (Dominici, 2006). Las CU-MSCs, luego de ser sembradas, presentaron una elevada adherencia, morfología fibroblastoide (Fig. 3A), expresión positiva para marcadores mesodermales como CD90, CD105 y CD73, además de carecer de la expresión de los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34, lo que fue evaluado por citometría de flujo (Fig. 3B).

En paralelo, evaluamos la capacidad de diferenciación hacia distintos linajes como adipocitos, condrocitos y osteoblastos, propiedades características y que definen a una MSCs. Para ello, las CU-MSCs fueron inducidas, mediante el uso de medios de diferenciación específicos, hacia su diferenciación a distintos linajes celulares (Fig. 3C-E).

En particular, la diferenciación a condrocitos requiere que los factores de diferenciación interaccionen con las células a partir de la formación de un microambiente celular. Esto se logra gracias al establecimiento de interconexiones celulares de manera tridimensional, condiciones difíciles de emular debido a la adherencia de estas células a las placas de cultivo. Por lo tanto, se sembró una microgota, a una concentración de 30.000 células por 10 μ l, lo que permitió que, en las

siguientes horas o días de cultivo, el conjunto de células formara una micromasa (Fig. 3C).

Por otro lado, la diferenciación hacia adipocitos no requiere del establecimiento de contactos celulares. De tal manera que, una vez inducida la diferenciación a células adiposas, utilizando el medio de diferenciación respectivo, se observó la aparición de pequeñas inclusiones lipídicas dentro de las células, las cuales, con el paso de los días, incrementan su tamaño hasta formar una gran gota lipídica que abarca toda la célula (Fig. 3D).

Finalmente, evaluamos la diferenciación a osteoblastos. Para ello, el crecimiento celular requiere de un crecimiento bidimensional. Una vez iniciado el proceso de diferenciación, luego de la incubación con el medio de diferenciación específico las células crecen una junto a la otra abarcando toda la placa. Estas células en conjunto logran diferenciarse y comienzan a realizar mineralización a medida que el tiempo de cultivo aumenta. A través del microscopio de luz invertida, esta mineralización se observa de color marrón oscuro sobre el cultivo celular (Fig. 3E). Este proceso de diferenciación osteoblástica, requiere tiempos más prolongados que los cultivos condrogénicos, siendo un cultivo de aproximadamente 21 días para las distintas líneas de CU-MSCs. De esa forma, todas las líneas de CU-MSCs utilizadas, mantienen su potencial de diferenciación hacia condrocitos, adipocitos y osteoblastos, lo que demuestra que nuestras células son MSCs.

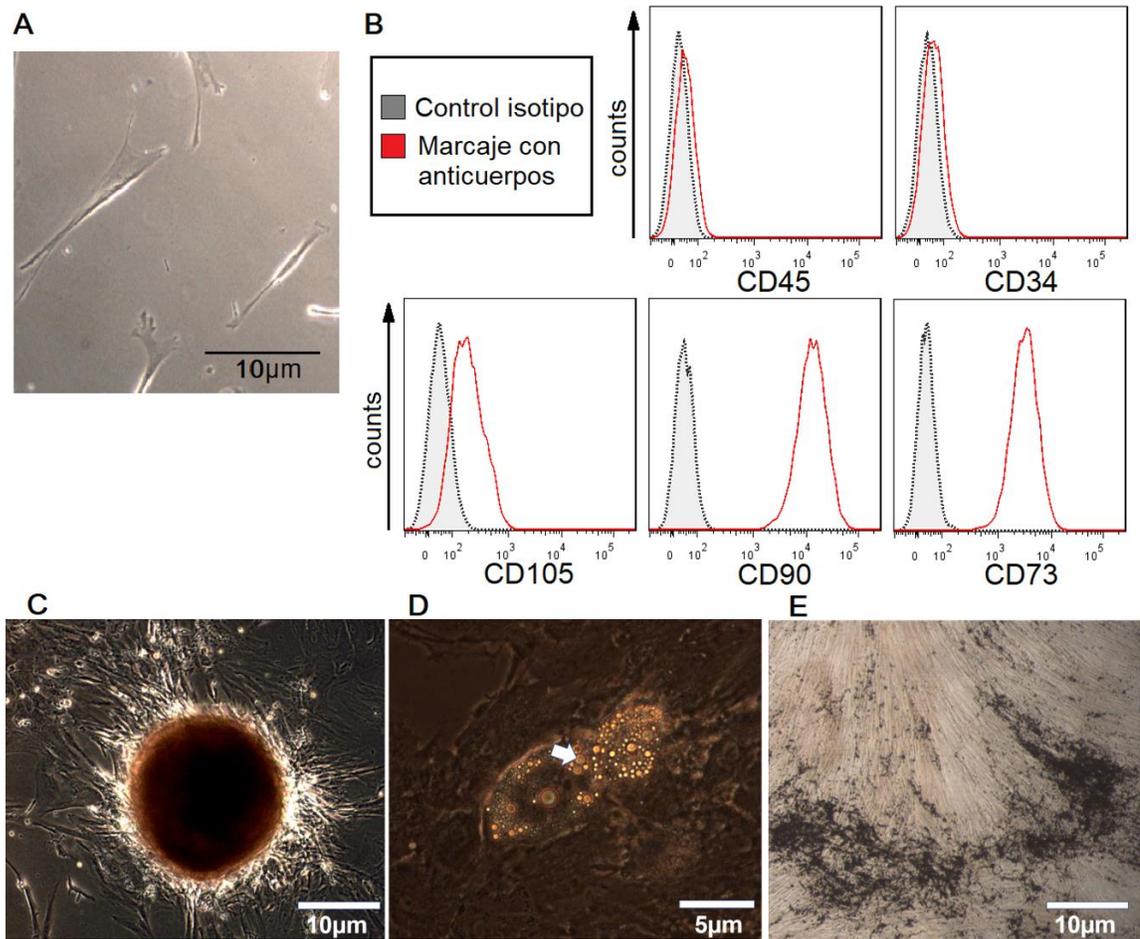


Figura 3. Caracterización fenotípica de CU-MSCs. **A)** Fotografía representativa de CU-MSC obtenidas mediante microscopía en campo claro. Se observa morfología fibroblastoide de una CU-MSC adherida a la placa de cultivo. **B)** Histograma de citometría de flujo representativo de un donante, de la expresión de los distintos marcadores moleculares. Línea negra indica control isotipo y línea roja el marcaje con el anticuerpo correspondiente. Se observa que CD73, CD105 y CD90 son positivos y CD45 y CD34 son negativos. **C)** Fotografía representativa de un donante del ensayo de diferenciación a tejido cartilaginoso. Se observa como las CU-MSCs al diferenciarse a condrocitos forman una micromasa. **D)** Fotografía representativa de un donante del ensayo de diferenciación a tejido adipogénico. Se observan las gotas lipídicas (flecha blanca) que se van acumulando a medida que las CU-MSCs se diferencian hacia adipocitos. **E)** Fotografía representativa de un donante del ensayo de diferenciación a tejido osteogénico. Se observa de color marrón oscuro la mineralización que producen

las CU-MSCs cuando se han diferenciado a osteoblastos. N=5 experimentos independientes utilizando 5 donantes diferentes.

7.2 Efecto de los tratamientos con 2DG y oligomicina sobre la sobrevida y el fenotipo de las CU-MSCs.

Para determinar el efecto sobre la sobrevida de las CU-MSCs de los tratamientos con diferentes concentraciones de 2DG y oligomicina se utilizó un ensayo de Anexina V y Ioduro de Propidio (PI). Para ellos se utilizaron las siguientes concentraciones: 100 μ M, 1 mM y 50 mM para 2DG y 0,1 μ g/ml, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml y 100 μ g/ml para oligomicina.

Evaluamos la expresión de Anexina V y PI mediante citometría de flujo 24 horas post tratamiento (Fig. 4A). Los resultados muestran que, respecto al control sin tratamiento, no existen cambios asociados a la viabilidad celular a las distintas concentraciones, tanto de 2DG como de oligomicina (Fig. 4B). Posteriormente, evaluamos si la viabilidad celular era afectada luego de la incubación con las drogas a largo plazo. Para ello, se utilizó concentraciones de 1mM para 2DG y 1 μ g/ml para oligomicina, dado que resultados preliminares en el laboratorio demostraron que 1mM de 2DG y 1 μ g/m de oligomicina demostraron modular el potencial inmunosupresor de MSCs murinas (Contreras RA 2018, publicación en preparación), se decidió probar la viabilidad de dichas concentraciones a largo plazo. Para ello, las CU-MSCs se mantuvieron durante 8 días con estas drogas, tiempo después del cual se analizó la sobrevida celular mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que ni 1mM de 2DG ni 1 μ g/ml de oligomicina cambia la viabilidad celular a largo plazo. (Fig.

4C). Por lo tanto, se eligieron dichas concentraciones para realizar los distintos experimentos del presente trabajo.

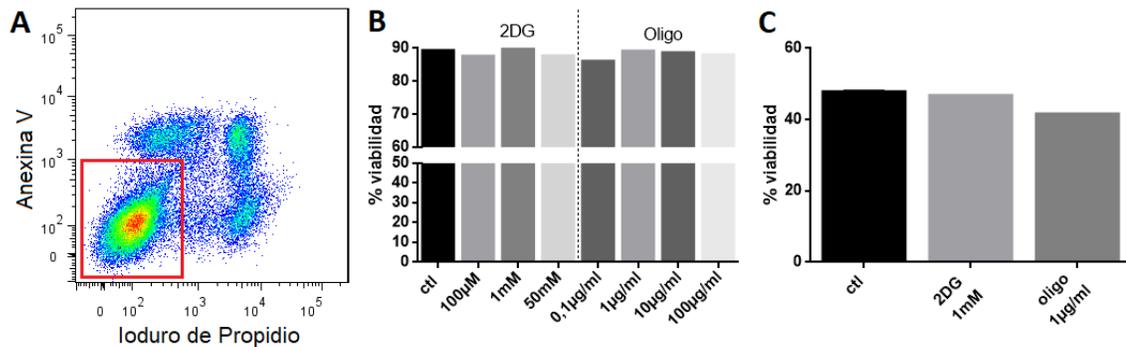


Figura 4. Efecto de los tratamientos a distintas concentraciones sobre la sobrevivencia de las CU-MSCs. Se utilizaron distintas concentraciones de 2DG u oligomicina por 24 horas u 8 días y se graficó el porcentaje de células vivas obtenido por citometría de flujo. **A)** *Dot plot* representativo de las células cultivadas en las distintas condiciones, el porcentaje de viabilidad de estas corresponden a los puntos enmarcados en rojo. **B)** Cuantificación de los porcentajes de viabilidad obtenidos mediante citometría. Se estudió efecto de viabilidad a diferentes concentraciones de 2DG y oligomicina 24 horas post tratamiento. Se observó que no hay un efecto citotóxico de las drogas sobre las células. **C)** Cuantificación de los porcentajes de viabilidad obtenidos mediante citometría. Se analizó el efecto de 1mM y 1µg/ml de 2DG y oligomicina respectivamente, 8 días post tratamiento. N=1.

Debido a que estas drogas son utilizadas para generar cambios en el metabolismo celular, decidimos determinar si su utilización modificaba el fenotipo de expresión molecular de los marcadores clásicos de superficie celular expresados por las CU-MSCs. Nuestros resultados mostraron que el pre-tratamiento por 24 horas tanto con 1mM de 2DG (Fig. 5 línea roja) como con 1µg/ml de oligomicina (Fig. 5 línea azul), no cambia el perfil de expresión de las CU-MSCs. Es más, no se observaron diferencias en la expresión de CD90, CD73 y CD105 (este último de forma menos

evidente ya que su expresión depende fuertemente del estado proliferativo de las células), y se mantuvo la expresión negativa para los marcadores hematopoyéticos CD45 y CD34, no mostrando diferencias significativas en comparación a la condición control (Fig. 5 línea negra).

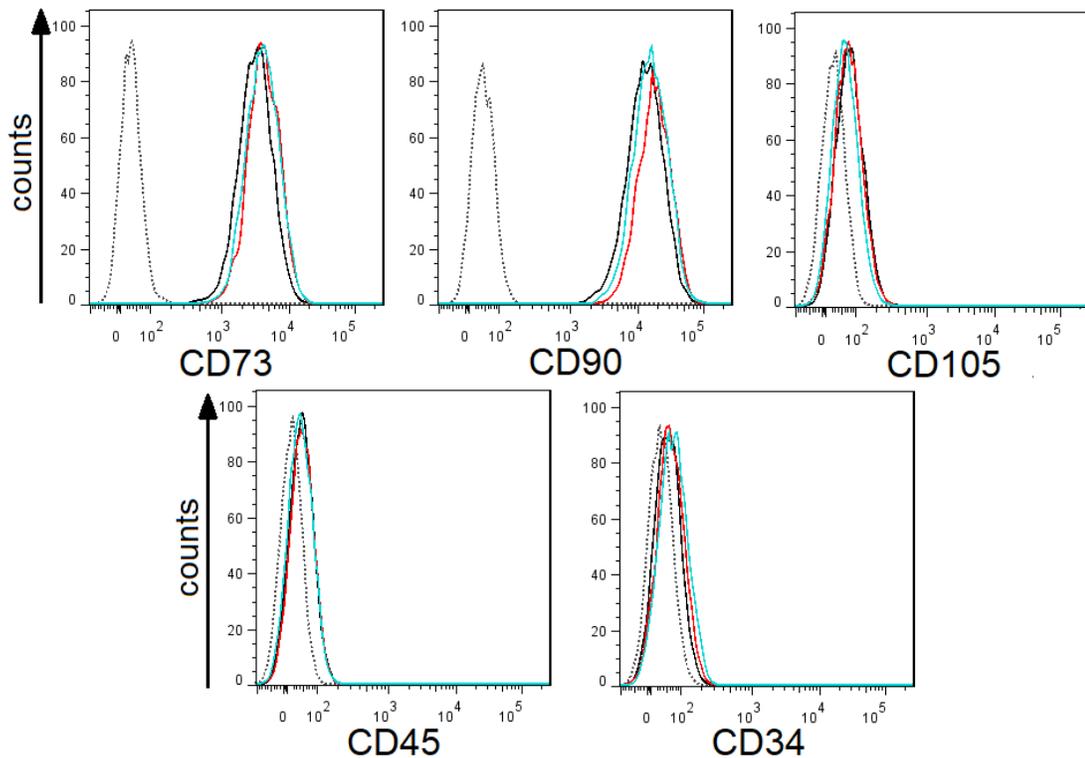


Figura 5. Expresión de marcadores de superficie canónicos en MSC control y tratadas con 2DG u oligomicina. Las CU-MSCs fueron cultivadas en medio DMEM completo y tratadas por 24 horas con 2DG 1mM y oligomicina 1µg/ml. Histogramas representativos de 1 donante de la expresión de marcadores de superficie característicos analizados por citometría de flujo. Línea punteada indica el control isotipo, línea roja el tratamiento con 2DG, línea azul el tratamiento con oligomicina y línea negra sin tratamiento (ctl). N=5 experimentos independientes.

7.3 Efecto de los tratamientos con 2DG y oligomicina sobre la diferenciación hacia linaje condrogénico

Una vez estandarizado el proceso de diferenciación de CU-MSCs hacia condrocitos, evaluamos si la reprogramación metabólica mediada por 2DG u oligomicina, modifica la capacidad de diferenciación hacia condrocitos. Para ello, las CU-MSCs fueron pre-incubadas durante 24 horas con 1mM de 2DG o 1µg/ml de oligomicina. Una vez realizado el pre-tratamiento, se estableció la diferenciación de estas células hacia condrocitos, a través de la formación de la microgota en presencia de su respectivo medio de diferenciación. Luego de la formación de la microgota, el tratamiento con las distintas drogas se mantuvo en cada cambio de medio por una semana con el fin de mantener el metabolismo de las MSCs asociado a cada droga. Luego del primer día de incubación se observó el recogimiento de las células para formar la micromasa lo que les otorga la conformación y ambiente propicio para continuar su diferenciación a condrocitos. Interesantemente, en varias de las líneas de CU-MSCs utilizadas, se observó formación de micromasa en la condición control de oligomicina, sugiriendo que la sola presencia de oligomicina en el medio induce la diferenciación a condrocitos (Fig. 6A). Posteriormente, luego de 11 días, evaluamos mediante la tinción de Safranina O, la presencia de glicosaminoglicanos típicos en el proceso de diferenciación hacia condrocitos, la cual pudo ser observada tanto en condiciones controles como diferenciadas (Fig. 6B).

La formación de la micromasa o el tamaño de esta, no necesariamente se encuentra directamente relacionado al éxito de la diferenciación. Por lo tanto, es necesario establecer molecularmente el grado de diferenciación hacia cartílago. Para ello, evaluamos mediante RT-qPCR la expresión de Colágeno II (Fig. 6C) y Agrecan

(Fig. 6D), genes asociados al linaje condrogénico. Al respecto, se observó que en algunos donantes de CU-MSCs, el control con medio de diferenciación no formó una micromasa definida (Fig. 6B), pero en el análisis de expresión de los genes condrogénicos, observamos aumento de expresión de Colágeno II (Fig. 6C barra verde-DIF-) y Agrecan (Fig. 6D barra verde-DIF-), comparado con el control sin medio de diferenciación (barra verde-CTL-), por lo que no necesariamente la formación de micromasa indica que hubo diferenciación hacia condrocitos.

Interesantemente, luego de 11 días de iniciada la diferenciación, es posible observar que el solo tratamiento con oligomicina en CU-MSCs, incrementa su expresión de Colágeno II (Fig. 6C, barra azul-CTL-) y Agrecan (Fig. 6D, barra azul-CTL-) respecto al control (barra verde-CTL-). Por otro lado, observamos que las CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina que si fueron cultivadas con medio de diferenciación, al día 11 no logran aumentar de manera significativa la expresión de los genes condrogénicos (Fig. 6 C y D barra azul-DIF-) respecto al control pre-tratado con oligomicina (barra verde-CTL-).

Estos resultados sugieren que el uso de oligomicina promueve la diferenciación de CU-MSCs hacia condrocitos sin necesidad de medio de diferenciación. Además, el pretratamiento junto con el medio de diferenciación, no presentan un efecto sinérgico dado que no hay diferencias significativas entre las CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina e inducidas con el medio de diferenciación en comparación con el control.

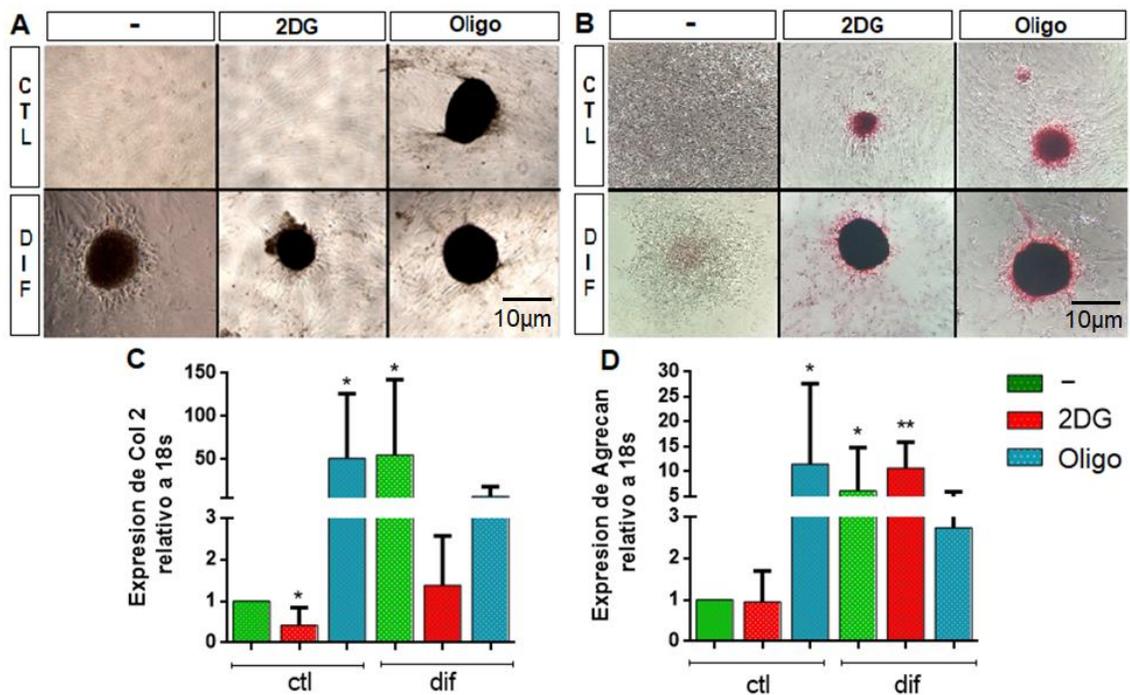


Figura 6. Diferenciación condrogénica de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina luego de 11 días de diferenciación. A) Fotografías representativa de CU-MSCs diferenciadas a condrocitos obtenidas por microscopía de campo claro. **B)** Fotografías representativas de CU-MSCs diferenciadas a condrocito y teñidas con Safranina O obtenidas por microscopía de campo claro. **C-D)** Expresión relativa a 18s de genes condrogénicos Colágeno II y Agrecan obtenida por RT-qPCR de MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina (Oligo) y diferenciadas a condrocitos. Se tomo como control las MSCs sin medio de diferenciación ni pretratamiento farmacológico, y se normalizó según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $p < 0,05$. * representa análisis con respecto al control sin pretratamiento ni medio de diferenciación. N=3 experimentos independientes.

7.4 Resistencia de las CU-MSCs y HC-a a distintas concentraciones de peróxido de hidrogeno.

En una articulación dañada, el elevado estrés oxidativo existente asociado principalmente a la liberación de ROS, produce una disminución de la sobrevivencia de los condrocitos residentes y de las MSCs infundidas durante un tratamiento. Por este

motivo, decidimos evaluar el efecto del H_2O_2 sobre la sobrevivencia de condrocitos (HC-a) que estén en ausencia o presencia de CU-MSC pre-tratadas o no con 2DG u oligomicina. Esto con el objetivo de simular las condiciones patológicas de liberación de radicales libres de oxígeno presentes en la articulación dañada.

En una primera aproximación, determinamos la dosis letal de H_2O_2 a usar de forma de encontrar la dosis necesaria que nos permitiera comparar sobrevivencia con las células que no reciben el tratamiento con H_2O_2 . Para ello se sembraron, separadamente, CU-MSCs y HC-a, a las cuales se les adicionó diferentes concentraciones de H_2O_2 . Luego de 24 horas de incubación, se colectó el sobrenadante y se evaluó la sobrevivencia celular por citometría de flujo (Fig. 7A).

Nuestros resultados indican que tanto para las CU-MSCs (Fig. 7B) como para los condrocitos (Fig. 7C), las concentraciones de 100 μM , 200 μM y 300 μM de H_2O_2 disminuyen la viabilidad respecto al control, pero solo la concentración de 300 μM de H_2O_2 fue capaz de reducir la sobrevivencia celular de manera significativa en comparación con la condición control. Por lo tanto, se seleccionó esta dosis que generó una muerte celular significativa y que al mismo tiempo mantuvo un porcentaje de células (entre 30 y 40%) para trabajar pensando en los experimentos posteriores.

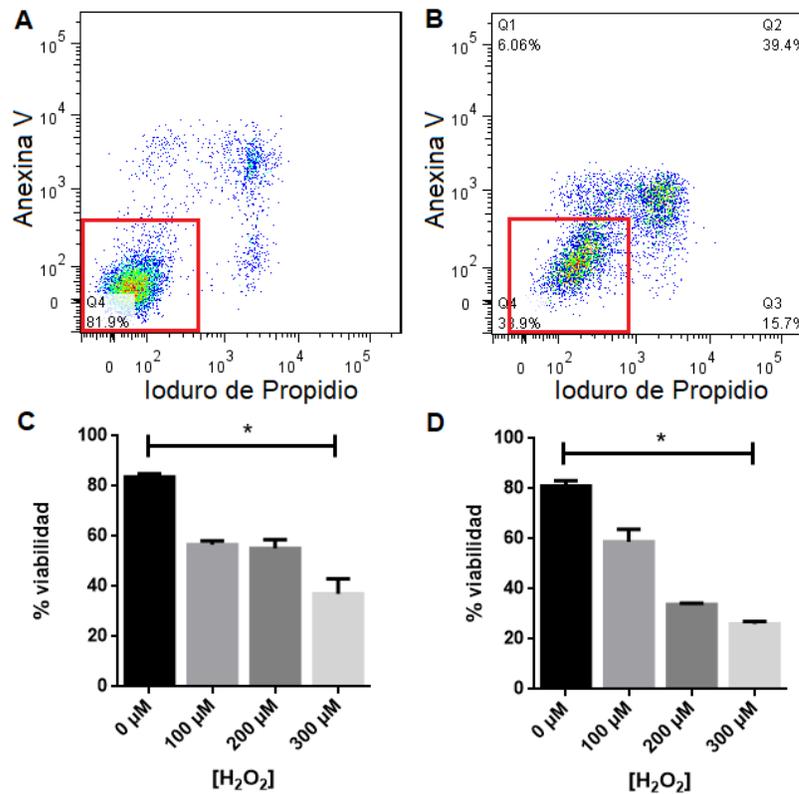


Figura 7. Resistencia de CU-MSCs y HC-a a distintas concentraciones de peróxido de hidrógeno por 24 horas. A) Dot plot representativo del porcentaje de viabilidad de condrocitos, el cuadro rojo muestra los puntos seleccionados en el porcentaje de viabilidad. **B)** Dot plot representativo del porcentaje de viabilidad de CU-MSCs, el cuadro rojo muestra los puntos seleccionados en el porcentaje de viabilidad **C)** Viabilidad de CU-MSCs tratadas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Observamos que viabilidad a 300 μM de H₂O₂ disminuye. **D)** Viabilidad de condrocitos tratadas a diferentes concentraciones de H₂O₂. Observamos que viabilidad a 300 μM de H₂O₂ disminuye. *p<0,05. N=1 donante experimental. Experimento realizado en triplicado.

7.5 Resistencia de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina a estrés oxidativo.

Para evaluar si el pretratamiento con 1mM de 2DG o 1μg/ml oligomicina, modifica la resistencia celular al estrés oxidativo, comparamos la supervivencia celular de CU-MSCs pre-tratadas o no con 2DG u oligomicina en presencia de 300 μM de H₂O₂.

Luego de 24 horas de incubación se colectó el sobrenadante celular, así como las células adheridas, con la finalidad de evaluar la sobrevivencia celular mediante citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que al estimular con 300 μM de H_2O_2 las CU-MSCs que recibieron el pre-tratamiento con oligomicina, poseen un porcentaje de viabilidad significativamente mayor en comparación con las células sin tratar en esta misma condición (Fig. 8B). Además, al estimularlas con 300 μM de H_2O_2 , las CU-MSCs sin tratar y las pre-tratadas con 2GD muestran una baja significativa de su viabilidad respecto sus controles sin H_2O_2 , mientras que las CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina no muestran una disminución significativa de la sobrevivencia entre las distintas condiciones. Estos resultados sugieren que la inducción de un metabolismo glicolítico en CU-MSCs promueve su resistencia a H_2O_2 .

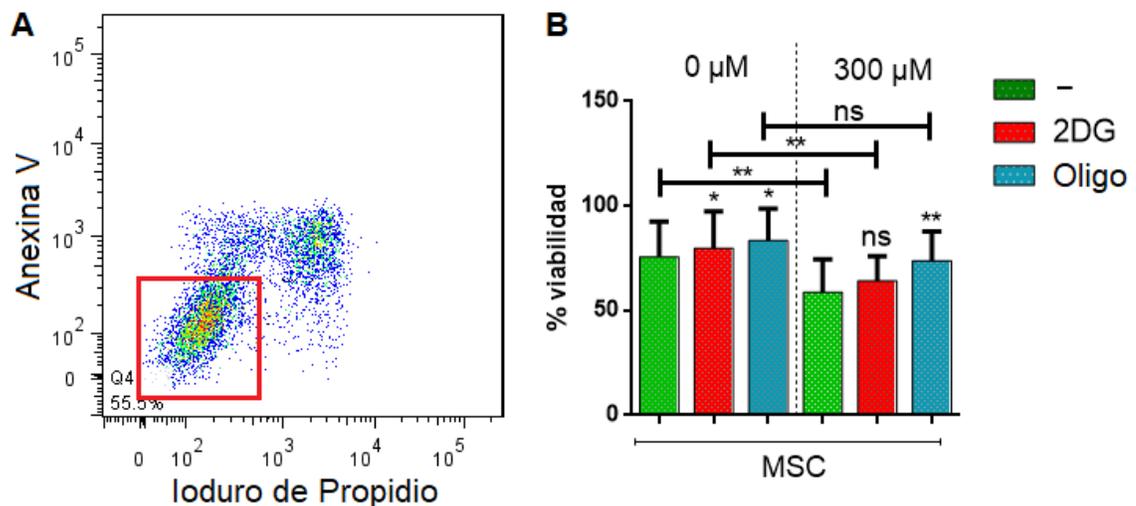


Figura 8. Resistencia de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina a 300 μM de peróxido de hidrógeno por 24 horas. **A)** *Dot plot* representativo del porcentaje de viabilidad de CU-MSCs, el cuadro rojo muestra los puntos seleccionados en el porcentaje de viabilidad. **B)** Viabilidad de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina (Oligo), a 0 μM y 300 μM de H_2O_2 . Observamos que viabilidad de CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina tiende a aumentar. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ análisis dentro de cada condición (0 o 300 μM de H_2O_2) respecto a su control (verde); (símbolo

sobre columna) y análisis de distintos grupos de MSCs (-,2DG,Oligo) en 300 μ M de H₂O₂ respecto a su control sin H₂O₂ (símbolo sobre barras horizontales). N=3 experimento independientes, con triplicado.

7.6 Ensayo de condroprotección de HC-a en co-cultivo con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.

En la OA, los condrocitos comienzan a sufrir apoptosis debido a la gran cantidad de radicales libres presentes en la articulación dañada. Al mismo tiempo, este ambiente dificulta la regeneración del tejido condrogénico. Es por eso, que decidimos evaluar si los factores solubles de las CU-MSCs son capaces de proteger a los condrocitos de la apoptosis en presencia del estímulo de estrés oxidativo.

Para evaluar la capacidad de las MSCs de prevenir la apoptosis de condrocitos se estableció un co-cultivo celular entre HC-a y CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina, en una relación 7:1. Para esto, Las CU-MSCs fueron depositadas en insertos (membrana semipermeable de 0,4 μ m) ubicados sobre los pocillos de la placa que contienen a las células HC-a, siendo estos permeables a los factores solubles e impidiendo el contacto entre los distintos tipos de células. Luego de 24 horas de incubación se retiraron los insertos con las MSCs y se les cambió el medio a los HC-a por medio α MEM con H₂O₂ a 300 μ M. Finalmente, 24 horas después se evaluó la sobrevivencia celular de los condrocitos mediante citometría de flujo (Fig. 9A).

Luego de analizar la sobrevivencia celular utilizando diferentes donantes de CU-MSCs, no se observaron diferencias en la sobrevivencia celular para los diferentes grupos celulares en comparación con el grupo control (Fig. 9B-C).

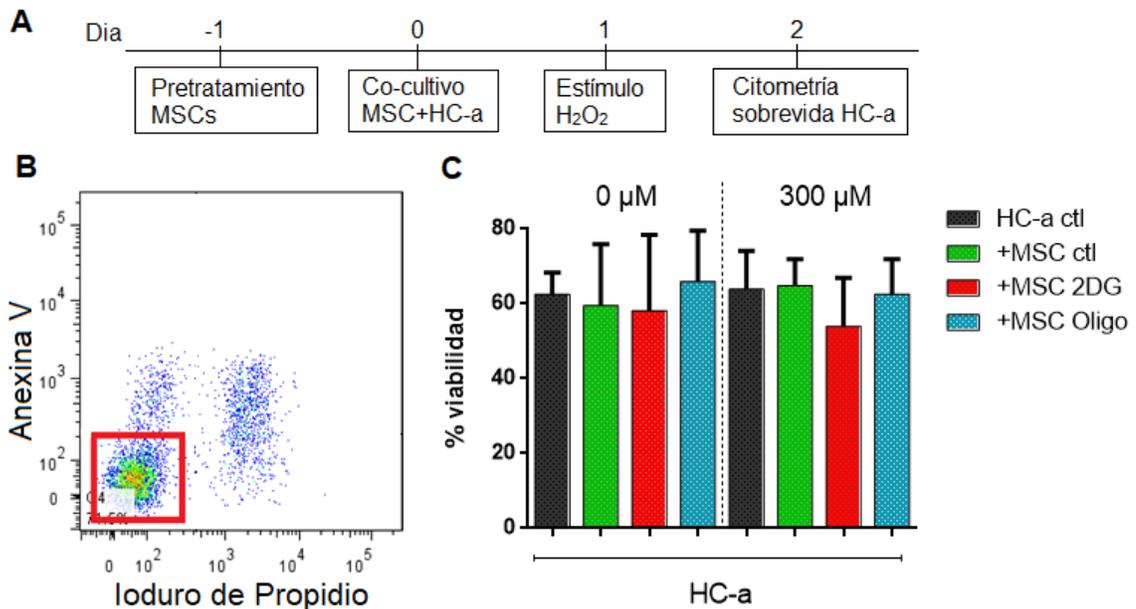


Figura 9. Efecto preventivo de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomycin sobre muerte celular de HC-a. **A)** Condrocitos y CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomycin fueron co-cultivadas en razón 7:1 en una membrana semipermeable de 0,4 μm (sistema transwell) por 24 horas, luego se agregó una estimulo de H₂O₂ de 300 μM por 24 horas. **B)** *Dot plot* representativo del porcentaje de viabilidad de condrocitos, el cuadro rojo muestra los puntos seleccionados en el porcentaje de viabilidad. **C)** Viabilidad de condrocitos co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomycin (Oligo) a 0 μM y 300 μM de H₂O₂. No observamos cambios en la viabilidad de condrocitos en las distintas condiciones. Ns=no significativo para todas las comparaciones. N=4 experimentos independientes.

Por lo tanto, decidimos realizar una segunda aproximación experimental, en la cual incorporamos las CU-MSCs al mismo tiempo que se agregaba el estímulo de H₂O₂ a los condrocitos. De esta manera evaluamos la capacidad de las CU-MSCs de proteger y revertir el proceso de apoptosis que comienzan a experimentar los HC-a debido a las condiciones de estrés que genera la presencia del H₂O₂ en el medio. Nuestros resultados apuntan a que las CU-MSCs (pre-tratadas con 2DG, con oligomycin o sin pre-tratar), inducen condroprotección ya que aumentan la sobrevida

de los HC-a en presencia de 300 de μM H_2O_2 respecto a los HC-a sin co-cultivo, siendo más significativo este aumento cuando las CU-MSCs son previamente tratadas con oligomicina (Fig. 10C). Además, al estimular con 300 μM de H_2O_2 , los HC-a co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina, no disminuyen su viabilidad en comparación al control sin H_2O_2 , contrario a lo que ocurre con los otros grupos de HC-a donde la baja de la viabilidad respecto a sus controles es significativa. Estos resultados sugieren que la oligomicina promueve las propiedades condroprotectoras de las CU-MSCs, mecanismo que podría estar mediado por la liberación de factores solubles, liberados por las CU-MSCs, asociados a condroprotección, ya que el co-cultivo no permite el contacto directo entre los distintos tipos celulares.

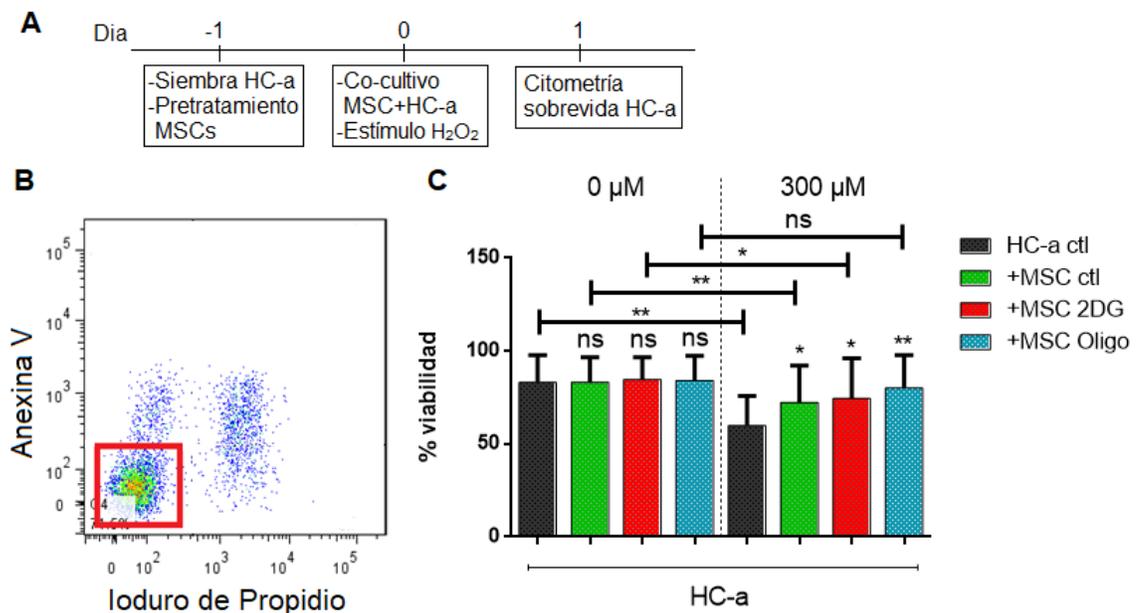


Figura 10. Ensayo de condroprotección co-cultivando HC-a con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina. A) Condrocitos y CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina fueron co-cultivadas en razón 6:1 en una sistema transwell. Se cultivan HC-a por 24 horas y luego MSCs son agregadas junto con un estímulo de H_2O_2 de 300 μM y se mantiene por 24 horas. **B)** Dot plot representativo del porcentaje de viabilidad

de condrocitos, el cuadro rojo muestra los puntos seleccionados en el porcentaje de viabilidad. **C)** Viabilidad de condrocitos co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina (Oligo) a 0 μM y 300 μM de H_2O_2 . N=6 experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ analisis dentro de cada condición (0 o 300 μM de H_2O_2) respecto a su control (verde)(símbolo sobre columna) y analisis de distintos grupos de MSCs (-,2DG,Oligo) en 300 μM de H_2O_2 respecto a su control sin H_2O_2 (Símbolo sobre barra horizontal). N=6 experimento independientes.

7.7 Ensayo de proliferación de HC-a en co-cultivo con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina.

Para evaluar si los pre-tratamientos de CU-MSCs con 2DG u oligomicina afectan la proliferación de condrocitos mediante un mecanismo asociado a factores solubles se estableció un co-cultivo de CU-MSCs (previamente tratadas por 24 horas con 2DG u oligomicina) y HC-a, en una relación 2:1. Luego de las primeras 24 horas de co-cultivo, utilizando el WST1 se midió la actividad mitocondrial de condrocitos el que indirectamente es proporcional al número de células en cultivo mediante absorbancia (Fig. 11A). Luego de 72 horas de co-cultivo nuevamente se midió la absorbancia de HC-a que habían permanecido en co-cultivo, con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina (Fig. 11B).

Nuestros resultados indican que los condrocitos co-cultivados con las CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina obtuvieron la mayor proliferación celular, siendo significativamente mayor que los condrocitos co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG y sin pre-tratar (Fig. 11C), sugiriendo que el metabolismo glicolítico inducido por oligomicina en CU-MSCs, podría estar incrementando la liberación de factores

tróficos que favorecen la proliferación de los condrocitos, en contraste con un metabolismo de OXPHOS inducido o un metabolismo sin alteración farmacológica. Aunque el aumento de la proliferación de HC-a en co-cultivo con CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina no logra ser significativo respecto a la proliferación propia de los condrocitos en el tiempo estudiado (barra negra), lo importante es que no disminuye la proliferación.

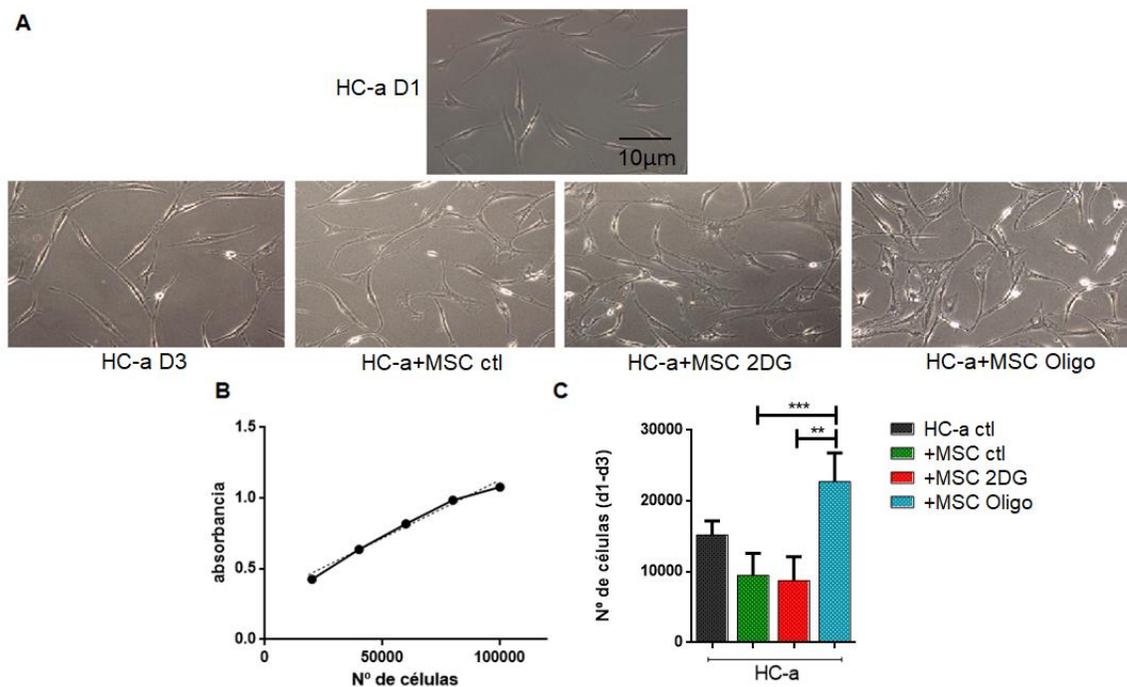


Figura 11. Ensayo de proliferación de HC-a co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina. A) Fotografías representativas de los HC-a al día 1 (D1) y al día 3 (D3) en condiciones control (ctl) o pre-tratadas con 2DG u oligomicina (OA). **B)** Curva de calibración que representa la equivalencia entre absorbancia y número de células. **C)** Número de condrocitos presentes luego de ser cultivados en presencia o ausencia de CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina. Observamos que la proliferación de HC-a co-cultivados con CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina (azul), tiende a ser mayor en relación a la proliferación de HC-a co-cultivados con CU-

MSCs pre-tratadas con 2DG (rojo) o sin pre-tratamiento (verde). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. N=4 experimentos independientes, con triplicado.

7.8 Expresión y liberación de factores tróficos de CU-MSC pre-tratadas con 2DG u oligomicina.

Para evaluar si el incremento en la proliferación celular de condrocitos se encontraba mediada por la expresión de factores tróficos producidos por CU-MSCs, evaluamos mediante RT-qPCR la expresión de diversos genes asociados a la inducción de sobrevida de condrocitos. Evaluamos los niveles de expresión de TGF β 3, FGF, HGF, TIM1, MMP1 y MMP9 en las CU-MSCs pre-tratadas durante 24 horas con 2DG u oligomicina, utilizando como gen de referencia la expresión de la subunidad 18s ribosomal (Fig. 12).

Nuestros resultados mostraron que la expresión del RNA mensajero para TGF β 3, disminuye significativamente en CU-MSCs que fueron pre-tratadas con oligomicina (Fig. 12A, barra azul) en comparación con la condición control (Fig. 12A, barra verde), sugiriendo que su expresión es modulada por cambio en el estado metabólico celular. Para FGF, HGF, TIM1, MMP1 y MMP9, se observa la misma tendencia, pero la disminución no es estadísticamente significativa. Estos resultados sugieren que el estado metabólico de la célula modifica la expresión de algunos genes asociados a condroremodelación, sin embargo, es necesario aumentar el número de repeticiones y donantes para saber la significancia de estos resultados.

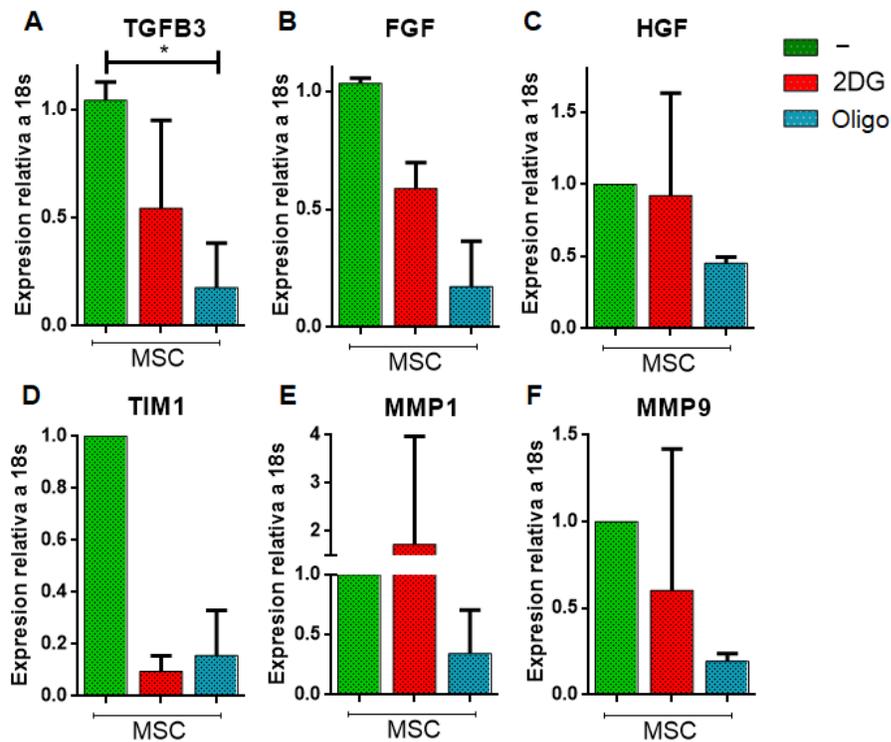


Figura 12. Determinación mediante RT-qPCR de la expresión de factores tróficos de CU-MSCs tratadas con 2DG u oligomicina. A-F) Análisis de la expresión relativa de TGFβ3 (A), FGF (B), HGF (C),TIM1 (D), MMP1 (E), MMP9 (F) de acuerdo a la expresión del gen de referencia 18s en muestras de CU-MSCs control (barra verde), y que recibieron pre-tratamiento con 2DG (barra roja) u oligomicina (barra azul). El control se normalizó según el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *p<0,05. N=2 experimentos independientes, con excepción de TGFβ3 con N=4.

Posteriormente evaluamos a través de ELISA si el incremento de la proliferación de HC-a estaba dada por la liberación de factores tróficos por parte de las CU-MSCs que promueven la proliferación de condrocitos. Para ello, evaluamos la modulación de FGF y HGF por ELISA en las CU-MSCs pre-tratadas durante 24 horas con 2DG u oligomicina. Nuestros resultados muestran que la mayor cantidad de FGF (Fig. 13A, barra azul) y HGF (Fig. 13B, barra azul) se encontró en el sobrenadante de CU-MSCs pre-tratadas con oligomicina, sin embargo no es significativamente mayor a

las otras condición. Solo en HGF observamos un aumento significativo respecto a CU-MSCs pretratadas con 2DG (Fig. 13B, barra roja). Esto sugiere que la alteración metabólica en CU-MSCs no varía su liberación de estos factores tróficos.

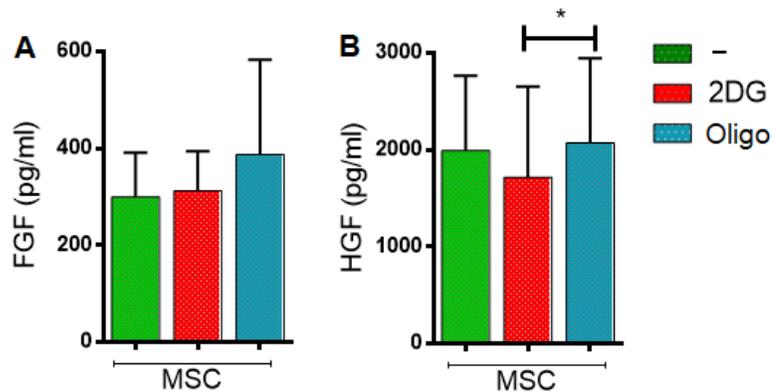


Figura 13. Cuantificación de la expresión de FGF y HGF humanos en CU-MSCs tratadas con 2DG u oligomicina. Cuantificación a través de ensayo de ELISA **A)** FGF y **B)** HGF en el sobrenadante de las MSCs tratadas con 2DG u oligomicina. N=5 experimentos independientes.

Finalmente, realizamos la cuantificación de FGF y HGF en los sobrenadantes obtenidos desde el co-cultivo de CU-MSCs y HC-a buscando si las CU-MSCs requerían de un contacto celular con HC-a para aumentar la producción de factores asociados a condroprotección. Estos resultados nos permitieron mostrar que los cultivos de HC-a por si solos liberan FGF y HGF de forma similar a los co-cultivos con CU-MSCs (Fig. 14A-B, barras negras). Nuevamente, el pre-tratamiento con oligomicina, fue el que obtuvo mayor concentración tanto de FGF (Fig. 14A, barra azul) como HGF (Fig. 14B, barra azul), sin embargo, este aumento no es significativo respecto a las otra condiciones. Estos resultados sugieren que no existen cambios en la liberación de estos factores por HC-a ni CU-MSCs, aun cuando están en co-cultivo,

por lo que la variación de la proliferación de HC-a observada no se debe a un aumento de la liberación de FGF o HGF.

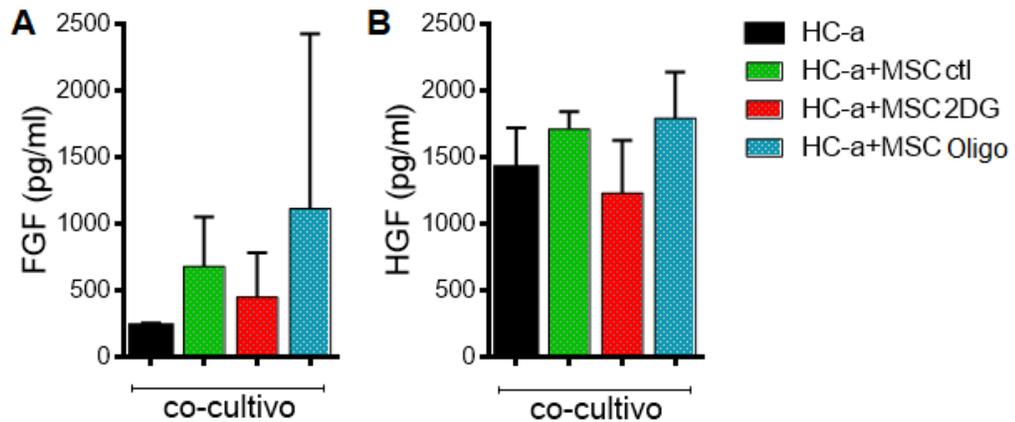


Figura 14. ELISA de factores tróficos de co-cultivo de HC-a y MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina. Se tomaron los sobrenadantes de los co-cultivos de HC-a junto a las MSCs en sus distintas condiciones y se realizó la cuantificación de **A)** FGF y **B)** HGF a través de un ensayo de ELISA. Ns: no significativo para ninguna condición. N=2 experimentos independientes.

8 DISCUSIÓN

En los últimos años, el estudio de MSCs se ha focalizado en encontrar estrategias que permitan potenciar el efecto terapéutico de las MSCs para la regeneración de tejidos. En el contexto de la osteoartritis el mecanismo de acción ha sido principalmente a través del implante directo de las células en la articulación o utilizando una estructura de material biológico que contenga a las MSCs (Freitag, 2016), presentándose algunos resultados prometedores en cuanto a la regeneración articular, específicamente de cartílago hialino. Resultados similares se han obtenido al implantar células previamente diferenciadas a condrocitos, pero se han presentado dificultades al tratar de generar condrocitos que presenten el fenotipo de cartílago hialino. La recreación de la estructura del cartílago articular nativo y su microambiente han mostrado ser claves para lograr dicha diferenciación (Somoza, 2014).

La implantación de MSCs para explorar sus funciones también se ha realizado utilizando “*carriers*” bioactivos que contienen factores de crecimiento con la habilidad de mantener bioactivas a las células, al mismo tiempo que ayudan a su transporte al sitio dañado. (Qureshi, 2009). Uno de estos factores es TGF β 3 que aumenta la expresión en MSCs de los genes condrogénicos Colágeno II y Agrecan, y asiste la migración celular en conjunto con el factor FGF2 (Ng & col., 2008)(Song & col., 2002).

Se ha observado que el metabolismo de las MSCs tiene un rol fundamental en sus funciones fisiológicas principalmente en su potencial de diferenciación hacia linaje adipogénico, osteogénico y condrogénico (Pattappa, 2011)(Forni & col., 2016) . Es por esto que resulta interesante estudiar el efecto del metabolismo sobre las MSCs y explorar el efecto de la modulación metabólica sobre estas células previo al implante

pensando en una posible terapia celular utilizando MSCs cuya diferenciación condrogénica y función terapéutica se encuentre potenciada y asegurada.

Para el primer objetivo de este trabajo, realizamos la diferenciación condrogénica de las CU-MSCs pre-tratadas con 2DG u oligomicina. Observamos que las MSCs inducidas hacia un metabolismo glicolítico (MSCs glicolíticas), sin medio de diferenciación, tienen un aumento de la expresión de los genes condrogénicos colágeno 2 y agregan respecto al control, siendo superior incluso a las MSCs cultivadas con medio de diferenciación en el caso de agregan. Este resultado nos indica que las CU-MSCs moduladas hacia un metabolismo glicolítico son capaces de diferenciarse hacia condrocitos solo por el uso de la droga oligomicina, sin otro requerimiento que el contacto tridimensional entre ellas, algo que no se había reportado antes en la literatura. Más aún, para lograr diferenciar MSCs hacia linaje condrogénico se ha reportado la necesidad de usar TGF β 3 para inducir la diferenciación (Tracy Ballock, 1993). Esto resulta importante ya que la diferenciación de las CU-MSCs hacia linaje condrogénico se ve potenciada, lo que nos encamina hacia el objetivo de generar una población de células con la capacidad de regenerar cartílago articular y mejorar la sintomatología de la osteoartritis.

Además, estos resultados muestran correlación con lo visto en la literatura donde se indicaba que las MSCs al diferenciarse hacia linaje condrogénico necesitan mantener un metabolismo glicolítico (Pattappa, 2011). Del mismo modo la inducción de un metabolismo de OXPHOS con 2DG se tradujo en la ausencia de diferenciación de las CU-MSCs, ya que no hay aumento de expresión de genes condrogénicos.

Para el segundo objetivo evaluamos la sobrevida a ROS de las CU-MSCs inducidas hacia diferentes estados metabólicos. Observamos que las MSCs glicolíticas

aumentan su sobrevivencia frente a ROS. Este resultado sugiere que la inducción de la vía glicolítica en MSCs puede hacerlas más resistentes al estrés oxidativo generado por el H₂O₂ en el medio.

Este efecto también puede deberse al uso de oligomicina para la obtención de CU-MSCs glicolíticas, la cual podría estar aumentando los niveles de ROS en la célula y por consiguiente aumentando la expresión de genes asociados a la respuesta antioxidantes, otorgando esta mayor resistencia a H₂O₂ por parte de las CU-MSCs, lo que es muy favorable para su sobrevivencia, dado que son implantadas en una articulación dañada y deben sobrevivir a este microambiente, el cual, al presentar altos niveles de ROS, produce una elevada apoptosis y por ende una disminución de su efecto terapéutico.

Por lo tanto, la inducción de un metabolismo glicolítico a través de oligomicina en CU-MSCs promueve su resistencia al estrés oxidativo, lo que les permitiría sobrevivir y permanecer en la articulación por más tiempo, logrando ejercer sus funciones condroprotectoras y facilitar la reparación del tejido dañado por un tiempo más prolongado.

Siguiendo con el segundo objetivo, evaluamos las propiedades condroprotectoras de las CU-MSCs moduladas metabólicamente sobre condrocitos humanos. Nuestros resultados mostraron que MSCs glicolíticas aumentan la sobrevivencia a ROS de los HC-a, indicando que estaríamos promoviendo sus propiedades condroprotectoras, ya que protege a los condrocitos de la apoptosis generada por ROS. Además, las MSCs glicolíticas mantienen la proliferación natural de los condrocitos. Esto tiene gran relevancia si pensamos que estas células podrían ser utilizadas como terapia para estadios iniciales de osteoartritis donde comienza a

aumentar la presencia de estrés oxidativo y con ello la apoptosis, facilitando la regeneración por los mismos condrocitos residentes (Lepetsos & Papavassiliou, 2016).

Para el tercer objetivo medimos la cantidad de algunas moléculas liberadas por las CU-MSCs conocidos como factores de crecimiento y sobrevida que podrían estar involucradas en la función terapéutica de las MSCs sobre la osteoartritis.

Al estudiar el sobrenadante del co-cultivo de HC-a y CU-MSCs con distintos estatus metabólicos, observamos que la inducción de la glicólisis en las CU-MSCs muestra una tendencia al aumento en la producción de FGF y HGF en el co-cultivo, lo cual se había observado también, en el sobrenadante de estas MSCs cultivadas en ausencia de condrocitos. En el presente trabajo no obtuvimos un aumento significativo de los factores estudiados en el co-cultivo, sin embargo, al aumentar el número de repeticiones y de donantes de CU-MSC podrían observarse diferencias significativas. Sin embargo, trabajos previos han estudiado el “*cross-talk*” entre MSCs y condrocitos, reportando el rol de estos últimos sobre la diferenciación de las MSCs donde el aumento de genes asociados a condrogénesis como agregan y colágeno 2 ocurre gracias a la producción de TGF β 3 por parte de los condrocitos. (Fischer & col., 2010); (Liu, 2010); (Aung & col., 2011); (Acharya, 2012). Por otro lado, un estudio con MSCs derivadas de tejido adiposo (ADSCs) demostró su rol protector sobre condrocitos, al disminuir la expresión de marcadores fibróticos e hipertróficos, ambos marcadores de condrocitos derivados de pacientes con OA. El mecanismo mediante el cual las ADSCs ejercen su efecto condroprotector está asociado a la disminución de expresión de TGF β 1 (conocido como pro-fibrótico) por parte de los condrocitos junto con un aumento de HGF secretado por parte de las ADSCs (Maumus, 2013). HGF es mayormente secretado por células estromales y es conocido por participar en la

protección de tejidos y regeneración al promover la supervivencia celular, proliferación y estimulando la degradación de la matriz extracelular (Nakamura y col., 2011). En otro trabajo donde se utilizaron BM-MSCs, se observó un aumento de la proliferación de condrocitos extraídos de un paciente con OA (hPCs) y de condrocito bovinos (bPC) al ser co-cultivados con las MSCs y que este efecto se debía a factores solubles liberados por ellas. Posteriormente demostraron que las MSCs aumentan la secreción de FGF específicamente cuando están en co-cultivo con los hPCs los cuales en respuesta incrementan su proliferación, indicando nuevamente la necesidad de un “*cross-talk*” entre ambos tipos celulares (Wu & col., 2013). El rol que FGF cumpliría en este “*crosstalk*” pareciera estar asociado a su capacidad de promover la proliferación de condrocitos y formación de la matriz de cartílago (Bolander, 1992).

Finalmente, los resultados obtenidos en la presente tesis son consistentes con la hipótesis planteada y son de gran relevancia para el contexto del uso de las CU-MSCs como terapia celular para la osteoartritis. Como se mencionó inicialmente se cree que las MSCs podrían ser ideales para la reparación de cartílago debido a su potencial de diferenciación condrogénico, además de sus propiedades inmunosupresoras y su capacidad de liberar factores tróficos, lo que contribuye a generar el ambiente propicio para la regeneración (Chang, 2015). Sin embargo, las CU-MSCs deben ser capaces de sobrevivir al microambiente de la articulación dañada, lugar donde existen diversos tipos de moléculas inflamatorias, así como elevados niveles de ROS, los que disminuyen su efecto terapéutico.

En este trabajo se observó que la regulación metabólica de MSC derivadas de cordón umbilical hacia un estado glicolítico aumenta sus propiedades terapéuticas en varias direcciones. Primero, potencia su diferenciación hacia condrocitos, aumenta su

resistencia a estrés oxidativo e incrementa su rol condroprotector que favorecen la proliferación y supervivencia de condrocitos. Con la modulación hacia un estado glicolítico de las CU-MSCs estamos potenciando varias de sus funciones terapéuticas que en su conjunto pueden lograr una disminución importante de la inflamación de la articulación dañada propiciando así el ambiente adecuado para permitir la regeneración del cartílago hialino tanto por los condrocitos residentes como por las MSCs infundidas en la articulación de los pacientes con OA.

Las proyecciones de este trabajo residen en evaluar la presencia de marcadores hipertróficos de condrocitos como MMP-13 y colágeno X (Dreier, 2010), en las distintas etapas experimentales con el objetivo de determinar si la diferenciación de CU-MSCs con oligomicina produce condrocitos con el fenotipo hialino deseado y no un fenotipo hipertrófico semejante a los de pacientes con OA. También para saber si las MSCs glicolíticas al aumentar la proliferación de condrocitos y supervivencia frente a ROS, está al mismo tiempo protegiendo de la degeneración de los condrocitos hacia un fenotipo hipertrófico. En cuanto a la expresión de genes asociados a condroremodelación y liberación de factores tróficos (factores tróficos), se observaron cambios al inducir diferentes metabolismos en las CU-MSCs pero es necesario aumentar el número de repeticiones y cantidad de donantes para saber la significancia de estos resultados. Finalmente, para la cuantificación de factores tróficos se pueden medir otros factores como IGF y Activina quienes también podrían estar asociadas a condroprotección y supervivencia con el objetivo de seguir indagando en el mecanismo mediante el cual la inducción de la glicolisis en las CU-MSCs es capaz de promover su potencial de diferenciación hacia cartílago, aumentar su resistencia a ROS y promover su efecto condroprotector (Sobacchi & col., 2017).

9 CONCLUSIONES

- 9.1 El tratamiento de CU-MSCs con oligomicina genera un estado glicolítico el cual no altera la expresión de marcadores clásicos de MSCs (CD90, CD105, CD73) ni induce la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD45, CD34).
- 9.2 La inducción hacia un metabolismo glicolítico en las CU-MSCs con oligomicina aumenta su potencial de diferenciación condrogénico, aumentando el nivel de expresión de genes condrogénicos como colágeno 2 y agregan sin la necesidad de utilizar un medio de diferenciación específico.
- 9.3 La inducción de un estado glicolítico en las CU-MSCs con oligomicina aumenta su resistencia al estrés generado por peróxido de hidrógeno.
- 9.4 Los HC-a co-cultivados con CU-MSCs glicolíticas aumentan su resistencia al estrés oxidativo y mantienen su tasa de proliferación natural (sin cocultivo).
- 9.5 La modulación de un estado glicolítico de las CU-MSCs con oligomicina favorece sus funciones paracrina entre ellas sus propiedades condroprotectoras y proliferativas.

10 REFERENCIAS

- Acharya, C., Adesida, A., Zajac, P., Mumme, M., Riesle, J., Martin, I., & Barbero, A. (2012). Enhanced chondrocyte proliferation and mesenchymal stromal cells chondrogenesis in coculture pellets mediate improved cartilage formation. *Journal of Cellular Physiology*, 227(1), 88–97.
- Aggarwal, S., & Pittenger, M. F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), 1815–1822.
- Alcayaga-Miranda, F., Cuenca, J., Luz-Crawford, P., Aguila-Díaz, C., Fernandez, A., Figueroa, F. E., & Khoury, M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: Angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Research and Therapy*, 6(1), 32.
- Armstrong, L., Tilgner, K., Saretzki, G., Atkinson, S. P., Stojkovic, M., Moreno, R., Przyborski, S., & Lako, M. (2010). Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 28(4), 661–673.
- Aung, A., Gupta, G., Majid, G., & Varghese, S. (2011). Osteoarthritic chondrocyte-secreted morphogens induce chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Arthritis and Rheumatism*, 63(1), 148–158.
- Barbash, I. M., Chouraqui, P., Baron, J., Feinberg, M. S., Etzion, S., Tessone, A., Miller, L., Guetta, E., Zipori, D., Kedes, L., Kloner, R., & Leor, J. (2003). Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: Feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*, 108(7), 863–868.
- Birben, E., Sahiner, U. M., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), 9-19.
- Bolander, M. E. (1992). Regulation of Fracture Repair by Growth Factors. *Experimental Biology and Medicine*, 200, 165–170.
- Böttcher, R. T., & Niehrs, C. (2005). Fibroblast growth factor signaling during early vertebrate development. *Endocrine Reviews*, 26(1), 63-77.
- Chang, Y.-H., Liu, H.-W., Wu, K.-C., & Ding, D.-C. (2015). Mesenchymal Stem Cells

- and their Clinical Applications in Osteoarthritis. *Cell Transplantation*, 25(98), 937–950.
- Chen, C.-T., Shih, Y.-R. V., Kuo, T. K., Lee, O. K., & Wei, Y.-H. (2008). Coordinated Changes of Mitochondrial Biogenesis and Antioxidant Enzymes During Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 26(4), 960–968.
- Deschepper, M., Manassero, M., Oudina, K., Paquet, J., Monfoulet, L. E., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., & Petite, H. (2013). Proangiogenic and prosurvival functions of glucose in human mesenchymal stem cells upon transplantation. *Stem Cells*, 31(3), 526–535.
- Detamore, M. S. (2013). Human umbilical cord mesenchymal stromal cells in regenerative medicine. *Stem Cell Research & Therapy*, 4(6), 142.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: Current status and future prospects. *Journal of Association of Physicians of India*, 52, 794–804.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J., & Horwitz, E. M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), 315–317.
- Fischer, J., Dickhut, A., Rickert, M., & Richter, W. (2010). Human articular chondrocytes secrete parathyroid hormone-related protein and inhibit hypertrophy of mesenchymal stem cells in coculture during chondrogenesis. *Arthritis and Rheumatism*, 62(9), 2696–2706.
- Folmes, C. D. L., Nelson, T. J., Dzeja, P. P., & Terzic, A. (2012). Energy metabolism plasticity enables stemness programs. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1254(1), 82–89.
- Folmes, C. D. L., Nelson, T. J., Martinez-Fernandez, A., Arrell, D. K., Lindor, J. Z., Dzeja, P. P., Ikeda, Y., Perez-Terzic, C., & Terzic, A. (2011). Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metabolism*, 14(2), 264–271.
- Fong, C. Y., Subramanian, A., Gauthaman, K., Venugopal, J., Biswas, A., Ramakrishna, S., & Bongso, A. (2012). Human Umbilical Cord Wharton's Jelly Stem Cells Undergo Enhanced Chondrogenic Differentiation when Grown on Nanofibrous Scaffolds and in a Sequential Two-stage Culture Medium Environment. *Stem Cell*

Reviews and Reports, 8(1), 195–209.

- Forni, M. F., Peloggia, J., Trudeau, K., Shirihai, O., & Kowaltowski, A. J. (2016). Murine mesenchymal stem cell commitment to differentiation is regulated by mitochondrial dynamics. *Stem Cells*, 34(3), 743–755
- Freitag, J., Bates, D., Boyd, R., Shah, K., Barnard, A., Huguenin, L., & Tenen, A. (2016). Mesenchymal stem cell therapy in the treatment of osteoarthritis: Reparative pathways, safety and efficacy - A review. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 230.
- Gupta, P. K., Das, A. K., Chullikana, A., & Majumdar, A. S. (2012). Mesenchymal stem cells for cartilage repair in osteoarthritis. *Stem Cell Research & Therapy*, 3(4), 25.
- Hillel, A. T., Taube, J. M., Cornish, T. C., Sharma, B., Halushka, M., McCarthy, E. F., Hutchins, G. M., & Elisseff, J. H. (2009). Characterization of human mesenchymal stem cell-engineered cartilage: Analysis of its ultrastructure, cell density and chondrocyte phenotype compared to native adult and fetal cartilage. *Cells Tissues Organs*, 191(1), 12–20.
- Ito, K., & Suda, T. (2014). Metabolic requirements for the maintenance of self-renewing stem cells. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(4), 243–56.
- Kanichai, M., Ferguson, D., Prendergast, P. J., & Campbell, V. A. (2008). Hypoxia promotes chondrogenesis in rat mesenchymal stem cells: A role for AKT and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α . *Journal of Cellular Physiology*, 216(3), 708–715.
- Kaelin WG, Jr, Ratcliffe PJ. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, 30, 393-402.
- Kong, L., Zheng, L. Z., Qin, L., & Ho, K. K. W. (2017). Role of mesenchymal stem cells in osteoarthritis treatment. *Journal of Orthopaedic Translation*, 9, 89-103.
- Kristjánsson, B., & Honsawek, S. (2014). Current perspectives in mesenchymal stem cell therapies for osteoarthritis. *Stem Cells International*, 2014, 194318.
- Ladurner, A. G. (2006). Rheostat Control of Gene Expression by Metabolites. *Molecular Cell*, 24(1), 1-11.
- Le Blanc, K., & Pittenger, M. F. (2005). Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy*, 7(1), 36–45.
- Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., & Ringdén, O. (2003). HLA

- expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31(10), 890–896.
- Lepetsos, P., & Papavassiliou, A. G. (2016). ROS/oxidative stress signaling in osteoarthritis. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1862(4), 576-591.
- Liu-Bryan, R. (2013). Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression topical collection on osteoarthritis. *Current Rheumatology Reports*, 15(5), 323.
- Liu, X., Sun, H., Yan, D., Zhang, L., Lv, X., Liu, T., Zhang, W., Liu, W., Cao, Y., & Zhou, G. (2010). In vivo ectopic chondrogenesis of BMSCs directed by mature chondrocytes. *Biomaterials*, 31(36), 9406–9414.
- Liu, Y., & Ma, T. (2015). Metabolic regulation of mesenchymal stem cell in expansion and therapeutic application. *Biotechnology Progress*, 31(2), 468–481.
- Lunt, S. Y., & Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis: Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), 441–464.
- Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., & Wang, Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21(2), 216-225.
- Malladi, P., Xu, Y., Chiou, M., Giaccia, A. J., & Longaker, M. T. (2006). Effect of reduced oxygen tension on chondrogenesis and osteogenesis in adipose-derived mesenchymal cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 290(4), C1139-46.
- Marmotti, A., Peretti, G. M., Mattia, S., Bonasia, D. E., Bruzzone, M., Dettoni, F., Dettoni, F., Rossi, R., & Castoldi, F. (2014). A future in our past: The umbilical cord for orthopaedic tissue engineering. *Joints*, 2(1), 20-25.
- Maumus, M., Manferdini, C., Toupet, K., Peyrafitte, J. A., Ferreira, R., Facchini, A., Gabusi, E., Bourin, P., Jorgensen, C., Lisignoli, G., & Noël, D. (2013). Adipose mesenchymal stem cells protect chondrocytes from degeneration associated with osteoarthritis. *Stem Cell Research*, 11(2), 834–844.
- Mitrano, T. I., Grob, M. S., Carrión, F., Nova-Lamperti, E., Luz, P. A., Fierro, F. S., Quintero, A., Chaparro, A., & Sanz, A. (2010). Culture and Characterization of Mesenchymal Stem Cells From Human Gingival Tissue. *Journal of Periodontology*, 81(6), 917–925.

- Mylotte, L. A., Duffy, A. M., Murphy, M., O'Brien, T., Samali, A., Barry, F., & Szegezdi, E. (2008). Metabolic Flexibility Permits Mesenchymal Stem Cell Survival in an Ischemic Environment. *Stem Cells*, 26(5), 1325–1336.
- Nakamura, T., Sakai, K., & Al, E. (2011). Hepatocyte growth factor twenty years on: Much more than a growth factor. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26, 188-202.
- Ng, F., Boucher, S., Koh, S., Sastry, K. S. R., Chase, L., Lakshmipathy, U., Choong, C., Yang, Z., Vemuri, M. C., Rao, M. S., Tanavde, V. (2008). PDGF, TGF- β , and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): Transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*, 112(2), 295–307.
- Nordberg, R. C., & Lobo, E. G. (2015). Our Fat Future: Translating Adipose Stem Cell Therapy. *Stem Cells Translational Medicine*, 4(9), 974–979.
- Ornitz, D. M. (2005). FGF signaling in the developing endochondral skeleton. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 16(2), 205-213.
- Palomäki, S., Pietilä, M., Laitinen, S., Pesälä, J., Sormunen, R., Lehenkari, P., & Koivunen, P. (2013). HIF-1 α is upregulated in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 31(9), 1902–1909.
- Pattappa, G., Heywood, H. K., de Bruijn, J. D., & Lee, D. A. (2011). The metabolism of human mesenchymal stem cells during proliferation and differentiation. *Journal of Cellular Physiology*, 226(10), 2562–2570.
- Pekovic, V., & Hutchison, C. J. (2008). Adult stem cell maintenance and tissue regeneration in the ageing context: The role for A-type lamins as intrinsic modulators of ageing in adult stem cells and their niches. *Journal of Anatomy*, 213(1), 5-25.
- Pers, Y. M., Ruiz, M., Noël, D., & Jorgensen, C. (2015). Mesenchymal stem cells for the management of inflammation in osteoarthritis: State of the art and perspectives. *Osteoarthritis and Cartilage*, 23(11), 2027-2035.
- Qureshi, A. H., Chaoji, V., Maignel, D., Faridi, M. H., Barth, C. J., Salem, S. M., Singhal, M., Stoub, D., Krestins, B., Ogihara, M., Zaki, M. J., Gupta, V. (2009). Proteomic and phospho-proteomic profile of human platelets in basal, resting state: Insights into integrin signaling. *PLoS ONE*, 4(10).

- Rahmati, M., Mobasheri, A., & Mozafari, M. (2016). Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the-art, current prospects, and future challenges. *Bone*, 85, 81-90.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, 3(3), 71–85.
- Scotti, C., Tonnarelli, B., Papadimitropoulos, A., Scherberich, A., Schaeren, S., Schauerte, A., Lopez-Rios, J., Zeller, R., Barbero, A., & Martin, I. (2010). Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(16), 7251–7256.
- Sobacchi, C., Palagano, E., Villa, A., & Menale, C. (2017). Soluble Factors on Stage to Direct Mesenchymal Stem Cells Fate. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 5, 32.
- Somoza, R. A., Welter, J. F., Correa, D., & Caplan, A. I. (2014). Chondrogenic differentiation of Mesenchymal Stem Cells: challenges and unfulfilled expectations. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 20(216), 1–50.
- Song, Q. H., Klepeis, V. E., Nugent, M. A., & Trinkaus-Randall, V. (2002). TGF- β 1 regulates TGF- β 1 and FGF-2 mRNA expression during fibroblast wound healing. *Journal of Clinical Pathology - Molecular Pathology*, 55(3), 164–176.
- Suganuma, K., Miwa, H., Imai, N., Shikami, M., Gotou, M., Goto, M., Mizuno, S., Takahashi, M., Yamamoto, H., Hiramatsu, A., Wakabayashi, M., Watarai, M., Hanamura, I., Imamura, A., Mihara, H., & Nitta, M. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: Glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Leukemia and Lymphoma*, 51(11), 2112–2119.
- Tormos, K. V., & Chandel, N. S. (2010). Inter-connection between mitochondria and HIFs. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 14(4), 795–804.
- Tracy Ballock, R., Heydemann, A., Wakefield, L. M., Flanders, K. C., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1993). TGF- β 1 prevents hypertrophy of epiphyseal chondrocytes: Regulation of gene expression for cartilage matrix proteins and metalloproteases. *Developmental Biology*, 158(2), 414–429.
- Uccelli, A., & de Rosbo, N. K. (2015). The immunomodulatory function of mesenchymal stem cells: Mode of action and pathways. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1351(1), 114–126.

- Vaamonde-García, C., Loureiro, J., Valcárcel-Ares, M. N., Riveiro-Naveira, R. R., Ramil-Gómez, O., Hermida-Carballo, L., Centeno, A., Meijide-Failde, R., Blanco, F. J., López-Armada, M. J. (2017). The mitochondrial inhibitor oligomycin induces an inflammatory response in the rat knee joint. *BMC Musculoskeletal Disorders*, *18*(1).
- Valiyaveetil, M., Achur, R. N., Muthusamy, A., & Gowda, D. C. (2004). Characterization of chondroitin sulfate and dermatan sulfate proteoglycans of extracellular matrices of human umbilical cord blood vessels and Wharton's jelly. *Glycoconj J*, *21*(6), 361–375.
- Van Lent PL, Grevers L, Blom AB, Sloetjes A, Mort JS, Vogl T, Nacken W, van den Berg WB, Roth J. (2008). Myeloid-related proteins S100A8/S100A9 regulate joint inflammation and cartilage destruction during antigen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis*, *67*,1750-1758.
- Wakitani, S., Mitsuoka, T., Nakamura, N., Toritsuka, Y., Nakamura, Y., & Horibe, S. (2004). Autologous bone marrow stromal cell transplantation for repair of full-thickness articular cartilage defects in human patellae: Two case reports. *Cell Transplantation*, *13*(5), 595–600.
- Wakitani, S., Okabe, T., Horibe, S., Mitsuoka, T., Saito, M., Koyama, T., Nawata, M., Tensho, K., Kato, H., Uematsu, K., Kuroda, R., Kurosaka, M., Yoshiya, S., Hattori, K., & Ohgushi, H. (2011). Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *5*(2), 146–150.
- Wang, Y., Chen, X., Cao, W., & Shi, Y. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology*, *15*(11), 1009–16.
- Wu, L. G., Leijten, J., van Blitterswijk, C., & Karperien, M. (2013). Fibroblast Growth Factor -1 is a mesenchymal stromal cell secreted factor stimulating proliferation of osteoarthritic chondrocytes in co-culture. *Stem Cells and Development*, *22*(17), 2356-2367.
- Xing, D., Xu, Y., Liu, Q., Ke, Y., Wang, B., Li, Z., & Lin, J. (2016). Osteoarthritis and all-cause mortality in worldwide populations: Grading the evidence from a meta-analysis. *Scientific Reports*, *6*, 24393.