

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**Departamento de Genética y Biología Celular**



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y  
REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS  
MULTIPOTENTES MURINAS EN RATONES  
TRANSGÉNICOS “mTert-EGFP”.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Eva Pericuesta Camacho**

Bajo la dirección de los doctores

Alfonso Gutiérrez Adán  
Miguel Ángel Ramírez de la Paz

**Madrid, 2010**

**ISBN: 978-84-693-4790-4**

**© Eva Pericuesta Camacho, 2009**

**Universidad Complutense de Madrid**

**Facultad de Biología**

Dpto. de Genética y Biología Celular



**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DE  
CÉLULAS MULTIPOTENTES MURINAS EN RATONES  
TRANSGÉNICOS *mTert-EGFP***

**Eva Pericuesta Camacho**

**Madrid, 2009**



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Biología

Dpto. de Genética y Biología Celular

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN  
DE CÉLULAS MULTIPOTENTES MURINAS EN RATONES  
TRANSGÉNICOS *mTert-EGFP***

Memoria que para optar al grado de Doctor en Biología presenta la licenciada:

Eva Pericuesta Camacho

Directores:

Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, Investigador del Dpto. de Reproducción Animal, INIA.

Dr. Miguel Ángel Ramírez de Paz, Investigador del Dpto. de Reproducción Animal,

INIA.





Dirección / Address Dpto. de Reproducción Animal y Conservación de Recursos  
Zoogenéticos  
Crt. de la Coruña Km 5,9  
Teléfono: 28040 Madrid  
Fax: (34)91 347 3768  
(34)91 347 4014

Dña. Eva Pericuesta Camacho ha desarrollado bajo nuestra dirección el trabajo  
titulado:

Aislamiento, caracterización y reprogramación de células multipotentes murinas en  
ratones transgénicos *mTert-EGFP*.

Por sus aportaciones e interés en el campo de la Biología y más concretamente en el  
campo de las Células Troncales, este trabajo se estima merecedor de ser aceptado como  
TESIS DOCTORAL en la Facultad de Biología (Dpto. de Genética y Biología Celular) de  
la Universidad Complutense de Madrid.

En Madrid, a de de 2009

Dr. Alfonso Gutiérrez Adán

Dr. Miguel Ángel Ramírez de Paz

Investigador del Dpto. de Reproducción  
Animal, INIA

Investigador del Dpto. de Reproducción  
Animal, INIA



Este trabajo ha sido realizado gracias a la concesión y disfrute de una Beca Predoctoral de Formación de Personal Investigador, financiada por el Ministerio de Educación y Ciencia



A mi familia



A Pedro



## **AGRADECIMIENTOS**



## **AGRADECIMIENTOS**

Este apartado es el pequeño hueco que deja la tesis para agradecer a toda la gente que de alguna manera ha hecho posible que esta tesis exista, y que sin ellos no hubiera sido posible.

Quiero agradecer especialmente:

Al Dr. Alfonso Gutiérrez Adán, tutor de este trabajo, por la confianza depositada en mí para realizar esta tesis. Gracias por la paciencia y el interés por enseñarme a hacer ciencia, y sobre todo el ánimo y la motivación para superarme día a día. La pasión que demuestras por la ciencia ha sido un gran aliciente para querer continuar en este mundillo, que aunque muy sacrificado tiene sus recompensas.

Al Dr. Miguel Ángel Ramírez de Paz por llevarme de la mano en esta aventura. Gracias por tus conocimientos, por tu paciencia, por tu amabilidad, por aportar ese toque humano del que nos olvidamos alguna vez perdidos en nuestros experimentos. Gracias.

A la Dra. Belén Pintado por su sabiduría y sus consejos. Gracias por enseñarme todo lo que sé sobre un animalario. Gracias por tus comentarios, tu sentido común, por tu ayuda. Gracias por ser siempre un modelo a seguir y del que aprender.

A mis compañeros de laboratorio: Miriam Pérez Crespo, Raúl Fernández González, Juan de Dios Hourcade Bueno, Pablo Bermejo Álvarez, Sandra Calle Arias. Gracias a todos, porque sin vosotros este camino hubiera sido mucho más duro.

Gracias Miriam por estar siempre ahí. Recuerdo cuando llegué al laboratorio. Me guiaste en los primeros pasos, me ofreciste tu amistad que desde entonces aprecio y espero no perder nunca.

Gracias Raúl por establecer la ley y el orden en el laboratorio. Aunque nos quejemos mucho al final se echa de menos. Gracias por tus risas, tus bromas y tus ideas de “científico loco”.

Gracias Juande por tus consejos sobre ciencia. Por las largas conversaciones en las que a veces arreglamos el mundo, y otras lo destrozamos un poco más. Gracias por tu amistad y por estar ahí cuando se te necesita.

Gracias Pablo por tu ayuda para asimilar conceptos e ideas. Por tus consejos, tu amistad, tu energía y entusiasmo por la ciencia (aunque trates de disimularlo). Gracias por tu apoyo. Por usar esas palabras que hacen despertar en ocasiones, pero que calman y animan cuando hace falta.

Gracias Sandra por ser como eres. Por la alegría con la que nos contagias todos los días. Por el entusiasmo que muestras en el laboratorio y por las ganas de aprender.

A mis compañeras de animalario Toñi Calero Prieto, Raquel Rey Rodríguez, Mari Luz, Bárbara Peláez, por todos esos buenos momentos en el animalario. Por las risas que pasamos al coger un ratón por primera vez o al hacer pipetas imposibles. Gracias por la alegría y el ánimo que me habéis dado en todo este tiempo. Gracias por estar ahí.

Al Dr. Dimitrios Rizos por su apoyo y sus consejos. Gracias por ayudarme con el inglés y por animarme siempre. Por tu sonrisa amable y por tu disponibilidad para ayudar.

A mis compañeros de departamento María Clemente, Paula Beltrán, Miguel Ángel Coloma Eusebio, Celia de Frutos. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntos dentro y fuera del departamento.

Gracias María por las conversaciones transcendentales a la hora de la comida y por el apoyo en los momentos difíciles.

A Alberto Miranda por su ayuda en la busca y captura de firmas.

A Alicia de Diego y Tere Zomeño, por los buenos ratos que pasamos. Aunque no lo creáis se os echa mucho de menos.

A la Dra. Anne-Marie Rodríguez por darme la oportunidad de aprender a su lado. Por la dedicación y el interés que me brindó en mi estancia en el centro INSERM de Crèteil.

A la Dra. Amelie Coudert, la Dra. Valérie Itier, el Dr. Xavier Decrouy, Françoise Poron y Sylvie por su amistad y simpatía. Gracias por acogerme en el laboratorio como una más y por ayudarme a realizar los experimentos en Crèteil.

Al Dr. Paul de Soussa por acogerme en su laboratorio de la Universidad de Edimburgo. Por darme la oportunidad de trabajar con células madre humanas y de conocer el Instituto Roslin.

A Mariana Todorova por el apoyo tanto moral como científico que me brindaste en Edimburgo. Gracias por los buenos momentos que pasamos allí y por todos los conocimientos que compartiste conmigo.

A la Dra. Pilar Arana, mi tutora en la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid por el tiempo dedicado tanto para la presentación del DEA, como en los últimos momentos de la tesis. Gracias por ayudarme en la elección del tribunal y con los trámites universitarios.

Por último, quiero agradecer a mi familia y a mis amigos el apoyo que me han dado durante estos años de tesis.

A mis padres que siempre han confiado en mí y me han apoyado en todo. Que me han sabido guiar en la vida y me han animado a perseguir todo. Gracias por estar ahí, por animarme y por aconsejarme.

A mis hermanos, por escucharme, apoyarme y darme ánimos. Por aguantar mis berrinches y mis protestas.

A Pedro, que me ha apoyado y escuchado siempre. Que ha aguantado mis agobios, y mis quejas. Gracias por el apoyo que me has dado. Gracias por el ánimo para terminar la tesis y por la confianza que has puesto en mí.

A mi tía Rosario por confiar en mí y por darme ánimos como sólo ella sabe.

A mi prima Margui que siempre ha estado ahí para todo.

No quisiera terminar este apartado sin hacer mención a los ratones que han hecho posible esta tesis. Animales de experimentación que contribuyen de manera importante al conocimiento humano.

Todos los protocolos experimentales en los que se emplean animales de laboratorio fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria



**ÍNDICE**



## INDICE

|  |            |
|--|------------|
| <b>1. RESUMEN DE LA TESIS.....</b>   | <b>25</b>  |
| <b>2. THESIS ABSTRACT.....</b>   | <b>35</b>  |
| <b>3. INTRODUCCIÓN.....</b>  | <b>43</b>  |
| <b>3.1. CÉLULAS TRONCALES, DIVISIÓN CELULAR Y ACTIVIDAD TELOMERASA.....</b>  | <b>45</b>  |
| 3.1.1. Definición, características e importancia de las células troncales .....  | 45         |
| 3.1.2. División celular, telómeros y actividad telomerasa .....  | 48         |
| 3.1.3. Aplicación del promotor tert para el estudio de las células troncales .....   | 54         |
| <b>3.2. CÉLULAS TRONCALES ADULTAS: CÉLULAS TRONCALES MUSCULARES .....</b>  | <b>54</b>  |
| 3.2.1. Desarrollo de un individuo y pérdida de pluripotencia de sus células .....  | 52         |
| 3.2.2. Células troncales y células precursoras en tejido adulto .....  | 56         |
| 3.2.3. Células troncales adultas del músculo.....  | 58         |
| <b>3.3. GENÉTICA Y EPIGENÉTICA EN LAS CÉLULAS TRONCALES.<br/>        RETROTRANSPOSONES.....</b>  | <b>62</b>  |
| 3.3.1. Concepto de epigenética .....   | 63         |
| 3.3.2. Retrotransposones y células troncales.....  | 64         |
| <b>3.4. APLICACIONES DE LAS CÉLULAS TRONCALES.....</b>   | <b>66</b>  |
| 3.4.1. Problemas asociados a la incompleta diferenciación de las células troncales para su uso<br>en medicina regenerativa .....   | 66         |
| 3.4.2. Diferenciación de células troncales embrionarias.....   | 67         |
| <b>4. OBJETIVOS.....</b>   | <b>69</b>  |
| <b>5. LA REGIÓN PROXIMAL DEL PROMOTOR MTERT ES SUFICIENTE PARA REGULAR LA<br/>ACTIVIDAD TELOMERASA EN CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS Y ANIMALES<br/>TRANSGÉNICOS.....</b>                        | <b>75</b>  |
| <b>THE PROXIMAL PROMOTER REGION OF MTERT IS SUFFICIENT TO REGULATE<br/>TELOMERASE ACTIVITY IN ES CELLS AND TRANSGENIC ANIMALS. REPRODUCTIVE<br/>BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY (2006) 4: 5</b>        |            |
| <b>6. ANÁLISIS DE LA AUTORREGENERACIÓN MEDIADA POR LAS CÉLULAS<br/>PLURIPOTENTES MURINAS PRESENTES EN EL MÚSCULO TIBIAL ANTERIOR<br/>UTILIZANDO EL MODELO TRANSGÉNICO MURINO MTERT-EGFP.....</b> | <b>93</b>  |
| <b>7. LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTTRANSCRIPCIONAL DE LOS<br/>RETROTRANSPOSONES IAP Y MUERV-L AFECTAN A LA PLURIPOTENCIA DE LAS<br/>CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS MURINAS .....</b>      | <b>123</b> |
| <b>TRANSCRIPTIONAL AND POSTTRANSCRIPTIONAL REGULATION OF<br/>RETROTRANSPOSONS IAP AND MUERV-L AFFECT PLURIPOTENCY OF MICE ES<br/>CELLS. REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY (2006) 4: 55</b>  |            |
| <b>8. PRESENCIA INADVERTIDA DE CÉLULAS PLURIPOTENTES EN MONOCAPAS<br/>DERIVADAS DE CUERPOS EMBRIOIDES DIFERENCIADOS .....</b>  | <b>139</b> |

**INADVERTENT PRESENCE OF PLURIPOTENT CELLS IN MONOLAYERS DERIVED FROM DIFFERENTIATED EMBRYOID BODIES. THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY (2007) 51: 397-407**

|                                     |            |
|-------------------------------------|------------|
| <b>9. DISCUSIÓN.....</b>            | <b>155</b> |
| <b>10. CONCLUSIONES.....</b>        | <b>169</b> |
| <b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>        | <b>173</b> |
| <br>                                |            |
| <b>ANEXO I. Abreviaturas .....</b>  | <b>181</b> |
| <b>ANEXO II: Publicaciones.....</b> | <b>185</b> |

## **RESUMEN DE LA TESIS**



## 1. RESUMEN DE LA TESIS

La presente tesis titulada **AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS MULTIPOTENTES MURINAS EN RATONES TRANSGÉNICOS *mTert-EGFP***, está compuesta por tres artículos científicos publicados (Pericuesta *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2006; Ramírez *et al.*, 2007) y un último trabajo realizado para completar el análisis de las células troncales en tejidos adultos.

La importancia de las células troncales ha crecido enormemente en las últimas décadas debido al gran potencial que presentan para tratar enfermedades hasta hoy incurables como el Parkinson, la diabetes tipo I, la enfermedad de Alzheimer, esclerosis múltiple, daños en la espina dorsal e incluso el cáncer, así como para realizar ensayos específicos de drogas y toxinas. Se ha definido a la célula troncal embrionaria como aquella célula procedente de la masa celular interna de un blastocisto con capacidad de autorregeneración, división ilimitada, y capacidad de diferenciarse en casi cualquier tipo celular. De manera general, en las células eucariotas, en cada división mitótica se produce un acortamiento de los telómeros, lo cual compromete la integridad de los cromosomas. Este fenómeno puede dar lugar a alteraciones y aberraciones cromosómicas tras un número limitado de divisiones. Actualmente se conoce un mecanismo mediante el cual las células troncales parecen estar protegidas de este fenómeno. Se trata de la acción del complejo enzimático de la telomerasa que viene controlado por la transcriptasa reversa de la telomerasa (TERT). Este mecanismo mantiene la secuencia telomérica del final de los cromosomas de las células eucariotas. Numerosos trabajos apoyan que la actividad enzimática de la telomerasa es muy alta en células troncales multipotentes no diferenciadas, pero que disminuye durante los procesos de diferenciación siendo inexistente en las células somáticas de los tejidos adultos. Se ha visto que esta ausencia de actividad es en parte la responsable del acortamiento de los telómeros en las células somáticas. Con el interés de estudiar los elementos reguladores del promotor del gen *Tert* murino (*mTert*) que controla la actividad telomerasa de las células en el ratón, en el primer trabajo de la tesis (Pericuesta *et al.*, 2006) hemos desarrollado un modelo de ratones transgénicos (*in vivo*) y un modelo de células troncales (*in vitro*), donde se han analizado tres construcciones que contienen distintos tamaños del promotor *mTert*. Las construcciones, que fueron denominadas 1k, 2k

y 5k, por contener la primera kilobase (kb), las 2 primeras kb, o las 5 primeras kb del promotor, se unieron a la secuencia codificante de la proteína de fluorescencia verde (EGFP), con el fin de analizar la actividad transcripcional del promotor de *Tert* midiendo la fluorescencia emitida por las células que expresaban dicho promotor. La hipótesis de trabajo planteada se basó en que las distintas construcciones contenían distintos elementos reguladores cuya ausencia o presencia nos indicaría su implicación en la regulación de la expresión de *Tert*. Las tres secuencias del promotor *Tert* unidas a la secuencia EGFP, fueron electroporadas en dos líneas de células troncales embrionarias, R1 (Nagy *et al.*, 1993) y MAR (obtenidas en nuestro laboratorio). Las células troncales transformadas fueron capaces de expresar la proteína fluorescente que estaba asociada al promotor *mTert*, y mostraron diferentes niveles de expresión en función del tamaño del promotor usado, siendo mayor la producida por los promotores 1k y 5k. A continuación se analizó la expresión inducida por los tres promotores durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las células troncales murinas. Dicha diferenciación comprende en primer lugar la formación de cuerpos embrioides y posteriormente se produce la diferenciación final hacia distintos tipos celulares. Durante este proceso, se observó cómo la expresión de *mTert-EGFP* fue disminuyendo gradualmente como consecuencia del proceso de diferenciación celular. El experimento planteado no reveló diferencias entre las tres construcciones analizadas durante el proceso de diferenciación. A continuación se produjeron ratones transgénicos con las tres construcciones: 8 líneas de ratones transgénicos que contenían la construcción 1k-mTert-EGFP, 3 líneas que contenían la construcción 2k-mTert-EGFP y 5 que contenían la construcción 5k-mTert-EGFP y se analizó la expresión de mTert-EGFP mediante la técnica de PCR y mediante el análisis de la expresión de fluorescencia. Los resultados mostraron que a pesar de que la expresión del RNA mensajero de las tres construcciones era menor que la mostrada por el promotor endógeno mTert, el modelo descrito era capaz de imitar su patrón de transcripción. Las tres construcciones analizadas produjeron expresión de fluorescencia de la EGFP en el estadio de blastocisto y en células troncales embrionarias obtenidas de ellos, así como en el anillo germinal de fetos de 13 días post coito (dpc), en colonias de células multipotentes (células troncales de la línea germinal, y colonias tipo célula troncal) derivadas de testículos de animales neonatos y adultos, y en neurosferas generadas a partir de células del cerebro de fetos de 14 dpc.

Los resultados mostraron, que la primera kb del promotor *mTert* contiene los elementos reguladores necesarios para controlar la expresión de telomerasa en células troncales durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Además los modelos transgénicos generados con dicho promotor, suponen un sistema apropiado para analizar la expresión del gen *Tert* murino en condiciones fisiológicas y durante el establecimiento de líneas celulares pluripotentes generadas a partir de un embrión o de tejidos adultos.

El modelo transgénico mTert-EGFP generado supone una nueva herramienta de gran utilidad para el estudio tanto de las células troncales localizadas en tejidos adultos como de su entorno. Para comprobar dicho potencial, hemos analizado la presencia y el comportamiento de dichas células pluripotentes en el tejido muscular de estos animales transgénicos.

El músculo esquelético es un tejido que se caracteriza por la elevada capacidad de regeneración que presenta cuando sufre un daño. En la actualidad esta capacidad de regeneración se atribuye a las células satélites del músculo, aunque estudios recientes han demostrado la presencia de células troncales procedentes de la médula ósea y del propio músculo con capacidad miogénica que contribuyen a la formación y regeneración de las fibras dañadas. Puesto que en un tejido adulto las únicas células que expresan *Tert* son las células troncales, o células con cierta capacidad pluripotente, nuestra hipótesis de trabajo planteó que el nuevo modelo transgénico mTert-EGFP permitiría identificar *in vivo* estos tipos celulares, distinguiéndolos del resto de células diferenciadas. Así, en el siguiente trabajo nos planteamos identificar e investigar las células GFP<sup>+</sup> localizadas en el músculo tibial anterior de los ratones transgénicos mTert-EGFP durante el desarrollo del individuo, así como durante los procesos de regeneración que se producen en el músculo tras sufrir un daño inducido por el tratamiento con cardiotoxina bupivacaína. Utilizando un anticuerpo anti-EGFP, observamos en el músculo tibial anterior de estos ratones transgénicos, una abundante presencia de células GFP<sup>+</sup> distribuidas de manera homogénea en el músculo durante los primeros días de vida de los mismos. Observamos también una mayor presencia de células GFP<sup>+</sup> alrededor de los vasos sanguíneos que atraviesan el músculo. A medida que el individuo crece, la presencia e intensidad de la señal de GFP disminuye, hasta ser prácticamente imperceptible en el estado adulto del individuo. Por otro lado, nos interesaba conocer la posición que ocupan esas células, con elevada actividad telomerasa, con respecto

a las fibras musculares, con el fin de identificar y definir a qué población celular pertenecen. Con este objetivo, realizamos una doble tinción en la que empleamos un anticuerpo anti-calagenasa tipo IV para teñir el contorno de la fibra muscular, y un anticuerpo anti-EGFP para localizar las células con elevada expresión telomerasa. Los resultados mostraron diferentes poblaciones celulares localizadas bajo la fibra y en el espacio intersticial de las mismas. Por último analizamos la presencia y el reclutamiento de células GFP<sup>+</sup> hacia la zona del músculo dañada durante el proceso de regeneración tisular. Observamos cómo en los días posteriores al daño muscular, se producía una acumulación de células GFP<sup>+</sup> en dicha zona y una disminución de las mismas en las fibras sanas próximas a la zona de regeneración.

Los resultados obtenidos coinciden con los estudios realizados acerca de la regeneración muscular, donde se describe el proceso diferenciando dos momentos claves: en un primer lugar la destrucción de las fibras dañadas y la actuación de células mononucleadas del proceso inflamatorio; y en segundo lugar, la acumulación y división de células pluripotentes con capacidad miogénica que dan lugar a las nuevas fibras o aportan nuevos núcleos a las dañadas. El modelo transgénico utilizado y la técnica de inmunohistoquímica empleada, permiten la identificación y cuantificación de las células pluripotentes localizadas en el músculo. Permite a su vez profundizar en el estudio de la posición que ocupan en el tejido y con respecto a las fibras musculares, despejando algunas de las incógnitas actuales acerca de la localización de las células troncales del músculo. El nuevo modelo transgénico representa una herramienta fundamental para el estudio y la caracterización de las distintas poblaciones celulares pluripotentes del músculo.

A pesar del enorme potencial de las células troncales por su posible aplicación en medicina regenerativa, existen ciertas limitaciones en su aplicación relacionadas con la estabilidad genética y epigenética de estas células al mantenerlas en cultivo. Se sabe que el cultivo prolongado de células troncales embrionarias murinas disminuye la pluripotencia de estas células y da lugar a anomalías en los fetos resultantes de su agregación o inyección con embriones. Una de las causas asociadas a estas anomalías son las alteraciones, tanto genéticas como epigenéticas (por ejemplo de genes “imprinting”) observadas en células mantenidas durante múltiples pases. Trabajos recientes han demostrado que los elementos retrotrasponibles pueden jugar un papel importante en la

estabilidad de las células embrionarias y en el mantenimiento de su pluripotencia. En el tercer trabajo de la tesis (Ramirez *et al.*, 2007) hemos analizado un hecho singular observado en nuestro laboratorio al trabajar con pases tardíos de la línea de célula troncal embrionaria R1. Observamos que después de 27 pases celulares, nuestra línea R1 perdió la habilidad de transmisión a la línea germinal y comenzó a inducir el fenotipo de cola torcida (similar a la mutación “kinky tail” en ratón) en los animales quiméricos producidos con ellas. Con el fin de investigar si dicho fenotipo está asociado con alteraciones cromosómicas, diferenciación inadvertida o modificaciones epigenéticas, se analizaron y compararon pases celulares tempranos (pase 16, que no producían el fenotipo) y tardíos (pase 27, que producían el fenotipo) con la línea de célula troncal embrionaria MAR (C57/CBAF1), generada en nuestro laboratorio (pase 10). En estas líneas se analizó el cariotipo, la expresión de marcadores de diferenciación y pluripotencia, la transcripción de ARN mensajero de los retrotransposones IAP (intracisternal-A particle) y MuERV-L (retrovirus endógeno murino), así como la metilación de dichos retrotrasposones.

Los resultados obtenidos muestran que la línea R1 a pase 27 presenta un cariotipo y aspecto normal, además de una expresión de los marcadores de diferenciación y pluripotencia similar a la de las líneas celulares troncales R1 y MAR en pases tempranos. La diferencia más relevante que encontramos con los análisis de transcripción realizados fue una alteración en los patrones de transcripción del ARN mensajero de los retrotransposones IAP y MuERV-L en las dos orientaciones del ARN transcrito (sentido directo y sentido inverso), así como una alteración en los patrones de metilación del retrotransposón IAP. Dicha alteración no se observa en el retrotransposón MuERV-L. Estos resultados sugieren que, además de los procesos de metilación, existen otros procesos transcripcionales que pueden estar implicados en la silenciamiento genómica de algunos retrotrasposones. Estos mismos mecanismos podrían ser los responsables de la disminución de pluripotencia observada en las células troncales tras pases avanzados de cultivo; además, la alteración en la expresión de ciertos retrotransposones puede pasar inadvertida en los controles rutinarios de calidad de las células en cultivo, sin que ello afecte a su morfología, estructura cromosómica, o expresión de marcadores de diferenciación o pluripotencia. Por ello hay que considerar la inestabilidad de estos elementos retrotransponibles a la hora de

utilizar células troncales tanto en transgénesis (formación de animales quiméricos) como en terapia celular.

Además de la necesidad de conocer y controlar las alteraciones genéticas y epigenéticas que se producen al mantener a las células troncales en cultivo *in vitro*, existen otras limitaciones relacionadas con su capacidad de pluripotencia y división ilimitada que restringen el uso de estas células en medicina regenerativa, como es la predisposición que presentan para formar tumores tras su aplicación. Así en el cuarto y último trabajo de esta tesis (Ramirez *et al.*, 2007), con el objetivo de analizar la seguridad del proceso de diferenciación de las células troncales, y examinar si después de esta diferenciación *in vitro* aun quedan células en el cultivo que, aunque morfológicamente parezcan diferenciadas, todavía conserven ciertas propiedades de las células troncales, se electroporaron células troncales embrionarias de ratón con la construcción ya descrita mTert-EGFP. Cuando estas células troncales embrionarias están en cultivo, se observa la expresión de la proteína de fluorescencia verde como consecuencia de la actividad telomerasa que presentan. Al diferenciarlas en cultivo *in vitro* eliminando el LIF (leukemia inhibitor factor) del medio, tras la formación de los cuerpos embriodes (EB), se obtiene una monocapa de células morfológicamente diferenciadas. Durante la formación de los cuerpos embrioides se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia, seguida de una disminución de la misma durante la formación de la monocapa de células diferenciadas, hasta perderse casi por completo en el cultivo morfológicamente diferenciado. Sin embargo, tras dos semanas de cultivo sin LIF se pudieron observar, entre las células de la monocapa diferenciada, pequeños grupos de células morfológicamente diferenciadas que aun conservaban cierta expresión de fluorescencia verde. Estos grupos celulares fueron aislados, expandidos y cultivados en condiciones de células troncales indiferenciadas (con LIF). Tras varios pases en medio en condiciones de no diferenciación, estas células (que denominamos ES-EB) recuperaron su morfología de célula troncal. Se analizaron las colonias ES-EB obtenidas mediante inmunocitoquímica, transcripción reversa mediante PCR y análisis de metilación mediante bisulfito, y se encontró que, a pesar de la pérdida inicial de expresión de algunos genes relacionados con pluripotencia, característicos de células troncales, y de la hipometilación de algunos retrotrasposones, tras varios pases en condiciones de células troncales, las colonias ES-EBs recuperaban esa falta de expresión de genes de

pluripotencia. Con el fin de medir el potencial pluripotente de estas ES-EB, se inyectaron y agregaron dichas células a embriones en estadio de 8 células y blastocisto. En un principio, la mayoría de las ES-EBs aisladas de la monocapa diferenciada fueron incapaces de producir quimerismo, pero tras varios pases en condiciones óptimas de cultivo de células troncales, recuperaron dicha capacidad. A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta su aplicación en medicina regenerativa, se puede destacar la necesidad de identificar y eliminar células con cierto grado de pluripotencia que permanecen en un cultivo diferenciado, ya que, en un ambiente adecuado pueden ser el inicio de un tumor.

Pericuesta E, Ramirez MA, Villa-Diaz A, Relano-Gines A, Torres JM, Nieto M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod Biol Endocrinol* 4:5.

Ramirez MA, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4:55.

Ramirez MA<sup>#</sup>, Pericuesta E<sup>#</sup>, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2007. Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies. *Int J Dev Biol* 51(5):397-407.

# Nota: Estos autores contribuyeron de igual manera a este trabajo.



**THESIS ABSTRACT**



## 2. THESIS ABSTRACT

Stem cells importance has grown on the last decades due to their high potential for treating diseases such as spinal cord injury, multiple sclerosis, Parkinson's disease, Alzheimer's disease and cancer and to be used for specific assays of drugs and toxins. Embryonic stem (ES) cells are undifferentiated cells derived from the inner cell mass of a developing preimplantation embryo which, like somatic stem cells, possess the unique ability to self-renewal and multilineage differentiation. The ability of indefinite self-renewal is lost as ES cells differentiate to generate somatic tissue due to a telomere shortening problem that occurs in every eucariotic cell. One mechanism that may underlie the capability of stem cells to replicate indefinitely is the expression of the DNA repair enzyme complex that includes telomerase, an RNAdependent DNA polymerase that maintains telomere length. The reverse transcriptase of telomerase (Tert) controls telomerase activity maintaining the end of linear chromosomes in eukaryotic cells. Telomerase function is highly active in undifferentiated multipotent stem cells, decreases with cell differentiation and is generally absent from most somatic cells in the adult, where its absence is responsible for telomeres shortening.

The first study of this thesis (Pericuesta *et al.*, 2006) comes from the interest to investigate the regulatory elements of Tert promoter. Using an *in vivo* transgenic model and *in vitro* culture differentiation of adult stem cells, we examined the elements of the mouse Tert (mTert) promoter that control telomerase activity. Three constructs comprising 1, 2 or 5 kb of the mTert promoter sequence coupled to the coding sequence of the green fluorescent protein (EGFP) were electroporated into embryonic stem (ES) cells. Transformed ES cells were able to mimic the expected mTert expression, which was associated to green fluorescence. One and 5 kb promoter produced the higher expression of EGFP, on ES cells. When ES cells were allowed to differentiate to embryoid bodies and to other cell types, they lost gradually the expression of mTert-EGFP as consequence of differentiation. No differences were found among the three constructs analyzed. We then generated transgenic mice with the three constructs: eight lines of transgenic mice carrying the 1 k-*mTert*-EGFP transgene, 3 carrying the 2 k-*mTert*-EGFP transgene and 5 carrying the 5 k-*mTert*-EGFP transgene. Expression of the reporter gene was monitored by reverse transcription-PCR analysis and EGFP visualization. The mRNA expression of the three

constructs was lower than the endogenous mTert, but mimicked the endogenous mTert transcription pattern; however, no fluorescent expression of EGFP was detected in adult tissues. EGFP expression of the three constructs was visualized at the blastocysts stage and in new ES cells generated from them; in the germinal ring of E13 dpc foetuses; in ES-like colonies and in germinal stem cells generated from neonatal and adult testis cells; and in neuroesferes generated from E14 dpc foetuses' brain cells.

According these results, we can conclude that the 1 kb promoter upstream of the initiating ATG codon of mTert contains the regulatory elements necessary to control telomerase expression in ES cells during *in vitro* loss of pluripotency. The transgenic mice lines generated represent an appropriate system to analyze the expression of mouse Tert gene under physiological conditions and during establishment of stem cell lines generated from embryonic or adult tissues and the transgenic model mTert-EGFP constitutes an important tool to study adult stem cells and their niche. To prove this potential, in the second study, we analyzed the presence of pluripotent cells in the muscular tissue of these transgenic mice.

Skeletal muscle is a tissue characterized by its high regeneration capacity showed when it is damaged. Nowadays this regeneration capacity is believed to be due to muscle satellite cells, although recent researches have demonstrated that bone marrow stem cells and muscle stem cells with miogenic capacity contribute to formation and regeneration of damaged fibers.

Due to the fact that the only cells expressing Tert in adult tissues are the stem cells, or cells with pluripotent capacity, our hypothesis assure that transgenic model mTert-EGFP allows *in vivo* identification of these pluripotent cells. In this work we identified and studied GFP<sup>+</sup> cells placed in transgenic mTert-EGFP mice tibialis anterior muscle during postnatal development and during the regeneration process carried out after induced tissue damage. We used an anti-EGFP antibody in the *tibialis anterior* of these transgenic mice and we observed a high presence of GFP<sup>+</sup> cells homogeneously distributed all around the muscle on the first life days. In addition we observed a higher GFP<sup>+</sup> cells presence around vessels. When mouse grows, GFP signal decreases, till being almost imperceptible in adult stage using this methodology.

Another interesting issue was to know the pluripotent cells position regarding muscle fibers to identify the kind of cells they are. To achieve this, we used a double staining using an anti-collagen Type IV antibody to observe muscle fiber shape and an anti-EGFP antibody to localize high telomerase activity cells. Results showed different cell populations placed under and between the fibers. Finally we analyzed the presence and the recruitment of GFP<sup>+</sup> cells to a damaged area during the regeneration process. After the tissue damage, we observed a GFP<sup>+</sup> cells accumulation in the damaged area while a decrease was observed in intact areas. Our results are in agreement with previous muscle regeneration reports which describe that regeneration process occurs by two steps: firstly, there is a muscular fibers destruction process where mononucleated cells from inflammatory process act and secondly, an accumulation and division of pluripotent cells with miogenic capacity give rise in new fibers or nucleus for the damaged ones.

We can conclude that the mTert-EGFP transgenic model and the immunocytochemistry tool used, allow the identification and quantification of pluripotent cells placed in muscular tissue. It allows to go into the study of the position where they are inside the muscle, clearing some questions about muscle stem cell localization. Therefore, mTert-EGFP transgenic model is an important tool to study and characterize different muscle pluripotent cell populations.

Despite the high potential of stem cells in regenerative medicine, there are some problems that limit its therapeutical use. It is generally accepted that an early-passage ES cell line can be used to produce complete ES cell-derived fetuses. However, after several passages, the potential of the majority of these ES cell lines becomes limited due to genetic and epigenetic changes. In the mouse, culture of embryonic stem (ES) cells may decrease their pluripotency and give rise to foetal abnormalities in recipient embryos. These abnormalities are frequently associated with both chromosome abnormalities and epigenetic alteration of imprinting genes; however, little is known about the epigenetic stability of endogenous retrotransposable elements (REs). In our laboratory, we came across a R1 ES cell line, which at passage 27, had lost the ability of germline transmission and had started the induction of the kinky tail phenotype in all chimeric animals produced with it. In the third study of this thesis (Ramirez *et al.*, 2006), we aimed to investigate

whether the kinky tail phenotype was associated with chromosome alteration, inadvertent differentiation, or epigenetic modification. We characterized and compared the R1 ES cell line at passage 27 above mentioned with an early passage and with a second ES cell line C57/CBAF1 generated in our laboratory. We assessed: i) karyotype; ii) expression of pluripotent and differentiation markers, iii) mRNA transcription by qRT-PCR of two REs, intracisternal-A particle (IAP) and murine endogenous-retrovirus-L (MuERV-L), and iv) methylation of IAP and MuERV-L.

The results showed that R1 ES cell at passage 27 presented normal morphology, karyotype, and expression of genetic markers characteristic of pluripotency; however, it was detected an altered mRNA transcription of sense and antisense RNA strands of both REs, concomitantly with an altered methylation pattern for the IAP element but not for MuERV-L. These results indicate that besides methylation, other post-transcriptional processes are involved in gene silencing of some REs; and that culture of ES cells may decrease their pluripotency by producing inadvertent alterations in the expression of REs without affecting significantly the morphology, chromosome structure, and expression of pluripotent or differentiation markers.

The main conclusion of this work is that inadvertent REs instability may have important consequences for the use of ES cells in transgenesis (chimera formation) or in cell therapy that are important to consider.

Besides of the genetic and epigenetic alterations occurring during stem cell culture, there are other factors which limits the use of these cells in regenerative medicine and are related with pluripotent capacity and unlimited division such as the high risk of teratoma formation after their use. In this perspective, the forth study of this thesis (Ramirez *et al.*, 2007) was designed to analyze the security of ES cells differentiation process. We hypothesized that some cells with pluripotency characteristics remain after the differentiation of embryoid bodies (EB) into monolayer cells. To test this, we transformed mouse ES cells using constructs comprised of the mTert promoter coupled to green fluorescent protein. In this manner, EBs could be identified as showing gradually diminishing expression of the fluorescent marker as a consequence of differentiation. However, after 2 weeks of incubation, small groups of fluorescent cells remained in the

differentiated monolayer. When these cells were isolated, cultured and expanded under ES cell culture conditions, they recovered their ES cell morphology (herein denoted ES-EB). We found by immunocytochemistry, reverse transcription-PCR and bisulphite analysis that despite the fact that some of these ES-EB lost their capacity to express some pluripotency markers characteristic of ES cells and undergo the epigenetic modification (hypomethylation) of some retrotransposons (RT), after several passages in ES media, the cell colonies recovered their capacity for both pluripotency marker expression and RT methylation. Furthermore, when assessed for their ability to form chimeras, most ES-EB lines were unable to do so, although they recovered this potential for chimera production after some passages in ES cell media. These results highlight the need for specific screening of differentiated cells before their therapeutic use and indicate that under adequate culture conditions, cells that lose their potential for expressing key markers of pluripotency can recover this fundamental embryonic stem cell property.

Pericuesta E, Ramirez MA, Villa-Diaz A, Relano-Gines A, Torres JM, Nieto M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod Biol Endocrinol* 4:5.

Ramirez MA, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4:55.

Ramirez MA<sup>#</sup>, Pericuesta E<sup>#</sup>, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2007. Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies. *Int J Dev Biol* 51(5):397-407.

**# Note:** These authors contributed equally to this work



## INTRODUCCIÓN



### **3. INTRODUCCIÓN**

La presente tesis analiza diferentes aspectos relacionados con la biología de células troncales embrionarias y adultas en el ratón. En primer lugar hemos desarrollado un modelo de ratón transgénico basado en el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa (*Tert*) controlando la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) (Pericuesta *et al.*, 2006), cuya caracterización nos ha permitido estudiar dicho promotor y analizar los procesos de diferenciación *in vitro* que acontecen en las células troncales embrionarias. En segundo lugar, hemos utilizado este modelo transgénico para estudiar las células troncales adultas presentes en el músculo esquelético y su comportamiento en el proceso de regeneración muscular. En tercer lugar hemos analizado la estabilidad de las células troncales en cultivo a nivel genético y epigenético (Ramirez *et al.*, 2006). Por último, hemos demostrado la presencia de células pluripotentes en un cultivo celular aparentemente diferenciado y hemos desarrollado metodologías que nos permiten identificar estas células para evitar el riesgo que presenta el uso de células troncales pseudo-diferenciadas en medicina regenerativa (Ramirez *et al.*, 2007).

#### **3.1 Células troncales, división celular y actividad telomerasa**

##### **3.1.1. Definición, características e importancia de las células troncales**

Las investigaciones realizadas en los últimos años han permitido vislumbrar un impresionante potencial terapéutico y biotecnológico en el uso de las células troncales embrionarias y adultas. Las propiedades que definen a las células troncales y que las hacen especiales son su capacidad de autorrenovación, su división ilimitada y su capacidad de diferenciación en casi cualquier tipo celular (Fig. 1 y 2). Estas características convierten a estas células en una nueva herramienta biológica para combatir enfermedades degenerativas, hasta hoy incurables, como la enfermedad de Parkinson, la diabetes tipo I, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, los daños en la espina dorsal e incluso el cáncer. Las células troncales también permiten realizar ensayos específicos de drogas y toxinas (Kirschstein 2001). Debido a que las células troncales embrionarias se aíslan a partir de embriones en estadio de blastocisto, los estudios realizados con ellas contribuyen

también a ampliar el conocimiento sobre el desarrollo embrionario, que algún día podrán ser de utilidad a la hora de comprender y tratar enfermedades prenatales. Su estudio es importante también para conocer cómo actúan ciertos genes y factores de crecimiento durante los procesos de desarrollo y diferenciación, información de utilidad a la hora de cultivar y diferenciar células troncales *in vitro* para una aplicación terapéutica.

A diferencia de las células somáticas, las células troncales se mantienen en estado de no diferenciación hasta que las señales que reciben del entorno les hacen especializarse en un tipo celular concreto con una función específica. Desde que en 1998 el Dr. James Thomson aislara la primera célula troncal humana a partir de un embrión temprano, el conocimiento y las expectativas sobre estas células ha crecido enormemente. Mediante estudios realizados *in vitro* se ha podido comprobar la capacidad de diferenciación de estas células en casi cualquier tipo celular especializado del cuerpo, así como su potencial para generar reservorios celulares de tejidos y órganos.

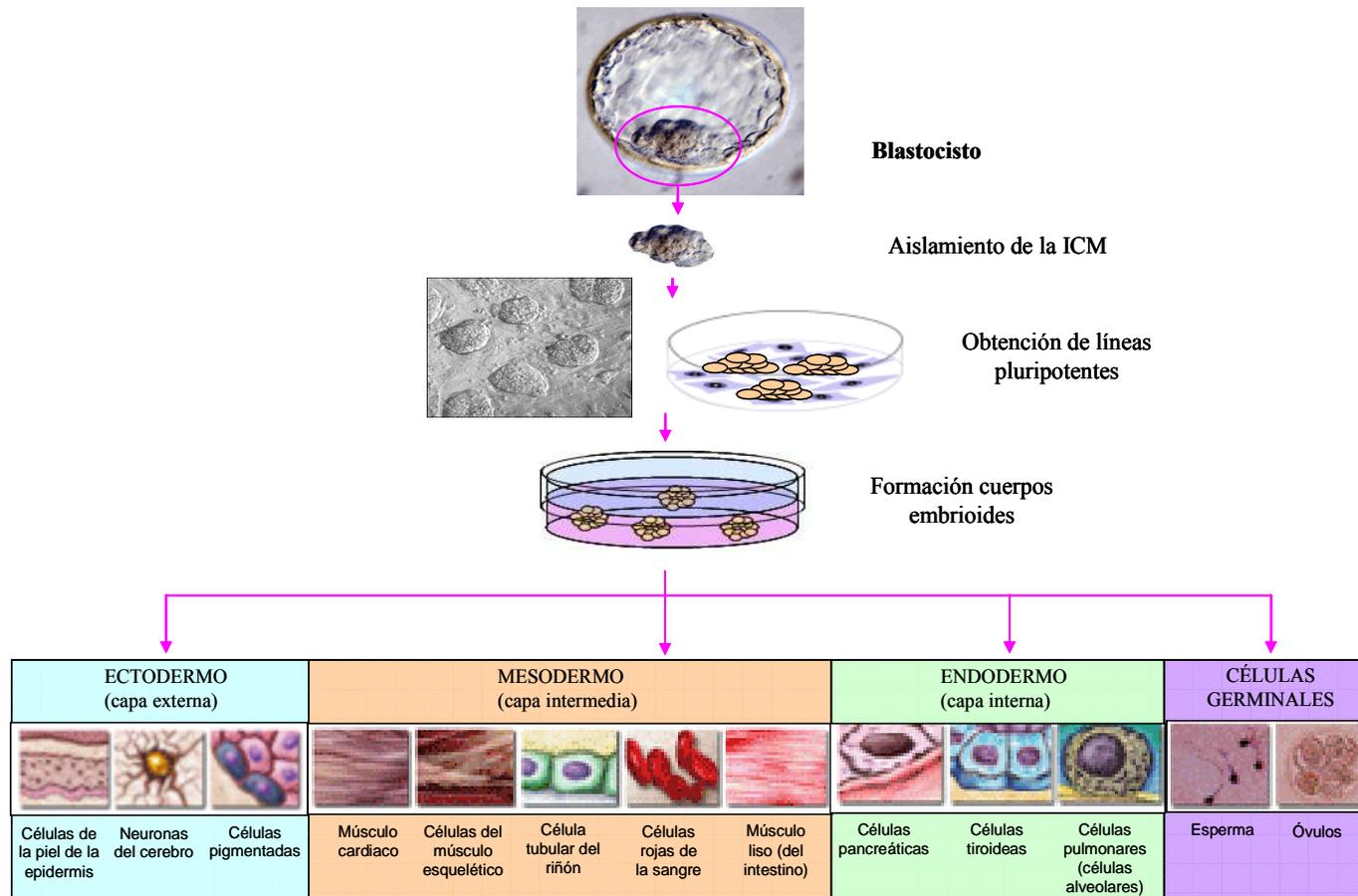


Figura 1. Obtención de células troncales embrionarias. Distintos tejidos de las tres capas embrionarias a los que pueden dar lugar tras su diferenciación.

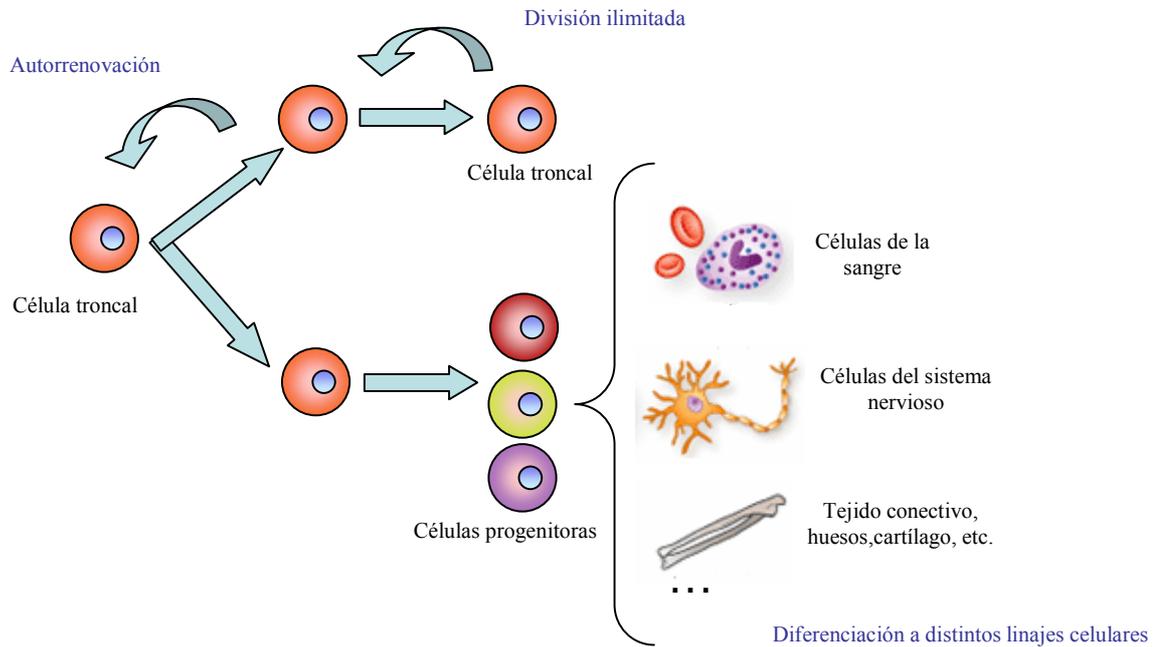


Figura 2. Esquema de las tres principales características de las células troncales, la autorrenovación, la división ilimitada y la diferenciación a distintos linajes celulares.

### 3.1.2. División celular, telómeros y actividad telomerasa

Una de las características principales de las células troncales es su capacidad de dividirse ilimitadamente en condiciones controladas. De forma generalizada, la célula eucariota en el proceso de división mitótica sufre un acortamiento de los telómeros, que son unas estructuras nucleoproteicas que se encuentran en los extremos del cromosoma y que le protegen de los procesos de degradación y de fusión (Fig. 3). El problema que se da en la replicación del ADN es debido a la propia naturaleza del proceso. En el momento de la replicación, la cadena doble de ADN se separa, quedando una cadena orientada en sentido 5'-3' y su complementaria, para servir de molde en la síntesis de las nuevas cadenas. La enzima utilizada en este proceso es la polimerasa, que actúa únicamente en sentido 5'-3' valiéndose de una pequeña secuencia sintética de oligonucleótidos (cebador) a partir del cual inicia la replicación del ADN. De esta forma, la cadena molde de sentido 5'-3' no presenta dificultad para su replicación ya que supone el molde perfecto para la polimerasa, sintetizándose así la nueva cadena de ADN se sintetiza de manera continua y hasta el final

de la cadena molde. El problema de la replicación surge al utilizar como molde la cadena complementaria. En este caso, debido a que la enzima polimerasa únicamente actúa en sentido 5'-3', la nueva cadena de ADN se crea mediante fragmentos pequeños y discontinuos (fragmentos de Okazaki). Cuando se retiran los fragmentos de ARN que servían de inicio a la reacción, la enzima polimerasa une los fragmentos que se han generado a partir de esos cebadores. El problema surge en el extremo 3' de la cadena molde, donde la enzima polimerasa no puede acceder por carecer de cebador al que unirse para iniciar la replicación. Así, tras varias sesiones de replicación, la molécula de ADN se va acortando (Fig. 3). Para evitar aberraciones y fusiones cromosómicas como consecuencia de este fenómeno, la naturaleza ha dispuesto en el extremo de los cromosomas unas secuencias sin sentido y repetidas (en vertebrados TTAGGG). Estas secuencias de ADN, junto con sus proteínas asociadas se denominan telómeros (Fig. 4). De esta forma son los telómeros de las células eucariotas los que sufren el problema de la replicación, acortándose en cada división celular. Este hecho limita el número de divisiones que la célula puede realizar antes de acumular aberraciones o fusiones cromosómicas (límite de Hayflick) que dirigen a la célula hacia la apoptosis.

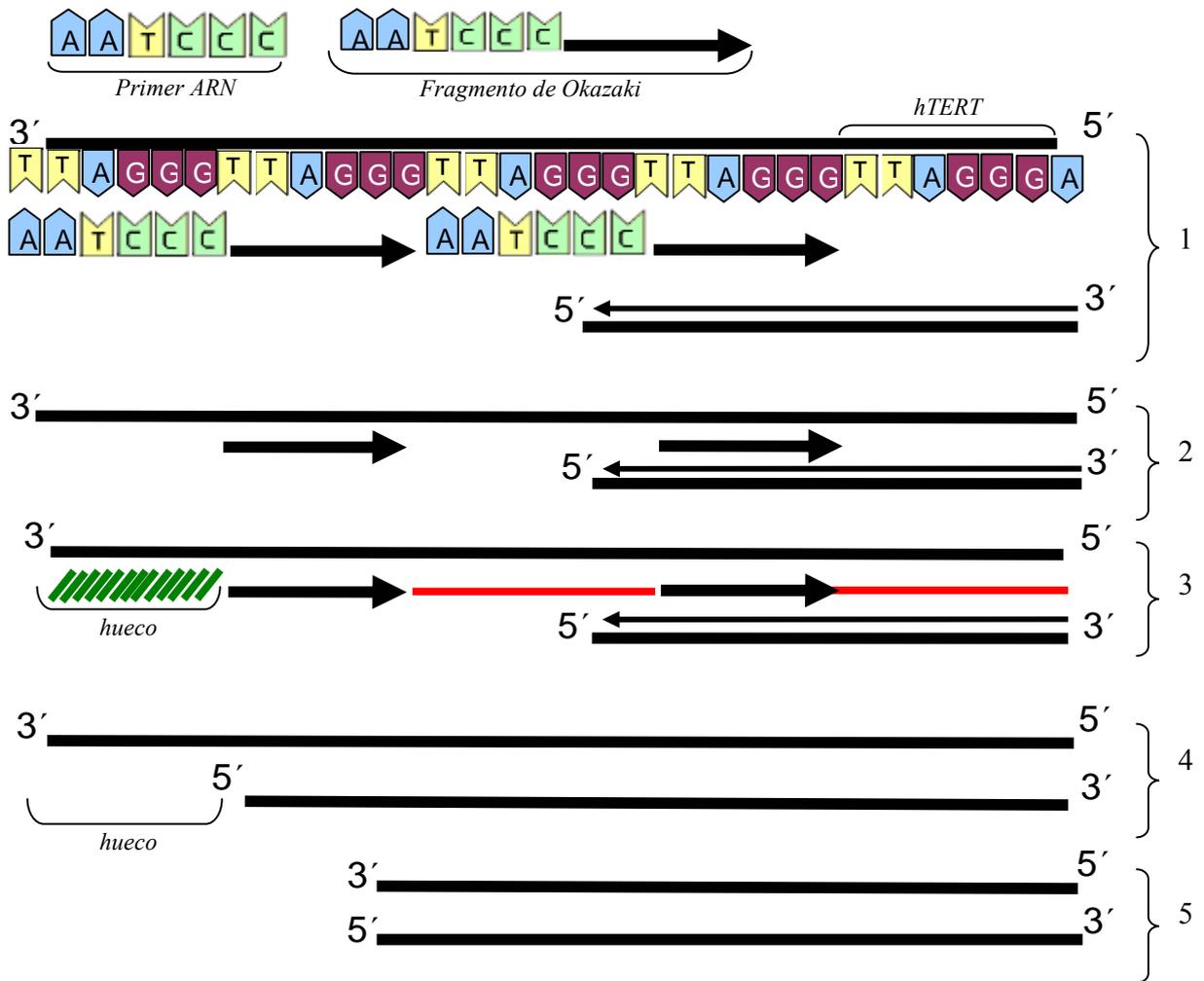


Figura 3. Como resultado de la división celular, los telómeros que protegen sus cromosomas se acortan progresivamente. Acortamiento de los telómeros: 1: Pequeños fragmentos de oligonucleótidos son utilizados como cebadores. La enzima ADN polimerasa comienza la replicación. 2: Los cebadores son eliminados. 3: Todos los fragmentos de Okazaki se extienden y se ligan. Sin embargo, la enzima polimerasa no es capaz de rellenar el hueco dejado por el cebador que está en el extremo 3' del ADN. 4 y 5: Como consecuencia, una de las dos cadenas hijas acorta el número de pares de bases que constituyen el cebador de iniciación del proceso.

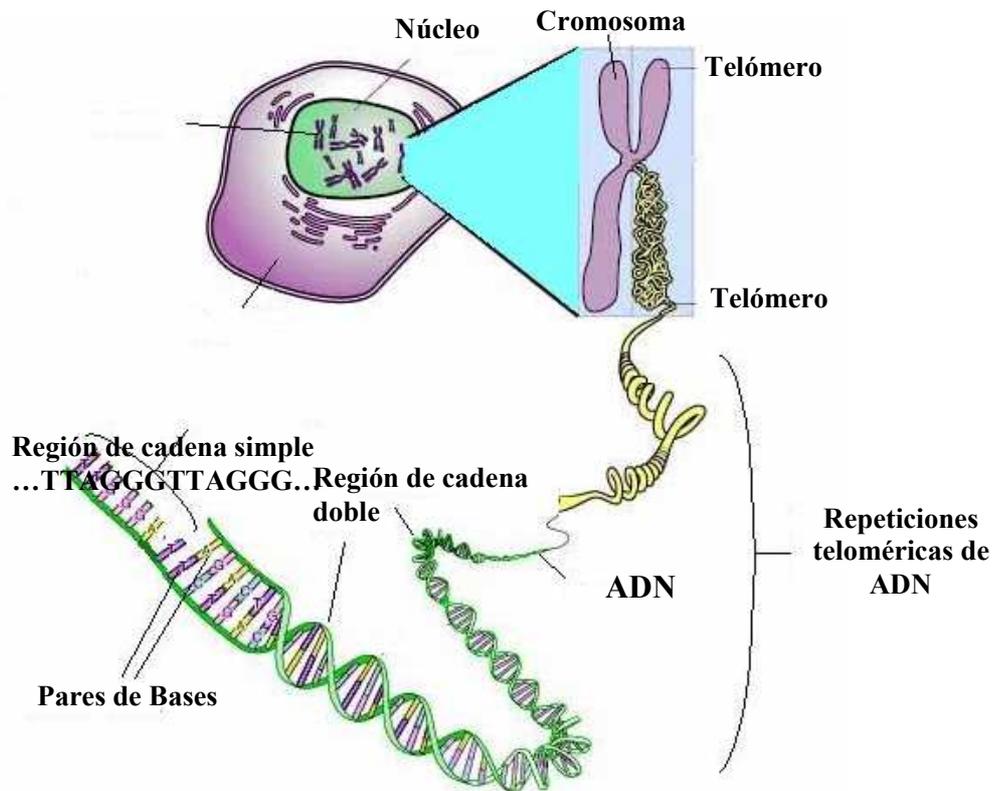


Figura modificada de PHARMOMIX

Figura 4. Localización de los telómeros en una célula eucariota. El telómero es una secuencia de cadena doble de ADN con un extremo final de cadena sencilla localizado en el extremo de los cromosomas.

En contraste con las células somáticas, cuya esperanza de vida está limitada debido al problema de replicación ya comentado, las células troncales se definen como “inmortales” debido a que pueden dividirse de manera ilimitada sin sufrir daños en sus cromosomas. Uno de los mecanismos que sostiene esta capacidad de división ilimitada es la expresión del ADN del complejo enzimático que incluye la telomerasa, que es una polimerasa de ARN dependiente de ADN que mantiene la longitud de los telómeros sintetizando repeticiones teloméricas (Tang *et al.*, 2001) (Fig. 5). Se sabe que el factor clave que controla la actividad de la telomerasa es la transcriptasa inversa de la telomerasa, también denominada *Tert*.

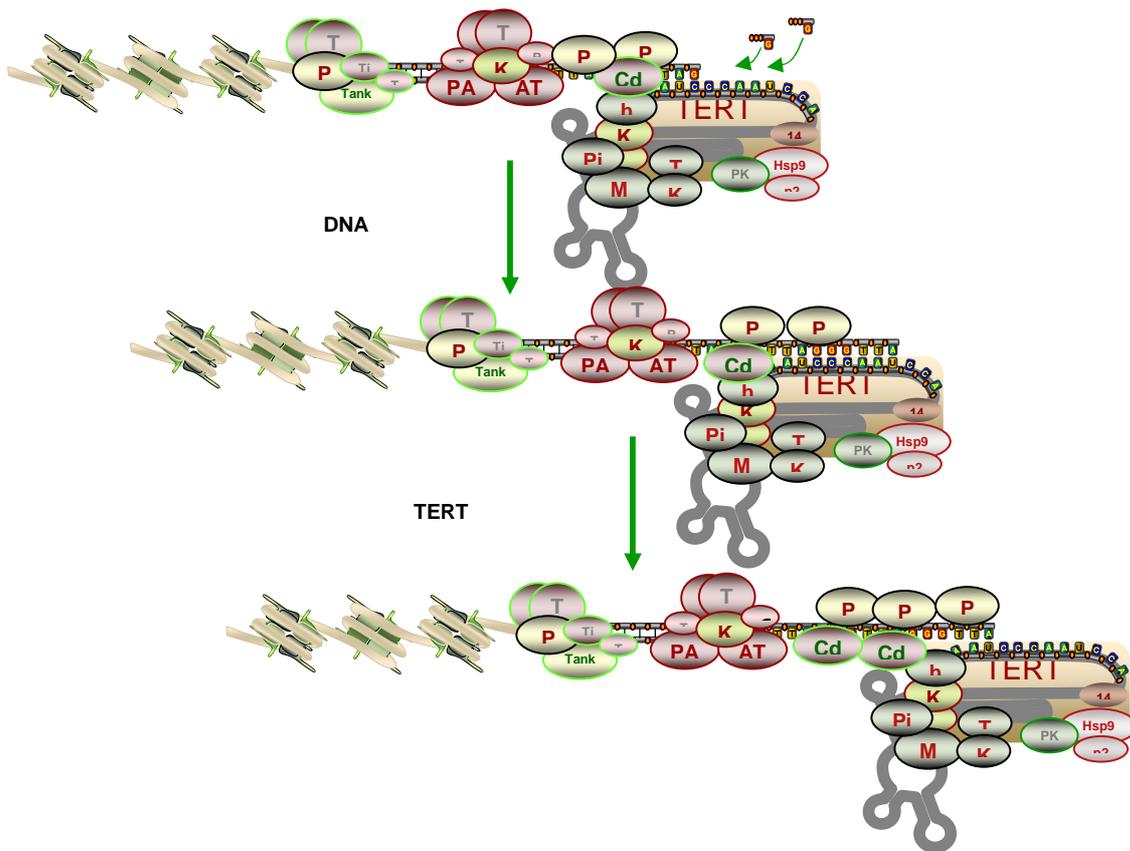


Figura 5. Esquema representativo de la extensión de los telómeros mediada por el complejo enzimático de la telomerasa. La telomerasa es una enzima que mantiene la longitud de los telómeros añadiendo secuencias de ADN. La enzima se une al extremo simple del telómero que sirve de molde en la síntesis de la nueva cadena de ADN. La telomerasa añade varias repeticiones de secuencias de ADN mientras que la ADN polimerasa se une a la cadena complementaria de ADN completando la extensión del extremo del cromosoma.

Los trabajos realizados sobre los niveles de actividad telomerasa en los distintos tipos celulares murinos durante procesos de proliferación, diferenciación y estados de senescencia, muestran que las células troncales tienen una alta actividad telomerasa, mientras que la actividad es menor en tejidos en proceso de diferenciación (Armstrong *et al.*, 2000). Se ha visto que en células en estado de quiescencia reversible o en procesos de diferenciación la actividad de esta enzima está regulada a la baja (Armstrong *et al.*, 2000).

Como se ha comentado anteriormente, los telómeros son estructuras especializadas que se encuentran en los extremos de los cromosomas. El complejo telomérico está formado por a) secuencias repetidas de ADN no codificante (TTAGGG en vertebrados) que se extienden varios miles de pares de bases y terminan en un extremo 3' de cadena sencilla, y b) múltiples proteínas asociadas que participan en el control de la longitud del ADN telomérico (por ejemplo, telomerasa, TRF1, TRF2, Ku86, etc). La telomerasa está compuesta por una transcriptasa inversa que controla la actividad de la telomerasa (TERT: telomerase reverse transcriptase) y un componente de ARN (TER RNA: telomerase RNA component) que sirve de molde para la síntesis de nuevas repeticiones de ADN telomérico (Fig. 5). Coincidiendo con el año en el que se aisló la primera célula troncal humana, Greenberg y colaboradores clonaron por primera vez el promotor de TERT humano. Este fue un primer paso para investigar los factores claves que regulan la actividad telomerasa en lo que a expresión génica se refiere. Se sabe que el núcleo del promotor TERT está constituido por una región de 300 pares de bases localizada en la región 5' de inicio de transcripción. TERT no presenta la secuencia TATA pero sí dos sitios "E-Box" flanqueando sitios de unión Sp1. Los sitios "E-box" unen varias proteínas celulares entre las que se incluye la familia de factores de transcripción Myc/Mad/Max (Greenberg *et al.*, 1998) (Fig. 6), alrededor de varios sitios de unión SP1. Diferentes estudios han determinado que en contraste con la mayoría de las células somáticas, las células troncales, germinales y tumorales muestran una actividad telomerasa alta regulada por la actividad de TERT.

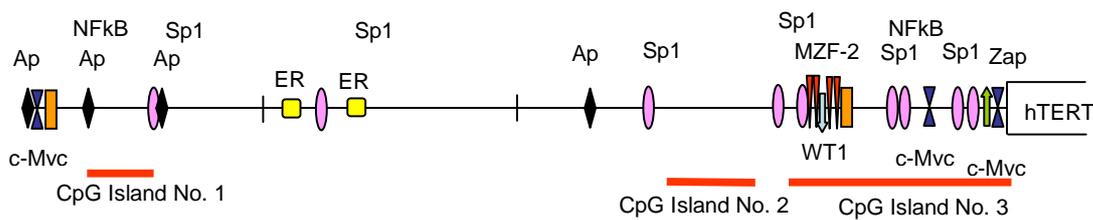


Figura 6. Esquema representando 4,5 kb del promotor de TERT humano. Los distintos símbolos representan elementos reguladores de la transcripción

### **3.1.3. Aplicación del uso del promotor de *Tert* para el estudio de las células troncales**

La mayoría de los conocimientos actuales sobre la regulación del promotor de la *Tert* y de la actividad telomerasa han surgido de los estudios de neoplasias y líneas celulares inmortalizadas gracias a las propiedades especiales de proliferación que presentan estos tipos celulares, y a la facilidad de obtener una muestra de las mismas. A pesar de ser una herramienta importante en el estudio del cáncer, su utilidad se ve reducida cuando se pretende estudiar dicho promotor y de la actividad telomerasa en células troncales o durante los procesos de diferenciación. Queda así constancia de un vacío en el estudio de la regulación de la telomerasa durante los procesos normales de desarrollo.

Por otro lado, se sabe que la capacidad de división ilimitada propia de las células troncales y cancerosas se mantiene en parte gracias a la expresión y actividad del complejo enzimático de la telomerasa (Tang *et al.*, 2001) que viene regulado principalmente por la transcriptasa inversa de la telomerasa (*Tert*) (Armstrong *et al.*, 2000). Se han observado elevados niveles de expresión y actividad telomerasa en células troncales, germinales y tumorales, en contraste con la mayoría de células somáticas donde su actividad es escasa o inexistente (Armstrong *et al.*, 2000).

Recientemente se ha desarrollado un modelo de ratón transgénico usando el promotor de *TERT* humano unido al gen bacteriano *LacZ* (Ritz *et al.*, 2005). En este modelo tan solo se detectó expresión de telomerasa en los testículos, sin lograr reproducir los patrones de expresión endógenos del promotor *Tert* del ratón.

Debido a la estrecha relación de las células troncales y la enzima telomerasa, hemos generado en nuestro laboratorio un modelo transgénico *mTert-EGFP*, donde se asocia el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa murina con el gen de la proteína de fluorescencia verde, para abordar el primer objetivo planteado en la tesis: profundizar en el conocimiento del promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa (*Tert*) y en su regulación durante el proceso de diferenciación de células troncales embrionarias.

### **3.2. Células troncales adultas: células troncales musculares**

Las células troncales adultas, como su propio nombre indica, se obtienen a partir de tejidos de individuos adultos, a diferencia de las células troncales embrionarias que se

obtienen a partir de embriones en estadio de blastocisto. Los estudios realizados hasta la fecha con células troncales embrionarias han permitido caracterizar y comprender en parte los mecanismos que median en los procesos tanto de mantenimiento de la pluripotencia como de la diferenciación celular. Por otro lado, las células troncales adultas han adquirido una gran importancia en la actualidad, debido a estudios que les atribuyen una mayor capacidad de pluripotencia de la que se suponía en un principio. Así se ha comprobado que las células troncales adultas pueden dar lugar a células de las tres capas embrionarias.

Las células troncales adultas, y en particular el músculo esquelético, representa una importante alternativa a las células troncales embrionarias para su aplicación en medicina regenerativa, dada su elevada capacidad de regeneración. En el caso del músculo esquelético, esta capacidad de regeneración se le ha atribuido a las células satélites de las fibras musculares, aunque existen nuevas evidencias que apuntan a la presencia de otras células con capacidad miogénica, que tendrían su origen tanto en el músculo, como en la médula ósea.

### **3.2.1. Desarrollo de un individuo y pérdida de pluripotencia de sus células**

Si hacemos un seguimiento de la pluripotencia de las células troncales desde el estadio de cigoto hasta su situación en un tejido adulto, observamos una pérdida progresiva de la capacidad de pluripotencia de estas células. Sólo podemos referirnos a células totipotentes, es decir, capaces de dar lugar a cualquier tipo celular del organismo, al considerar las células resultantes de las primeras divisiones del embrión, siendo el primer proceso de diferenciación conocido la formación de la masa celular interna (ICM) y del trofoblasto en el estadio de blastocisto. Desde ese momento las células del organismo experimentan procesos de diferenciación que las lleva a constituir los distintos tejidos y órganos asumiendo funciones específicas. Este proceso de diferenciación de la célula troncal se realiza generando un tipo celular intermedio que se conoce como célula progenitora o precursora y que podemos encontrar tanto en tejidos fetales como adultos (Robey 2000). Las células progenitoras son células parcialmente diferenciadas que tras su división, dan lugar a células completamente diferenciadas con una función especializada

(Fig. 2). Estas células progenitoras desempeñan funciones de homeostasis así como de reemplazo, aunque con ciertas limitaciones, de células que mueren como consecuencia de un daño o enfermedad (Leblond 1964).

### **3.2.2. Células troncales y células precursoras en tejido adulto**

La población de células troncales en los tejidos adultos es muy escasa. Se estima que 1 de cada 10000 ó 15000 células de la médula ósea es una célula troncal hematopoyética (Weissman 2000). Teóricamente las células troncales adultas se encuentran dispersas en los tejidos de un animal adulto y se comportan de forma muy distinta de su entorno. El nicho, o relación de la célula troncal con su entorno le confiere las condiciones apropiadas para llevar a cabo sus funciones de autorrenovación y de diferenciación celular. Dependiendo de los tejidos que las alberguen, las células troncales adultas pueden estar en continua división, como ocurre con las células troncales hematopoyéticas que dan lugar a células de la sangre (Domen and Weissman 1999), o pueden permanecer latentes y separadas físicamente de las células diferenciadas a las que dan lugar, como sucede con las células troncales del intestino delgado (Slack 2000). En la actualidad se conoce muy poco sobre el origen de las células troncales en los tejidos adultos. Alguna de las teorías que se proponen es que las células troncales adultas se mantienen en estado no diferenciado durante el desarrollo fetal evitando esa diferenciación en el tejido adulto. En la actualidad se ha descrito la presencia de células troncales en diversos tejidos como la médula ósea, la sangre periférica, el cerebro, el cordón umbilical, los vasos sanguíneos, músculo esquelético, la capa epitelial de la piel y del sistema digestivo, la córnea, la retina, el hígado y el páncreas (Kirschstein 2001)

Una de las principales dificultades que presenta el estudio de las células troncales adultas es debida a su similitud con las células progenitoras del tejido en el que se encuentran. Estas células progenitoras se encuentran en tejidos fetales y adultos, y mediante división simétrica o asimétrica, dan lugar a células diferenciadas (Fig. 7). Se piensa que la función de estas células es mantener la integridad del tejido del que forman parte, reemplazando las células dañadas del mismo. La principal diferencia entre las células progenitoras y las células troncales es su nivel de pluripotencia. Por ejemplo, a pesar de que

las células progenitoras de la médula ósea son capaces de diferenciarse hacia linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, no se piensa que sean capaces de dar lugar a otros tipos celulares. Por ello, parte de los trabajos en los que se relata la existencia de células troncales en tejidos como el músculo esquelético, el tejido endotelial, la piel, el sistema digestivo, el páncreas y el hígado, quizás hagan referencia a los precursores existentes en todos estos tejidos más que a verdaderas células troncales. Por otra parte, al contrario que las células precursoras, es propio de las células troncales adultas dar lugar a células de tejidos procedentes de las tres capas embrionarias como ya se ha demostrado con las células troncales derivadas de la médula ósea que pueden diferenciarse en tejido neuronal, el cual se deriva del ectodermo embrionario (Brazelton *et al.*, 2000; Mezey *et al.*, 2000). Otro ejemplo lo constituyen las células troncales neuronales de cerebro adulto, que mantenidas en cultivo pueden diferenciarse hacia células hematopoyéticas (Bjornson *et al.*, 1999) y participar en la diferenciación de distintos tipos celulares en un embrión quimérico. Estos trabajos, y otros muchos sobre células troncales adultas evidencian que estas células poseen un mayor grado de plasticidad del inicialmente esperado (Yamanaka 2008).

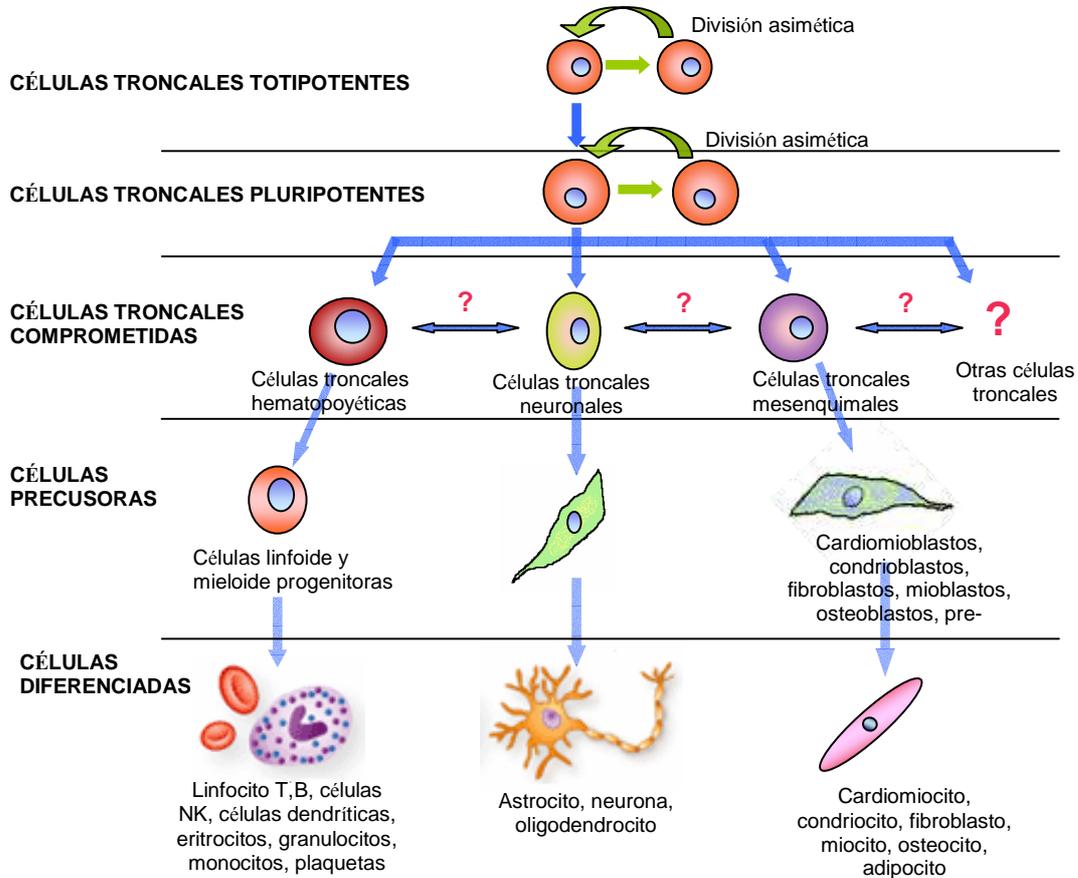
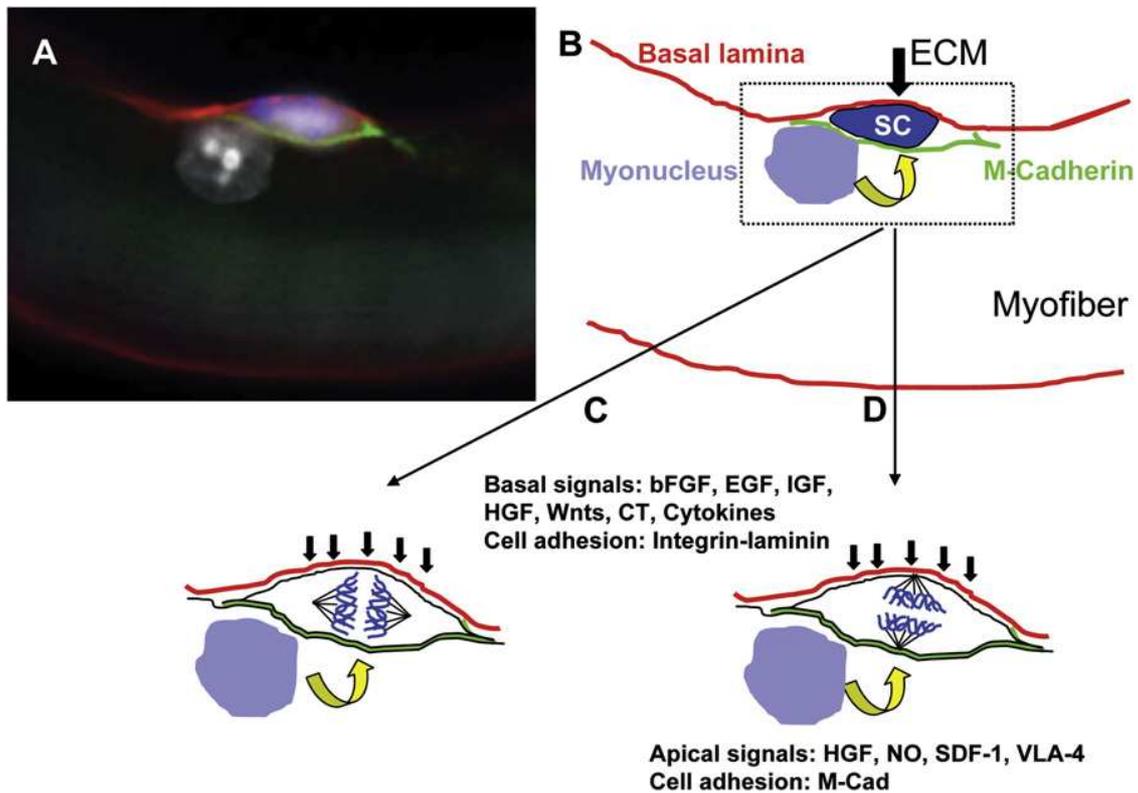


Figura 7. Diferenciación de las células troncales. Las células progresan por los diferentes estados de pluripotencia hasta alcanzar la diferenciación final.

### 3.2.3. Células troncales adultas del músculo

El músculo esquelético es un tejido que presenta una estructura única formada principalmente por miofibras altamente especializadas (Saini and Stewart 2006). Varias investigaciones han dado a conocer el alto potencial que presenta este tejido para regenerarse tras un daño o lesión que le han podido afectar. Esta elevada capacidad de regeneración es debida a la presencia de células con propiedades de autorreplicación y de diferenciación que se denominaron en un primer lugar células satélites del músculo.

Diferentes estudios las describen como células mononucleadas localizadas entre la membrana plasmática y la membrana basal que envuelve a la fibra muscular a lo largo de toda la longitud de la fibra (Mauro 1961) (Fig. 8). Se sabe que cada miofibra está asociada estrechamente con un número de células satélite que se encuentran quiescentes en condiciones normales, pero que son capaces de activarse en respuesta a las señales recibidas en caso de daño muscular. En estas circunstancias, las células satélite del músculo dan lugar a células miogénicas precursoras, que posteriormente se diferencian a las miofibrillas que constituyen el músculo esquelético (Day *et al.*, 2007) (Fig. 9).



(Fuente: Kuang, 2008)

Figura 8. Localización de las células satélite en una fibra muscular. Componentes clave de su nicho celular y regulación de la polaridad de la división celular. Destino de la célula hija llevada a cabo por el nicho. (A) Tinción de una miofibra aislada. La célula satélite está teñida con Pax7 en azul; laminina en rojo, M-cadherina en verde. Núcleos en blanco revelados con DAPI. (B) Diagrama de la imagen A donde se muestra cómo señales

diferenciales procedentes de la matriz extracelular (EMC) (en negro) y de la miofibra huésped (amarillo) puede establecer una polaridad a la célula satélite. (C) Una división con orientación planar puede depositar a las dos células hijas bajo la misma influencia de las señales apicales y basales. (D) Por el contrario una división con orientación apical-basal, puede dar lugar a una división asimétrica donde la célula hija más próxima a la lamina basal y la célula hija más próxima a la miofibra huésped estén expuestas a señales diferentes (Kuang *et al.*, 2008).

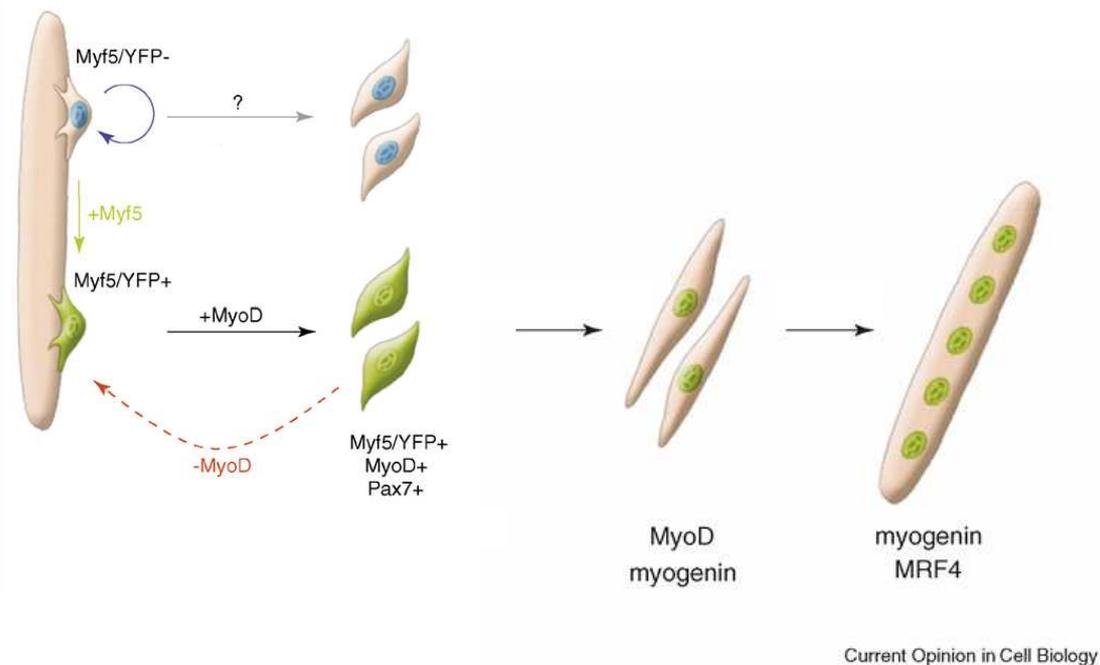


Figura 9. Formación y regeneración de las fibras musculares: durante la regeneración, las células satélites troncales del nicho celular se dividen asimétricamente produciendo por una parte una célula satélite troncal y una célula satélite condicionada para originar una nueva fibra muscular. Esta última, tras recibir las señales del entorno, inicia su diferenciación a miocito. De la fusión de estos miocitos surge la nueva fibra muscular.

El potencial de autorreplicación de las células satélite ha sido comprobado mediante cultivos *in vitro* donde se reproducen de forma ilimitada y, tras ser cultivados en condiciones apropiadas, llevan a cabo su diferenciación miogénica. Es por esto que se han considerado como células troncales adultas dentro del músculo. Pero estudios recientes sugieren que las células troncales del músculo son en realidad una población heterogénea en la que conviven en un mismo nicho células de diferente origen y subpoblaciones de células satélite. Se ha sugerido que esta heterogeneidad afecta también al grado de pluripotencia y diferenciación en el que se encuentran las diferentes subpoblaciones. Así, en la actualidad se han descrito al menos dos poblaciones de células satélites que muestran distintas características de activación. Una población mayoritaria formada por células comprometidas para ser precursoras con una capacidad de proliferación limitada y con una rápida capacidad de diferenciación; y una segunda población minoritaria, con una tasa de división lenta, encargadas de la autorrenovación y el mantenimiento del grupo de precursores anteriormente mencionados. Considerando la heterogeneidad encontrada entre las células satélites, se han planteado interrogantes como si son las células satélites musculares las únicas células troncales adultas del músculo con capacidad de regenerar el músculo esquelético. Los trabajos realizados para responder a esta pregunta han descrito que existen varias poblaciones de células con propiedades similares a la célula troncal que se pueden aislar y que contribuyen a la regeneración del músculo después de sufrir un daño. Pensando en una aplicación práctica en medicina regenerativa, se ha mostrado especial interés por las células progenitoras derivadas de la línea endotelial que incluyen los mesoangioblastos, los pericitos y las células troncales CD133 ya que, al contrario que las células troncales, debido a su origen son capaces de atravesar el endotelio para llegar a la zona dañada. Los mesoangioblastos son células troncales asociadas a los vasos sanguíneos que proceden en origen de la aorta dorsal embrionaria. Distintas experiencias han demostrado que poseen un elevado potencial miogénico y que contribuyen satisfactoriamente a la regeneración muscular. Por otro lado, los pericitos se encuentran en el tejido adulto rodeando el sistema miovascular. Se ha descrito que los pericitos aislados del músculo esquelético humano pueden diferenciarse en miotúbulos cuando se cocultivan con mioblastos o cuando se cultivan en un medio de diferenciación hacia músculo (Dellavalle *et al.*, 2007). La eficiencia de este proceso es similar al reportado para las

células satélite humanas derivadas de un cultivo de mioblastos. Además las investigaciones recientes llevadas a cabo sugieren que los pericitos poseen la capacidad de reconstituir el nicho de las células satélite, aunque con baja eficiencia. Por último, se ha descrito una población de células troncales que expresan el antígeno de superficie CD133. Estas células se encuentran circulando en el torrente sanguíneo y poseen el potencial de reparar un daño en el músculo esquelético. A este último tipo celular, así como a los pericitos, también se les atribuye la capacidad de reconstruir el compartimiento en el que se alojan las células satélites del músculo (Kuang *et al.*, 2008).

Teniendo en cuenta el elevado número de células troncales con capacidad de regeneración que existen en el músculo esquelético, y considerando la existente relación ya mencionada anteriormente entre la capacidad de autorrenovación y de división ilimitada de las células troncales con la expresión de la enzima telomerasa, elegimos el músculo esquelético como tejido diferenciado para abordar el último objetivo de la tesis: validar el modelo de ratón transgénico derivado de las construcciones *mTert-EGFP* como herramienta de utilidad para localizar las células troncales en tejidos adultos. Debido al diseño de la construcción, la expresión de telomerasa en las células de estos modelos transgénicos se hace visible por la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) a la que está asociada. Para cumplir el objetivo detallado, se analizó la presencia y el comportamiento de las células GFP positivas presentes en el músculo tibial anterior de los ratones transgénicos de telomerasa en distinto grado de desarrollo y durante el proceso de autoregeneración después del daño celular producido tras el tratamiento con cardiotoxina.

### **3.3. Genética y epigenética en las células troncales. Retrotransposones**

La actividad telomerasa y la conservación de la longitud telomérica participan en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica a lo largo de las sucesivas divisiones celulares, pero se desconoce si esto es suficiente para mantener un cultivo de células troncales en condiciones óptimas para su uso en medicina regenerativa. A pesar de que la capacidad de división ilimitada constituye una característica fundamental de las células troncales, un cultivo prolongado de estas células puede alterar su estabilidad genética o

epigenética, comprometiendo el control y seguridad de la técnica, y por tanto su aplicación en medicina regenerativa. Hay trabajos recientes que demuestran la presencia de alteraciones epigenéticas en las células troncales en cultivo; como defectos en la expresión de genes relacionados con la impronta genómica (Huntriss and Picton 2008). Es imprescindible conocer el estatus epigenético de las células troncales antes de su utilización en terapia o en la producción de animales transgénicos.

### 3.3.1. Concepto de epigenética

La estabilidad celular no sólo depende de la estabilidad cromosómica a nivel estructural, existen otros factores bioquímicos importantes que influyen en la transcripción genética y que tienen el poder de activar o desactivar la expresión de genes. Estos factores, que vienen condicionados principalmente por el medio que rodea a las células no influyen sobre la secuencia de ADN, sino sobre la epigenética de las células. Podemos definir la epigenética como la herencia de los patrones de expresión de genes que no vienen determinados por la secuencia génica. El mecanismo principal por el que el medio ambiente influye en la expresión de los genes de las células troncales, es mediante modificaciones en su cromatina (Young and Beaujean 2004). Estas modificaciones comprenden los procesos de metilación, acetilación, ubiquitinación y fosforilación que se pueden dar o bien en los grupos amino de la cola terminal del núcleo de las histonas o directamente sobre la cadena de ADN (Beaujean 2002). Se ha descrito la metilación de ADN como uno de los factores clave en el mecanismo de control de la expresión genética y en la regulación epigenética (Razin and Riggs 1980). Numerosos trabajos demuestran que los procesos epigenéticos son imprescindibles para un desarrollo correcto del embrión. Se sabe que después de la fertilización, la mayoría de las marcas de metilación son eliminadas del genoma del embrión, salvo las asociadas con el establecimiento de la impronta genómica durante la gametogénesis, para ser reestablecidas gradualmente durante el desarrollo embrionario hasta completar el estadio de blastocisto (Monk *et al.*, 1987). Sin embargo, la reprogramación epigenética de la mayoría de los genes no finaliza hasta después de los procesos de implantación (Kafri *et al.*, 1992).

### 3.3.2. Retrotransposones y células troncales

Durante mucho tiempo, el estudio del genoma se ha centrado en el pequeño porcentaje del ADN que suponen las regiones que codifican para las proteínas, pero existe un alto porcentaje de secuencias no-codificantes que se insertan entre los genes, que suponen más del 90% del genoma de los mamíferos. A pesar de que inicialmente se pensaba que este ADN no codificante no tenía utilidad alguna, estudios recientes apuntan a la inexactitud de esta hipótesis. Una parte de este genoma no codificante, aproximadamente un 46% del genoma humano, y un 38% del genoma de ratón, está formado en su mayoría por secuencias repetidas de ADN que incluyen transposones de ADN, retrotransposones LTR (repeticiones terminales largas, “long terminal repeats”), LINEs (elementos nucleares móviles largos y dispersos, “long interspersed nuclear elements”), y SINEs (elementos nucleares móviles cortos y dispersos, “short interspersed nuclear elements”). La importancia de los retrotransposones es que algunos de ellos pueden ser móviles y estar activos, pudiendo desplazarse de un sitio a otro del genoma, más o menos aleatoriamente. Cuando se insertan en regiones codificantes del mismo, pueden causar mutaciones e incrementar la variabilidad genética, participando así en la evolución y funcionando como la principal fuente de polimorfismo vigente en la naturaleza. Actualmente se ha visto que una parte de estos elementos retrotransponibles (REs) participan en la regulación de genes del embrión durante el periodo preimplantacional (Peaston *et al.*, 2004). A pesar de la gran variedad de REs LTR existentes, sólo el ERV (retrovirus endógeno específico de vertebrados) parece permanecer activo en el genoma de mamíferos. Estos ERV consisten en repeticiones terminales largas (LTRs) en sentido 5'-3', que contienen secuencias reguladoras y regiones codificantes internas. La presencia de cubiertas de glicoproteínas distinguen a estos ERVs de otros retrotransposones en cuanto a su homología estructural con el retrovirus (Taruscio and Mantovani 2004). Se caracterizan por flanquear repeticiones terminales largas (LTRs) que regulan la transcripción de genes virales internos. Actualmente se clasifican en tres grupos distintos (I-III). Entre los ERVs pertenecientes al grupo II, se encuentran los IAPs (intracisternal-A particles), uno de los más abundantes y activos de su clase. A pesar de que el papel que desempeñan los retrotransposones en el genoma no se conoce con exactitud, se ha visto que algunos de los retrotransposones son transcritos durante el inicio de la embriogénesis en ratones (Peaston *et al.*, 2004), así como

en líneas de células troncales (Maksakova and Mager 2005). En concreto se ha descrito que la expresión del retrotransposón IAP se correlaciona con la disminución de la metilación del ADN, que comienza durante el estadio embrionario de ocho blastómeras y que la represión en la expresión de estos elementos IAPs coincide con la metilación del ADN que se da en los procesos siguientes a la formación del blastocisto (Santos *et al.*, 2002).

Debido a que las células troncales embrionarias se aíslan a partir de un embrión en estadio de blastocisto, cabe pensar que la expresión de ciertos retrotransposones pueda jugar un papel importante en la preservación de la integridad genómica y de la pluripotencia de las células troncales derivadas de él. En la especie humana ya se ha demostrado la influencia de estos elementos retrotransponibles en los procesos de diferenciación celular (Muotri *et al.*, 2005). En algunos aspectos, los IAPs se asemejan a los genes de impronta, puesto que ambos presentan una gran resistencia a la reprogramación epigenética existe durante la preimplantación (Lane *et al.*, 2003). Se piensa que esta resistencia a la desmetilación podría ser beneficiosa para la mayoría de los organismos como mecanismo de protección frente a los daños que la propia naturaleza del retrotransposón pueda causar al saltar dentro del genoma, produciendo mutaciones en los genes entre los que se intercala (Lane *et al.*, 2003). Por otro lado, se sabe que el recién descubierto retrotransposón de la clase III ERV se encuentra activo en el genoma del ratón. Como consecuencia de las inserciones de ERV en el genoma pueden aparecer fenotipos inesperados (Benit *et al.*, 1999; Costas 2003) debido a la conservación de su secuencia y de los marcos abiertos de lectura. Se ha descrito que MuERV-L es uno de los primeros genes que se transcriben en embriones murinos en estadio de una blastómera (Kigami *et al.*, 2003) y que está altamente transcrito en embriones en estadio de dos blastómeras, pero poco en el estadio de blastocisto (Peaston *et al.*, 2004). Cabe destacar los descubrimientos que demuestran la expresión de RNA tanto de IAP como MuERV-L en sentido positivo (5'-3') y negativo (3'-5') en el estadio de blastocisto. En este mismo estadio se ha observado un mecanismo post-transcripcional mediante un ARN interferente que contiene la expresión de estos elementos retrotransponibles (Svoboda *et al.*, 2004). Todo esto sugiere la participación de estos dos elementos transponibles en distintos momentos del desarrollo embrionario, que parece ser importante para que dicho desarrollo se lleve a cabo con normalidad.

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, resulta imprescindible analizar los patrones de expresión de estros retrotransposones en células troncales, los cuales varían al cultivar las células durante un elevado número de pases, sucediendo cambios genéticos y epigenéticos que pueden alterar la pluripotencia del cultivo. Así, el segundo objetivo de la presente tesis es analizar el estado tanto genético como epigenético de células troncales embrionarias mantenidas en cultivo durante largos periodos de tiempo, prestando especial atención a los patrones de expresión de los mencionados retrotransposones IAP y MuER-L.

### **3.4. Aplicaciones de las células troncales.**

Actualmente existe un gran interés en mejorar las condiciones del cultivo *in vitro* de las células troncales, especialmente en lo referente a su estabilidad genética y epigenética, para su posible aplicación en medicina regenerativa. A primera vista las células troncales se presentan como una excelente fuente de células para su empleo en trasplantes, con el objetivo de reemplazar las células dañadas por enfermedad o lesión, o incluso reemplazar células con deficiencias genéticas u hormonales. En la actualidad se están consiguiendo grandes avances para el tratamiento de enfermedades como la esclerosis múltiple, daños en la espina dorsal, las enfermedades de Parkinson o de Alzheimer, así como para el tratamiento de la diabetes tipo I y tipo II, generando células  $\beta$  de islotes pancreáticos capaces de producir insulina y regular así los niveles de glucosa en sangre. Hoy en día se está evaluando la posibilidad de emplear células troncales adultas en lugar de células troncales embrionarias, y más recientemente, el uso de iPS (“induced pluripotent stem”), células pluripotentes obtenidas a partir de células no embrionarias reprogramadas genéticamente (Takahashi *et al.*, 2007; Takahashi and Yamanaka 2006; Yu *et al.*, 2007).

#### **3.4.1. Problemas asociados a la incompleta diferenciación de las células troncales para su uso en medicina regenerativa**

Para el empleo de células troncales embrionarias en medicina regenerativa, se necesita en primer lugar generar una diferenciación celular dirigida *in vitro*. Esto exige un conocimiento profundo de los procesos de diferenciación celular del tejido de interés, así

como de los procesos de desarrollo y proliferación celular tras el trasplante. Las principales limitaciones con las que cuentan las terapias celulares hoy en día son: 1) determinar los elementos clave que controlan la diferenciación celular; 2) un inadecuado conocimiento de los mecanismos genéticos que controlan el destino de las células; y 3) la variedad de formas en las que los factores externos influyen en la expresión de genes de las células troncales. (Tanaka 2009) Por otro lado, hay que tener en cuenta la posible heterogeneidad de las células que están en cultivo y que se aplicarán en el paciente. Muchas de las preparaciones de células troncales adultas que se han desarrollado en el laboratorio están formadas por múltiples tipos celulares que no están completamente caracterizados. Diferentes trabajos, como el realizado por Reubinoff y colaboradores, demuestran la formación de teratomas al trasplantar células troncales embrionarias humanas en un ratón inmunológicamente comprometido (Reubinoff *et al.*, 2000). Cada trasplante de células troncales diferenciadas, presenta el riesgo de contener células que permanezcan indiferenciadas y gracias a sus propiedades de división ilimitada y de autorregeneración que caracterizan a las células troncales, pueden generar tumores (Roy *et al.*, 2006).

### **3.4.2. Diferenciación de células troncales embrionarias**

Muchos son los estudios llevados a cabo en el área de la diferenciación de las células troncales. Se sabe que el principal mecanismo por el que una célula troncal pasa a estado de diferenciación *in vitro*, es mediante la formación de un cuerpo embriode “EB” (Fig. 1). En el modelo de ratón, estas estructuras se obtienen al cultivar las células troncales murinas en ausencia de la citoquina denominada LIF (factor inhibidor de leucemia), que es el factor que mantiene a las células troncales de ratón en estado de no diferenciación en el sistema *in vitro*. Los cuerpos embrioides (EB) se definen como la última población celular no diferenciada que tiene potencial para dar lugar a todos los tipos celulares. Los diferentes trabajos llevados a cabo con EB han evidenciado una composición celular heterogénea dentro de los mismos. Un ejemplo de esto lo constituye el trabajo presentado por Hilario y colaboradores, donde describen hasta cuatro poblaciones celulares estables distintas en un cultivo en monocapa derivado de EB procedentes de teratocarcinomas (Hilario *et al.*, 2001). Una de las causas de esta heterogeneidad celular es la estructura tridimensional del

EB, la cual favorece la captación de los factores de crecimiento presentes en el medio de cultivo por las células que se localizan en la parte externa del EB, pero no por las células que forman su núcleo. Estas células del interior del EB se diferencian en las tres capas germinales. Estudios como el presentado por O'Shea respalda la interacción química entre células al describir cómo las células que dan lugar al mesodermo y que producen LIF, contribuyendo a la no diferenciación de las células del interior del EB (O'Shea 2004). Esta "no diferenciación" es la que puede suponer un riesgo de formación de un tumor en medicina regenerativa, al emplear células aparentemente diferenciadas.

Con el fin de analizar el proceso de diferenciación de las células troncales embrionarias y el riesgo que supone su empleo en medicina regenerativa, se plantea el tercer objetivo de la presente tesis: analizar el proceso de diferenciación de células troncales embrionarias murinas mediante su cultivo, formación de cuerpos embrioides y diferenciación final, analizando la heterogeneidad de esta población diferenciada, y su capacidad para recuperar su pluripotencia.

**OBJETIVOS**



#### 4. OBJETIVOS

La presente tesis pretende analizar distintos aspectos relacionados con la pluripotencia de las células troncales murinas, en particular aquellos aspectos relacionados con los procesos de aislamiento, regulación y reprogramación. Para abordar este estudio se ha diseñado un modelo transgénico murino en el que se utiliza como marcador de célula indiferenciada, la actividad del promotor de la transcriptasa inversa de la enzima telomerasa asociado con la proteína de fluorescencia verde (GFP). Este objetivo general se puede dividir en los siguientes objetivos concretos:

##### **Objetivo 1: Estudio del promotor de *Tert* murino**

El primer objetivo planteado asienta las bases para poder llevar a cabo el resto de objetivos. En él se pretende estudiar el promotor de *Tert* murino, que se utilizará como modelo para lograr los objetivos generales del estudio de las células troncales. En concreto se proyecta:

- Determinar la región del promotor de *mTert* que regula la actividad telomerasa durante los procesos de diferenciación de células troncales embrionarias murinas en un modelo *in vitro* e *in vivo*.
- Analizar la regulación del promotor de *mTert* durante dicho proceso de diferenciación de células troncales embrionarias *in vitro*.
- Estudiar la regulación del promotor de *mTert* en un sistema *in vivo*, produciendo ratones transgénicos con la construcción *mTert-EGFP*.
- Producir un sistema que identifique nuevas líneas de células troncales embrionarias, fetales, de recién nacido y de tejidos adultos.

En respuesta a estos objetivos planteados se presenta el primer artículo de la tesis que lleva por título “The proximal promoter region of *mTert* is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals” (La región proximal del promotor de *mTert* es suficiente para regular la actividad telomerasa en células troncales y en animales transgénicos) (Pericuesta *et al.*, 2006).

**Objetivo 2: Validar el modelo transgénico *mTert-EGFP* analizando la presencia y el comportamiento de las células *mTert-EGFP* positivas presentes en el músculo tibial anterior**

Una de las características esenciales de las células troncales que les permite escapar de la senescencia, es su alta expresión de telomerasa (Thomson *et al.*, 1998). En base a los resultados obtenidos en el primer trabajo presentado en la tesis, se plantea el segundo objetivo que consiste en validar el modelo de ratón transgénico derivado de las construcciones *mTert-EGFP* como herramienta para localizar y analizar el comportamiento de las células troncales persistentes en tejidos adultos. Debido al diseño de la construcción, la expresión de telomerasa en las células de estos modelos transgénicos se hace visible por la expresión de la proteína de fluorescencia verde (GFP) a la que está asociada. Puesto que la expresión de gen *mTert* es el paso regulador de la actividad del complejo telomerasa, esperamos que nuestro modelo, utilizando el promotor *mTert*, nos permita identificar las células que expresan telomerasa y de esta forma obtener un biomarcador de las células pluripotentes presentes en tejidos adultos. La hipótesis de trabajo planteada para este segundo objetivo, propone que, debido a la elevada actividad telomerasa descrita en células troncales, el modelo transgénico *mTert-EGFP* es apropiado para marcar células con elevada capacidad de división, candidatas a ser células troncales en un tejido adulto. Por otro lado, debido a la elevada capacidad de regeneración descrita en el músculo liso, se ha seleccionado dicho tejido con el fin de identificar y estudiar las células troncales localizadas en el mismo. En concreto el objetivo planteado pretende analizar la presencia y el comportamiento de las células GFP positivas, presentes en el músculo tibial anterior de los ratones transgénicos de telomerasa en distinto grado de desarrollo, y durante el proceso de autoregeneración después del daño celular producido tras el tratamiento con cardiotoxina.

**Objetivo 3: Análisis genético y epigenético de la estabilidad en cultivo de las células troncales embrionarias**

Debido a la inestabilidad celular observada en cultivos *in vitro* de larga duración, se plantea el tercer objetivo dirigido a examinar las características genéticas y epigenéticas que presentan las células troncales embrionarias mantenidas en cultivo durante largos

periodos de tiempo. La estabilidad epigenética es clave para el mantenimiento de las características de las células troncales, pero resulta muy complejo analizar todos los procesos epigenéticos presentes en dichas células. Debido a la posible participación de elementos retrotransponibles en el mantenimiento o pérdida de la pluripotencia celular, hemos considerado estos elementos como posibles marcadores de la estabilidad epigenética de las células troncales. Por ello, para cumplir el objetivo planteado, hemos analizado los patrones de expresión de los retrotransposones IAP y MuERV-L en células troncales murinas durante procesos de pérdida de pluripotencia producidos por largos periodos de cultivo *in vitro*.

El trabajo titulado “Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells” (La regulación transcripcional y postranscripcional de los retrotransposones IAP y MuERV-L afecta a la pluripotencia de las células troncales murinas) (Ramirez *et al.*, 2006) recoge los experimentos realizados para abordar esta temática.

### **Objetivo 4: Análisis del riesgo potencial del uso de células troncales en medicina regenerativa**

Con el fin de analizar el proceso de diferenciación de las células troncales embrionarias y de examinar el riesgo potencial que presenta el uso de células troncales en medicina regenerativa, se plantea analizar el proceso de diferenciación *in vitro* de las células troncales embrionarias murinas mediante el cultivo de una monocapa de células troncales diferenciadas. En concreto se pretende identificar las células que se mantienen pluripotentes dentro de la monocapa de células aparentemente diferenciadas, y analizar sus características y capacidad para recuperar la pluripotencia propia de las células troncales. Este planteamiento pretende imitar el proceso que ocurre *in vivo* cuando se insertan células troncales o injertos en una aplicación médica.

Para abordar este último objetivo, se diseñó el trabajo de la tesis que lleva como título “Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies” (Presencia inadvertida de células pluripotentes en monocapas derivadas de cuerpos embrioides diferenciados) (Ramirez *et al.*, 2007).



**LA REGIÓN PROXIMAL DEL PROMOTOR *mTert* ES SUFICIENTE PARA  
REGULAR LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN CÉLULAS TRONCALES  
EMBRIONARIAS Y ANIMALES TRANSGÉNICOS**



## **5. LA REGIÓN PROXIMAL DEL PROMOTOR *mTert* ES SUFICIENTE PARA REGULAR LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS Y EN ANIMALES TRANSGÉNICOS**

**THE PROXIMAL PROMOTER REGION OF *mTert* IS SUFFICIENT TO REGULATE TELOMERASE ACTIVITY IN ES CELLS AND TRANSGENIC ANIMALS. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* (2006) 4: 5**

### RESUMEN

Se ha definido a la célula troncal embrionaria como aquella célula procedente de la masa celular interna de un blastocisto con capacidad de autorregeneración, de división ilimitada, y con capacidad de diferenciación en casi cualquier tipo celular. De manera general, en las células eucariotas se produce un acortamiento de los telómeros en cada división mitótica, que compromete la integridad de los cromosomas. Este fenómeno puede dar lugar a alteraciones y aberraciones cromosómicas tras un número limitado de divisiones. Actualmente se conoce un mecanismo mediante el cual las células troncales parecen estar protegidas de este fenómeno. Se trata de la acción del complejo enzimático de la telomerasa que viene controlado por la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT). Este mecanismo mantiene la secuencia telomérica del final de los cromosomas de las células eucariotas. Numerosos trabajos apoyan que la actividad enzimática de la telomerasa es muy alta en células troncales multipotentes no diferenciadas, pero que disminuye durante los procesos de diferenciación siendo inexistente en las células somáticas de los tejidos adultos. Se ha visto que esta ausencia de actividad es en parte la responsable del acortamiento de los telómeros en las células somáticas. Con el interés de estudiar los elementos reguladores del promotor del gen *Tert* murino (*mTert*) que controlan la actividad telomerasa de las células en el ratón, se ha utilizado un modelo transgénico *in vivo* y un cultivo en diferenciación *in vitro* donde se han probado tres construcciones del promotor *mTert* de diferente tamaño, diseñadas en nuestro laboratorio. Las construcciones que fueron denominadas 1k, 2k y 5k, por contener la primera kilobase (kb), las 2 primeras kb, o las 5 primeras kb del promotor, se unieron a la secuencia codificante de la proteína de

fluorescencia verde (EGFP), con el fin de analizar la actividad transcripcional del promotor de *Tert* midiendo la fluorescencia emitida por las células que expresaban dicho promotor. La hipótesis de trabajo planteada se basó en que las distintas construcciones contenían distintos elementos reguladores cuya ausencia o presencia nos indicaría su implicación en la regulación de la expresión de *Tert*. Las tres secuencias del promotor *Tert* unidas a la secuencia EGFP, fueron electroporadas en las células troncales embrionarias R1 (Nagy *et al.*, 1993) y MAR (obtenidas en nuestro laboratorio). Las células transformadas fueron capaces de imitar la expresión esperada del promotor *mTert* asociada a la fluorescencia verde, siendo mayor la producida por los promotores 1k y 5k en las células troncales. A continuación se analizó la expresión de los tres promotores durante el proceso de diferenciación *in vitro* de las células troncales murinas. Dicha diferenciación comprende la formación de cuerpos embrioides y la diferenciación final hacia distintos tipos celulares. Durante este proceso, se observó cómo la expresión de *mTert-EGFP* fue disminuyendo gradualmente como consecuencia de la diferenciación celular. El experimento planteado no reveló diferencias entre las tres construcciones analizadas durante el proceso de diferenciación. A continuación se produjeron ratones transgénicos con las tres construcciones: 8 líneas de ratones transgénicos que contenían la construcción *1k-mTert-EGFP*, 3 líneas que contenían la construcción *2k-mTert-EGFP* y 5 que contenían la construcción *5k-mTert-EGFP*. Se analizó la expresión de *mTert-EGFP* en estas líneas mediante la técnica de PCR y mediante el análisis de la expresión de fluorescencia. Se pudo comprobar que a pesar de que la expresión del RNA mensajero de las tres construcciones era menor que la mostrada por el promotor endógeno *mTert*, el modelo descrito era capaz de imitar su patrón de transcripción. Las tres construcciones analizadas produjeron la expresión de EGFP en el estadio de blastocisto, en células troncales embrionarias obtenidas de ellos, así como en el anillo germinal de fetos de 13 días post coito (dpc). También mostraron expresión de EGFP colonias de células multipotentes (célula troncal de la línea germinal, y colonias tipo célula troncal) derivadas de testículos de animales neonatos y adultos, y neuroesferas generadas a partir de células del cerebro de fetos de 14 dpc.

A la vista de los resultados, se puede concluir que la primera kb del promotor *mTert* contiene los elementos reguladores necesarios para controlar la expresión de telomerasa en

La región proximal del promotor mTert es suficiente para regular la actividad telomerasa en células troncales embrionarias y en animales transgénicos

---

células troncales durante el proceso de diferenciación *in vitro*. Además, los modelos transgénicos generados con dicho promotor suponen un sistema apropiado para analizar la expresión del gen *Tert* murino en condiciones fisiológicas y durante el establecimiento de líneas celulares pluripotentes generadas a partir de un embrión o de tejidos adultos.



**ANÁLISIS DE LA AUTORREGENERACIÓN MEDIADA POR LAS CÉLULAS  
PLURIPOTENTES MURINAS PRESENTES EN EL MÚSCULO TIBIAL  
ANTERIOR UTILIZANDO EL MODELO TRANSGÉNICO MURINO *mTERT-E***



# **Análisis de la autoregeneración mediada por las células pluripotentes murinas presentes en el músculo tibial anterior utilizando el modelo transgénico murino *mTert-EGFP***

## RESUMEN

El músculo esquelético es un tejido que se caracteriza por la elevada capacidad de regeneración que presenta cuando se le produce un daño. Esta capacidad de regeneración es atribuida a las células satélites del músculo, aunque estudios recientes han demostrado la presencia de células troncales procedentes de la médula ósea y del propio músculo con capacidad miogénica que contribuyen a la formación y regeneración de las fibras dañadas. Recientemente hemos generado un modelo de ratón transgénico *mTert-EGFP*, que se caracteriza por contener el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa murina (*mTert*) asociado con la proteína de fluorescencia verde (*EGFP*), de tal manera que la actividad telomerasa de sus células viene revelada por la expresión de dicha proteína. Esta fluorescencia nos permite identificar *in vivo* células troncales y/o pluripotentes, ya que son las únicas células que en un individuo adulto expresan TERT. Utilizando técnicas inmunohistoquímicas hemos analizado en primer lugar la evolución de la presencia de las células GFP<sup>+</sup> en el tejido muscular a lo largo del desarrollo de un individuo. En segundo lugar hemos observado el proceso de regeneración llevado a cabo por las células GFP<sup>+</sup> en el músculo tibial anterior dañado con la cardiotoxina bupivacaína. En tercer lugar hemos estudiado la localización de las células troncales GFP<sup>+</sup> dentro del tejido muscular para caracterizar el tipo de células pluripotentes que representan estas células GFP<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos muestran que las células GFP<sup>+</sup> que se observan en el área de regeneración provienen en parte de la división de las propias células satélites localizadas en este área, y en parte de células con capacidad miogénica procedente de regiones próximas a la lesión. El análisis de la localización de las células GFP<sup>+</sup> permite identificar dos tipos de células dentro de las fibras musculares (que representarían a las células satélites) y un tercer tipo celular

localizado en la zona intersticial de las fibras musculares (que representarían a las células troncales musculares). El presente estudio demuestra el potencial del modelo transgénico *mTert-EGFP* para estudiar *in vivo* la biología de las células pluripotentes localizadas en el tejido muscular.

## INTRODUCCIÓN

La posibilidad de utilizar células troncales en medicina regenerativa ha adquirido un gran interés en las últimas décadas como herramienta para combatir enfermedades, hasta el momento incurables, como la enfermedad de Parkinson, la diabetes tipo I, enfermedades crónicas cardíacas, fallos hepáticos e incluso cáncer (Kirschstein, 2001). Las células troncales se pueden aislar a partir de distintas fuentes, como son tumores y teratocarcinomas, la masa celular interna de un embrión en estadio de blastocisto o algunos tejidos de un individuo adulto (Kirschstein, 2001). Además, desde el año 2006 existe una nueva estrategia para obtener células similares a las células troncales, que consiste en la reprogramación de células somáticas mediante la activación de genes específicos. Estas células pluripotentes resultantes reciben el nombre de iPS (Induced Pluripotent Stem Cell) y se desconoce la capacidad de diferenciación de dichas células (Takahashi and Yamanaka, 2006; Yamanaka, 2008; Yu, *et al.*, 2007). Debido a las consideraciones éticas que suscita el uso de embriones de la especie humana, la utilización de las células troncales a partir de tejidos adultos ha cobrado especial interés en las últimas décadas. La principal limitación para el uso de las células troncales adultas es el escaso número en el que se encuentran estas células pluripotentes dentro de los tejidos diferenciados. Así por ejemplo, en la médula ósea, 1 de cada 10000 ó 15000 células es célula troncal hematopoyética (Weissman, 2000). Por otro lado, se conoce muy poco de la biología de las células troncales adultas. Se sabe que uno de los factores clave que condiciona las características de las células troncales en el tejido adulto es el ambiente que las rodea. Este nicho biológico mantiene las condiciones apropiadas para que las células

troncales lleven a cabo las funciones de autorrenovación y de diferenciación celular (Theise, 2006).

En el caso del músculo esquelético, la influencia de este microambiente es manifiesta y condiciona la alta capacidad de regeneración que presenta este tejido, en parte regulada por las células troncales que permanecen remanentes en él (Saini and Stewart, 2006). En los intentos por conocer cómo influye el microambiente en las células pluripotentes de este tejido, se ha relacionado el envejecimiento del tejido muscular, con la pérdida de células troncales del mismo. El músculo esquelético de los vertebrados se forma a partir de células precursoras del mesodermo que se originan en las somitas. Durante el desarrollo embrionario, se produce una diferenciación de estas células precursoras hacia un linaje miogénico, dando lugar así a los mioblastos que tras llevar a cabo el ciclo celular, dan lugar a miocitos totalmente diferenciados. Los miocitos son células mononucleadas que se fusionan específicamente dando lugar a una estructura multinucleada, que tras un proceso de maduración adquiere la capacidad contráctil propia de las fibras musculares maduras (Charge and Rudnicki, 2004). Se ha descrito la existencia de una subpoblación de mioblastos que permanecen sin diferenciarse durante el desarrollo del músculo. Esta subpoblación celular permanece quiescente como una célula satélite, asociada a la superficie de las fibras musculares en desarrollo (Charge and Rudnicki, 2004). Finalmente, tras la madurez sexual, el músculo esquelético es un tejido estable constituido principalmente por fibras musculares postmitóticas multinucleadas (Schmalbruch and Lewis, 2000).

Varios trabajos han mostrado una disminución en el número de células troncales residentes en el músculo esquelético de roedores de avanzada edad comparado con animales adultos (Chakravarthy, 2000; Chakravarthy and MacKenzie, 2000; Lipton and Samuels, 1982). También se ha descrito que el potencial de proliferación de las células troncales del músculo disminuye a medida que aumenta la edad del individuo, comprometiéndose la recuperación muscular tras una lesión grave en individuos senescentes (Carlson, 2003; Sadeh, 1988). Por otro lado, estudios en los que se han trasplantado tejidos senescentes en tejidos jóvenes, muestran que las reservas de

células troncales procedentes de los primeros son suficientes para reparar el daño causado en el tejido muscular, siendo el ambiente en el que se injerta el tejido el condicionante del éxito o fracaso de la regeneración tisular (Carlson, 2003). Se ha propuesto que esta disminución en la capacidad de regeneración debida al envejecimiento del microambiente es debida a la pérdida de señales como *Notch*. Así, la exposición de células satélite procedentes de ratones viejos a suero procedente de ratones jóvenes, aumenta la activación del ligando *Notch (Delta)*, y el aumento de la activación de *Notch* potencia la proliferación celular *in vitro* (Conboy *et al.*, 2005). Por tanto, a pesar de que la respuesta proliferativa de las células troncales del músculo se ve disminuida con el envejecimiento, hay autores que concluyen que la capacidad regenerativa de estas células no disminuye en tejidos adultos (Grounds, 1998). Esta idea se complementa con el trabajo presentado por Dedkov (Dedkov *et al.*, 2003) que sugiere que la edad del tejido muscular no disminuye la capacidad de activación y regeneración de las células troncales musculares en respuesta a la denervación del músculo (Dedkov *et al.*, 2003). Diferentes autores proponen optimizar esta respuesta regenerativa usando las poblaciones óptimas de células troncales y mejorando el microambiente que las soporta (Ehrhardt and Morgan, 2005).

La elevada capacidad de regeneración del músculo liso (Barbier *et al.*, 2004; Carlson, 2003; Saini and Stewart, 2006; Usas and Huard, 2007) fue atribuida en un primer lugar al conjunto de células mononucleadas localizadas entre la membrana plasmática y la membrana basal de las fibras musculares. Estas células tienen capacidad de autorreplicación y de diferenciación y se denominan células satélite (Mauro, 1961). Se ha descrito que cada miofibra está estrechamente asociada con un número de células satélite que se encuentran quiescentes en condiciones normales, pero que se activan ante las señales producidas por un daño muscular. Así las células satélite del músculo dan lugar a células miogénicas precursoras, que al diferenciarse dan lugar a las miofibrillas que constituyen el músculo esquelético (Day *et al.*, 2007). Durante el desarrollo postnatal, las células satélite aportan núcleos extra a las fibras que se encuentran en desarrollo (Dedkov *et al.*, 2003). Actualmente se ha comprobado que existe una gran heterogeneidad de células troncales y células satélite

de diferente origen y grado de pluripotencia que se encuentran en diferente posición dentro del músculo (Zammit and Beauchamp, 2001). Así, se han descrito al menos dos poblaciones de células satélites que muestran distintas características de activación. Una población mayoritaria formada por células comprometidas para ser precursoras, con una capacidad de proliferación limitada y con una rápida respuesta para diferenciarse, y una segunda población minoritaria con una tasa de división lenta orientada a la autorrenovación y al mantenimiento de las anteriores.

Numerosos trabajos demuestran la presencia de actividad telomerasa en las células troncales, tanto embrionarias como adultas (Sarin *et al.*, 2005; Dan *et al.*, 2006; Hiyama *et al.*, 1996; Wright *et al.*, 2006). En individuos adultos, sólo las células troncales adultas y las células germinales tienen actividad telomerasa (Flores *et al.*, 2006), por esta razón en los tejidos adultos con intensa renovación como el endometrio, existe una alta actividad telomerasa. Se ha descrito que el músculo de un individuo recién nacido presenta una actividad telomerasa elevada, mientras que el de un adulto la actividad telomerasa es casi inexistente (Isabella Dell'Aica, 2002). El presente trabajo se planteó con el objetivo de analizar la población de células pluripotentes que se localizan en el músculo a lo largo del desarrollo de un individuo, y su comportamiento en un proceso de autorregeneración muscular. Para ello se utilizó el modelo de ratón transgénico *mTert-EGFP* generado en nuestro laboratorio, que contiene el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa murina (*mTert*) asociado con la proteína de fluorescencia verde (EGFP) (Pericuesta *et al.*, 2006).

## MATERIAL Y MÉTODOS

Para el estudio y la localización de las células pluripotentes que se hayan en el músculo tibial anterior, se utilizó el modelo de ratón transgénico *mTert-GFP*, que contiene el promotor de la transcriptasa reversa de la telomerasa murina (*mTert*) asociado con la proteína de fluorescencia verde (EGFP) (Pericuesta *et al.*, 2006). Para analizar la actividad telomerasa de las células que constituyen el músculo esquelético a lo largo del crecimiento de un individuo, se utilizaron técnicas inmunohistoquímicas en las que se empleó un anticuerpo primario de conejo anti-GFP (Gene Tex GTX20290, San Antonio, USA) revelado con streptovidina-peroxidasa (Molecular Probes, S-911, Cergy Pontoise Cedex, Francia).

### ***Preparación de los cortes del músculo tibial anterior***

Para la inducción del daño muscular y el análisis de la autoregeneración muscular se aplicó una inyección de entre 10 y 20  $\mu$ l (según edad del individuo) a una concentración de 10 $\mu$ M de cardiotoxina (Bupivacaína, Latoxan) en el músculo tibial anterior de los ratones transgénicos *mTert-EGFP*. Se utilizaron un total de 48 músculos tibiales anteriores, tanto normales como en estado de regeneración, procedentes de 24 ratones transgénicos *mTert-EGFP* de edades comprendidas entre los 5 días (recién nacido) y los 3 meses de vida (individuo adulto). Los músculos tibiales anteriores se aislaron de ratones sacrificados por dislocación cervical y se congelaron en isopentanol previamente enfriado en nieve carbónica, antes de su almacenamiento a -80°C. A continuación se prepararon secciones de 7 $\mu$ m en portas mediante criostato y se dejaron secar a temperatura ambiente antes de su almacenamiento final a -80°C.

Todos los protocolos experimentales utilizados con los animales de laboratorio fueron aprobados por el comité de Ética del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Agroalimentarias (INIA).

### ***Análisis de la expresión de GFP mediante inmunohistoquímica revelada con peroxidasa***

Las secciones del tejido muscular, una vez preparadas en los portas, se rehidrataron mediante dos incubaciones de 5 minutos en PBS. A continuación se incubaron durante 20 minutos en una solución de bloqueo y permeabilización PBST [PBS suplementado con 20% de suero de cabra (Jennings and Powell) y 0,5% de Tritón x-100], y el kit de bloqueo avidina/biotina (Avidin/Biotin blocking kit, VECTOR, SP-2001) para eliminar las biotinas endógenas que pudieran estar presentes en el músculo. A continuación, el tejido se incubó con el anticuerpo primario de conejo anti-GFP (Gene Tex GTX20290) (1:500 en PBS suplementado con 0,1% Tritón x-100 y 5% de NGS) durante toda la noche a 4°C. Tras 3 lavados de 5 minutos con PBS, se incubó la muestra durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado de cabra (Vector, BA-1000) (1:300 en PBS suplementado con 2% de NGS). A continuación se lavó 3 veces durante 5 minutos con PBS y se añadió streptavidina-peroxidasa biotinilada (Vector, B-2004) a una dilución 1:200 en PBS. Se tiñeron los núcleos con hematoxilina de Harris. Se lavó con agua y se reveló con el kit de Vectastain ABC Kit Peroxidasa (Vector, PK-6100). Las muestras se observaron en un microscopio de campo claro.

### ***Análisis de la expresión de GFP mediante inmunohistoquímica revelada con Alexa 488***

Con el propósito de analizar simultáneamente la expresión de GFP por parte de las células localizadas en el músculo y de delimitar las fibras musculares para desvelar la localización de las células GFP+, se utilizó la técnica inmunohistológica revelada con fluorocromos. El protocolo de inmunohistoquímica empleado coincide con el descrito en el apartado anterior con las siguientes modificaciones: tras la incubación con el anticuerpo primario anti-GFP hecho en conejo, la expresión de GFP se reveló con el anticuerpo secundario de cabra Alexa 488 (Invitogen, A-11008) [1:200 en PBS suplementado con 2% de suero fetal bovino (FBS)]. Los núcleos se tiñeron durante 30 segundos con Hoechst 33342 (Sigma, Ref. 14533) a una dilución 1/500.

### ***Análisis de la localización de las células GFP<sup>+</sup> en el tejido del músculo liso***

Con el fin de analizar la localización de las células GFP<sup>+</sup> con respecto a las fibras musculares, se tiñeron las membranas de las fibras con colagenasa tipo IV junto con las células GFP<sup>+</sup> en ratones de 6 y 13 días de edad, siguiendo el protocolo anteriormente detallado. Para ello se utilizó el anticuerpo de cabra anti-collageno tipo IV (Chemicon AB769) (1:100 en PBS suplementado con 0,1% Tritón x-100 y 5% de FCS), revelado con el anticuerpo secundario de burro anti-cabra Cy3 (rojo) (1:100 en PBS suplementado con 2% FCS). La señal fue visualizada con microscopio de fluorescencia y microscopio confocal (Confocal Zeiss LSM-510 NLO-META, objetivo 63x NA1.4) con aceite de inmersión. Excitación para FITC (verde) producida con LASER 488 Argón nm, recogido con un filtro de emisión entre 500-550 nm. Excitación para Cy3 (rojo) producida con LASER de 543nm, recogida con un filtro de emisión de entre 560-630nm. Excitación de los núcleos teñidos con Hoechst (azul) producida por una excitación bi-fotón realizada con el LASER Chameleon titanium-sapphire de Coherent a 760nm, recogidos por un filtro de emisión de entre 435-485 nm).

### ***Análisis estadístico***

Los datos de recuento celular se analizaron con el programa SigmaStat 3.1, utilizando el test de análisis de varianza de una vía. Para la comparación múltiple se utilizaron los test de Fisher y de Mann-Whitney Rank Sum. Los datos que no cumplían la asunción de igualdad de varianza entre grupos fueron normalizados utilizando la transformación log<sub>10</sub>. Las diferencias fueron consideradas significativas a niveles iguales o inferiores de 0,05. La intensidad de la señal fue cuantificada con el programa AxioVision LE Documentation (IMAS Imaging Associates, UK) siguiendo una escala del 1 al 3 en la que intensidad 1 era la más fuerte y 3 la más clara. El recuento celular se llevó a cabo sobre imágenes de tejido obtenidas todas ellas con el mismo microscopio de campo claro (Leitz Aristoplan y cámara Photometrics CoolSNAP; software de adquisición Coolsnap) con magnificación 20x. Se utilizó el programa AxioVision LE Documentation para seleccionar un área similar de 300

píxeles en todas ellas. Los datos obtenidos lo constituyen el número de células GFP<sup>+</sup> por área de selección.

## RESULTADOS

### ***Evolución de la presencia de células GFP<sup>+</sup> en el tejido muscular durante el crecimiento de un individuo.***

Utilizando el modelo de ratón *mTert-EGFP*, se analizó mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de células GFP positivas en cortes del músculo tibial anterior de ratones de edades comprendidas entre 5 días hasta 3 meses (adulto). Dichos análisis, revelaron un mayor número de células GFP positivas en edades tempranas del individuo, coincidiendo con una mayor intensidad de la señal en este estadio (Fig. 1). Los resultados de las pruebas inmunológicas muestran cómo a medida que el individuo va creciendo, la presencia e intensidad de las células GFP positivas va disminuyendo (Fig. 1). La población de las células GFP<sup>+</sup> se mantiene en número hasta los 13 días de edad aproximadamente (Fig. 1B-D). A partir del día 14 se observa una reducción tanto en el número como en los niveles de expresión de telomerasa, siendo esta reducción aún más acusada tras el día 15 después del nacimiento (Fig. 1E-F). Con un mes de edad, el número e intensidad de la señal de GFP observada mediante inmunohistoquímica es muy baja (Fig. 1H). Tres meses después del nacimiento (edad adulta), el número de células GFP<sup>+</sup> se ve drásticamente disminuido (Fig. 1I). La Fig. 2 muestra las diferencias que hay en el número de células pluripotentes en las distintas edades del individuo. En todas las edades analizadas, la distribución de dichas células fue homogénea a lo largo de todo el músculo mostrando una mayor intensidad y presencia en torno a los vasos sanguíneos que atraviesan el músculo (Fig. 3).

### ***Evolución de la presencia de células GFP<sup>+</sup> en el tejido muscular durante la regeneración tras la aplicación de un daño tisular***

Siguiendo el procedimiento anteriormente detallado, se analizó la presencia de células GFP<sup>+</sup> en el músculo tibial anterior de ratones de 5 días tras la aplicación de un daño muscular mediante una cardiotoxina. Se analizaron cortes del músculo a distintos tiempos, siendo estos 1, 2, 3, 4, 5 y 10 días tras el tratamiento con cardiotoxina. Como consecuencia de dicha aplicación, se observó una pérdida total o parcial de la estructura muscular (Fig. 4). En el día 1 tras la aplicación del veneno, se observó una región degenerada invadida por células mononucleares, algunas de ellas GFP<sup>+</sup> (Fig. 5-A, células marrones) y otras GFP<sup>-</sup> [Fig. 5-A, células azules (núcleos)]. Al tercer día tras la lesión, se observa que el área de regeneración se encuentra completamente invadida por células mononucleadas GFP positivas (Fig. 5B), no presentes en el área no dañada. Transcurridos 4 días desde la lesión se observa la formación de nuevas fibras musculares (Fig. 5C), destacando la presencia de células GFP positivas en el área de regeneración desde el día 1 hasta aproximadamente el día 4 tras la lesión (Fig. 5A-C). En días sucesivos, en los que el músculo ha regenerado las fibras dañadas, la distribución de las células GFP<sup>+</sup> pasa a ser homogénea dentro del mismo (Fig. 5D), al igual que lo es en un músculo sin dañar (Fig. 1). Diez días tras la aplicación del tratamiento, la imagen que se observa es la de un músculo normal (Fig. 5E). La Fig. 6 refleja la evolución del número e intensidad de las células GFP<sup>+</sup> en los días siguientes a la aplicación de la cardiotoxina. El primer día tras la aplicación de la cardiotoxina, las fibras musculares se encuentran desestructuradas y destruidas. El número de células pluripotentes es bajo y la intensidad de la señal elevada. En los días sucesivos, la cantidad de células pluripotentes en el área dañada aumenta, presentando una expresión de telomerasa elevada. La mayor cantidad de células pluripotentes se observan en el tercer día tras la lesión. En los días sucesivos, las fibras musculares van siendo reconstruidas y la cantidad de células pluripotentes disminuye, así como la cantidad de expresión de telomerasa.

La Figura 7 muestra la comparación entre el número de células pluripotentes que existe en un músculo normal sin dañar (Fig. 1) y el número de células que existe cuando se ha generado un daño muscular con una cardiotoxina (Fig. 6). El día 11 de

edad del individuo corresponde con el primer día tras el daño con la cardiotoxina, si bien el número de células GFP<sup>+</sup> observadas con y sin el tratamiento es similar, se observa un aumento en la intensidad de la señal en el músculo dañado. En los días consecutivos, se observa un aumento significativo en el número de células pluripotentes que se encuentran en el tejido dañado a partir del segundo día de la aplicación del daño, además de un aumento en la expresión de telomerasa con respecto a lo que ocurre en un músculo sin dañar. Las diferencias son significativas ( $p \leq 0.05$ ) desde el segundo día desde que se aplica la cardiotoxina hasta el décimo día tras la aplicación de la cardiotoxina), momento en el cual, el estado del músculo, dañado y sin dañar es similar.

#### ***Localización de las células GFP<sup>+</sup> con respecto a las fibras musculares en el músculo tibial anterior***

Con el objetivo de analizar y caracterizar en qué posición con respecto a las fibras musculares se localizan las células pluripotentes GFP<sup>+</sup>, se realizó una doble tinción: por un lado el anticuerpo anti-colagenasa tipo IV revelado con Cy3 (rojo) que permitió delimitar las fibras musculares y por otro lado, el anticuerpo anti-GFP revelado con Alexa 488 (verde) que marcó las células pluripotentes GFP<sup>+</sup>. Los resultados de esta doble tinción revelaron diferentes posiciones de las células pluripotentes. La Fig. 8A muestra la zona de regeneración que se crea tras la aplicación de cardiotoxina en el músculo. En ella se puede observar una acumulación de células GFP<sup>+</sup> en la zona de regeneración, y una ausencia de las mismas en la zona donde las fibras no están dañadas. Como se ha mencionado anteriormente, en este área de regeneración se observan un gran número de células mononucleadas GFP<sup>-</sup>. Si se observa la imagen en detalle (Fig. 8B), se puede apreciar la posición que ocupan las células GFP<sup>+</sup> con respecto al límite de la fibra. En un primer lugar se observan nuevos núcleos localizados en el centro de las fibras procedentes de células GFP<sup>+</sup>. En otra sección analizada (Fig. 8D y 8E), se pueden distinguir células GFP<sup>+</sup> localizadas en el espacio intersticial de las fibras.

## DISCUSIÓN

En la actualidad existe un gran interés en el estudio de células troncales adultas debido al elevado potencial que presentan para tratar enfermedades hasta hoy incurables (Kirschstein, 2001). El conocimiento acerca de estas células y de su entorno ha aumentado en los últimos años gracias a las nuevas técnicas en cultivos celulares (Anghileri *et al.*, 2008; Chojnacki and Weiss, 2008; Lu *et al.*, 2006), a los análisis de los genes relacionados con procesos de diferenciación o mantenimiento de pluripotencia (Cheng *et al.*, 2007) y a los logros obtenidos en la reprogramación de las células somáticas hacia estadios más pluripotentes (Nakagawa *et al.*, 2008; Yamanaka, 2008; Yu *et al.*, 2007). La mayoría de estos estudios se han realizado usando modelos *in vitro*, dejando en evidencia la necesidad de desarrollar modelos *in vivo* que permitan conocer lo que ocurre con las células troncales adultas en un individuo. El presente trabajo pretende validar el modelo de ratón transgénico *mTert-EGFP*, generado previamente en nuestro laboratorio (Pericuesta *et al.*, 2006), como modelo *in vivo* para el estudio de las células troncales musculares murinas. En dicho modelo, hemos asociado el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa murina (*mTert*) con el gen de la proteína de fluorescencia verde (*EGFP*), para poder identificar de este modo *in vivo* las células GFP<sup>+</sup> que están expresando telomerasa. Dado que en los individuos adultos, son las células troncales adultas las que presentan actividad telomerasa (Flores *et al.*, 2006), las células GFP<sup>+</sup> presentes en el ratón transgénico representarán en su mayor parte células troncales adultas.

Existe una subpoblación de mioblastos en el músculo esquelético que permanecen sin diferenciarse durante el desarrollo del músculo. Esta subpoblación celular permanece quiescente como una célula satélite, asociada a la superficie de las fibras musculares en desarrollo (Charge and Rudnicki, 2004). Por otro lado, se ha relacionado la elevada capacidad de división de las células troncales con un elevado nivel de expresión de la enzima telomerasa. Dicha enzima mantiene la longitud de los telómeros en las células eucarióticas protegiéndolas de procesos de degradación y fusión cromosómica (Flores *et al.*, 2006). Se ha descrito que en el músculo esquelético de un ratón recién nacido, la actividad telomerasa es elevada, mientras

que en los músculos de individuos adultos es casi inexistente (Isabella Dell'Aica, 2002). Los resultados presentados en la Fig. 1A y la Fig. 3, respaldan trabajos publicados con anterioridad (Schmalbruch and Hellhammer, 1977), que demuestran la presencia masiva de células satélite en áreas próximas a los capilares, lo cual probablemente es el reflejo de un ambiente mas enriquecido (Charge and Rudnicki, 2004). Los resultados revelados en la Fig. 1 coinciden con los ya publicados por Bischoff y colaboradores (Bischoff, 1994), que demuestran que las células satélites en el músculo de un ratón recién nacido constituyen el 30% de los núcleos localizados por debajo de la lámina de la fibra muscular mientras que en individuos de 2 meses de edad, la cantidad de células satélite se reduce a menos del 5%. Este fenómeno está determinado por los factores extrínsecos propios del tejido muscular y que afectan a la funcionalidad de las células pluripotentes. Durante el envejecimiento de un individuo, estos factores se ven alterados de manera reversible o irreversible, influyendo en las poblaciones de células satélite o en su progenie (Brack and Rando, 2007).

El proceso de regeneración en el músculo esquelético se realiza en dos fases: una primera fase de degeneración en la que se produce la necrosis de las fibras musculares dañadas y la activación de células mononucleadas, principalmente de tipo inflamatorio (células neutrófilas y macrófagos) y miogénico (activadas por los macrófagos) (Almekinders and Gilbert, 1986; Lescaudron *et al.*, 1999; Merly *et al.*, 1999); y una segunda fase de regeneración, donde se produce la proliferación de células miogénicas. Estas células miogénicas se fusionan entre sí o a las fibras musculares dañadas para dar lugar a fibras nuevas o bien para reparar las ya existentes (Snow, 1977, 1978). Las fibras en estado de regeneración se caracterizan por ser de menor tamaño y presentar mionúcleos en posición central, contrariamente a una fibra normal, donde los mionúcleos se localizan en el extremo de la fibra. Finalmente, cuando la fusión de los mionúcleos es completa, la nueva fibra muscular comienza a aumentar de tamaño. En condiciones normales, el músculo regenerado es morfológicamente y funcionalmente indistinguible de un músculo no dañado.

Las pruebas inmunohistológicas realizadas sobre el músculo tibial anterior de ratones *mTert-EGFP* tratados con cardiotoxina, representados en la Fig. 5A,

reproducen el proceso de regeneración del músculo y permiten el estudio de células con una elevada capacidad de proliferación (células GFP<sup>+</sup>). Si relacionamos estos resultados con lo descrito anteriormente sobre regeneración muscular, podemos deducir que las células GFP<sup>-</sup> son células de tipo inflamatorio como macrófagos, mientras que las células GFP<sup>+</sup> son células con elevada actividad telomerasa y alta capacidad de proliferación propia de las células satélite y miogénicas activadas. Los resultados revelados en la Fig. 5B y 5C hacen pensar que de algún modo las células GFP<sup>+</sup> que se observan en el área de regeneración, provienen en parte de la división de las propias células satélite con capacidad miogénica, y en parte de la migración de las regiones próximas a la lesión.

Si comparamos el número de células pluripotentes observado en un tejido muscular sin dañar (Fig. 2) y tras la aplicación de una cardiotoxina (Fig. 6), podemos observar diferencias significativas entre ellas (Fig. 7). La intensidad de la expresión de telomerasa, y el número de células GFP<sup>+</sup> es significativamente mayor tras la aplicación del daño muscular, una vez pasada la fase de destrucción del tejido. Estas diferencias se mantienen hasta que el proceso de regeneración finaliza, aproximadamente diez días después de la aplicación del daño.

En un principio se atribuía a la célula satélite la responsabilidad casi absoluta de la regeneración de las fibras musculares tras sufrir un daño (Brack and Rando, 2007). Pero evidencias recientes demuestran la posible contribución de células troncales adultas a este proceso de regeneración. En concreto, y gracias a estudios realizados tanto *in vivo* como *in vitro*, se sabe que células troncales derivadas de la médula ósea y células troncales derivadas del músculo, contribuyen a la formación de nuevas miofibras y a la repoblación de las células satélite tras un daño (Charge and Rudnicki, 2004). Estas células troncales del músculo, también conocidas como mSP, son reconocidas como una población distinta a las células satélite en cuanto a que no expresan los marcadores celulares propios de las células satélite (Asakura *et al.*, 2002). La elevada capacidad de las células mSP para dar lugar a colonias de células hematopoyéticas *in vitro*, y la competencia de estas células para dar lugar a células satélite en un nicho muscular, revelan la posibilidad de que las mSP sean las células precursoras de las células satélite (Asakura *et al.*, 2002; Gussoni *et al.*, 1999). Los

resultados observados gracias a la tinción de células GFP<sup>+</sup> tanto en un músculo dañado como sin dañar, muestran la elevada actividad telomerasa que presentan algunas células localizadas en el músculo. Cabe pensar, que las células que observamos como GFP<sup>+</sup> sean células satélites o células troncales del propio músculo. Estas dos poblaciones celulares se diferencian principalmente por la posición que ocupan con respecto a la miofibra. Las células satélite del músculo son poblaciones de células miogénicas mononucleares no diferenciadas localizadas en el músculo esquelético (Campion *et al.*, 1981; Gamble *et al.*, 1978; Mauro, 1961). Se pueden identificar mediante microscopio electrónico debido a localización distintiva en el interior de la lámina basal que rodea las miofibras individuales, yuxtapuesta entre la membrana plasmática de la fibra muscular y la base de la membrana. Poco es lo que se conoce acerca del nicho que ocupan las células troncales del músculo. En la actualidad se han descrito células troncales con propiedades miogénicas denominadas pericitos, localizadas en la periferia de los vasos sanguíneos (Dellavalle *et al.*, 2007).

Con la doble tinción realizada en los cortes de los músculos tibiales anteriores de los ratones *mTert-EGFP*, en la que las células GFP<sup>+</sup> se observan en verde, y los bordes de las fibras musculares en rojo, se estudió la posición que ocupan estas primeras con respecto a las segundas, con el objetivo de identificar distintas poblaciones con propiedades miogénicas y con una elevada capacidad de proliferación dentro del tejido muscular. Como se ha mencionado anteriormente, las células mononucleadas GFP<sup>-</sup> que muestra la Fig. 4 y 8A vendrían asociadas a los procesos de inflamación y fagocitosis propios de los primeros estadios de lesión muscular. En la Fig. 8B se puede apreciar la posición que ocupan las células GFP<sup>+</sup> con respecto al límite de la fibra. En un primer lugar se observan núcleos teñidos por el Hoechst y con señal GFP<sup>+</sup> localizados en el centro de las fibras. Según lo descrito anteriormente, estos núcleos pueden ser células satélites que se unen a las fibras musculares dañadas, o entre sí con el objetivo de regenerar el daño muscular. En un segundo lugar, se observan otras células GFP<sup>+</sup> localizadas en posición satélite por debajo de la lámina basal de la fibra. En otra sección analizada (Fig. 8D y 8E), se pueden distinguir células GFP<sup>+</sup> localizadas en el espacio intersticial de las fibras. Esta

posición, diferente a la ocupada por las células satélite, podría revelar el nicho que ocupan las células troncales del músculo.

## CONCLUSIONES

Utilizando el modelo transgénico *mTert-EGFP*, hemos determinado el comportamiento de las células pluripotentes durante el desarrollo posnatal. Hemos analizado el proceso de regeneración del músculo tibial anterior cuando se le aplica un daño, y hemos determinado la localización de las diferentes poblaciones pluripotentes dentro del tejido muscular. Las conclusiones a las que podemos llegar derivadas de estos estudios son: 1) a medida que se desarrolla un individuo, desde los primeros días de su nacimiento, hasta alcanzar el estado adulto, se produce una disminución de las células pluripotentes dentro del tejido muscular de dicho individuo; 2) el proceso de regeneración muscular se produce en dos fases, una primera en la que se eliminan las fibras dañadas, y una segunda donde las células pluripotentes del músculo participan en la regeneración y fabricación de las fibras musculares nuevas; durante esta fase de regeneración, se produce una acumulación de células pluripotentes en la zona dañada; 3) el tejido muscular alberga diferentes poblaciones de células pluripotentes, además de las células satélite que participan en los procesos de regeneración muscular; y 4) el modelo de ratón transgénico *mTert-EGFP* es una herramienta adecuada para estudiar las poblaciones pluripotentes que forman parte de los tejidos adultos de un individuo.

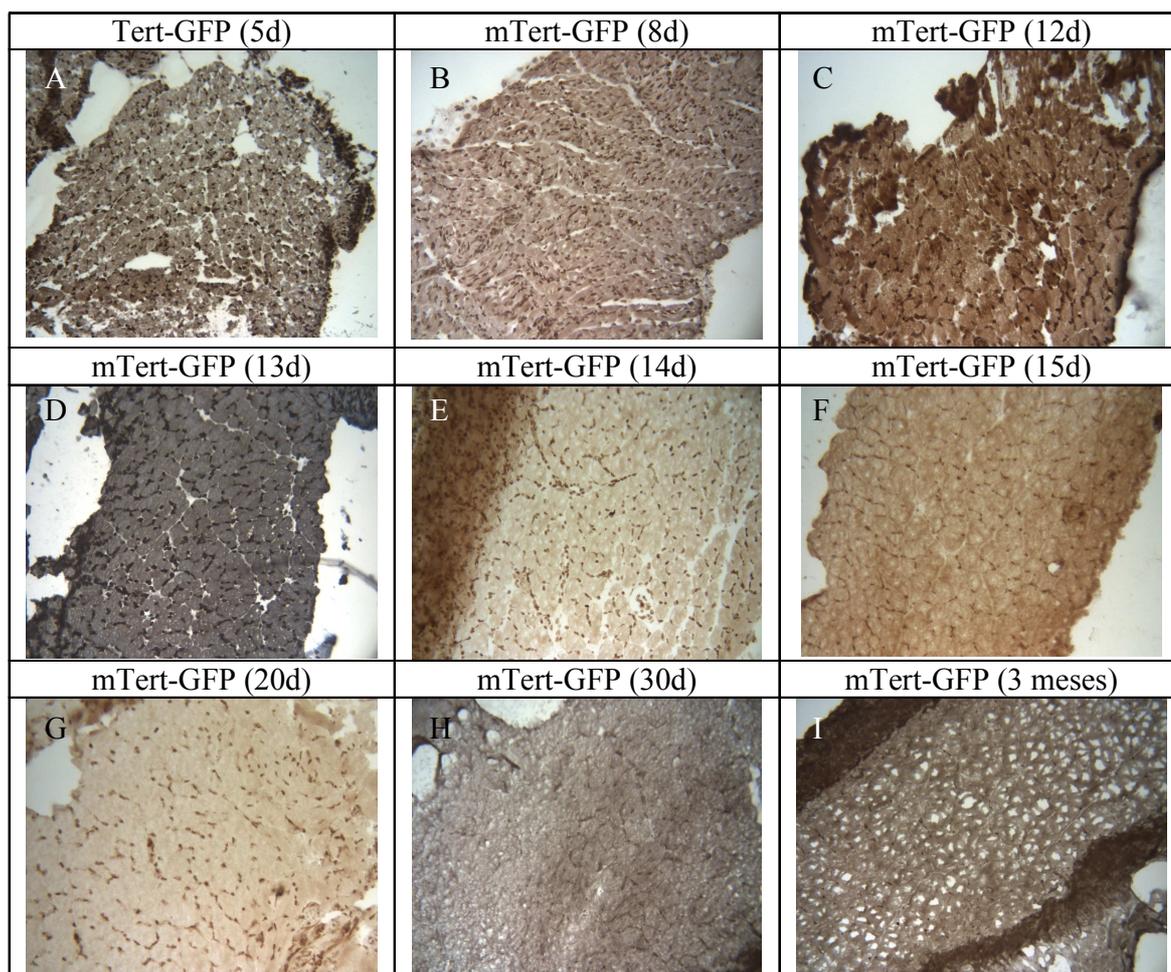
## BIBLIOGRAFÍA

- Almekinders LC, Gilbert JA. 1986. Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med* 14(4):303-308.
- Anghileri E, Marconi S, Pignatelli A, Cifelli P, Galie M, Sbarbati A, Krampera M, Belluzzi O, Bonetti B. 2008. Neuronal Differentiation Potential of Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Dev*.
- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159(1):123-134.
- Barbier J, Popoff MR, Molgo J. 2004. Degeneration and regeneration of murine skeletal neuromuscular junctions after intramuscular injection with a sublethal dose of *Clostridium sordellii* lethal toxin. *Infect Immun* 72(6):3120-3128.
- Bischoff R. 1994. The satellite cell and muscle regeneration: McGraw-Hill. pp 97-118.
- Brack AS, Rando TA. 2007. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev* 3(3):226-237.
- Campion DR, Richardson RL, Reagan JO, Kraeling RR. 1981. Changes in the satellite cell population during postnatal growth of pig skeletal muscle. *J Anim Sci* 52(5):1014-1018.
- Carlson BM. 2003. Muscle regeneration in amphibians and mammals: passing the torch. *Dev Dyn* 226(2):167-181.
- Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, Rando TA. 2005. Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433(7027):760-764.
- Chakravarthy U. 2000. Radiotherapy for choroidal neovascularisation of age-related macular degeneration: a fresh perspective. *Eye* 14 ( Pt 2):151-154.
- Chakravarthy U, MacKenzie G. 2000. External beam radiotherapy in exudative age-related macular degeneration: a pooled analysis of phase I data. *Br J Radiol* 73(867):305-313.
- Charge SB, Rudnicki MA. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1):209-238.
- Cheng X, Wang Y, He Q, Qiu M, Whittemore SR, Cao Q. 2007. Bone morphogenetic protein signaling and olig1/2 interact to regulate the differentiation and maturation of adult oligodendrocyte precursor cells. *Stem Cells* 25(12):3204-3214.
- Chojnacki A, Weiss S. 2008. Production of neurons, astrocytes and oligodendrocytes from mammalian CNS stem cells. *Nat Protoc* 3(6):935-940.
- Dan YY, Riehle KJ, Lazaro C, Teoh N, Haque J, Campbell JS, Fausto N. 2006. Isolation of multipotent progenitor cells from human fetal liver capable of differentiating into liver and mesenchymal lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(26):9912-9917.
- Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. 2007. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Dev Biol* 304(1):246-259.

- Dedkov EI, Borisov AB, Wernig A, Carlson BM. 2003. Aging of skeletal muscle does not affect the response of satellite cells to denervation. *J Histochem Cytochem* 51(7):853-863.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nat Cell Biol* 9(3):255-267.
- Ehrhardt J, Morgan J. 2005. Regenerative capacity of skeletal muscle. *Curr Opin Neurol* 18(5):548-553.
- Flores I, Benetti R, Blasco MA. 2006. Telomerase regulation and stem cell behaviour. *Curr Opin Cell Biol* 18(3):254-260.
- Gamble HJ, Fenton J, Allsopp G. 1978. Electron microscope observations on human fetal striated muscle. *J Anat* 126(Pt 3):567-589.
- Grounds MD. 1998. Age-associated changes in the response of skeletal muscle cells to exercise and regeneration. *Ann N Y Acad Sci* 854:78-91.
- Gussoni E, Soneoka Y, Strickland CD, Buzney EA, Khan MK, Flint AF, Kunkel LM, Mulligan RC. 1999. Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature* 401(6751):390-394.
- Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, Kuroi K, Yokoyama T, Gazdar AF, Hiyama K, Piatyszek MA, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 88(2):116-122.
- Isabella Dell'Aica B, Rossini K., Sandri M., Destro Ch. and Ugo Carraro. 2002. Telomerase Activity in Regenerated Normal Muscles: Effects of Repeated Injuries. *Basic and applied myology* 12((2)): 73-76.
- Jennings C, Powell D. 1995. Genome organisation in the murine sperm nucleus. *Zygote (Cambridge, England)* 3(2):123-131.
- Kirschstein. 2001. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Health NIo, editor: Terese Winslow.
- Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. 1999. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord* 9(2):72-80.
- Lipton SA, Samuels MA. 1982. Diagnosis of stroke by CPK isoenzymes. *Ann Neurol* 11(4):434-435.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. 2006. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica* 91(8):1017-1026.
- Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-495.
- Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22(6):724-732.
- Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. 2008. Generation of induced

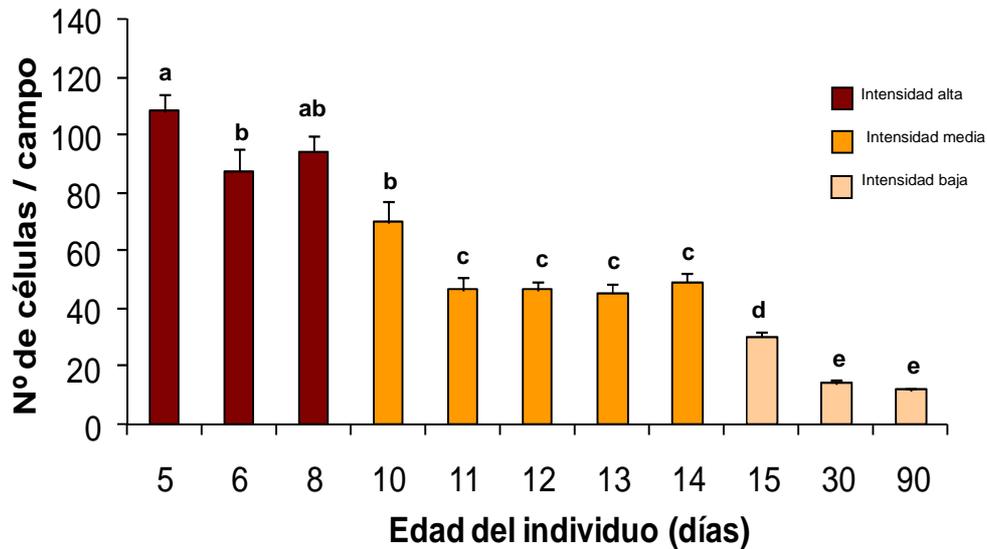
- pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* 26(1):101-106.
- Pericuesta E, Ramirez MA, Villa-Diaz A, Relano-Gines A, Torres JM, Nieto M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod Biol Endocrinol* 4:5.
- Sadeh M. 1988. Effects of aging on skeletal muscle regeneration. *J Neurol Sci* 87(1):67-74.
- Saini A, Stewart CE. 2006. Adult stem cells: the therapeutic potential of skeletal muscle. *Curr Stem Cell Res Ther* 1(2):157-171.
- Sarin KY, Cheung P, Gilison D, Lee E, Tennen RI, Wang E, Artandi MK, Oro AE, Artandi SE. 2005. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. *Nature* 436(7053):1048-1052.
- Schmalbruch H, Hellhammer U. 1977. The number of nuclei in adult rat muscles with special reference to satellite cells. *Anat Rec* 189(2):169-175.
- Schmalbruch H, Lewis DM. 2000. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve* 23(4):617-626.
- Snow MH. 1977. Myogenic cell formation in regenerating rat skeletal muscle injured by mincing. II. An autoradiographic study. *Anat Rec* 188(2):201-217.
- Snow MH. 1978. An autoradiographic study of satellite cell differentiation into regenerating myotubes following transplantation of muscles in young rats. *Cell Tissue Res* 186(3):535-540.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
- Theise ND. 2006. The stem cell niche and tissue biology. *Stem Cell Rev* 2(3):169-170.
- Usas A, Huard J. 2007. Muscle-derived stem cells for tissue engineering and regenerative therapy. *Biomaterials* 28(36):5401-5406.
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1):157-168.
- Wright LS, Prowse KR, Wallace K, Linskens MH, Svendsen CN. 2006. Human progenitor cells isolated from the developing cortex undergo decreased neurogenesis and eventual senescence following expansion in vitro. *Exp Cell Res* 312(11):2107-2120.
- Yamanaka S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell proliferation* 41 Suppl 1:51-56.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318(5858):1917-1920.
- Zammit P, Beauchamp J. 2001. The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation* 68(4-5):193-204.

Figs. y tablas.

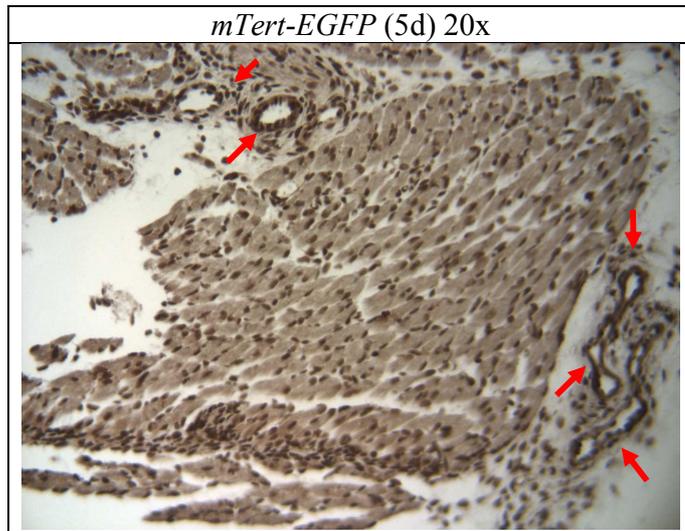


**Figura 1:** Imágenes de inmunohistoquímica mostrando la cinética de las células GFP positivas en el músculo tibial anterior del modelo transgénico *mTert-EGFP* durante el crecimiento del individuo desde 5 días hasta 3 meses. Inmunohistoquímica aviditina-biotina-peroxidasa, 20x.

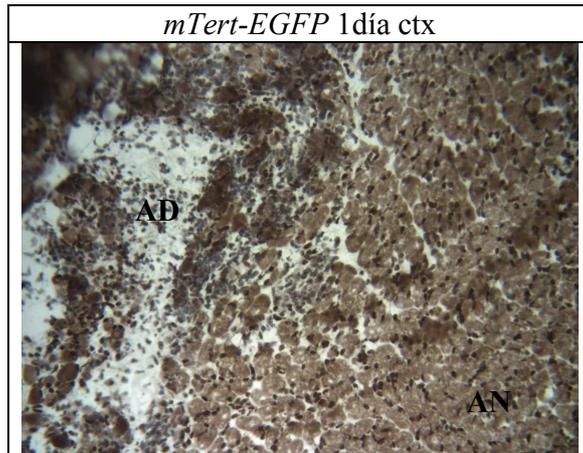
## Presencia de células GFP+ y desarrollo del individuo



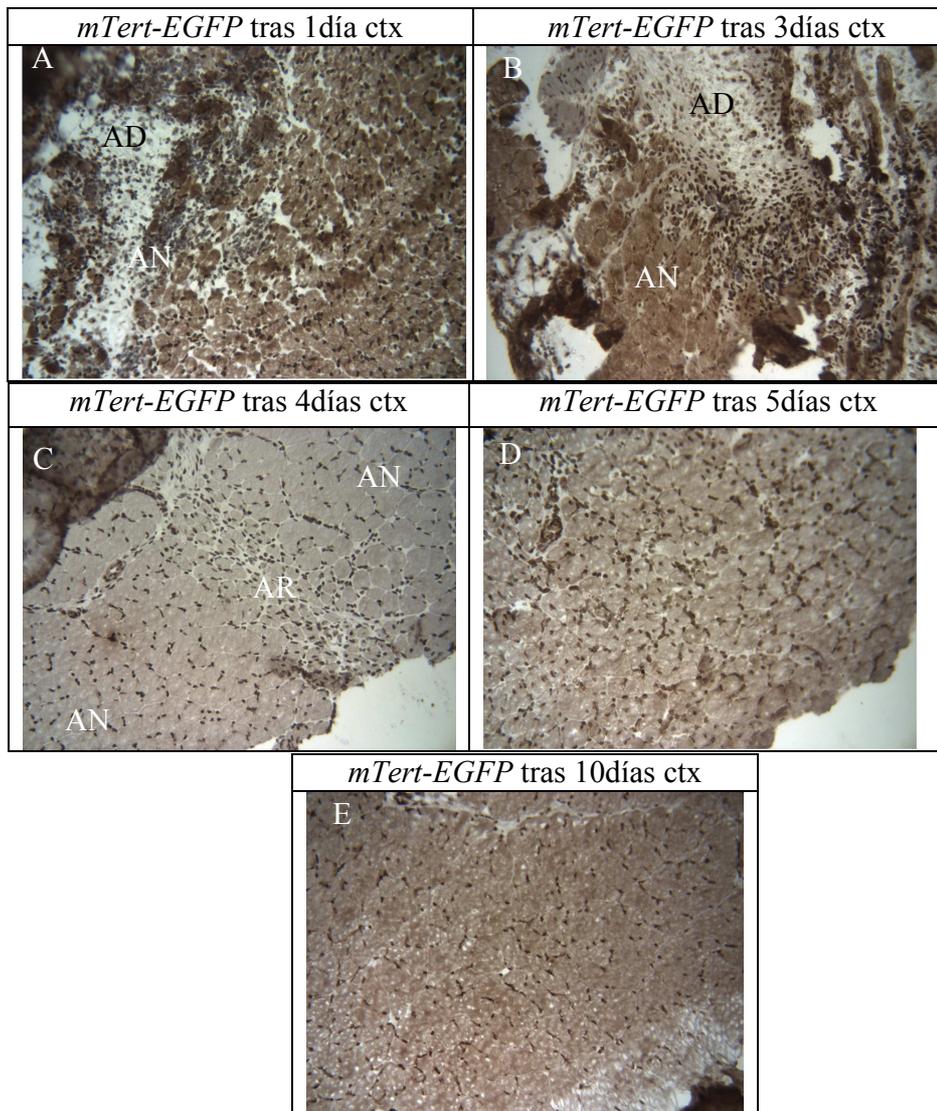
**Figura 2:** Pérdida de células pluripotentes (GFP positivas por la expresión de *mTert-EGFP*) en el músculo tibial anterior con la edad del individuo. A medida que el individuo crece, el número de células pluripotentes disminuye. Además la intensidad de GFP también disminuye, siendo máxima en los primeros días del individuo y mínima a partir del día 15 de su nacimiento. La intensidad de la señal se cuantificó analizando la intensidad de la tinción en el programa AxioVision LE Documentation, utilizando una escala de uno a tres donde 1 es intensidad alta de tinción, 2 intensidad media y 3 intensidad baja. Esta disminución en la intensidad de la señal se corresponde con una disminución en la expresión de telomerasa dentro de la célula. Las letras de la “a” a la “e” indican las diferencias significativas entre el número de células presente en el músculo tibial anterior en cada una de las edades analizadas.



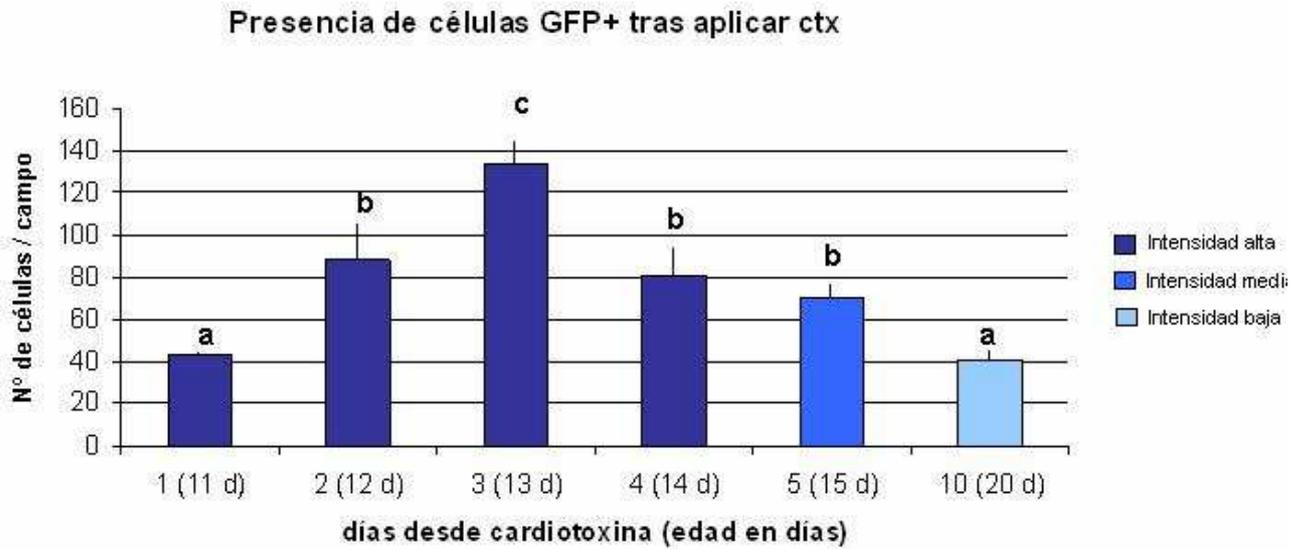
**Figura 3.** Inmunohistoquímica mostrando la distribución homogénea de las células GFP positivas en el músculo tibial anterior de ratones transgénicos *mTert-EGFP*. Flecha roja: Vasos sanguíneos. Se puede observar una mayor intensidad y presencia de células GFP positivas alrededor de los mismos. Inmunohistoquímica avidita-biotina-peroxidasa 20x.



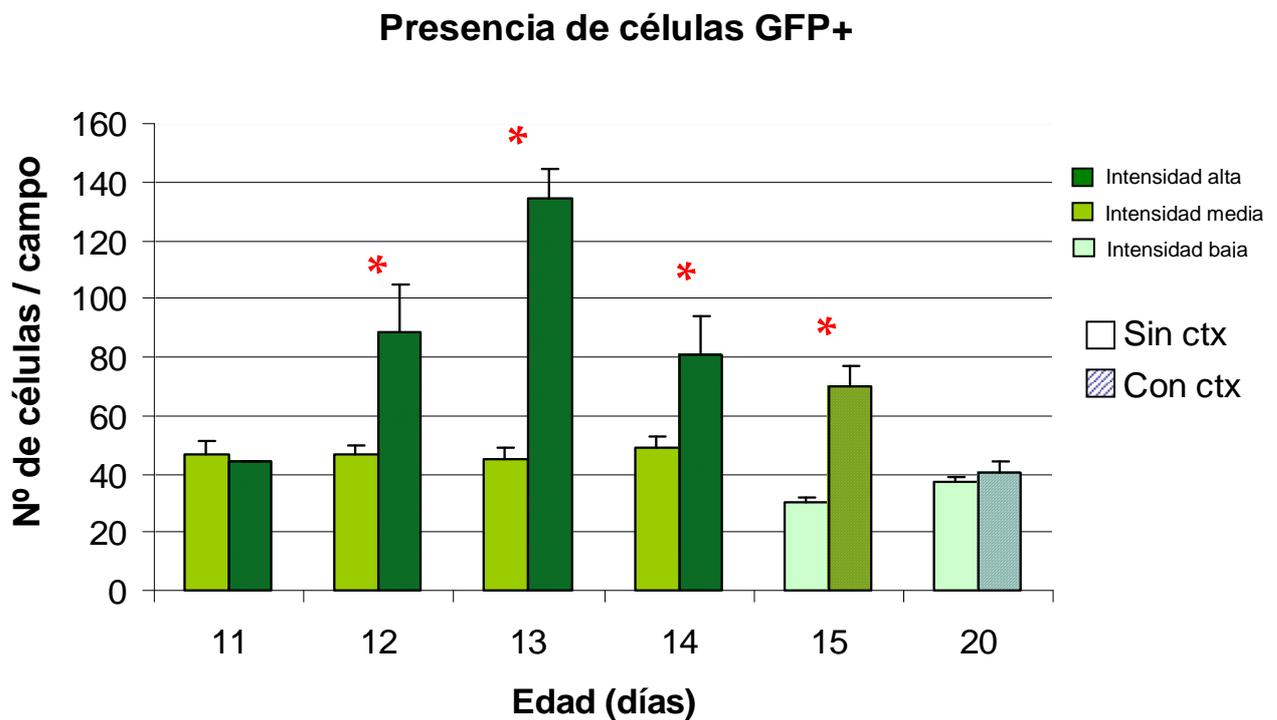
**Figura 4:** Aspecto de un corte del músculo tibial anterior un día después del tratamiento con cardiotoxina. En la imagen de inmunohistoquímica se puede observar un área desestructurado (AD) donde gran parte de las fibras musculares han sido destruidas, frente a otro área (AN) donde se mantiene la estructura normal del tejido. Inmunohistoquímica avidita-biotina-peroxidasa 20x.



**Figura 5:** Imágenes de inmunohistoquímica mostrando la distribución e intensidad de la expresión de GFP en el músculo tibial anterior de ratones de 5 días tratado con cardiotoxina. Evolución del proceso de regeneración llevado a cabo por las células pluripotentes del músculo 1, 3, 4, 5 y 10 días después del tratamiento con cardiotoxina. AD: área dañada. AN: tejido sin dañar. AR: área de regeneración. Inmunohistoquímica avidita-biotina-peroxidasa 20x.

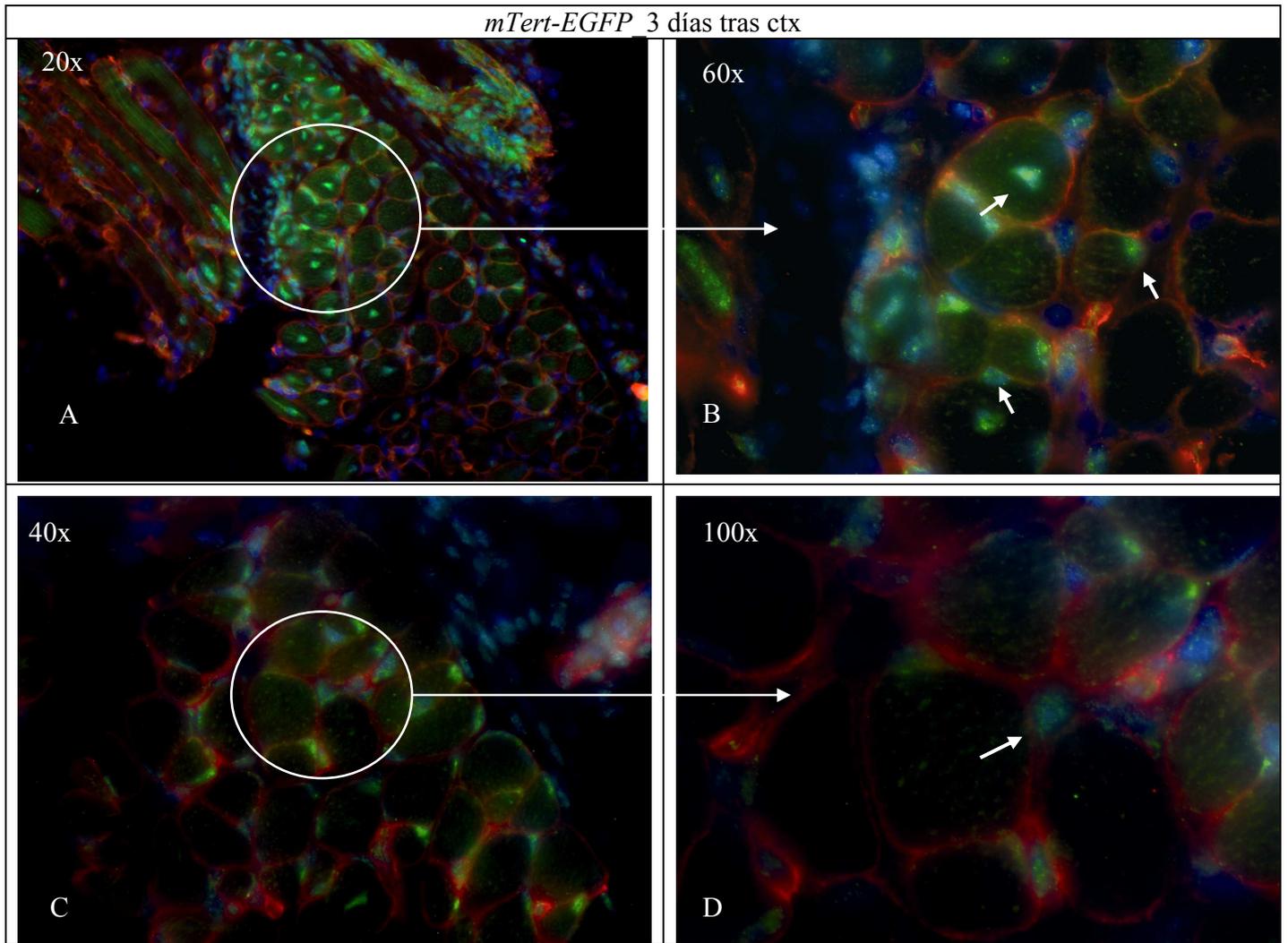


**Figura 6:** Presencia de células pluripotentes (GFP positivas por la expresión de *mTert-EGFP*) en un músculo tibial anterior tras sufrir daño con una cardiotoxina. El primer día tras la aplicación de la cardiotoxina, las fibras musculares se encuentran desestructuradas y destruidas. El número de células pluripotentes es bajo y la intensidad de la señal elevada. En los días sucesivos, la cantidad de células pluripotentes en el área dañada aumenta, presentando una expresión de telomerasa elevada. La mayor cantidad de células pluripotentes se observan en el tercer día tras la lesión. En los días sucesivos, las fibras musculares van siendo reconstruidas y la cantidad de células pluripotentes disminuye, así como la cantidad de expresión de telomerasa. Las letras a, b y c muestran las diferencias significativas entre el número de células de los distintos días analizados.



\* Diferencias significativas con  $p \leq 0.05$

**Figura 7:** Comparación de la presencia de células pluripotentes (GFP positivas por la expresión de *mTert-EGFP*) en el músculo tibial anterior dañado y sin dañar con cardiotoxina. La gráfica muestra la comparación del número de células pluripotentes e intensidad de la expresión telomerasa localizadas en el músculo tibial anterior de un ratón transgénico *mTert-EGFP* a diferentes días de edad de un individuo, cuando se le ha aplicado o no un daño tisular inducido por cardiotoxina. El día 11 de edad del individuo corresponde con el primer día tras el daño con la cardiotoxina, si bien el número de células GFP<sup>+</sup> observadas con y sin el tratamiento es similar, se observa un aumento en la intensidad de la señal en el músculo dañado. En los días consecutivos, se observa un aumento significativo en el número de células pluripotentes que se encuentran en el tejido dañado a partir del segundo día de la aplicación del daño, además de un aumento en la expresión de telomerasa con respecto a lo que ocurre en un músculo sin dañar. Las diferencias son significativas hasta el día 20 de edad (10 días tras la aplicación de la cardiotoxina), momento en el cual, el estado del músculo, dañado y sin dañar es similar.



**Figura 8:** Tinción de las fibras musculares del músculo tibial anterior de 6 y 13 días de edad con colagenasa tipo IV (rojo) y análisis de inmunohistoquímica de las células GFP<sup>+</sup> mediante anti-GFP (verde).



**LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTTRANSCRIPCIONAL DE LOS  
RETROTRANSPOSONES IAP Y MuERV-L AFECTAN A LA PLURIPOTENCIA  
DE LAS CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS MURINAS**



**7 LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL Y POSTTRANSCRIPCIONAL DE LOS RETROTRANSPONES IAP Y MuERV-L AFECTAN A LA PLURIPOTENCIA DE LAS CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS MURINAS**

**TRANSCRIPTIONAL AND POST-TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF RETROTRANSPONSONS IAP AND MuERV-L AFFECT PLURIPOTENCY OF MICE ES CELLS. *REPRODUCTIVE BIOLOGY AND ENDOCRINOLOGY* (2006) 4: 55**

**RESUMEN**

El cultivo prolongado de células troncales embrionarias murinas disminuye la pluripotencia de estas células y da lugar a anomalías en los fetos resultantes de las metodologías de agregación o microinyección de células troncales en embriones. Una de las causas de estas anomalías son las alteraciones tanto genéticas como epigenéticas (por ejemplo de genes “imprinting”) observadas en las células troncales mantenidas en cultivo durante un elevado número de pases celulares. Trabajos recientes han demostrado que los elementos retrotransponibles pueden jugar un papel importante en la estabilidad de las células embrionarias y en el mantenimiento de su pluripotencia. En nuestro laboratorio observamos que la línea R1 después de 27 pases celulares en cultivo perdió la habilidad de transmisión a la línea germinal y comenzó a inducir el fenotipo de cola torcida (similar a la mutación “kinky tail” en ratón) en los animales quiméricos producidos con ellas.

Con el fin de investigar si dicho fenotipo está asociado con alteraciones cromosómicas, diferenciación inadvertida o modificaciones epigenéticas, se analizaron y compararon pases celulares tempranos (pase 16, que no producían el fenotipo) y tardíos (pase 27) con la línea de célula troncal embrionaria MAR (C57/CBAF1), generada en nuestro laboratorio (pase 10). En estas líneas se evaluó el cariotipo, la expresión de marcadores de diferenciación y pluripotencia, la transcripción de ARN mensajero de los retrotrasposones IAP (intracisternal-A particle) y MuERV-L (retrovirus endógeno murino), así como la metilación de dichos retrotrasposones.

Los resultados obtenidos muestran que la línea R1 en su pase 27 presenta un cariotipo y aspecto normal, además de una expresión de los marcadores de diferenciación y pluripotencia similar a la mostrada por las líneas celulares troncales R1 y MAR en sus pases tempranos. La diferencia más relevante que encontramos en base a los análisis de transcripción realizados fue una alteración en los patrones de transcripción del ARN mensajero de los retrotransposones IAP y MuERV-L en las dos orientaciones del ARN transcrito (sentido directo y sentido inverso), así como una alteración en los patrones de metilación del retrotransposón IAP. Dicha alteración no se observa en el retrotransposón MuERV-L. Estos resultados nos sugieren que, además de los procesos de metilación, existen otros procesos transcripcionales que pueden estar implicados en el silenciamiento genómico de algunos retrotransposones. Estos mismos mecanismos podrían ser los responsables de la disminución de pluripotencia observada en las células troncales tras un elevado número de pases en cultivo; además, la alteración en la expresión de ciertos retrotransposones puede pasar inadvertida en los controles rutinarios de calidad de las células en cultivo, sin que ello afecte a su morfología, estructura cromosómica, o expresión de marcadores de diferenciación o pluripotencia. Por ello, debería considerarse la inestabilidad de estos elementos retrotransponibles a la hora de utilizar células troncales tanto en la transgénesis (formación de animales quiméricos) como en la terapia celular.

**PRESENCIA INADVERTIDA DE CÉLULAS PLURIPOTENTES EN  
MONOCAPAS DERIVADAS DE CUERPOS EMBRIOIDES DIFERENCIADOS**



## **8. PRESENCIA INADVERTIDA DE CÉLULAS PLURIPOTENTES EN MONOCAPAS DERIVADAS DE CUERPOS EMBRIOIDES DIFERENCIADOS**

**INADVERTENT PRESENCE OF PLURIPOTENT CELLS IN MONOLAYERS DERIVED FROM DIFFERENTIATED EMBRYOID BODIES. *THE INTERNATIONAL JOURNAL OF DEVELOPMENTAL BIOLOGY* (2007) 51: 397-407**

### RESUMEN

El potencial que presentan las células troncales para su aplicación en medicina regenerativa ha despertado un gran interés científico y social. A pesar de los avances logrados tanto en el conocimiento de los medios de cultivo necesarios para su mantenimiento *in vitro*, como en el desarrollo de protocolos para una mejor obtención de nuevas líneas celulares troncales, así como en la identificación de genes implicados en el mantenimiento de la pluripotencia, su uso terapéutico está todavía restringido debido al elevado riesgo de formación de teratomas tras su aplicación.

Con el objetivo de analizar la seguridad del proceso de diferenciación de las células troncales, y de examinar si después de esta diferenciación *in vitro* aun quedan células en el cultivo que, aunque mostrando una morfología de célula diferenciada, todavía pudieran conservar cierta pluripotencia, se electroporaron células troncales embrionarias de ratón con una construcción que comprende el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa murina (*mTert*) unido al promotor de la proteína de fluorescencia verde (EGFP). Cuando estas células troncales embrionarias están en cultivo, se observa la expresión de la proteína de fluorescencia verde como consecuencia de la actividad telomerasa que presentan. Para la diferenciación *in vitro* de las células se elimina el LIF (leukemia inhibitor factor) del medio de cultivo, formándose como consecuencia en primer lugar los cuerpos embrioides (EB), y a continuación una monocapa de células morfológicamente diferenciadas. Durante la formación de los cuerpos embrioides se observa un incremento en la intensidad de fluorescencia, seguida de una disminución de la misma durante la formación de la monocapa de células diferenciadas, hasta perderse casi por completo en el cultivo morfológicamente diferenciado. Sin embargo, tras dos semanas de cultivo sin LIF se pudieron observar pequeños grupos de células morfológicamente diferenciadas entre las

células de la monocapa diferenciada, que aun conservaban cierta expresión de fluorescencia verde. Estos grupos celulares fueron aislados, expandidos y cultivados en condiciones de células troncales pluripotentes (suplementado con LIF). Tras varios pases en medio de no diferenciación, estas células (en adelante ES-EB) recuperaron su morfología de célula troncal. Se analizaron las colonias ES-EB obtenidas mediante inmunocitoquímica, transcripción inversa mediante PCR y análisis de metilación mediante bisulfito, y se observó que, a pesar de la pérdida inicial de expresión de algunos genes relacionados con pluripotencia característicos de células troncales, y de la hipometilación de algunos retrotransposones, tras varios pases celulares en condiciones de células troncales, las colonias ES-EBs recuperaban la expresión de genes de pluripotencia. Con el fin de medir el potencial pluripotente de estas ES-EB, se inyectaron y agregaron dichas células a embriones en estadio de 8 células y de blastocisto. En un principio, la mayoría de las ES-EB aisladas de la monocapa diferenciada fueron incapaces de producir quimerismo, pero tras varios pases en condiciones óptimas de cultivo de células troncales, recuperaron dicha capacidad. A la vista de estos resultados y teniendo en cuenta su aplicación en medicina regenerativa, se puede destacar la necesidad de identificar y eliminar células con cierto grado de pluripotencia que permanecen en un cultivo diferenciado, ya que, en un ambiente adecuado pueden ser el inicio de un tumor.

**DISCUSIÓN**



## 9. DISCUSIÓN

En las últimas décadas las células troncales han suscitado un gran interés científico y social debido a su potencial aplicación en medicina regenerativa y en terapia génica. El conocimiento de las células troncales se ha abordado desde dos vertientes: estudios *in vitro* encaminados a su caracterización y estudios *in vivo* que permiten conocer el entorno y la funcionalidad de las células troncales.

En la actualidad se acepta que una de las características que definen a las células troncales es su relativa resistencia a entrar en senescencia a pesar de los múltiples ciclos de división a los que se ven sometidas (Lovell-Badge 2001). Uno de los mecanismos que permiten la división ilimitada de estas células se basa en el complejo ribonucleoproteico de la telomerasa, que cataliza la extensión terminal de los cromosomas. De este modo se ha asociado la actividad de la enzima telomerasa con la inmortalidad y no senescencia de las células (Tang *et al.*, 2001). Nuestro interés en dicho complejo enzimático radica en sus elevados niveles de expresión en muchos tipos de células troncales (Breault *et al.*, 2008). Por tanto, la presente tesis engloba los estudios tanto *in vivo* como *in vitro* de las células troncales utilizando para ello el promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa murina (*mTert*).

### Estudio de los elementos reguladores del promotor de la *mTert*

Teniendo en cuenta que la mayoría de los conocimientos acerca del promotor *Tert* provienen de la especie humana, realizamos un estudio comparativo entre éste y su homólogo murino con el fin de comprender los mecanismos reguladores que dirigen a este último. Al realizar un análisis de secuencia de ambos promotores, encontramos diferencias notables, que pueden ser la causa de los distintos modos de regulación de dicha enzima, explicando a su vez la disparidad en los procesos de senescencia e immortalización que se dan en el cultivo celular de ambas especies. Las principales diferencias aparecen en primer lugar en el número y la localización de sitios de unión para el factor de transcripción Sp-1. Observamos así nueve sitios de unión en el promotor humano localizados a lo largo de las 4 kb del mismo, mientras que en el promotor murino se observan únicamente dos sitios de unión próximos a la región ATG. Se sabe que estos sitios de unión para Sp1 son comunes en genes con promotores que carecen de regiones TATA, como es el caso de *Tert* (Boisclair

*et al.*, 1993), y se ha confirmado que el factor de transcripción Sp1 es imprescindible para llevar a cabo la actividad transcripcional completa del promotor de la hTERT (*Nozawa et al.* 2001; *Takakura et al.* 2001). Otra diferencia observada entre ambos promotores se refiere al número de regiones AP-1 que contiene cada uno de ellos. En el caso del promotor murino, el número de regiones AP-1 está incrementado respecto de su homólogo humano. Recientemente se ha demostrado que los diferentes mecanismos de inhibición de la actividad telomerasa observados en las células somáticas de ambas especies, pueden ser debidos a la funcionalidad especie-específica de las regiones AP-1 (*Takakura et al.*, 2005). Por otro lado, se observan diferencias en cuanto a los mecanismos de regulación epigenética que pueden actuar en ambos promotores. Se sabe que la regulación epigenética de la hTERT durante el proceso de diferenciación celular se lleva a cabo mediante la metilación de citosinas y la acetilación de histonas en dicho promotor. La mayor presencia de regiones CpG encontradas en el promotor de la TERT humano podría ser una de las causas de las diferencias encontradas en los procesos de inmortalización y senescencia observados en los cultivos primarios de las células humanas y de ratón, ya que indicaría una mayor regulación de dicho promotor mediante metilación con respecto a su homólogo murino.

A pesar de las diferencias encontradas y ya mencionadas entre ambos promotores, existen otras regiones conservadas que realizan funciones similares en ambas especies. Tal es el caso de c-Myc, que participa en la regulación de la enzima. Los estudios realizados en el promotor humano demuestran que c-Myc contribuye a la activación de la enzima telomerasa (*Takakura et al.*, 1999). Este mismo efecto se observa con la interacción de la región c-Myc del promotor murino y la enzima (*Greenberg et al.*, 1999), por lo que cabe pensar que se trata de un mecanismo conservado en la especie humana y en el ratón. Otros elementos como Zap3, relacionado con los niveles absolutos de transcripción de la *mTert* (*Armstrong et al.*, 2004), y MZF, considerado como una región de regulación negativa (*Fujimoto et al.*, 2000), presentan una localización conservada en ambos promotores, indicando una posible funcionalidad similar en ambas especies.

*Funcionamiento del promotor de la mTert durante el proceso de diferenciación celular*

Gracias a los estudios *in vitro* realizados con las líneas de células troncales R1 y MAR que expresan las tres construcciones del promotor de la *mTert*, pudimos analizar la funcionalidad del promotor de la telomerasa. Durante el proceso de diferenciación de dichas células troncales observamos que los mayores niveles de fluorescencia, y por tanto de expresión de telomerasa, se corresponden con la formación de los cuerpos embrioides, momento en el que las células presentan un mayor grado de replicación. A medida que el cultivo se diferencia, la intensidad de la señal disminuye, coincidiendo con una disminución de la actividad telomerasa. Esto sugiere que existe una estrecha correlación entre la regulación a la baja de *mTert* y el proceso de diferenciación. Los resultados obtenidos coinciden con lo publicado anteriormente en cuanto a que la actividad telomerasa es elevada en células troncales, línea germinal y algunos tumores, pero es mínima o inexistente en células diferenciadas. Armstrong y colaboradores demostraron este fenómeno durante el proceso de diferenciación hematopoyética (Armstrong *et al.*, 2000). Teniendo en cuenta el análisis del promotor referido anteriormente, y que no existen diferencias en el patrón de expresión entre las distintas líneas celulares expresando las distintas construcciones podemos concluir que, contrariamente a lo que ocurre en su homólogo humano, los elementos reguladores del promotor murino se localizan principalmente en la primera kilobase de la región proximal de dicho promotor, siendo esta región suficiente para regular su actividad.

*Modelo transgénico mTert-EGFP como marcador de células pluripotentes*

Más allá de conocer el comportamiento del promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa murina, y su relación con la expresión de telomerasa durante el proceso de diferenciación celular, el modelo transgénico creado por la asociación del promotor de la *mTert* y el gen de la GFP, supone un biomarcador selectivo de las células troncales, pues permite identificar mediante la señal fluorescente, las células que expresan telomerasa, y que por tanto, presentan cualidades de pluripotencia.

Dicho modelo nos ha permitido localizar células pluripotentes en estos animales transgénicos, al establecer líneas de células troncales a partir de embriones (células troncales embrionarias), de fetos (neurosferas), de recién nacidos y de tejidos adultos (células de la

línea germinal) de estos animales. Sin embargo, nuestro modelo no mostró señal fluorescente en los tejidos adultos, lo que pudo ser debido en primer lugar a la escasa presencia de las células troncales adultas entre la población total de un tejido diferenciado, a que los niveles de expresión fueron indetectables en condiciones fisiológicas o incluso a que exista un sistema de represión del promotor en este estadio. El mismo efecto fue descrito anteriormente usando el promotor *hTERT* (Armstrong *et al.*, 2000; Ritz *et al.*, 2005).

#### Uso del modelo transgénico *mTert-EGFP* para el análisis de las células pluripotentes del músculo

Con el fin de localizar células pluripotentes en un tejido adulto, y considerando que los niveles de expresión de telomerasa en condiciones fisiológicas no permitían una medida directa de la fluorescencia, analizamos mediante técnicas inmunohistoquímicas la presencia de células pluripotentes en el músculo tibial anterior de los ratones transgénicos *mTert-EGFP*. Seleccionamos este tejido por su elevada capacidad de regeneración y porque ha sido ampliamente descrita la presencia de células pluripotentes con capacidad miogénica dentro del tejido muscular, siendo estas células de diversa procedencia, las responsables de regenerar el músculo cuando éste sufre una lesión (Brack and Rando 2007; Charge and Rudnicki 2004). El trabajo desarrollado a este respecto en la tesis abarca el estudio de la localización y la identificación de células GFP<sup>+</sup> durante el crecimiento del ratón, así como el estudio del proceso de regeneración llevado a cabo en el músculo tibial anterior tras una lesión.

- *Localización de células pluripotentes en el músculo tibial anterior*

Del análisis realizado observamos una elevada presencia de células GFP<sup>+</sup> en estadios iniciales de crecimiento hasta aproximadamente los 13 días de edad, tras lo cual se aprecia una disminución en el número de células con señal, dato que se corresponde con lo presentado en trabajos anteriores donde se indica que las células satélites en el músculo de un individuo recién nacido constituyen el 30% de los núcleos localizados por debajo de la lámina de la fibra muscular en ratones, mientras que en individuos de 2 meses de edad, la cantidad de células satélite se reduce a menos del 5% (Bischoff 1994). En este análisis

pudimos comprobar una distribución homogénea de las células GFP<sup>+</sup> a lo largo de todo el músculo, a excepción de las regiones próximas a los vasos sanguíneos donde se observó una concentración de dichas células. Otros autores han demostrado ésta misma localización y coinciden que es debido a las características nutricionales del entorno vascular (Charge and Rudnicki 2004).

- *La regeneración del músculo tibial anterior*

El estudio del proceso de regeneración del músculo tibial anterior, desde la aplicación del daño hasta su completa regeneración, consistió en localizar las células GFP<sup>+</sup> y estudiar su comportamiento durante todo el proceso regenerativo. Coincidiendo con los datos mostrados por otros autores sobre el proceso de regeneración, (Almekinders and Gilbert, 1986; Lescaudron *et al.*, 1999; Merly *et al.*, 1999), la recuperación del músculo se lleva a cabo en dos fases. En una primera fase se produce la necrosis de las fibras musculares dañadas y la activación de células mononucleadas, principalmente de tipo inflamatorio (neutrófilos y macrófagos), y miogénico (activadas por los macrófagos). En una segunda fase se produce la proliferación de células miogénicas. Nuestros análisis demostraron que los días siguientes a la aplicación del daño, se produce la destrucción de las fibras musculares, así como una acumulación de células GFP<sup>-</sup> en la zona dañada, que se corresponderían con las células mononucleadas de tipo inflamatorio, en convivencia con células GFP<sup>+</sup>. Estas células GFP<sup>+</sup> proliferan y pasan a ocupar el vacío dejado por las fibras musculares degeneradas iniciando así la creación de fibras musculares nuevas, y con ello la regeneración del músculo. El proceso dura aproximadamente diez días, y a partir de ese momento la distribución de las células GFP<sup>+</sup> vuelve a ser homogénea, y el músculo recupera su aspecto normal.

- *Identificación de las células pluripotentes del músculo*

En la actualidad muchos grupos de investigación tratan de identificar y definir las células troncales que participan en la regeneración del músculo. Así se han descrito, además de las células satélite (Brack and Rando 2007), células troncales derivadas de la médula ósea y células troncales procedentes del músculo que participan en el proceso de regeneración muscular (Charge and Rudnicki 2004). Estos tipos celulares se diferencian

entre sí, tanto por su patrón de marcadores moleculares (Asakura *et al.*, 2002), como por su ubicación espacial en la fibra muscular. De este modo, aplicando una doble tinción anti-EGFP y anti-colagenasa tipo IV sobre el músculo tibial anterior de nuestro modelo de ratón transgénico *mTert-EGFP*, conseguimos distinguir diferentes localizaciones de las células GFP<sup>+</sup> con respecto a la fibra muscular, sugiriendo que se trata de diferentes poblaciones de células troncales que participan en la regeneración del músculo. Por tanto, se demuestra que el modelo transgénico *mTert-EGFP* supone una herramienta importante para el estudio y la caracterización de estos tipos celulares pluripotentes localizados en el músculo.

#### *Estabilidad genética y epigenética de las células troncales*

Las células troncales se definen como células con capacidad de división ilimitada, sin embargo a medida que se realizan pases celulares *in vitro*, se observa una pérdida de dicha capacidad. Se sabe que la pluripotencia de las células troncales embrionarias viene controlada por la regulación genética y epigenética de su genoma que puede verse alterado por largos periodos de cultivo, como ocurre en las células troncales embrionarias humanas (Maitra *et al.*, 2005). Se ha visto en el ratón, que el cultivo prolongado de las células troncales embrionarias no solo puede hacer disminuir su pluripotencia sino que también puede dar lugar a anomalías en fetos quiméricos obtenidos de su contribución. Estas anomalías se asocian con frecuencia a alteraciones tanto cromosómicas como epigenéticas de los genes de “imprinting”.

En nuestro trabajo (Ramirez *et al.*, 2006), describimos alteraciones en el *estatus* epigenético de una línea troncal embrionaria en su pase 27. En este pase avanzado, esta línea celular pierde la capacidad de transmitir su genoma a la línea germinal y comienza a inducir el fenotipo de cola torcida en todos los animales quiméricos nacidos a partir de ella. En estudios anteriores (Ramirez *et al.*, 2007), observamos por primera vez que el cultivo de células troncales produce una alteración en el patrón de metilación y en la transcripción del ARN mensajero en sentido y antisentido, de algunos retrotransposones endógenos (REs). En este trabajo observamos a su vez cierta relación entre la expresión de los retrotransposones IAP y MuERV-L y la situación de pluripotencia de las células.

Hoy en día se sabe que en la naturaleza existen mecanismos de seguridad mediante los cuales se evita la transcripción de elementos transpuestos en el genoma (tipo

retrotransposones) que podrían provocar efectos perjudiciales para la vida y el desarrollo del individuo. El principal mecanismo que se conoce hasta la fecha es el silenciamiento de la transcripción del genoma mediante la metilación de sus promotores. De esta manera se impide el acceso a los factores de transcripción, o se genera una forma inactiva de la cromatina del *loci* objeto (Baqir and Smith 2003). Por otro lado, se asume que el silenciamiento transcripcional no puede controlar todos los retrotransposones insertados en el genoma, y se han visto otros mecanismos mediados por ARN interferente que previenen la actividad de estos retrotransposones en estadios tempranos del desarrollo.

Atendiendo a los resultados obtenidos (Ramirez *et al.*, 2006), observamos que las células en pases tardíos no varían en cuanto a morfología, cariotipo y sólo fallan en la expresión de dos marcadores de pluripotencia: Rex1 (*Zfp42*) y GENESIS (*Foxd3*) con respecto a lo observado en células troncales en pases tempranos. Se ha descrito que la expresión de Rex1 está restringida a las células pluripotentes procedentes de la ICM, y que células pluripotentes procedentes de estadios posteriores (ectodermo primitivo y epiblasto) presentan una regulación negativa de este gen. Además se ha comprobado que la población Rex1<sup>-</sup>/Oct4<sup>+</sup> que forma parte de células troncales embrionarias no diferenciadas, se diferencian de forma más eficaz en células de linaje somático que las poblaciones Rex1<sup>+</sup>/Oct4<sup>+</sup>, y además muestran poca capacidad para contribuir a la formación de quiméricos (Toyooka *et al.*, 2008) Las diferencias más significativas que nos muestran los resultados son la alteración en la expresión de los retrotransposones IAP y MuERV-L, y la metilación del promotor IAP (no del MuERV-L). Esto sugiere que la principal razón de la pérdida de capacidad de transmisión a línea germinal de la línea R1 en su pase 27 y de la aparición del fenotipo de cola torcida en los animales quiméricos formados a partir de la misma, se debe a alteraciones en la metilación y/o expresión de algunos retrotransposones. La relación que se observa entre la reactivación del ARN mensajero del retrotransposón IAP y la desmetilación de los genomas de las células troncales de la línea R1 en su pase 27, corrobora la “metilación de la citosina” como mecanismo supresor de los retrotransposones en las células troncales de mamíferos, apoyando a su vez lo descrito en otros tipos celulares donde la expresión de estos elementos es reprimida también mediante metilación de su ADN (Walsh *et al.*, 1998). Por otro lado, observamos una mayor expresión del retrotransposón MuERV-L sin encontrar una reducción en su metilación. Este hecho indica

que, además de la metilación como mecanismo regulador, existen otros mecanismos (p.e. ARN interferente) que controlan la expresión de este tipo de secuencias parasitarias repetitivas en las células troncales, coincidiendo con lo reportado en otros trabajos donde se ha visto que la metilación no es el único mecanismo que regula la expresión de los retrotransposones en las células troncales (Maksakova and Mager 2005). Esta idea se ve apoyada por los trabajos que muestran cómo la pérdida de Dicer (la nucleasa necesaria para la acción del ARN interferente), compromete la proliferación de las células troncales, corroborando la importancia de la maquinaria del ARN interferente en la proliferación de las células troncales (Murchison *et al.*, 2005). Además se ha demostrado que las células troncales procedentes de ratones knockout para Dicer, muestran un aumento en la transcripción de algunas secuencias repetidas, como IAP, combinadas con varios defectos en el desarrollo (Kanellopoulou *et al.*, 2005).

La importancia de estos mecanismos naturales de seguridad se deduce de los numerosos ejemplos que se observan en la naturaleza, en los que la expresión de ciertos retrotransposones está relacionada con la expresión genómica y la diferenciación celular (retrotransposón L1 humano) (Muotri *et al.*, 2005) e incluso con mutaciones espontáneas que contribuyen a gran parte de los casos de cáncer en ratón (ERVs) (Maksakova *et al.*, 2006). Así, se ha publicado que las alteraciones epigenéticas que se dan en las células troncales embrionarias como consecuencia de su cultivo al introducirlas en un embrión, no son corregidas durante el periodo post-implantacional, dando como consecuencia patrones de expresión de los genes de “imprinting” aberrantes en los fetos derivados de los mismos (Dean *et al.*, 1998). De esta forma, podríamos pensar que la causa del fenotipo de cola torcida observado en los animales quiméricos derivados de las líneas troncales analizadas en nuestro trabajo, es un patrón de metilación aberrante de los elementos IAP. El fenotipo variable que observamos en los animales quiméricos obtenidos con estas células, apoya esta hipótesis en cuanto a que las marcas de metilación se establecen de manera estocástica en el genoma. Existen otros ejemplos anteriores a nuestro trabajo, que muestran cómo los eventos epigenéticos están asociados con el fenotipo de cola torcida (Ludwig *et al.*, 1996; Rakyan *et al.*, 2003; Tsai and Silver, 1991). Se ha observado en mamíferos que existe un número de alelos mutantes asociados a la inserción del retrotransposón IAP, y que su expresión está afectada por la actividad y la metilación de estos elementos

retrotransponibles. Se ha visto que los elementos IAPs pueden tener efectos en ambas zonas flanqueantes al sitio de inserción en el que se ubican (Druker *et al.*, 2004). Esta incorrecta metilación observada en IAP, puede ser también la causa de las alteraciones observadas en la expresión del ARN mensajero de algunos de los genes de pluripotencia y diferenciación analizados.

Teniendo en cuenta cómo cambios epigenéticos en los elementos retrotransponibles afectan a la capacidad pluripotente de las células troncales, pensamos que el análisis de la estabilidad genética de estos elementos puede ser un buen sistema para evaluar la estabilidad epigenética de las células troncales antes de su uso terapéutico, como medida de seguridad dirigida a evitar posibles efectos adversos resultantes del uso de células troncales en terapias médicas.

### *Problemas asociados con la incompleta diferenciación de las células troncales para su uso en medicina regenerativa*

El enorme potencial que presentan las células troncales para abordar ciertas enfermedades hasta hoy incurables, debe ir acompañado de un mayor conocimiento y control de las mismas. Uno de los principales objetivos de los estudios relacionados con las células troncales se centra en comprender y controlar los procesos que participan en la diferenciación de las células troncales embrionarias humanas. Este punto es imprescindible si se pretende utilizar dichas células en trasplantes terapéuticos o terapias celulares. En la actualidad se reconoce a las células troncales embrionarias humanas obtenidas *in vitro* como células pluripotentes capaces de generar una gran diversidad de tipos celulares procedentes de las tres hojas embrionarias, con las aplicaciones médicas que ello conlleva. Sin embargo, los ensayos de transferencia de células troncales embrionarias presentan un alto riesgo dada su capacidad para desarrollar tumores (Taupin, 2006). Así el uso de transferencia de células troncales como estrategia terapéutica, debe tener en cuenta esta limitación. Cabe pensar que, considerando el alto grado de autorrenovación que poseen las células troncales, el mantenimiento de esta elevada capacidad de división, común al proceso de formación de tumores, es más sencillo que si la célula tuviera que adquirir esta característica *de novo*. Por tanto, son las células no-diferenciadas, más que las diferenciadas, las que parecen inducir la formación de tumores. Destaca por tanto la

necesidad de desarrollar métodos que permitan la identificación y eliminación de cualquier célula que permanezca indiferenciada en un cultivo de células aparentemente diferenciadas, previamente a su trasplante (Drukker *et al.*, 2002).

Coincidiendo con las publicaciones que sostienen que las células troncales embrionarias al diferenciarse y formar los cuerpos embrioides expresan genes relacionados con linajes celulares procedentes de las tres capas embrionarias (Ward *et al.*, 2004), nuestras células con aspecto de célula troncal denominadas ES-EB, que fueron obtenidas a partir de las células que permanecían indiferenciadas dentro del cultivo de células diferenciadas, mostraron a su vez la expresión de genes característicos de linajes celulares de las tres hojas embrionarias. A pesar de que la incompleta diferenciación de los cuerpos embrioides es muy común, no se había publicado hasta la fecha la detección de células, tipo célula troncal, procedentes de cuerpos embrioides tras dos semanas de diferenciación. De este modo, hemos demostrado (Ramirez *et al.*, 2007) que en la monocapa de células diferenciadas, morfológicamente homogénea bajo microscopio de campo claro y obtenida a partir de la diferenciación de células troncales embrionarias, existe una porción de células que fallan en su completa diferenciación y mantienen parte de sus propiedades pluripotentes. Al aislar y cultivar estas células ES-EB en condiciones estándar de célula troncal, fuimos capaces de recuperar su morfología pluripotente así como su potencial para producir quimeras y expresar ciertos marcadores propios de células troncales. Cabe añadir que las células ES-EB que no expresaron los marcadores propios de células troncales en los pases iniciales de su cultivo en condiciones pluripotentes, sí lo hicieron al mantenerlas durante varios pases (aproximadamente 10) en estas condiciones. Al reflexionar sobre este aspecto, proponemos dos alternativas que justificarían este fenómeno: en primer lugar, las células mTert-EGFP que tras dos semanas de diferenciación continuaron siendo positivas, mantuvieron cierta pluripotencialidad que recuperaron completamente tras su cultivo en unas condiciones adecuadas. En segundo lugar, las células que continuaban siendo GFP<sup>+</sup> tras las dos semanas de diferenciación, realmente perdieron durante este tiempo sus características pluripotentes, pero al ser cultivadas de nuevo en condiciones de célula troncal sufrieron una reprogramación recuperando la expresión de genes de pluripotencia tan importantes como Nanog, que desencadenó la expresión de otros marcadores pluripotentes volviendo así a su estado inicial de célula troncal.

Gracias al análisis de expresión de marcadores de pluripotencia en las líneas ES-EB en el momento de su obtención, observamos cómo Nanog, Foxd3 (GENESIS) y Terf1 (Telomeric repeat binding factor 1) mantenían su expresión en casi todas ellas. Nanog, se define como un gen específico de células pluripotentes con un papel importante en el mantenimiento del estado de no-diferenciación en los embriones en estadio post-implantacional y en las células troncales embrionarias. La presencia de ARNm de Nanog es característico de las células pluripotentes tanto humanas como de ratón, estando ausente en sus células diferenciadas (Chambers *et al.*, 2003). Las dos características que se confieren a Nanog: a) desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia tanto de las células de la ICM, como de las células troncales, y b) mantener la capacidad de autorrenovación de las células troncales en ausencia de LIF (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003), hacen que este factor de transcripción se asocie estrechamente a la capacidad pluripotente de las células troncales. Nuestros resultados concuerdan con la importancia, descrita anteriormente, que adquiere Nanog como organizador transcripcional principal en el mantenimiento de la pluripotencia de las células troncales. Por otro lado, Foxd3 es un factor de transcripción muy expresado en las células troncales embrionarias murinas. Recientemente se ha publicado que Foxd3, junto con Oct4 (*Pou5f1*) y Nanog forman una red interdependiente de factores de transcripción que regulan la pluripotencia de las células troncales embrionarias (Pan *et al.*, 2006). En dicho artículo, los autores muestran cómo Nanog y Foxd3 son capaces de activar la expresión del promotor de Oct4. Por último se ha visto que mTert, un factor de transcripción asociado con la actividad telomerasa, confiere cierta resistencia a las células troncales murinas a diferenciarse y a entrar en apoptosis evitando el estrés producido por la dependencia de TP53 (Lee *et al.*, 2005).

Es importante destacar el hecho de que sólo los marcadores de pluripotencia Nanog, Foxd3 y Terf1 fueron detectados en casi todas las células ES-EB en sus pases iniciales (Ramirez *et al.*, 2007). Esto parece indicar que incluso en ausencia de Oct3/4, el conjunto de Nanog, Foxd3 y Terf1 es capaz de controlar parte del pool de genes relacionados con la pluripotencia de las células. Así, con el fin de controlar los efectos adversos del uso de células troncales en terapias y trasplantes celulares, recomendamos analizar estos tres marcadores de pluripotencia específicos con el fin de confirmar la diferenciación total de las células antes de su aplicación médica.

El hecho de que incluso las células que en un primer lugar no expresaron el marcador pluripotente Oct4, tras varios pases en condiciones pluripotentes recuperaran dicha expresión y su capacidad para formar quimeras, indica que un cultivo adecuado puede devolver la condición de pluripotencia a ciertas células con memoria multipotente. A este respecto, nuestros experimentos muestran cambios en la expresión de marcadores de pluripotencia y en el estado de metilación de ciertos retrotransposones que influyen en esta capacidad pluripotente al mantener a las células ES-EB en condiciones adecuadas de cultivo. Esta observación es de vital importancia si lo aplicamos a las células troncales adultas. Sabemos que en un individuo adulto, se pueden encontrar células troncales en una gran variedad de tejidos como el hematopoyético, gastrointestinal y testicular, así como en el sistema tegumentario. Estas células troncales, mantienen en este entorno su capacidad de regeneración y autorrenovación. Estudios recientes muestran cómo la capacidad pluripotente de estas células troncales adultas supera los límites pensados cuando a partir de una célula troncal de la piel se puede obtener una célula germinal femenina (Dyce *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la diferenciación de las células troncales adultas es incompleta y son necesarias ciertas señales, principalmente del entorno, para adquirir un estado funcional (Belema Bedada *et al.*, 2005). Por otra parte se ha observado que el potencial multipotente que presentan las células troncales de las espermatogonias, o las células de la piel *in vitro*, puede deberse más bien a las condiciones impuestas por el medio en el que se cultivan que a un reflejo de su comportamiento natural como célula troncal en un nicho concreto. Teniendo en cuenta que las células troncales dependen del medio de cultivo en el que se mantienen para conservar sus propiedades, este mismo medio de cultivo puede también ser el responsable de que células, como nuestras ES-EB, con cierta memoria pluripotente adquieran características propias de células troncales y sean capaces de recuperar la expresión de marcadores, como Oct4, importantes en el mantenimiento y control de sus propiedades pluripotentes.

Así, nuestros resultados sugieren que cualquier célula troncal fetal o adulta con memoria multipotente, puede ser reprogramada si se mantiene en un medio de cultivo adecuado, llegando a adquirir *in vitro* características pluripotentes similares a las de las células troncales embrionarias.

**CONCLUSIONES**



## 10. CONCLUSIONES

1. El modelo de célula troncal *mTert-EGFP* supone un buen marcador para identificar los elementos del promotor que regulan la actividad de la *mTert* durante la diferenciación celular.
2. La primera kilobase del promotor de *mTert* (inmediatamente anterior al codón de iniciación ATG) contiene los elementos reguladores necesarios para el control de la expresión de la enzima telomerasa, en las células troncales embrionarias, durante el proceso de diferenciación *in vitro*.
3. El modelo transgénico *mTert-EGFP* supone un sistema de identificación de células troncales, y permite la selección y aislamiento de células troncales generadas a partir de embriones, fetos y tejidos de recién nacidos. Supone a su vez una herramienta para el estudio de células troncales localizadas en tejidos adultos como el músculo.
4. Las células troncales embrionarias de ratón pueden diferenciarse morfológicamente en cultivo, pero conservar cierta memoria genética o epigenética de su estado pluripotente, lo cual las permite ser reprogramadas *in vitro* por las condiciones del entorno, y recuperar sus propiedades de totipotencia. Dicha reprogramación sugiere la necesidad de realizar un análisis específico de ciertos marcadores con el fin de confirmar la pérdida total de multipotencia de las células que van a ser empleadas en terapia. En concreto, en ratón los marcadores *Nanog*, *Foxd3* y *Tert1* fueron los únicos detectados en casi todos los clones ES-EB analizados, y serían buenos candidatos para analizar en las células troncales humanas.
5. En las células troncales embrionarias de ratón, la expresión de ciertos retrotrasposones como IAP y MuERV-L, esta relacionada con el mantenimiento de la capacidad de diferenciación y pluripotencia de las células troncales. Ciertas condiciones de cultivo pueden modular y reprogramar la expresión de estos retrotrasposones.
6. Además del silencio transcripcional de los genes llevado a cabo por la metilación de citosinas existen otros procesos relacionados con la transcripción de los

retrotransposones en sentido inverso que están implicados en el silenciamiento de algunos retrotrasposones en las células troncales embrionarias.

7. Antes de la aplicación de las células troncales en pacientes, es recomendable analizar la estabilidad epigenética de los retrotrasposones que están integrados en el genoma de estas células. El análisis de estabilidad epigenética de estos elementos, puede ser una manera sencilla de evaluar la estabilidad epigenética de una línea pluripotente concreta.

## **BIBLIOGRAFÍA**



## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Almekinders LC, Gilbert JA. 1986. Healing of experimental muscle strains and the effects of nonsteroidal antiinflammatory medication. *Am J Sports Med* 14(4):303-308.
- Armstrong L, Lako M, Lincoln J, Cairns PM, Hole N. 2000. mTert expression correlates with telomerase activity during the differentiation of murine embryonic stem cells. *Mech Dev* 97(1-2):109-116.
- Armstrong L, Lako M, van Herpe I, Evans J, Saretzki G, Hole N. 2004. A role for nucleoprotein Zap3 in the reduction of telomerase activity during embryonic stem cell differentiation. *Mech Dev* 121(12):1509-1522.
- Asakura A, Seale P, Girgis-Gabardo A, Rudnicki MA. 2002. Myogenic specification of side population cells in skeletal muscle. *J Cell Biol* 159(1):123-134.
- Baqir S, Smith LC. 2003. Growth restricted in vitro culture conditions alter the imprinted gene expression patterns of mouse embryonic stem cells. *Cloning Stem Cells* 5(3):199-212.
- Beaujean N. 2002. Fundamental features of chromatin structure. *Cloning Stem Cells* 4(4):355-361.
- Belema Bedada F, Technau A, Ebelt H, Schulze M, Braun T. 2005. Activation of myogenic differentiation pathways in adult bone marrow-derived stem cells. *Molecular and cellular biology* 25(21):9509-9519.
- Benit L, Lallemand JB, Casella JF, Philippe H, Heidmann T. 1999. ERV-L elements: a family of endogenous retrovirus-like elements active throughout the evolution of mammals. *J Virol* 73(4):3301-3308.
- Bischoff R. 1994. The satellite cell and muscle regeneration: McGraw-Hill. pp 97-118.
- Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. 1999. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science* (New York, NY 283(5401):534-537.
- Boisclair YR, Brown AL, Casola S, Rechler MM. 1993. Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat. *J Biol Chem* 268(33):24892-24901.
- Brack AS, Rando TA. 2007. Intrinsic changes and extrinsic influences of myogenic stem cell function during aging. *Stem Cell Rev* 3(3):226-237.
- Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, Blau HM. 2000. From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* (New York, NY 290(5497):1775-1779.
- Breault DT, Min IM, Carlone DL, Farilla LG, Ambruzs DM, Henderson DE, Algra S, Montgomery RK, Wagers AJ, Hole N. 2008. Generation of mTert-GFP mice as a model to identify and study tissue progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(30):10420-10425.
- Costas J. 2003. Molecular characterization of the recent intragenomic spread of the murine endogenous retrovirus MuERV-L. *J Mol Evol* 56(2):181-186.
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113(5):643-655.
- Charge SB, Rudnicki MA. 2004. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev* 84(1):209-238.

- Day K, Shefer G, Richardson JB, Enikolopov G, Yablonka-Reuveni Z. 2007. Nestin-GFP reporter expression defines the quiescent state of skeletal muscle satellite cells. *Developmental biology* 304(1):246-259.
- Dean W, Bowden L, Aitchison A, Klose J, Moore T, Meneses JJ, Reik W, Feil R. 1998. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. *Development* 125(12):2273-2282.
- Dellavalle A, Sampaolesi M, Tonlorenzi R, Tagliafico E, Sacchetti B, Perani L, Innocenzi A, Galvez BG, Messina G, Morosetti R, Li S, Belicchi M, Peretti G, Chamberlain JS, Wright WE, Torrente Y, Ferrari S, Bianco P, Cossu G. 2007. Pericytes of human skeletal muscle are myogenic precursors distinct from satellite cells. *Nature cell biology* 9(3):255-267.
- Domen J, Weissman IL. 1999. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 5(5):201-208.
- Druker R, Bruxner TJ, Lehrbach NJ, Whitelaw E. 2004. Complex patterns of transcription at the insertion site of a retrotransposon in the mouse. *Nucleic Acids Res* 32(19):5800-5808.
- Druker M, Katz G, Urbach A, Schuldiner M, Markel G, Itskovitz-Eldor J, Reubinoff B, Mandelboim O, Benvenisty N. 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(15):9864-9869.
- Dyce PW, Wen L, Li J. 2006. In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature cell biology* 8(4):384-390.
- Fujimoto K, Kyo S, Takakura M, Kanaya T, Kitagawa Y, Itoh H, Takahashi M, Inoue M. 2000. Identification and characterization of negative regulatory elements of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter: possible role of MZF-2 in transcriptional repression of hTERT. *Nucleic Acids Res* 28(13):2557-2562.
- Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, DePinho RA. 1998. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 16(13):1723-1730.
- Greenberg RA, O'Hagan RC, Deng H, Xiao Q, Hann SR, Adams RR, Lichtsteiner S, Chin L, Morin GB, DePinho RA. 1999. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-Myc but is not functionally equivalent in cellular transformation. *Oncogene* 18(5):1219-1226.
- Hilario E, Alvarez A, Simon J, Garcia-Sanz M, Lacalle J, Arechaga J. 2001. Presence of four stem cell populations in monolayer cultures derived from teratocarcinoma embryoid bodies. *In Vivo* 15(3):217-226.
- Huntriss J, Picton HM. 2008. Stability of genomic imprinting in embryonic stem cells: lessons from assisted reproductive technology. *Current stem cell research & therapy* 3(2):107-116.
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. 1992. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6(5):705-714.
- Kanellopoulou C, Muljo SA, Kung AL, Ganesan S, Drapkin R, Jenuwein T, Livingston DM, Rajewsky K. 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev* 19(4):489-501.

- Kigami D, Minami N, Takayama H, Imai H. 2003. MuERV-L is one of the earliest transcribed genes in mouse one-cell embryos. *Biology of reproduction* 68(2):651-654.
- Kirschstein. 2001. *Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions*. Health NIO, editor: Terese Winslow.
- Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. 2008. Niche regulation of muscle satellite cell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell* 2(1):22-31.
- Lane N, Dean W, Erhardt S, Hajkova P, Surani A, Walter J, Reik W. 2003. Resistance of IAPs to methylation reprogramming may provide a mechanism for epigenetic inheritance in the mouse. *Genesis* 35(2):88-93.
- Leblond CP. 1964. Classification of Cell Populations on the Basis of Their Proliferative Behavior. *Natl Cancer Inst Monogr* 14:119-150.
- Lee MK, Hande MP, Sabapathy K. 2005. Ectopic mTERT expression in mouse embryonic stem cells does not affect differentiation but confers resistance to differentiation- and stress-induced p53-dependent apoptosis. *Journal of cell science* 118(Pt 4):819-829.
- Lescaudron L, Peltekian E, Fontaine-Perus J, Paulin D, Zampieri M, Garcia L, Parrish E. 1999. Blood borne macrophages are essential for the triggering of muscle regeneration following muscle transplant. *Neuromuscul Disord* 9(2):72-80.
- Lovell-Badge R. 2001. The future for stem cell research. *Nature* 414(6859):88-91.
- Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A. 1996. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (IGF2R) are rescued from perinatal lethality in *Igf2* and *Igf1r* null backgrounds. *Developmental biology* 177(2):517-535.
- Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, Ikeda M, Stastny V, Kassaei K, Sui G, Cutler DJ, Liu Y, Brimble SN, Noaksson K, Hyllner J, Schulz TC, Zeng X, Freed WJ, Crook J, Abraham S, Colman A, Sartipy P, Matsui S, Carpenter M, Gazdar AF, Rao M, Chakravarti A. 2005. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37(10):1099-1103.
- Maksakova IA, Mager DL. 2005. Transcriptional regulation of early transposon elements, an active family of mouse long terminal repeat retrotransposons. *J Virol* 79(22):13865-13874.
- Maksakova IA, Romanish MT, Gagnier L, Dunn CA, van de Lagemaat LN, Mager DL. 2006. Retroviral elements and their hosts: insertional mutagenesis in the mouse germ line. *PLoS Genet* 2(1):e2.
- Mauro A. 1961. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol* 9:493-495.
- Merly F, Lescaudron L, Rouaud T, Crossin F, Gardahaut MF. 1999. Macrophages enhance muscle satellite cell proliferation and delay their differentiation. *Muscle Nerve* 22(6):724-732.
- Mezey E, Chandross KJ, Harta G, Maki RA, McKercher SR. 2000. Turning blood into brain: cells bearing neuronal antigens generated in vivo from bone marrow. *Science* (New York, NY 290(5497):1779-1782.
- Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. 2003. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113(5):631-642.

- Monk M, Boubelik M, Lehnert S. 1987. Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99(3):371-382.
- Muotri AR, Chu VT, Marchetto MC, Deng W, Moran JV, Gage FH. 2005. Somatic mosaicism in neuronal precursor cells mediated by L1 retrotransposition. *Nature* 435(7044):903-910.
- Murchison EP, Partridge JF, Tam OH, Cheloufi S, Hannon GJ. 2005. Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(34):12135-12140.
- Nagy A, Rossant J, Nagy R, Abramow-Newerly W, Roder JC. 1993. Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(18):8424-8428.
- Nozawa K, Maehara K, Isobe K. 2001. Mechanism for the reduction of telomerase expression during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 276(25):22016-22023.
- O'Shea KS. 2004. Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biology of reproduction* 71(6):1755-1765.
- Pan G, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D. 2006. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *Faseb J* 20(10):1730-1732.
- Peaston AE, Evsikov AV, Graber JH, de Vries WN, Holbrook AE, Solter D, Knowles BB. 2004. Retrotransposons regulate host genes in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Dev Cell* 7(4):597-606.
- Pericuesta E, Ramirez MA, Villa-Diaz A, Relano-Gines A, Torres JM, Nieto M, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals. *Reprod Biol Endocrinol* 4:5.
- Rakyan VK, Chong S, Champ ME, Cuthbert PC, Morgan HD, Luu KV, Whitelaw E. 2003. Transgenerational inheritance of epigenetic states at the murine Axin(Fu) allele occurs after maternal and paternal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5):2538-2543.
- Ramirez MA, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Moreira P, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2006. Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells. *Reprod Biol Endocrinol* 4:55.
- Ramirez MA, Pericuesta E, Fernandez-Gonzalez R, Pintado B, Gutierrez-Adan A. 2007. Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies. *Int J Dev Biol* 51(5):397-407.
- Razin A, Riggs AD. 1980. DNA methylation and gene function. *Science (New York, NY)* 210(4470):604-610.
- Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, Trounson A, Bongso A. 2000. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* 18(4):399-404.
- Ritz JM, Kuhle O, Riethdorf S, Sipos B, Deppert W, Englert C, Gunes C. 2005. A novel transgenic mouse model reveals humanlike regulation of an 8-kbp human TERT gene promoter fragment in normal and tumor tissues. *Cancer Res* 65(4):1187-1196.
- Robey PG. 2000. Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 105(11):1489-1491.

- Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. 2006. Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes. *Nat Med* 12(11):1259-1268.
- Saini A, Stewart CE. 2006. Adult stem cells: the therapeutic potential of skeletal muscle. *Current stem cell research & therapy* 1(2):157-171.
- Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. 2002. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Developmental biology* 241(1):172-182.
- Slack JM. 2000. Stem cells in epithelial tissues. *Science (New York, NY)* 287(5457):1431-1433.
- Svoboda P, Stein P, Anger M, Bernstein E, Hannon GJ, Schultz RM. 2004. RNAi and expression of retrotransposons MuERV-L and IAP in preimplantation mouse embryos. *Developmental biology* 269(1):276-285.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131(5):861-872.
- Takahashi K, Yamanaka S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126(4):663-676.
- Takakura M, Kyo S, Inoue M, Wright WE, Shay JW. 2005. Function of AP-1 in transcription of the telomerase reverse transcriptase gene (TERT) in human and mouse cells. *Molecular and cellular biology* 25(18):8037-8043.
- Takakura M, Kyo S, Kanaya T, Hirano H, Takeda J, Yutsudo M, Inoue M. 1999. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells. *Cancer Res* 59(3):551-557.
- Takakura M, Kyo S, Sowa Y, Wang Z, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Inoue M. 2001. Telomerase activation by histone deacetylase inhibitor in normal cells. *Nucleic Acids Res* 29(14):3006-3011.
- Tanaka TS. 2009. Transcriptional heterogeneity in mouse embryonic stem cells. *Reprod Fertil Dev* 21(1):67-75.
- Tang DG, Tokumoto YM, Apperly JA, Lloyd AC, Raff MC. 2001. Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science (New York, NY)* 291(5505):868-871.
- Taruscio D, Mantovani A. 2004. Factors regulating endogenous retroviral sequences in human and mouse. *Cytogenet Genome Res* 105(2-4):351-362.
- Taupin P. 2006. Derivation of embryonic stem cells for cellular therapy: challenges and new strategies. *Med Sci Monit* 12(4):RA75-78.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)* 282(5391):1145-1147.
- Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H. 2008. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* 135(5):909-918.
- Tsai JY, Silver LM. 1991. Escape from genomic imprinting at the mouse T-associated maternal effect (Tme) locus. *Genetics* 129(4):1159-1166.
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH. 1998. Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20(2):116-117.

- Ward CM, Barrow KM, Stern PL. 2004. Significant variations in differentiation properties between independent mouse ES cell lines cultured under defined conditions. *Experimental cell research* 293(2):229-238.
- Weissman IL. 2000. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100(1):157-168.
- Yamanaka S. 2008. Induction of pluripotent stem cells from mouse fibroblasts by four transcription factors. *Cell proliferation* 41 Suppl 1:51-56.
- Young LE, Beaujean N. 2004. DNA methylation in the preimplantation embryo: the differing stories of the mouse and sheep. *Anim Reprod Sci* 82-83:61-78.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)* 318(5858):1917-1920.

**ANEXO I. Abreviaturas**



## 12. ABREVIATURAS

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**Dpc:** Día después del coito

**EB:** Cuerpo Embrioide

**ERV/MuERV-L:** Retrovirus endógeno/ Retrovirus Endógeno Murino

**Fig.:** Figura

**GFP:** Proteína de Fluorescencia Verde

**hTERT:** Transcriptasa Inversa de la Telomerasa humana

**IAP:** Intracisternal-A particle

**ICM:** Masa Celular Interna

**iPS:** Célula troncal pluripotente inducida

**Kb.:** Kilobase

**LIF:** Factor Inhibidor de Leucemia

**LINE:** Elementos Nucleares móviles Largos y dispersos (long terminal repeats)

**LTR:** Repeticiones Terminales Largas

***mTert*:** Transcriptasa Inversa de la Telomerasa murina

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**RE:** Elemento Retrotrasponible

**RT:** Retrotrasposón

**SINE:** Elementos Nucleares móviles Cortos y dispersos (short interspersed nuclear elements)

**TERT:** Transcriptasa Inversa de la Telomerasa (general)



## **ANEXO II. Publicaciones**



**Publicaciones relacionadas con la Tesis:**

1. AUTORES/AS: **Eva Pericuesta**, Miguel Ángel Ramírez, Ana Villa Diaz, Aroa Relaño Gines, Juan Maria Torres, Marta Nieto, Belén Pintado, Alfonso Gutiérrez-Adán.

**TÍTULO:** “*The proximal promoter region of mTert is sufficient to regulate telomerase activity in ES cells and transgenic animals*”

**REF. REVISTA/LIBRO:** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006 4(5):1-12.

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2006

2. AUTORES/AS: Miguel Ángel Ramírez, **Eva Pericuesta**, Raúl Fernández-González, Pedro Moreira, Belén Pintado and Alfonso Gutiérrez-Adán

**TÍTULO:** “*Transcriptional and post-transcriptional regulation of retrotransposons IAP and MuERV-L affect pluripotency of mice ES cells*”

**REF. REVISTA/LIBRO:** *Reproductive Biology and Endocrinology* 2006, 4:55-63 **CLAVE:** A

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2006

3. AUTORES/AS: **Eva Pericuesta**, Miguel Ángel Ramírez , Raúl Fernández-González, Belén Pintado, and Alfonso Gutiérrez-Adán.

**TÍTULO:** “*Inadvertent presence of pluripotent cells in monolayers derived from differentiated embryoid bodies*”

**REF. REVISTA/LIBRO:** *The International Journal of Developmental Biology* 51:397-408; 2007

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2007

4. AUTORES/AS: **Eva Pericuesta**, Miguel A. Ramírez, Raúl Fernández-González and Alfonso Gutiérrez-Adán.

**TÍTULO:** “*Incomplete Differentiation of Embryonic Stem Cell: a Risk of Teratoma Formation in Regenerative Medicine*”.

**REF. REVISTA/LIBRO:** *In: Stem Cell Applications in Disease and Health*. Editors: W.B. Burnside et al, pp. 243-252.2008. Nova Science Publishers, Inc

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2008

5. AUTORES/AS: **Eva Pericuesta**, Miguel Ángel Ramírez, Raúl Fernández-González, Miriam Pérez-Crespo, Juan de Dios Hourcade, Pablo Bermejo, Dimitrios Rizos, and Alfonso Gutiérrez Adán

**TÍTULO:** *In: Telomere lengthening from oocyte to embryonic stem cell*

**REF. REVISTA/LIBRO:** *Telomeres: Function, Shortening and Lengthening* ISBN 978-1-60692-350-4; Editor: Leonardo Mancini, Chapter 12 pp. © 2009 Nova Science Publishers, Inc.

**FECHA PUBLICACIÓN:** *pendiente de publicar*

### **Otras publicaciones**

6. AUTORES/AS: Raúl Fernández-Gonzalez, Pedro Nuno Moreira, Miriam Pérez Crespo, Manuel Sánchez-Martín, Miguel Angel Ramírez, **Eva Pericuesta**, Ainhoa Bilbao, Pablo Bermejo-Alvarez, Juan de Dios Hourcade, Fernando Rodriguez de Fonseca, and Alfonso Gutiérrez-Adán.

**TÍTULO:** *“Long-Term Effects of Mouse Intracytoplasmic Sperm Injection with DNA-Fragmented Sperm on Health and Behavior of Adult Offspring”*.

**REF. REVISTA/LIBRO:** *Biology of Reproduction*. 2008 Jan 78, 761–772

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2008

7. AUTORES/AS: Miguel Angel Ramírez, Raúl Fernández-González, Miriam Pérez-Crespo, **Eva Pericuesta**, and Alfonso Gutiérrez-Adán.

**TÍTULO:** *“Effect of stem cell activation, culture media of manipulated embryos, and site of embryo transfer in the production of FO embryonic stem cells mice”*

**REF. REVISTA/LIBRO:** *Biology of reproduction*

**FECHA PUBLICACIÓN:** 2009 (0006-3363 Print).