

Tesis Doctoral

Las células madre pluripotentes son propagadas en un medio de cultivo novedoso que preserva sus propiedades fundamentales y aumenta su proliferación, asociada a la presencia de una isoforma de fibronectina que incluye el exón EDA

Losino, Noelia Ivana

2013-03-19

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Losino, Noelia Ivana. (2013-03-19). Las células madre pluripotentes son propagadas en un medio de cultivo novedoso que preserva sus propiedades fundamentales y aumenta su proliferación, asociada a la presencia de una isoforma de fibronectina que incluye el exón EDA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Losino, Noelia Ivana. "Las células madre pluripotentes son propagadas en un medio de cultivo novedoso que preserva sus propiedades fundamentales y aumenta su proliferación, asociada a la presencia de una isoforma de fibronectina que incluye el exón EDA". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-03-19.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Las células madre pluripotentes son propagadas en un medio de cultivo novedoso que preserva sus propiedades fundamentales y aumenta su proliferación, asociada a la presencia de una isoforma de fibronectina que incluye al exón EDA

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Noelia Ivana Losino

Director de tesis: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Consejero de Estudios: Dra. Adali Pecci

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre

Buenos Aires, 2013

Las células madre pluripotentes son propagadas en un medio de cultivo novedoso que preserva sus propiedades fundamentales y aumenta su proliferación, asociada a la presencia de una isoforma de fibronectina que incluye al exón EDA

Resumen

Las células madre (CM) pluripotentes, entre ellas, las CM embrionarias (CME) y CM pluripotentes inducidas (CMPI) son capaces de propagarse indefinidamente en cultivo y de diferenciarse a todos los tipos celulares del organismo. Encontramos un medio de cultivo que permite su propagación, preservando sus propiedades básicas, evaluadas por análisis de expresión de marcadores y diferenciación *in vitro* e *in vivo*; y aumentando paralelamente su proliferación. Este medio es condicionado por una línea celular de granulosa bovina, mitogénico sobre otros tipos celulares, adjudicándose dicho efecto a la fibronectina (FN) que incluye el exón EDA (FN+EDA). En este contexto, decidimos analizar si esta isoforma de FN aumenta la proliferación de las CME. Estudiamos los niveles de proliferación de las CME en presencia de EDA exógeno, mediante dos estrategias. Utilizamos medios condicionados por líneas de fibroblastos embrionarios de ratón genéticamente modificadas, que secretan sólo FN+EDA, FN sin EDA o ambas isoformas. Por otra parte, evaluamos el efecto de un péptido correspondiente a una porción de FN que incluye o no dicho exón. En todos los casos, observamos que la presencia de este dominio produjo un aumento en la proliferación en CME de ratón y humanas, evaluada por MTT, cristal violeta y ensayos de sanado de herida. Esperamos que nuestros hallazgos contribuyan al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación de CM y a la optimización de sus condiciones de cultivo.

Palabras clave

Células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, auto-renovación, pluripotencia, proliferación, medio condicionado, fibronectina

Pluripotent stem cells are propagated in a novel culture medium that preserves their essential properties and increases their proliferation rate, associated to the presence of a fibronectin isoform that includes EDA exon

Summary

Pluripotent stem cells, which include Embryonic Stem Cells (ESC) and induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) can be propagated indefinitely in culture and are able to differentiate into all cell types of the organism. We found a culture medium that allows their propagation, preserving their basic properties, evaluated by analysis of marker gene expression and *in vitro* and *in vivo* differentiation protocols. This medium also increased pluripotent stem cells' proliferation. This is a medium conditioned by a bovine granulosa cell line, previously reported to be mitogenic for other cell types, ascribing this effect to fibronectin (FN) containing EDA exon (FN+EDA). In this context, we decided to study if this FN isoform increases the proliferative rate of ESC. We studied the mitogenic effect on ESCs in the presence of exogenous EDA, by two strategies. We used conditioned media from genetically modified lines of mouse embryonic fibroblasts that secrete only FN+EDA, FN without EDA or both isoforms. Furthermore, we evaluated the effect of a peptide corresponding to a portion of FN comprising or not EDA exon. In all cases, we observed that the presence of this domain resulted in an increase in the proliferation rate of both mouse and human ESC, assessed by MTT, crystal violet, and wound healing assays. We hope that our findings contribute to the understanding of the molecular mechanisms involved in the proliferation of pluripotent stem cells and optimization of culture conditions.

Keywords

Embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, self-renewal, pluripotency, proliferation, conditioned medium, fibronectin

Los resultados presentados en este trabajo forman parte de las siguientes publicaciones:

- Losino N., Luzzani, C., Solari, C., Boffi, J., Louis Tisserand, M., Sevlever, G., Barañao, L. and Guberman, A. (2010). **Maintenance of Murine Embryonic Stem Cells' Self-Renewal and Pluripotency with Increase in Proliferation Rate by a Bovine Granulosa Cell Line-Conditioned Medium.** *Stem Cells and Development*. 2011 Ago, 20 (8): 1439-1449. Epub 2011 Jan 12. Online Ahead of Editing: December 2, 2010. DOI: 10.1089, cd.2010.0336. ISSN: 1547-3287
- Claudia Solari; Noelia Losino; Carlos Luzzani; Ariel Waisman; Carolina Bluguermann; Maria Questa; Gustavo Sevlever; Santiago Miriuka; Lino Barañao; Alejandra Guberman (2011). **Induced Pluripotent Stem Cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011 Jul 1; 410 (2): 252-7. Epub 2011 May 30. ISSN: 0006-291X

Asimismo, los resultados de la parte 2 componen un manuscrito que se encuentra en etapa de evaluación:

- Losino, Waisman, Solari, Luzzani, Fernandez Espinosa, Sassone, Muro, Miriuka, Barañao, and Guberman **EDA-containing fibronectin increases proliferation of embryonic stem cells.** En revisión, enviado a *Stem Cells and Development*.

Agradecimientos

Con mucha alegría y porque los quiero mucho, quiero agradecer a mi familia, a Diego, a su familia y a mis amigos a los que estuvieron, a los que están y estarán, porque siempre van a estar en mis recuerdos y en mi corazón. Siempre me mostraron su interés en mi profesión e intentaron entender, porque no todos entienden lo que hago.

Gracias vieja! a tu manera me ayudaste a poder seguir adelante con mi formación durante toda mi vida. Siempre valoraste mucho el estudio, y nunca faltó tu consejo para seguir adelante.

Gracias Ro, Lea y Emi! Porque estuvieron siempre presente, supieron acompañarme y ayudarme.

Y que puedo decir de Diego, gracias amor! realmente supiste acompañarme en los últimos momentos de mi doctorado, donde se me presentaron muchos momentos de dedicación a mi formación. Siempre me alentaste, apoyaste y hasta fuiste mi inspiración. Me acompañaste viéndome estudiar, analizando resultados, escribiendo mi tesis y todas estas tareas que me hacen crecer día a día. Además, siempre te alegraste y me felicistaste por todos mis logros, y hasta hemos salido para festejarlo. Realmente estoy muy agradecida y feliz, sos un muy buen compañero en todos los sentidos, sos un novio increíble. Te quiero mucho!

Quiero agradecerle con mucho amor a mi amiga Aymy porque siempre estuvo conmigo, bancándome con todo, siempre entendió y acompañó en mi formación. Siempre alentándome y felicitándome por mis participaciones en los congresos, cursos y publicaciones. También a Cris, que siempre supo entenderme. Los dos, siempre supieron valorar lo que hago, mi pequeño aporte a la ciencia. Me bancaron cuando estuve ausente en mis momentos de mucho trabajo o estudio. Los adoro a los 2!

Con mucha alegría también agradezco mucho a Ale, Clau, Charly, y Ari, mi segunda familia, que cada día crece más, y me acompañaron, ayudaron y escucharon en todo momento y además me rebautizaron Zoe. Los quiero mucho!

Muchísimas gracias Ale! nuestra segunda mama, mi guía y encargada de todos mis logros, cuanta paciencia y dedicación me tuviste jefa! Siempre me alentaste, valoraste y hasta festejaste con mucho entusiasmo nuestros avances. Fue y es muy enorgullecedor ver crecer nuestro laboratorio en todos los sentidos, pero fundamentalmente la buena onda y buena gente que se suma.

Claudette! Gracias! Como puedo describir todo lo que sos para mí. Siempre pude y puedo contar con vos, sos una compañera y amiga maravillosa. Nos imagino unas viejecitas saliendo a tomar un té con Pao, tarde de amigas.

Charlito, Arielucho, muchas gracias!! Que dúo. Siempre me bancaron y ayudaron con toda la onda y ganas. Son mi gran compañía de todos los días.

Gracias Pao! Sos una compañera y amiga muy especial. Me aconsejaste, enseñaste y ayudaste con varios protocolos y con diversas situaciones que surgieron en mi vida. Te quiero mucho!

No quiero olvidarme de nadie, quiero agradecer a todos mis buenos compañeros y amigos de la FCEyN que todavía están o ya no en esta universidad. Especialmente a los grupos de Susana Correa y Mariana Bermudez, Elba Vazquez y Adriana de Siervi, Adali Pecci y Edith Kordon, Martín Monte y Mario Galigniana, Diego Laderach y Daniel Compagno, y al grupo de Eduardo Canepa. También a los chicos, entre ellos Sa, Cari, Chino, Cris Rios, Cris Moiola, Flor, Mechi, Belu, Andrés, Johy, Vicky, Diego, Dieguito, Fer, Fatima, July, Lucas, Lau, Feli, Dai, Tefi, Ale. Muchas gracias por todos los momentos que hemos compartido!

Además, agradezco a Ali, que me ayudo íntegramente con el análisis estadístico con mucha onda, muy buena voluntad y ganas.

También quiero agradecer a Darío Fernández, a Santiago Miriuka y a todo su equipo por colaborar y enseñarme como trabajar con las CMEh, lo cual es bastante difícil, especialmente a Darío que siempre estuvo muy presente y atento a mis necesidades.

Asimismo, quiero darles las gracias a la Dra Anabella Srebrow, Anita y Guille, por la ayuda que siempre nos dieron, las discusiones de experimentos, las charlas de resultados y con los reactivos que nos prestaron.

Además, quiero agradecer los préstamos de los equipos, que gentilmente me permitieron usar los responsables del Departamento de Química Biológica y Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular.

Agradezco al Dr. Michel Puceat, Dr. Sean Wu, y al Dr. Niels Geijsen, ya que nos han dado gentilmente varias de las líneas de células madre murinas utilizadas durante mi doctorado.

También quiero agradecer a Marcelo Schultz, Estefania, Naomi y a al Dr. Gustavo Sevlever y a todo su equipo por el procesamiento y análisis de los teratomas, especialmente a Marcelo quien me enseñó y guió durante el procesamiento de todas las muestras y siempre con muy buena voluntad y mucha onda.

Agradezco especialmente al Dr. Andrés Muro (ICGEB, Trieste, Italia) ya que nos ha facilitado las bacterias BL21 transformadas y las líneas de MEF modificadas genéticamente y con quién discutimos parte de los experimentos de este trabajo.

Al Conicet y a la UBA por financiar mi Beca Doctoral. A las instituciones que financian nuestro trabajo diario: ANPCyT, UBA, CONICET y Biosidus.

Quiero agradecer también a la Universidad de Buenos Aires y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, por ser el lugar donde me formé, mi segundo hogar, y donde se me dio un espacio para realizar esta tesis. Por ser una de las mejores universidades que hay. Por ser pública, laica, de alta calidad y gratuita, que es un derecho que todos tenemos que defender para que cada vez pueda llegar a más gente.

Índice

| | |
|--|----|
| Abreviaturas | 1 |
| Introducción | 4 |
| <i>Obtención de células madre embrionarias murinas</i> | 7 |
| <i>¿Cómo se evalúa la pluripotencia?</i> | 7 |
| <i>Mecanismos moleculares involucrados en la auto-renovación de células madre embrionarias murinas</i> | 8 |
| <i>Vías de transducción de señales involucradas en el mantenimiento del estado indiferenciado</i> | 9 |
| <i>Factores y vías de señalización involucradas en la proliferación</i> | 13 |
| Hipotesis y objetivos | 18 |
| Resultados | |
| <i>Parte 1. Las células madre pluripotentes, pueden ser cultivadas en un medio condicionado por una línea celular de granulosa bovina, preservando sus propiedades esenciales y aumentando su proliferación.</i> | 20 |
| <i>Las células madre pluripotentes inducidas propagadas en el medio condicionado preservan sus propiedades esenciales.</i> | 30 |
| <i>Las células madre embrionarias humanas pueden ser propagadas en el medio condicionado preservando su estado indiferenciado.</i> | 33 |
| <i>La línea celular BGC expresa factores involucrados en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CME.</i> | 35 |
| <i>El medio condicionado aumenta la proliferación de las células madre embrionarias.</i> | 38 |
| <i>Parte2. La isoforma de fibronectina que incluye EDA aumenta la proliferación de las células madre pluripotentes.</i> | 43 |
| Discusión | 52 |
| Materiales y métodos | 59 |
| Bibliografía | 74 |

Abreviaturas

| | |
|------------------|---------------------------------------|
| α AML | α -actina de músculo liso |
| ADN | Ácido Desoxiribonucleico |
| ADNc | ADN Copia |
| AFP | Alfa-fetoproteína |
| AKT1/PKB | Proteína Kinasa B |
| ANP | Péptido Natriurético Atrial |
| ARN | Ácido Ribonucleico |
| ARNm | ARN mensajero |
| β 3T | β III tubulina |
| BGC | línea celular de granulosa bovina |
| BMP4 | Proteína Morfogénica del Hueso 4 |
| BNP | Péptido Natriurético Cerebral |
| EBs | Cuerpos Embrioides |
| ChIP | Inmunoprecipitación de la Cromatina |
| ChIP-seq | ChIP seguido de secuenciación |
| CHO | <i>Chinese Hamster Ovary</i> |
| CM | Células Madre |
| CME | Células Madre Embrionarias |
| CMEh | CME Humanas |
| CME _m | CME de ratón |
| CMP | Células Madre Pluripotentes |
| CMPI | Células Madre Pluripotentes Inducidas |
| CNP | Péptido Natriurético del Tipo C |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimetil Sulfóxido |
| +EDA | péptido de FN que incluye el exón EDA |
| -EDA | péptido de FN que excluye el exón EDA |
| EDII/ EDI | Exón EDA |
| EIIIB/EIIIA | Exón EDB |
| FAK | Kinasa de adhesión focal |

| | |
|--------------------------|--|
| FDA | Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos |
| FGF | Factor de Crecimiento de Fibroblastos |
| FN | Fibronectina |
| FNc | Fibronectina celular |
| FN EDA ⁺ | isoforma de FN que incluye el exón ED-I o EDA |
| FN EDA ⁻ | isoforma de FN que no incluye el exón ED-I o EDA |
| GP130 | Glicoproteína 130 |
| GSK3 | Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3 |
| HEK | Línea celular human derivada de riñón (Human Embryonic Kidney) |
| LIF | Factor Inhibidor de Leucemia |
| LIFR | Receptor de LIF |
| MC | Medio Condicionado por la línea BGC (excepciones se especifican) |
| MC-MEF EDA ^{wt} | MC por la línea MEF EDA <i>wt</i> |
| MC-MEF EDA ⁺ | MC por la línea MEF EDA ⁺ |
| MC-MEF EDA ⁻ | MC por la línea MEF EDA ⁻ |
| MC-HEK | MC por la línea HEK |
| MCI | Macizo Celular Interno |
| MD | Medio de Diferenciación |
| MEC | Matriz Extracelular |
| MEF | Fibroblastos Embrionarios de ratón |
| MEF EDA ⁺ | MEF que solo secretan FN EDA ⁺ |
| MEF EDA ⁻ | MEF que solo secretan FN que excluye EDA |
| MEF EDA ^{wt} | MEF que expresan ambas isoformas de FN |
| MEFi | MEF irradiados |
| Mh | MPh sin FGF2 |
| MP | Medio de Propagación Estándar |
| MPh | MP para CME h suplementado con FGF2 |
| MP-LIF | MP para CMEm sin el agregado de LIF y en celular diferente |
| NPR-A | Receptor del Péptido Natriurético del Tipo A |
| NPR-B | Receptor del Péptido Natriurético del Tipo B |
| p130Cas | Sustrato asociado a Crk |
| PCR | Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| PI3K | Fosfoinositol 3-quinasa |
| ROS | Especies Reactivas de Oxígeno |

| | |
|----------------|--|
| RT-PCR | retro transcripción seguida por PCR |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sodio |
| SFB | Suero Fetal Bovino |
| STAT3 | Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3 |
| TGF- β 1 | Transforming Growth Factor – β 1 |

Introducción

La posibilidad de utilizar células madre en el área de la medicina regenerativa, para usos terapéuticos aplicados a diversas patologías en seres humanos, se encuentra en creciente estudio. Debido al potencial de las células madre pluripotentes, de diferenciarse a distintos tipos celulares, éstas podrían utilizarse como sistemas de reparación de diferentes tejidos. Se estima que podrían tratarse disfunciones cardiovasculares producidas por infarto de miocardio ¹⁻⁵, diabetes y enfermedades neurodegenerativas como la enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, así como también lesiones neurológicas, como lesiones de médula espinal consecuencia de traumatismos ⁶. Asimismo, se estima que estas células, modificadas genéticamente, podrían ser usadas como vehículos para terapia génica de diversos tipos de tumores. Si bien, la posibilidad de utilización terapéutica de células madre es una estrategia muy promisoriosa, por el momento hay diversos tipos de dificultades en varios aspectos ⁷⁻⁹, entre los que se encuentran su comportamiento impredecible al ser implantadas y la posibilidad de desarrollo de tumores en los pacientes. Por estas razones es evidente que aún falta seguir estudiando estas células hasta que pueda concretarse su uso clínico.

El inicio del desarrollo de los mamíferos se da con la unión entre el oocito y el espermatozoide en el oviducto materno. La célula así formada, el cigoto, dará origen tanto al embrión como a todas las membranas extraembrionarias necesarias para su desarrollo. A pesar de los grandes avances en la ciencia y la tecnología, todavía desconocemos como a partir de una célula puede formarse un animal completo.

Luego de la fecundación, el desarrollo de un organismo multicelular continúa mediante un proceso denominado segmentación. Ésta consiste en una serie de divisiones mitóticas y el cigoto se divide en numerosas células nucleadas, denominadas blastómeros. Así, el cigoto es dividido primero a la mitad, luego en cuartos, en octavos y así sucesivamente hasta formar una masa compacta de células denominada mórula. La mórula continúa dividiéndose y da origen al siguiente estadio, el blastocisto, que consiste en una capa exterior de células llamada trofoblasto y una capa interna de células denominada macizo celular interno (MCI). Las células del macizo celular interno son las encargadas de generar todos los tipos celulares que constituyen el individuo adulto. Las líneas de células madre embrionarias derivan del macizo celular interno.

El aislamiento, cultivo y mantenimiento de las células madre embrionarias (CME), primero de ratón ^{10, 11} y luego humanas ¹², revolucionó el campo de las terapias

regenerativas mediante la posibilidad de obtener distintos linajes celulares *in vitro* que puedan ser empleados para regenerar tejidos dañados o enfermos ⁴. Debido a esto, uno de los principales focos de investigación en el área son aquellas enfermedades o lesiones en las que existe una población celular definida que podría ser reemplazada.

Diversos estudios en modelos animales demostraron una mejoría en la condición a tratar. Estos incluyen infarto de miocardio ⁵, lesiones en el sistema nervioso central ⁶, diabetes ⁷, retinitis pigmentaria ⁹ y otras patologías. Los avances en este campo hicieron que recientemente se pusieran en marcha los primeros dos estudios clínicos en humanos utilizando células derivadas de CME humanas. Ambos estudios, aprobados por la administración de drogas y alimentos de Estados Unidos (US FDA), tienen como objetivo la inyección en pacientes de progenitores de oligodendrocitos y células epiteliales pigmentarias retinales para tratar, respectivamente, lesiones en la columna vertebral y distintas retinopatías ^{9,10}. Estos estudios iniciales otorgarán información clave que permitirá comenzar a analizar tanto la efectividad como los métodos de administración y bioseguridad del uso de éste tipo de células.

Sin embargo, existen controversias en el uso de las CME humanas. A pesar de ser una fuente promisoría para trasplantes, el uso, modificación y destrucción de embriones humanos para obtener células embrionarias plantea un dilema ético. No obstante, nuevos avances en el área otorgan esperanzas para dejar atrás éstos dilemas. En un trabajo innovador, que revolucionó el área de células madre y llevó a la obtención del premio nobel de medicina este año, lograron reprogramar células de ratón terminalmente diferenciadas a un estadio pluripotente similar al de las CME, mediante la expresión forzada de cuatro factores de transcripción ¹³. El tipo de células así obtenido fue denominado células madre pluripotentes inducidas (CMPI). Un año después, obtuvo resultados similares a partir de fibroblastos humanos ¹⁴, generando así una revolución en la ciencia y proyecciones hacia una futura aplicación de células madre pluripotentes (CMP) en terapias regenerativas, sin el uso de embriones humanos. Este hecho tan remarcable dejó atrás el antiguo dogma de la biología del desarrollo que indicaba que una célula diferenciada no era capaz de volver a un estadio de desarrollo anterior y, por otro lado, generó una alternativa novedosa para el desarrollo de nuevas terapia regenerativas.

Obtención de células madre embrionarias murinas

En 1981, Evans, Kaufman y Martin lograron establecer CME extraídas del macizo celular interno de embriones de ratón preimplantatorios ^{10, 11}. El tipo de células aisladas mostró tener dos propiedades fundamentales. Primero, ante condiciones adecuadas podían ser propagadas indefinidamente, auto-renovarse. En un principio, estas condiciones implicaban el cultivo de estas células sobre una capa nutricia de células (*feeder layer*). Actualmente utilizada y que consiste en una monocapa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) irradiados para evitar su proliferación, la cual aporta factores clave para el mantenimiento del estado indiferenciado. El fenotipo inmortal de las CME de ratón (CME_m) mantenidas en estas condiciones, asociado al hecho de que éstas células presentan alta expresión de telomerasa ¹⁵, permite su cultivo por períodos de tiempo indefinidos. Cuando las CME se diferencian, esta característica se pierde y las células son susceptibles a mecanismos de envejecimiento celular (límite de Hayflick ¹⁶), como está documentado para otros cultivos primarios no transformados. La segunda propiedad observada fue que las CME retenían su pluripotencia y eran capaces de diferenciarse a la misma variedad de tipos celulares que aquellos formados en el embrión a partir del MCI.

Uno de los primeros clones de células madre de ratón que fueron desarrolladas fue la línea ES-D3, y ha sido ampliamente utilizada como modelo celular para estudiar la diferenciación *in vitro*, y analizar la organización temprana de las células dentro de los cuerpos embriodes.

El campo de las células madre embrionarias dio un gran avance cuando en 1998 Thompson y colaboradores lograron el aislamiento y cultivo de células madre embrionarias humanas a partir de blastocistos de descarte producidos por fertilización *in vitro* con fines clínicos ¹². Estos blastocistos fueron donados con el consentimiento informado de los progenitores y la aprobación de la junta ética del instituto en donde se desarrollaron. Este hecho contribuyó al estudio del desarrollo temprano de seres humanos y abrió las puertas a una posible utilización de estas células en terapias regenerativas.

¿Cómo se evalúa la pluripotencia?

Existen distintas formas de analizar la pluripotencia de las CME. La prueba más rigurosa consiste en evaluar su habilidad para contribuir en la línea germinal y en todos los tejidos de un animal adulto luego de ser inyectadas en blastocistos receptores, formando

animales quimera. Sin embargo, esta metodología no puede utilizarse en CME humanas (CMEh) por cuestiones éticas. Una alternativa muy utilizada para evitar esto consiste en la inyección de CME, tanto de ratón como humanas, en ratones inmunosuprimidos, en los que forman tumores denominados teratomas. La habilidad de las CME inyectadas de generar tumores que contengan distintos tipos celulares derivados del endodermo, mesodermo y ectodermo es indicativa de su pluripotencia. Existen también métodos *in vitro* para analizar la pluripotencia de las CME, como la formación de cuerpos embrioides, en los que se analiza la presencia de las tres capas germinales¹⁷ o la diferenciación dirigida a linajes específicos.

El análisis funcional del potencial de diferenciación de las CME es la prueba más confiable de sus propiedades de célula madre, pero también debe estudiarse el mantenimiento del estado indiferenciado a lo largo del tiempo en cultivo. Para ello, se analiza la expresión de marcadores moleculares propios del estado indiferenciado. Muchos de estos marcadores son factores de transcripción expresados en el MCI y en las CME, que han demostrado roles importantes en su mantenimiento. Los marcadores más importantes y mejor caracterizados incluyen a los factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox2^{18, 19}. Otros marcadores incluyen alta expresión de TERT, que es la subunidad catalítica de la telomerasa, y al SSEA-1, para CME de ratón. Asimismo, se utilizan marcadores moleculares específicos para analizar las células diferenciadas. Entre estos se encuentran β III tubulina que marca el linaje de ectodermo, Brachyury que identifica derivados del mesodermo y alfafetoproteína (AFP) que marca el linaje del endodermo^{13, 20}. Por otro lado, Cdx2 y Gata6 marcan a los linajes del trofoectodermo y del endodermo primitivo, respectivamente¹⁸. La existencia de marcadores moleculares permite el análisis del estado indiferenciado así como de la diferenciación de CMEs y es una de las herramientas de uso habitual en el trabajo con estas células.

Mecanismos moleculares involucrados en la auto-renovación de células madre embrionarias murinas

Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog forman una red transcripcional a través de la cual mantienen la expresión de genes necesarios para el mantenimiento del estado indiferenciado, a la vez que inhiben la expresión de genes necesarios para la diferenciación²¹. En esta red, los tres factores de transcripción se regulan tanto a sí mismos como a otros genes. La frecuencia con la que estos factores co-localizan en una misma

región promotora es muy alta, lo que sugiere que interactúan entre sí para regular la expresión de sus genes blanco. Entre los genes a los que se une Oct4, la mitad de ellos también se une a Sox2. Más del 90% de las regiones promotoras unidas por Oct4 y Sox2 también se unen a Nanog. Oct4, Sox2 y Nanog también se unen a sus propios promotores, formando una red autoregulada e interconectada que mantiene la identidad de célula madre ²².

El factor de transcripción Oct4 pertenece a la familia de factores con dominios POU y reconoce una secuencia específica en el ADN. La expresión de este factor se observa *in vivo* en el estadio de embrión de cuatro células, luego se encuentra en células pluripotentes como las CME del MCI o las células germinales ²³. *In vivo*, la interrupción de la expresión de Oct4 por mutagénesis dirigida genera la pérdida del MCI ²⁴. Los niveles de expresión de Oct4 influyen en gran medida en el fenotipo de las CME; se necesitan niveles precisos de este factor para sostener el fenotipo indiferenciado. La pérdida de la expresión del mismo causa la diferenciación de las CME a trofoectodermo, mientras que su sobreexpresión causa la diferenciación a endodermo primitivo y mesodermo ^{18, 25}. Estos hechos evidencian la importancia de la regulación precisa de la expresión de este factor en el mecanismo molecular por el cual las CME se mantienen indiferenciadas. Se han encontrado diversos genes blanco para Oct4, como *Cdx2* ¹⁸, Sox2 y Nanog ^{23, 26}.

Otro factor importante en el mantenimiento del estado indiferenciado es Sox2. Este factor pertenece a la familia de proteínas HMG (*High Mobility Group*) e interactúa con Oct4 formando un heterodímero que regula la expresión de genes necesarios para mantener el estado indiferenciado. Por otra parte, este complejo también regula la expresión de Nanog ²⁷.

La expresión de Oct4 se observa en el oocito, en el cigoto, luego en las células del MCI, ectodermo primitivo, células germinales primordiales y gametas, por lo que es posible hipotetizar que ésta no se interrumpe a lo largo del ciclo de vida y de ese modo nunca sería necesario reiniciarla. Esto implicaría que durante toda la vida de los organismos, desde el cigoto hasta las gametas producidas por el adulto, prevalezca la expresión de factores asociados a la pluripotencia como *Oct4*, y esta expresión continúe en su descendencia ²⁸.

Vías de transducción de señales involucradas en el mantenimiento del estado indiferenciado

Un creciente número de grupos de científicos utilizan las células madre embrionarias de ratón para desarrollar sus tareas de investigación, considerando además que el uso de las

mismas no está sujeto a regulación legal. Para ello se mantienen cultivos de CME en estado indiferenciado y también se induce su diferenciación hacia los tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias. El medio de cultivo necesario para propagar y mantener en estado pluripotente a estas células es muy costoso debido a la necesidad del agregado de un factor, LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*).

La citoquina LIF activa al factor de transcripción STAT3²⁹ (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*), éste es fosforilado y se transloca al núcleo donde induce la expresión de determinados genes, entre ellos *c-myc*¹⁹. Su actividad es esencial en células madre embrionarias de ratón, para el mantenimiento de sus propiedades esenciales. Como ya mencionamos, estas son la auto-renovación, es decir la proliferación en estado indiferenciado y la pluripotencia, que es la capacidad de generar los distintos tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias^{18, 24, 28, 30} (Figura A).

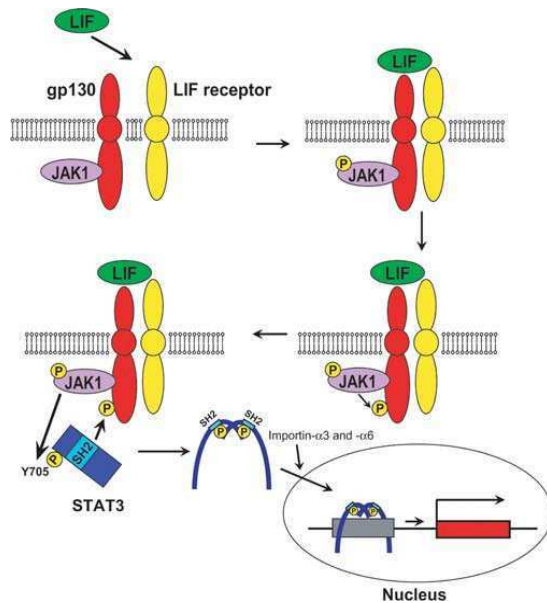


Figura A. Esquema de activación de la vía de STAT3 por la citoquina LIF. Extraído y modificado de Kikyo y colaboradores¹⁹

Contrariamente, el mantenimiento de las células madre embrionarias humanas (CMEh) conservando su pluripotencia es independiente de la vía de STAT3^{24, 30}.

Está reportado que las células similares a fibroblastos que se generan a partir de CME humanas, mediante la activación de la vía de FGF2 expresan IGF2, y este factor estaría involucrado en el mantenimiento de las CME¹⁸.

Los miembros de la familia de factores de transcripción STAT están implicados en funciones celulares con relevancia en múltiples procesos. La señal es desencadenada por diversos estímulos y luego de la transducción de la señal, ésta culmina con la fosforilación de los monómeros STAT, que dimerizan y son activados. Esta activación promueve su

localización principalmente nuclear donde regulan la expresión de numerosos genes^{18, 24}. La actividad de estos factores está modulada a diferentes niveles que involucran modificaciones postraduccionales y/o interacción con otras proteínas^{18, 19, 31, 32}.

La regulación y función de los distintos factores STAT dependen en gran medida del contexto celular. Esto se ilustra claramente con el factor STAT3, que tiene un papel proapoptótico en la regresión del epitelio mamario pero también es un factor anti-apoptótico en células T^{33, 34} y en varias células tumorales³⁵⁻⁴² y, como dijimos anteriormente, es esencial para la proliferación y el mantenimiento de la pluripotencia en células madre embrionarias de ratón.

Uno de los principales blancos transcripcionales de la activación de la vía de STAT3 es el proto-oncogen y factor de transcripción c-myc. El mantenimiento de los niveles de c-myc mediante la utilización de transgenes inducibles resulta en el mantenimiento del estado indiferenciado, aún en ausencia de LIF, indicando que este factor es un blanco importante de la vía LIF/STAT3 en CME de ratón. Una segunda vía que regula los niveles de c-myc involucra a la fosforilación de la glucógeno-sintetasa quinasa 3 (GSK3). Cuando la vía de LIF se inactiva, GSK3 es rápidamente activada y fosforila a c-myc, llevándolo a degradación dependiente de proteasoma (Figura B). Por otro lado, la activación de GSK3 promueve la degradación de Nanog, factor de transcripción clave en el mantenimiento del estado indiferenciado. Trabajos recientes de *ChIP-seq* identificaron que STAT3 se une al promotor de Oct4 y Nanog, otorgando información clave para entender cómo se mantiene la pluripotencia de las CMEm³⁷.

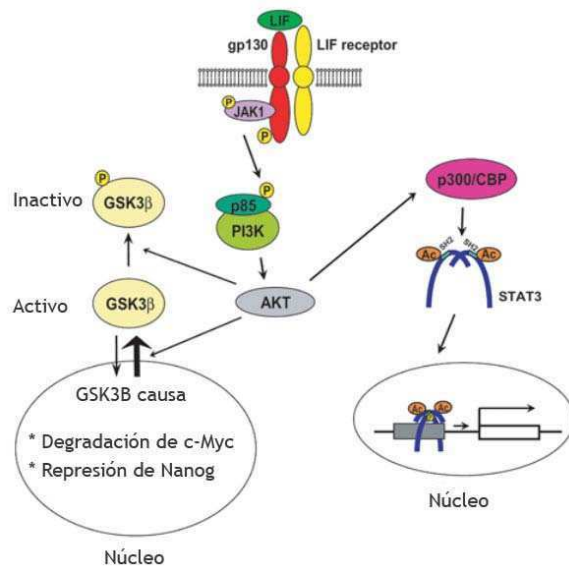


Figura B. Vía de transducción de señales de LIF, PI3K y AKT. Extraído y modificado de Kikyo y colaboradores³⁷.

La vía de señalización de PI3K está involucrada en múltiples procesos celulares, como la proliferación, apoptosis y diferenciación⁴³. Un efector fundamental de esta vía es la proteína quinasa B (PKB)/AKT1. Numerosas evidencias demuestran que la vía de PI3K es crucial para el mantenimiento del estado indiferenciado de estas células. La inhibición de la vía de PI3K/AKT promueve a la diferenciación de las CME de ratón, aún en presencia de LIF⁴⁴. A medida que estas células se diferencian, la actividad de la vía declina, consistente con la importancia de la misma en el mantenimiento de las CME de ratón. Por otro lado, la activación sostenida de la vía mediante la expresión ectópica de mutantes constitutivamente activas retrasa significativamente la diferenciación de CMEm. La vía PI3K/AKT funciona mediante la inhibición de la vía de GSK3, resultando en un aumento de los niveles de c-myc y Nanog, ambos fundamentales en el mantenimiento del estado indiferenciado^{19, 21, 45, 46} (Figura B).

Otra vía implicada en la auto-renovación de las CME de ratón involucra la señalización por proteínas morfogénicas del hueso (BMP), en particular BMP4. Si bien BMP4 generalmente no se agrega como factor recombinante, como es el caso de LIF, está presente en el suero fetal bovino (SFB) en el cual se cultivan las CME de ratón y parece tener efectos importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado. BMP4 actúa promoviendo la expresión de los genes *Id1* e *Id3*, los cuales inhiben la diferenciación neural. El trabajo de Ying y colaboradores⁴⁷ fue el primero en remarcar que la autorenovación de las CMEs tiene que deberse a una serie de eventos coordinados que implican simultáneamente el mantenimiento del estado indiferenciado y el bloqueo de la diferenciación. De esta forma, la presencia de BMP4 inhibe la diferenciación hacia ectodermo neural, que utiliza la vía de ERK, mientras que LIF actuaría inhibiendo la diferenciación hacia los linajes endodermo y mesodermo (Figura C).

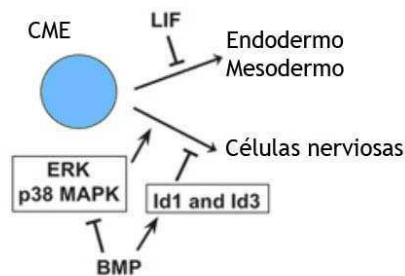


Figura C. Auto-renovación de las CME mediada por citoquinas.
Extraído y modificado de Kikyo y colaboradores³⁷

Factores y vías de señalización involucradas en la proliferación

Actualmente, muchos grupos de investigación abordan el estudio de los mecanismos epigenéticos como la estructura del estado de metilación del ADN que contribuye al proceso de auto-renovación y diferenciación, pero se sabe muy poco acerca de la relación del metabolismo en la auto-renovación y la diferenciación temprana de las CME. Asimismo, las mitocondrias juegan un papel importante en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas y funcionan como un centro coordinador de las señales intrínsecas y extrínsecas para dirigir el crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular ⁴⁸.

Las disfunciones mitocondriales tienen un papel importante en el envejecimiento y en la apoptosis, y contribuyen al desarrollo de un amplio espectro de enfermedades, incluyendo neuro y miopatías. Estudios recientes en CME de ratón y humanas han mostrado que en condiciones de auto-renovación la CME típicamente poseen pocas mitocondrias y están formando un grupo perinuclear que han desarrollado crestas con capacidad oxidativa restringida. En la diferenciación, las CME de ratón y humanas desarrollan crestas numerosas que aumentan en número y generan una red reticular extensa de estructura tubular. Este cambio en la morfología mitocondrial es acompañado por tasas de consumo de oxígeno aumentadas y producción aumentada de ATP, específicamente a través de la fosforilación oxidativa ⁴⁸. En este trabajo demostraron que al atenuar la función mitocondrial, usando CCCP (protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone), se evidencia por una caída en el nivel celular de ATP y el correspondiente aumento en el nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS); se retrasa la velocidad de proliferación en la auto-renovación de CME de ratón y humanas como también en CMPI humanas. El crecimiento de las CME y CMPI en presencia de CCCP disminuye los niveles de ATP en el estado diferenciado causando un retraso en todas las fases del ciclo celular. Aunque la proliferación de las CME y CMPI en estado indiferenciado fue afectada en presencia de CCCP, la pluripotencia fue preservada. En estudios previos han demostrado que en estado indiferenciado, las CME normalmente expresan niveles mayores de genes glucolíticos comparado con las CME diferenciadas ⁴⁸. Estos resultados indican una interesante dicotomía, la auto-renovación de los CME puede requerir la función mitocondrial para la proliferación, mientras que la glucólisis sostiene la regulación de la red pluripotencia co-regulada por Oct4, Nanog y Sox2. Estudios previos habían demostrado que las CME cultivadas bajo condiciones de auto-renovación se caracterizaron por la presencia de mitocondrias punteadas y globulares, junto con el consumo de oxígeno y niveles de ATP reducido. Estos resultados sugirieron que tanto

para la auto-renovación de células CMEh y CMPI la proliferación esta sostenido por la fosforilación oxidativa realizada por los grupos perinucleares de las mitocondrias. En contraste, los CME diferenciadas tienen una red extensa de mitocondrias ramificada y un aumento en el consumo de oxígeno ⁴⁸.

Sin embargo, la proliferación es un proceso celular complejo que involucra diferentes mecanismos y vías de señalización que actúan en su regulación.

Las CME exhiben un ciclo celular muy inusual, caracterizado por una fase G1 corta y una alta proporción de las células en fase S, el cual está asociado con un mecanismo único de regulación del ciclo celular.

El péptido natriurético cerebral (BNP), un miembro de la familia del péptido natriurético, es producido predominantemente en el corazón, y se reportó recientemente que BNP es expresado en los cardiomiocitos derivados de las CME ⁴⁹. Los efectos fisiológicos de los péptidos natriuréticos son iniciados por la unión a dos receptores de guanilato ciclasa particulares; el receptor del péptido natriurético del tipo A (NPR-A), éste es sensible al péptido natriurético atrial (ANP) y BNP; el receptor del péptido natriurético del tipo B (NPR-B), el cual es específico para el péptido natriurético del tipo C (CNP). Además, se ha demostrado que modulan el crecimiento y la proliferación celular. Estudios realizados en distintos tipos celulares mostraron que el ANP y BNP exhiben importantes funciones autócrinas y parácrinas, tales como modulación del crecimiento de miocitos, apoptosis y la proliferación en las células musculoso liso ⁴⁹. Además, se ha encontrado que BNP exógeno puede aumentar la propagación de las CME, sugiriendo la presencia de receptores de péptido natriurético funcionales en células madre embrionarias. Han encontrado que el BNP y su receptor NPR-A se expresan específicamente en CME indiferenciadas, y la señalización de BNP juega un papel importante en el mantenimiento de la proliferación de las células ES ⁴⁹. Se ha reportado que el *knockdown* de BNP, suprime significativamente la proliferación de las CME disminuyendo el porcentaje de las células en fase S y acumulación de las células en las fases G1 y G2/M. El mecanismo implicado en la acumulación de las células en fase G2/M es desconocido, sugiriendo que BNP podría tener un papel en la regulación de la transición G2/M y G1/S en las CME ⁴⁹. Además el *knockdown* de BNP en las CME conduce a una marcada disminución en los niveles de GMPc y una reducción significativa en el nivel del ARNm de NPR-B. Es probable que los niveles reducidos de GMPc en las CME sea un reflejo de los niveles reducidos del ARNm de NPR-B ⁴⁹.

Los desórdenes fibroproliferativos, están caracterizados por un aumento y deposición de proteínas de la la matriz extracelular en los tejidos. La MEC es un complejo altamente dinámico que varía en composición según la ubicación del tejido y el contexto fisiológico. Los diferentes tipos de colágeno son las proteínas de la MEC predominante identificados en lesiones fibróticas y en las enfermedades fibroproliferativas, pero las distintas variantes de fibronectina también están presentes en grandes cantidades y se encuentran en áreas de fibrogenesis activa ⁵⁰⁻⁵².

Las fibronectinas son glicoproteínas de la MEC que juegan múltiples funciones, entre ellas, proliferación ^{53, 54}, adhesión y migración celular durante el desarrollo embrionario, sanado de heridas ⁵⁰⁻⁵² y en la progresión tumoral ⁵⁵.

Las moléculas de FN son dímeros que consisten de subunidades con un peso molecular de 249-280 kDa unidos por dos puentes disulfuro en el extremo carboxilo de la proteína ⁵⁶. Esta glicoproteína puede ser encontrada en forma soluble y en altas concentraciones en el plasma sanguíneo (FN plasmática) ^{50-52, 57}. Existen dos formas de FN, cada una de ellas pudiendo presentar diversas isoformas, fibronectina plasmática, que es soluble y producida únicamente por los hepatocitos y que circula a altas concentraciones, y la fibronectina celular (FNc) producida por un grupo de células durante el desarrollo, en zonas de morfogénesis activa y remodelado de tejido ⁵⁶, es depositada en las fibrillas de la MEC y contiene proporciones variables del dominio extra de tipo A o B (EDA o EDB, respectivamente) ⁵⁰⁻⁵². Una diferencia importante entre FNc y la FN plasmática es que únicamente la FNc puede incluir alguno de los exones EDA o EDB (dominios extra A y B, también denominados EDII/EIIIB y EDI/EIIIA) presentes en una única repetición de tipo III ^{50-52, 56, 57}.

Ciertos componentes de la MEC, como la laminina, aparecieron temprano en la evolución, mientras que la fibronectina, emergió solo en los vertebrados en el sistema circulatorio, principalmente en el endotelio ⁵⁷. La FN se encuentra distribuida en bajas concentraciones, a lo largo de toda la matriz extracelular sintetizada por fibroblastos humanos y condroblastos. La fibronectina celular es una proteína de adhesión que al unirse a los receptores de integrina y componentes del colágeno, media la interacción entre las células y su ambiente ⁵⁶.

La digestión proteolítica de FN reveló múltiples regiones funcionales. El CCBD, dominio C-terminal de unión a heparina (es el dominio de adhesión celular más importante de la FN y contiene el motivo Arg-Gly-Asp (RGD)) que es reconocido por los miembros de

la familia de integrinas de los receptores de adhesión celular incluyendo $\alpha 5\beta 1$, $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha v\beta 6$, y $\alpha 8\beta 1$ ⁵⁵.

Existen evidencias que FN no solo actúa como sustrato de la adhesión celular sino también transduce las señales bioquímicas a través de la membrana plasmática vía receptores de integrinas regulando la proliferación, diferenciación y apoptosis celular ⁵⁵. Las integrinas son glicoproteínas de transmembrana que forman receptores heterodiméricos funcionales, $\alpha\beta$ -receptores; que se unen a ligandos de la MEC o son moléculas de adhesión ancladas a la membrana celular. La activación de las integrinas inicia una cascada de señalización intracelular que regula numerosas funciones celulares, incluyendo migración, proliferación celular, supervivencia y apoptosis ⁵⁸. Estudios genéticos en ratones y peces han destacado un papel fundamental para FN y su receptor primario, la integrina $\alpha 5\beta 1$, en el desarrollo temprano de los vasos sanguíneos y fisio-patologías vasculares. En ratones *knockout* para FN, los embriones mueren el día 9.5 con defectos vasculares severos, igual fenotipo que presentan los ratones *knockout* para $\alpha 5$ ⁵⁷. La integrina $\alpha 5\beta 1$ contiene a la secuencia RGD en su secuencia funcional y es la integrina principal expresada en CME de ratón. Asimismo, es el receptor primario de la fibronectina que se encuentra en la matriz extracelular y en la mayoría de las células, y su expresión es incrementada por su ligando FN ⁵⁸.

La interacción de FN con integrinas estimula la fosforilación de varias proteínas celulares incluyendo FAK y p130Cas y además estimula la activación de la familia de proteínas tirosina quinasa SRC y las quinasas ERK1 y ERK2. Además, FN induce la expresión de ciclina D1 y la subsecuente activación de pRb mediante hiperfosforilación, por lo tanto, media la progresión del ciclo celular a través de la fase G1 ⁵⁵. La FN y el receptor $\alpha 5\beta 1$ juegan un papel crítico en el desarrollo de los vasos sanguíneos en el embrión de ratón y en los cuerpos embrioides diferenciados a partir de las CME ⁵⁸.

Se ha reportado que los cambios conformacionales de FN promovidos por el sustrato, conducen a diferencias en la unión a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y a tener diferentes funciones, cambiando entre la proliferación o diferenciación celular. Asimismo, demostraron que la conformación de FN o de $\alpha 5\beta 1$ puede ser modificada para regular la interacción ligando-integrina y la vía de señalización mediada por la integrina ⁵⁸.

El ARNm de fibronectina es el producto de un único gen ubicado en el cromosoma 2. Las variantes son generadas por splicing alternativo del ARNm precursor o modificaciones post-traduccionales, este proceso es modulado por citoquinas ⁵⁶.

FN posee tres segmentos de *splicing* alternativo; EDA, EDB y IIICS. Los segmentos EDA y EDB cada uno de ellos son codificados por un único exón, y ambos incluyen la repetición de tipo III intacta^{55,56}.

Las variantes de FN que poseen EDA y EDB son generadas por *splicing* alternativo del pre ARNm⁵⁶, y son completamente independientes⁵⁰⁻⁵².

Ya que las FNs que contienen el segmento EDA y/o EDB son altamente expresadas en tejidos proliferativo y migratorio, es probable que las FNs que contienen estos segmentos extra jueguen un papel importante al promover proliferación y migración celular⁵⁵, adhesión, secreción, diferenciación y progresión del ciclo celular⁵⁷. A pesar de la evidencia acumulada para la expresión regulada de las FNs que contienen EDA o EDB *in vivo*, aún no se conocen completamente las funciones biológicas de ambas isoformas^{50-52, 55, 57}. Se sabe que FNc que incluye EDA, además denominada FN embrionaria u oncofetal, es un sustrato importante para la migración, adhesión y diferenciación de los miofibroblastos⁵⁰⁻⁵².

Por otra parte, el dominio EDB es una repetición con homología al tipo III, compuesta de 91 aminoácidos y se encuentra normalmente únicamente en los tejidos embrionarios⁵⁶ y en tumores malignos de mama e hígado⁵⁰⁻⁵².

Ratones con *knockout* simultáneo de ambos exones, EDA y EDB tienen fenotipo letal embrionario similar a aquellos animales *knockout* para FN, lo que resalta la importancia de FNc endógena producida para la formación de los nuevos vasos *in vivo*. Aunque células BAE deficientes en FN son incapaces de ensamblar FN soluble, estas células pueden remodelar FN plasmática cuando es adsorbida en un soporte rígido, en una conformación extendida, parcialmente activa en células madre embrionarias de ratón *knockout* para FN. En este caso, las células *knockout* para FN fueron capaces de ensamblar la FN plasmática agregada exógenamente, cuando las células fueron plaqueadas sobre FN plasmática adsorbida o laminina, pero no cuando fueron plaqueadas sobre vitronectina⁵⁷.

Se reportó que las isoformas que contienen el segmento EDA eran más potentes que aquellas que carecían del mismo al promover la adhesión y migración celular. Este incremento es causado por la unión aumentada de EDA a la integrina $\alpha 5\beta 1$. Ha sido reportado en cultivos de células CHO, que el segmento EDA, pero no EDB, potencia la habilidad de las FNs para promover la proliferación celular⁵⁵.

Los factores fisiológicos o patológicos que inducen la producción de FN que incluye EDA están escasamente definidos, aunque los mecanismos moleculares que regulan el

splicing alternativo han sido bien descritos. Interesantemente, uno de los factores que promueven la inclusión de EDA es TGF- β 1, una citoquina implicada en desórdenes fibroproliferativos. El tratamiento de fibroblastos humanos normales con cantidades picomolares de TGF- β produce un aumento de 2 ó 3 veces de FNc que incluye EDA relativo a FN total, asimismo, FNc que incluye EDA es necesario para la inducción de un fenotipo miofibroblástico a través de TGF- β . Esto demuestra que TGF- β está presente en los sitios de fibrosis y es un factor de crecimiento pro-fibrótico; una de las vías mediante la cual TGF- β promueve la fibrogénesis podría ser vía la inducción de FNc que incluye EDA, que a su vez promueve la diferenciación de las células mesenquimales a miofibroblastos fibrogénicos ⁵⁰⁻⁵²

Considerando el promisorio potencial terapéutico de las células madre embrionarias ^{1-5, 7, 8} y teniendo en cuenta que un importante factor limitante es el mantenimiento de las mismas en cultivo preservando su estado pluripotente ^{4, 7, 8, 59}, resulta de importancia la comprensión de los mecanismos implicados tanto en el mantenimiento de sus propiedades fundamentales como en su proliferación. Asimismo, como aporte al conocimiento básico para uso general de la comunidad científica, podría ser de gran relevancia la identificación de mecanismos alternativos involucrados en procesos fundamentales.

Hipótesis y Objetivos

Resultados preliminares de nuestro grupo indican que sería posible propagar células madre embrionarias en un medio de cultivo condicionado por una línea celular de granulosa bovina (BGC) ⁶⁰, establecida anteriormente. La línea BGC secreta gran diversidad de factores, con lo cual podríamos estar posibilitando el mantenimiento de las células a través de un mecanismo novedoso. Por otra parte, observaciones iniciales parecen indicar que las células propagadas en este medio presentan colonias de mayor tamaño que cuando son cultivadas en medio de proliferación estándar. Esta línea de células de granulosa bovina fue originalmente seleccionada por sus propiedades mitogénicas sobre células de la misma línea y sobre cultivos primarios de células de la granulosa ⁶¹. Este efecto mitogénico fue adjudicado a una isoforma particular de fibronectina, FNA EDA+, presente en el medio condicionado ⁶². Si bien, muchos de los factores expresados por la línea BGC podrían ser responsables de sus efectos sobre CME, aún no se han identificado con certeza todos los

factores que podrían estar implicados. Incluso, podría haber nuevos factores que involucren mecanismos novedosos y que participen de manera individual o concertada.

Sobre la base de las evidencias presentadas, planteamos las siguientes hipótesis:

1. Existen factores en el medio condicionado (MC) secretados por la línea BGC que permiten la propagación de CME manteniendo sus propiedades esenciales; auto-renovación, es decir su capacidad de proliferación en estado indiferenciado y pluripotencia, que es la capacidad de diferenciarse a tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias.
2. El MC produce un incremento en la tasa de proliferación de las CME.
3. Una isoforma de FN en particular, secretada por las BGC y presente en el medio condicionado, FN EDA+, sería responsable del aumento en la proliferación de las CME producido por el MC.

El objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de las propiedades fundamentales y en la proliferación de CME.

Basándonos en el objetivo general y en las hipótesis postuladas, planteamos los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar si diferentes líneas de CME pueden ser cultivadas en el medio condicionado por la línea de granulosa bovina preservando sus propiedades esenciales: auto-renovación y pluripotencia.
- Analizar la expresión de factores que podrían ser responsables del mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CME en la línea condicionadora.
- Estudiar la proliferación de las CME cultivadas en el medio condicionado.
- Investigar el efecto de la FN EDA+ sobre la proliferación de las CME.

Resultados

Parte1

Las células madre pluripotentes, pueden ser cultivadas en un medio condicionado por una línea celular de granulosa bovina, preservando sus propiedades esenciales y aumentando su proliferación

Con el propósito de estudiar si el medio condicionado (MC) por la línea celular de granulosa bovina BGC permite cultivar las células madre embrionarias, en primer lugar trabajamos con la línea de CME de ratón (CME_m) CGR8. En nuestros primeros ensayos, cultivamos estas células, tanto en su medio de propagación habitual suplementado con LIF (MP), como en el medio condicionado mencionado, para estudiar si éstas mantienen sus propiedades básicas a lo largo de los sucesivos pasajes. Como mencionamos anteriormente, las propiedades básicas que tienen las CME son la auto-renovación, es decir la proliferación en estado indiferenciado y la pluripotencia, que es la capacidad de generar todos los distintos tipos celulares. Esta última se evalúa analizando la diferenciación a tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo^{45, 63-65}.

Las CME fueron cultivadas sobre gelatina para evitar la interferencia que introducen las células de la *feeder layer* al sistema, tanto si el medio de cultivo utilizado fue el MP o el MC. Observamos que las CME propagadas en MC y en MP mostraron la morfología típica de colonia de CME indiferenciada (Figura 1).

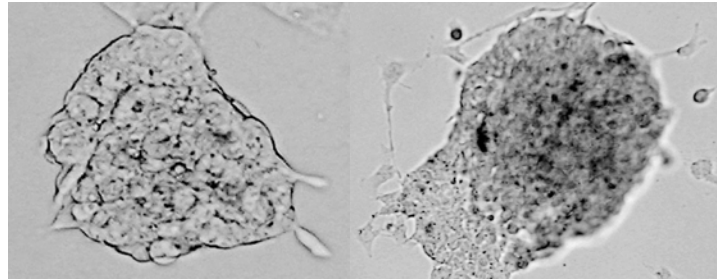


Figura 1. Las CME cultivadas en MC presentan morfología similar a las propagadas en MP estándar. Fotomicrografía de colonias propagadas en los distintos medios. Las CME CGR8 fueron propagadas al menos tres pasajes en el medio correspondiente. Derecha: CME cultivadas en MP, izquierda: CME cultivadas en MC. Las células propagadas en MC forman colonias con la morfología típica de célula madre embrionaria de ratón.

A continuación, para estudiar si las CME podían ser propagadas en el MC, evaluamos una de las propiedades básicas, la auto-renovación. Para ello, las CME fueron cultivadas sobre gelatina con el MP o el MC al menos tres pasajes o 7 días. Luego extrajimos ARN de cada condición de cultivo, preparamos ADNc y evaluamos por RT-PCR la expresión de los marcadores propios de estado indiferenciado de las CME, como Oct4, Sox2, Nanog, Ecat1, Rex1 y Klf4⁶⁶⁻⁶⁸. Asimismo, fijamos colonias de CME y analizamos la expresión de Oct4 y SSEA-1, también marcadores de estado indiferenciado, mediante inmunofluorescencia.

Observamos que las CME de la línea CGR8 propagadas tanto en MP como en MC expresaron los marcadores de estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Ecat1, Rex1 y Klf4, incluso en el pasaje 17, un pasaje avanzado (Figura 2).

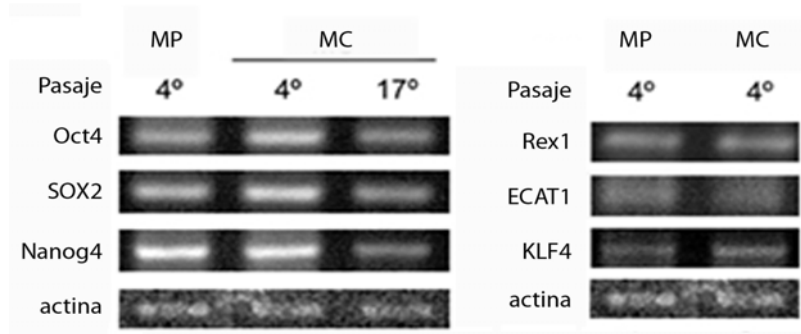


Figura 2. Las CME cultivadas en MC expresan genes marcadores de estado indiferenciado. Las CME CGR8 fueron cultivadas en MP o MC durante al menos 3 pasajes o 7 días. Las CME en ambos medios presentaron expresión de genes marcadores de estado indiferenciado (Oct4, Sox2, Nanog, Ecat1, Rex1 y Klf4). Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

Asimismo, observamos por Inmunofluorescencia, la presencia de los marcadores de estado indiferenciado Oct4 y SSEA-1, en las colonias cultivadas en ambos medios (Figura 3).

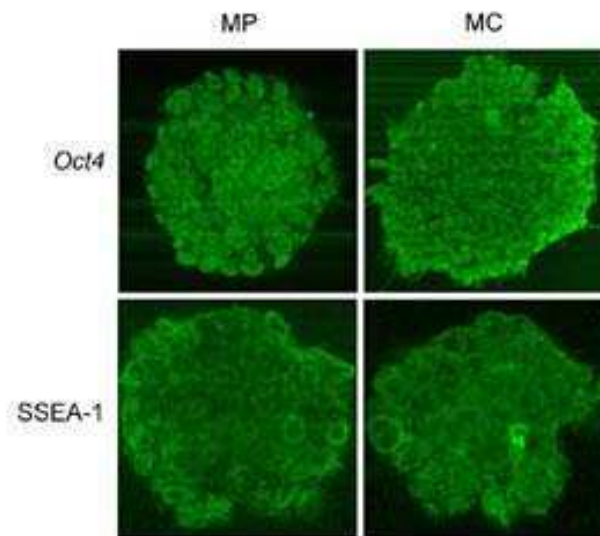


Figura 3. Las CME cultivadas en MC expresan genes marcadores de estado indiferenciado. Las CME CGR8 fueron cultivadas en MP o MC al menos 3 pasajes o 7 días. Se evaluó la presencia de marcadores de estado indiferenciado (Oct4 y Ssea-1) mediante Inmunofluorescencia. Fotomicrografía de colonias representativas de CME cultivadas en MP o MC.

Para evaluar la pluripotencia, la otra propiedad fundamental de las CME, estudiamos su capacidad para diferenciarse a tipos celulares pertenecientes a las tres capas germinales, mediante un protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigido.

Para ello, cultivamos las CME CGR8 sobre gelatina durante tres pasajes en MP o MC, luego, mediante el protocolo de *Hanging drop* indujimos su diferenciación. Como observamos en la Figura 4, al inducirse la diferenciación de las CME, ambas poblaciones formaron cuerpos embrioides (EBs) de morfología similar.

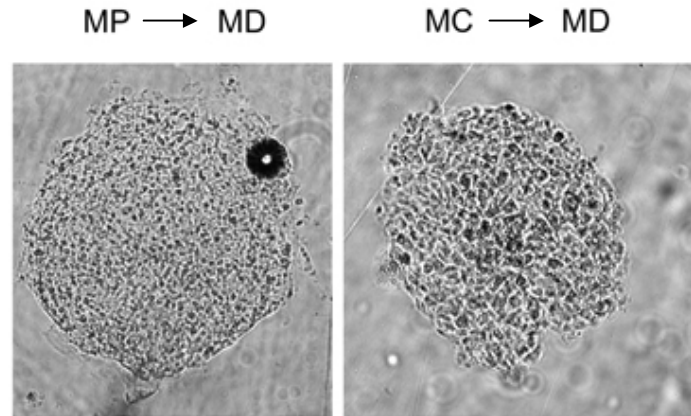


Figura 4. Las CME previamente propagadas en MP y MC formaron cuerpos embrioides de morfología similar. Las células CGR8 propagadas en MC conservan su capacidad de formar EBs al ser sometidas a un protocolo de diferenciación *in vitro*. La morfología de los EBs es semejante en las células propagadas en ambos medios.

Estudiamos la pluripotencia de las CME propagadas en MC evaluando la expresión de los marcadores de las tres capas embrionarias como Brachyury, gen marcador de mesodermo; α -fetoproteína, gen marcador de endodermo; Mesp1 y 2, Isl y, miocardina, genes marcadores de mesodermo tardío. Para ello, extrajimos ARN de los cuerpos embrioides provenientes de CME previamente propagadas en MC, preparamos ADNc y mediante RT-PCR detectamos la expresión de los genes marcadores de diferentes linajes mencionados.

Observamos que los cuerpos embrioides de las CME CGR8 propagadas en MC sometidas al protocolo de *Hanging drop in vitro*, expresan genes marcadores de las 3 capas embrionarias (Figura 5).

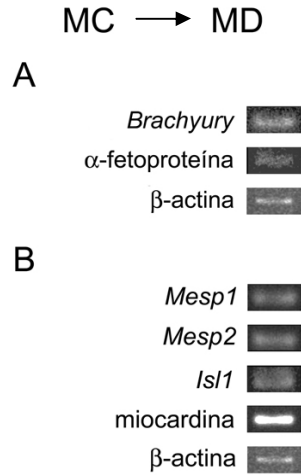


Figura 5. Los EBs derivados de CME propagadas en MC expresan genes marcadores de los tres linajes. Las CME cultivadas en MC preservan su pluripotencia, evidenciada al inducir su diferenciación *in vitro*. *Brachyury*, gen marcador de mesodermo; α -fetoproteína, gen marcador de endodermo; *Mesp1* y *2*, *Isl1* y, *miocardina*, genes marcadores de mesodermo tardío. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

Para extender nuestros resultados, nos propusimos evaluar si otras líneas de CME, tanto de ratón como de origen humano, propagadas en MC preservan sus propiedades básicas. Esto podría ser de fundamental importancia para su futura aplicación en la terapia con células madre.

A continuación, evaluamos las líneas CME de ratón *Nkx2.5eGFP* y *GKGFP*, cedidas por los Dres. Sean Wu y Niels Giejsen, respectivamente y generadas independientemente. Ambas líneas fueron cultivadas sobre gelatina y propagadas tanto en MC como en MP. En ambas condiciones de cultivo, estas dos líneas, al igual que habíamos obtenido con la línea *CGR8*, expresaron marcadores de estado indiferenciado detectados por RT-PCR (Figura 6, línea *GKGFP*) e inmunofluorescencia (Figuras 7; línea *Nkx2.5eGFP*, Figura 8; línea *GKGFP*).

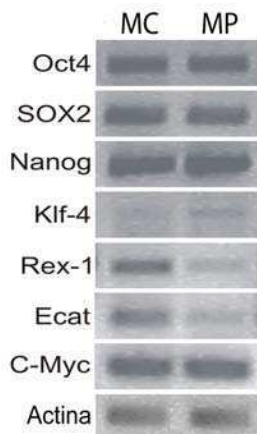


Figura 6. Las CME *GKGFP* cultivadas en MP o MC expresan genes marcadores de estado indiferenciado. Las CME fueron propagadas en el medio indicado. Se extrajo ARN de las colonias propagadas en ambas condiciones y se analizó la expresión de marcadores de estado indiferenciado por RT-PCR. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

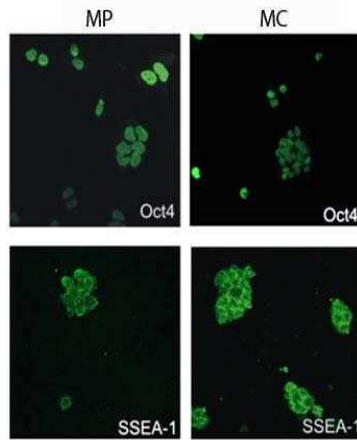


Figura 7. Las CME propagadas en MP o MC expresan marcadores de estado de indiferenciado. Las CME Nkx2.5eGFP fueron propagadas en el medio correspondiente, las colonias fueron fijadas y se detectó la presencia de marcadores de estado indiferenciado. Fotomicrografías de tinciones de inmunofluorescencia representativas de colonias de CME cultivadas en MP o MC.

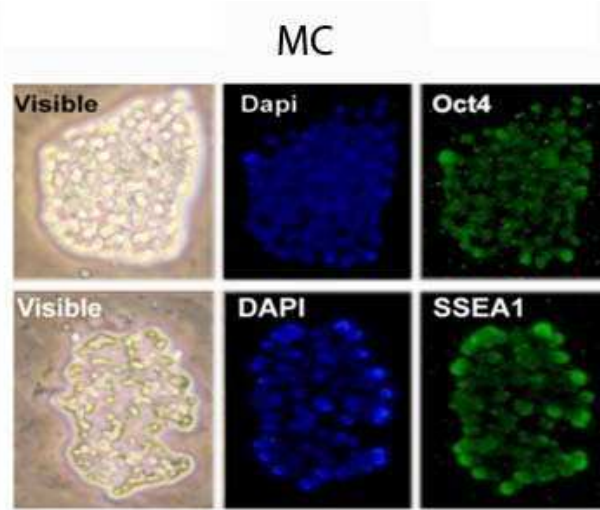


Figura 8. Las CME propagadas en MC expresan marcadores de estado indiferenciado. Las CME GKGFP fueron propagadas en el medio correspondiente, las colonias fueron fijadas y se detectó la presencia de marcadores de estado indiferenciado.

Finalmente, con el propósito de extender nuestros resultados a líneas celulares que se encuentren ampliamente distribuidas en la comunidad científica, adquirimos comercialmente las líneas de CME de ratón R1 y Ainv 15, esta última derivada de la línea E14. Las CME Ainv15 y R1 fueron cultivadas sobre gelatina tanto en MC como en MP y estudiamos si éstas podían ser propagadas en MC preservando sus propiedades esenciales. En la Figura 9 observamos colonias de las CME Ainv15 mostrando la morfología típica de colonia indiferenciada. Los mismos resultados fueron observados en las colonias de CME R1 (resultados no mostrados). Por otro lado, cuando cultivamos a las CME, ya sea en su medio de propagación estándar, pero en ausencia de LIF (MP-LIF), o en un medio condicionado por una línea celular diferente (MC-HEK), observamos una morfología claramente diferente a la esperada para colonias en estado indiferenciado, correspondiente a células diferenciadas (Figura 9).

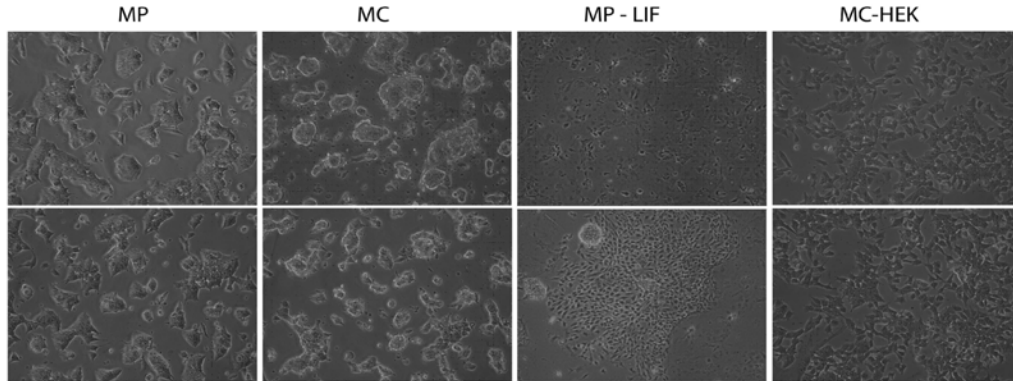


Figura 9. Las colonias de las CME propagadas en MC presentan morfología de colonia indiferenciada similar a las propagadas en MP. Fotomicrografía de colonias CME Ainv15 propagadas en MP o MC. Las CME fueron propagadas al menos tres pasajes en el medio correspondiente, MP, MC, MP sin LIF (MP-LIF) y medio condicionado por la línea HEK (MC-HEK).

Asimismo, observamos que las CME Ainv15 propagadas tanto en MP como en MC expresaron marcadores de estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Ecat1, Rex1 y Klf4 detectados por RT-PCR (Figura 10).

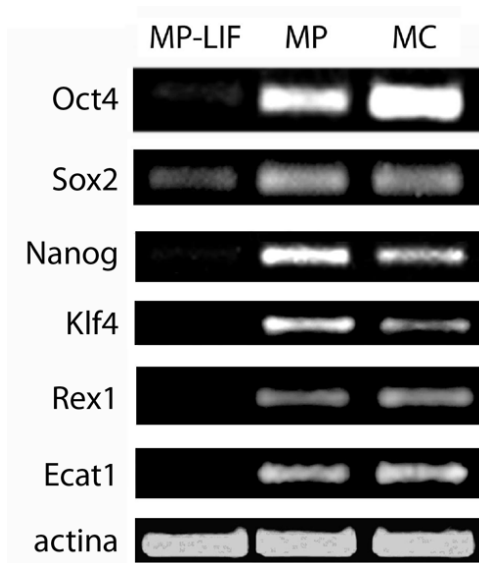


Figura 10. Las CME propagadas en MC o MP expresan genes marcadores de estado indiferenciado. Las CME Ainv15 cultivadas en MP o en MC presentaron expresión similar de genes marcadores de estado indiferenciado ⁶⁶ Ecat1, Rex1 y Klf4. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

Asimismo, observamos por inmunofluorescencia, la presencia de los marcadores Oct4 y SSEA-1 en las colonias cultivadas en ambos medios (Figura 11).

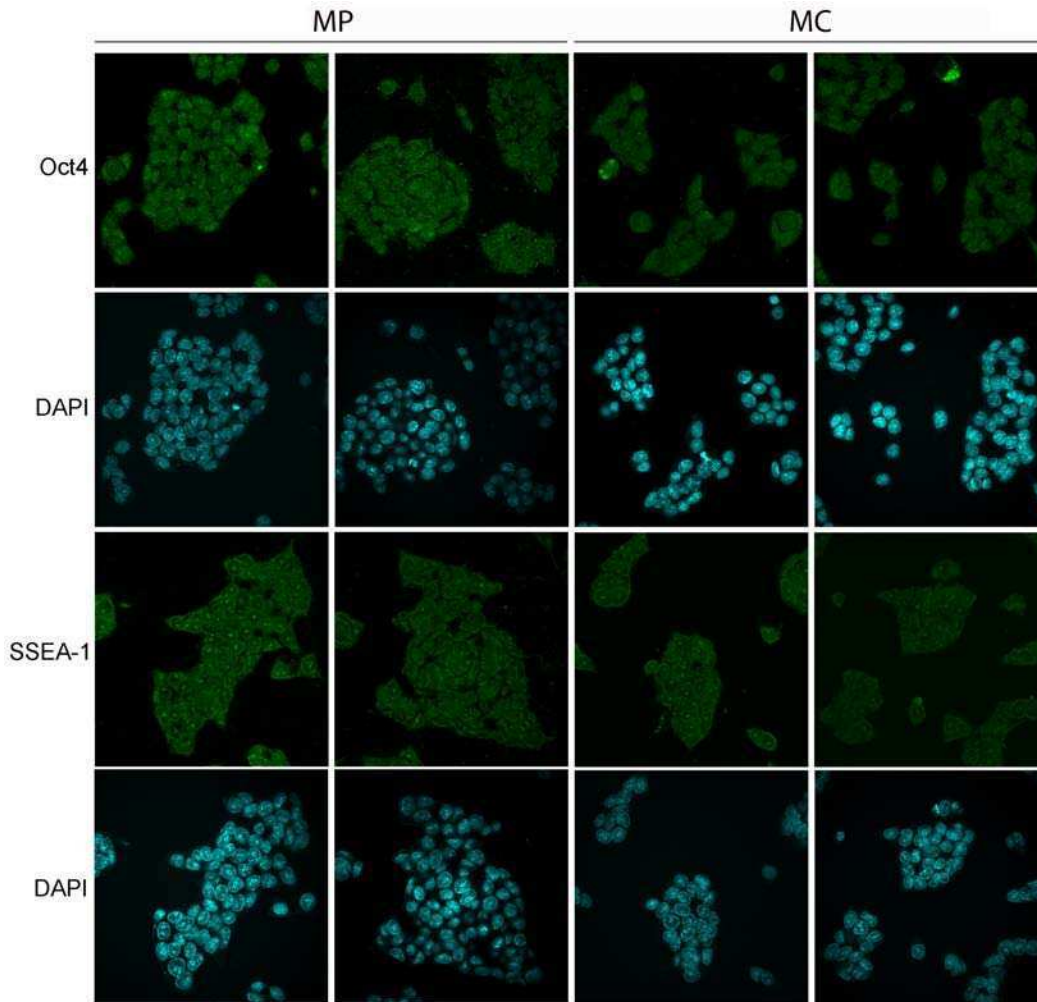


Figura 11. Las CME cultivadas en MC expresan marcadores de estado indiferenciado, Oct4 y SSEA-1. Las CME Ainv15 fueron propagadas en el medio correspondiente, las colonias fueron fijadas y se detectó la presencia de marcadores de estado indiferenciado. Fotomicrografía de colonias representativas de CME cultivadas en MP o MC.

Además, propagamos las CME Ainv15 sobre gelatina en MP o MC, luego de tres pasajes, sometimos a las células al protocolo de *Hanging drop* para inducir su diferenciación no dirigida *in vitro*. Como observamos en la Figura 12, al inducir su diferenciación, ambas poblaciones formaron cuerpos embrioides.

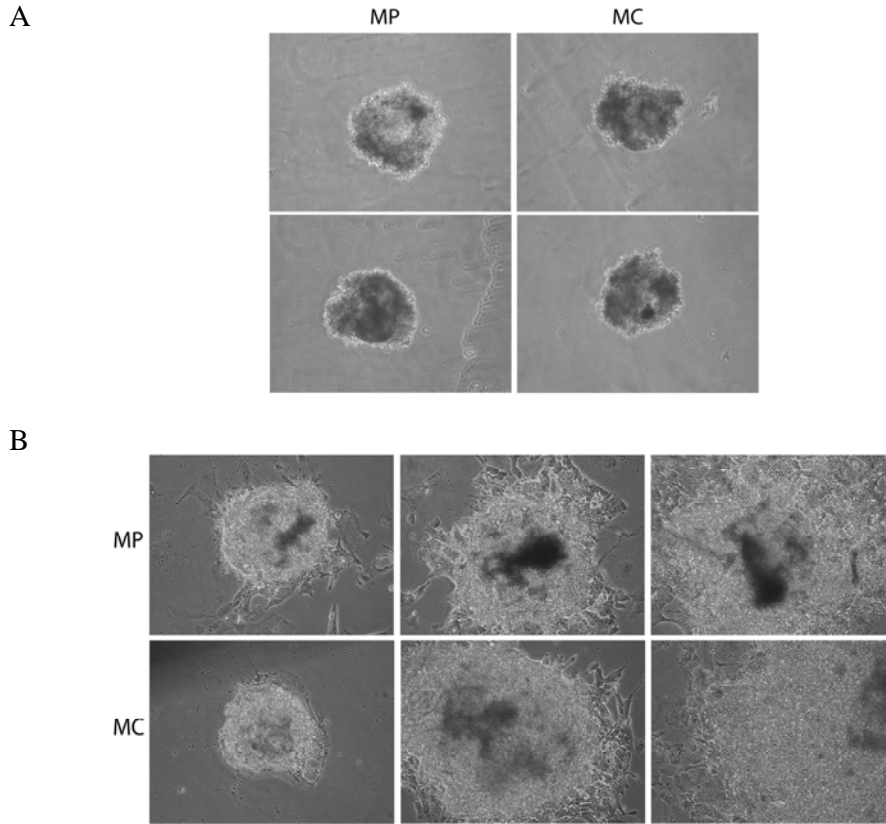
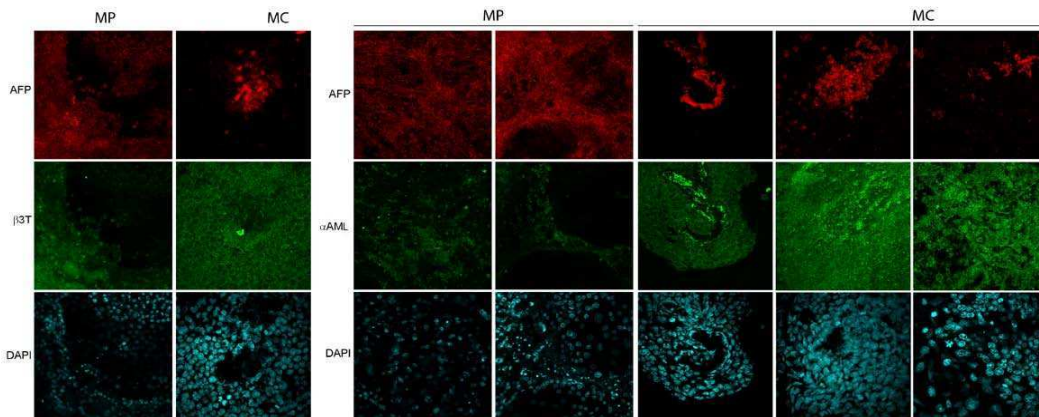


Figura 12. Las CME previamente propagadas en MC forman cuerpos embrioides. Fotomicrografías de EBs a lo largo del tiempo. Las colonias de las CME Ainv15 propagadas en MP o en MC fueron sometidas a un protocolo de diferenciación *in vitro*. Las CME propagadas en MC conservan su capacidad de formar EBs. La morfología de los EBs es semejante en las células propagadas en ambos medios. A, cuerpos embrioides en suspensión. B, cuerpos embrioides en adherencia.

Asimismo, evaluamos la pluripotencia de las CME Ainv15 propagadas en MC, por RT-PCR (panel inferior) e Inmunofluorescencia (panel superior). En los EBs derivados de células previamente propagadas en MC, detectamos la expresión de genes marcadores de diferentes linajes, incluyendo marcadores de linaje cardíaco (Figura 13).



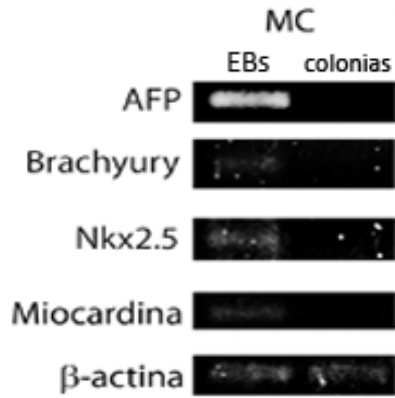


Figura 13. Los cuerpos embrioides derivados de células de la línea propagadas en MC expresan marcadores de los tres linajes. Las CME *Ainv15* cultivadas en MC conservan su pluripotencia, evidenciada al inducir su diferenciación mediante el protocolo de *Hanging drop*. *Brachyury* y α -actina de músculo liso y (α AML), genes marcadores de mesodermo; α -fetoproteína (AFP), gen marcador de endodermo; β III tubulina (β 3T), gen marcador de ectodermo; *Nkx2.5* y *miocardina*, genes marcadores de mesodermo tardío. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

A continuación, evaluamos la pluripotencia *in vivo*, mediante el ensayo de obtención de teratomas. Para ello, inyectamos en ratones inmunosuprimidos, células de la línea *Ainv15* que habían sido propagadas en MC durante tres pasajes. Como control, inyectamos de manera contra lateral células que habían sido propagadas en medio de propagación estándar. En ambas condiciones, los tumores se hicieron evidentes entre 2 semanas y un mes luego de la inyección, y presentaron tejidos pertenecientes a las tres capas embrionarias, detectados mediante análisis histológico y por inmunohistoquímica (Figura 14). Estos resultados demuestran que las células propagadas en MC preservan su pluripotencia *in vivo*.

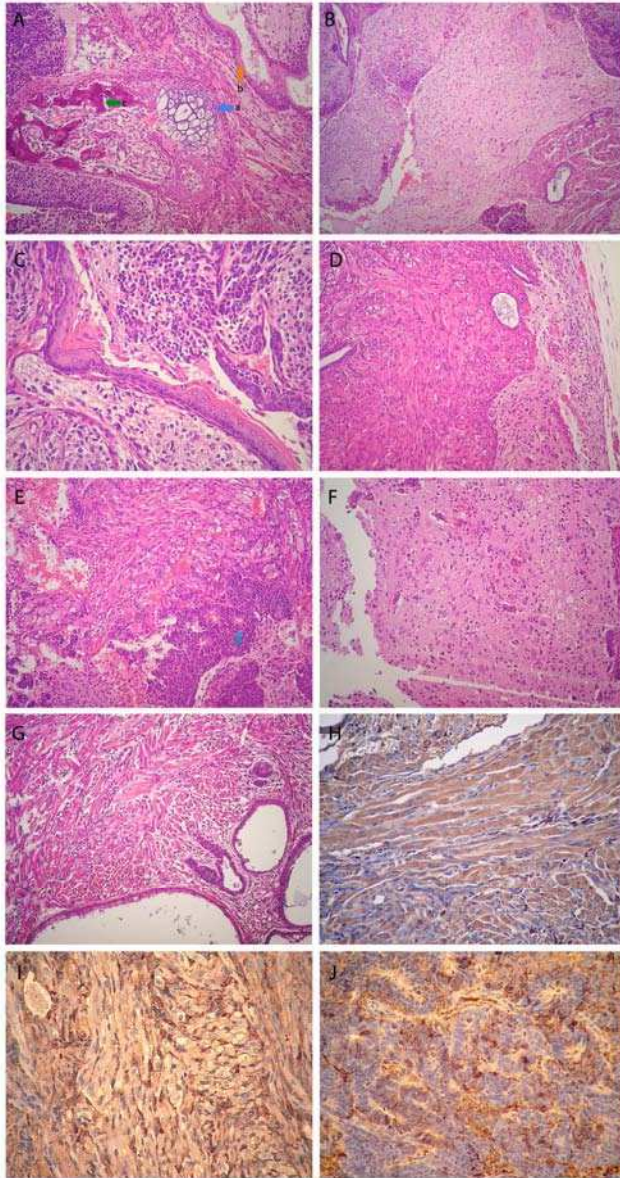


Figura 14. Las CME Ainv15 propagadas en MC originan teratomas que presentan tejidos con células derivadas de las tres capas germinales. Las CME fueron cultivadas al menos 3 pasajes o 7 días en MC previo a la inyección en ratones inmunosuprimidos. Luego de 2 semanas post-detección de los tumores, éstos fueron extraídos quirúrgicamente, fijados y teñidos con hematoxilina y eosina. Secciones de 4µm de los tejidos de teratomas fueron teñidas con hematoxilina y eosina o inmunoteñidas. **A-G** Cortes histológicos representativos de los teratomas. **A** Cartilago (a, flecha), epitelio glandular (b, flecha), y trabécula ósea (c, flecha). **B** Cerebro y componentes del neuroectodermo primitivo (derecha superior). **C** Células escamosas en medio del epitelio neuroectodérmico. **D** Músculo esquelético (izquierda) y tejido cerebral (derecha). **E** Músculo esquelético (izquierda) y epitelio neuroectodérmico (derecha) con rosetas neuroblásticas (flecha). **F** Tejido cerebral. **G** Músculo (derecha superior) y epitelio glandular (izquierda inferior). **H-J** Inmunohistoquímica. **H** Tejido muscular inmunopositivo para α AML. **I** Tejido muscular inmuno positivo para GATA4. **J** Epitelio neuroectodérmico primitivo inmunopositivo para β III tubulina

Estos resultados en conjunto indican que las CME de la línea Ainv15 pueden ser propagadas en MC manteniendo sus propiedades fundamentales.

Las células madre pluripotentes inducidas propagadas en el medio condicionado preservan sus propiedades esenciales

En nuestro grupo de trabajo, la Bioquímica Claudia Solari, estableció diferentes líneas de células madre pluripotentes inducidas (CMPI), a partir de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón. Estas células fueron validadas como verdaderas CMPI mediante estudio de su auto-renovación y pluripotencia *in vitro* e *in vivo* ^{69, 70}. Con el

propósito de extender nuestros resultados a otro tipo de células madre pluripotentes, evaluamos si el MC nos permitía también propagar las CMPI preservando su estado indiferenciado. Observamos que las CMPI propagadas tanto en MP como en MC durante al menos tres pasajes, expresaron los marcadores de estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Ecat1, Rex1 y Klf4 detectados por RT-PCR (Figura 15 A) y observamos la presencia de los marcadores Oct4 y SSEA-1 por inmunofluorescencia (Figura 15 B). Por otra parte, la mayoría de estos marcadores disminuye su expresión cuando las células son cultivadas en MP en ausencia de LIF (Figura 15 A, MP-LIF).

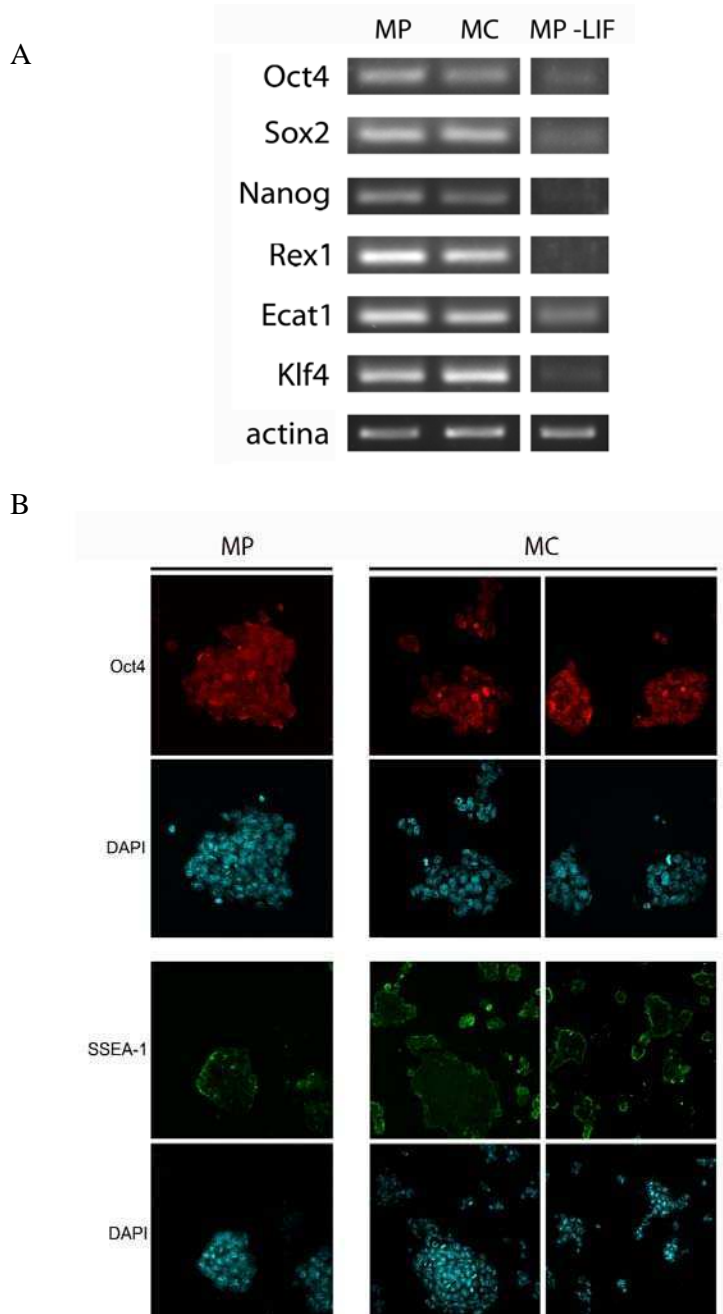


Figura 15. Las CMPI propagadas en MC expresan marcadores de estado indiferenciado. Las CMPI 20 se cultivaron en MP, MC o MP-LIF al menos 3 pasajes o 7 días. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición. A, las CMPI presentan expresión de los genes marcadores de estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Ecat1 and Klf4. La expresión de actina fue utilizada como control. MP sin LIF (MP-LIF) B, imágenes representativas de inmunotinciones de CMPI de los genes marcadores de estado indiferenciado Oct4 y SSEA-1. El núcleo fue teñido con DAPI.

Evaluamos la otra propiedad básica, la pluripotencia, encontramos que al igual que las CMPI propagadas en MP, las CMPI que habían sido propagadas en MC, dieron lugar a cuerpos embrioides que expresaron marcadores pertenecientes a los diferentes linajes, detectados por RT-PCR e Inmunofluorescencia (Figura 16 A y B, respectivamente).

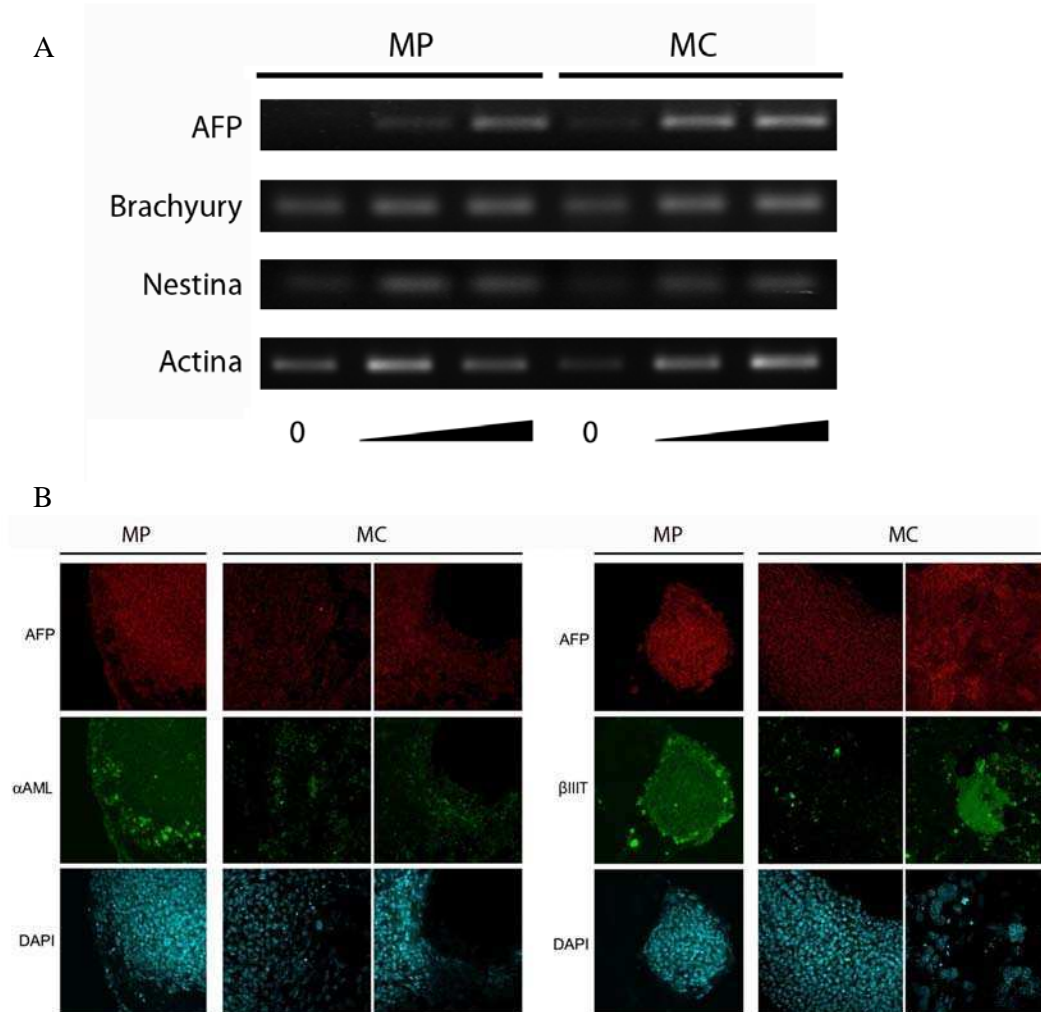


Figura 16. Las CMPI propagadas en MP y MC forman cuerpos embrioides que expresan genes marcadores de distintos linajes. Las CMPI cultivadas en MP y MC conservan su pluripotencia, evidenciada al inducir su diferenciación mediante el protocolo de Hanging drop. A, RT-PCR de genes pertenecientes a las 3 capas embrionarias, Brachyury, gen marcador de mesodermo; α -fetoproteína (AFP), gen marcador de endodermo; Nestina, gen marcador de ectodermo. B, Inmunofluorescencia de proteínas pertenecientes a los diferentes linajes, α -actina de musculo liso y (α AML), marcador de mesodermo; α -fetoproteína (AFP), marcador de endodermo; β III tubulina (β 3T), marcador de ectodermo. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicado en réplicas independientes de cada condición.

A continuación, estudiamos la pluripotencia *in vivo* de las CMPI propagadas en MC. Estas células dieron origen a teratomas, cuando fueron inyectadas en ratones inmunosuprimidos. Los tumores generados presentaron tejidos pertenecientes a las tres capas embrionarias, detectados mediante análisis histológico y por inmunohistoquímica

(Figura 17). En resumen, con estos resultados demostramos *in vivo* que las CMPI propagadas en MC preservan su pluripotencia.

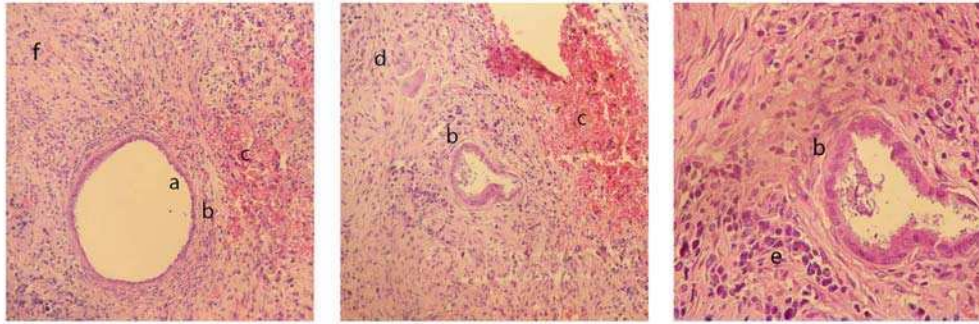


Figura 17. Las CMPI propagadas en MC originan teratomas que presentan tejidos con células derivadas de las tres capas embrionarias. La CMPI fueron cultivadas 3 pasajes o 7 días en MC previo a la inyección en ratones inmunosuprimidos. Luego de 2 semanas post-detección de los tumores, éstos fueron extraídos quirúrgicamente, fijados y teñidos con hematoxilina y eosina [20]. Secciones representativas de 4µm de los tejidos de teratomas muestran la diferenciación de las CMPI a los diferentes linajes, a; tejido epitelial ciliado, b; músculo liso, c; células sanguíneas, d; tejido neural, e; tejido neural primitivo, f: vasos sanguíneos. El tercer panel muestra una imagen ampliada de una sección diferente de la misma región del panel central.

Las células madre embrionarias humanas pueden ser propagadas en el medio condicionado preservando su estado indiferenciado

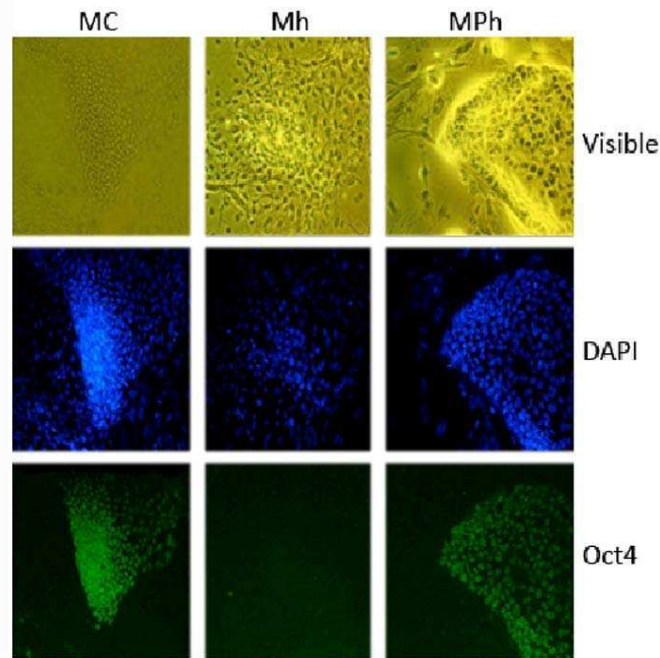
Los resultados presentados hasta aquí fueron realizados en células madre embrionarias o en células madre pluripotentes inducidas, en ambos casos de ratón. Si bien los modelos murinos son de gran interés científico porque permiten el avance en el estudio y la comprensión de los mecanismos, reconocemos la importancia para la comunidad en general de avanzar en estos tópicos en las CME de origen humano.

En colaboración con el grupo del Dr. Santiago Miriuka, de FLENI, realizamos algunos ensayos preliminares con líneas de CME humanas (CMEh), con el propósito de evaluar si éstas podían ser cultivadas en el MC. Las CME fueron propagadas sobre una capa de MEFi en su medio de proliferación para CME suplementado con FGF2 (MPh), a continuación fueron cultivadas al menos un pasaje en Matrigel antes de comenzar con los ensayos, para disminuir la cantidad de MEF remanentes y luego, al menos tres pasajes en MC o en el medio de proliferación estándar utilizada para CME humanas (MPh).

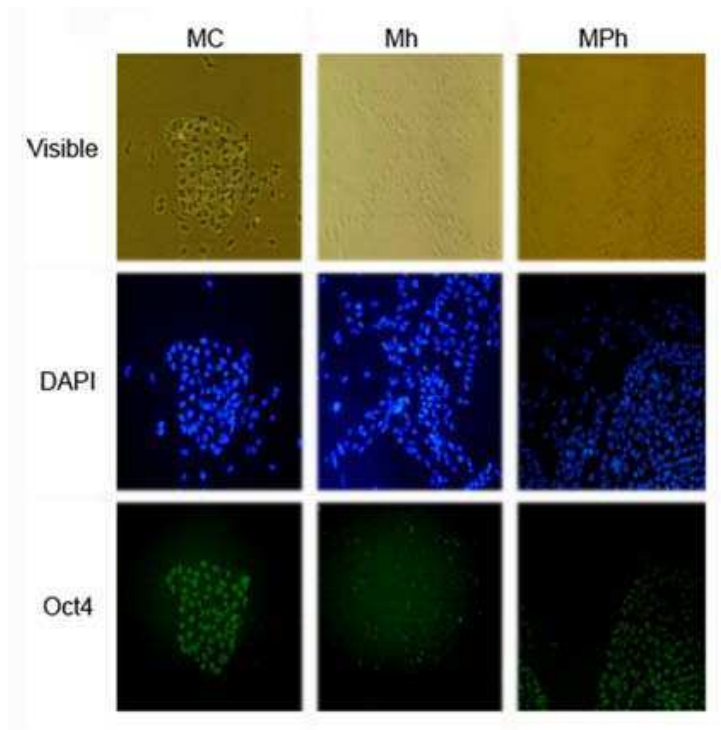
Las CME de la línea HUES-16 cultivadas tanto en MC como en MPh mostraron la morfología típica de colonias indiferenciadas. Asimismo, mediante Inmunofluorescencia detectamos la expresión de la proteína de estado indiferenciado, Oct4. Contrariamente, en el control negativo, las CME cultivadas en medio de proliferación sin FGF2 (Mh) presentaron morfología de colonia diferenciada y disminución de la expresión de Oct4 (Figura 18 A).

Observamos los mismos resultados en las líneas WA-09 y en S351 (Figuras 18 B y C). Estos resultados demuestran que estas líneas CMEh también pueden ser cultivadas indiferenciadas en el MC, cumpliendo con una de las propiedades esenciales de las CME. Finalmente, para demostrar la otra propiedad fundamental de las CME, habría que evaluar si estas células preservan su capacidad de diferenciarse al ser propagadas en el MC. Planeamos estudiarlo en un futuro.

A



B



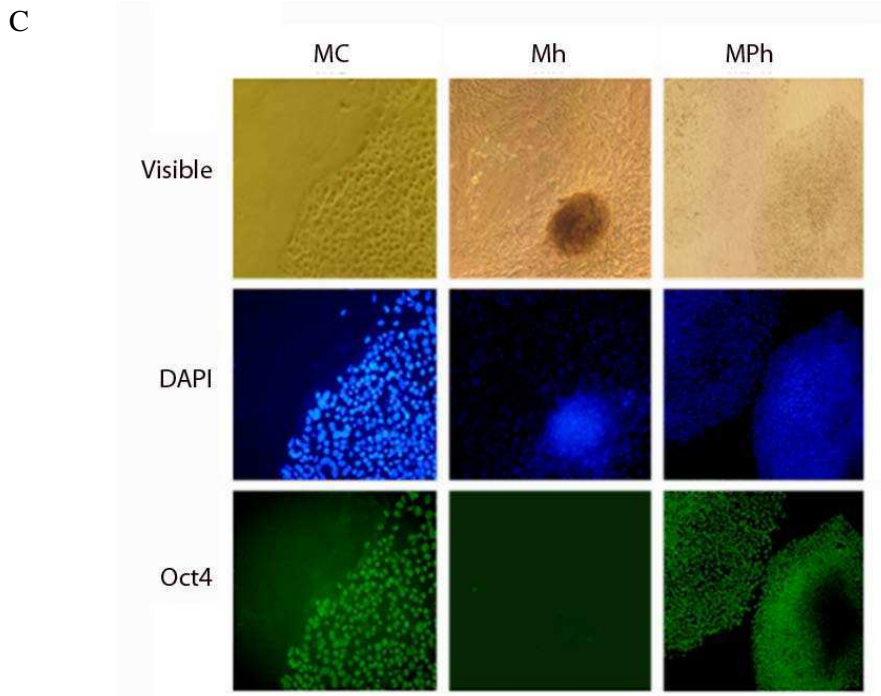


Figura 18. Las distintas líneas de CMEh cultivadas en MC presentan morfología típica de colonia de células indiferenciadas y expresan Oct4. Las CMEh fueron cultivadas en MC, MPh; medio de proliferación para CME suplementado con FGF2 y Mh; medio de proliferación sin FGF2. Las colonias fueron fijadas y se detectó la expresión de la proteína de estado indiferenciado Oct4. Las líneas de CMEh utilizadas son: A, línea HUES-16. B, línea WA-099. C, línea S351.

Los resultados aquí presentados, demuestran que las diferentes líneas de CME y de CMPI de ratón, pueden ser propagadas en este MC manteniendo sus propiedades fundamentales, la proliferación preservando su estado indiferenciado y la capacidad de diferenciarse a tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias. Por otra parte, probamos que el MC también permite propagar CME humanas manteniendo su estado indiferenciado. Como ya mencionamos, planeamos estudiar su pluripotencia en un futuro.

La línea celular BGC expresa factores involucrados en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CME

Los resultados hasta aquí presentados, demuestran que el medio condicionado por la línea BGC permite la propagación de distintas líneas de CME. Por esta razón, con el propósito de identificar los factores presentes en el MC, que podrían ser responsables de esta propiedad, a continuación estudiamos la expresión de los principales factores involucrados en la propagación en estado indiferenciado de las CME de origen humano y de ratón.

Evaluamos la expresión de IGF2 y FGFb por RT-PCR en la línea BGC, ya que estos factores son los responsables del mantenimiento del estado indiferenciado de las CMEh ⁷¹.

Cultivamos las células de la granulosa bovina en su medio habitual, extrajimos ARN, preparamos ADNc y por RT-PCR evaluamos la expresión de los diferentes factores. Como mostramos en la Figura 19, detectamos expresión de FGFb e IGF2. Estos resultados, nos indican que estos factores podrían ser los responsables del mantenimiento del estado indiferenciado de las CMEh en MC.

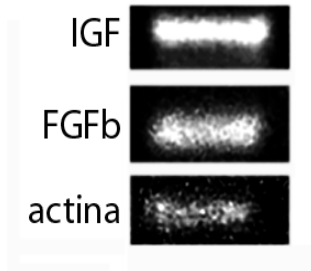


Figura 19. La línea condicionadora expresa los genes FGFb e IGF2. Las BGC fueron propagadas en su medio habitual. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicados en réplicas independientes de cada condición.

Asimismo, evaluamos la expresión de la citoquina LIF en las células de la granulosa bovina, ya que es el factor fundamental para mantener las CME de ratón conservando sus propiedades esenciales. Como se muestra en la Figura 20, comprobamos que también LIF se expresa en esta línea de células de la granulosa bovina.

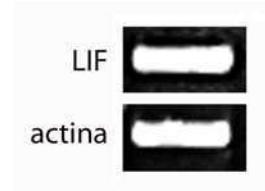
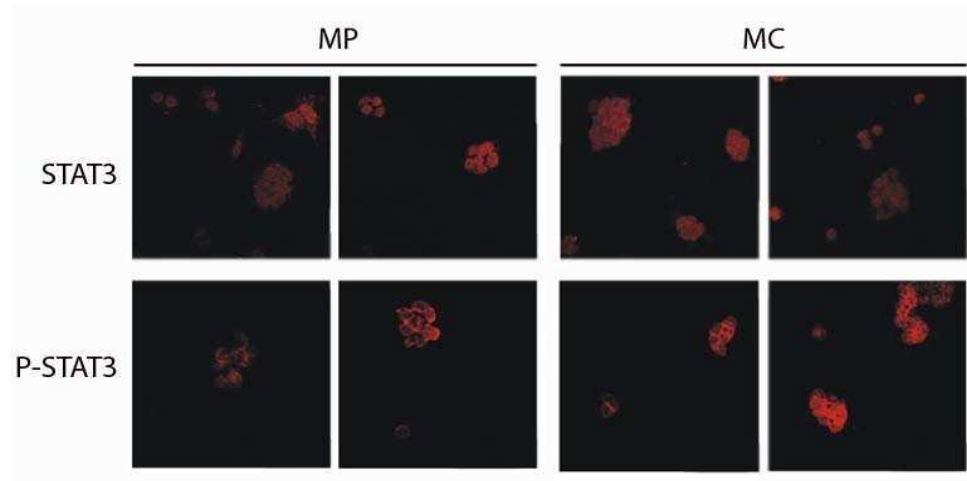


Figura 20. La línea BGC expresa el gen LIF. Las células fueron propagadas en su medio habitual. Se evaluó por RT-PCR la expresión de la citoquina LIF. Se muestra un resultado representativo de condiciones evaluadas por triplicados en réplicas independientes de cada condición.

Como mencionamos en la introducción, LIF, a través de su receptor LIFR y GP130, activa al factor de transcripción STAT3 produciendo su fosforilación y cuya actividad es esencial en células madre embrionarias de ratón para el mantenimiento de sus propiedades esenciales¹⁸. Esta evidencia concuerda con el estado de fosforilación de STAT3 que observamos en las líneas Nkx2.5eGFP y GKGFP cuando fueron propagadas en MC (Figuras 21 panel superior e inferior, respectivamente). En ambos casos, detectamos por inmunofluorescencia la presencia de STAT3 fosforilado.

En resumen, encontramos que la línea BGC expresa los principales factores que están involucrados en el mantenimiento de las propiedades básicas de las CME y que están profundamente estudiados, por este motivo, descartamos la búsqueda de nuevos factores involucrados en un posible mecanismo novedoso implicado en el mantenimiento de las CME en este MC. Por esa razón focalizamos nuestros siguientes objetivos en el estudio de las propiedades mitogénicas del MC, efecto que previamente había sido observado en otros tipos celulares, pero nunca había sido estudiado en células madre.

Nkx2.5eGFP



GKGFP

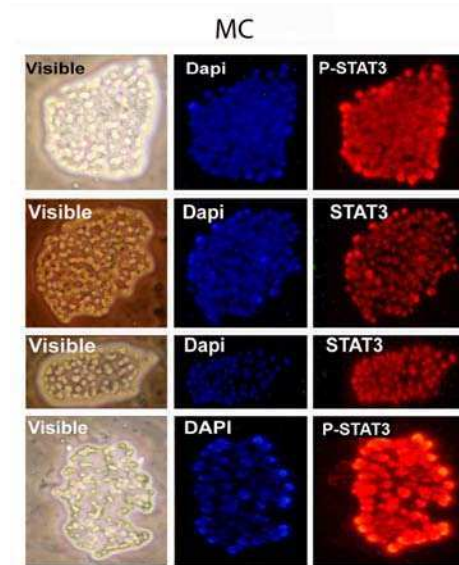


Figura 21. El factor STAT3 se encuentra fosforilado en CME propagadas en MP o en MC. Las CME fueron propagadas en el medio correspondiente, las colonias fueron fijadas y se detectó la activación de STAT3 mediante Inmunofluorescencia. Panel superior; línea CME Nkx2.5eGFP, panel inferior línea GKGFP. Fotomicrografías de tinciones de inmunofluorescencia representativas de colonias de CME cultivadas en MP o MC.

El medio condicionado aumenta la proliferación de las células madre embrionarias

Como mencionamos en la introducción, esta línea BGC fue seleccionada originalmente por sus propiedades mitogénicas. Las evidencias demostraron que el MC de la línea tiene este efecto tanto sobre los cultivos primarios de granulosa como sobre células de la misma línea celular. Por otra parte, durante el transcurso de los experimentos descriptos anteriormente, notamos que las colonias de CME cultivadas en MC, si bien presentaban morfología similar, eran notablemente más grandes que las propagadas en el medio de proliferación estándar.

Dadas estas evidencias, decidimos estudiar el efecto del medio condicionado sobre el cultivo de distintas líneas de CME de origen independiente, tanto de ratón como humanas.

En primer lugar, analizamos la proliferación en la línea de CME Ainv15, que es la que utilizamos principalmente a lo largo de todo este trabajo. Cultivamos estas células sobre gelatina tanto en MP como en MC y observamos que las colonias cultivadas en ambos medios presentaron morfología similar y característica de colonia indiferenciada, pero aquellas que fueron propagadas en MC siempre resultaron de mayor tamaño que las que fueron propagadas en MP (Figura 22), como mencionamos anteriormente.

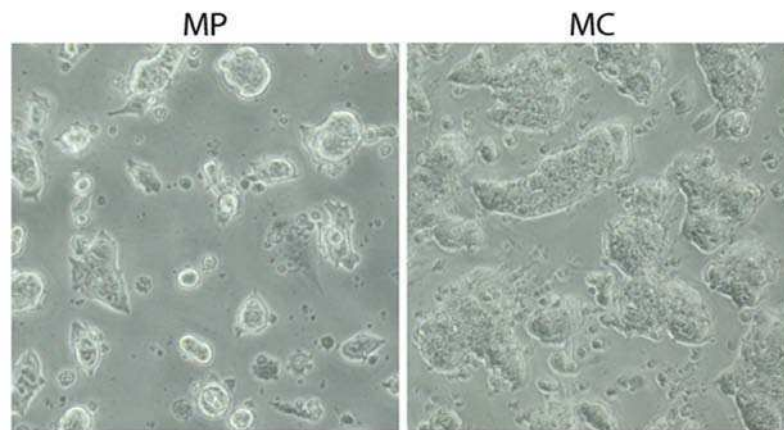


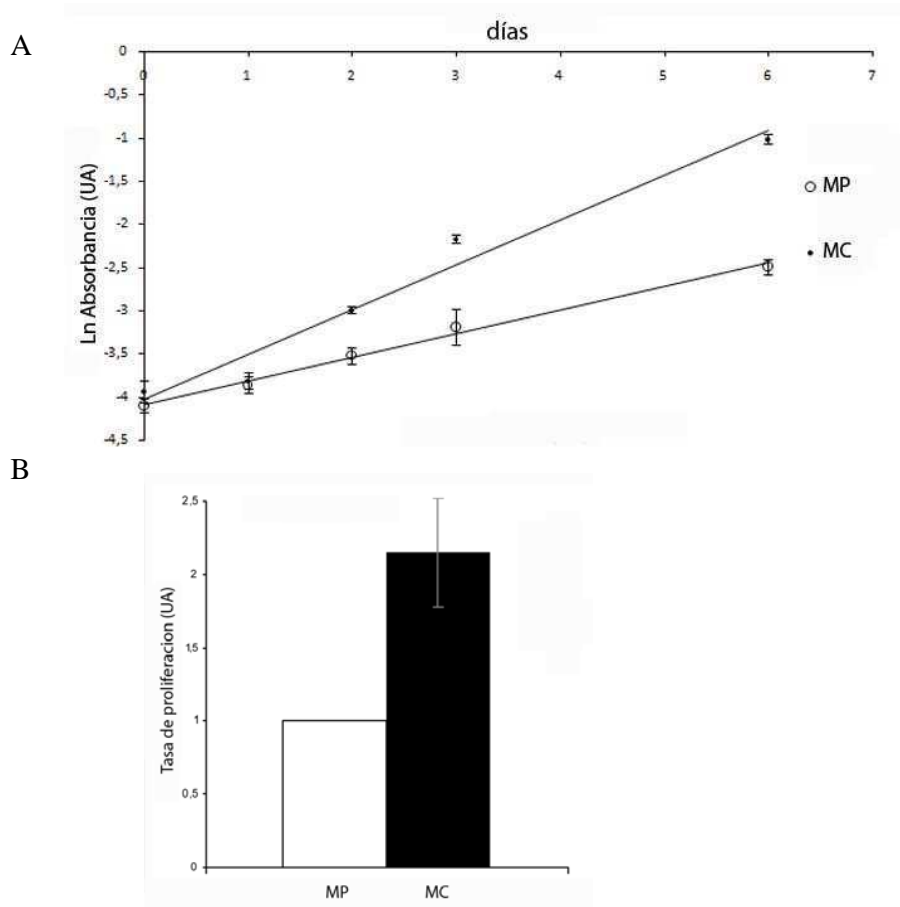
Figura 22. Las CME Ainv15 propagadas en MC presentan colonias de mayor tamaño. Fotomicrografía de colonias CME Ainv15 propagadas en MP o MC. Las CME fueron propagadas al menos tres pasajes en el medio correspondiente, MP o MC. Las CME propagadas en ambos medios formaron colonias con la morfología típica de células madre embrionarias. Las CME propagadas en MC presentaron colonias de mayor tamaño que aquellas cultivadas en MP.

Para estudiar la proliferación utilizamos diferentes ensayos. En todos los casos, plaqueamos las células sobre gelatina y las cultivamos en el medio estándar durante 24 horas. Luego, una vez que las células ya se habían adherido al sustrato reemplazamos el medio por MP o MC. La proliferación de las células propagadas en ambos medios fue

medida en diferentes puntos a lo largo del tiempo; en primer lugar, utilizamos el ensayo de XTT.

Como se muestra en las figuras 23 A y B, a medida que avanzan los días de tratamiento, observamos un aumento en la proliferación en las colonias de las CME propagadas en MC comparadas con aquellas cultivadas en el MP.

Con el propósito de estudiar la proliferación mediante un abordaje que evalúe otro parámetro que no sea la actividad mitocondrial, para descartar posibles efectos del MC sobre ésta, estudiamos la proliferación de las CME mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Del mismo modo, mediante esta otra estrategia, observamos que las CME propagadas en MC durante 3 días presentaron una proliferación mayor que aquellas propagadas en MP (figura 23 C).



C

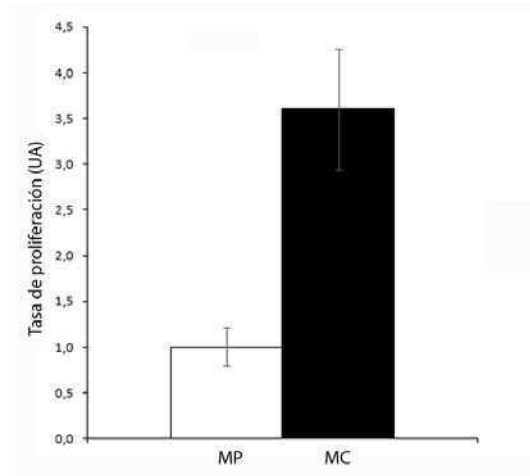


Figura 23. Las CME propagadas en el medio condicionado presentan un aumento en la tasa de proliferación. Las CME Ainv15 fueron propagadas en MC o en MP a lo largo del tiempo. A, Gráfico representativo de la tasa de proliferación de las CME en los medios indicados a lo largo del tiempo. La proliferación fue medida mediante el ensayo de XTT en cada uno de los días indicados. B, Gráfico de la media del cociente de las pendientes de la regresión lineal del gráfico de proliferación (gráfico 23 A) referido a MP. C, Gráfico representativo de la proliferación de las CME en el medio indicado el día 3. La proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción de Cristal Violeta. Todos los gráficos aquí presentados son un resultado representativo de condiciones evaluadas al menos por triplicado en réplicas independientes de cada condición. En todos los gráficos, la barras de error corresponden al desvío estándar.

Con el objetivo de extender nuestros resultados observados en la línea de CME Ainv15, evaluamos la proliferación en otra línea comercial de CME de ratón denominada R1 cultivadas en el MC. Nuevamente, las células fueron plaqueadas sobre gelatina y al cabo de 24 horas el medio fue reemplazado por MP o MC. La proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Resultados preliminares nos indicaron que las CME de la línea R1 propagadas en MC también presentaron una proliferación aumentada respecto a aquellas propagadas en MP, evidenciada al cabo de 3 días (Figura 24).

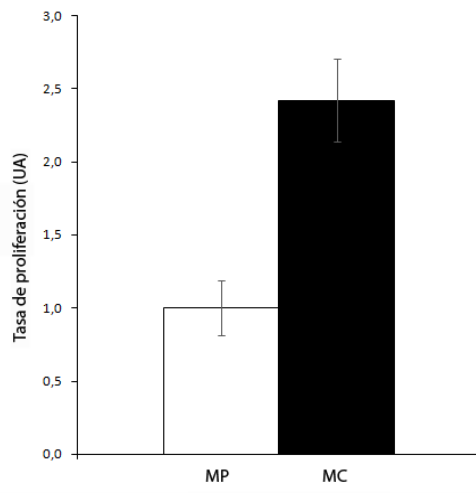


Figura 24. El medio condicionado aumenta la tasa de proliferación de las CME. Las CME R1 fueron propagadas en MC o en MP a lo largo del tiempo. Gráfico representativo de la proliferación de las CME en el medio indicado el día 3. La proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción de Cristal Violeta. Las barras de error en el gráfico corresponden al desvío estándar.

Asimismo, con el propósito de seguir estudiando el efecto mitogénico del MC sobre las células madre pluripotentes de ratón, evaluamos el efecto del mismo en una línea de células madre pluripotentes inducidas previamente establecidas en nuestro laboratorio. En esta línea, denominada CMPI 20, ya habíamos estudiado la capacidad del MC de preservar sus propiedades básicas ⁶⁹.

Las CMPI 20 fueron propagadas sobre gelatina tanto en MP como en MC. Observamos que las colonias cultivadas en ambos medios presentaron morfología similar de colonia indiferenciada, pero aquellas que fueron propagadas en MC resultaron de mayor tamaño que las que fueron propagadas en MP (Figura 25), al igual que observamos con las CME.

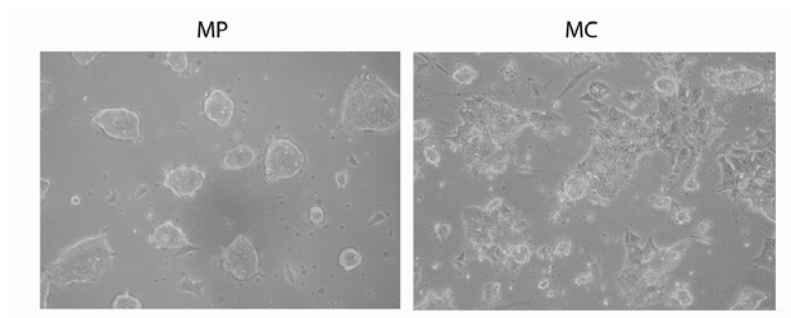


Figura 25. Las colonias de CMPI propagadas en MC son de mayor tamaño que aquellas cultivadas en medio de propagación estándar. Fotomicrografía de colonias CMPI 20 propagadas en MP o en MC. Las CMPI fueron propagadas al menos tres pasajes en el medio correspondiente, MP o MC. Las CMPI propagadas en ambos medios presentaron colonias con morfología típica de células madre pluripotentes. Las CMPI propagadas en MC presentaron colonias de mayor tamaño que aquellas cultivadas en MP.

A continuación, estudiamos la proliferación de estas células. Las CMPI 20 fueron plaqueadas sobre gelatina y al cabo de 24 horas, el medio fue reemplazado por MP o MC. La proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Resultados preliminares indican que, al igual que lo observado con las CME, las CMPI propagadas en MC presentaron una proliferación aumentada respecto a aquellas propagadas en MP, evidenciado a los 3 días de tratamiento (Figura 26).

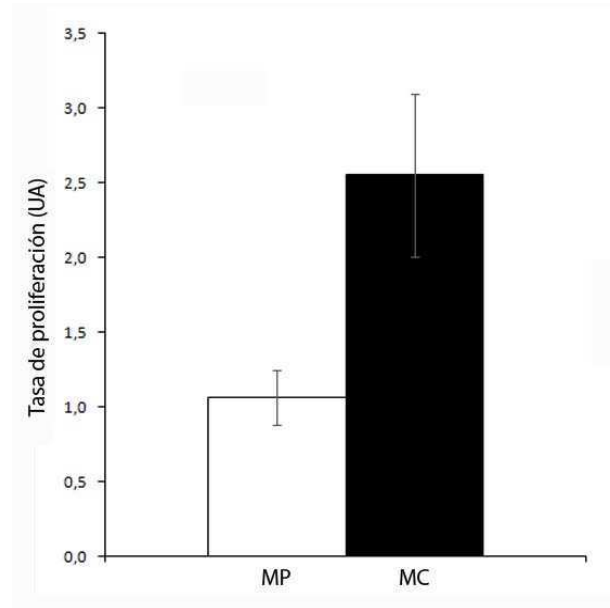


Figura 26. El medio condicionado aumenta la tasa de proliferación de las CMPI. Las CMPI 20 fueron propagadas en MC o en MP a lo largo del tiempo. Gráfico representativo de la proliferación de las CME en el medio indicado durante 3 días. La proliferación fue cuantificada mediante el ensayo de tinción de Cristal Violeta. Las barras de error en el gráfico corresponden al desvío estándar.

Resultados

Parte2

La isoforma de fibronectina que incluye EDA aumenta la proliferación de las células madre pluripotentes

Hasta este momento, demostramos que el MC por la línea BGC permite propagar distintos tipos de células madre pluripotentes manteniendo sus propiedades esenciales. Por otra parte, encontramos que este medio induce un aumento en su proliferación. Habiendo detectado la expresión, por parte de la línea BGC, de diferentes moléculas que podrían ser responsables de la primera de estas características, el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia, nos propusimos identificar cuál o cuáles podrían ser los factores presentes en el MC, responsables del aumento de la proliferación.

Se ha reportado que el medio condicionado por la línea BGC aumenta la proliferación de células de la granulosa, y dicho efecto ha sido adjudicado a la isoforma de fibronectina (FN) que incluye el exón EDA (FN+EDA).

Por otra parte, ha sido reportado que una alta concentración de glucosa presente en el medio de proliferación estándar, induce la expresión de FN en CME de ratón, y que esta molécula podría ser la responsable del aumento de la proliferación en respuesta a la alta concentración de glucosa^{53, 54}. Sin embargo, este estudio no está focalizado en la isoforma de FN involucrada. Los autores encontraron que FN induce proteínas regulatorias del ciclo celular y protooncogenes mediado por las vías de señalización que involucran a RhoA-PI3K/Akt-ERK 1/2 y caveolina-1 en las CME de ratón⁵⁴. Recientemente, fue reportado que en CME cultivadas en ausencia de *feeder layer*, tanto la FN producida por las células como FN agregada al medio de cultivo, interactúa con la gelatina proporcionando una superficie que mantiene la adhesión y auto-renovación de las células⁷².

Por estas razones decidimos evaluar el efecto de FN+EDA en las CME mediante el uso de dos estrategias diferentes. Una de ellas fue la obtención de medios condicionados (MC) por distintas líneas de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), obtenidas a partir de ratones modificados genéticamente. Aquellas MEF que solo secretan FN EDA, las denominamos MEF EDA+; MEF EDA-, si solo secretan FN que excluye EDA, y MEF EDA^{wt} es la línea que secreta ambas isoformas, en una proporción aproximada de 60% FN EDA⁺ y 40% FN EDA⁻⁷³.

Las CME de la línea Ainv15 fueron plaqueadas sobre gelatina en MP, luego de 24 horas, el medio fue reemplazado por los medios condicionados por las distintas líneas de MEF, previamente suplementado con LIF, 5% SFB, aminoácidos no esenciales y 0.5 mM β -mercaptoetanol. Las colonias propagadas en los diferentes MC-MEF EDA presentaron morfología típica de colonia de CME indiferenciada a lo largo del tiempo (Figura 27). Además las CME propagadas en MC-MEF EDA+ en general presentaron colonias de mayor

tamaño que aquellas cultivadas en MC-MEF EDA⁻ e incluso que aquellas en MC-MEF^{wt} (Figura 27 A). Los mismos resultados pueden observarse con mayor claridad en una ampliación de la Figura 27 A día 3 en la Figura 27 B.

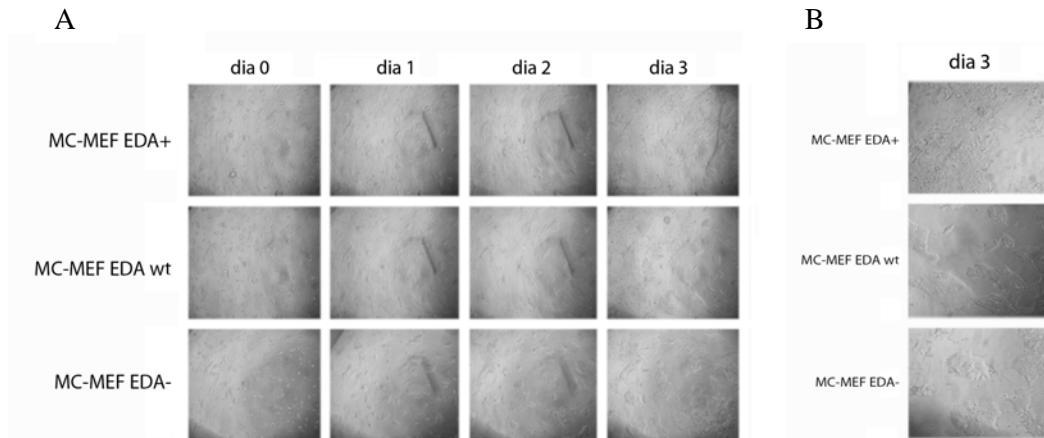


Figura 27. La presencia de FN EDA⁺ en el medio de cultivo produce un aumento en el tamaño de las colonias de CME. Fotomicrografía de CME propagadas en los distintos medios condicionados. Los medios condicionados (MC) fueron colectados de las líneas de MEF que expresan una de las isoformas de FN EDA⁺. MC-MEF EDA⁺; solo expresa FN con el exón EDA, MC-MEF EDA⁻; solo expresa FN sin el exón EDA, MC-MEF^{wt}; expresan ambas isoformas. Las CME de la línea Ainv15 fueron propagadas en el MC-MEF EDA correspondiente. Se observa morfología y tamaño de las colonias a lo largo del tiempo en cultivo en el medio indicado. (A) Imágenes representativas de las diferentes condiciones de cultivo, (B) Imágenes representativas ampliadas de las diferentes condiciones de cultivo en el día 3.

Mediante el ensayo de MTT evaluamos la tasa de proliferación de las CME Ainv15 propagadas en los diferentes MC-MEF EDA a lo largo del tiempo. Observamos que aquellas CME que fueron propagadas en MC-MEF EDA⁻ presentaron una tasa de proliferación más baja que aquellas en MC-MEF EDA⁺ o en MC-MEF EDA^{wt}. A pesar de que no encontramos una gran diferencia en la proliferación entre aquellas propagadas en MC-MEF EDA^{wt} y MC-MEF EDA⁺, es notorio un ligero aumento en esta última condición (Figura 28). Estos resultados se corresponden con los resultados de la evaluación morfológica.

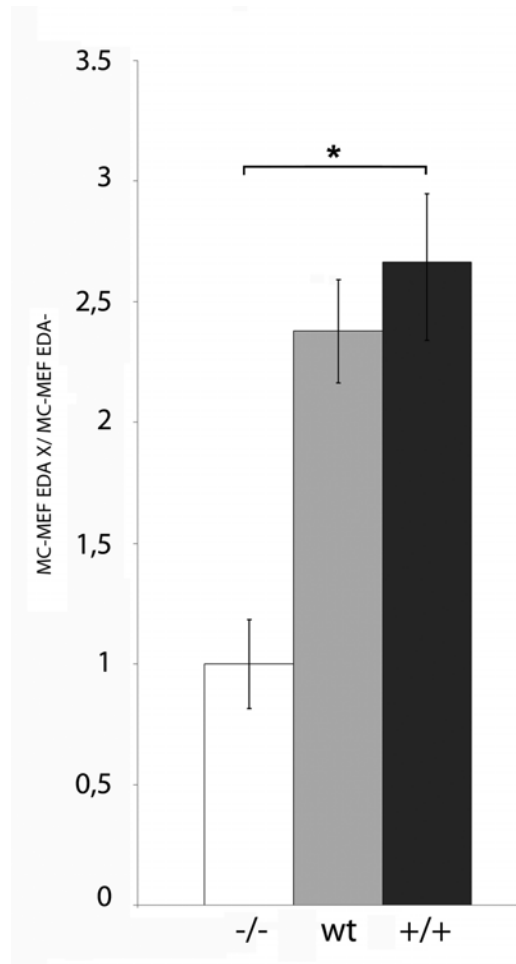


Figura 28. Las CME propagadas en el MC-MEF EDA+ presentan un aumento en la proliferación. Las CME de la línea Ainv15 fueron propagadas en el MC-MEF EDA correspondiente, -/-; MC-MEF EDA-, wt; MC-MEF EDAwt, +/+; MC-MEF EDA+. La proliferación fue medida mediante el ensayo de MTT. Se evaluó la tasa de proliferación relativa (UA de las CME propagadas en el MC correspondiente relativizado a aquellas propagadas en MC-MEF EDA-) Las barras representan la media \pm desvío estándar. El análisis estadístico se realizó mediante t-test de muestras independientes. * indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.01$).

Estos resultados indican que la isoforma de fibronectina que incluye EDA produce un aumento en la tasa de proliferación de las CME. Asimismo, el hecho de que la diferencia encontrada entre los medios condicionados por la línea de MEFwt y la de MEF EDA+ sea pequeña, podría significar que los niveles de FN EDA secretados por la primera son suficientes para estimular la proliferación.

A continuación, decidimos corroborar estos resultados mediante otro abordaje experimental con condiciones más definidas. Estudiamos la proliferación de las CME agregando a su medio de proliferación estándar un péptido correspondiente a una región de FN que incluye o excluye al exón EDA. Para la obtención de estos péptidos, utilizamos bacterias (BL21) que habían sido transformadas con un vector de expresión (pProEX Htb expression vector) que codifica dichos fragmentos bajo la regulación del promotor de β -galactosidasa. Cultivamos las bacterias en presencia del inductor IPTG y luego extrajimos las proteínas totales, las sometimos a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante

(SDS-PAGE) y cortamos la banda de interés. A continuación, extrajimos el péptido mediante electroelución.

En primer lugar, evaluamos la morfología de las colonias a lo largo del tiempo, en función de la concentración del péptido. Al igual que en los experimentos anteriores, las CME fueron plaqueadas sobre gelatina en MP, luego de 24 horas el medio fue reemplazado por medio de cultivo estándar, suplementado con diluciones progresivas de la preparación de los péptidos de FN. Las CME de la línea Ainv15 propagadas en todas las condiciones presentaron morfología típica de colonia (Figura 29 A). Además, observamos que aquellas propagadas con la "dilución 10" del péptido (dilución 10" corresponde a 10 μ l de la preparación del péptido por ml de MP) que incluye el exón EDA (+EDA) el día 3, presentaron colonias de mayor tamaño que aquellas con el péptido que no incluye el exón EDA (-EDA) (Figura 29 B).

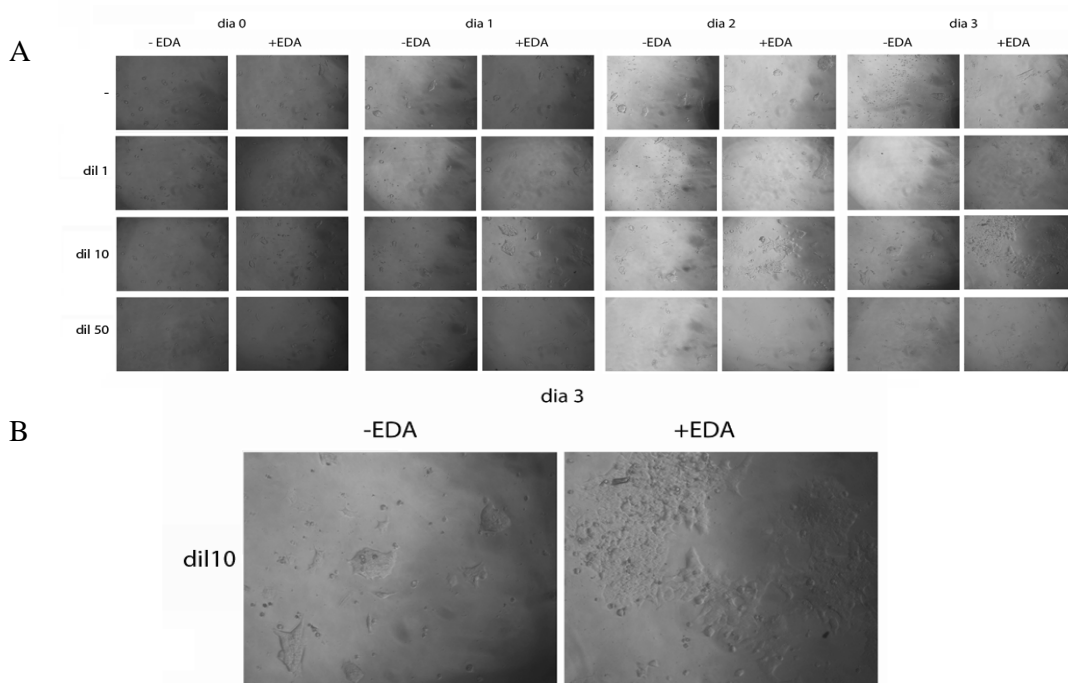


Figura 29. La presencia del péptido que incluye el exón EDA en el medio de cultivo produce un aumento en el tamaño de las colonias de CME. Fotomicrografía de las CME Ainv15 propagadas con las distintas dosis de los diferentes péptidos de FN en el transcurso del tiempo. Las CME fueron plaqueadas en MP, luego el medio fue reemplazado por el medio de propagación estándar con o sin el agregado de la preparación del péptido de FN que incluye el exón EDA (+EDA) o lo excluye (-EDA). Se observa morfología y tamaño de las colonias en los tiempos indicados. (A) Imágenes representativas de las CME propagadas en las diferentes diluciones de +EDA o -EDA en el tiempo (curva dosis-respuesta), (B) Imágenes representativas de las CME propagadas con la "dilución 10"; 10 μ l de las preparaciones de los péptidos por ml de MP; del péptido de FN indicado el día 3.

Realizamos una nueva preparación de los péptidos y evaluamos la tasa de proliferación de las CME en función de la concentración del péptido (curva dosis-respuesta). Evaluamos diluciones progresivas de las preparaciones de los péptidos para establecer la

nueva dilución a utilizar. Esta nueva preparación fue suficiente para todos los experimentos que mostramos a continuación.

Las CME fueron plaqueadas sobre gelatina en MP, luego de 24 horas el medio fue reemplazado por MP con el agregado de distintas concentraciones de los péptidos de FN. Medimos la tasa de proliferación mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta luego de 72 horas (Figura 30). Observamos un efecto dependiente de la concentración y elegimos la "dilución 1", 10 μ l de la preparación del péptido por ml de MP para realizar el siguiente experimento.

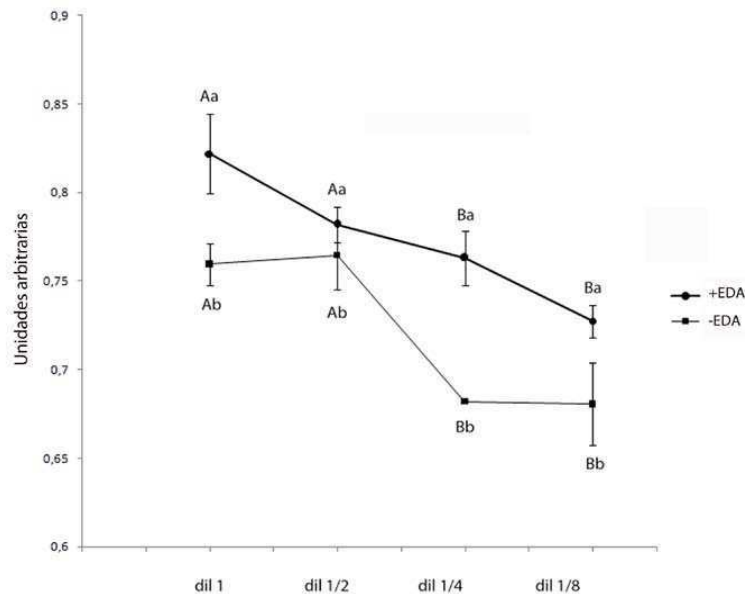


Figura 30. Curva concentración-respuesta al péptido +EDA y -EDA. Las CME Ainv15 fueron plaqueadas sobre gelatina en medio de propagación estándar, luego de 24 hs el medio fue reemplazado por el medio de propagación estándar con o sin el agregado de diluciones progresivas de la preparación del péptido de FN que incluye el exón EDA (+EDA) o lo excluye (-EDA) durante 72 hs. Dilución 1 corresponde a 10 μ l de la preparación del péptido por ml de MP. La proliferación fue cuantificada mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. Se muestra un experimento representativo de al menos tres réplicas independientes. Los datos presentados son la media \pm desvío estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de dos factores con el test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas entre las diluciones ($P < 0.01$). Las diferentes letras minúsculas indican diferencias significativas entre los tratamientos con EDA ($P < 0.001$).

Una vez hallada la concentración a la cual observamos un cambio en la proliferación de las CME, realizamos el siguiente ensayo. Las CME Ainv15 fueron plaqueadas sobre gelatina en MP, luego de 24 horas el medio fue reemplazado por MP con y sin el agregado la "dilución 1" (10 μ l de la preparación del péptido por mililitro de MP) del péptido +EDA y -EDA. La tasa de proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta luego de 48 y 72 horas. Observamos que las CME propagadas con el agregado del péptido +EDA presentan un aumento en la tasa de proliferación pero no observamos diferencias en la respuesta a la proliferación entre las CME sin tratar, es decir propagadas en MP sin

agregados; y aquellas tratadas con el péptido -EDA a las 24 horas, pero sí se observa a las 48 horas (Figura 31). En síntesis, observamos que la presencia del péptido en el medio aumenta la proliferación de las CME, pero observamos una respuesta más temprana y aumentada si incluye el exón EDA.

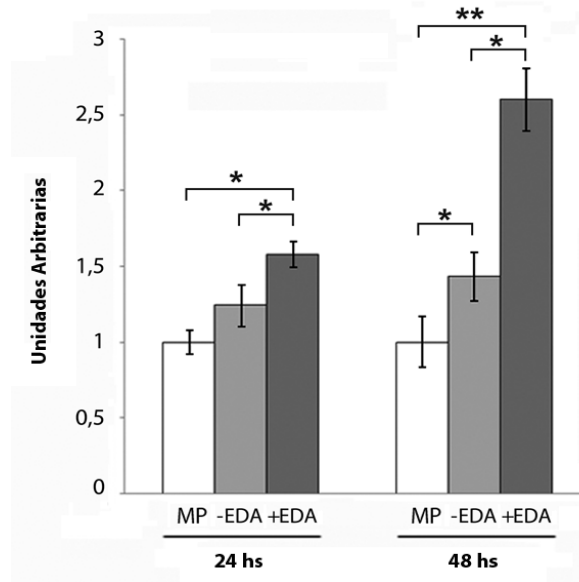


Figura 31. La proliferación de las CME aumenta con el péptido +EDA. Las CME *Alnv15* fueron plaqueadas sobre gelatina en medio de propagación estándar, luego de 24 hs el medio fue reemplazado por el medio de propagación estándar con o sin el agregado de la dilución 1 de la preparación del péptido de FN que incluye el exón EDA (+EDA) o lo excluye (-EDA) a lo largo del tiempo. Dilución 1 corresponde a 10 μ l de la preparación del péptido por mililitro de MP. La proliferación fue medida mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta a las 24 y 48 hs. Se muestra un experimento representativo de al menos tres replicas independientes. Las barras representan la media \pm desvío estándar. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de un factor con el test de Bonferroni para comparaciones múltiples. * indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$). ** indica diferencias significativas entre los tratamientos ($P < 0.05$).

Para extender nuestro análisis, estudiamos el efecto del péptido +EDA y -EDA en la línea de CME humana WAO9. Las CMEh fueron propagadas sobre Matrigel, luego el medio de proliferación estándar fue reemplazado por el mismo con o sin el agregado de la "dilución 1" del péptido +EDA y -EDA. La proliferación fue analizada mediante el ensayo *wound-healing* o sanado de herida^{74, 75}. En la Figura 32 observamos como proliferan a lo largo del tiempo las CMEh cultivadas en las distintas condiciones. Aquellas CMEh que fueron propagadas en presencia del péptido +EDA llenaron el área dañada más rápidamente que las CMEh que fueron propagadas con el péptido -EDA o MP.

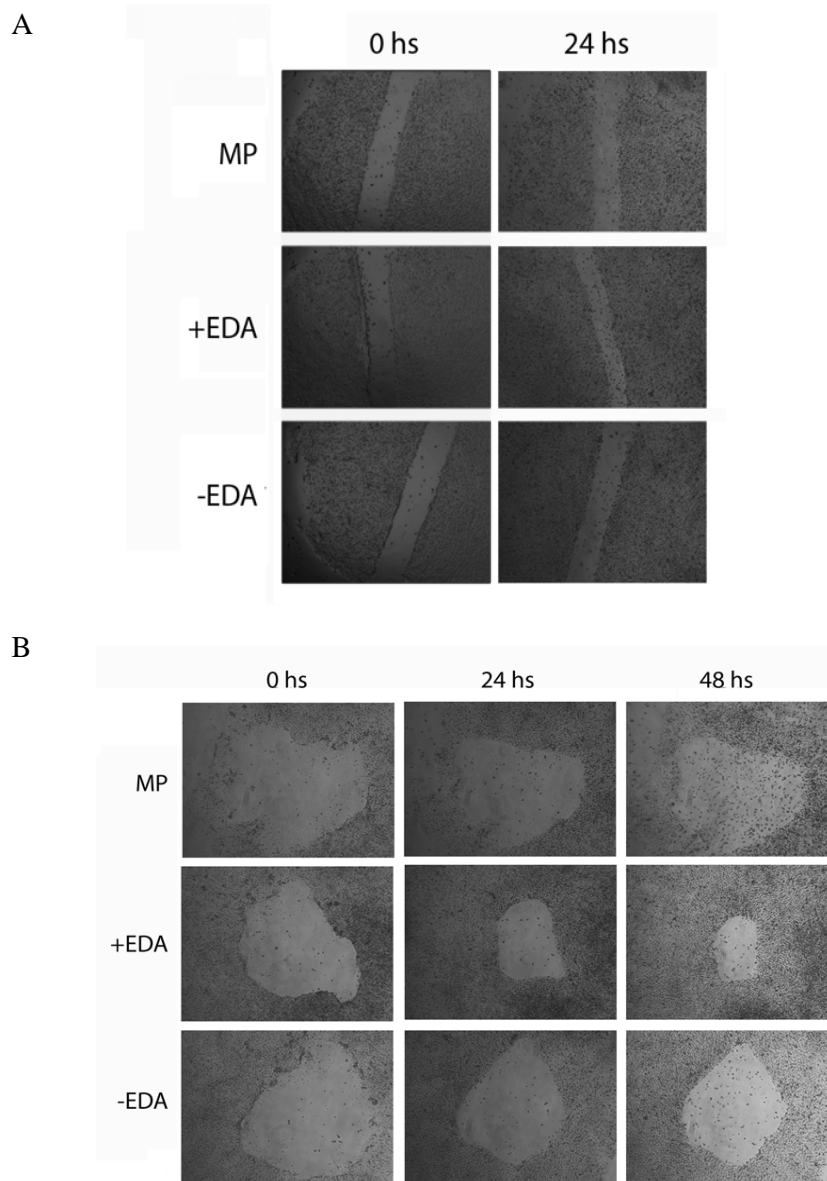


Figura 32. El péptido +EDA pero no el -EDA aumenta la proliferación de las CMEh. Las CMEh WAO9 fueron plaqueadas sobre Matrigel en medio de proliferación estándar, luego el medio fue reemplazado por MP con y sin el agregado de la "dilución 1" de la preparación del péptido de FN que incluye el exón EDA (+EDA) o lo excluye (-EDA). Dilución 1 corresponde a 10 μ l de la preparación del péptido por ml de MP. A-B, imágenes representativas del ensayo wound healing. La herida fue realizada el mismo día que el péptido se agregó al medio de cultivo y fue monitoreada a lo largo del tiempo. A, herida lineal, B; herida circular.

Asimismo, calculamos la proliferación de las CMEh WAO9 propagadas en las diferentes condiciones a partir del llenado del área dañada de manera lineal a las 24 horas (Figura 33). Observamos una proliferación mayor en aquellas CMEh que fueron propagadas con el péptido +EDA.

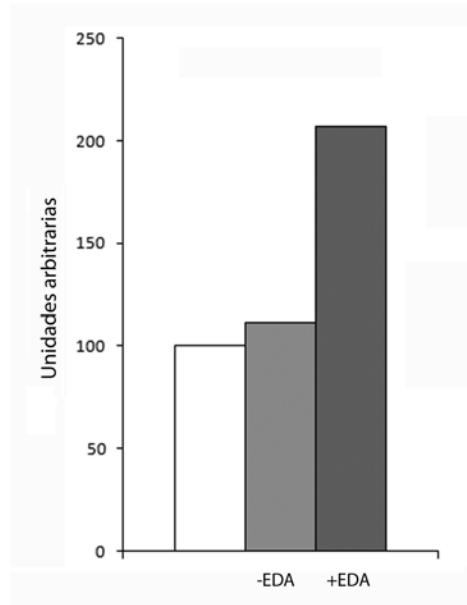


Figura 33. La proliferación de las CMEh aumenta con el péptido de fibronectina que incluye el exón EDA. Las CMEh WAO9 fueron plaqueadas sobre matrigel en medio de proliferación estándar, luego el medio fue reemplazado por MP con y sin el agregado de la "dilución 1" de la preparación del péptido de FN que incluye el exón EDA (+EDA) o lo excluye (-EDA). Dilución 1 corresponde a 10 μ l de la preparación del péptido por ml de MP. Mediante el ensayo de wound healing realizamos un daño lineal el mismo día que el péptido se agregó al medio de proliferación estándar. Luego de 24 hs, la proliferación se calculó a partir del llenado del área dañada mediante el uso del programa Image J. Gráfico representativo de las veces de aumento de proliferación en el medio indicado relativo a MP. Se muestra un experimento representativo de al menos tres réplicas independientes.

En resumen, a pesar de que encontramos cierto grado de variabilidad en la magnitud de la respuesta entre las diferentes réplicas biológicas, el péptido de fibronectina que incluye el exón EDA aumentó la proliferación en todas las réplicas. Observamos este efecto tanto en la línea de CMEM Ainv15 detectado por los ensayos MTT y tinción con Cristal Violeta evaluado en diferentes días de tratamiento, como en la línea de CMEh WAO9, y de manera preliminar en la línea de CMEh HUES5 (resultados no mostrados); ambos mediante el ensayo de *wound healing*.

Las diferencias en la magnitud de la respuesta de incremento en la proliferación que observamos en las distintas réplicas biológicas, podrían deberse a los distintos contextos metabólicos que podrían ser escenario biológico en cada caso, incluyendo los diferentes niveles de expresión endógena de FN+EDA. Actualmente, nos encontramos evaluando si existe correlación entre ambos parámetros.

Discusión

Durante el desarrollo de este trabajo, comenzamos explorando la posibilidad de cultivar CME en un medio novedoso que denominamos MC. Demostramos que cuando las CME y CMPI son propagadas en éste, conservan sus propiedades esenciales; es decir, pueden ser propagadas a lo largo del tiempo manteniendo su estado indiferenciado y son capaces de diferenciarse hacia los diferentes linajes pertenecientes a las tres capas embrionarias. Obtuvimos estos resultados en distintas líneas de células madre embrionarias de ratón de origen independiente y de manera preliminar, en tres líneas humanas.

El medio fue condicionado por una línea de granulosa bovina previamente establecida⁶⁰ y originalmente seleccionada por sus propiedades mitogénicas sobre la misma línea celular y sobre cultivos primarios de granulosa⁶¹. Las células de la granulosa secretan numerosos factores que podrían estar involucrados tanto en el mantenimiento de las propiedades esenciales de las CME de ratón como humanas; como el factor de crecimiento de fibroblastos, IGF, miembros de la familia de TGF- β , como Activina A^{76, 77, 78, 79} y la citoquina LIF⁴⁷. Particularmente, en la línea BGC se ha detectado la expresión de Activina A⁸⁰ y de LIF, en este trabajo. Originalmente, las CME requerían de una capa nutricia o *feeder layer*, constituida por fibroblastos embrionarios murinos previamente irradiados; que en los últimos años y en busca de condiciones de cultivo más definidas, fue sustituida con el agregado de la citoquina LIF al medio de propagación^{78, 79}, y el suero fetal fue reemplazado por un miembro de la familia TGF- β , BMP4⁴⁷. En los últimos años, han sido establecidas múltiples condiciones definidas que permiten cultivar las CME libres de la capa nutricia y el suero. Estas condiciones incluyen combinaciones de inhibidores de vías implicadas en la diferenciación, tales como las de FGF/Mek/Erk, y GSK3^{81, 82}. Aunque la identificación de los componentes precisos del medio condicionado no han sido abordados en este trabajo, la detección de la expresión de LIF en la línea BGC nos ha llevado a especular que esta citoquina podría ser el factor principal responsable del mantenimiento de las características de las CME de ratón. Finalmente, sabemos que FGFb está implicado en el mantenimiento de la pluripotencia de CME humanas⁸³. Dado que la línea BGC expresa este factor estamos evaluando si las CMEh pueden ser propagadas en el MC conservando su pluripotencia, ya que hemos demostrado que conservan la auto-renovación cuando son propagadas en ellas. Teniendo en cuenta los múltiples factores que están presentes en el MC, no podríamos asegurar que LIF o FGFb son los únicos factores responsables de la propagación de las células madre. Creemos que es un equilibrio entre múltiples señales en las CME lo que permite que éstas sean propagadas en el MC, manteniendo la auto-renovación y pluripotencia.

Por otra parte, observamos que el medio condicionado produjo un aumento en la tasa de proliferación de las células madre pluripotentes. Varios candidatos podrían ser responsables del incremento de la tasa de proliferación de las CMP cultivadas en este medio. Las células de la granulosa secretan numerosos factores que podrían estar involucrados en el efecto mitogénico.

Si bien LIF induce la proliferación en diversos tipos celulares, se sabe que este factor no está relacionado con la proliferación de las CME. Por otra parte, ha sido reportado que una isoforma de FN que incluye el exón EDA (FN+EDA), presente en el medio condicionado por la línea BGC es el factor responsable del efecto mitogénico observado en las células de granulosa ⁶².

La fibronectina participa en el mantenimiento de la supervivencia, adhesión, migración e invasión, entre otros procesos celulares. Particularmente, el segmento EDA es incluido en la proteína de FN en las diferentes especies en los tejidos embrionarios ⁵⁶, pero deja de incluirse en la proteína a medida que avanza el desarrollo ⁵⁵, por lo que está prácticamente ausente en tejidos adultos en condiciones normales ^{84, 85}. Sin embargo, FN EDA⁺ reaparece en tejidos relacionados con aumento en la proliferación, como por ejemplo en sitios de daño tisular, inflamación ^{55, 56}, sanado de heridas ^{56, 86, 87}, fibrosis tisular ⁵⁰⁻⁵², proliferación del músculo liso vascular. Notablemente, también se la asocia a sanado de fracturas y osteosarcoma, pero está ausente en el hueso normal adulto ⁵⁶. Asimismo, fue reportado que esta isoforma estimula la hiperproliferación de queratinocitos ⁸⁸ y la proliferación de fibroblastos de pulmón ⁸⁹, así como se la relacionó con el grado de malignidad de tumores ⁹⁰⁻⁹² y con psoriasis ⁸⁸.

Respecto a la señalización y efectores que podrían mediar su acción, se reportó que FN EDA⁺ induce la expresión de ciclina D1, hiperfosforilación de pRb, y la activación de ERK2 ⁵⁵ asociado a la promoción de la transición de la fase G1-S ⁵⁵, estas evidencias apoyan firmemente que esta isoforma está involucrada en la proliferación celular.

En este trabajo demostramos que el MC por la línea BGC aumenta la proliferación de células madre pluripotentes y que uno de los factores responsables de dicho efecto podría ser la FN EDA⁺ expresada por las BGC. Encontramos que esta isoforma de FN es un factor mitogénico para las CME de ratón y humanas. Hemos tratado esta cuestión mediante dos

abordajes experimentales diferentes que involucran el cultivo de estas células en presencia de EDA exógeno. En primer lugar, cultivamos las CME en presencia de medios condicionados por líneas celulares de MEF derivadas de ratones genéticamente modificados. Denominamos MEF EDA⁺ a la línea celular que solo secreta la isoforma de FN que incluye el exón EDA; MEF EDA⁻ a aquella que solo secreta la isoforma de FN que excluye EDA y MEF EDA^{wt} es la línea que secreta ambas isoformas, en una proporción aproximada de 60% de FN que incluye el exón EDA y 40% de FN que lo excluye. Por otra parte, suplementamos el medio de proliferación estándar con péptidos recombinantes de FN que contienen o no el exón EDA, expresado por bacterias y purificado mediante electroforesis y posterior electroelución.

En ambos casos observamos una tasa de proliferación mayor de las CME propagadas en presencia de EDA⁺ respecto a EDA⁻. Notablemente, si bien detectamos un ligero aumento en la proliferación en MC-MEF EDA⁺ respecto al MC-MEF^{wt}, las diferencias entre estas dos condiciones no fueron tan pronunciadas. Con respecto a esta observación, creemos que los niveles de FN EDA⁺ presente en el MC-MEF^{wt} podrían ser suficientes para promover la proliferación de las CME. Esta situación es diferente para el MC-MEF EDA⁻, dado que esta línea de MEF no expresa FN EDA⁺, ya que este exón fue eliminado del gen de FN ⁷³, lo que explica la baja tasa de proliferación de las CME cuando son propagadas en esta condición. En síntesis, proponemos que la isoforma de FN que incluye EDA tiene un efecto mitogénico sobre las CM pluripotentes.

Los componentes de la matriz extracelular interactúan con receptores transmembrana pertenecientes a la familia de integrinas y promueven la proliferación celular. Particularmente, la FN es uno de los componentes de la MEC que estimula, de manera altamente eficiente, la progresión del ciclo celular ⁹³. Si bien se demostró que FN induce proteínas protooncogénicas y regulatorias del ciclo celular mediado por la vía de señalización que involucra RhoA-PI3K/Akt-ERK 1/2 y caveolina-1 en las CMEm ⁹³. En dicho trabajo, no se especifica la isoforma de FN involucrada.

Recientemente fue reportado que la hipoxia aumenta la proliferación de las CME de ratón al inducir la expresión de los genes de FN y de integrina $\beta 1$ ⁹⁴. Allí, se describió la señalización involucrada en la inducción de FN y el consiguiente aumento de la proliferación en CME ⁹⁴. Asimismo, se ha sugerido que la expresión inducida de FN en las CME por altas concentraciones de glucosa, es responsable de una proliferación aumentada de estas células. Este estudio mostró que este efecto es dependiente de las vías de

señalización de angiotensina II, TGF- β y JNK. Sin embargo, en ninguno de estos trabajos se analizó cual es la isoforma de FN involucrada en los procesos mencionados.

En este trabajo, hemos observado un efecto de FN exógena sobre la proliferación de las CME y demostramos por primera vez, una respuesta diferencial de las CME a FN dependiendo de la inclusión de EDA.

Otro trabajo publicado recientemente, reportó que en las CMEm cultivadas en condiciones libres de *feeder layer*, la FN producida por las CMEm o agregada al medio de cultivo, interactúa con el sustrato o *coating* de gelatina, proporcionando una superficie capaz de mantener la adhesión y la auto-renovación ⁷².

Con respecto a los receptores de FN, a pesar de que las células expresan gran variedad de integrinas, y que existe algo de redundancia de las proteínas que se unen a ellas, la integrina $\alpha 5\beta 1$ ha sido reportada como el receptor clásico de FN ^{95, 96}. A pesar del hecho que $\alpha 4\beta 7$ ha sido propuesta como la integrina que parcialmente media la adhesión a FN EDA⁺ en fibroblastos de pulmón de ratón y humano ⁹⁷, $\alpha 4\beta 1$ fue reportado como el receptor de EDA en células de melanoma humano ⁹⁸, y la integrina $\alpha 9\beta 1$ fue propuesta como el receptor específico de FN EDA⁺ en múltiples modelos ^{90, 98-101}. Estas evidencias indicarían que no existe un único receptor específico de FN EDA⁺, sino que puede variar según el tejido y la especie involucrada.

Dado que FN EDA⁺ es más potente que FN EDA⁻ para promover la adhesión celular a través de un aumento en la unión al receptor integrina $\alpha 5\beta 1$, y que el ligando al unirse a este receptor promueve la síntesis de ADN a través de la activación de las vías de transducción de señales intercelular, que incluye ERK2, ciclina D1 y pRb, es probable que la inclusión del segmento EDA intensifique la transducción de la señal mitogénica dependiente de FN mediante una mayor afinidad en la unión FN a la integrina $\alpha 5\beta 1$ ⁵⁵.

Asimismo, la interacción de la célula con FN no solo es regulada por el *splicing* alternativo de la región EDA, sino también por el estado de afinidad de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Las integrinas poseen diferentes estados de afinidad que van desde formas inactivas a completamente activadas. Los estados de afinidad de las integrinas son modulados por la estimulación celular por quimioattractantes y la interacción con proteínas asociadas a la membrana tales como IAP (proteína asociada a integrina). Se ha reportado que la modulación de la afinidad de unión del ligando de la integrina $\alpha 5\beta 1$ afecta la proliferación celular dependiente de FN y la diferenciación celular al modular la transducción de señal

mediada por la integrina $\alpha 5\beta 1$. Es probable, que el *splicing* alternativo de FN y la modulación de la afinidad a la integrina $\alpha 5\beta 1$ coordinadamente regulen las señales extracelulares mediada por la integrina requerida para la proliferación, diferenciación y supervivencia de las células⁵⁵.

Basándose en la estructura tridimensional de una proteína recombinante correspondiente a un fragmento de FN, se propuso que la inserción del segmento de EDA altera la conformación global de la molécula de FN a través de una rotación de la de la porción N-terminal del polipéptido de FN relativo al C-terminal, resultando así en el aumento de la unión de FN EDA⁺ a la integrina $\alpha 5\beta 1$ debido a una exposición aumentada del motivo RGD y/o un mal plegamiento local del módulo. Asimismo, el segmento EDB no sustituye al EDA, no logra alterar la conformación global de FN ni tampoco aumentar la afinidad por la integrina $\alpha 5\beta 1$, por lo tanto, la inserción de un módulo de tipo III extra depende de la posición y/o la secuencia del módulo insertado, haciendo del segmento EDA, el más adecuado para modular la afinidad de unión a la integrina $\alpha 5\beta 1$ ⁵⁵.

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha, no hay evidencia acerca de un receptor específico de FN EDA⁺ en células madre. Aún queda por determinar si los mismos receptores y efectores que median los diferentes efectos de FN EDA⁺ sobre otros tipos celulares son los responsables del aumento de la tasa de proliferación que encontramos en este trabajo, producido por esta molécula sobre las células madre embrionarias.

Por otra parte, nuestros resultados preliminares indican que el medio condicionado por la línea BGC también tendría efecto mitogénico sobre las CMPI obtenidas en nuestro laboratorio. Actualmente nos encontramos estudiando el efecto de la FN EDA⁺ sobre este otro tipo de célula madre pluripotente. Otro aspecto que estamos estudiando es la variabilidad en la magnitud de la respuesta a FN EDA⁺ que observamos entre las diferentes réplicas biológicas. Hipotetizamos que esta diferencia puede deberse a distintos niveles de expresión de FN que incluye EDA por parte de las células madre pluripotentes, parámetro que puede ser afectado por diferentes contextos fisiológicos. Estamos analizando si existe correlación entre los niveles de FN EDA⁺ endógena y la respuesta a EDA exógeno. Asimismo, planeamos modular la inclusión de EDA endógeno y estudiar si varía la respuesta proliferativa, para determinar si existe una relación causal entre ambos parámetros, es decir, entre los niveles de FN EDA⁺ endógena y la respuesta proliferativa por parte de las células madre.

Nuestros resultados en conjunto demostraron la capacidad del medio condicionado de permitir la propagación de CME y CMPI, manteniendo sus propiedades esenciales; es

decir, conservando las capacidades de proliferar en estado indiferenciado y de diferenciarse a tipos celulares pertenecientes a diferentes linajes, en líneas de CME de origen independiente, tanto murinas como humanas y en una línea de CMPI obtenida en nuestro laboratorio. Por otra parte, encontramos condiciones que determinan un incremento en la tasa de proliferación de las CME de ratón. Finalmente, demostramos que una isoforma particular de FN produce un efecto mitogénico sobre las CMEm.

Con respecto a las CMEh, las proteínas de la matriz extracelular han sido ampliamente estudiadas como andamiaje o sustrato para promover tanto la diferenciación¹⁰² y la propagación en estado indiferenciado¹⁰³ mediante la activación de la adhesión. Sin embargo, a nuestro entender, este es el primer resultado en el cual mostramos, que una isoforma en particular de FN aumenta la proliferación de las CMEh cuando es agregada al medio de cultivo.

En síntesis, en una primera etapa de este trabajo, encontramos un medio condicionado que podría ofrecer una alternativa de bajo costo para el cultivo de diferentes líneas de CME durante largos períodos de tiempo y con una alta tasa de proliferación, conservando sus características básicas. Este medio podría ser una herramienta de investigación poderosa, ya que proporciona un contexto de cultivo novedoso para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en el mantenimiento de la auto-renovación y de la pluripotencia. Este tipo de escenarios novedosos puede contribuir a la identificación de nuevos factores importantes para la producción de medios de propagación definidos, adecuados para la aplicación terapéutica de las células madre.

Por otra parte, encontramos que la isoforma de FN que incluye el exón EDA produce un aumento de la proliferación en las células madre embrionarias.

Actualmente, si bien no conocemos cual es el receptor de tipo integrina al que se une FN EDA⁺, así como desconocemos cuál o cuáles son las vías de señalización involucradas que promueven el efecto mitogénico en las CME, los resultados que presentamos contribuyen al conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en los procesos fundamentales de las células madre pluripotentes.

Materiales y Métodos

Cultivo celular

Trabajamos con varias líneas de CME de ratón, CGR8, Nkx2.5eGFP y GKGFP, cedidas por los Dres. Michel Puceat, Sean Wu y Niels Giejsen, respectivamente y generadas de manera independiente. Las líneas Ainv15 y R1 fueron adquiridas comercialmente (ATCC). Todas las líneas pueden ser cultivadas sobre una capa nutricia de células o *feeder layer*, compuesta por fibroblastos embrionarios de ratón irradiados (MEFi) o sobre placas cubiertas con 0.1% de gelatina de piel bovina (Sigma) para favorecer la adherencia de las células.

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular mantuvimos las células en placas de cultivo de 6 cm de diámetro (p60) sobre MEFi utilizando medio de propagación (MP), compuesto por knockout Dulbecco's minimal essential medium (high-glucose DMEM) DMEM (Invitrogen: Gibco 10829-018) suplementado con 2mM l-alanyl-l-glutamine (Gibco), 100 mM MEM nonessential amino acids (Gibco), 0.5mM beta-bercaptoetanol, y antibióticos (100U/ml penicillina and 100 mg/mL streptomycin ,Gibco) 15% de SFB (Life Technologies). Además, contamos con la línea de células CHO (Chinese Hamster Ovary) modificada genéticamente de tal forma que sobreexpresa y secreta el factor LIF. Utilizamos este medio condicionado en reemplazo del LIF comercial para propagar las células de forma rutinaria, agregándolo al medio de cultivo. Realizamos una curva de dosis respuesta del mismo con cada nueva preparación, pero en general utilizamos 1µl de este medio condicionado por cada ml de medio de cultivo. Poseemos además el factor LIF comercial (1,000U/ml de LIF, Chemicon, ESG1106) para utilizar en casos en que se requieran condiciones más definidas. El medio de propagación estándar siempre contiene LIF, ya sea para el cultivo sobre MEFi como sobre gelatina.

Para preparar las placas con *feeder layer*, un día previo al pasaje de las células sembramos 5×10^5 MEFi en una p60 previamente tratada con 0.1% de gelatina de piel bovina; las dejamos adherir por 24 horas en presencia de medio MEF. El cultivo primario de MEF es establecido a partir de MEF obtenidas en nuestro laboratorio a partir de embriones de ratón de la cepa CF1 de 12,5 días^{69, 70, 104}.

Para diversas técnicas, como mencionamos previamente, cultivamos las células en placas p60 recubiertas con gelatina de piel bovina, para de esta forma evitar cualquier influencia que pudieran tener las MEF sobre las CME tanto en el proceso de diferenciación como en los distintos experimentos. Por ejemplo, en el caso de extracción de ARN de células para análisis de expresión génica, la presencia de MEF en la placa de CME interferiría con los resultados ya que la preparación quedaría contaminada con ARN de MEF. Para esto,

realizamos al menos tres pasajes en placas sin MEFi, cubiertas con gelatina y en presencia de MP. El recubrimiento de las placas lo realizamos tomando incubando durante 15 minutos en estufa a 37°C, un volumen suficiente para cubrir la superficie de la placa de solución 0,1% de gelatina preparada en buffer fosfato salino (PBS). Pasado este tiempo, removemos la solución de gelatina y sembramos la cantidad deseada de células, habitualmente 2×10^6 de CME para una p60, las cuales se adhieren en las primeras 24 horas. A lo largo de los sucesivos pasajes en gelatina, se va reduciendo la cantidad de MEF y al tercer pasaje, en general su cantidad es despreciable en comparación con las CME.

Realizamos el pasaje de las células cada 48 a 72 horas luego del plaqueo. Para esto, aspiramos el medio de cultivo y lavamos con 1 ml de PBS pH 7,4. Luego, descartamos el PBS y tratamos las placas con 0,4 ml de tripsina (Gibco) a 37°C de 3 a 5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disgregación de las células. Transcurrido ese tiempo, completamos la disgregación de forma mecánica con pipeta para evitar que queden agregados de células. Monitoreamos el proceso mediante observación al microscopio. Para inactivar la tripsina agregamos igual volumen de medio de propagación conteniendo 15% de SFB. Luego, colocamos el volumen de suspensión con la cantidad de células adecuadas en una nueva placa de cultivo y agregamos medio nuevo de forma tal que la tripsina quede diluida al menos 10 veces. La inactivación de la tripsina se debe a la presencia de suero en el medio de cultivo. Por un lado, el suero contiene inhibidores de la enzima, a la vez que el alto contenido proteico del mismo compite con las proteínas presentes en el cultivo por el uso de la enzima.

Determinamos la cantidad de células mediante el método de exclusión con Azul de Tripán. Para eso, tomamos 10 μ l de suspensión de células y los mezclamos con un volumen igual de solución 4% de Azul de Tripán. Para el recuento, tomamos 10 μ l de dicha dilución, los colocamos en una cámara de Neubauer y contamos las células no coloreadas en los cuatro campos de la cámara. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el recuento, realizamos diluciones de la mezcla de células con el colorante utilizando PBS. Las células viables son aquellas que excluyeron activamente el colorante. Estimamos el número de células por ml de suspensión promediando los valores de los cuatro cuadrantes y considerando la capacidad de la cámara (0,1 μ l) y la dilución realizada con el colorante.

Sembramos las células en una nueva p60 a una densidad aproximada de 2×10^6 células y en presencia de MP para alcanzar un volumen final de 3 ml. Realizamos la siembra por goteo de la suspensión celular de forma uniforme y luego mezclamos formando “ochos” para diseminar las células de forma homogénea a lo largo de la superficie de la placa.

Las células madre embrionarias humanas de la línea fueron utilizadas en colaboración con el grupo de Santiago Miriuka, de FLENI. La línea WAO9 provino del WiCell Research Institute (WI), la línea CMEh HUES-5 de Harvard University and the Howard Hughes Medical Institute (MA) de pasajes bajos (p15 a p20) y la línea CMEh S351, de Suecia. Mantuvimos las líneas de CMEh sobre una *feeder layer* de MEF inactivados mitóticamente, habitualmente mediante irradiación gama; en un medio que contiene of Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's F12 (DMEM/F12) suplementado con 20% KSR, 2 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomicina, 0.1 mM β-mercaptoetanol y 4 ng/ml de FGFb o sobre una placa de cultivo cubierta con Matrigel™ diluido (1/40) en medio condicionado MEF. Para la obtención de medio condicionado MEF, incubamos por 24 horas en 25 ml de medio DMEM/F12 suplementado con 5% KSR y 2 ng/ml de FGFb (además de los otros suplementos mencionados anteriormente) 3×10^6 células MEF inactivadas. Conservamos el medio condicionado a -20°C y una vez descongelado, le agregamos nuevas alícuotas de KSR y FGFb al medio para alcanzar una concentración final de 20% y 4 ng/ml, respectivamente.

Incubamos las células de todas las líneas en una estufa a 37°C y con una concentración de CO₂ del 5% y las controlamos a diario para verificar su correcto estado, cambiando el medio de cultivo de ser necesario.

Extracción de ADN genómico para la detección de Mycoplasma por PCR.

Como parte de nuestro trabajo de rutina, habitualmente controlamos la ausencia de la bacteria del género *Mycoplasma* en nuestros cultivos celulares. Dado que no se puede detectar con el análisis microscópico de rutina, como las demás contaminaciones, realizamos una extracción de ADN genómico y detectamos por PCR la presencia de su genoma¹⁰⁵. Utilizamos como control positivo de presencia de ADN genómico, para validar la ausencia del marcador de *Mycoplasma*, la presencia del gen GAPDH con primer que hibridan en el mismo exón. Brevemente, tripsinizamos las células y separamos 1/10 de las células presentes en una placa de 10 cm de diámetro en un tubo eppendorf. Centrifugamos 5 minutos a 1000 rpm. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con 200 µl de PBS y volvemos a centrifugar 5 minutos a 1000 rpm. Resuspendemos el pellet en 100 µl de buffer

de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20), al cual previamente le agregamos proteinasa K a una concentración final de 100 µg/ml. A continuación realizamos el lisado celular durante 1 hora a 60°C con agitación intermitente. Precipitamos el ADN con 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente durante 5 - 10 minutos. Centrifugamos a 13.000 g a temperatura ambiente durante 15 - 20 minutos, descartamos el sobrenadante y lavamos el pellet con etanol 70%. Secamos al aire y resuspendemos el pellet en 30 µl de agua. Rehidratamos el ADN incubando 1 hora a 65°C y lo guardamos a -20°C. Para realizar la amplificación por PCR, utilizamos 1-2 µl de la preparación. El programa que utilizamos para la misma es:

1. 5 minutos a 94 °C
2. 30 segundos a 94 °C
3. 30 segundos a 55 °C
4. 40 segundos a 72 °C
5. Ir al paso 2 39 veces
6. 5 minutos a 72 °C
7. Fin

| <i>Gen</i> | | <i>Secuencia del primer (5'-3')</i> |
|------------------------|---------|-------------------------------------|
| Marcador de Mycoplasma | Forward | ACACCATGGGAGYTGGTAAT |
| | Reverse | CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT |
| GAPDH | Forward | AAGAAGGTGGTGAAGCAG |
| | Reverse | CGAAGGTGGAAGAGTGGG |

Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio.

Congelamiento y descongelamiento de células

Para mantener un stock de células las congelamos en N₂ líquido de acuerdo al siguiente protocolo. Utilizamos una p60 y realizamos la tripsinización como se explicó previamente. Centrifugamos las células a 1000 g por 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml, las

resuspendemos en 1 ml de MP con una concentración final 25% SFB y 10% DMSO y las colocamos en hielo. Colocamos la suspensión en un criotubo y, siempre trabajando en frío, llevamos las células rápidamente a un freezer de -80 °C, colocando los criotubos en un recipiente de telgopor para lograr un enfriamiento gradual. Al cabo de 24 horas, los mismos son guardados en el termo que contiene N₂ líquido.

Para descongelar las células tomamos un criotubo del termo de N₂ líquido y lo calentamos rápidamente a 37°C hasta lograr el descongelamiento de la suspensión celular. Para remover el DMSO, que presenta una alta toxicidad celular, pasamos rápidamente el contenido del criotubo a un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de MP y lo centrifugamos a 1000 g por 5 minutos. Luego, resuspendemos las células en un volumen adecuado de MP y analizamos la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con Azul de Tripán, como se explicó anteriormente. Una vez verificado el estado de las células, las sembramos en la cantidad necesaria de placas de la superficie adecuada en presencia de MEFi.

Diferenciación celular

Las CME fueron sometidas a diferenciación de a través de la formación de cuerpos embrioides (EBs), empleando el protocolo de *Hanging Drop*¹⁷. Este protocolo consiste en la remoción de las señales que mantienen el estado indiferenciado y en favorecer los contactos celulares que promueven la diferenciación. Brevemente, consiste en sembrar las células en gotas de medio de cultivo de diferenciación (MD) en la tapa de placas no adherentes, que son las placas de Petri comúnmente utilizadas para el cultivo de bacterias, e incubarlas por 48 horas. Durante este período, las células se acumulan en el extremo de las gotas debido a la acción de la gravedad, interactuando entre sí y formando estructuras tridimensionales denominadas cuerpos embrioides. Posteriormente, los EBs son pasados a un período de crecimiento en suspensión por 72 horas, luego de los cuales se cultivan en adherencia durante distintos tiempos, entre 4 y 11 días. Durante este último período, los cuerpos se adhieren y las células proliferan y se diferencian a los diferentes linajes.

A lo largo del proceso utilizamos MD, cuya formulación es similar a la del MP, pero usando SFB 20% y sin el agregado de LIF.

Partimos de una p60 con CME mantenidas en estado indiferenciado en gelatina. Las tripsinizamos y resuspendemos 6×10^5 células en 15 ml de MD en un tubo cónico de 50 ml.

Preparamos 10 placas de bacterias colocando 1 ml de PBS en la base para evitar la posterior deshidratación de las gotas durante la incubación.

Utilizando una pipeta de repetición, colocamos gotas de 25 μ l de la suspensión celular conteniendo alrededor de 1000 células/gota en las tapas de las placas de bacterias y las incubamos a 37°C 5% CO₂ durante 48 horas.

Transcurrido ese tiempo se pueden visualizar los EBs a simple vista en las gotas de MD como puntos blancos. En ese momento, cosechamos las gotas con EBs agregando 1 ml de MD por placa y colectamos el medio con los cuerpos utilizando una pipeta de 5 ml, aplicando una succión suave para no dañarlos.

Por cada 5 placas con gotas, tomamos su contenido y lo sembramos en la base de una nueva placa de bacterias, de forma tal de obtener un volumen final de 10 ml. De esta forma, obtenemos 2 placas para cultivo en suspensión por cada 10 placas con gotas. Verificamos la integridad de los cuerpos a través de un microscopio invertido y los cultivamos en suspensión por 72 horas a 37 °C y 5% CO₂.

Al cabo de 72 horas de cultivo en suspensión los EBs aumentan su tamaño y se observan como puntos blancos flotando en el medio de cultivo. Colectamos los EBs como se explicó previamente y sembramos el contenido de cada placa de cultivo en suspensión en 3 placas p60 previamente recubiertas con gelatina, obteniendo de esta forma 6 p60 con cuerpos en adherencia.

Pasadas 24 horas, los EBs se adhieren a la placa de cultivo y en los días sucesivos las células proliferan, migran y se diferencian, por lo que se pueden distinguir diversas poblaciones celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias con morfologías claramente diferentes.

Obtención y preparación de los medios condicionados

Cultivamos las células de la línea BGC-1 o HEK293T en knockout Dulbecco's minimal essential medium (high-glucose DMEM) suplementado con SFB al 10% (Gibco), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), y los mismos antibióticos que utilizamos para preparar el MP, a una confluencia del 90%. Luego, el medio de cultivo fue reemplazado por medio fresco MP estándar sin SFB y beta-mercaptoetanol y se incubaron durante 24 horas. Después de la incubación, cosechamos el MC, centrifugamos a 2.000 g durante 10 min, y suplementamos con 15% de SFB y 0,5 mM beta-mercaptoetanol antes de utilizarlo.

Las diferentes líneas de MEF fueron preparadas a partir de animales EDA^{wt/wt}, EDA^{+/+} y EDA^{-/-}⁷³. Las MEF fueron obtenidas de embriones de 13.5 días y propagadas en knockout Dulbecco's minimal essential medium (high-glucose DMEM) suplementado con 10% SFB (GIBCO), glutamina y antibióticos durante los sucesivos pasajes hasta que las líneas celulares de MEF fueron establecidas. Denominamos MEF EDA⁺ a aquellas que solo expresan FN que incluye al exón EDA, MEF EDA⁻; a las células que solo expresan FN que excluye EDA, y MEF EDA^{wr}; a la línea celular que expresa ambas isoformas (60% FN EDA⁺ y 40% FN EDA⁻). Luego, cultivamos las líneas en el mismo medio de cultivo hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. A continuación, reemplazamos el medio de cultivo por medio fresco e incubamos por 24 horas. Después de la incubación, colectamos el medio condicionado, centrifugamos a 2000 g durante 10 minutos y suplementamos con LIF, 5% SFB (GIBCO), aminoácidos no esenciales y 0.5 mM β-mercaptoetanol, previo a su uso. Las diferentes líneas de MEF fueron gentilmente cedidas por el Dr. Andrés F. Muro, Trieste, Italia.

Preparación de los péptidos recombinante de FN que incluyen o no el exón EDA

Obtuvimos los péptidos recombinantes que incluyen o no el exón EDA como está descrito⁹⁷. Brevemente, para la obtención del péptido, utilizamos las bacterias competentes BL21 *E. coli* que fueron transfectadas con un plásmido que contiene un fragmento de 804 pb correspondientes al segmento de EDA flanqueado por las repeticiones 11 y 12 de tipo III, o 534 pb que carecen del dominio EDA. Las secuencias fueron clonadas en el sitio BamHI del vector de expresión pProEX HTB. Estas bacterias fueron gentilmente cedidas por el Dr. Andrés F. Muro, Trieste, Italia. Indujimos la expresión de los péptidos agregando IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) a una concentración final 1 mM. Lisamos las bacterias congelando y descongelando y sonicamos en un sonicador BRANSON - Fisher Scientific Model 500; realizando 8 pulsos de 10 segundos a 15% de amplitud con intervalos de 10 segundos en hielo. Extrajimos las proteínas totales, las sometimos a electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante, 12% SDS-PAGE y cortamos la bandas correspondiente a los péptidos que incluyen o no EDA, previamente teñimos los geles con 1M de KCl para visualizarlas. A continuación, extrajimos el péptido mediante electroelución en un buffer 50 mM carbonato/bicarbonato pH 9.6, durante 3 horas a 150 mA, en una

membrana de diálisis benzoilada con un tamaño de poro de 2000 PM (Sigma, D-2272). Cuantificamos el contenido proteico de las preparaciones mediante el método de *Bradford*.

Extracción de ARN y cuantificación

Las CME fueron propagadas en MC, MC-HEK, MP y/o MP sin LIF al menos tres pasajes o siete días en placas de cultivo previamente cubiertas con 0.1% de gelatina de piel bovina. Realizamos la extracción de ARN total según Chomczynsky and Sacchi ¹⁰⁶, utilizando Trizol (Invitrogen). El reactivo de Trizol está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que facilitan el aislamiento de los diversos tipos de ARN. La extracción de ARN requiere trabajar con mucha cautela, siempre en condiciones libres de RNAsa para evitar su degradación.

Para el aislamiento, descartamos el medio de cultivo de la placa que contiene las células y agregamos 1 ml de Trizol por placa de 3,5 cm de diámetro, homogeneizamos utilizando un rastrillo de goma (*scraper*) e incubamos por 5 minutos a temperatura ambiente. Colocamos la muestra en un tubo eppendorf y agregamos 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Incubamos a temperatura ambiente por 2-3 minutos. Centrifugamos el tubo a 12.000 g durante 15 minutos a 4°C, luego de los cuales observaremos tres fases: una superior acuosa que contiene el ARN, una interfase y una fase inferior roja compuesta por fenol-cloroformo. Transferimos la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y agregamos 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol. Incubamos 10 minutos a temperatura ambiente para favorecer la precipitación del ARN. Centrifugamos durante 10 minutos a 12.000 g a 4 °C, luego de los cuales se observa un precipitado blanco tipo gel correspondiente al ARN. Descartamos cuidadosamente el sobrenadante y lavamos el *pellet* con 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de Trizol utilizado. Homogeneizamos con *vortex* y centrifugamos a 7500 g durante 5 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente. Por último, resuspendemos el pellet en 30 µl de agua libre de RNAsa y preservamos el ARN purificado a -80 °C.

Para realizar la cuantificación del ARN utilizamos el equipo NanoDrop, un espectrómetro de amplio espectro (220-750 nm) que mide 1 µl de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Brevemente, se coloca 1 µl de muestra en la punta de una fibra óptica y, en segundos, el equipo otorga la concentración de la misma, la cual puede estar en un rango de

2 a 3000 ng/μl. La concentración se obtiene por la medición de la absorbancia cuando la muestra es excitada a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos. El equipo también evalúa la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y se calcula la relación 260/280, la cual debe ser superior a 1.7-1.8 para ser considerada de una pureza aceptable.

Retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc utilizamos la enzima transcriptasa reversa del virus MMLV (Invitrogen). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en presencia de un *primer* para sintetizar la hebra de ADNc.

Para todas las reacciones, partimos de 1 μg de ARN para una masa representativa y homogénea del cultivo celular. Realizamos la reacción en dos pasos; primero alicuotamos en un tubo el ARN y el agua, incubamos a 65°C por 5 minutos en un termociclador (Bio-Rad) para de esta forma desnaturalizar el ARN y romper las posibles estructuras secundarias que pudieran haberse formado. Luego, agregamos 10 μl de la mezcla de retrotranscripción e incubamos a 37°C por 50 minutos, tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc. Por último, calentamos a 70°C por 15 minutos para inactivar la enzima.

PCR

Realizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final utilizando la ADN polimerasa DreamTaq (Fermentas). La reacción fue llevada a cabo en el equipo Peltier Thermal Cycler DNA (BioRad). Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido bromuro de etidio para poder visualizar las bandas de ADN. Detallamos a continuación los primers utilizados:

| <i>Gen</i> | | <i>Secuencia del primer (5'-3')</i> |
|------------|---------|-------------------------------------|
| OCT4 | Forward | TGACGGGAACAGAGGGAAAG |
| | Reverse | TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG |
| Nanog | Forward | AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG |
| | Reverse | CAACCACTGGTTTTTCTGCCACCG |

| | | |
|-----------|---------|----------------------------------|
| Sox2 | Forward | CACAACCTCGGAGATCAGCAA |
| | Reverse | CTCCGGGAAGCGTGTACTTA |
| Klf4 | Forward | GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC |
| | Reverse | TCGCTTCCTCTTCTCCGACACA |
| cMyc | Forward | TGACCTAACTCGAGGAGGAGCTGGAATC |
| | Reverse | AAGTTTGAGGCAGTTAAAATTATGGCTGAAGC |
| Rex1 | Forward | ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA |
| | Reverse | TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT |
| Ecat1 | Forward | TGTGGGGCCCTGAAAGGCGAGCTGAGAT |
| | Reverse | ATGGGCCGCCATACGACGACGCTCAACT |
| Mesp1 | Forward | GCGACATGCTGGCTCTTCTA |
| | Reverse | TGGTATCACTGCCGCCTCTTCC |
| Mesp2 | Forward | GTGCCTTTATCTGCCTCTTCTG |
| | Reverse | AGCGGGGGTGTCTTGTCTC |
| Miocardin | Forward | CATTGTTTCCAAGGAGATTC |
| | Reverse | GCGATGTTACCCTCCTCAAAA |
| Isl1 | Forward | CATCGAGTGTTTCCGCTGTGTAG |
| | Reverse | GTGGTCTTCTCCGGCTGCTTGTGG |
| Brachyury | Forward | GACTTCGTGACGGCTGACAA |
| | Reverse | CGAGTCTGGGTGGATGTAG |
| Nkx2.5 | Forward | ACATTTTACCCGGGAGCCTACGGTG |
| | Reverse | GCTTTCCGTCGCCGCCGTGCGCGTG |
| actina | Forward | GTGGGCCGCTCTAGGCACCA |
| | Reverse | CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG |
| IGF | Forward | TCTGTGCGGCGGGGAGCTGGT |
| | Reverse | AGTCTCCAGCAGGGCCAGGTCTG |
| FGF | Forward | GAACGGGGGCTTCTTCCT |
| | Reverse | CCCAGTTCGTTTCAGTGCC |
| LIF | Forward | GCTCCAGTATATAAATCAGG |
| | Reverse | GATCTGGTTCATGAGGTTGC |

Inmunofluorescencia

Cultivamos las células sobre vidrios cubreobjetos en placas de 12 o 24 wells cubiertas con gelatina como se especificó previamente. Una vez adheridas las células o llegado al estadio de diferenciación deseado, descartamos el medio de cultivo y realizamos tres lavados con PBS. Fijamos y permeabilizamos las células mediante el agregado de 0,5 ml de metanol a -20°C durante 10 minutos, luego realizamos lavados con PBS para eliminar el exceso de metanol. Realizamos el bloqueo incubando los wells con 0,5 ml de una solución 0.1% de suero de cabra en PBS-Tween, durante media hora a temperatura ambiente. Realizamos la incubación con el anticuerpo primario específico para cada marcador en estudio utilizando una dilución de dicho anticuerpo en PBS Tween. Incubamos cada well con 200 µl de anticuerpo primario específico para los marcadores en estudio durante una hora a temperatura ambiente. Luego, realizamos 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween para remover el exceso de anticuerpo primario e incubamos con 200 µl del anticuerpo secundario por 40 minutos. En la mezcla de incubación, además agregamos 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 0,1 µg/ml para marcar los núcleos de todas las células. Montamos los cubreobjetos con 7 µl de solución de montaje Mowiol/Dabco, dejamos secar un día y sellamos con esmalte de uñas transparente. Conservamos en frío y en oscuridad hasta observar al microscopio. Obtuvimos las imágenes utilizando un microscopio confocal Olympus IX81/Fluoview FV 1000 y las procesamos con el software Photoshop CS3. Detallamos a continuación los anticuerpos utilizados:

| <i>Anticuerpo</i> | <i>Dilución de trabajo</i> | <i>Proveedor</i> |
|---------------------------|----------------------------|--------------------------|
| OCT4 | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| SSEA-1 | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| Stat3 | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology |
| p-Stat3 | 1:100 | Santa Cruz Biotechnology |
| Alphafetoprotein | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| β III tubulin | 1:200 | Santa Cruz Biotechnology |
| Alpha Smooth Muscle Actin | 1:200 | Dako |

Formación de teratomas y análisis histológicos

Cultivamos las CME en MC por lo menos tres pasajes o 7 días en placas de cultivo previamente tratadas con 0,1% de gelatina de piel bovina; cosechamos las células por tratamiento con tripsina, las centrifugamos y las resuspendimos a una densidad de 1×10^7 células/ml en DMEM en ausencia de SFB. Mantuvimos las células a 37°C hasta la inyección. A continuación, inyectamos 100 μ l de la suspensión celular (1×10^6 células) subcutáneamente en el flanco dorsal de ratones de la cepa *nude* (nu/nu) de 6-8-semanas de edad. Dos semanas después de la aparición del tumor los animales fueron anestesiados en una cámara con CO₂ y se sacrificaron por dislocación cervical. Removimos los tumores quirúrgicamente, fijamos en PBS con 4% de formaldehído, e incluimos en parafina. Se hicieron cortes de los mismos (secciones de 4 mm) y realizamos ensayos de inmunohistoquímica o se tiñeron con hematoxilina y eosina. Para inmunohistoquímica, bloqueamos las cortes con 1% de suero de cabra en PBS, lavamos e incubamos con los anticuerpos primarios durante 1 hora a temperatura ambiente. Después lavamos en PBS e incubamos los cortes durante 30 minutos con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (HRP), lavamos y revelamos (ABC Kit, Vector, Ref. PK-6200). Luego, teñimos las muestras con hematoxilina. Los procedimientos que se llevaron a cabo con los ratones, se realizaron de acuerdo a las normas éticas locales.

Ensayos de proliferación celular

Evaluamos la proliferación de las células mediante diferentes ensayos. Para ello, cultivamos las CME en placas cubiertas con 0.1% de gelatina en medio de proliferación estándar. Luego, tripsinizamos las células y las plaqueamos en una placa multiwell de fondo plano de 96 pocillos. Para cada experimento, sembramos entre 5.000 – 10.000 células por pocillo, dejamos crecer en MP durante 24 horas y una vez adheridas, les cambiamos el medio por MC o MP según corresponda, preparado sin rojo fenol, según el protocolo que decidamos utilizar.

El ensayo de MTT es un ensayo colorimétrico que mide la actividad de las enzimas mitocondriales que reducen al colorante de tatrazolio (sal) MTT o XTT que es otro colorante muy relacionado.

Se cuantificó la proliferación de las células por el método de sodio 2,3 -bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -5 - [(fenilamino)-carbonil]-2H-tetrazolio inner salt (XTT) (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, un volumen de solución XTT igual al 20% del medio de cultivo fue agregado 3 horas antes de la medición. La formación de producto coloreado; un derivado de formazan de color naranja; se cuantificó al coleccionar el medio de cultivo, y realizando la lectura de su absorbancia a 450 nm, en un lector de placas multiwell (Microplate Reader, BioRad, modelo 680). Se restó la contribución de la sal de sodio (reactivo de XTT) a 690 nm Realizamos una medición inicial 3 horas después de la siembra de las células en la placa. Luego, medimos la absorbancia a 450 y 690 nm todos los días. La tasa de proliferación fue calculada relativizando al medio de proliferación estándar. Asimismo, se cuantificó la proliferación de las células utilizando el tetrazolio MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). Brevemente, agregamos 20 µl de la solución madre de MTT (5 mg/ml en PBS) a un *well* de una placa de 96 pocillos con 200 µl del medio correspondiente. Protegimos las placas de la luz e incubamos 4 horas a 37 C (en estufa). Luego reemplazamos el medio por 100 µl de isopropanol y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Cuantificamos la formación de producto coloreado, formazán de color púrpura; realizando la lectura de su absorbancia a 570 nm y restamos la contribución de la sal del MTT, un tetrazolio amarillo; a 650 nm. Medimos la absorbancia los días indicados. La tasa de proliferación fue calculada relativizando al medio de proliferación estándar.

Por otra parte, cuantificamos la proliferación mediante el ensayo de tinción con Cristal Violeta. El Cristal Violeta es un ensayo colorimétrico para la cuantificación del ADN. Este colorante ingresa al núcleo y se une a la carga negativa del ADN. Brevemente, lavamos las células 2 veces con PBS frío y luego fueron fijadas con metanol 10 minutos a -20 °C. Llevamos a cabo la tinción con 0.5% Cristal Violeta en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Lavamos las células con agua y secamos a temperatura ambiente protegidas de la luz. El Cristal Violeta que incorporaron las células se solubilizó con una solución 10% ácido acético durante 30 minutos a temperatura ambiente. Medimos la absorbancia a 590-595 nm los días indicados.

Además, cuantificamos la proliferación mediante el ensayo de sanado de herida o *wound healing*. Para este ensayo, realizamos una herida en el centro de las colonias de CMEh mediante un rasguño o aspiración de las células con la punta de un *tip* de una pipeta de

200 μ l. Lavamos las células con PBS y reemplazamos el medio por medio fresco que contiene o no los péptidos indicados. El sanado se monitoreó por fotomicrografías tomadas todos los días. Las imágenes fueron analizadas con el programa ImageJ para cuantificación del área cubierta.

Bibliografía

1. Menard, C. et al. Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet* **366**, 1005-12 (2005).
2. Rosenstrauch, D., Poglajen, G., Zidar, N. & Gregoric, I.D. Stem celltherapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J* **32**, 339-47 (2005).
3. Yoon, Y.S., Lee, N. & Scadova, H. Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biol Cell* **97**, 253-63 (2005).
4. Yoon, Y.S. et al. Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *J Clin Invest* **115**, 326-38 (2005).
5. Itescu, S., Schuster, M.D. & Kocher, A.A. New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *J Mol Med* **81**, 288-96 (2003).
6. Battista, D., Ferrari, C.C., Gage, F.H. & Pitossi, F.J. Neurogenic niche modulation by activated microglia: transforming growth factor beta increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **23**, 83-93 (2006).
7. Nagy, R.D. et al. Stem cell transplantation as a therapeutic approach to organ failure. *J Surg Res* **129**, 152-60 (2005).
8. Gepstein, L. Derivation and potential applications of human embryonic stem cells. *Circ Res* **91**, 866-76 (2002).
9. Ginis, I. & Rao, M.S. Toward cell replacement therapy: promises and caveats. *Exp Neurol* **184**, 61-77 (2003).
10. Evans, M.J. & Kaufman, M.H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-6 (1981).
11. Martin, G.R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7634-8 (1981).
12. Thomson, J.A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145-7 (1998).
13. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76 (2006).
14. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72 (2007).
15. Hiyama, E. & Hiyama, K. Telomere and telomerase in stem cells. *Br J Cancer* **96**, 1020-4 (2007).
16. Tkemaladze, J. & Chichinadze, K. Centriole, differentiation, and senescence. *Rejuvenation Res* **13**, 339-42.
17. Kurosawa, H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng* **103**, 389-98 (2007).
18. Niwa, H. How is pluripotency determined and maintained? *Development* **134**, 635-46 (2007).
19. Hirai, H., Karian, P. & Kikyo, N. Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* **438**, 11-23.
20. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A.G. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**, 372-6 (2000).
21. Sato, N., Meijer, L., Skaltsounis, L., Greengard, P. & Brivanlou, A.H. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* **10**, 55-63 (2004).

22. Chambers, I. & Tomlinson, S.R. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* **136**, 2311-22 (2009).
23. Liu, N., Lu, M., Tian, X. & Han, Z. Molecular mechanisms involved in self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *J Cell Physiol* **211**, 279-86 (2007).
24. Leahy, A., Xiong, J.W., Kuhnert, F. & Stuhlmann, H. Use of developmental marker genes to define temporal and spatial patterns of differentiation during embryoid body formation. *J Exp Zool* **284**, 67-81 (1999).
25. Niwa, H. Molecular mechanism to maintain stem cell renewal of ES cells. *Cell Struct Funct* **26**, 137-48 (2001).
26. Hanna, L.A., Foreman, R.K., Tarasenko, I.A., Kessler, D.S. & Labosky, P.A. Requirement for Foxd3 in maintaining pluripotent cells of the early mouse embryo. *Genes Dev* **16**, 2650-61 (2002).
27. Kuroda, T. et al. Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol* **25**, 2475-85 (2005).
28. Brenner, C.A., Adler, R.R., Rappolee, D.A., Pedersen, R.A. & Werb, Z. Genes for extracellular-matrix-degrading metalloproteinases and their inhibitor, TIMP, are expressed during early mammalian development. *Genes Dev* **3**, 848-59 (1989).
29. Kirn-Safran, C.B., D'Souza, S.S. & Carson, D.D. Heparan sulfate proteoglycans and their binding proteins in embryo implantation and placentation. *Semin Cell Dev Biol* **19**, 187-93 (2008).
30. Strickland, S., Reich, E. & Sherman, M.I. Plasminogen activator in early embryogenesis: enzyme production by trophoblast and parietal endoderm. *Cell* **9**, 231-40 (1976).
31. O'Shea, K.S. Self-renewal vs. differentiation of mouse embryonic stem cells. *Biol Reprod* **71**, 1755-65 (2004).
32. Robb, L. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **26**, 6715-23 (2007).
33. Chapman, R.S. et al. Suppression of epithelial apoptosis and delayed mammary gland involution in mice with a conditional knockout of Stat3. *Genes Dev* **13**, 2604-16 (1999).
34. Akaishi, H. et al. Defective IL-2-mediated IL-2 receptor alpha chain expression in Stat3-deficient T lymphocytes. *Int Immunol* **10**, 1747-51 (1998).
35. Fukada, T. et al. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G1 to S cell-cycle transition. *Embo J* **17**, 6670-7 (1998).
36. de Groot, R.P., Raaijmakers, J.A., Lammers, J.W. & Koenderman, L. STAT5-Dependent CyclinD1 and Bcl-xL expression in Bcr-Abl-transformed cells. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**, 299-305 (2000).
37. Bromberg, J.F. et al. Stat3 as an oncogene. *Cell* **98**, 295-303 (1999).
38. Sinibaldi, D. et al. Induction of p21WAF1/CIP1 and cyclin D1 expression by the Src oncoprotein in mouse fibroblasts: role of activated STAT3 signaling. *Oncogene* **19**, 5419-27 (2000).
39. Bowman, T. et al. Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7319-24 (2001).
40. Garcia, R. et al. Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells. *Oncogene* **20**, 2499-513 (2001).
41. Catlett-Falcone, R., Dalton, W.S. & Jove, R. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription. *Curr Opin Oncol* **11**, 490-6 (1999).

42. Buettner, R., Mora, L.B. & Jove, R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res* **8**, 945-54 (2002).
43. Takahashi, K., Murakami, M. & Yamanaka, S. Role of the phosphoinositide 3-kinase pathway in mouse embryonic stem (ES) cells. *Biochem Soc Trans* **33**, 1522-5 (2005).
44. Welham, M.J., Storm, M.P., Kingham, E. & Bone, H.K. Phosphoinositide 3-kinases and regulation of embryonic stem cell fate. *Biochem Soc Trans* **35**, 225-8 (2007).
45. Cartwright, P. et al. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* **132**, 885-96 (2005).
46. Cross, D.A., Alessi, D.R., Cohen, P., Andjelkovich, M. & Hemmings, B.A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* **378**, 785-9 (1995).
47. Ying, Q.L., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell* **115**, 281-92 (2003).
48. Mandal, S., Lindgren, A.G., Srivastava, A.S., Clark, A.T. & Banerjee, U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells* **29**, 486-95 (2010).
49. Abdelalim, E.M. & Tooyama, I. BNP signaling is crucial for embryonic stem cell proliferation. *PLoS One* **4**, e5341 (2009).
50. Muro, A.F. et al. An essential role for fibronectin extra type III domain A in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **177**, 638-45 (2008).
51. Akiyama, S.K., Yamada, S.S., Chen, W.T. & Yamada, K.M. Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: roles in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* **109**, 863-75 (1989).
52. White, E.S., Baralle, F.E. & Muro, A.F. New insights into form and function of fibronectin splice variants. *J Pathol* **216**, 1-14 (2008).
53. Kim, Y.H., Ryu, J.M., Lee, Y.J. & Han, H.J. Fibronectin synthesis by high glucose level mediated proliferation of mouse embryonic stem cells: Involvement of ANG II and TGF-beta1. *J Cell Physiol* **223**, 397-407.
54. Park, J.H., Ryu, J.M. & Han, H.J. Involvement of caveolin-1 in fibronectin-induced mouse embryonic stem cell proliferation: role of FAK, RhoA, PI3K/Akt, and ERK 1/2 pathways. *J Cell Physiol* **226**, 267-75.
55. Manabe, R., Oh-e, N. & Sekiguchi, K. Alternatively spliced EDA segment regulates fibronectin-dependent cell cycle progression and mitogenic signal transduction. *J Biol Chem* **274**, 5919-24 (1999).
56. Kilian, O. et al. Expression of EDA+ and EDB+ fibronectin splice variants in bone. *Bone* **35**, 1334-45 (2004).
57. Cseh, B. et al. Autocrine fibronectin directs matrix assembly and crosstalk between cell-matrix and cell-cell adhesion in vascular endothelial cells. *J Cell Sci* **123**, 3989-99 (2010).
58. Pimton, P. et al. Fibronectin-mediated upregulation of alpha5beta1 integrin and cell adhesion during differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cell Adh Migr* **5**, 73-82 (2011).
59. Loebel, D.A., Watson, C.M., De Young, R.A. & Tam, P.P. Lineage choice and differentiation in mouse embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* **264**, 1-14 (2003).
60. Bernath, V.A. et al. Cyclic AMP inhibits fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem* **265**, 18219-26 (1990).

61. Lerner, A.A., Salamone, D.F., Chiappe, M.E. & Baranao, J.L. Comparative studies between freshly isolated and spontaneously immortalized bovine granulosa cells: protein secretion, steroid metabolism, and responsiveness to growth factors. *J Cell Physiol* **164**, 395-403 (1995).
62. Colman-Lerner, A. et al. Evidence for a role of the alternatively spliced ED-I sequence of fibronectin during ovarian follicular development. *Endocrinology* **140**, 2541-8 (1999).
63. Chung, B.M. et al. Jak2 and Tyk2 are necessary for lineage-specific differentiation, but not for the maintenance of self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **351**, 682-8 (2006).
64. Constantinescu, S. Stemness, fusion and renewal of hematopoietic and embryonic stem cells. *J Cell Mol Med* **7**, 103-12 (2003).
65. Forrai, A. et al. Absence of suppressor of cytokine signalling 3 reduces self-renewal and promotes differentiation in murine embryonic stem cells. *Stem Cells* **24**, 604-14 (2006).
66. Boiani, M. & Scholer, H.R. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 872-84 (2005).
67. Li, Y. et al. Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood* **105**, 635-7 (2005).
68. Imamura, M. et al. Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Dev Biol* **6**, 34 (2006).
69. Solari, C. et al. Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Biochem Biophys Res Commun* **410**, 252-7 (2011).
70. Losino, N. et al. Maintenance of murine embryonic stem cells' self-renewal and pluripotency with increase in proliferation rate by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Stem Cells Dev* **20**, 1439-49 (2011).
71. Bendall, S.C. et al. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* **448**, 1015-21 (2007).
72. Hunt, G.C., Singh, P. & Schwarzbauer, J.E. Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells. *Exp Cell Res* **318**, 1820-31 (2012).
73. Muro, A.F. et al. Regulated splicing of the fibronectin EDA exon is essential for proper skin wound healing and normal lifespan. *J Cell Biol* **162**, 149-60 (2003).
74. Rodriguez, L.G., Wu, X. & Guan, J.L. Wound-healing assay. *Methods Mol Biol* **294**, 23-9 (2005).
75. Liang, C.C., Park, A.Y. & Guan, J.L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* **2**, 329-33 (2007).
76. Skinner, M.K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum Reprod Update* **11**, 461-71 (2005).
77. Knight, P.G. & Glister, C. Potential local regulatory functions of inhibins, activins and follistatin in the ovary. *Reproduction* **121**, 503-12 (2001).
78. Smith, A.G. et al. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* **336**, 688-90 (1988).
79. Williams, R.L. et al. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* **336**, 684-7 (1988).
80. Fazzini, M. et al. Transforming growth factor beta1 regulates follistatin mRNA expression during in vitro bovine granulosa cell differentiation. *J Cell Physiol* **207**, 40-8 (2006).

81. Ying, Q.L. et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* **453**, 519-23 (2008).
82. Hall, J. et al. Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell* **5**, 597-609 (2009).
83. Vallier, L., Alexander, M. & Pedersen, R.A. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* **118**, 4495-509 (2005).
84. Norton, P.A. & Hynes, R.O. Alternative splicing of chicken fibronectin in embryos and in normal and transformed cells. *Mol Cell Biol* **7**, 4297-307 (1987).
85. Vartio, T. et al. Differential expression of the ED sequence-containing form of cellular fibronectin in embryonic and adult human tissues. *J Cell Sci* **88** (Pt 4), 419-30 (1987).
86. Ffrench-Constant, C., Van de Water, L., Dvorak, H.F. & Hynes, R.O. Reappearance of an embryonic pattern of fibronectin splicing during wound healing in the adult rat. *J Cell Biol* **109**, 903-14 (1989).
87. Leiss, M., Beckmann, K., Giros, A., Costell, M. & Fassler, R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Curr Opin Cell Biol* **20**, 502-7 (2008).
88. McFadden, J.P., Basketter, D.A., Dearman, R.J. & Kimber, I.R. Extra domain A-positive fibronectin-positive feedback loops and their association with cutaneous inflammatory disease. *Clin Dermatol* **29**, 257-65 (2011).
89. Kohan, M., Muro, A.F., Bader, R. & Berkman, N. The extra domain A of fibronectin is essential for allergen-induced airway fibrosis and hyperresponsiveness in mice. *J Allergy Clin Immunol* **127**, 439-446 e1-5.
90. Ou, J. et al. Endostatin suppresses colorectal tumor-induced lymphangiogenesis by inhibiting expression of fibronectin extra domain A and integrin alpha9. *J Cell Biochem* **112**, 2106-14 (2011).
91. Allen, M.D. et al. Clinical and functional significance of alpha9beta1 integrin expression in breast cancer: a novel cell-surface marker of the basal phenotype that promotes tumour cell invasion. *J Pathol* **223**, 646-58 (2011).
92. Oyama, F., Hirohashi, S., Shimosato, Y., Titani, K. & Sekiguchi, K. Deregulation of alternative splicing of fibronectin pre-mRNA in malignant human liver tumors. *J Biol Chem* **264**, 10331-4 (1989).
93. Park, J.H., Ryu, J.M. & Han, H.J. Involvement of caveolin-1 in fibronectin-induced mouse embryonic stem cell proliferation: role of FAK, RhoA, PI3K/Akt, and ERK 1/2 pathways. *J Cell Physiol* **226**, 267-75 (2011).
94. Lee, S.H., Lee, Y.J. & Han, H.J. Role of hypoxia-induced fibronectin-integrin beta1 expression in embryonic stem cell proliferation and migration: Involvement of PI3K/Akt and FAK. *J Cell Physiol* **226**, 484-93.
95. MacLaren, L.A. & Wildeman, A.G. Fibronectin receptors in preimplantation development: cloning, expression, and localization of the alpha 5 and beta 1 integrin subunits in bovine trophoblast. *Biol Reprod* **53**, 153-65 (1995).
96. Hemler, M.E. VLA proteins in the integrin family: structures, functions, and their role on leukocytes. *Annu Rev Immunol* **8**, 365-400 (1990).
97. Kohan, M., Muro, A.F., White, E.S. & Berkman, N. EDA-containing cellular fibronectin induces fibroblast differentiation through binding to alpha4beta7 integrin receptor and MAPK/Erk 1/2-dependent signaling. *FASEB J* **24**, 4503-12.
98. Mould, A.P. et al. Affinity chromatographic isolation of the melanoma adhesion receptor for the IIICS region of fibronectin and its identification as the integrin alpha 4 beta 1. *J Biol Chem* **265**, 4020-4 (1990).

99. Zoppi, N., Ritelli, M. & Colombi, M. Type III and V collagens modulate the expression and assembly of EDA(+) fibronectin in the extracellular matrix of defective Ehlers-Danlos syndrome fibroblasts. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 1576-87 (2012).
100. Shinde, A.V. et al. Identification of the peptide sequences within the EIIIA (EDA) segment of fibronectin that mediate integrin $\alpha 9\beta 1$ -dependent cellular activities. *J Biol Chem* **283**, 2858-70 (2008).
101. Liao, Y.F., Gotwals, P.J., Koteliansky, V.E., Sheppard, D. & Van De Water, L. The EIIIA segment of fibronectin is a ligand for integrins $\alpha 9\beta 1$ and $\alpha 4\beta 1$ providing a novel mechanism for regulating cell adhesion by alternative splicing. *J Biol Chem* **277**, 14467-74 (2002).
102. Heydarkhan-Hagvall, S. et al. The effect of vitronectin on the differentiation of embryonic stem cells in a 3D culture system. *Biomaterials* **33**, 2032-40.
103. Abraham, S., Riggs, M.J., Nelson, K., Lee, V. & Rao, R.R. Characterization of human fibroblast-derived extracellular matrix components for human pluripotent stem cell propagation. *Acta Biomater* **6**, 4622-33 (2010).
104. Luzzani, C. et al. Modulation of chromatin modifying factors' gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **410**, 816-22 (2011).
105. Tang, J., Hu, M., Lee, S. & Roblin, R. A polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. *J Microbiol Methods* **39**, 121-6 (2000).
106. Chomczynski, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156-9 (1987).