

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**Máster en Biología Molecular y Celular.**



**ANÁLISIS FUNCIONAL DE MOLÉCULAS BIOACTIVAS**  
**INDUCTORAS DE MUERTE ESPECÍFICA**  
**EN CÉLULAS TRONCALES.**



TRABAJO FIN DE MÁSTER

JUNIO-2012

Autor: Patricia Martínez Alonso  
Director: José Alberto Carrodegas

# ÍNDICE

<b>Índice</b> .....	<b>1</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>8</b>
<b>Metodología</b> .....	<b>9</b>
Técnicas de cultivo celular.....	9
Cribado de quimiotecas .....	12
Medida de viabilidad celular	
Método del XTT .....	13
Método del MTT .....	14
Método del WST-1 .....	15
Curva dosis-respuesta.....	16
Respuesta en el tiempo (Time-course).....	16
Microscopía de fluorescencia	
Toxicidad de los fluorocromos .....	18
Quimiotoxicidad y fototoxicidad de Hoechst 33342.....	19
Concentración mínima de Hoechst 33342 .....	20
Tiempo mínimo de incubación de Hoechst 33342.....	20
Toxicidad del Hoechst 33342 con nuevas condiciones .....	21
Toxicidad del compuesto 1 .....	21
Cocultivo celular.....	22
Toxicidad del compuesto 1 en cocultivo .....	22
Toxicidad del cloruro de bencetonio en cocultivo .....	23
Citometría de flujo .....	23
<b>Resultados</b> .....	<b>25</b>
<b>Discusión</b> .....	<b>58</b>
<b>Conclusiones</b> .....	<b>62</b>
<b>Anexo</b> .....	<b>63</b>
<b>Bibliografía</b> .....	<b>65</b>

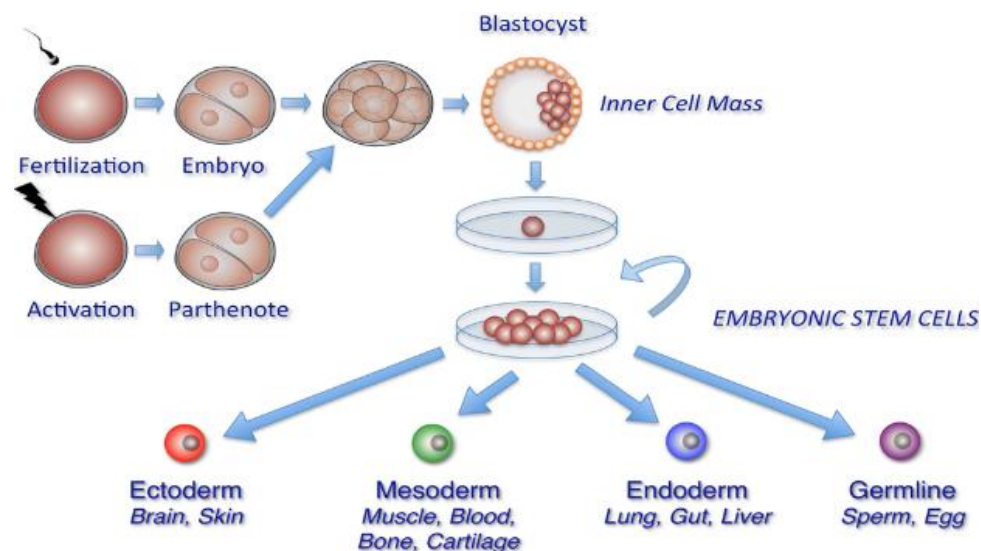
# INTRODUCCIÓN

## Las células madre

La investigación en células madre es esencial para su utilización en terapia celular y medicina regenerativa. Existen muchas patologías que pueden ser tratadas con estas células, como el cáncer, enfermedades neurodegenerativas (1), artritis (2), daño en médula espinal (3) o infarto de miocardio (4).

Las células madre son aptas para tratar este tipo de enfermedades debido a que este tipo de células tienen dos características muy importantes, que son la capacidad de autorrenovación y la pluripotencia (5).

Las células madre embrionarias, derivadas del blastocisto (en ratón) o del epiblasto (en humanos) no pueden formar un organismo completo por sí solas, pero tienen el potencial de diferenciarse en varios tipos de células especializadas, correspondiente a los tres linajes embrionarios (endodermo, ectodermo y mesodermo) (6)



**Fig. 1. Aislamiento, cultivo y diferenciación de células madre embrionarias, procedentes de la masa interna del blastocisto (7).**

Es durante la organogénesis cuando se forman los órganos, estos se forman a partir de los tres linajes embrionarios ya nombrados, endodermo, mesodermo y ectodermo. A partir del ectodermo se constituye el pelo, las uñas, la epidermis, sistema

nervioso. Del mesodermo se forman los músculos, huesos, gónadas... Y a partir del endodermo se desarrollarán principalmente el tubo digestivo y glándulas anexas.

Un importante campo de investigación para la utilización de células madre en terapia celular y medicina regenerativa se centra en la diferenciación dirigida de éstas, con el fin de poder obtener diferentes tipos de células somáticas, que podrían ser utilizadas para reemplazar tejidos, incluso obtener una cura para enfermedades para las que actualmente no existe una terapia adecuada.

Las células madre se pueden diferenciar al tipo celular deseado *in vitro*, para su posterior trasplante (8), o se pueden implantar directamente en el organismo para su posterior diferenciación *in vivo*.

Algunos de los problemas más importante que han surgido durante la diferenciación dirigida de células madre embrionarias (ESCs) son la diferenciación a tipos celulares no deseados, o incluso la proliferación descontrolada de una célula indiferenciada o diferenciada parcialmente, es decir, células en las que no se ha llevado a cabo la diferenciación completa. Este tipo de células dan lugar a la aparición de teratomas, debido a un crecimiento incontrolado (9). Los teratomas son tumores que contienen tipos celulares derivados de las tres capas embrionarias.

Por lo tanto, es de suma importancia para la utilización adecuada de células madre en terapia celular el poder dirigir de forma eficiente su diferenciación así como eliminar las células indiferenciadas, para evitar la formación de teratomas.

Por lo expuesto, es necesario caracterizar los mecanismos de muerte celular apoptótica en células madre y en células diferenciadas, para determinar si hay diferencias que puedan utilizarse para la identificación de moléculas, a partir de quimiotecas, capaces de eliminar selectivamente el tipo celular no deseado. La eliminación de células indiferenciadas podría prevenir la formación de tumores, y la eliminación de células diferenciadas podría ser útil al aislar células madre adultas a partir de tejidos.

Es por tanto importante la identificación de compuestos químicos con toxicidad selectiva hacia células madre o células diferenciadas. Esto lo podemos conseguir gracias al cribado de quimiotecas, en lo que se conoce como genética química.

## **La genética química**

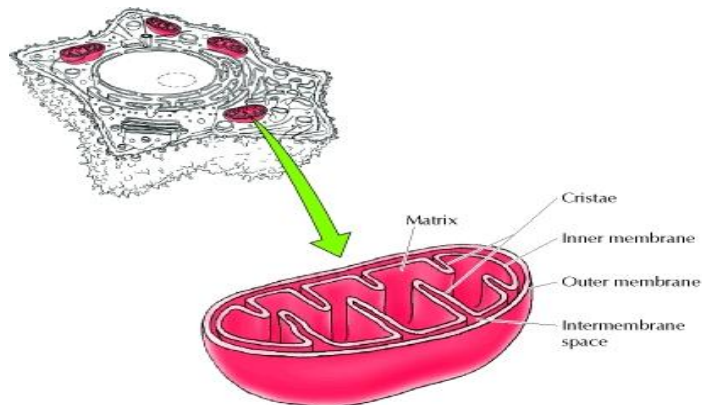
La genética química consiste en el uso de compuestos químicos que alteran la actividad de moléculas biológicas, principalmente de proteínas, permitiendo así la caracterización funcional de las dianas de estos compuestos. En este campo existen dos formas diferentes de proceder, la **genética química directa** en la cual se estudian los cambios fenotípicos deseados después de ser tratadas las células u organismos con los compuestos, y la **genética química inversa** en la cual los compuestos químicos que modifican la actividad de una proteína diana se identifican *in vitro*, y posteriormente se tratan células u organismos para estudiar sus efectos fenotípicos.

Recientemente, estudios del metabolismo mitocondrial de células diferenciadas y células madre, han puesto de manifiesto los diferentes perfiles de actividad mitocondrial en ambos tipos celulares (10). Se ha observado que las células madre poseen una actividad mitocondrial disminuida, al igual que ocurre en las células tumorales.

La actividad mitocondrial disminuida que presentan las células madre embrionarias puede ser debido a que presentan un bajo número de mitocondrias, y éstas tienen las crestas poco desarrolladas (11). Este hecho está relacionado con el entorno en el que se encuentran las células embrionarias antes de la implantación del embrión y su posterior vascularización *in vivo* un entorno hipóxico dentro del lumen uterino (12). Debido a que este ambiente no es propicio para la síntesis de ATP a través de la fosforilación oxidativa, las células embrionarias se basan en el metabolismo anaeróbico para satisfacer sus demandas de energía (13).

## **La mitocondria**

Las mitocondrias son orgánulos celulares encargados de suministrar la mayor parte de la energía necesaria para la actividad celular, entre otras funciones. Suelen ser alargadas y su número depende de la necesidad energética de la célula. Están rodeadas por una doble membrana, la membrana mitocondrial interna y la externa, separadas por un espacio intermembranas. La membrana interna forma numerosos pliegues, llamados crestas, que se extienden hacia el interior de la matriz. El contenido de esos pliegues puede aislarse parcialmente del resto del espacio intermembranas, constituyendo lo que se conoce como espacio intracrestal, el quinto compartimento mitocondrial.

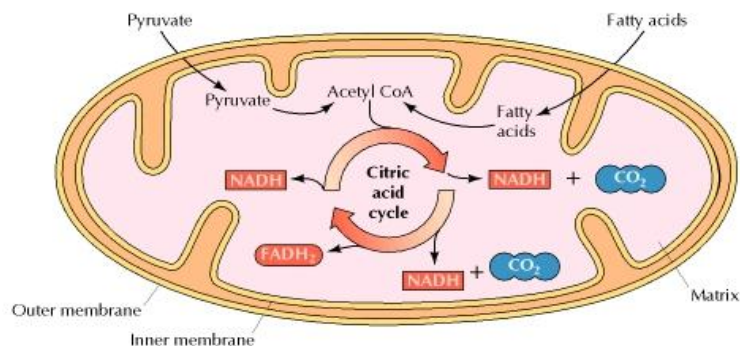


**Fig. 2. Estructura de una mitocondria. (14)**

La principal fuente de energía metabólica para las células animales se obtiene de la oxidación de la glucosa (glucólisis) y de los ácidos grasos ( $\beta$ - oxidación).

Las etapas iniciales de la glucólisis se producen en el citosol, donde la glucosa se convierte en piruvato. El piruvato se transporta al interior de la mitocondria, donde se lleva a cabo su oxidación completa, obteniendo energía en última instancia en forma de ATP.

La  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y el ciclo del ácido cítrico también se llevan a cabo en el interior de la mitocondria (14).



**Fig. 3. Metabolismo en la mitocondria. (14)**

Desde hace mucho tiempo, se sabe que las mitocondrias son muy importantes para la supervivencia de la célula, debido a su papel en el metabolismo energético. Sin embargo, no fue hasta los años 90 cuando se descubrió que las mitocondrias participan activamente en un tipo de muerte celular programada conocida como apoptosis (término griego que significa caída de la hoja) (15).

Al seleccionar compuesto químicos con toxicidad selectiva hacia tipos celulares

concretos, con la finalidad de usarlos como agentes terapéuticos, nos interesan aquellos que inducen muerte celular por apoptosis. En la apoptosis las células muertas son fagocitadas por macrófagos y otras células, eliminándose de forma silenciosa sin dañar a células vecinas. En el otro tipo principal de muerte celular, la necrosis, las células liberan su contenido celular produciendo inflamación en el tejido adyacente.

## **Apoptosis**

La apoptosis es un proceso perfectamente regulado por el cual la célula muere ante estímulos procedentes tanto del exterior como del interior celular. Es fundamental en el desarrollo de los órganos y en el mantenimiento de la homeostasis tisular (16).

Existen dos vías de apoptosis dependiendo del tipo de estímulo que reciba la célula: la vía intrínseca y la vía extrínseca.

La mitocondria es el principal orgánulo implicado en la ejecución de muerte celular por la vía intrínseca.

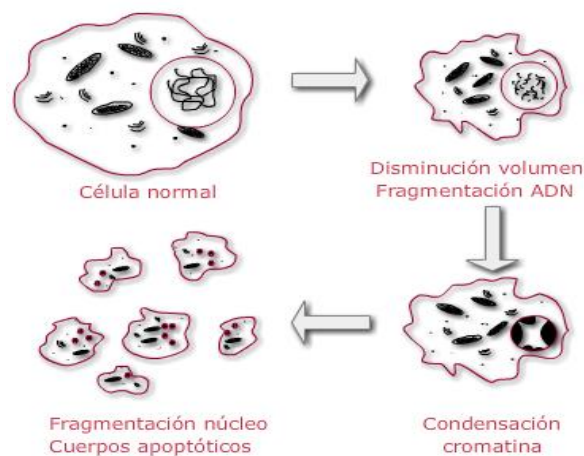
La **vía intrínseca** comienza con la liberación de citocromo c (y de otras proteínas) al citosol debido al aumento de permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. En el citosol el citocromo c se une con Apaf-1, procaspasa 9 y ATP, formando un complejo llamado apoptosoma. En este complejo se activa la caspasa 9, que a su vez activa una cascada proteolítica que culmina con la hidrólisis de proteínas y la activación de endonucleasas, provocando finalmente la muerte de la célula (17).

La familia de proteínas Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) regulan la apoptosis mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial externa. Las proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 y Bcl-XL se pueden localizar en la membrana externa mitocondrial impidiendo la liberación del citocromo c, aunque también se pueden localizar en otras membranas celulares. Por otra parte las proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 como Bax y Bak pueden formar poros en la membrana mitocondrial externa a través de los cuales se libera citocromo c. Bak reside normalmente en la mitocondria, mientras Bax suele estar en el citosol y se transloca a la mitocondria al recibir señales pro-apoptóticas. Otras proteínas de la misma familia como Bid, pueden activar a las pro-apoptóticas como Bax y Bak e inhibir a las anti-apoptóticas (18).

La **vía extrínseca** está mediada por receptores de muerte. Los receptores de muerte son proteínas que se encuentran ancladas en la membrana plasmática y actúan

como transductores de señales, enviando señales del exterior al interior celular. Cuando los receptores de muerte como el TNF o Fas, entre otros, son activados por sus ligandos, se activa la procaspasa 8. La caspasa 8 puede activar a su vez a las caspasas 3 y 7, que son activadas también por la caspasa 9, confluyendo aquí la ruta extrínseca con la intrínseca. En células de tipo II, la caspasa 8 puede además cortar a Bid, generando un fragmento, tBid (Bid truncado), que se transloca a la mitocondria para activar la vía mitocondrial. La vía intrínseca y la extrínseca están por tanto conectadas por Bid.

La apoptosis es un proceso ordenado, con una serie de fases: disminución del volumen celular, degradación de proteínas, fragmentación del DNA, condensación de la cromatina, aparición de burbujas en la membrana plasmática, y fragmentación de la células en cuerpos apoptóticos, siempre rodeados de membrana plasmática, que son fagocitados por macrófagos u otras células. En ningún caso se vierte el contenido celular al exterior y por tanto no hay inflamación del tejido adyacente.



**Fig. 4. Proceso de apoptosis. (<http://www.medmol.es/glosario/60/>)**

## **Necrosis**

La necrosis es junto con la apoptosis uno de los tipos principales de muerte celular. Ambas se diferencian principalmente por los mecanismos moleculares implicados, que afectan a la morfología de la célula durante el proceso. La necrosis suele ser ocasionada por daño celular intenso, bien de tipo físico o químico (19).

Durante la necrosis, el núcleo celular permanece intacto (mientras que en apoptosis se condensa y se fragmenta), se produce una pérdida de la integridad de la membrana



plasmática, hinchazón de la célula y posterior rotura de ésta, permitiendo así la liberación de contenido citosólico al exterior celular (en apoptosis la membrana permanece intacta), provocando una respuesta inflamatoria.

## **Microscopía**

Durante décadas se han utilizado los modelos celulares basados en cultivo celular *in vitro* para plantear diversas líneas de investigación. Las técnicas basadas en la adquisición de imágenes de microscopía y su posterior análisis han sido esenciales para llevar a cabo multitud de estudios.

Los estudios de tejidos y células por microscopía normalmente se han realizado en material fijado, es decir, tratando las muestras con compuestos químicos que producen enlaces covalentes entre componentes celulares, manteniendo así su estructura para un posterior análisis. Este tipo de preparaciones implica el análisis de una muestra estática, ésta únicamente representa un momento preciso dentro de un proceso continuo, en el cual se producen cambios a lo largo del tiempo. En nuestro caso hemos utilizado un microscopio de fluorescencia equipado con un sistema para célula viva, es decir, acoplado a una cabina de cultivo celular, que nos permite observar las células en cultivo a lo largo del tiempo, permitiéndonos obtener videos para estudiar procesos celulares en el tiempo. El microscopio está completamente automatizado y es programable, permitiendo cambiar de objetivo, de filtro de fluorescencia, de enfoque, de posición de la platina, etc. en modo automático a lo largo de días o incluso semanas.

Las ventajas de este tipo de análisis frente al basado en una simple fotografía instantánea son evidentes. Con esta nueva técnica de microscopía podemos observar fácilmente procesos que ocurren en células vivas y que no serían evidentes en células fijadas.

## **OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo era caracterizar funcionalmente algunas moléculas bioactivas que habían sido seleccionadas a partir de cribados funcionales de quimiotecas por su actividad diferencial en cuanto a la inducción de muerte celular en células madre y en células diferenciadas.

Para ello se estudió el efecto de los compuestos seleccionados utilizando ensayos de viabilidad celular, técnicas de microscopía de fluorescencia en célula viva y citometría.

Se utilizaron varios ensayos de viabilidad basados en la reducción metabólica de distintas sales de tetrazolio, aprovechando sus distintas propiedades: XTT, MTT y WST-1.

Se pusieron a punto diferentes técnicas:

- Microscopia de fluorescencia en célula viva.
- Ensayos de toxicidad de fluorocromos en los distintos tipos celulares estudiados.
- Técnicas de cocultivo celular.
- Estudio de viabilidad celular utilizando el Contador Celular MUSE.

## **METODOLOGÍA**

### **TÉCNICAS DE CULTIVO CELULAR.**

#### ○ **LÍNEAS CELULARES.**

Para este proyecto máster se utilizaron tres líneas celulares: mESC CGR8, MEFs y C57.

- **mESC CGR8:** Células madre embrionarias de ratón. Son células pluripotentes provenientes de la masa celular interna del blastocisto, adaptadas a crecer en ausencia de células "feeder" (fibroblastos "alimentadores"), y en presencia de LIF (leukemia inhibitory factor) para mantenerlas indiferenciadas.
- **MEFs:** Fibroblastos embrionarios de ratón. Los fibroblastos se encuentran en el tejido conectivo y segregan proteínas de colágeno que se utilizan para mantener el marco estructural de muchos tejidos. También juegan un papel importante en la cicatrización de heridas.
- **C57:** Son células transmitocondriales generadas mediante la transferencia de mitocondrias procedentes de plaquetas del ratón C57 a una línea celular carente de DNA mitocondrial, derivada de fibroblastos L929. Esta línea ha sido además modificada genéticamente para expresar la proteína fluorescente verde (GFP) de

forma constitutiva, lo que nos permite distinguir estas células fácilmente en experimentos de cocultivo. Agradecemos al Dr. Iñaki Ochoa (CIBER-BBN) la cesión de esta línea celular.

#### ○ **TRIPSINIZACIÓN, CONGELACIÓN y DESCONGELACIÓN**

La **tripsinización** es una técnica que permite separar las células de su soporte; se utiliza tripsina una enzima que rompe las proteínas que usan las células para unirse a la superficie de cultivo y también entre ellas. La tripsinización de las células se realizó tras un lavado con 4 ml de tampón fosfato salino (PBS 1X), para esto, se añadió 1 ml de Tripsina-EDTA (0,05/0,02 % en PBS; PAN Biotech GmbH; el EDTA es un agente quelante que inhibe metaloproteasas) al frasco de cultivo, incubando durante 2-3 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>; tras este tiempo los frascos se golpearon manualmente para desprender las células y se comprobó mediante microscopía que todas las células estaban despegadas. Posteriormente se recogieron las células con una pipeta e inmediatamente después se le adicionó 2 ml de medio de cultivo con suero para inactivar la tripsina, se pipeteó suavemente hasta homogenizar la suspensión celular, y se procedió a sembrar las células en el frasco o placa deseados a la concentración adecuada para cada experimento.

La **congelación** de las células se llevó a cabo cuando se observó una confluencia del 80-100 %. Para esto, se tripsinizó el cultivo celular, y se añadió 10 % de DMSO al medio de cultivo en el caso de las MEFs y C57, y al suero fetal bovino en el caso de las mESC CGR8. La concentración a la que se congelaron fue de  $1 \times 10^6$  células/ml. Por último se introdujeron los crioviales (Nalgene) en un recipiente específico para este uso el cuál es relleno con isopropanol y almacenado durante toda una noche a -80°C, tras este período se procedió al almacenaje en contenedores de nitrógeno líquido.

La **descongelación** de las células se llevó a cabo mediante inmersión de los tubos en un baño termostatizado a 37°C durante unos minutos, se añadió 5ml de medio DMEM para MEFs y C57 y GMEM para CGR8, y se centrifugó a 300g durante 5 minutos para eliminar el DMSO, luego se reemplazó el medio por medio nuevo. Finalmente se procedió a sembrar las células en el frasco de cultivo deseado, y se incubaron en el incubador a 37°C y en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Trascorridas 24 horas se comprobó que las células se habían pegado a la superficie de cultivo y se cambió de medio de cultivo cada vez que fuese necesario para conservar las células en monocapa.

## ○ CULTIVO CELULAR.

Las células **mESC CGR8**, tras tripsinizarlas, se lavaron con medio de lavado: “Glasgow Minimum Essential Medium,, (GMEM, Invitrogen) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS, PAN Biotech GMBH), 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Invitrogen).

El medio de lavado y la tripsina se retiraron por centrifugación (300 g, 5 min.). Luego, se resuspendieron las células en medio de propagación: GMEM, suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 units/ml de factor inhibidor de leucemia (LIF, Chemicon), 50 µM β-mercaptoetanol (Invitrogen), 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomina en frascos recubiertos de gelatina al 0.2 % en PBS (Sigma). Se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los pases de células se realizaron al alcanzar una confluencia del 70% aproximadamente, mediante una dilución 1:3 – 1:4, para que los pases coincidieran con días alternos.

Las **MEFs**, se cultivaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> en “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10% de FBS, 100 units/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomina y 2 mM de glutamina (Invitrogen). Los pases de células se realizaron cuando alcanzaban una confluencia de aproximadamente el 90%, mediante una dilución 1:10.

A las células **C57**, tras tripsinizarlas, se les añadió medio de cultivo “Dulbecco's Modified Eagle Medium” (DMEM, Invitrogen) suplementado con 10% de FBS, 100 units/ml de penicilina y 100 µg/ml estreptomina y 2 mM de glutamina (Invitrogen). Mediante centrifugación (300 g, 5 min), se eliminó este medio y la tripsina. Posteriormente se resuspendieron las células en su medio de cultivo, se colocaron en los frascos adecuados y se dejaron incubando a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Los pases de células se realizaron cuando alcanzaban una confluencia de aproximadamente el 90%, mediante una dilución 1:10.

## **CRIBADO DE QUIMIOTECAS**

Este proyecto parte del cribado primario de una quimioteca formada por 1.120 compuestos, que había sido realizado anteriormente por la Dra. Celia Conesa. Este cribado se llevó a cabo con el objetivo de identificar compuestos que fueran tóxicos para las células madre embrionarias de ratón (CGR8), y que por el contrario no fuesen tóxicos para células diferenciadas, o viceversa. Como modelo de células diferenciadas se utilizaron MEFs.

Previamente a este trabajo se había realizado ya un cribado primario. Para agilizar el trabajo e intentar prevenir la contaminación de las placas de las quimiotecas, se prepararon una serie de placas intermedias, donde se colocaron tres o cuatro compuestos por pocillo. Las placas de la quimioteca venían a una concentración de 5 mM (disueltos los compuestos en DMSO), las placas intermedias que partieron de éstas las realizaron a una concentración 500  $\mu$ M (diluidos en PBS).

Para realizar el cribado primario se utilizaron las células mESC CGR8, sembrándolas en placas de 96 pocillos, a una concentración de  $10^4$  células/ml en medio de propagación GMEM, con un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo y se dejaron durante 24 horas en incubación a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Trascurridas las 24 horas, se añadieron 2  $\mu$ l por pocillo de los compuestos de las placas intermedias, para tener una concentración final de 10  $\mu$ M de cada compuesto. Como control positivo se añadió DMSO en la misma proporción que se añadieron los compuestos, ya que como se ha comentado anteriormente los compuestos de las placas originales de la quimioteca estaban disueltos en DMSO. Como control de muerte utilizaron camptotecina, un compuesto que induce apoptosis al inactivar la enzima DNA topoisomerasa I, añadiéndolo a la misma concentración que los compuestos.

Las células se incubaron con los compuestos durante 48 horas, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Para estudiar la viabilidad celular se utilizó un ensayo colorimétrico basado en el XTT (2,3-bis[2-Methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (Roche).

A partir de este cribado inicial se seleccionaron conjuntos de tres o cuatro compuestos que aumentaban la viabilidad de mESC CGR8, y también conjuntos de tres o cuatro compuestos que disminuían la viabilidad de estas.

Se procedió a preparar placas intermedias en las que se colocaron únicamente un compuesto por cada pocillo a una concentración de 500  $\mu$ M, este mismo procedimiento se

realizó con los compuestos que disminuían la viabilidad.

Esto se llevó a cabo para identificar mediante un cribado secundario cual de los compuestos del grupo era el responsable del aumento o disminución de la viabilidad.

El trabajo que se presenta en este Máster se basa en la utilización de algunos compuestos seleccionados como se ha indicado, centrándonos en el análisis más detallado de algunos compuestos que aumentaban la viabilidad de las mESC CGR8.

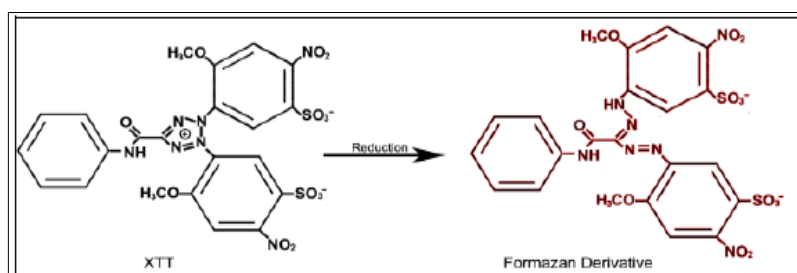
El **cribado secundario** se realizó de la misma forma que el cribado primario, pero colocando un compuesto por pocillo y utilizando además MEFs sembrados a una concentración de 2500 células por pocillo, menor que las mESC CGR8, debido al rápido crecimiento de los fibroblastos. Este tipo celular se utilizó para seleccionar compuestos con efectos diferenciales en células madre y células somáticas.

Se utilizó una concentración final de compuesto de 10  $\mu$ M, se incubó durante 48 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se procedió a realizar el ensayo colorimétrico de XTT.

Una vez realizado el cribado secundario se seleccionaron los compuestos que aumentaban la viabilidad de mESC CGR8 y disminuían la viabilidad de las células MEFs.

## MEDIDAS DE VIABILIDAD CELULAR

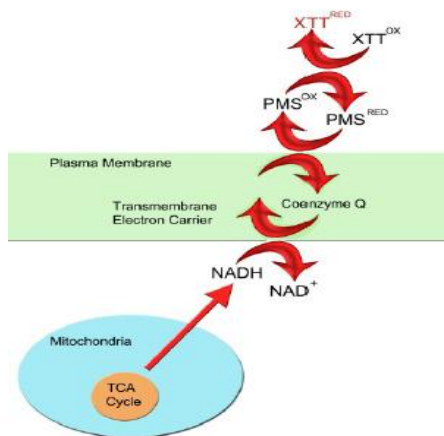
### ○ Ensayo de XTT.



**Fig. 5. Reducción metabólica del XTT a una sal de formazan.  
(ATCC XTT Cell Proliferation Assay Kit)**

Es un ensayo colorimétrico, no radiactivo que mide la actividad metabólica de las células viables, basado en la reducción metabólica de la sal de tetrazolium de color amarillo, XTT (2,3-bis [2-Methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide), a una sal de formazan naranja.

La sal de tetrazolium es soluble en solución acuosa y tiene carga neta negativa, por lo que se cree que no entra dentro de la célula para ser reducida; por ello se utiliza en conjunto con IEAs (intermediarios aceptores de electrones). Nosotros utilizamos el kit comercial “Cell Proliferation Kit II (XTT)”, de Roche Applied Science, donde se emplea como aceptor de electrones el PMS (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate).



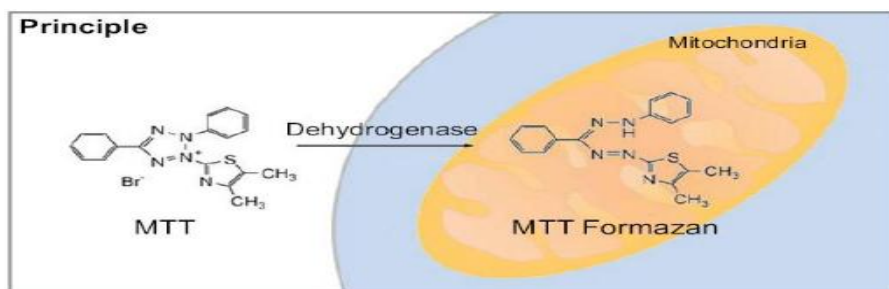
**Fig. 6. Reducción colorimétrica del XTT realizada por enzimas. (ATCC XTT Cell Proliferation Assay Kit).**

Para realizar este ensayo, se crecieron las células en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano con un volumen final de 100 µl por pocillo. Tras la incubación de las células con los compuestos correspondientes, se añadió a cada pocillo 50 µl de mezcla (preparada previamente) de XTT y PMS en una proporción 50:1. Se incubó 4h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Tras este tiempo se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de placas (Sinergy HT, Biotek) con una longitud de onda de referencia de 650 nm.

○ **Ensayo de MTT.**

Es un ensayo colorimétrico, de viabilidad celular similar al XTT.

Este ensayo se basa en la reducción de la sal de tetrazolium de color amarillo, MTT (Bromuro de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio), a una sal de formazán de color púrpura.



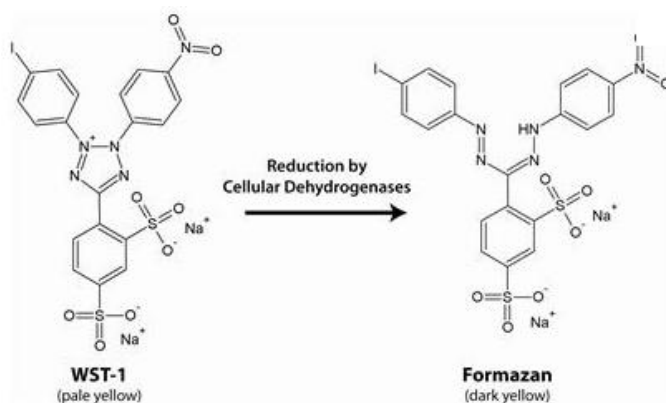
**Fig. 7. Reducción del MTT a una sal de formazan. (MTT Stable Sol. NBS Biologicals.)**

Al contrario que el XTT, el MTT entra en la célula y se reduce en su interior, dando lugar a un formazán insoluble que es necesario resuspender en DMSO o formamida para su cuantificación espectrofotométrica. A diferencia del XTT, no depende de procesos de transporte electrónico en la membrana plasmática.

Para realizar este ensayo se utilizó el kit comercial, "Cell Proliferation Kit I (MTT)", de Roche Applied Science, creciendo las células en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano en un volumen final de 100 µl por pocillo. Tras la incubación de las células con los compuestos correspondientes, se añadió a cada pocillo 10 µl de MTT. Se incubó 4h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras este tiempo se añadió 100 µl de la Solución de Solubilización. Se incubó durante toda la noche a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> y se midió la absorbancia a 570 nm en un espectrofotómetro de placas (Sinergy HT, Biotek).

#### o Ensayo de WST-1.

Es un ensayo colorimétrico, de viabilidad celular similar al XTT y al MTT, aunque en este caso el WST-1 se reduce únicamente fuera de la célula. Está basado en la reducción de la sal estable de tetrazolium, WST-1, (4-[3-(4-Iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-3H-5-tetrazolio]-1,3-disulfonato de benceno) para formar una sal soluble de formazán.



**Fig. 8. Reducción del WST-1 en una sal de formazan.  
(WST-1 Cell Proliferation Assay. GBiosciences)**

Lleva un reactivo de acoplamiento de electrones. Esta biorreducción depende de la producción glicolítica de NAD(P)H en células viables. Por lo tanto, la cantidad de formazán formado está directamente relacionado con el número de células metabólicamente activas en cultivo.



Para realizar este ensayo se utilizó el kit comercial, “Cell Proliferation Reagent WST-1” de Roche Applied Science y se crecieron las células en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo plano en un volumen final de 100 µl por pocillo. Tras el tiempo de incubación de las células con los compuestos correspondientes, se añadió a cada pocillo 10 µl de WST-1. Se incubó 4h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Tras este tiempo se midió la absorbancia a 440 nm en un espectrofotómetro de placas (Sinergy HT, Biotek).

## **CURVAS DOSIS-RESPUESTA**

Para obtener la concentración efectiva de los compuestos químicos seleccionados anteriormente, se realizaron ensayos dosis-respuesta con los compuestos en estudio, tanto en mESC CGR8 como en MEFs.

Se cultivaron los dos tipos celulares en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas, tras este tiempo se añadieron los compuestos por triplicado a diferentes concentraciones: 5, 10 y 20 µM, utilizando como blanco el medio de cultivo de cada tipo celular.

A las 48 horas se procedió a la lectura de la viabilidad celular, mediante el ensayo de XTT utilizando el espectrofotómetro.

## **RESPUESTA EN EL TIEMPO (TIME-COURSE)**

Una vez conocida la concentración efectiva de los compuestos químicos seleccionados, se realizaron los ensayos de respuesta a lo largo del tiempo (time-course). La finalidad de este ensayo es conocer el tiempo óptimo de incubación de los compuestos con las células, o sea, el tiempo al cual las diferencias observadas entre los dos tipos celulares era mayor.

Se cultivaron los dos tipos celulares en placas de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Tras este tiempo se añadieron los compuestos por triplicado a una concentración de 5 y 10 µM, utilizando como blanco el medio de cultivo de cada tipo celular.

Estos ensayos se realizaron a diferentes tiempos de incubación: 6, 24 y 48 horas.

Transcurridos los diferentes tiempos de incubación con el compuesto, se procedió a la lectura de la viabilidad celular, mediante el ensayo de XTT utilizando el espectrofotómetro.

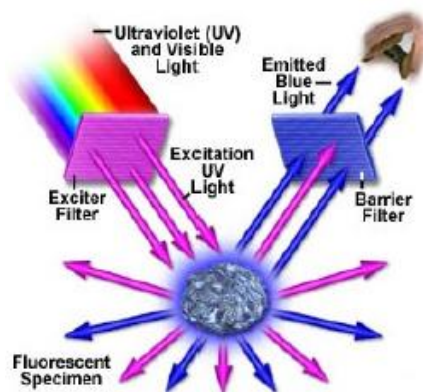
# MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

## MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA EN CÉLULA VIVA

Se realizaron ensayos de microscopía de fluorescencia en célula viva. El microscopio que se utilizó fue un Leica DMI 6000B con luz estructurada (Optigrd) y software de análisis MMAF (Metamorph).

Se utilizaron diferentes fluorocromos para visualizar las partes de las células que nos interesaban.

Los fluorocromos son moléculas químicas que absorben luz a una determinada longitud de onda (emitida en nuestro caso por una lámpara de metal haluro y seleccionada a través de un filtro) y emiten a otra longitud de onda mayor (menor energía), que también se selecciona con un filtro adecuado.



**Fig. 9. Esquema básico de la iluminación en microscopía de fluorescencia.**

Cada fluorocromo tiene espectros de excitación y emisión característicos. Los fluorocromos se eligen atendiendo a una serie de criterios como la longitud de onda (excitación y emisión), la sensibilidad al fotoblanqueado, y la capacidad de atravesar las membranas celulares.

En el caso de los fluorocromos para la tinción nuclear, es importante la especificidad de los fluorocromos, ya que muchos de ellos se unen al DNA y también al RNA. Por esta razón, se deben usar fluorocromos específicos para el DNA, o si no, se requiere un pretratamiento con RNAsa, que no es factible en experimentos de célula viva.

En nuestro caso elegimos llevar a cabo la tinción con los fluorocromos Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos, ambos de Molecular Probes, Invitrogen.

**Hoechst 33342** es un fluorocromo que atraviesa la membrana plasmática y tiene especificidad por los pares de bases A-T, específico de DNA, uniéndose a éste y tiñendo los núcleos de las células en color azul. Tiene un máximo de excitación y emisión a 350 nm y 460 nm, respectivamente.

**Mitotracker Red CMXRos** es un fluorocromo que entra específicamente en las mitocondrias, tiñéndolas de color rojo. Su máximo de excitación se encuentra a 579 nm y el de emisión a 599 nm.

Por lo tanto para la fluorescencia que emiten estos fluorocromos es necesario el filtro azul para Hoechst 33342 y filtro rojo para Mitotracker Red CMXRos.

El microscopio de fluorescencia que se utilizó está equipado con un sistema para célula viva, esto es, acoplado a una cabina de cultivo celular que mantiene una temperatura de 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>, lo que nos permite observar las células en cultivo a lo largo del tiempo, permitiéndonos obtener videos para estudiar diversos procesos celulares no solamente en las tres dimensiones espaciales sino también en el tiempo.

### **Preparación de las células para microscopía**

Las células se crecieron en placas de 24 pocillos, con un volumen final de 500 µl. Las células mECS CGR8 se sembraron a una densidad de 3x10<sup>5</sup> células/ml y las MEFs a 5x10<sup>4</sup> células/ml. Se incubaron durante 24h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente los dos tipos celulares, MEFs y mESC CGR8, se tiñeron con los fluorocromos Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos.

Antes de llevar a cabo los ensayos de microscopía de fluorescencia en célula viva se realizaron diferentes ensayos de toxicidad de los fluorocromos Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos, ya que estos eran los fluorocromos que queríamos utilizar. El motivo de estos ensayos fue la existencia de bibliografía describiendo la toxicidad del fluorocromo Hoechst 33342 en algunos tipos celulares (20). Por tanto comprobamos si los fluorocromos utilizados son tóxicos para las células MEFs y mESC CGR8.

### ***Ensayo de toxicidad de los fluorocromos***

La finalidad de este ensayo es comprobar la toxicidad de los dos fluorocromos tanto por separado como juntos, en células mESC CGR8 y MEFs.

La tinción de cada tipo celular se llevó a cabo en su correspondiente medio sin suero, GMEM y DMEM, para mESC CGR8 y MEFs, respectivamente.

Se incubaron unas células con Hoechst 33342, otras con Mitotracker Red CMXRos y por último unas con los dos fluorocromos, estas tinciones se realizaron en ambos tipos celulares. Las concentraciones de fluorocromos utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante 1 µg/ml para Hoechst 33342 y 25 nM para Mitotracker Red CMXRos

Las células se incubaron con los fluorocromos por separado y juntos, a la concentración indicada y en medio sin suero, durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Trascurridos los 30 minutos de incubación se procedió a sustituir el medio, por su correspondiente medio sin suero, para eliminar el resto de fluorocromos que no fueron incorporados por la célula, y se procedió a una segunda incubación de 30 minutos, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esta última incubación, se eliminó el medio, se lavó con 400 µl de PBS 1X y se añadieron 500 µl de medio DMEM completo a las células MEFs y 500 µl de medio GMEM de propagación a las células CGR8. Como control se pusieron células mESC CGR8 y MEFs sin teñir, a las que se le realizó el mismo número de lavados.

Posteriormente, se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia en campo claro, con filtro azul para visualizar Hoechst 33342 y filtro rojo para visualizar Mitotracker Red CMXRos. Las fotos se tomaron cada 45 minutos, durante 24 horas. Con la ayuda del software de procesamiento de imágenes del microscopio se realizaron videos con las imágenes tomadas a cada tiempo.

### ***Ensayos de quimiotoxicidad y fototoxicidad de Hoechst 33342***

El objetivo de este ensayo es estudiar la quimiotoxicidad del Hoechst 33342, es decir, determinar si es tóxico para las CGR8 por sí mismo, y estudiar también la fototoxicidad de dicho fluorocromo. Estos ensayos también se realizaron en células MEFs.

Para realizar el ensayo de quimiotoxicidad las células se incubaron con Hoechst 33342 a la misma concentración (1µg/ml) y en su correspondiente medio sin suero, durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Trascurridos los 30 minutos de incubación se procedió a sustituir el medio por su correspondiente medio sin suero, para eliminar el exceso de fluorocromo que no fue incorporado por la célula, y se procedió a una segunda incubación de 30 minutos, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esta última incubación, se eliminó el medio, se lavó con 400 µl de PBS 1X y se añadieron 500 µl de medio GMEM de propagación a CGR8 y DMEM a células MEFs.

Durante el ensayo de quimiotoxicidad se tomaron imágenes en el microscopio de fluorescencia únicamente en campo claro, ya que queríamos estudiar si la muerte era causada por el fluorocromo en ausencia de la alta intensidad luminosa de la lámpara de fluorescencia.

Para el ensayo de fototoxicidad no se realizó la tinción de las células ya que queríamos comprobar si era la luz de excitación o emisión la responsable de la muerte de las CGR8.

Posteriormente, para el ensayo de fototoxicidad se tomaron imágenes en campo claro (Nomarsky) y utilizando el filtro azul.

Las fotos se tomaron cada 45 minutos, durante 24 horas y se ensamblaron en videos.

### ***Determinación de la concentración mínima de Hoechst 33342 necesaria para teñir las células***

Se llevó a cabo la determinación de la mínima concentración de Hoechst 33342 necesaria para que se tiña el núcleo de las células mESC CGR8, con una buena calidad de imagen.

Se tiñeron las células a la concentración utilizada habitualmente y a concentraciones inferiores a esta: 1µg/ml, 750, 500, 250, 100, 50, 20 y 10 ng/ml, en medio sin suero GMEM, durante 30 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

La tinción con Hoechst 33342 se realizó como se ha descrito en ensayos anteriores.

Las imágenes se adquirieron y ensamblaron como se ha indicado anteriormente.

### ***Ensayo del tiempo mínimo de incubación de Hoechst 33342 necesario para teñir las células***

Una vez seleccionada la concentración mínima a la cual se tiñen los núcleos, se realizaron ensayos para conocer a qué tiempo de incubación con Hoechst 33342 se pueden comenzar a observar los núcleos nítidamente.

La tinción en este caso se realizó en el propio microscopio de fluorescencia, dentro de la

cabina de cultivo celular acoplada al microscopio.

Las concentraciones de Hoechst 33342 utilizadas fueron 1 µg/ml y 250 ng/ml.

Se eliminó el medio de las células y este se reemplazó por el medio sin suero al que se le incorporó el fluorocromo a dichas concentraciones.

Se tomaron imágenes con el microscopio de fluorescencia en campo claro y con filtro azul. Estas imágenes se realizaron a diferentes tiempos: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 y 25 minutos.

### ***Ensayos de quimiotoxicidad y fototoxicidad de fluorocromos en CGR8 y MEFs utilizando las nuevas condiciones***

El ensayo se realizó para estudiar si la concentración de Hoechst 33342 utilizada habitualmente y la mínima concentración necesaria para que se puedan visualizar los núcleos, producen fototoxicidad en las células mESC CGR8, cuando la incubación con el fluorocromo se ha llevado a cabo durante el menor tiempo posible.

Se desarrollaron dos tipos distintos de tinción, cada uno de ellos se realizó a diferentes concentraciones del fluorocromo y diferentes tiempos de incubación.

Las células que se tiñeron con una concentración de 1 µg/ml en su correspondiente medio sin suero, se incubaron durante 10 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, y las que se tiñeron con una concentración de 250 ng/ml, se incubaron durante 25 minutos en las mismas condiciones.

Trascurrido el tiempo de incubación descrito para cada una de las concentraciones se procedió a sustituir el medio por su correspondiente medio sin suero, y se procedió a una segunda incubación de 30 minutos, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esta última incubación, se eliminó el medio, se lavó con 400 µl de PBS 1X y se añadieron 500 µl de medio DMEM completo a las células MEFs y 500 µl de medio GMEM de propagación a las células CGR8.

La adquisición y el procesamiento de las imágenes se realizaron de la forma habitual.

### ***Ensayo de toxicidad del compuesto 1***

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas para llevar a cabo la tinción de las células mESC CGR8 con Hoechst 33342 minimizando el efecto fototóxico, se estudiaron los efectos producidos por el compuesto 1 en CGR8 y MEFs, *in vivo*.

Las células se incubaron con los fluorocromos Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos a una concentración de 250 ng/ml y 25 nM, respectivamente, en su correspondiente medio sin suero, durante 25 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Trascurridos 25 minutos de incubación se sustituyó el medio por su medio sin suero, y se llevó a cabo una segunda incubación de 30 minutos, a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Tras esta última incubación, se eliminó el medio, se lavó con 400 µl de PBS 1X y se añadieron 500 µl de medio DMEM completo a las células MEFs y 500 µl de medio GMEM de propagación a las células CGR8.

Se adquirieron imágenes en el microscopio de la forma habitual.

### ***Cocultivo celular***

Las células mESC CGR8 y C57 se crecieron en cocultivo en placas de 24 pocillos, con un volumen final de 500 µl. La razón por la que se utilizaron células C57 es que éstas emiten fluorescencia verde por sí mismas, es decir, sin necesidad de teñirlas con ningún fluorocromo, lo que nos permite distinguir las de las mESC CGR8, además de por su morfología. Se sembraron a distintas densidades, con distintos medios, en presencia y ausencia de gelatina, para averiguar las condiciones óptimas de cocultivo de las dos líneas celulares. Las concentraciones que se utilizaron fueron:

- 1) 2,5x10<sup>5</sup> células/ml de mESC CGR8 + 5x10<sup>4</sup> células/ml de C57.
- 2) 1,5x10<sup>5</sup> células/ml de ambas.
- 3) 2,5x10<sup>5</sup> células/ml de C57 + 5x10<sup>4</sup> células/ml de mESC CGR8.

Se utilizaron los medios DMEM, GMEM de propagación y GMEM de lavado. Se incubaron durante 24h a 37°C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo se tomaron fotos en el microscopio de fluorescencia cada 45 minutos durante 24 horas, en campo claro y con filtro verde para visualizar la GFP.

### ***Ensayo de toxicidad del compuesto 1 en células CGR8 y C57***

Una vez puestas a punto las condiciones óptimas de cocultivo con células mESC CGR8 y C57, se estudió la toxicidad del compuesto 1 en ambos tipos celulares cuando crecen en cocultivo.

Se crecieron las células en placas de 24 pocillos previamente recubiertos con gelatina al 0,2% en PBS. Se utilizó una concentración de 2,5x10<sup>5</sup> células/ml para las células mESC CGR8 y 5x10<sup>4</sup> células/ml para las células C57, el medio de cultivo elegido

fue GMEM de propagación. Se dejaron incubar a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, durante aproximadamente 24 horas.

Pasadas las 24 horas de incubación, las células en cocultivo fueron tratadas con el compuesto a una concentración de 10µM y como control se trataron células con DMSO a la misma concentración que se encuentra el compuesto, ya que éste está disuelto en DMSO.

Se adquirieron imágenes de microscopía según el procedimiento habitual.

### ***Ensayo de toxicidad del cloruro de bencetonio en células mESC CGR8 y C57***

Estudios anteriores aportados por la Dra. Celia Conesa, demostraron que el cloruro de bencetonio provocaba la muerte a mESC CGR8 y no a MEFs, a ciertas dosis. Este compuesto se seleccionó a partir de la misma quimioteca utilizada en este proyecto, por disminuir la viabilidad celular de mESC CGR8, utilizando el ensayo XTT de Roche. Mediante diversos ensayos se comprobó que el tipo de muerte provocado a las mESC CGR8 era apoptosis.

En este proyecto se realizaron ensayos para ver la toxicidad de dicho compuesto en las células mESC CGR8, en cocultivo con las células C57.

Se sembraron en placas de 24 pocillos recubiertos con gelatina al 0,2% en PBS, a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células/ml las mESC CGR8 y  $5 \times 10^4$  células/ml las C57 en medio GMEM de propagación. Se dejaron en incubación durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo las células en cocultivo fueron tratadas con el compuesto, a la concentración de 15 µM, (a partir de un stock que se encontraba a 500 µM diluido en agua destilada).

Se adquirieron las imágenes de microscopía según el procedimiento habitual.

## **CITOMETRÍA DE FLUJO**

La citometría de flujo permite realizar un análisis rápido, de forma individual y cuantitativa de una población celular (21).

Es una técnica que implica medir las características de dispersión de luz y fluorescencia que poseen las células conforme pasan de forma individual a través de un haz de luz.

Con este ensayo estudiamos la viabilidad celular de mESC CGR8 y MEFs al ser



tratadas con el compuesto 1 y con cloruro de bencetonio.

### ***Preparación de las células***

Las células mESC CGR8 y MEFs, se crecieron en placas de 24 pocillos, con un volumen final de 500  $\mu$ l. Se sembraron a una densidad de  $3 \times 10^5$  células/ml y  $5 \times 10^4$  células/ml, las mESC CGR8 y MEFs, respectivamente. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, las células fueron tratadas por separado, con el compuesto 1 y con cloruro de bencetonio. Se probó el compuesto 1 a una concentración de 10  $\mu$ M, y el cloruro de bencetonio a 15  $\mu$ M. Se pusieron controles para los dos compuestos, un control con DMSO y otro con agua destilada, ya que el compuesto 1 está disuelto en DMSO, y el cloruro de bencetonio en agua destilada. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

Pasadas las 24 horas de incubación con los compuestos, se prepararon las células para poder llevar a cabo el análisis con el Analizador Celular MUSE (Millipore).

### ***Ensayo de viabilidad***

Se retiró el medio de cultivo en el que se encontraban las células, y se guardó porque contenía las células muertas, que se despegan del soporte. Posteriormente se tripsinizaron las adheridas con 200  $\mu$ l de tripsina, y se incubó durante 2-3 minutos a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez resuspendidas se incorporaron al medio de cultivo que anteriormente habíamos retirado, con este paso conseguimos además de tener las células muertas y vivas juntas, inactivar la tripsina. Se centrifugó a 300g durante 2 minutos, se retiró el medio y se resuspendieron con 200  $\mu$ l de su correspondiente medio fresco.

Para realizar la medida de viabilidad con el Analizador Celular MUSE, se realizó una dilución 1/5 de las células usando el reactivo suministrado en el kit de viabilidad específico para el MUSE, con un volumen final de 200  $\mu$ l.

# RESULTADOS

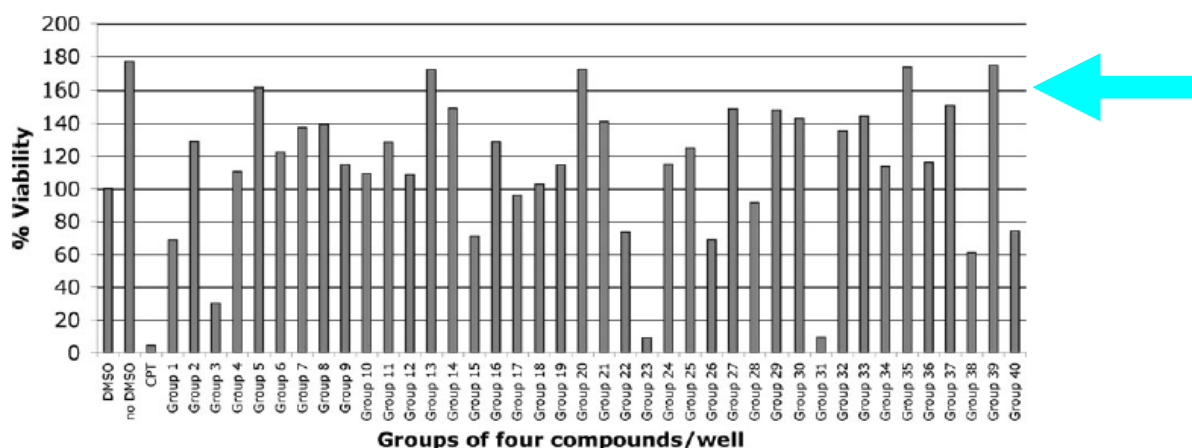
## CRIBADO DE LA QUIMIOTECA

Previamente al comienzo de este trabajo la Dra. Celia Conesa había llevado a cabo un cribado primario, utilizando la Prestwick Chemical Library (Prestwick Chemical, Illkirch, France), que consta de 1.120 compuestos químicos. El cribado se llevó a cabo para buscar compuestos que disminuían la viabilidad (según el ensayo de XTT) de las células mESC CGR8, analizándolos en grupos de 3 o 4 por pocillo.

Este proyecto comenzó con la realización de un cribado secundario, a través del cual se seleccionaron cuatro compuestos que aumentaban la viabilidad de las células CGR8, y no de las células MEFs (compuestos 1, 2, 3 y 4).

### Cribado primario

El cribado primario se planeó inicialmente para seleccionar compuestos que disminuían la viabilidad de las células madre pero no de células diferenciadas, teniendo en mente su utilización final para evitar la formación de teratomas. No obstante, algunos compuestos mostraron el efecto contrario, es decir, aumentaban la viabilidad de las células madre, según el ensayo de XTT.



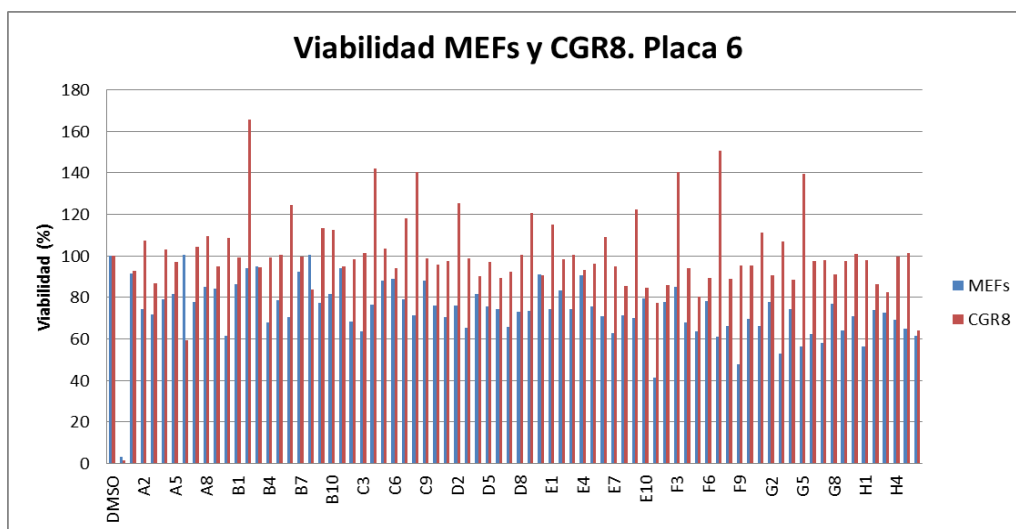
**Fig. 10. Cribado primario. Resultado del ensayo de XTT llevado a cabo sobre células mESC CGR8 en el que se estudiaron 40 grupos de cuatro compuestos con una concentración final de 10  $\mu$ M y un tiempo de incubación de 48 horas. Se utilizó campototecina (CPT) como control positivo de muerte, y DMSO como control**

negativo. Los datos se normalizaron respecto al valor de las células tratadas con DMSO, dándole un valor de 100%.

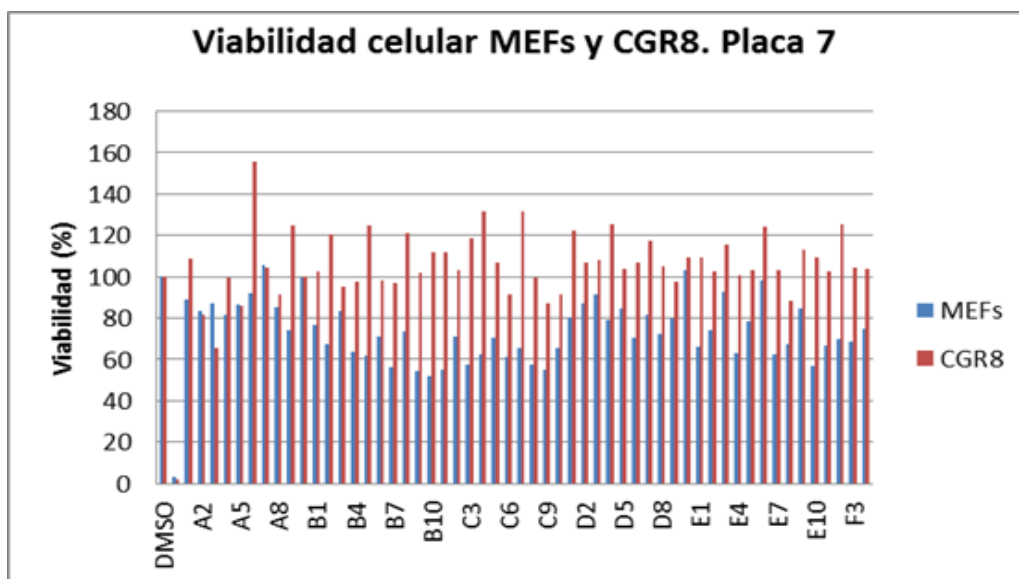
### Cribado secundario.

Nosotros seguimos con la realización del cribado secundario a partir de los grupos de tres o cuatro compuestos seleccionados del cribado primario que aumentaban la viabilidad de las células mESC CGR8. Este cribado secundario se realizó tanto en células mESC CGR8, como en células MEFs, para observar posibles diferencias en la viabilidad celular ambas líneas celulares

a)



b)



c)

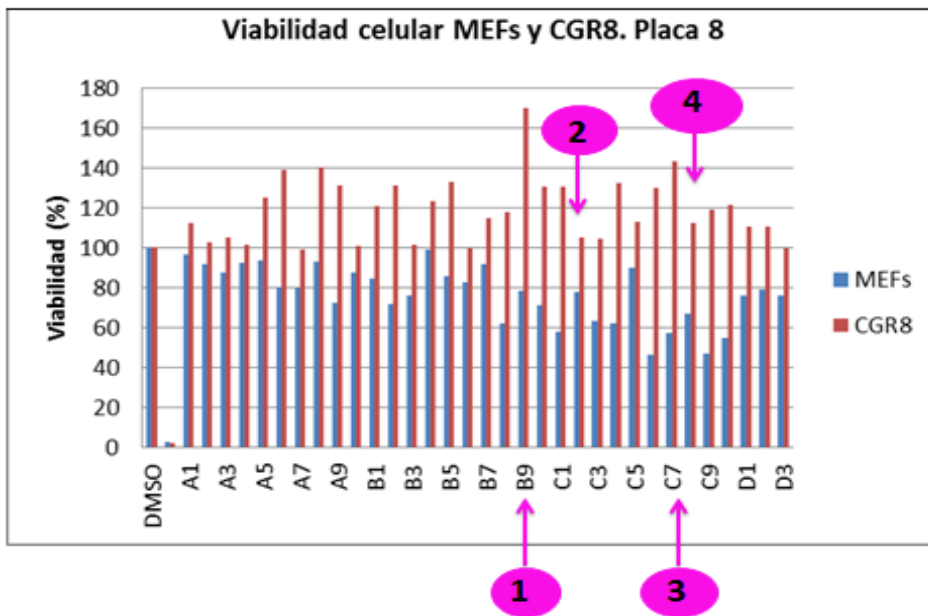
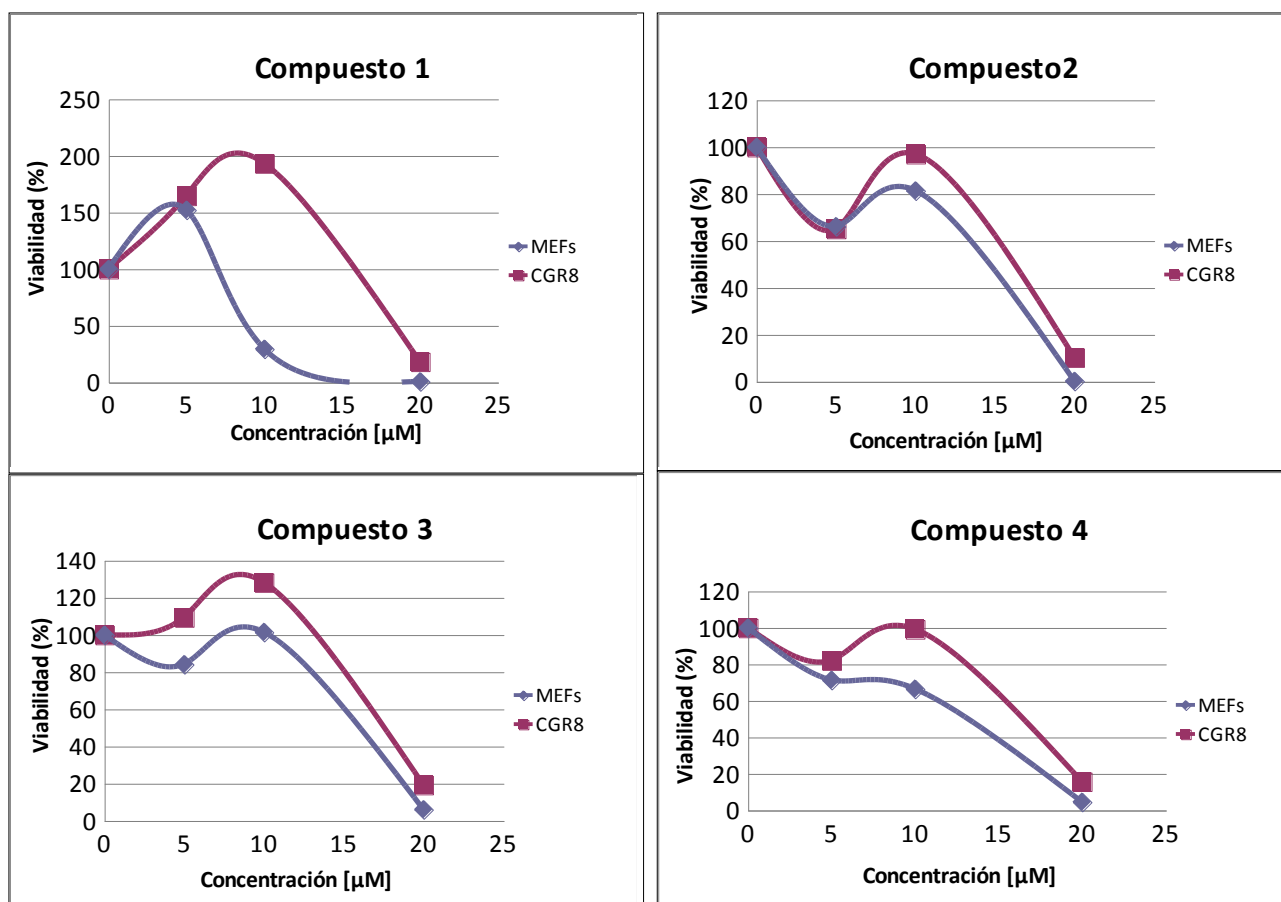


Fig. 11. Gráficos de cribados secundarios. En el cribado secundario se utilizaron las líneas celulares MEFs y mESC CGR8 para seleccionar los compuestos que tienen diferentes efectos sobre estas líneas celulares. Como control positivo se utilizó DMSO (1ª barra) y camptotecina como control de muerte (2ª barra). C) Con este cribado secundario se seleccionaron cuatro compuestos que aumentan la viabilidad celular de CGR8 y disminuyen la viabilidad celular de MEFs.

## CURVAS DOSIS-RESPUESTA

Para estudiar el efecto de los compuestos químicos se realizaron curvas de dosis respuesta, estas nos indican la concentración de cada compuesto a la cual la diferencia de viabilidad entre ambos tipos celulares es mayor.



**Fig. 12.** Curva dosis-respuesta de los cuatro compuestos seleccionados, realizados a un tiempo de 48 horas y a diferentes concentraciones. En cada uno de los gráficos se compara el porcentaje de viabilidad de MEFs y mESC CGR8 al ser incubados con el mismo compuesto. Los datos se han normalizado dando un 100% de viabilidad al dato obtenido con DMSO.

En los ensayos de dosis-respuesta se observó que la mayor diferencia de viabilidad entre ambos tipos celulares la producía el compuesto 1, a una concentración de 10 µM. Los demás compuestos no mostraban efectos significativos a ninguna de las concentraciones estudiadas.

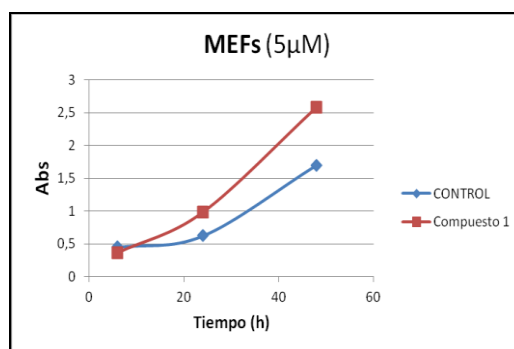
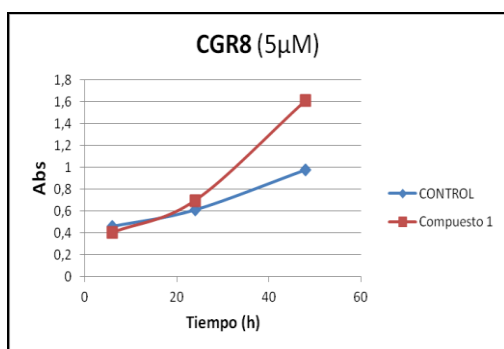
Cabe mencionar que al tratar los distintos tipos celulares con los compuestos a una

concentración de 20  $\mu\text{M}$ , la viabilidad de ambos tipos celulares disminuía drásticamente, lo que corrobora que cualquier droga en exceso es tóxica.

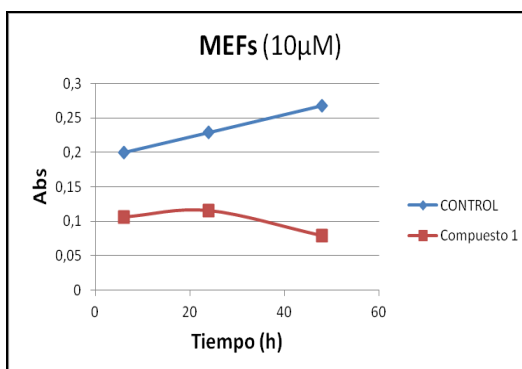
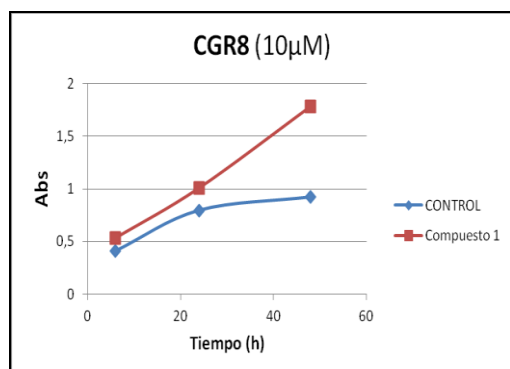
## **RESPUESTA EN EL TIEMPO (TIME- COURSE)**

Se realizó la medida de la viabilidad con los cuatro compuestos en ambos tipos celulares utilizando dos concentraciones diferentes, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , y variando los tiempos de incubación de las células con los compuestos: 6, 24 y 48 horas. Este ensayo se realizó para comprobar el tiempo de incubación al cual el efecto diferencial de los compuestos en ambos tipos celulares era mayor.

a)



b)



**Fig. 13. Time-Course del compuesto a diferentes concentraciones: 5 y 10  $\mu\text{M}$ , tomados a tiempos de 6, 24 y 48 horas. En estas gráficas se observan los efectos que produce dicho compuesto en células MEFs y mESC CGR8. Los datos no están normalizados respecto al control con DMSO, ya que así se aprecia mejor la tendencia. a) Time-course del compuesto 1 a 5  $\mu\text{M}$ , a la izquierda células CGR8, a la derecha células MEFs. b) Time-course del compuesto 1 a 10 $\mu\text{M}$ , a la izquierda, células CGR8, a la derecha células MEFs. NOTA: Las gráficas del resto de compuestos se encuentran en el Anexo Fig. 1**

A la concentración de 10  $\mu$ M el compuesto 1 manifiesta los efectos observados en el cribado secundario, el aumento de la viabilidad de las células mESC CGR8, y una gran disminución de la viabilidad de las células MEFs, hasta una 50 %.

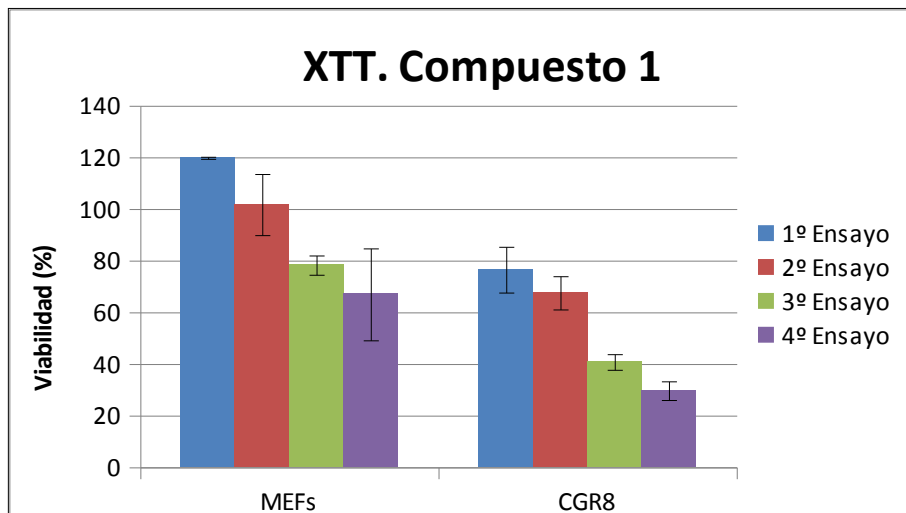
En este ensayo se observó que para el compuesto 1 a la concentración de 10  $\mu$ M, el tiempo de incubación al cual se observaban mayores diferencias de viabilidad entre ambos tipos celulares era a 48 horas, pero se decidió hacer los ensayos a 24 horas ya que a este tiempo la diferencia de viabilidad también es alta, y se reduce la duración de los ensayos.

## **ENSAYOS DE VIABILIDAD CELULAR.**

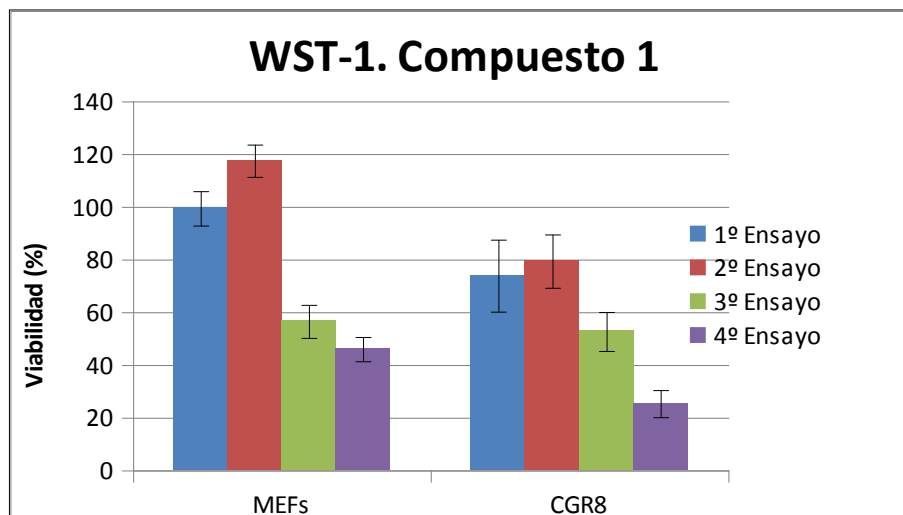
Teniendo en cuenta los datos obtenidos en los ensayos de Dosis-Respuesta y Time-Course se seleccionó el compuesto 1 para llevar a cabo ensayos adicionales, ya que con este compuesto se observaban mayores diferencias de viabilidad entre ambas líneas celulares. Para corroborar este dato se realizaron diferentes ensayos que miden viabilidad celular, además del XTT, como son MTT y WST-1, para asegurarnos de que el compuesto seleccionado afecta realmente a la viabilidad de ambos tipos celulares. Como se ha indicado, el XTT se reduce principalmente fuera de la célula, por lo que depende no solamente de la capacidad reductora celular sino del transporte de electrones al exterior celular. El WST-1 está descrito que solo se reduce fuera de la célula, siendo por tanto similar al XTT. El MTT se reduce dentro de la célula y no depende por tanto de fenómenos de transporte de electrones hasta el exterior celular.

Se realizaron diferentes ensayos de viabilidad celular con los kits de XTT, MTT y WST-1 para el compuesto 1. Estos se llevaron a cabo en ambos tipos celulares, utilizando una concentración final de compuesto de 10  $\mu$ M y con un tiempo de incubación de 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Estos ensayos se realizaron cuatro veces, cada uno de ellos por triplicado.

a)



b)



c)

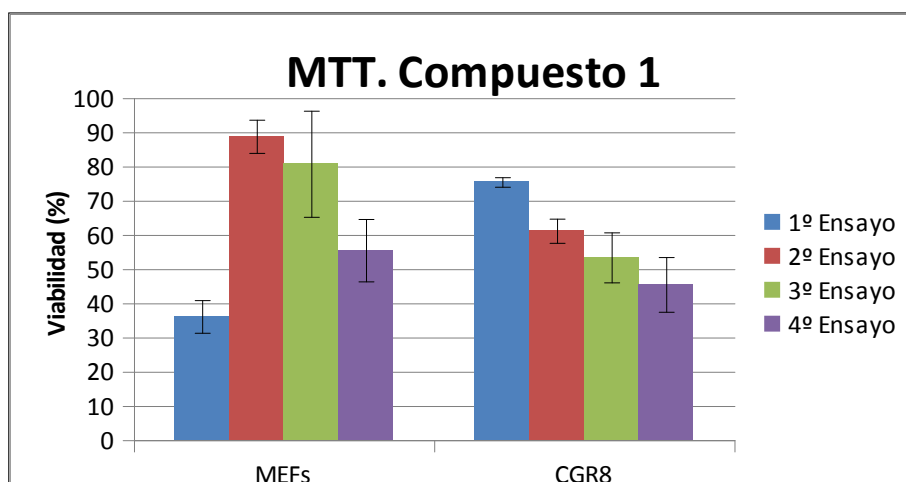


Fig.14. Diferentes ensayos de viabilidad celular para confirmar el efecto que



**produce el compuesto 1 sobre las células MEFs y mESC CGR8. Todos se realizaron en las mismas condiciones: las células se incubaron con el compuesto 1 a 10  $\mu$ M durante 24 horas. a) Ensayo de viabilidad utilizando el kit de XTT. b) Ensayo de viabilidad utilizando el kit de WST-1. c) Ensayo de viabilidad utilizando el kit de MTT.**

Como se puede observar en los gráficos (Fig. 14) existe bastante variabilidad entre los distintos ensayos, y además mostraban valores muy diferentes a los obtenidos anteriormente, ya que este compuesto fue seleccionado porque disminuía la viabilidad de las células MEFs y aumentaba la de las mESC CGR8.

Se analizó meticulosamente todo el trabajo realizado y se realizaron algunos análisis para determinar la causa de esa variabilidad.

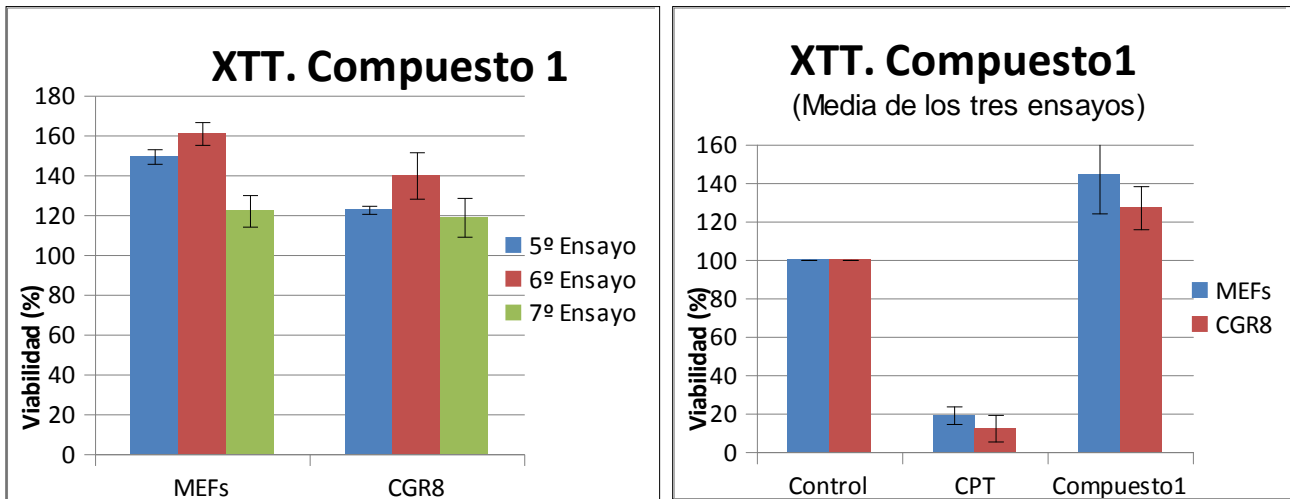
Primero se realizó el test de micoplasma en ambos tipos celulares, para descartar una posible contaminación de las células, ya que los micoplasmas pueden causar una gran variedad de efectos sobre las células, incluyendo alteraciones en el metabolismo, disminución de la proliferación y aberraciones cromosómicas (22).

Una vez descartado el micoplasma como posible causante de la variabilidad obtenida en los diferentes ensayos, se procedió a descartar otras posibles causas. Debido al alto número de pases realizados a las células, los últimos ensayos de viabilidad se realizaron con células frescas de ambas líneas, es decir, recién descongeladas (a éstas también se les realizó el test de micoplasma), descartando así que las células no se encontraran en perfecto estado después de los numerosos pases realizados.

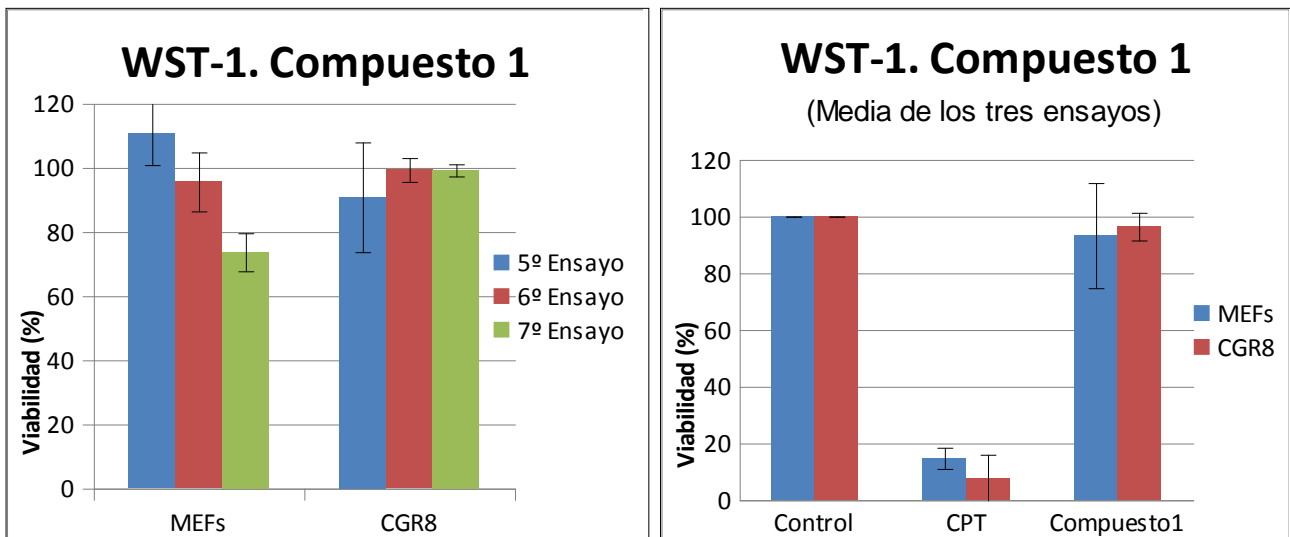
Una de las causas también podría ser el posible error de pipeteo, pero éste se descartó debido al alto número de ensayos realizados, poniendo especial cuidado en este aspecto en las repeticiones de los ensayos una vez detectado el problema.

Otro de los posibles motivos barajados fue el probable deterioro del compuesto, ya que este procedía de una quimioteca que había sufrido congelación y descongelación en muchas ocasiones. Por lo que se adquirió nuevamente el compuesto 1 de forma independiente, este fue disuelto en DMSO, y las posteriores diluciones se realizaron en PBS 1X. Se hicieron tres ensayos más de viabilidad, cada uno de ellos por triplicado, utilizándose los kits de XTT y WST-1. Se realizó además un ensayo sencillo con MTT. (Fig.15)

a)



b)



c)

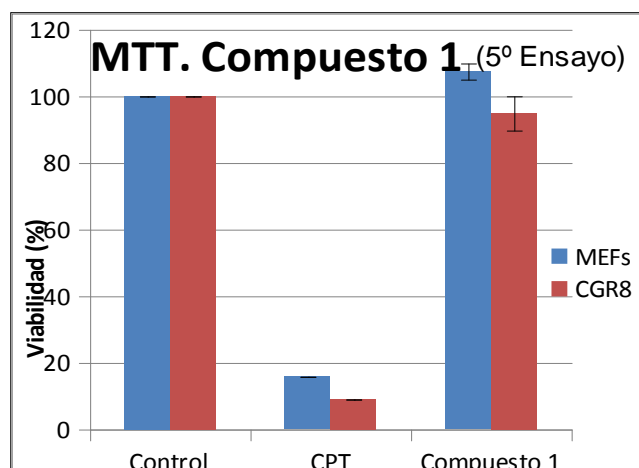


Fig. 15. Nuevos ensayos de viabilidad celular realizados con el compuesto 1 recién

**comprado, utilizando las mismas condiciones que en los ensayos anteriores, un tiempo de incubación con el compuesto 1 de 24 horas, a una concentración de 10  $\mu$ M. a) Ensayos de viabilidad utilizando el kit de XTT, a la izquierda, representados los tres nuevos ensayos realizados para las células MEFs y mESC CGR8, a la derecha media de los tres ensayos comparando los dos tipos celulares, como control células tratadas con DMSO, y cómo control positivo de muerte tratadas con camptotecina. b) Ensayos de viabilidad utilizando el kit de WST-1, a la izquierda representados los tres nuevos ensayos realizados para las células MEFs y mESC CGR8, a la derecha la media de estos ensayos, como control tenemos las células tratadas con DMSO, y cómo control positivo de muerte las células tratadas con camptotecina. c) Ensayo sencillo de MTT comparando los dos tipos celulares, como control células tratadas con DMSO, y cómo control positivo de muerte las células tratadas con camptotecina.**

Estos nuevos ensayos de viabilidad realizados (5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup>; con el compuesto recién comprado) utilizando los kits de XTT y WST-1 sí que producen resultados similares, con lo cual podemos concluir que la causa de la variabilidad obtenida en los ensayos anteriores (1<sup>o</sup>, 2<sup>o</sup>, 3<sup>o</sup> y 4<sup>o</sup>), es el deterioro del compuesto probablemente debido al elevado número de veces que fue congelado y descongelado.

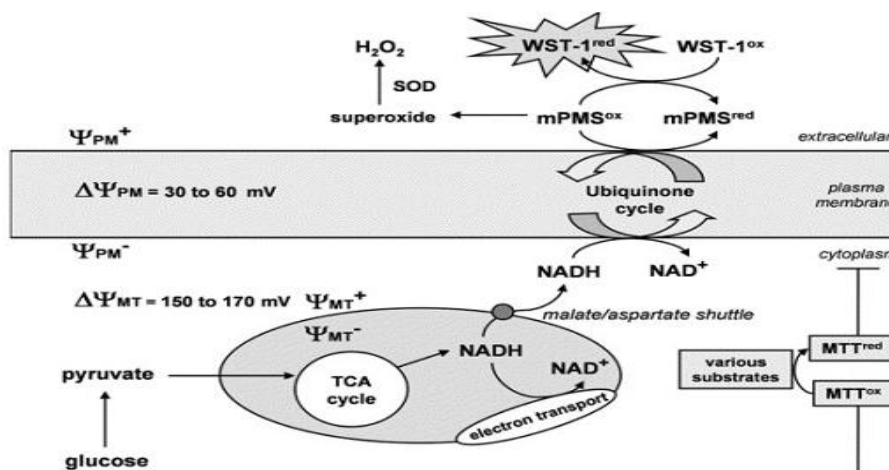
Los nuevos datos de viabilidad celular no muestran diferencias significativas entre los dos tipos celulares estudiados en ninguno de los ensayos realizados: XTT, MTT y WST-1.

Las diferencias de viabilidad celular observadas entre los dos tipos celulares en los primeros ensayos de XTT (cribado secundario, Dosis-Respuesta y Time-Course), no son comparables a las obtenidas a los últimos ensayos realizados (5<sup>o</sup>, 6<sup>o</sup> y 7<sup>o</sup>). La viabilidad celular después de incubar las células con el compuesto 1 a una concentración de 10  $\mu$ M durante 24 horas, en estos últimos ensayos fue del 127,19 % y 144,2 % para las células mESC CGR8 y MEFs, respectivamente, mientras que en las mismas condiciones para el ensayo de Time-Course la viabilidad para MEFs fue de 50,42 % y para mESC CGR8 de 126,45% (Tabla. 1).

Ensayo de viabilidad	Ensayos 5°, 6° y 7°		Ensayo Time-Course	
	MEFs (% Viabilidad)	mESC CGR8 (% Viabilidad)	MEFs (% Viabilidad)	mESC CGR8 (% Viabilidad)
XTT	144,2 ±19,44	127,19±11,21	50,42±14,43	126,45±36,15
WST-1	93,3±18,55	96,47±4,88	-	-
MTT	107,46±2,43	94,89±5,15	-	-

**Tabla 1. Porcentajes de viabilidad obtenidos con los diferentes kits, comparando los datos de los últimos ensayos ( 5°, 6° y 7°; con el compuesto recién comprado) y del Time-Course (compuesto de la quimioteca), todos los ensayos se realizaron a la misma concentración de compuesto 1 (10µM) y tiempo de incubación (24h).**

Los resultados obtenidos con los diferentes kits de viabilidad celular tampoco son comparables entre sí. Los ensayos de XTT, MTT y WST-1 miden viabilidad celular, pero como ya se ha indicado reaccionan en distintos lugares (dentro o fuera de la célula). De ahí pueden venir los diferentes resultados obtenidos con cada método. De estas tres sales de tetrazolium sólo es capaz de entrar en el interior celular el MTT, siendo reducida por la enzima succinato deshidrogenasa, que participa en el Ciclo de Krebs y en la cadena de transporte de electrones. Tanto la sal XTT como la WST-1 no pueden entrar al interior celular porque están cargadas negativamente, estas necesitan de intermediarios aceptores de electrones que captan electrones de la superficie celular y, que a su vez reduce a estas sales. Esos electrones son transferidos desde el interior celular por la oxidorreductasa de la membrana plasmática (PMOR por sus siglas en inglés). No obstante, aunque está descrito que el WST-1 solamente se reduce en el exterior celular, no está claro si una parte del XTT se reduce dentro de la célula (23).



**Fig.16. Esquema comparativo de la actuación de las sales MTT y WST-1 (24).**

Debido a estos nuevos datos obtenidos se decidió utilizar otras técnicas con las que pudiéramos estudiar la viabilidad de células MEFs y mESC CGR8 al ser tratadas con el compuesto 1 o con otros compuestos. Estas nuevas técnicas fueron la citometría y la microscopía de fluorescencia en célula viva, con esta última técnica se puede observar, *in vivo*, los efectos que pudiera producir el compuesto 1 en las mESC CGR8 y MEFs, ya que aunque no afecte a la viabilidad de las células, puede afectar en otros aspectos, como por ejemplo: morfología, movilidad, granulosidad, cantidad de mitocondrias, etc.

## **MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA**

### ***Ensayo de célula viva.***

Para la puesta a punto del ensayo de célula viva, se optimizaron las condiciones adecuadas para el mantenimiento de las células en el microscopio de fluorescencia, tanto en placas de plástico, como en cámaras Attofluor (Invitrogen), que utilizan un cubreobjetos de vidrio de 0,17  $\mu\text{m}$  de espesor como superficie de cultivo celular.

Las concentraciones óptimas de cultivo para las cámaras Attofluor y las placas de 24 pocillos de plástico son de  $3 \times 10^5$  células/ml para células CGR8 y  $5 \times 10^4$  células/ml para células MEFs

Para los ensayos de microscopía de fluorescencia con célula viva se decidió utilizar los fluorocromos Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos. Estos fluorocromos nos permiten observar alteraciones en el núcleo celular y cambios morfológicos en las mitocondrias.

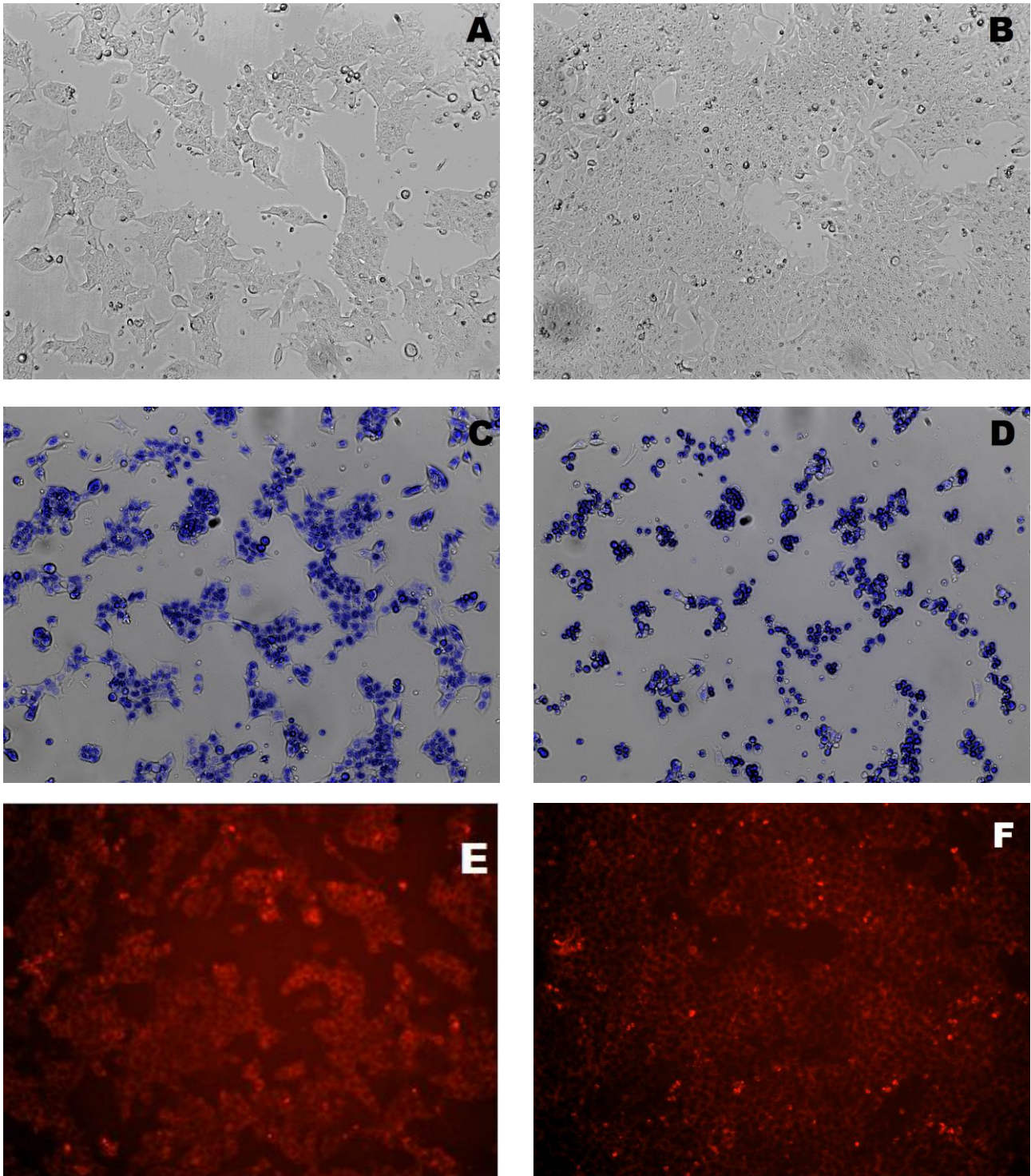
### ***Ensayo de toxicidad de los fluorocromos***

Lo primero que se estudió fue la toxicidad de cada uno de los fluorocromos, por separado, en conjunto, y en ambos tipos celulares.

Se llevó a cabo la tinción de las células MEFs y mESC CGR8 con Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos siguiendo el protocolo descrito en el apartado de *Metodología*.

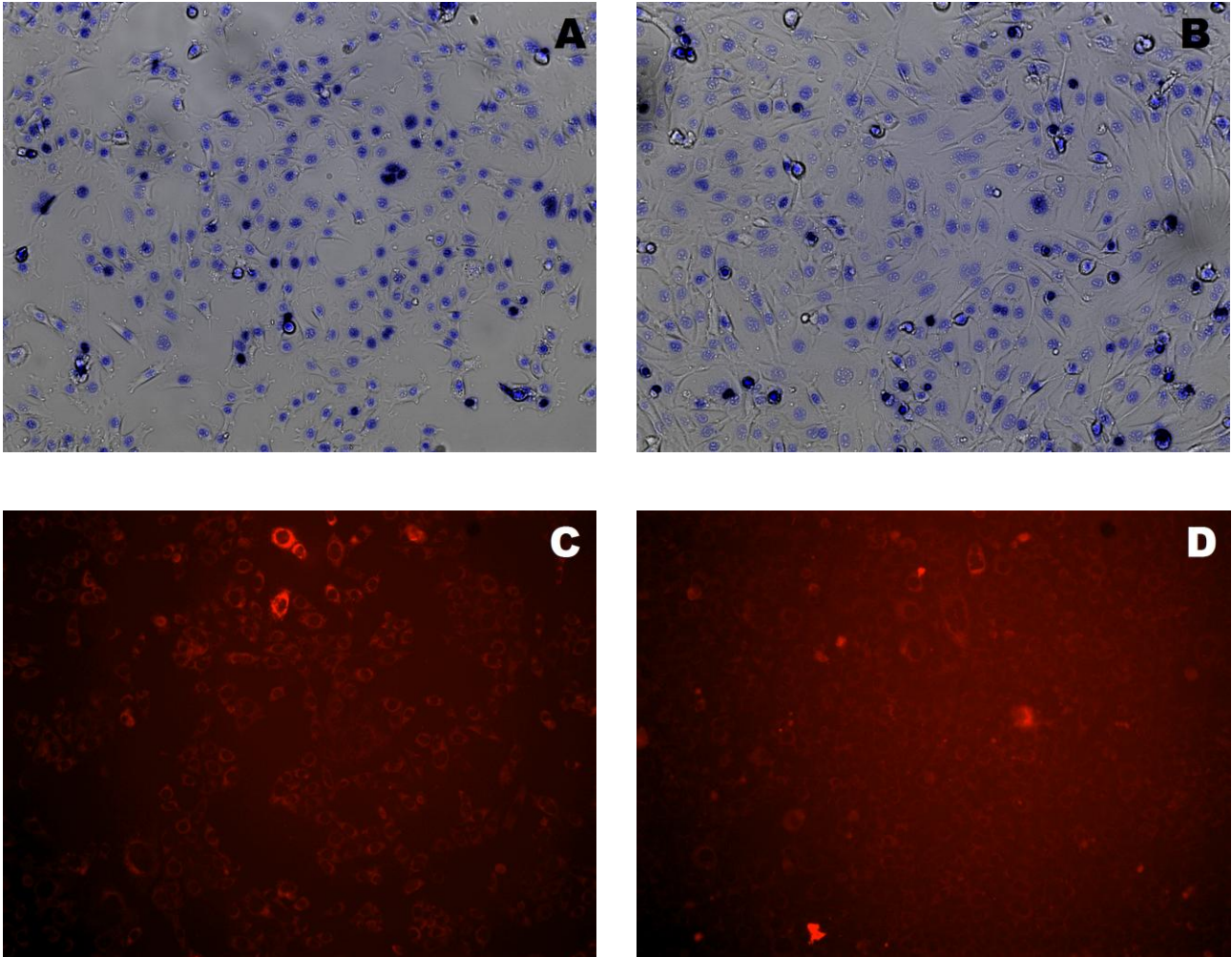
Los resultados concluyeron que ninguno de los dos fluorocromos provocaba daño alguno a las células MEFs, ya que se observaba un crecimiento y una división normal de éstas (Fig.18. A, B, C y D). Diferentes resultados se obtuvieron para las mESC CGR8,

mientras que en presencia del fluorocromo Mitotracker Red CMXRos las células se dividían de forma normal (Fig.17. E y F), con el fluorocromo Hoechst 33342 las células se mueren (se redondean y despegan) (Fig.17. C y D). En los ensayos de microscopia de fluorescencia cuando nos referimos al tiempo de cultivo, el tiempo cero se refiere al momento en el que comenzamos a tomar imágenes con el microscopio de fluorescencia.



**Fig. 17. Ensayo de toxicidad de los distintos fluorocromos en células mESC CGR8.**

A) Células mESC CGR8 control sin teñir a tiempo 0. B) Igual que en A pero tras 24 horas realizando fotos cada 45 minutos. C) Solapamiento de imágenes de campo claro y fluorescencia azul, células mESC CGR8 teñidas con Hoechst 33342 a tiempo 0. D) Solapamiento como en C tras 24 horas realizando fotos cada 45 minutos. E) Células mESC CGR8 con fluorescencia roja teñidas con Mitotracker Red CMXRos a tiempo 0. F) Igual que en B pero tras 24 realizando fotos cada 45 minutos.



**Fig.18. Ensayo de toxicidad de fluorocromos sobre células MEFs. A) Solapamiento de campo claro y fluorescencia azul, células teñidas con Hoechst 33342 a tiempo 0. B) Igual que en A pero tras 24 horas realizando fotos cada 45 minutos. C) Células con fluorescencia roja teñidas con Mitotracker Red CMXRos a tiempo 0. D) Igual que C pero tras 24 horas realizando fotos cada 45 minutos.**

Después de observar el daño causado por el Hoechst 33342 en las células mESC CGR8, el siguiente paso consistió en estudiar la causa de la muerte, es decir, si la muerte

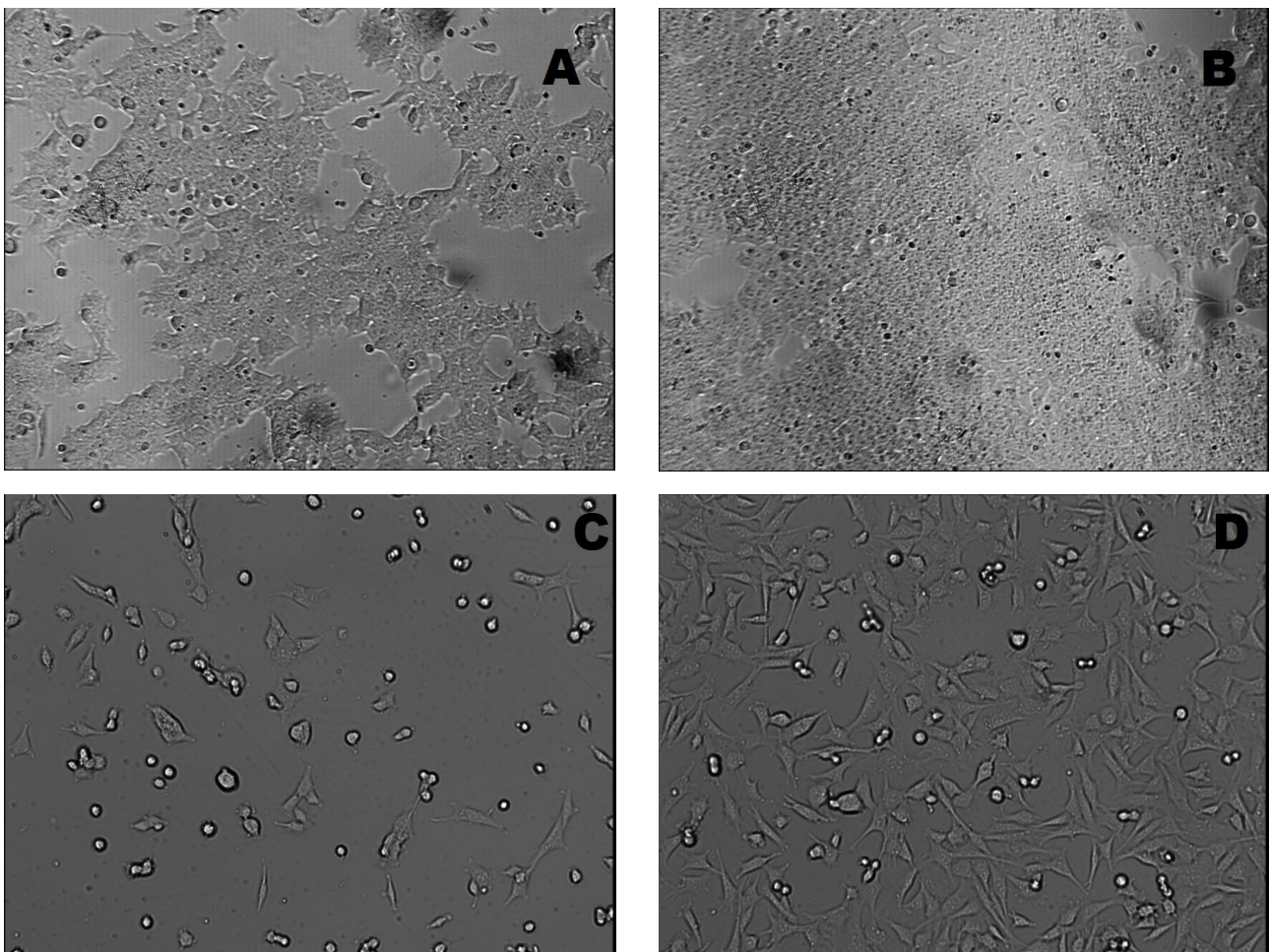
era provocada por el propio fluorocromo (quimiotoxicidad), o sí era provocada por la fluorescencia (fototoxicidad).

### ***Ensayo de quimiotoxicidad y fototoxicidad de Hoechst 33342***

Para estudiar la **quimiotoxicidad** del Hoechst 33342 se llevó a cabo la tinción de las células sólo con dicho fluorocromo. Se procedió siguiendo el protocolo descrito en *Metodología* para este apartado. Este ensayo se realizó para células MEFs y mESC CGR8.

Al finalizar las 24 horas durante las cuales se estuvieron realizando fotos cada 45 minutos solo en campo claro se observó que las células continuaban vivas, y se habían dividido de forma normal (Fig.19).

Este ensayo descartó que la muerte de las mESC CGR8 fuera causada por la quimiotoxicidad del Hoechst 33342.



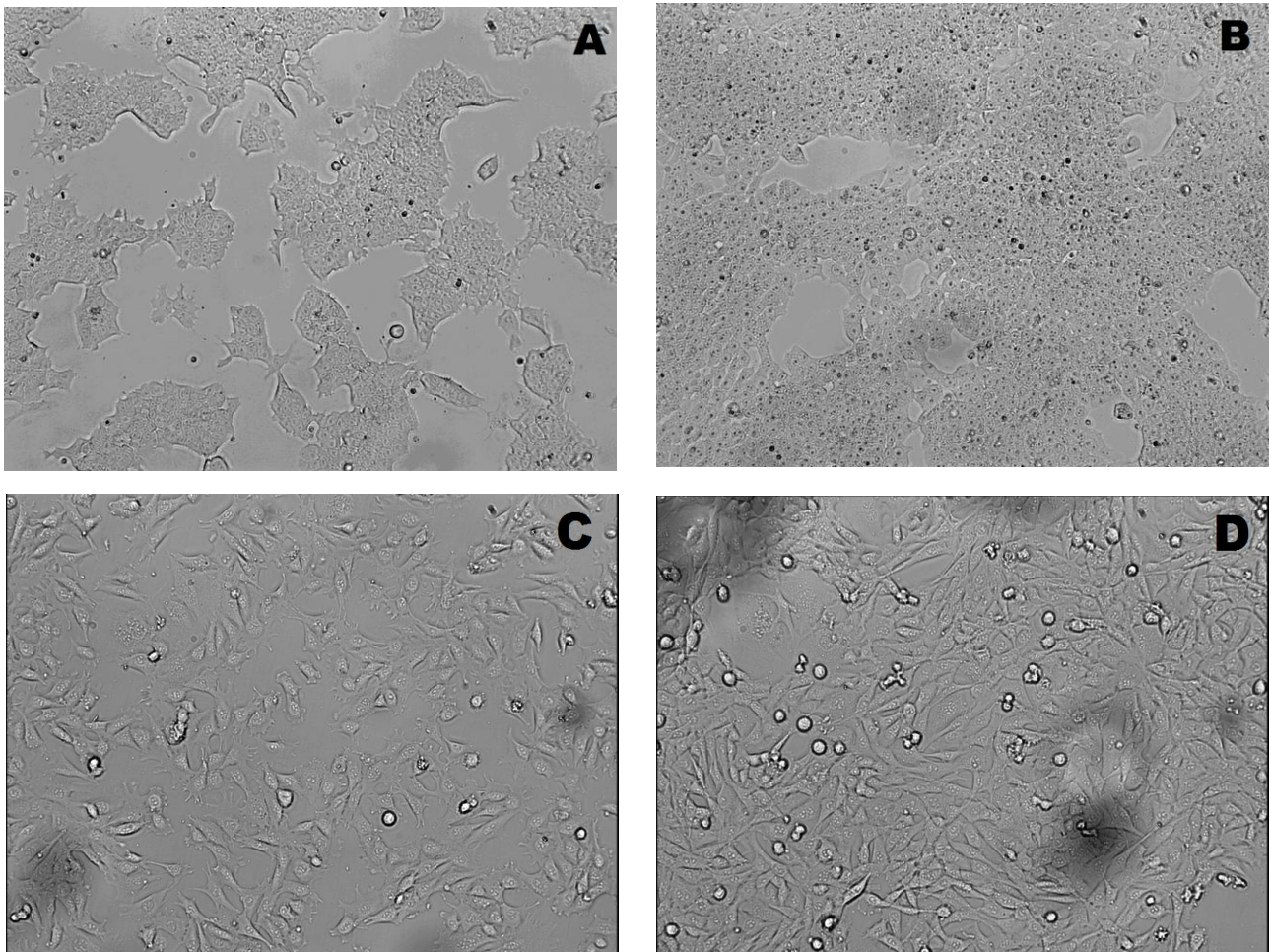
**Fig.19. Ensayo de quimiotoxicidad del Hoechst 33342. A) Células mESC CGR8 teñidas con Hoechst 33342 a tiempo 0. B) Células mESC CGR8 teñidas con Hoechst**



33342 a tiempo 24 horas, sin hacer incidir luz de fluorescencia sobre ellas. C) Células MEFs teñidas con Hoechst 33342 a tiempo 0. D) Células MEFs teñidas con Hoechst 33342 a tiempo 24 horas, sin hacer incidir luz de fluorescencia sobre ellas.

Una vez descartado que la muerte de las mESC CGR8 fuese provocada por la quimiotoxicidad del fluorocromo y, por lo tanto, probado que era debida a fototoxicidad llevamos a cabo ensayos para determinar si la **fototoxicidad** era debida a la luz de excitación o a la de emisión. Este ensayo también lo realizamos para las células MEFs.

Tras seguir los protocolos de preparación de células y microscopía descritos en *Metodología*, a las 24 horas se observó que las células mESC CGR8 que no habían sido teñidas, pero fueron iluminadas con luz fluorescente durante 24 horas cada 45 minutos, seguían vivas, y se dividían de forma normal (Fig.20).



**Fig.20. Ensayo de fototoxicidad del fluorocromo Hoechst 33342. A) Células mESC CGR8 sin teñir a tiempo 0. B) Células mESC CGR8 sin teñir tras 24 horas haciéndoles incidir fluorescencia azul cada 45 minutos. C) Células MEFs sin teñir a**

**tiempo 0. D) Células MEFs sin teñir tras 24 horas haciéndoles incidir fluorescencia azul cada 45 minutos.**

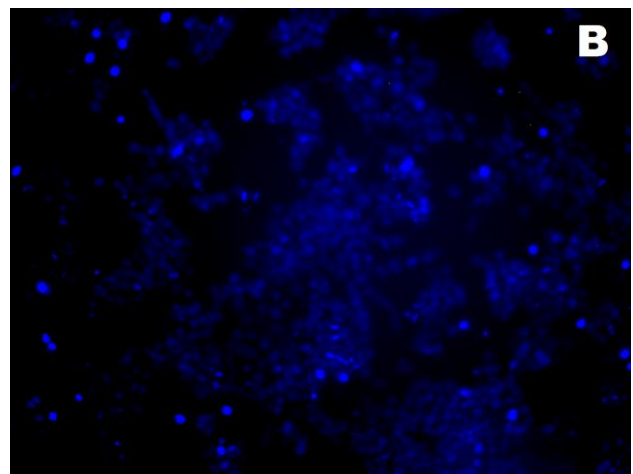
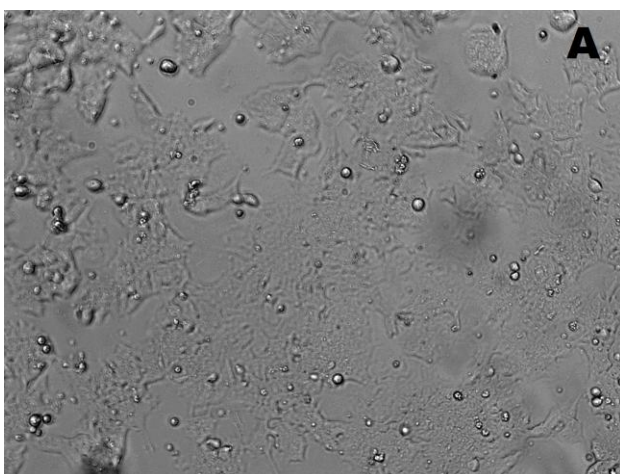
Este ensayo demostró que la luz de excitación del fluorocromo no es la causante de la muerte de las células mESC CGR8, por lo que, la fototoxicidad tiene que deberse a la luz de emisión. Es decir, lo que mata a las células es la luz que emite el Hoechst 33342 desde el interior celular.

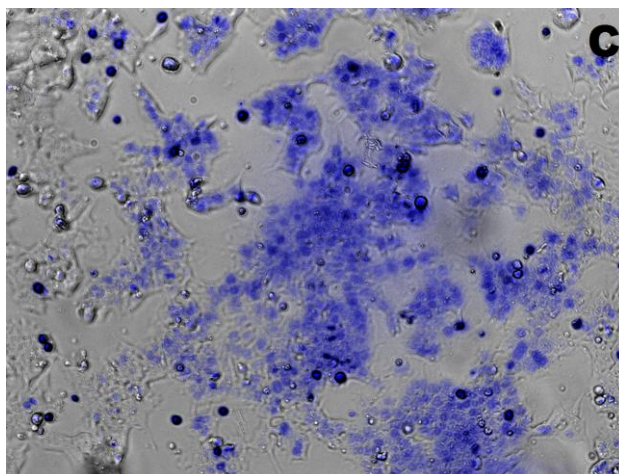
Dadas las circunstancias de que la toxicidad del fluorocromo Hoechst 33342 es causada por la luz de emisión que emite el propio fluorocromo, y ésta es inevitable, se estudiaron diferentes aspectos de la tinción, como son la concentración de fluorocromo, y el tiempo de incubación con el mismo, para tratar de encontrar así los parámetros adecuados para que el fluorocromo provoque el menor daño posible a las mESC CGR8.

### ***Determinación de la concentración mínima de Hoechst 33342 necesaria para teñir las células***

En este caso se estudió la mínima concentración necesaria para que el Hoechst 33342 tiña los núcleos de mESC CGR8. Este ensayo se realizó con diferentes concentraciones, partiendo de la concentración recomendada por el fabricante hasta concentraciones 100 veces menores. Se llevó a cabo la tinción siguiendo el protocolo descrito en *Metodología*, el tiempo de incubación del fluorocromo para todas las concentraciones fue de 30 minutos.

El resultado obtenido tras realizar este ensayo nos indicó que la mínima concentración de fluorocromo necesaria para que se tiñan los núcleos de las células mESC CGR8 y se puedan observar nítidamente es de 250 ng/ml (Fig. 21)



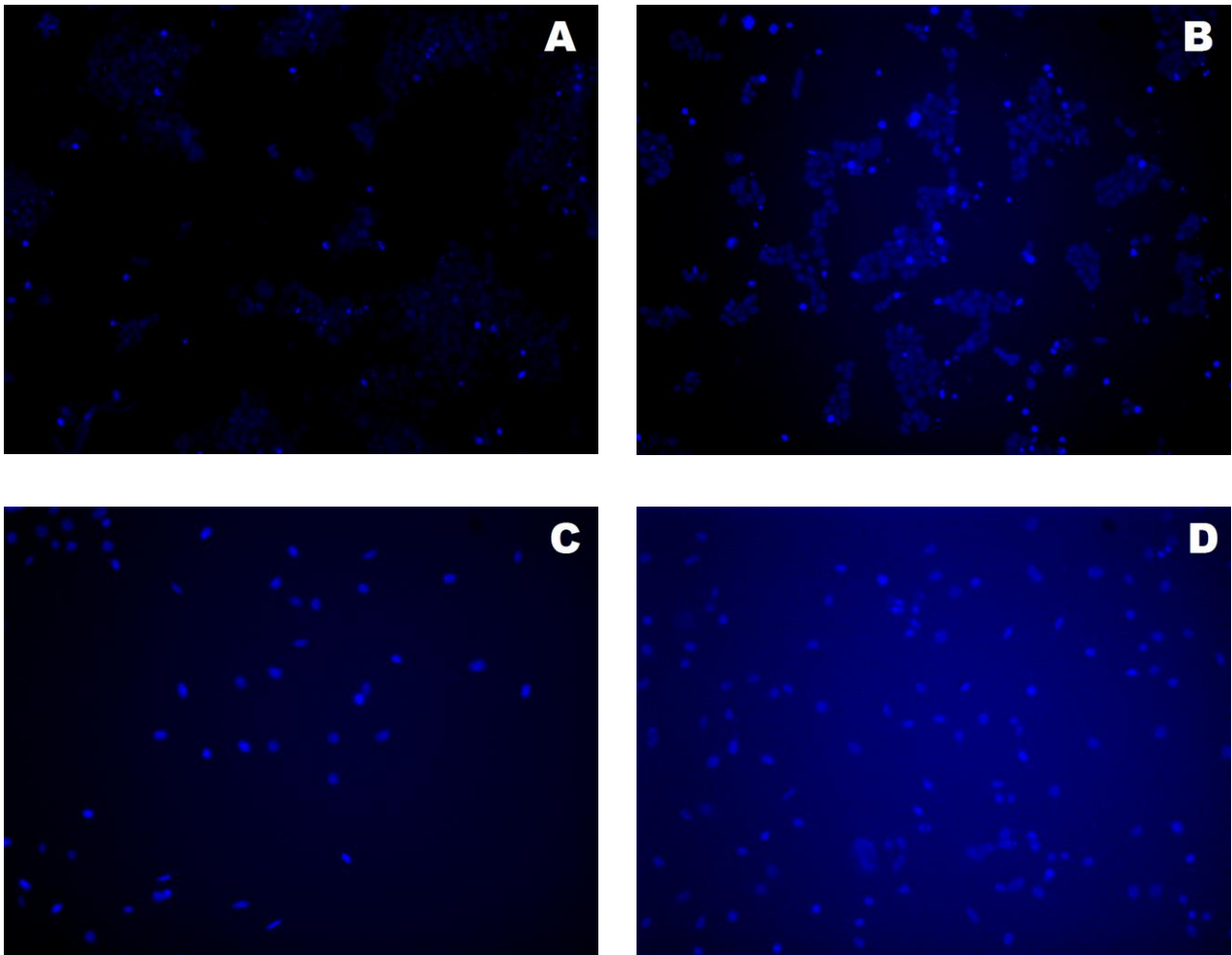


**Fig.21. Concentración mínima de Hoechst 33342 a la cual se tiñen los núcleos de las células mESC CGR8, 250 ng/ml. A) Imagen en campo claro. B) Imagen con fluorescencia azul. C) Solapamiento de las fotos A y B.**

***Ensayo del tiempo mínimo de incubación de Hoechst 33342 necesario para teñir las células***

Otra de las características que se estudió fue el tiempo mínimo de incubación necesario para que se tiñan las mESC CGR8 y MEFs. Las concentraciones utilizadas para llevar a cabo la tinción fueron la recomendada por el fabricante, 1µg/ml, y la mínima necesaria para teñir los núcleos, 250 ng/ml. Este ensayo lo realizamos también para células MEFs para comprobar que también se tiñen con una concentración de 250 ng/ml. La tinción con las dos concentraciones en los dos tipos celulares se llevó a cabo siguiendo el procedimiento que se encuentra descrito en *Metodología*.

El resultado de este ensayo fue que, para ambos tipos celulares a la concentración de 1µg/ml el tiempo mínimo de incubación era de 10 minutos (Fig.22 A y C), mientras que para la concentración de 250 ng/ml era de 25 minutos (Fig.22 B y D).

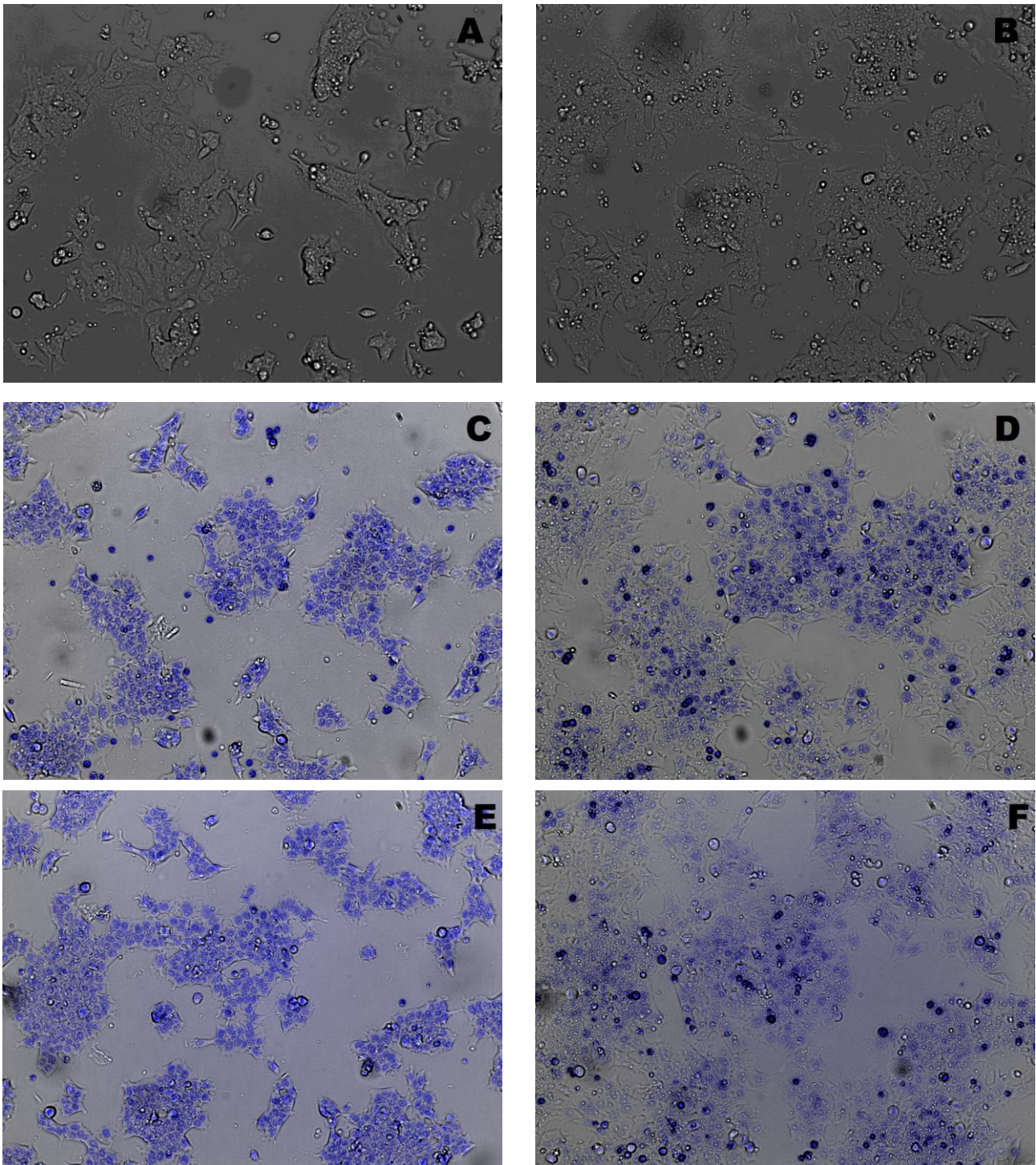


**Fig.22. Tiempo mínimo de incubación de células MEFs y mESC CGR8 con diferentes concentraciones de Hoechst 33342. A) mESC CGR8 teñidas con una concentración de 1 µg/ml durante 10 minutos. B) mESC CGR8 teñidas con una concentración de 250 ng/ml durante 25 minutos. C) MEFs teñidas con una concentración de 1 µg/ml durante 10 minutos. D) MEFs teñidas con una concentración de 250 ng/ml durante 25 minutos.**

***Ensayo fototoxicidad de Hoechst 33342 a las concentraciones y tiempos de incubación seleccionados***

Una vez conocido el tiempo mínimo de incubación y la menor concentración necesaria para que se tiñan los núcleos con Hoechst 33342, se decidió estudiar si también utilizando estas condiciones el fluorocromo era tóxico para las mESC CGR8, ya que se sospechaba que con una baja concentración y el menor tiempo de incubación posible, la célula incorporaría menor cantidad fluorocromo y el daño sería menor. Este ensayo se realizó también con células MEFs.

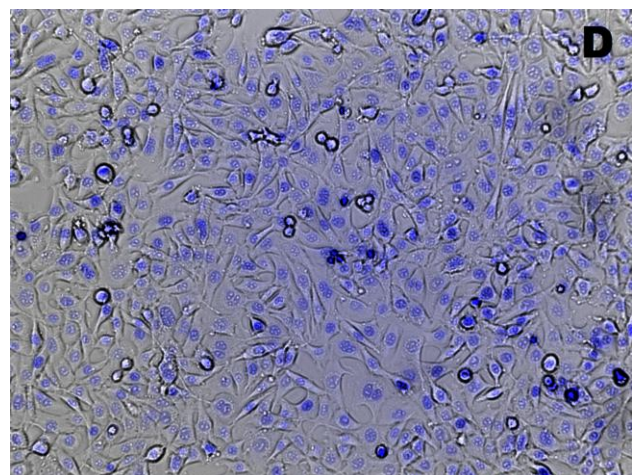
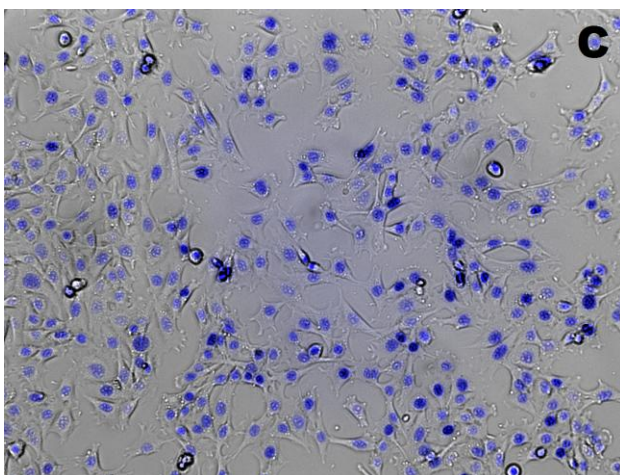
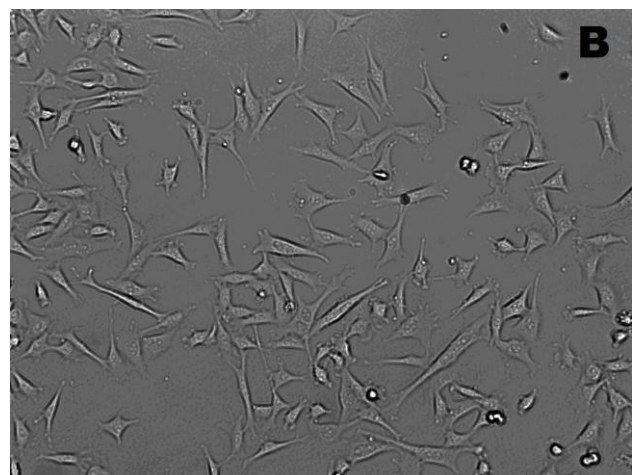
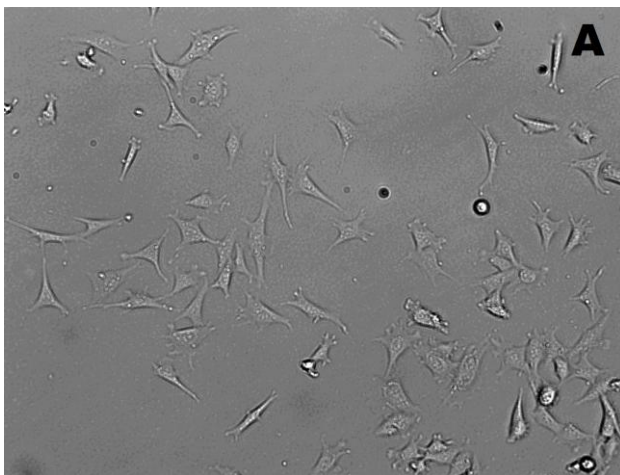
El resultado de este estudio permitió concluir que la tinción con el fluorocromo Hoechst 33342 en las dos condiciones nuevas estudiadas: 1) 250ng/ml durante 25 min. 2) 1µg/ml durante 10 min (Fig.23 C, D, E y F) provoca menor daño celular que las condiciones iniciales, pero de todas formas les afecta a su comportamiento habitual, ya que presentan un menor crecimiento y una división más lenta que en condiciones normales, es decir, cuando no están teñidas.

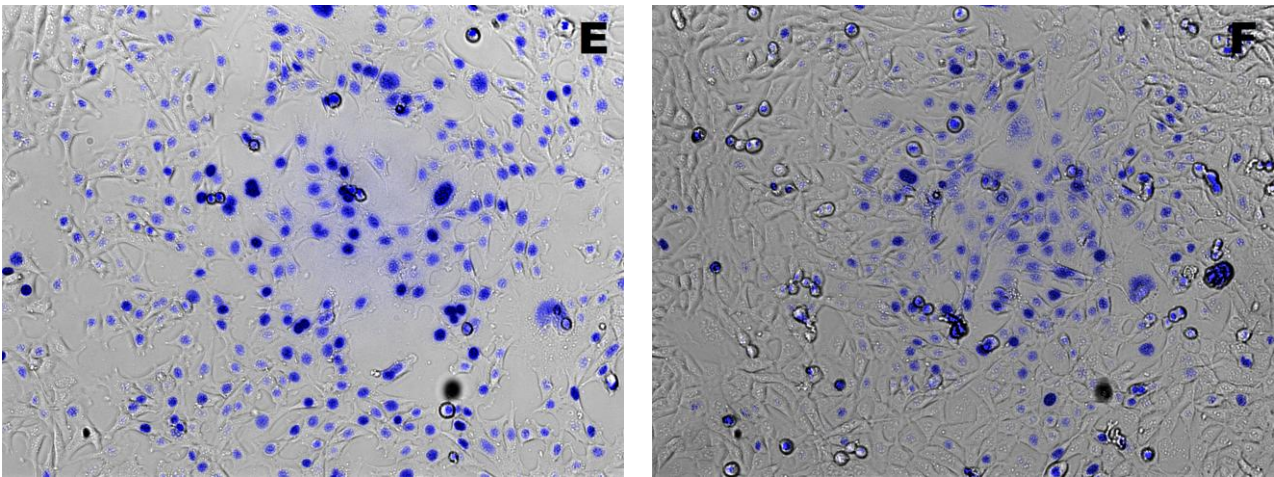


**Fig.23. Estudio de la fototoxicidad del fluorocromo Hoechst 33342 sobre las células**

mESC CGR8 variando las concentraciones de fluorocromo y tiempos de incubación  
A) mESC CGR8 control sin teñir a tiempo 0, en campo claro. B) mESC CGR8 control sin teñir tras 24 horas haciendo incidir fluorescencia sobre ellas cada 45 minutos, en campo claro. C) Solapamiento en campo claro y fluorescencia azul de mESC CGR8 teñidas con 1µg/ml de Hoechst 33342 durante 10 minutos, a tiempo 0. D) Igual que C, pero tras 24 horas haciendo incidir fluorescencia azul sobre ellas cada 45 minutos. E) Solapamiento de campo claro y fluorescencia azul de mESC CGR8 teñidas con 250 ng/ml de Hoechst 33342 durante 25 minutos, a tiempo 0. F) Igual que E pero tras 24 horas haciendo incidir fluorescencia azul sobre ellas.

En las mismas condiciones, el fluorocromo no produce toxicidad apreciable en MEFs (Fig. 24 C,D,E,F).





**Fig. 24. Estudio de la fototoxicidad del fluorocromo Hoechst 33342 sobre las células MEFs variando las concentraciones de fluorocromo y tiempos de incubación. A, B, C, D, E y F, igual que en la Fig.23.**

Las condiciones de tinción elegidas para llevar a cabo el resto de ensayos fueron 250 ng/ml y 25 minutos de incubación.

***Ensayo de toxicidad del Compuesto 1, una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas del fluorocromo Hoechst 33342***

Se llevó a cabo el estudio de la toxicidad del compuesto 1 en células mESC CGR8 y MEFs, *in vivo*. Se tiñeron con Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMXRos. En este caso se siguieron las nuevas condiciones de tinción del fluorocromo Hoechst 33342, siguiendo paso a paso el protocolo descrito en *Metodología*. Al finalizar este estudio se dedujo que el compuesto 1 no afectaba a la viabilidad de las células MEFs, ya que tanto en presencia como en ausencia del compuesto se dividieron de forma normal (Fig.27 y 28). En el caso de las células mESC CGR8 no se pudo asegurar un resultado concreto, ya que al afectar el Hoechst 33342 a su crecimiento normal no podemos saber cómo influye el compuesto en estas células. No obstante, al comparar las células tratadas con el compuesto con las células control que solo estaban teñidas no se observó ninguna diferencia entre ellas, con lo cual podemos decir que probablemente tampoco afecte al crecimiento de éstas (Fig.25 y 26).

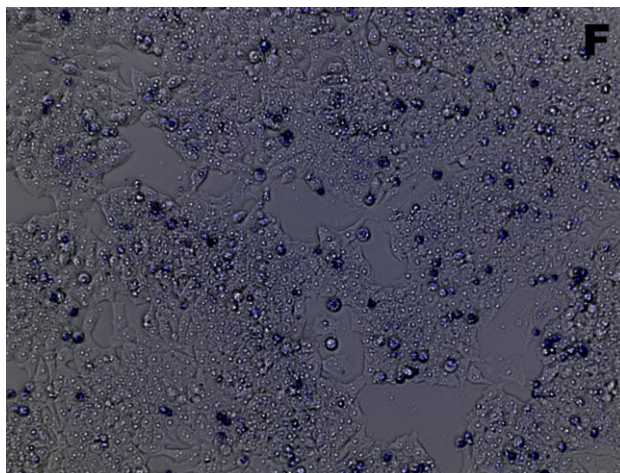
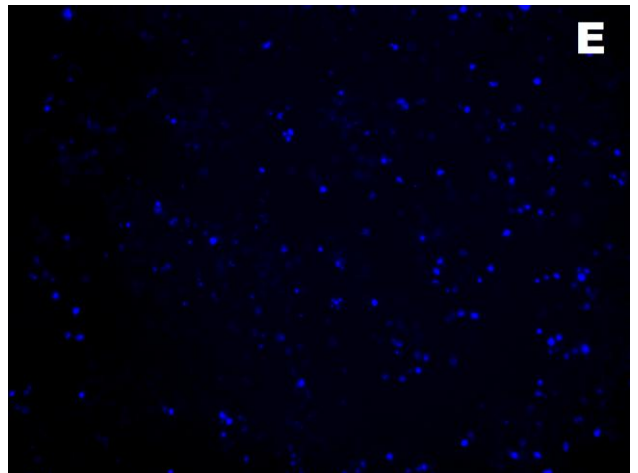
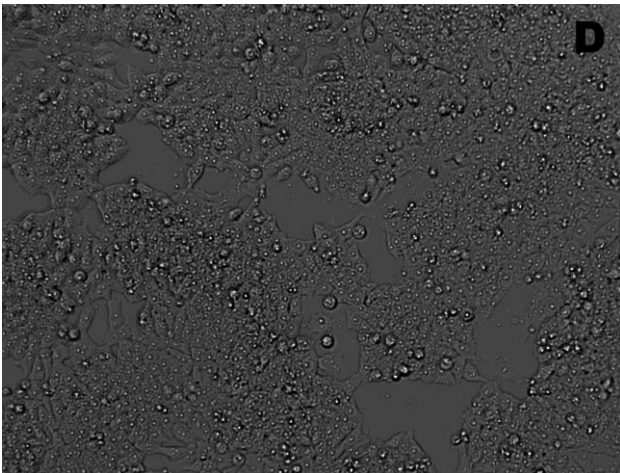
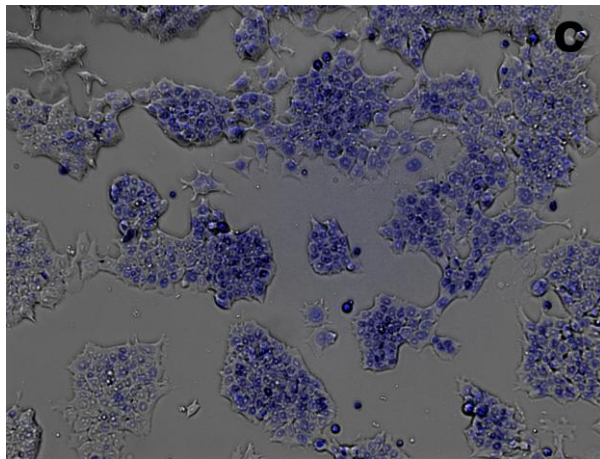
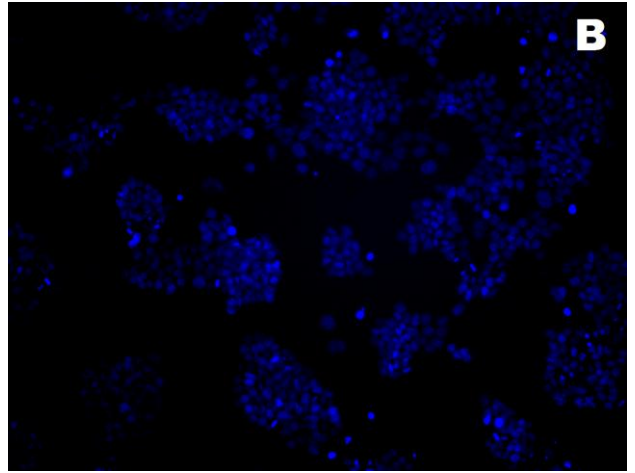
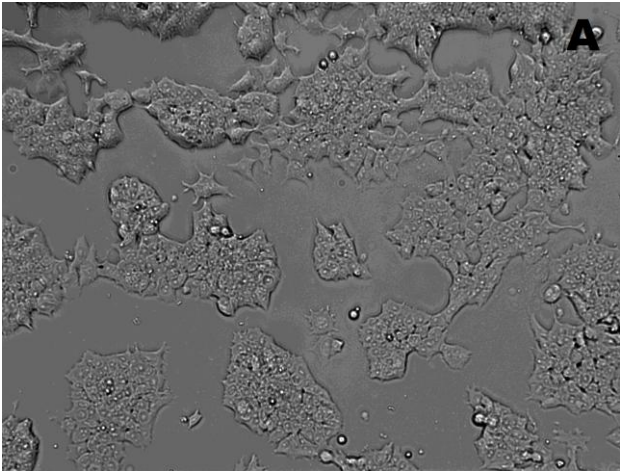
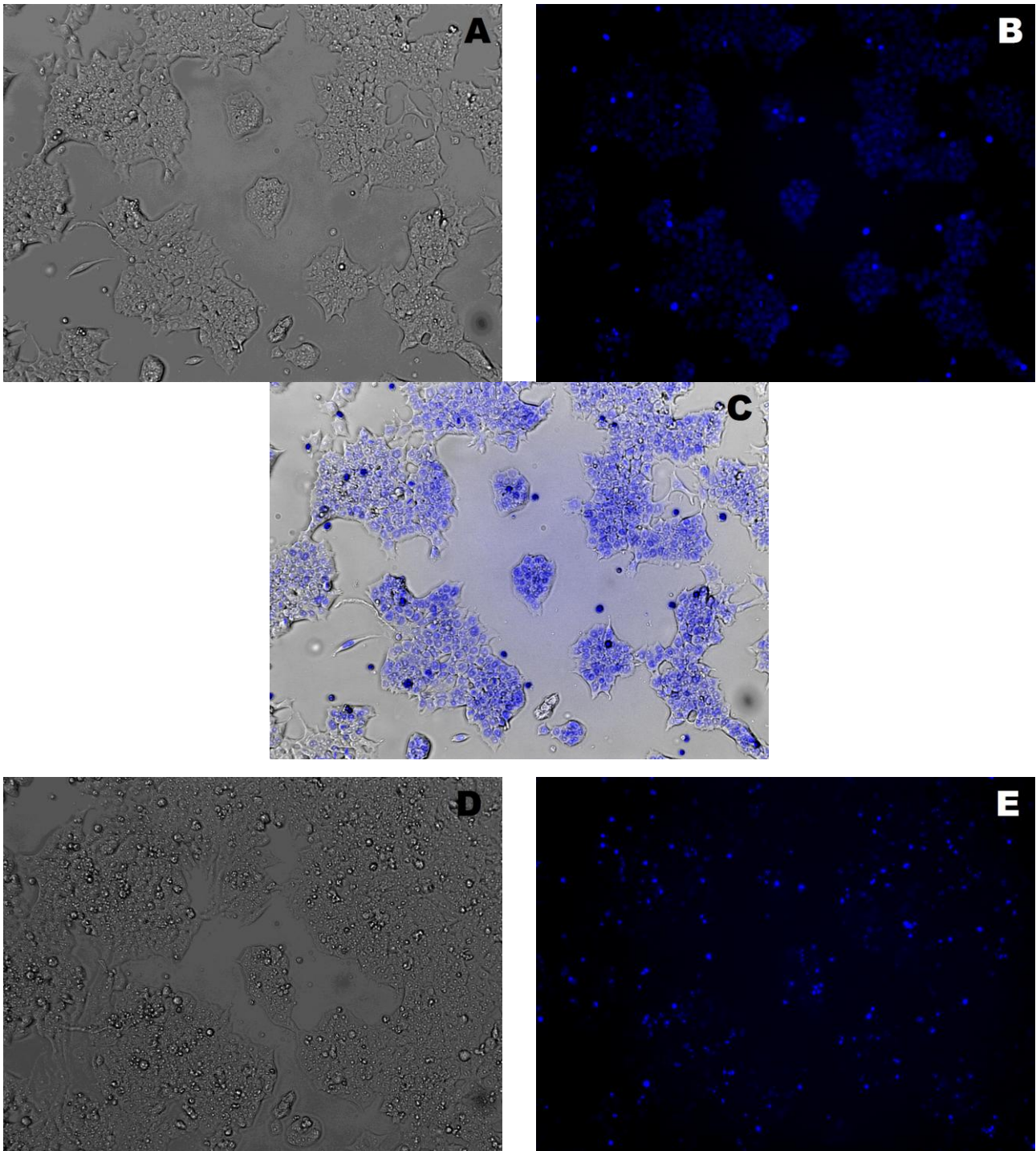




Fig. 25. Ensayo de toxicidad del compuesto 1, una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas del fluorocromo Hoechst 33342. Células mESC CGR8 Control, es decir, teñidas sin tratar con el compuesto. A) Células mESC CGR8 a tiempo 0, en campo claro. B) Igual que A, pero con fluorescencia azul. C) Solapamiento de las imágenes A y B. D) Células mESC CGR8 tras 24 horas haciendo incidir fluorescencia azul sobre ellas, en campo claro. E) Igual que D, pero con fluorescencia azul. F) Solapamiento de las imágenes D y E.



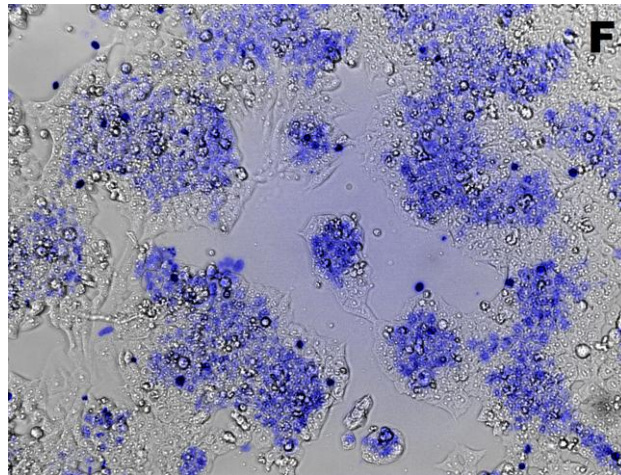
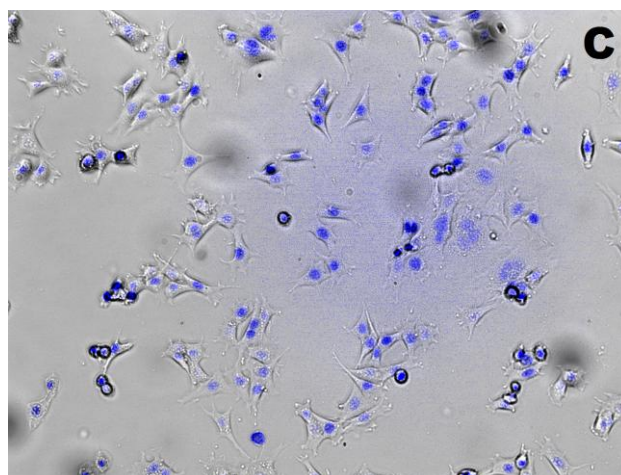
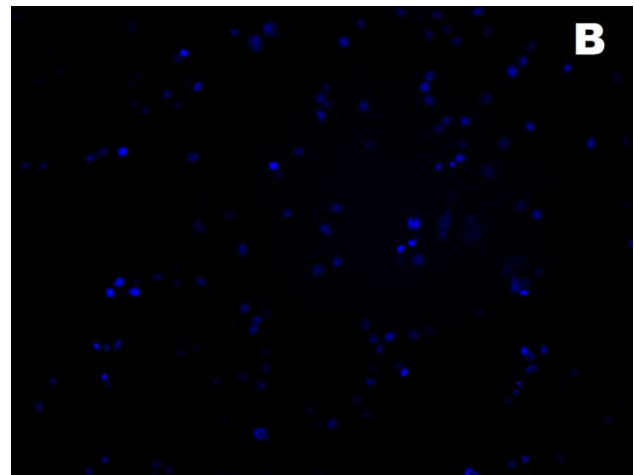
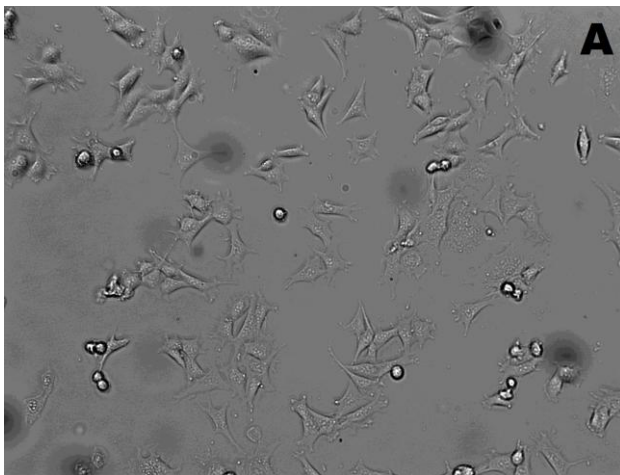
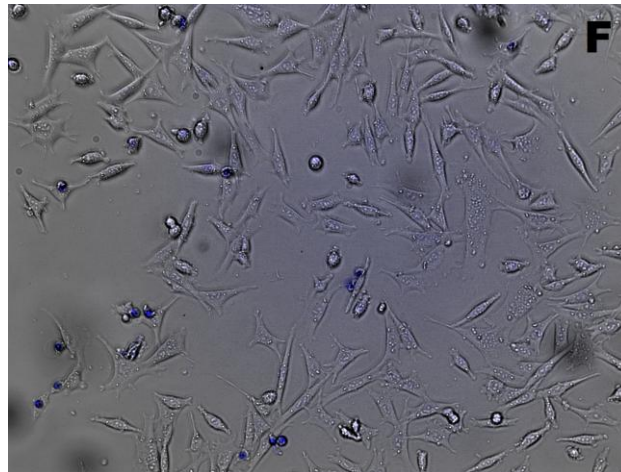
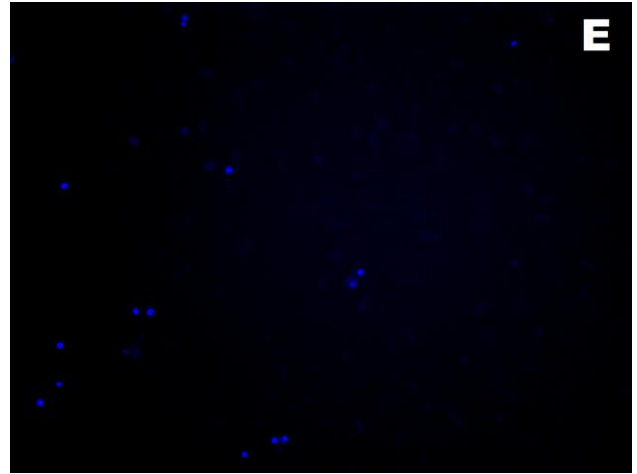
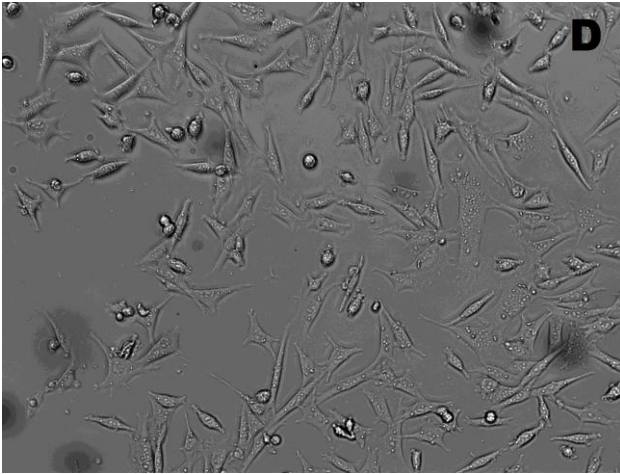
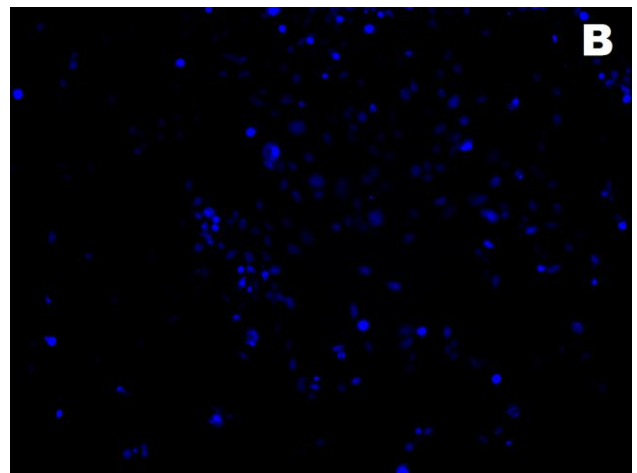
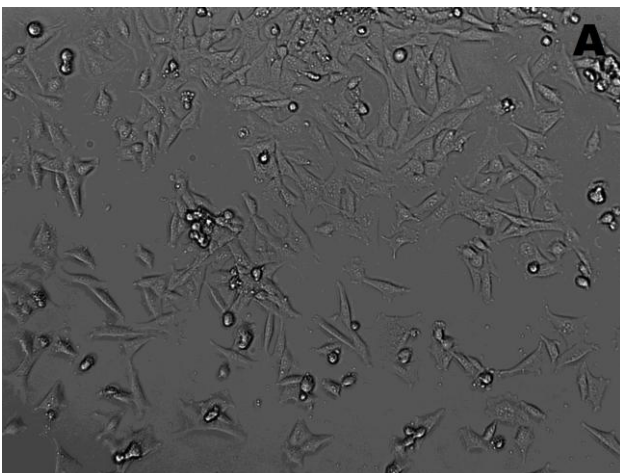


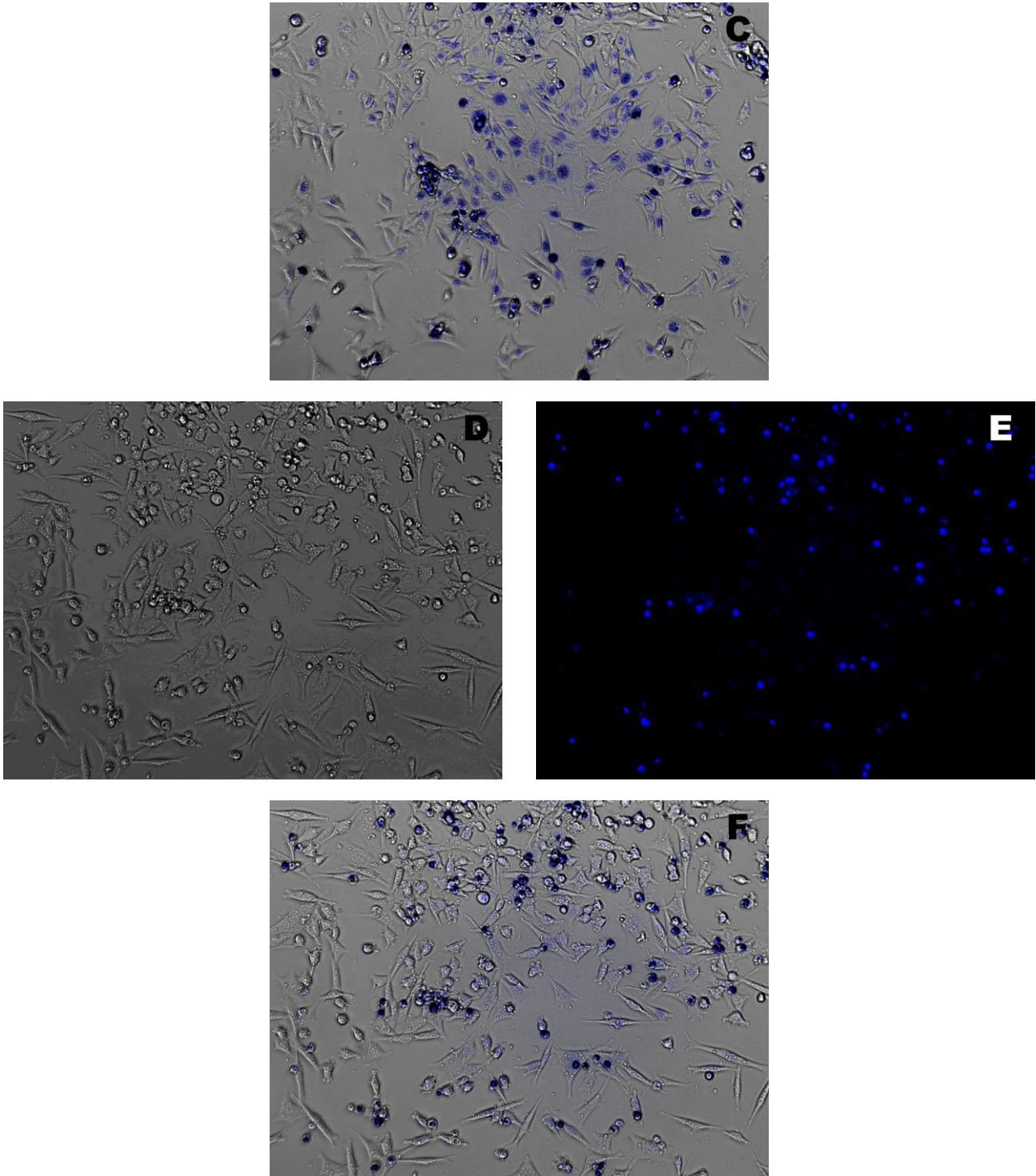
Fig. 26. Ensayo de toxicidad del compuesto 1, una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas del fluorocromo Hoechst 33342. Células mESC CGR8 tratadas con el compuesto 1. A, B, C, D, E, F igual que en Fig.25.





**Fig. 27. Ensayo de toxicidad del compuesto 1, una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas del fluorocromo Hoechst 33342. Células MEFs Control, es decir, teñidas sin tratar con el compuesto. A) Células MEFs a tiempo 0, en campo claro. B) Igual que A, pero con fluorescencia azul. C) Solapamiento de las imágenes A y B. D) Células MEFs tras 24 horas haciendo incidir fluorescencia azul sobre ellas, en campo claro. E) Igual que D, pero con fluorescencia azul. F) Solapamiento de las imágenes**



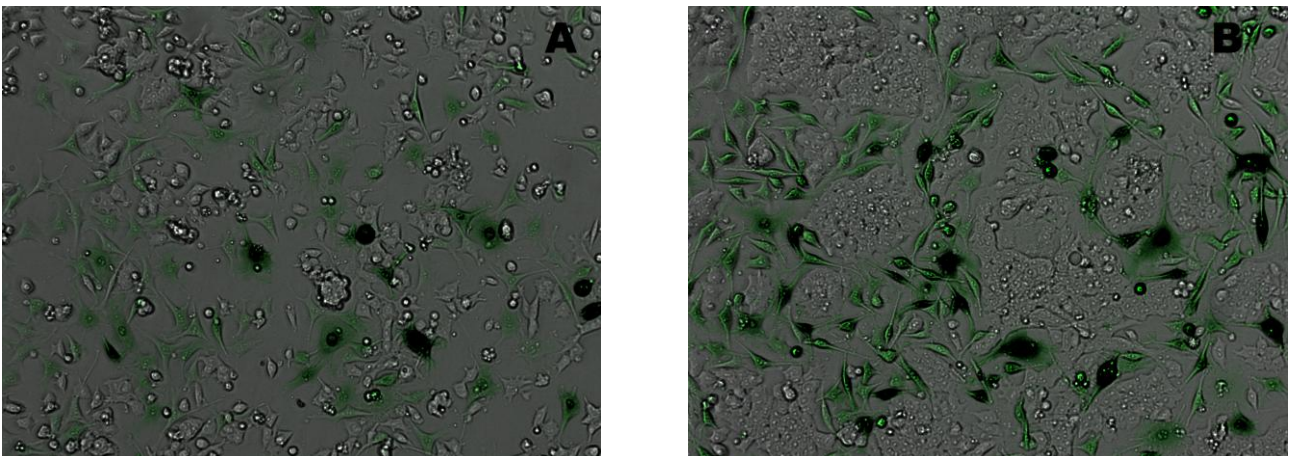


**Fig. 28. Ensayo de toxicidad del compuesto 1, una vez seleccionadas las concentraciones adecuadas del fluorocromo Hoechst 33342. Células MEFs tratadas con el compuesto 1. A, B, C, D, E, F igual que en Fig.27.**

## **Cocultivo celular**

Estudiamos las condiciones adecuadas para llevar a cabo el cocultivo de las células mESC CGR8 y C57. Se consideraron diferentes parámetros, como el uso de diferentes concentraciones, medios de cultivo y la presencia o no de una capa de gelatina recubriendo los pocillos.

Tras realizar los ensayos, se dedujo que las condiciones óptimas de cocultivo para estas líneas celulares fueron: utilizar una concentración  $2,5 \times 10^5$  células/ml para mESC CGR8 y una concentración  $5 \times 10^4$  células/ml para células C57, el medio de cultivo óptimo para ambos tipos celulares fue GMEM de propagación y los pocillos debían estar recubiertos con gelatina al 0,2% en PBS (Fig.29). Cuando nos referimos al tiempo de cultivo, el tiempo cero se refiere al momento en que comenzamos a tomar imágenes con el microscopio de fluorescencia.



**Fig. 29. Cocultivo de células CGR8 y C57 en las condiciones determinadas como óptimas, a tiempo 0 (A) y tras 24 horas de incubación (B). Las imágenes fueron adquiridas a 100 aumentos con óptica de Normarsky y mediante fluorescencia con el filtro adecuado para la GFP. Ambas imágenes fueron luego superpuestas en una única imagen.**

Los motivos por los cuales la concentración de las células mESC CGR8 es mayor que la de las células C57 son que los fibroblastos tienen un crecimiento más rápido y la necesidad de las mESC CGR8 de crecer en grupos. Cuando sembramos a concentraciones mayores de C57 que de CGR8, las células C57 desplazan a las CGR8 impidiendo el crecimiento de estas últimas. Con concentraciones idénticas para ambos tipos celulares, las C57 crecen sin problemas, mientras que para las CGR8 es una

concentración muy baja para que se produzca un crecimiento rápido de estas.

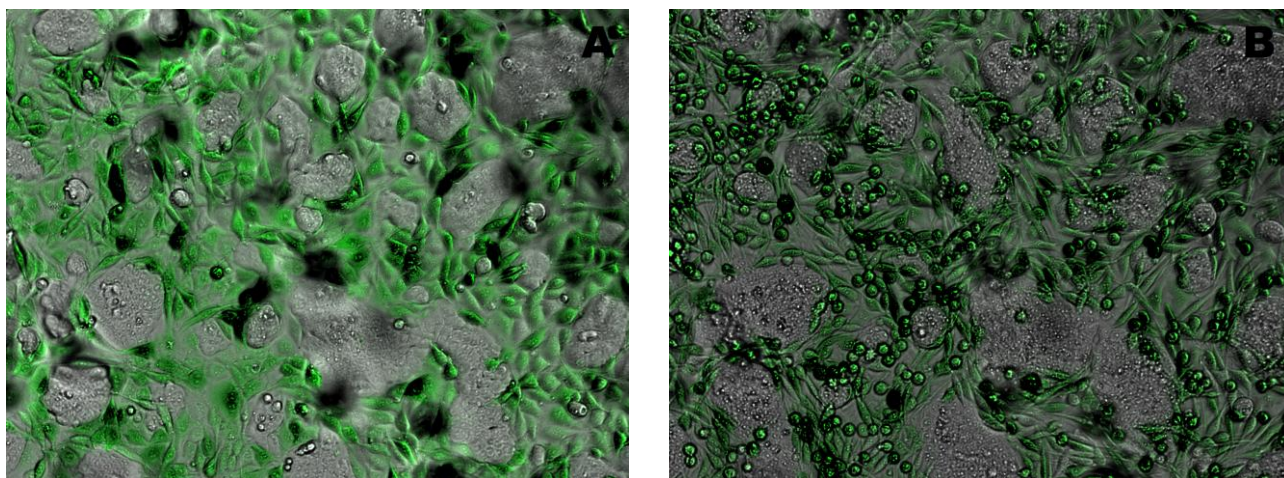
El medio de cultivo óptimo para el crecimiento de ambos tipos celulares fue GMEM de propagación, aunque no existieran muchas diferencias con los demás medios. Pasadas las 48 horas con medio GMEM de propagación y DMEM, el crecimiento de las células se para, y se redondean.

En ausencia de una capa gelatina recubriendo el fondo del pocillo las células mESC CGR8 no se llegan adherir, ya que la gelatina es necesaria para la adhesión adecuada de estas células.

### ***Ensayo de toxicidad del compuesto 1 en células mESC CGR8 y C57***

Las células C57, como se ha explicado, son fibroblastos de ratón al igual que las células MEFs, pero transfectadas de forma estable con un vector que codifica la proteína fluorescente verde (GFP), y por tanto mantienen la expresión generación tras generación. De esta forma son fácilmente distinguibles de otras células no fluorescentes en cocultivos.

Se decidió estudiar la toxicidad del compuesto 1 en células mESC CGR8 y C57, *in vivo*, pero en este caso en cocultivo.



**Fig. 30. Ensayo de toxicidad del compuesto 1 en cocultivo de células C57 y mESC CGR8. A) Células mESC CGR8 y C57 tratadas con el compuesto 1 a tiempo 0. B) Células C57 y mESC CGR8 tratadas con dicho compuesto a tiempo 24 horas. Las imágenes fueron adquiridas a 100 aumentos con óptica de Normarsky y mediante fluorescencia con el filtro adecuado para la GFP. Ambas imágenes fueron luego superpuestas en una única imagen.**

En este ensayo se puede observar el crecimiento de ambos tipos celulares sin

afectar el compuesto notablemente a las células indiferenciadas ni a las células diferenciadas. Las células mESC CGR8 crecen en cúmulos y las células C57 van ocupando los espacios libres (Fig. 30).

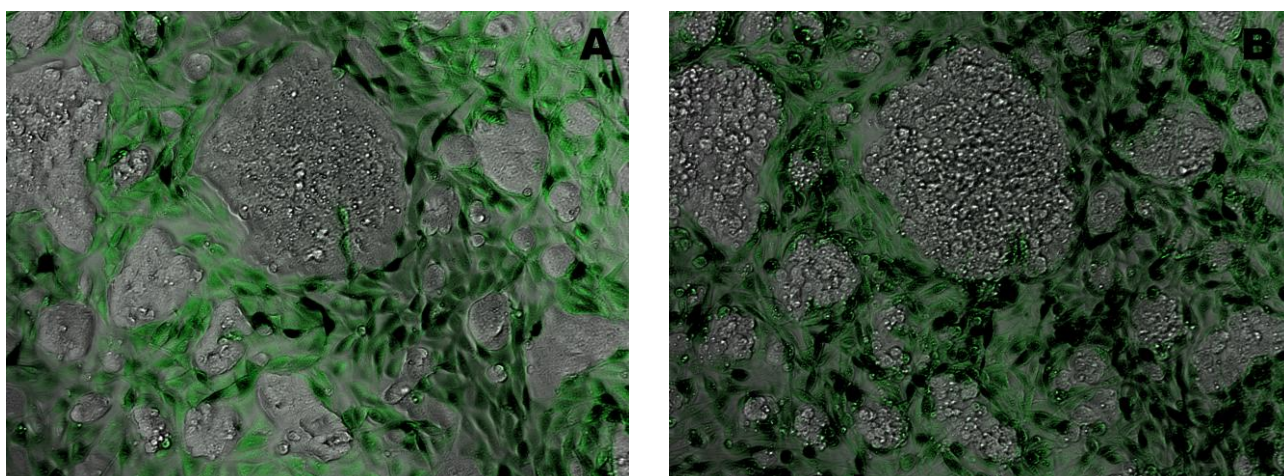
### ***Ensayo de toxicidad del cloruro de bencetonio en células mESC CGR8 y C57***

En este estudio partíamos de los datos proporcionados por la Dra. Celia Conesa acerca de este compuesto, el cloruro de bencetonio, el cual provocaba la muerte en células indiferenciadas, y no en células diferenciadas.

Nosotros quisimos comprobar el efecto de este compuesto, pero en este caso *in vivo*, utilizando la técnica de cocultivo puesta en marcha, puesto que uno de los objetivos de estos estudios era encontrar compuestos que permitiesen seleccionar tipos celulares determinados en cultivos mixtos.

Se realizó el ensayo de célula viva en cocultivo, utilizando células mESC CGR8, cómo células indiferenciadas y células C57, cómo células diferenciadas, siguiendo el protocolo descrito en *Metodología*.

Tras finalizar el ensayo observamos mediante el ensamblaje de las imágenes tomadas a distintos tiempos en videos como el cloruro de bencetonio provocaba la muerte a las células mESC CGR8 de forma progresiva durante un período de 24 horas, observándose cómo se redondean las células, y en cambio las células C57 seguían vivas, continuaban dividiéndose y desplazándose (Fig .31).



**Fig. 31. Estudio de la toxicidad del compuesto cloruro de bencetonio. A) Cocultivo de células C57 y mESC CGR8 tratadas con dicho compuesto a tiempo 0. B) Cocultivo de células C57 y mESC CGR8 tratadas con cloruro de bencetonio durante 24 horas. Las imágenes fueron adquiridas a 100 aumentos con óptica de Normarsky**

y mediante fluorescencia con el filtro adecuado para la GFP. Ambas imágenes fueron luego superpuestas en una única imagen

Como curiosidad, cabe mencionar que durante el transcurso de este experimento se observó la división de fibroblastos C57 en tres células.

## **CITOMETRÍA DE FLUJO:**

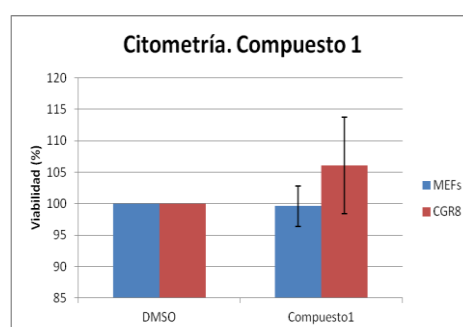
### **Viabilidad celular:**

Otra técnica que utilizamos para estudiar la viabilidad celular fue la citometría de flujo. En este caso, quisimos comprobar por un tercer método la viabilidad de las células diferenciadas y células no diferenciadas al ser tratadas con el compuesto 1 y con el cloruro de bencetonio.

La preparación de las células y el posterior ensayo de citometría se describe detalladamente en el apartado *Metodología*.

### Resultados obtenidos con el Compuesto 1

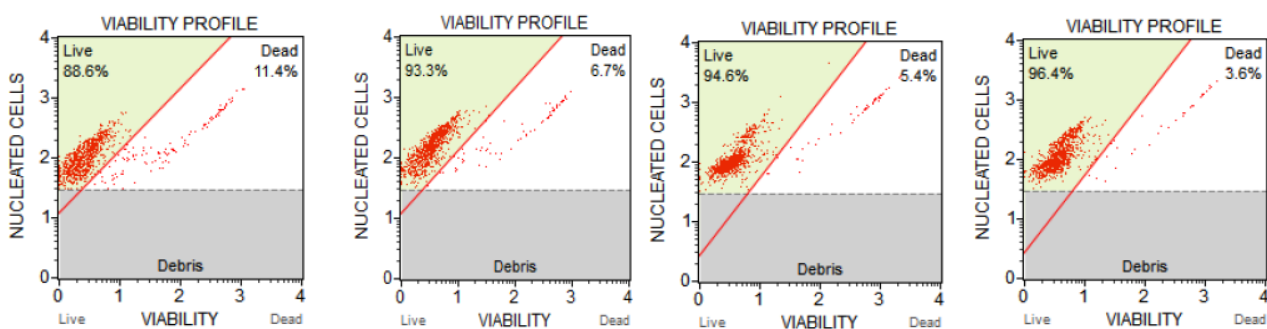
El resultado de este ensayo indicó que la viabilidad de las células tras 24 horas de incubación con dicho compuesto es de un 99,63 % para las células MEFs, y de un 105,96% para las células mESC CGR8 (datos normalizados frente al control, células tratadas con DMSO, a las cuáles se les dio un valor del 100%). La diferencia de viabilidad entre ambas líneas celulares es mínima, lo que no permite concluir que el compuesto 1 no influye significativamente en la viabilidad de ninguno de los tipos celulares estudiados, células MEFs como modelo de células diferenciadas, y mESC CGR8 como modelo de células indiferenciadas.



**Fig. 32.** Esta gráfica representa el porcentaje de viabilidad de las células MEFs y



mESC CGR8 al ser tratadas con el compuesto 1. Los datos se han normalizado respecto a los obtenidos con el control, es decir, células tratadas con DMSO, a las cuáles se les ha dado un valor del 100%. Los datos indican el resultado de dos experimentos independientes. La barras de error representan la desviación estándar



**Fig. 33.** Ejemplos de gráficas obtenidas con el Analizador de Células MUSE. De izquierda a derecha: células CGR8 tratadas con DMSO (control), CGR8 tratadas con el compuesto 1 con una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 24 horas de incubación, células MEFs tratadas con DMSO (control), MEFs tratadas con el compuesto 1 a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  y 24 horas de incubación.

El control en este caso se realizó tratando a las células con DMSO a la misma concentración que se encuentra en el compuesto, ya que como se explicó anteriormente este compuesto esta disuelto en DMSO. En la tabla N° 2 se recogen los datos de viabilidad obtenidos para ambos tipos celulares tratados con DMSO (control), y tratados con el compuesto 1. Podemos observar que el DMSO afecta disminuyendo la viabilidad de las células mESC CGR8, mientras que el compuesto 1 (contiene la misma concentración de DMSO) aumenta la viabilidad obtenida con DMSO, por lo que de estos datos podemos deducir que el compuesto 1 aumenta la viabilidad de las células mESC CGR8, aunque este aumento no sea muy significativo. En el caso de las células MEFs las diferencias obtenidas entre el control (DMSO) y el compuesto 1 son prácticamente nulas.

	<b>MEFs (% Viabilidad)</b>	<b>mESC CGR8 (% Viabilidad)</b>
<b>DMSO</b>	94,25±0,49	86,4±3,11
<b>Compuesto 1</b>	93,9±3,54	91,55±3,32

**Tabla N°2.** Datos de viabilidad obtenidos mediante citometría para células MEFs y

mESC CGR8 tratadas con el compuesto 1, usando como control células tratadas con DMSO. Datos no normalizados.

Resultados obtenidos con el cloruro de bencetonio

El resultado de este ensayo indicó que la viabilidad de las células tras 24 horas de incubación con dicho compuesto es de un 91,68 % para las células MEFs, y de un 66,24% para las células mESC CGR8. La diferencia de viabilidad encontrada entre ambos tipos celulares es bastante significativa, estos resultados indican que el cloruro de bencetonio provoca la muerte de las células mESC CGR8 en mayor parte, mientras que no afecta al crecimiento ni viabilidad de las células MEFs.

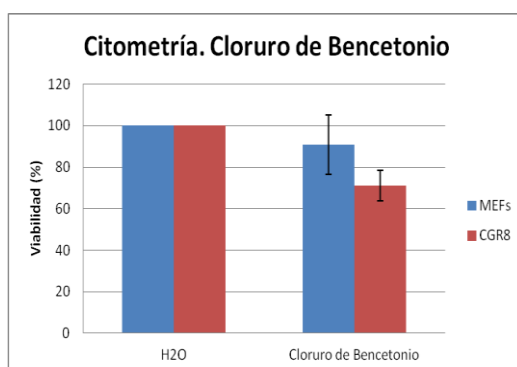


Fig. 34. Esta gráfica representa el porcentaje de viabilidad de las células MEFs y mESC CGR8 al ser tratadas con cloruro de bencetonio. Los datos se han normalizado respecto a los obtenidos con el control, es decir, células tratadas con H<sub>2</sub>O, a las cuáles se les ha dado un valor del 100%.

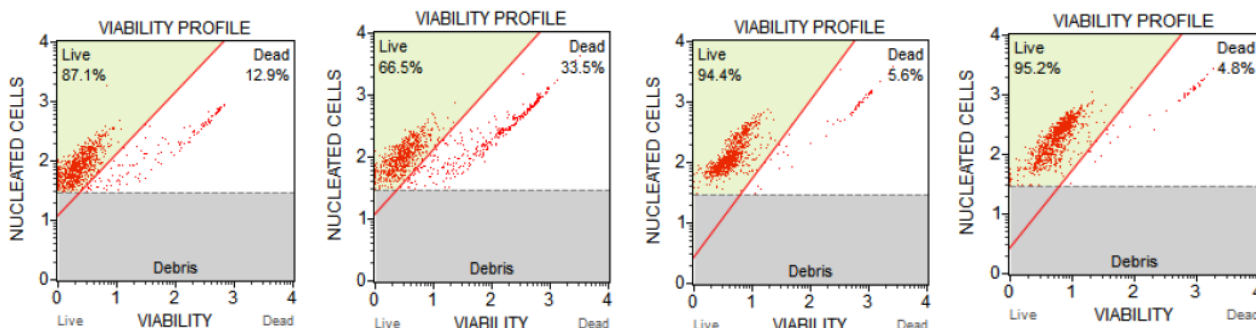


Fig. 35. Ejemplos de gráficas obtenidas con el Analizador de Células MUSE. De izquierda derecha: células CGR8 tratadas con H<sub>2</sub>O destilada (control), CGR8 tratadas con cloruro de bencetonio con una concentración de 15 µM y 24 horas de

**incubación, células MEFs tratadas con H<sub>2</sub>O destilada (control), MEFs tratadas con cloruro de bencetonio a una concentración de 15 µM y 24 horas de incubación.**

	<b>MEFs (% Viabilidad)</b>	<b>mESC CGR8 (% Viabilidad)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	95,4±1,41	80,65±9,12
<b>Cloruro de bencetonio</b>	86,55±12,23	57,7±12,44

**Tabla N°3. Datos de viabilidad obtenidos mediante citometría para células MEFs y mESC CGR8 tratadas con cloruro de bencetonio, usando como control células tratadas con H<sub>2</sub>O destilada. Datos sin normalizar.**

## **DISCUSIÓN**

La medicina regenerativa o terapia celular utilizando células madre es un campo de investigación de gran importancia en la actualidad ya que se espera que pueda aportar soluciones a diversas enfermedades neurodegenerativas (1), artritis (2), daños en médula espinal (3) o infarto de miocardio (4), entre otras patologías.

Para este tipo de terapias es importante poder seleccionar células madre a partir de un tejido mediante la eliminación selectiva de células diferenciadas.

En este proyecto se buscaron compuestos químicos que eliminaran selectivamente a células diferenciadas (se usaron fibroblastos embrionarios de ratón, MEFs como modelo), y aumentarían la viabilidad de las células madre (usando como modelo células madre embrionarias de ratón, línea CGR8). Se seleccionaron cuatro compuestos a partir de un cribado previo de una quimioteca de 1.120 compuestos. Los posteriores ensayos se realizaron finalmente sólo con el compuesto 1, ya que era el compuesto con el que en los primeros ensayos se obtuvieron resultados de viabilidad más diferentes entre ambos tipos celulares.

Tras numerosos ensayos de viabilidad realizados con los dos tipos celulares que produjeron resultados poco reproducibles, llegamos a la conclusión de que la variabilidad obtenida con estos ensayos era debido al deterioro del compuesto presente en la quimioteca.

Una vez realizados los ensayos con el compuesto 1 de nueva adquisición, se comprobó que la variabilidad disminuía considerablemente. También se comprobó que los

resultados obtenidos con los diferentes kits utilizados para estudiar la viabilidad celular, XTT, MTT y WST-1, producían resultados diferentes. Esto es probablemente debido a la distinta forma de reducirse estas sales de tetrazolio: el XTT principalmente fuera de la célula, el WST-1 fuera de la célula (necesitando ambos donadores de electrones), y el MTT dentro de la célula.

Los nuevos datos obtenidos no mostraban las diferencias observadas en el cribado secundario, ni en posteriores ensayos, pero no por ello se abandonó el estudio de los efectos que el compuesto 1 pudiera provocar en células diferenciadas e indiferenciadas.

Se realizaron ensayos de microscopia de fluorescencia *in vivo*, incubando con el compuesto químico células diferenciadas e indiferenciadas, tanto por separado como juntas, utilizando técnicas de cocultivo celular.

Otro de los ensayos que se realizaron para medir la viabilidad celular fue la citometría, utilizando el Contador de Células MUSE de Millipore.

Los resultados obtenidos mediante los ensayos de viabilidad celular utilizando kits comerciales nos indicaban que no existían diferencias de viabilidad entre los diferentes tipos celulares al ser tratadas con el compuesto 1.

Se utilizó microscopia de fluorescencia *in vivo*, para observar los efectos que pudiera tener el compuesto 1 sobre las células mESC CGR8 y MEFs tratándolas por separado.

Antes de realizar estos ensayos se estudió la toxicidad de los fluorocromos con los que íbamos a trabajar, Hoechst 33342 y Mitotracker Red CMCRos, ya que existe bibliografía previa que demuestra la toxicidad del fluorocromo Hoechst 33342 en algunos tipos celulares. El resultado de estos ensayos indicó que ninguno de los dos fluorocromos estudiados era tóxico para las células MEFs, sin embargo, el fluorocromo Hoechst 33342 sí que es tóxico para las células mESC CGR8. Se estudió el tipo de toxicidad que provocaba la muerte de dichas células, es decir, si era provocado por el propio compuesto (quimiotoxicidad) o por la luz de excitación o emisión (fototoxicidad). Estos estudios indicaron que era la luz de emisión del propio fluorocromo la que provocaba la muerte de estas células. Se realizaron ensayos para determinar la concentración y tiempo de incubación mínimos con el fluorocromo, ya que se esperaba que a concentraciones menores la toxicidad del fluorocromo sobre la célula fuese menor. En los ensayos de fototoxicidad en los cuales se utilizaron las nuevas condiciones de tinción la muerte de las células mESC CGR8 no era tan drástica como utilizando las condiciones anteriores, pero

se observa un menor crecimiento lo que indica que cualquier cantidad de Hoechst 33342 que permita observar los núcleos por fluorescencia es perjudicial para este tipo celular.

Debido a esto, con los ensayos de microscopia de fluorescencia *in vivo*, en el caso de las células mESC CGR8 no pudimos obtener conclusiones claras sobre la toxicidad del compuesto 1 debido a que el fluorocromo utilizado para ver modificaciones en el núcleo altera por sí mismo la viabilidad celular. En el caso de las células MEFs sí que podemos asegurar que el compuesto 1 no les afecta, ya que se observa un crecimiento y división normales.

Como método alternativo para estudiar la toxicidad selectiva de los compuestos seleccionados de la quimioteca se puso a punto de la técnica de cocultivo celular de mESC CGR8 y células C57. Las C57 son fibroblastos de ratón que expresan de forma estable la proteína fluorescente verde (GFP), y se transmite de generación en generación, lo que nos permite distinguir los dos tipos celulares claramente por fluorescencia, además de por su morfología, y no es necesario llevar a cabo ningún tipo de tinción que pueda afectar a las células. El resultado de estos nuevos ensayos fue que el compuesto 1 no afecta notablemente a ninguno de los tipos celulares estudiados. Ahora bien, el compuesto está disuelto en DMSO y el control negativo consiste en células tratadas con DMSO a la misma concentración que la incluida con el compuesto. Estas células tratadas solamente con DMSO presentaban una menor viabilidad que células no tratadas, y de hecho, al comparar su comportamiento frente a células tratadas con el compuesto 1, se pudo observar que éste compuesto mejoraba la viabilidad celular.

Los efectos del compuesto 1 sobre mESC CGR8 y MEFs también se estudiaron utilizando el Contador Celular MUSE (un minicitómetro de flujo) usando un kit para medir viabilidad celular. Los datos obtenidos en este estudio corroboraron datos obtenidos con los ensayos anteriores (últimos ensayos de viabilidad utilizando kits comerciales basados en sales de tetrazolio y microscopia de fluorescencia): el compuesto 1 no afecta a las células MEFs. En el caso de las mESC CGR8 se observó que el tratamiento con DMSO afectaba disminuyendo de forma muy débil (a un 86%) la viabilidad de estas células, mientras que con el compuesto 1, la viabilidad de estas se mantenía en este caso en torno al 100%, con lo que podemos concluir que el compuesto 1 mejora la viabilidad de estas células respecto al tratamiento únicamente con DMSO. Este efecto también lo observamos en microscopia de fluorescencia, pero con esta técnica el efecto parece ser más acusado que los datos que arroja el Contador de Células MUSE.

También se realizaron los ensayos de microscopía de fluorescencia y citometría para estudiar el efecto del cloruro de bencetonio, compuesto que se había demostrado que era más tóxico para células indiferenciadas que para células diferenciadas. En este caso no se habían utilizado ninguna de estas técnicas para comprobar su efecto por lo que decidimos realizarlas.

Mediante microscopía de fluorescencia *in vivo*, con técnicas de cocultivo celular se observó cómo dicho compuesto provocaba la muerte de las células mESC CGR8 drásticamente, mientras que no afectaba a las C57.

En el estudio de la viabilidad celular utilizando el Contador de Células MUSE, el efecto del compuesto sobre las células mESC CGR8 no es tan acusado como el observado en microscopía.

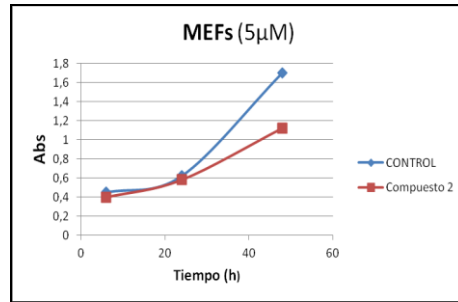
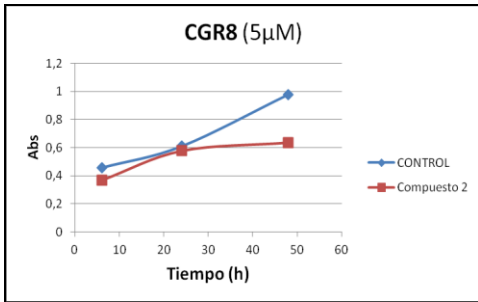
En resumen, se han utilizado diversas técnicas para estudiar los efectos diferenciales de compuestos bioactivos en la viabilidad de células madre y de células diferenciadas. Nuestros datos indican que el método de análisis debe seleccionarse cuidadosamente. Hemos demostrado también con experimentos concretos las ventajas de la microscopía en célula viva para este tipo de estudios, aportando más información en experimentos individuales que las otras técnicas. Nuestros resultados también han puesto de manifiesto las limitaciones relacionadas con la utilización de algunos fluorocromos de uso habitual en estos tipos de ensayos, debido a su toxicidad.

## **CONCLUSIONES**

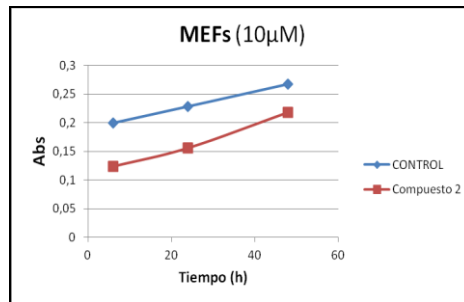
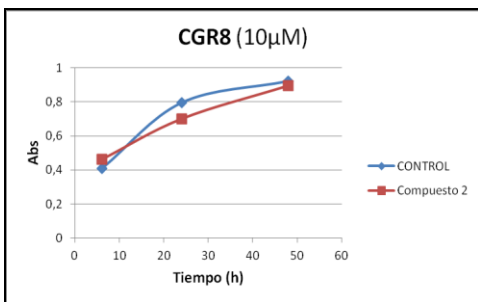
- La continua congelación y descongelación de los compuestos químicos en las quimiotecas puede alterar su actividad.
- La utilización de diversas sales de tetrazolio como medida de la viabilidad celular puede producir resultados distintos.
- Los fluorocromos utilizados habitualmente para marcar distintos compartimentos celulares en experimentos de microscopía convencional pueden no ser adecuados para experimentos de microscopía en célula viva. Por ejemplo, el Hoechst 33342 utilizado para teñir núcleos, produce fototoxicidad debido a la emisión de fluorescencia.
- Distintos tipos celulares presentan distinta sensibilidad al tratamiento con fluorocromos en experimentos de célula viva. En concreto las células madre embrionarias de ratón CGR8 son sensibles a la Hoechst 33342, mientras que los fibroblastos embrionarios son resistentes a los tiempos y concentraciones estudiados.
- La microscopía de célula viva ofrece claramente mayor información y más fiable que otros tipos de ensayos de viabilidad celular, permitiendo observar variaciones en la división celular, morfología, movilidad,... etc. que dan una visión más amplia de la viabilidad celular real.

# ANEXO

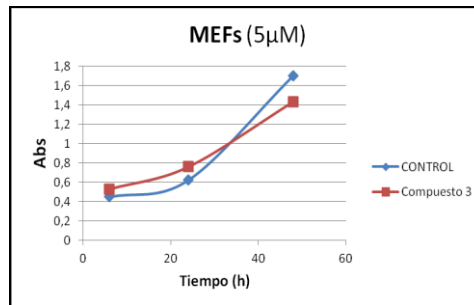
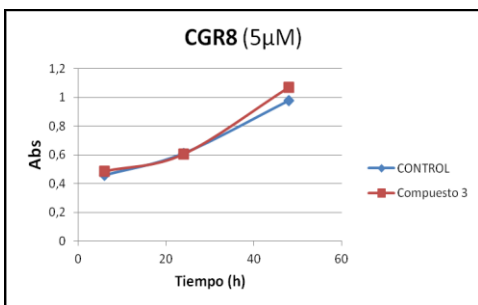
a)



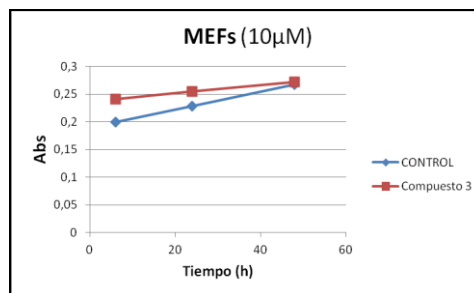
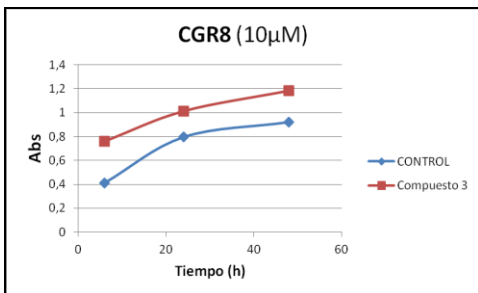
b)



c)

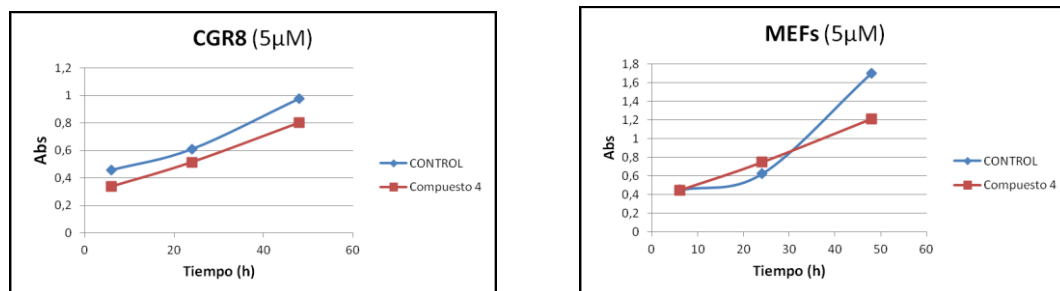


d)

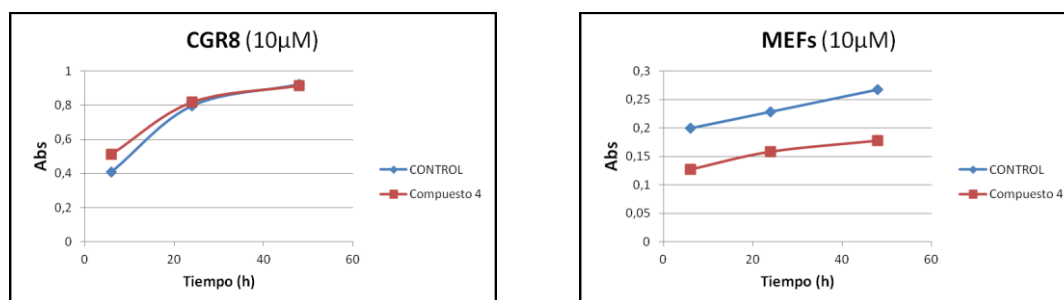




e)



f)



**Fig. 1. Time-Course del resto compuesto a diferentes concentraciones: 5 y 10  $\mu$ M, tomados a tiempos de 6, 24 y 48 horas. En estas gráficas se observan los efectos que produce dicho compuesto en células MEFs y mESC CGR8. Los datos no están normalizados respecto al control con DMSO, ya que así se aprecia mejor la tendencia. a) Time-course del compuesto 2 a 5  $\mu$ M, a la izquierda células CGR8, a la derecha células MEFs. b) Time-course del compuesto 2 a 10 $\mu$ M, a la izquierda, células CGR8, a la derecha células MEFs. c) Time-course del compuesto 3 a 5  $\mu$ M, a la izquierda células CGR8, a la derecha células MEFs. d) Time-course del compuesto 3 a 10  $\mu$ M, a la izquierda células CGR8, a la derecha células MEFs. e) Time-course del compuesto 4 a 5 $\mu$ M, a la izquierda, células CGR8, a la derecha células MEFs. f) Time-course del compuesto 4 a 10  $\mu$ M, a la izquierda células CGR8, a la derecha células MEFs**

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Lescaudron L, Boyer C, Bonnamain V, Fing KD, Lévêque X, Rossignol J, Nerrière-Daguin V, Malouet AC, Lelan F, Dey ND, Michel-Monigadon D, Lu M, Neveu I, von Hörsten S, Naveilhan P, Dunbar GL.(2012). **Assessing the potential clinical utility of transplantations of neural and mesenchymal stem cells for treating neurodegenerative diseases.** *Methods in Molecular Biology*, 879:147-64
2. Papadopoulou A, Yiangou M, Athanasiou E, Zogas N, Kaloyannidis P, Batsis I, Fassas A, Anagnostopoulos A, Yannaki E. (2012). **Mesenchymal stem cells are conditionally therapeutic in preclinical models of rheumatoid arthritis.** *Annals of the Rheumatic Disease*.
3. Ozdemir M, Attar A, Kuzu I, Ayten M, Ozgencil E, Bozkurt M, Dalva K, Uckan D, Kilic E, Sancak T, Kanpolat Y, Beksac M. (2012) **Stem Cell Therapy in Spinal Cord Injury: In Vivo and Postmortem Tracking of Bone Marrow Mononuclear or Mesenchymal Stem Cells.** *Stem Cell Review and Reports*.
4. Dauwe DF, Janssens SP. (2011). **Stem cell therapy for the treatment of myocardial infarction.** *Current Pharmaceutical Design* (30):3328-40.
5. Zhang, H. and Wang, Z. Z. (2008), **Mechanisms that mediate stem cell self-renewal and differentiation.** *Journal of Cellular Biochemistry*, 103: 709–718.
6. Drukker M, Tang C, Ardehali R, Rinkevich Y, Seita J, Lee AS, Mosley AR, Weissman IL, Soen Y. **Isolation of primitive endoderm, mesoderm, vascular endothelial and trophoblast progenitors from human pluripotent stem cells.**(2012) *Nature Biotechnology*.
7. Odessa Yabut and Harold S. Bernstein. **The promise of human embryonic stem cells in aging-associated diseases.**
8. Zhang L, Yuan T, Guo L, Zhang X. **An in vitro study of collagen hydrogel to induce the chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells.** (2012) *Journal of Biomedical Materials Research*.
9. Masuda S. (2012). **Risk of Teratoma Formation After Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cells.** *Chest* 141:4 1120-112.
10. Zhang J, Nuebel E, Wisidagama DR, Setoguchi K, Hong JS, Van Horn CM, Imam SS, Vergnes L, Malone CS, Koehler CM, Teitell MA. (2012) **Measuring energy metabolism in cultured cells, including human pluripotent stem cells and differentiated cells.** *Nature Protocols*.
11. Thomas Lonergan, Barry Bavister, Carol Brenner. (2007). **Mitochondria in stem cells.** *Mitochondrion*;

7(5): 289-296.

12. Fischer B, Bavister BD.(1993). **Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits.** Journal of Reproduction and Fertility 1993;99(2):673-9.

13. Brown GC. (1992). **Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells.** Biochemical Journal 15;284 (Pt 1):1-13.

14. The Cell: A Molecular Approach. Second Edition. Cooper GM. Sunderland (MA), 2000.

15. Chalah A, Khosravi-Far R. **The mitochondrial death pathway.**(2008). Advances in Experimental Medicine and Biology. 615:25-45.

16. Renehan AG, Bach SP, Potten Cs.(2001). **The relevance of apoptosis for cellular homeostasis and tumorigenesis in the intestine.** Canadian Journal of Gastroenterology. 15(3):166-76.

17. Chen M, Wang J.(2002). **Initiator caspases in apoptosis signaling pathways.** Apoptosis: 313-9.

18. Rong Y, Distelhorst CW (2008). **Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis.** Annual Review of Physiology.70,73-91.

19. Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH. (1992). **Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry.** Biochimica et Biophysica Acta 1133(3):275-85.

20. Martin Purschke, Noemi Rubio, Kathryn D. Helda and Robert W. Redmond. (2010) **Phototoxicity of Hoechst 33342 in time-lapse fluorescence microscopy.** Photochemical & Photobiological Sciences.

21 Davey HM, Kell DB. (1996) **Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses.** Microbiological Review. 60(4):641-96.

22. Paige L. Dobrovolny, Dan Bess. (2011). **Optimized PCR-based Detection of Mycoplasma.** Journal of Visualized Experiments.

23. Altman FP.(1976). **Tetrazolium salts and formazans.** Prog Histochem Cytochem 9(3):1-56.

24. Michael V. Berridge, Patries M. Herst, An S. Tan. (2005). **Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction.** Biotechnology Annual Review, Volume 11,

