



Departamento de Bioquímica

Facultad de Medicina

Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio de los mecanismos de inducción de  
pluripotencialidad usando un modelo experimental de  
células germinales primordiales de ratón**

Yago Alcaina de la Iglesia

Licenciado en Biología

Directora

Dra. María Paz de Miguel González

Tutor

Dr. Miguel Ángel Fernández Moreno

Hospital Universitario La Paz, IdiPaz

Madrid, 2013



# **AGRADECIMIENTOS**





En primer lugar quiero agradecerle a la Dra. María de Miguel por la dirección de esta tesis y su inmenso trabajo y dedicación durante todos estos años en los que hemos trabajado juntos. No sólo me ha dado la oportunidad de realizar este trabajo de investigación sino que ha realizado un gran esfuerzo en mi formación. Ha sido un placer tenerle como jefa y espero que sigamos en contacto como colegas y amigos.

A todos los compañeros que han pasado por el laboratorio durante estos años: Pili, Alejandro, Almudena, Fátima, Sherezade, Nacho, Massimo y Diego. Todos ellos han contribuido en diferentes formas a la consecución de este trabajo y han convertido el “LIC” en algo más que un gran lugar de trabajo. Voy a echar mucho de menos trabajar con vosotros.

Entre mis compañeros resulta imprescindible destacar a la futura Dra. Pilar López Iglesias, responsable directa de gran parte del trabajo aquí mostrado. Han sido muchos años de esfuerzos y sacrificios conjuntos y gracias a su incalculable ayuda han sido mucho más sencillos de superar. Esta tesis es tan tuya como mía.

A los doctores Edurne Berra, Manuel Nistal y Hans Schöler por su aportación a este trabajo y su muy apreciada colaboración con nuestro laboratorio que seguro que continúa en el futuro.

A toda la Unidad de Radiofísica del Hospital La Paz por su ayuda desinteresada, en especial a Jesús Vidal por facilitarme tanto el trabajo durante tanto tiempo.

A la Unidad de Investigación del Hospital La Paz, llena de grandes investigadores y grandes personas que siempre se han mostrado dispuestos a ayudar cuando ha sido necesario. Mención especial a los trabajadores, usuarios y habitantes del animalario dirigido por Carlota Largo. He disfrutado mucho estos años con mis ratoncitos.

A mis padres y hermana, por haber respetado y apoyado siempre el camino que he escogido, ayudarme en todo lo que han podido y esforzarse en aprender palabras tan alejadas de su área de conocimiento como “pluripotencia” e “hipoxia”.

Por último agradecer el apoyo económico del Ministerio de Ciencia e Innovación (Saf2010-19230) y la Fundación Mutua Madrileña.

# **RESUMEN**



El estudio de las células madre ha experimentado un gran auge durante los últimos años debido a su gran potencial terapéutico. El descubrimiento de la posibilidad de derivar Células Madre Pluripotentes inducidas (iPSC) de células somáticas adultas ha abierto nuevas perspectivas en esta línea de investigación, aunque siguen existiendo obstáculos a su aplicación clínica, como el riesgo de formación de tumores o la baja eficiencia de derivación de estas células.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares involucrados en este proceso de reprogramación celular, se ha utilizado un modelo de adquisición de pluripotencialidad en Células Germinales Primordiales (PGC) de ratón de 8.5 días post coitum. Estas células tienen la capacidad de dar lugar, bajo determinadas condiciones de cultivo, a células madre pluripotentes llamadas Células Germinales Embrionarias (EGC). Mediante tratamientos con modificadores epigenéticos, alteraciones del metabolismo de la glucosa y cultivo en condiciones hipóxicas se intentó lograr esta reprogramación. Se demostró que el cultivo de las PGC con una concentración de oxígeno del 3% durante un periodo de 7 días permitía la derivación de células pluripotentes. La potencialidad de estas células se comprobó mediante la formación de cuerpos embrioides y su capacidad de diferenciación hacia células de las tres hojas embrionarias. El mecanismo molecular por el cual la hipoxia provoca este efecto implica al Factor Inducido por Hipoxia 1 (HIF-1) y su regulación de Oct4, uno de los factores de transcripción centrales en células madre. Sorprendentemente estas células carecen de la capacidad de autorrenovación ilimitada relacionada habitualmente con las células madre, por lo que no pudieron ser cultivadas a largo plazo. Esto puede deberse a la no expresión de factores de transcripción típicos de células madre como Klf4 y c-Myc, y a la diferenciación espontánea de estas células asociada a la represión del receptor de LIF. Por lo tanto las células obtenidas se encuentran en un estado intermedio en la adquisición de características de célula madre, mostrando así una separación entre la potencialidad celular y la autorrenovación.

Los resultados de nuestro estudio demuestran la capacidad de la hipoxia como inductor de pluripotencialidad, así como la posibilidad de obtener células pluripotentes con una limitada capacidad de autorrenovación. Estos datos pueden tener aplicaciones tanto en la derivación de iPSC como en la comprensión de los procesos de malignificación en células tumorales.



# **SUMMARY**





The study of stem cells has experienced a substantial growth over the last few years given its large therapeutic potential. The possibility of obtaining induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) from adult somatic cells has opened up new perspectives in this line of research, although there are still difficulties concerning their clinical application, such as the risk of tumor formation or the low efficiency of derivation of these cells.

In order to gain further knowledge of the cellular mechanisms involved in this process of cellular reprogramming, a model of pluripotency acquisition has been established using mouse Primordial Germ Cells (PGC) at 8.5 days post coitum. These cells have the ability to give rise, under certain culture conditions, to pluripotent stem cells called Embryonic Germ Cells (EGC). This reprogramming has been pursued by means of treatments with epigenetic modifiers, manipulations of the glucose metabolism, and culturing in hypoxic conditions. It was demonstrated that the PGC culture in a oxygen concentration of 3% for a 7-day period allowed the derivation of pluripotent cells. The pluripotency of these cells was demonstrated by the formation of embryoid bodies and their ability to differentiate into cells of the three embryonic germ layers. The molecular mechanism by which the hypoxia causes this effect involves the Hypoxia Inducible Factor 1 (HIF-1) and its regulation of Oct4, one of the essential transcription factors in stem cells. Surprisingly, these cells lack the unlimited self-renewal ability usually associated with stem cells. This can be due to the lack of expression of typical transcription factors in stem cells such as Klf4 and c-Myc, and to the spontaneous differentiation of these cells associated to the repression of the LIF receptor. Therefore, the cells obtained are in an intermediate stage with regards to the acquisition of stem cell characteristics, showing dissociation between cellular pluripotency and self-renewal.

Our research findings come to demonstrate the ability of hypoxia to induce pluripotency, as well as the possibility of obtaining pluripotent cells with a limited self-renewal ability. These results can have implications for the derivation of iPSC, as well as for understanding the process by which tumor cells become malignant.



*La ignorancia afirma o niega rotundamente; la ciencia duda.*

**Voltaire**



# ÍNDICE



---

<b>ÍNDICE</b> .....	1
<b>GLOSARIO</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1- CÉLULAS MADRE .....	15
2- CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES.....	15
2.1- Células Madre Embrionarias.....	17
2.2- Células Madre del Epiblasto .....	18
3- REPROGRAMACIÓN CELULAR.....	19
3.1- Células Madre Pluripotentes inducidas.....	19
5- CÉLULAS GERMINALES EMBRIONARIAS .....	24
6- EGC COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA PLURIPOTENCIALIDAD .....	25
7- ESTADO EPIGENÉTICO .....	26
8- HIPOXIA .....	28
8.1- Metabolismo de la glucosa.....	29
8.2- HIF .....	31
<b>OBJETIVOS</b> .....	33
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	37
1- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN .....	39
2- GENOTIPADO RATONES OCT4-GFP.....	40
2.1- Aislamiento de DNA de colas de ratón .....	40
2.2- PCR Oct4-GFP.....	41
3- AISLAMIENTO DE PGC.....	42
4- CULTIVO CELULAR .....	43
4.1- Células nutricias .....	43
4.2- Cultivo de PGC .....	44
4.3- INDUCCIÓN DE PLURIPOTENCIALIDAD .....	45
4.4- Cultivo de células control .....	48
5- FIJACIÓN, HISTOQUÍMICA FOSFATASA ALCALINA Y RECuento CELULAR .....	49
6- ESTUDIO ESTADÍSTICO .....	50
7- Diferenciación por medio de Formación de Cuerpos Embrioides (EBs) .....	50

---

8- INMUNOFLUORESCENCIA.....	51
8.1- ICC marcadores PGC/EGC.....	51
8.2- ICC marcadores hojas embrionarias .....	53
8.3- Inmunofluorescencia sobre criocortes. ....	54
9- OBTENCIÓN DE IMÁGENES.....	55
10- CITOMETRÍA DE FLUJO .....	55
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
1- La modificación del estado epigenético no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC.....	59
2- La concentración de glucosa en el medio no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC. ....	62
3- La hipoxia provoca la formación de colonias en las PGC. ....	63
4- Es necesario mantener las condiciones hipóxicas para inducir pluripotencialidad en las PGC.....	65
5- La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia es de aproximadamente un 7%. ....	66
6- Las células obtenidas de PGC reprogramadas en hipoxia comparten características con las células madre pluripotentes.....	67
6.1- Las colonias producidas por la hipoxia son Oct4 positivas. ....	67
6.2- La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC. ....	67
6.3- Las células obtenidas de PGC en hipoxia son pluripotentes.....	68
6.4- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia no proliferan a largo plazo. ....	71
6.5- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia expresan el marcador de línea germinal c-Kit.....	72
6.6- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia no expresan Klf4 y c-Myc. ....	72
6.7- La expresión del receptor de LIF (LIFR) se inhibe en PGC en hipoxia. ....	75
7- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIFs. ....	76
7.1- El tratamiento con inhibidores farmacológicos de la función mitocondrial no provocó la inducción de pluripotencialidad en PGC.....	76
7.2- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIF-1	77



---

<b>DISCUSIÓN</b> .....	79
1- La modificación del estado epigenético no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC.....	81
2- La hipoxia provoca la inducción de pluripotencialidad en las PGC. ....	83
3- Es necesario mantener las condiciones hipóxicas para inducir pluripotencialidad en las PGC.....	85
4- La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia es de aproximadamente un 7%. ....	86
5- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia en PGC representan un estado intermedio entre PGC y EGC. ....	87
6- El cambio metabólico de fosforilación oxidativa a glucólisis provocado por la hipoxia no es responsable directo de la inducción de pluripotencialidad en PGC.....	92
7- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIF-1.....	95
8- La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC. ....	96
9- Relevancia del estudio.....	97
<b>CONCLUSIONES</b> .....	101
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	105



# **GLOSARIO**



**2i:** 2 inhibidores (inhibidores de GSK3 y MEK)

**ac:** acetilación

**AGM:** región Aorta-Gónada-Mesonefros

**ARNT:** Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator

**ATCC:** American Type Culture Collection

**AzaC:** 5-Aza-2-Desoxicitidina

**bFGF:** Factor de Crecimiento Fibroblástico básico, FGF2

**BGN:** Biglycan

**BMP:** Bone Morphogenetic Protein

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**CB:** Buffer de Citoesqueleto

**CCCP:** Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona

**CD9:** Cluster of Differentiation 9

**CDK:** Cyclin Dependent Kinase

**COS-7:** CV-1 en Origen que contiene SV40

**CpG:** Citosina-fosfato-Guanina

**DAPI:** 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato

**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DNMT:** DNA Methyltransferase

**d.p.c:** días después del coito

**EB:** Cuerpo Embrioide

**ECC:** Carcinoma Embrionario

**EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético

**EGC:** Célula Germinal Embrionaria

**EHD2:** EH-Domain containing 2 protein

**ENO1:** Enolasa 1

**EpiSC:** Célula Madre del Epiblasto

**ESC:** Célula Madre Embrionaria

**hESC:** ESC humanas

**mESC:** ESC de ratón

**ETM:** Epitelial to Mesenchymal Transition

**F6P:** D-Fructosa-6-Fosfato

**FACS:** Fluorescence-Activated Cell Sorting (Citometría de Flujo Fluorescente)

**FBS:** Suero Bovino Fetal

**FKBP6:** FK506 Binding Protein 6

**FN1:** Fibronectin 1

**GAPDH:** Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase

**GCNA:** Germ Cell Nuclear Antigen

**GCTM:** Germ Cell Tumor of the Mediastinum

**GFP:** Proteína Fluorescente Verde

**GLUT:** Transportador de Glucosa

**GMEM:** Glasgow Minimum Essential Medium

**GSK3:** Glycogen Synthase Kinase 3

**HDAC:** Desacetilasas de Histonas

**HIF:** Factor Inducido por Hipoxia

**HLA1:** Human Leukocyte Antigen

**HRE:** Elemento de Respuesta a Hipoxia

**rHRE:** Elementos de Respuesta a Hipoxia inversos

**HSC:** Célula Madre Hematopoyética

**HSPD1:** Heat Shock Protein D1

**ICC:** Immunocitoquímica

**ICM:** Masa Celular Interna

**IFITM3:** Interferon-induced Transmembrane Protein 3

**IGFBP5:** Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5

**ITGA8:** Integrin Alpha 8

**K:** lisina

**KL:** Ligando de Kit = SCF

**KRAS:** Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog

**IPO7:** Importin 7

**iPSC:** Célula Madre Pluripotente inducida

**LDHA:** Lactato Deshidrogenasa A

**LIF:** Factor Inhibidor de la Leucemia

**LIFR:** Receptor de LIF

**MAPK:** Mitogen-Activated Protein Kinases

**me:** metilación

**MED7:** Mediator complex subunit 7

**MEF:** Fibroblasto Embrionario de Ratón

**MEK:** Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase)

**MET:** Mesenchymal to Epitelial Transition

**Mvh:** homólogo de Vasa en ratón

**NPC:** Célula Precursora Neuronal

**NSC:** Célula Madre Neural

**OCT:** Optimal Cutting Temperature

**OF:** Oncogenic Foci

**PBS:** Solución tampón Fosfato Salino

**PFK:** Fosfofructoquinasa

**PGC:** Célula Germinal Primordial

**PGK1:** Fosfoglicerato Quinasa 1

**PHD:** Prolyl Hydroxylase

**PTEN:** Phosphatase and Tensin homolog

**RBM26:** RNA Binding Motif protein 26

**ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno

**SCF:** Stem Cell Factor = KL

**SNRPN:** Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N

**SRY:** Sex determining Region Y

**SSEA:** Stage Specific Embryonic Antigens

**STAT3:** Signal Transducer and Activator of Transcription

**STO:** Sandoz Thioguanine- and Ouabain-resistant

**TBS:** Tris-Buffered Saline

**TERT:** Transcriptasa Inversa de la Telomerasa

**TGF- $\beta$ :** Transforming Growth Factor  $\beta$

**Thy1:** Thymus cell antigen

**TNAP:** Fosfatasa Alcalina No específica de Tejido

**TSA:** Tricostatina A

**TTF:** Tail Tip Fibroblast

**VPA:** Ácido Valproico



# **INTRODUCCIÓN**



## 1- CÉLULAS MADRE

Las células madre son aquellas células con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia uno o varios tipos celulares (Weissman, 2000). Se han descrito gran cantidad de tipos de células madre en función de su origen y características. En relación a su potencial de diferenciación se pueden clasificar en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes:

- Totipotentes: Son aquéllas que pueden dar lugar a un organismo completo, incluyendo las estructuras extraembrionarias necesarias para su desarrollo. Tan sólo el cigoto y los blastómeros tempranos (aproximadamente hasta el estado de 4 células) se consideran totipotentes (Mitalipov, 2009).
- Pluripotentes: Pueden diferenciarse en cualquier tipo celular del organismo, pero no dar lugar a las estructuras extraembrionarias. Entre ellas se encuentran las Células Madre Embrionarias (ESC) y las Células Germinales Embrionarias (EGC).
- Multipotentes: Su potencial de diferenciación está más restringido, pudiendo dar lugar a varios tipos celulares. Se localizan tanto durante el desarrollo embrionario como en tejidos adultos, conociéndose estas últimas como “células madre adultas”. Se han descrito en la mayoría de los tejidos, como las Células Madre Hematopoyéticas (HSC) (Spangrude et al., 1988) o las Células Madre Neurales (NSC) (McKay, 1997).
- Unipotentes: Sólo pueden dar lugar a un tipo celular, como las Células Germinales Primordiales (PGC) de las que trataremos en esta tesis, que dan lugar a los gametos (Donovan et al., 1998). Habitualmente reciben el nombre de progenitores cuando se encuentran en tejidos adultos, como el progenitor de células T, proveniente de las HSC; o progenitor de oligodendrocitos, provenientes de NSC (Seaberg y van der Kooy, 2003).

## 2- CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES

Durante el desarrollo embrionario, las células madre pluripotentes corresponden a las células de la Masa Celular Interna (ICM) del blastocisto y posteriormente del epiblasto. *In vivo*, estas células mantienen su pluripotencialidad sólo durante los primeros estadios

del desarrollo, antes de diferenciarse a otros tipos celulares de potencialidad más reducida. Sin embargo, cuando estas células son cultivadas bajo determinadas condiciones *in vitro*, son capaces de crecer indefinidamente en cultivo (capacidad de autorrenovación ilimitada) manteniendo este estado pluripotente. Estas células crecen en forma de colonias y pueden diferenciarse hacia tipos celulares de las tres hojas embrionarias: Ectodermo, Mesodermo y Endodermo. Este proceso puede ser inducido, dirigiéndose la diferenciación hacia el tipo celular deseado mediante diferentes condiciones de cultivo. También pueden dar lugar, tanto *in vitro* como *in vivo*, a estructuras diferenciadas como Cuerpos Embrioides (EB) y teratomas respectivamente, estructuras macroscópicas que contienen células pertenecientes a las 3 hojas embrionarias. Con el fin de comprobar de forma aún más estricta la capacidad de estas células para dar lugar a todos los tipos celulares y contribuir a la formación de un organismo completo *in vivo*, se recurre a la formación de quimeras mediante la agregación de células a blastocistos comúnmente de ratón (Beddington y Robertson, 1989).

Además de la capacidad de autorrenovación y la pluripotencialidad, las células madre pluripotentes comparten una serie de características entre sí que ayudan a su identificación y estudio:

- Expresión de antígenos de membrana como los de la familia SSEA (Stage Specific Embryonic Antigens), los de la familia de keratán sulfato (Tra-1-60, Tra-1-81), GCTM2 (Germ Cell Tumor of the Mediastinum), GCT343, CD9 (Cluster of Differentiation), Thy1 (Thymus cell antigen) y HLA1 (Human Leukocyte Antigen 1) (International Stem Cell Initiative, 2007).
- Expresión de factores de transcripción relacionados con el estado de célula madre, como Oct4, Sox2 y Nanog. Éstos regulan gran cantidad de genes entre los que se encuentran factores de transcripción involucrados en el desarrollo embrionario, como Klf4 (Jiang et al., 2008), c-Myc, Stat3 (Kidder et al., 2008) o Rest (Singh et al., 2008). Todos estos genes forman una red transcripcional fuertemente autorregulada en la que también se encuentran microRNAs, como mir-137 y mir-301 (Boyer et al., 2005) y modificaciones epigenéticas que conforman un estado general de la cromatina más abierto (Meissner, 2010).

- Actividad Fosfatasa Alcalina No específica de Tejido (TNAP), excepto en EpiSC (Brons et al., 2007).
- Actividad telomerasa. Esta actividad enzimática consiste en la adición de repeticiones TTAGGG en el extremo de los telómeros. Esto resulta esencial para el mantenimiento de la capacidad de autorrenovación, ya que el acortamiento de los telómeros durante las divisiones celulares provoca inestabilidad cromosómica y la pérdida de la capacidad de división (Counter, 1996).

Existen diferentes tipos de células madre pluripotentes que se diferencian principalmente en su origen. Se pueden distinguir aquellas derivadas de células madre pluripotentes *in vivo*, como las Células Madre Embrionarias (ESC) derivadas de la ICM o las Células Madre del Epiblasto (EpiSC) derivadas del epiblasto. Otras derivan de células diferenciadas, por lo que para la obtención de células pluripotentes en cultivo es necesaria su reprogramación celular. Entre ellas se encuentran las Células Madre Pluripotentes inducidas (iPSC) y las Células Germinales Embrionarias (EGC) derivadas de las Células Germinales Primordiales (PGC), las cuales serán el objeto de estudio de este trabajo.

## **2.1- Células Madre Embrionarias**

Las células madre embrionarias fueron las primeras células pluripotentes no malignas mantenidas en cultivo. Se derivaron por primera vez de la masa celular interna de blastocisto de ratón (Evans y Kaufman, 1981), y desde entonces se han obtenido de multitud de especies diferentes, entre ellas de humano (Thomson et al., 1998). A pesar de tener un mismo origen, se han observado importantes diferencias entre las ESC de las diferentes especies, en concreto entre ratón y humano, las más estudiadas.

Las ESC de ratón y humano difieren en varios aspectos tales como la morfología de las colonias, siendo éstas planas y extendidas en Células Madre Embrionarias humanas (hESC) y pequeñas, compactas y abultadas en Células Madre Embrionarias de ratón (mESC). Tampoco se comportan igual en cultivo, presentando las hESC una muy baja eficiencia en el pase, sufriendo muerte celular cuando se utilizan técnicas de disociación de

una sola célula, mientras que las mESC muestran una gran eficiencia y resistencia a estas técnicas. Las ESC de ratón dependen del Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF) y BMP (Bone Morphogenetic Protein) para su mantenimiento en cultivo, mientras que las ESC humanas dependen de Activina/Nodal y del Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) (Vallier et al., 2009). En las mESC la señalización por LIF actúa activando STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) y la ruta de las MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), ambas relacionadas con proliferación celular (Rossant, 2001), mientras que Activina/Nodal lo hace a través de la activación de Smad 2/3, la cual interacciona directamente con Nanog (Vallier et al., 2009). Esta diferencia en los factores necesarios para su crecimiento *in vitro* así como las rutas de señalización que activan, ponen de manifiesto profundas diferencias entre estas células, sugiriendo la hipótesis de que se encuentren en estados diferentes de desarrollo debido a su derivación de ICM en esos mismos estados.

## 2.2- Células Madre del Epiblasto

El epiblasto embrionario es una capa celular que se forma en la blástula antes de la gastrulación, cuando la ICM se diferencia en 2 tipos celulares: el epiblasto y el hipoblasto. Las células del epiblasto siguen siendo pluripotentes, ya que dan lugar a todas las células del organismo, mientras que el hipoblasto sólo formará estructuras extraembrionarias. Las Células Madre del Epiblasto (EpiSC) se derivaron recientemente por primera vez de embriones de ratón de 5.5-6.5 d.p.c. (días después del coito) (Tesar et al., 2007). Las principales diferencias con respecto a las ESC tanto de ratón como humanas son la presencia de un cromosoma X inactivo en las células femeninas y la expresión de Oct4 dependiente del *enhancer* proximal en lugar del *enhancer* distal (Tesar et al., 2007).

Sorprendentemente, las EpiSC de ratón son más parecidas a las ESC humanas que a las de ratón, compartiendo con las primeras los factores necesarios para su mantenimiento en cultivo, así como las características fenotípicas (Brons et al., 2007). Los patrones de expresión génica, la regulación epigenética (Rugg-Gunn et al., 2007) o la biología de la telomerasa son también más parecidos entre EpiSC y ESC humanas que con ESC de ratón (Forsyth et al., 2002, Tesar et al., 2007). Además, al contrario que las ESC de ratón, tienen

una capacidad muy limitada de contribuir a quimeras (Tesar et al., 2007) y, al contrario de las demás células madre pluripotentes y de las células del epiblasto de las que proceden, no presentan actividad fosfatasa alcalina (Brons et al., 2007).

### **3- REPROGRAMACIÓN CELULAR**

Bajo diferentes condiciones, diversos tipos de células diferenciadas pueden revertir su estado a uno menos diferenciado mediante reprogramación celular. Entre los diferentes métodos para conseguir esta “desdiferenciación” se encuentra la transferencia nuclear de células somáticas (Wilmot et al., 2002; Kishigami et al., 2006); la fusión celular con células pluripotentes (Ying et al., 2002); la incubación con fragmentos de células pluripotentes (Taranger et al., 2005); la derivación a partir de Células Germinales Primordiales de Células Germinales Embrionarias pluripotentes (Resnick et al., 1992; Matsui et al., 1992); o más recientemente la transducción con virus con factores de transcripción (Takahashi y Yamanaka, 2006)

#### **3.1- Células Madre Pluripotentes inducidas**

Recientemente se ha logrado revertir el estado de células somáticas diferenciadas a un estado pluripotente mediante la transducción retroviral de factores de transcripción. Estas células pluripotentes reciben el nombre de Células Madre Pluripotentes inducidas (iPSC) y fueron originalmente obtenidas mediante la transfección de 4 factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4, y c-Myc, en fibroblastos de ratón (Takahashi y Yamanaka, 2006) y poco después se consiguieron derivar de fibroblastos humanos, utilizando tanto los mismos 4 genes mostrados arriba (Takahashi et al., 2007) como una segunda combinación con Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Yu et al., 2007).

Las iPSC son muy parecidas a las ESC, tanto en su expresión génica, características epigenéticas, reactivación del cromosoma X, como en la actividad telomerasa (Maherali et al., 2007; Marion et al., 2009). Las principales diferencias con respecto a las ESC se encuentran en su estado epigenético, como los patrones de metilación del DNA (Doi et al., 2009; Deng et al., 2009) o la ocasional expresión bialélica de genes de impronta (Pick et

al., 2009). Algunas de estas diferencias pueden ser debidas a la llamada “memoria epigenética” en la que, a pesar de las modificaciones epigenéticas que ocurren durante la derivación de las iPSC, se mantienen características residuales del estado epigenético de las células somáticas originales (Kim et al., 2010).

Los principales obstáculos para el estudio y posterior utilización terapéutica de las iPSC son la baja eficiencia de reprogramación (0,02% según Takahashi et al., 2007) y los riesgos relacionados con la formación de tumores. Éstos son en parte compartidos con las células ES, como la facilidad con la que un pequeño número de células indiferenciadas pueden dar lugar a la formación de teratomas (Li et al., 2008). Además, las iPSC presentan riesgos adicionales resultantes de los métodos utilizados para su derivación. Algunos de los factores transducidos son conocidos oncogenes que inducen tumores en los ratones derivados de las iPSC y su descendencia (Okita et al., 2007), los retrovirus pueden causar mutaciones al integrarse en el genoma de forma aleatoria y la expresión de los transgenes, ya sea por su reactivación o por un insuficiente silenciamiento, puede inhibir la diferenciación de las iPSC *in vivo* aumentando el riesgo de tumorigenesis (Yamanaka, 2009).

Con el fin de superar estos obstáculos se ha profundizado en la derivación de iPSC a partir de diversos tipos celulares, la utilización de técnicas para aumentar la eficiencia de reprogramación y encontrar la forma de prescindir tanto de oncogenes como del uso de retrovirus: Además de los fibroblastos utilizados en un primer momento, se han obtenido iPSCs de diversos tipos celulares, como queratinocitos (Aasen et al., 2008), Células Precursoras Neuronales (NPC; Eminli et al., 2008), células de hígado y estómago de ratón (Aoi et al., 2008), células pancreáticas  $\beta$  (Stadtfield et al., 2008), linfocitos (Hanna et al., 2008) o progenitores circulantes de la sangre (Loh et al., 2009). Estos estudios han demostrado el diferente comportamiento de las células frente a la reprogramación hacia iPSCs, tanto por la eficiencia de reprogramación como por los diferentes requerimientos de factores de transcripción transducidos. Así, linfocitos B totalmente diferenciados necesitan, además de los 4 factores de transcripción descritos por Takahashi y Yamanaka, la transfección de C/EBP $\alpha$  o el knockdown de Pax5 (Hanna et al., 2008). Por otro lado,



células en un estado menos diferenciado como las NPCs pueden transformarse en iPSCs sin necesidad de Sox2 exógeno (Eminli et al., 2008) e incluso con la transfección de Oct4 en solitario (Kim et al., 2009). En cuanto a la eficiencia de reprogramación, está ligada tanto a la célula de origen como a las técnicas utilizadas, cubriendo un amplio margen desde el 0,02% descrito inicialmente para fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007), hasta el 24% obtenido para progenitores mieloides de ratón utilizando los mismos 4 genes (Eminli et al., 2009). Además, la utilización de células circulantes o keratinocitos permite prescindir de biopsias para la obtención de las células del paciente. Desde el punto de vista metodológico, también se han logrado grandes avances en la derivación de las iPSCs, permitiendo la sustitución de oncogenes y retrovirus. Por ejemplo, se vio que el oncogén c-Myc era prescindible aunque disminuyera la eficiencia de reprogramación (Nakagawa et al., 2007), y que Klf4 puede reemplazarse por Esrrb (Feng et al., 2009) y Oct4 por Nr5a2 (Heng et al., 2010). También se ha conseguido reemplazar los retrovirus por vectores adenovirales (Stadtfield et al., 2008), plásmidos de expresión (Okita et al., 2008), vectores episomales (Yu et al., 2009) o incluso proteínas recombinantes (Zhou et al., 2009). Estos métodos eliminan los problemas relacionados con la integración de genes exógenos en el genoma pero, como contrapartida, son mucho menos eficientes (Okita y Yamanaka, 2011). También se han utilizado diferentes productos químicos que permitieron aumentar la eficiencia y sustituir la transfección de factores de transcripción (ver modificaciones epigenéticas, pag. 24), así como micro-RNAs que aumentan la eficiencia de reprogramación, como miR-291-3p, miR-294 o miR-295 (Judson et al., 2009).

Otro tipo celular de gran interés para el estudio de la reprogramación son las PGC que, como ya hemos visto, a pesar de tratarse de células unipotentes pueden reprogramarse y dar lugar a células pluripotentes sin necesidad de expresar ningún factor exógeno (Resnick et al., 1992; Matsui et al., 1992). Esto tiene la ventaja de evitar los problemas, tanto metodológicos como clínicos, de la transfección de factores de transcripción en la célula que, como ya hemos visto, lleva asociado un gran riesgo de tumorigénesis.

#### 4- CÉLULAS GERMINALES PRIMORDIALES

Las Células Germinales Primordiales (PGC) son los precursores embrionarios de los gametos, ya sea masculinos o femeninos, por lo que defectos en su proliferación, supervivencia o diferenciación pueden provocar alteraciones en la fertilidad del organismo adulto (De Miguel et al., 2000). Por el contrario, un incremento en su proliferación puede dar lugar a cáncer testicular de tipo Carcinoma Embrionario (ECC) o teratocarcinoma. A pesar de ser células unipotentes, su función última consiste en la formación del cigoto totipotente tras la fecundación. Esta totipotencialidad latente confiere a las PGC características tanto de células madre pluripotentes como de células diferenciadas, convirtiéndolas en un objeto de estudio único (Surani et al., 2007).

Las PGC se especifican en el organismo en la parte proximal del epiblasto poco antes de la gastrulación, esto es 6.25 d.p.c. en ratón y a las 3 semanas de gestación en humano (Saitou et al., 2002; McLaren, 2003). No todas las células del epiblasto proximal darán lugar a PGC, y aquellas que lo hagan no vienen determinadas con anterioridad (Quinlan et al., 1995; Tsang et al., 2001), sino que responden a señales de BMP producidas por el ectodermo extraembrionario (Lawson et al., 1999; Okamura et al., 2005). Esto resulta en la inducción de *Blimp1* (*Prdm1*), un represor transcripcional que juega un papel central tanto en la represión de los programas de desarrollo somáticos como en la inducción del programa de línea germinal (Ohinata et al., 2005; Vincent et al., 2005). Además de la represión de genes relacionados con la diferenciación hacia células somáticas, la especificación de las PGC implica la reexpresión de genes de pluripotencialidad como *Nanog* y *Sox2* (Yamaguchi et al., 2005; Yabuta et al., 2006) y la activación del *enhancer* distal de *Oct4* (Yeom et al., 1996).

Las PGC pueden identificarse por su actividad TNAP a los 7 d.p.c. en ratón y alrededor de los 22 días de gestación en humano. Además, expresan otros marcadores de membrana como SSEAs, *Mvh* (homólogo de *Vasa* en ratón) (Toyooka et al., 2000) y *Fragilis*; citoplasmáticos como *Esg1* y nucleares como *Stella*, *Dazl*, *Nanos3*, *Blimp1* y *GCNA1* (Germ Cell Nuclear Antigen) (De Felici et al., 2009). Además de marcadores típicos de células madre como TNAP y SSEA, las PGC expresan diversos factores de

transcripción relacionados con pluripotencialidad, como Oct4, Sox2, Nanog y Lin28 (Scholer et al., 1990; Boiani et al., 2002; Donovan y De Miguel 2003; Yamaguchi et al., 2005; Yabuta et al., 2006; West et al., 2009). A pesar de la expresión de estos factores, las PGC son células unipotentes, pudiendo dar lugar tan sólo a los gametos y, por lo tanto, siendo incapaces de formar cuerpos embrioides en cultivo, teratomas en ratones inmunodeficientes, o de contribuir a quimeras (Donovan et al., 2001; Donovan y De Miguel, 2003; De Miguel et al., 2010).

La población inicial de unas 30-40 PGC migra a continuación a la base del alantoides, localizada en el mesodermo extraembrionario. Posteriormente se incorporan al epitelio del intestino posterior desde donde comienzan a migrar a partir de los 9.5 d.p.c. en ratón y de la cuarta semana de gestación en humano. Es principalmente durante este periodo migratorio cuando las PGC pueden ser reprogramadas. Las PGC alcanzan la región AGM (Aorta-Gónada-Mesonefros) en torno a los 10.5 d.p.c. en ratón y entre la quinta y sexta semanas en humano. La región AGM o para-aorta-esplacnopleura deriva del mesodermo y recibe este nombre por originar las futuras aorta, gónadas y mesonefros (AGM). Finalmente, las PGC penetran en las crestas genitales, situadas en la parte dorsal del embrión, a los 11.5 d.p.c. en ratón y en la sexta semana de gestación en humano (McLaren, 2003).

Las PGC pueden ser aisladas y cultivadas sin sufrir cambios fenotípicos utilizando varios factores, entre los que se encuentran el Ligando de Kit (KL o SCF) y LIF, que promueven su supervivencia y proliferación (Donovan y De Miguel, 2001; De Miguel et al., 2002). Esta proliferación sólo dura unos pocos días (7-10), tanto *in vivo* como *in vitro*, antes de comenzar la diferenciación o entrar en apoptosis (Donovan et al., 1986). Sin embargo, si añadimos el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) al cultivo, las PGC se reprograman en células germinales embrionarias (EGC) que son identificables en el cultivo por formar colonias fosfatasa alcalina positivas (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992). Este fenómeno de adquisición de pluripotencialidad también se observa en PGC *in vivo*, dando lugar a células de carcinoma embrionario (ECC), las células madre pluripotentes de los tumores testiculares (Stevens, 1967).

## 5- CÉLULAS GERMINALES EMBRIONARIAS

Se originan en cultivo a partir de PGC desde 7.5 a 11.5 d.p.c. en ratón (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992), entre las 5 y 10 semanas de gestación en humano (Shamblott et al., 1998), y estadios equivalentes en otras especies. Las etapas del desarrollo de las PGC en las que se pueden transformar en EGC coinciden con las de formación de ECC *in vivo*. Este periodo se caracteriza por la alta tasa de proliferación de las PGC, así como por ciertas marcas epigenéticas, como el aumento de los marcadores de metilación de histonas H3K27me3 y H3K4me3 (Seki et al., 2005) (ver más adelante en el apartado de epigenética, pag. 26).

A diferencia de las PGC, las EGC crecen de forma continua en cultivo, son capaces de subcultivo y forman colonias TNAP positivas. La pluripotencialidad de estas células ha sido demostrada tanto por la formación de EBs y teratomas (Resnick et al., 1992) como por la contribución a la formación de quimeras cuando son transplantadas a blastocistos (Stewart et al., 1994). La principal diferencia con las Células de Carcinoma Embrionario (ECC) observadas *in vivo* es que éstas suelen presentar aneuploidía por lo que no contribuyen a la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos. Ambos tipos celulares comparten muchas de sus propiedades con las ESC, como la pluripotencialidad, la morfología o los marcadores (SSEAs, TNAP, Oct4, Sox2, Nanog...), muchos de los cuales son directamente responsables de las características diferenciales de las células madre, siendo su expresión imprescindible para el mantenimiento de la pluripotencialidad (Niwa et al., 2000). Las principales diferencias existentes entre las EGC y las ESC tienen que ver con su estado epigenético, ya que las PGC de las que derivan las primeras se encuentran en diferentes fases del borrado y restablecimiento de la impronta, imprescindibles en el establecimiento de la impronta diferencial de las células germinales XX y XY (Donovan y De Miguel, 2003). También existen diferencias en el nivel de expresión génica global tanto frente a ESC como iPSC o ECC (Pashai et al., 2012). Entre los genes sobreexpresados en EGC en comparación con otras células madre pluripotentes se encuentran FKBP6 (FK506 Binding Protein 6), H19 (imprinted maternally expressed transcript protein), IGFBP5 (Insulin-like Growth Factor Binding Protein 5), ITGA8 (Integrin Alpha 8), BGN (Biglycan), EHD2 (EH-Domain containing 2 protein), Sox9 (SRY (Sex determining

Region Y)-box 9), AXL (AXL receptor tyrosine kinase) y FN1 (Fibronectin 1); mientras que, entre los que se expresan a un nivel inferior, encontramos DNMT3B (DNA (cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Beta), Cyclin B1, Cyclin E1, CDK1 y 6 (Cyclin Dependent Kinase), HSPD1 (Heat Shock 60 kDa Protein 1), KRAS (Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog), IPO7 (Importin 7), MED7 (Mediator complex subunit 7) y RBM26 (RNA Binding Motif protein 26) (Pashai et al., 2012).

El mecanismo por el cual el tratamiento con bFGF provoca la transformación de las PGC en EGC aún no ha sido totalmente esclarecido. Recientemente se ha descubierto su implicación en la inhibición de Blimp1, el factor de transcripción responsable de la determinación de la línea germinal (Durcova-Hills et al., 2008, De Felici et al., 2009). También se ha visto que provoca la sobreexpresión de Klf4 y c-Myc, dos factores de transcripción claves en pluripotencialidad (Durcova-Hills et al., 2008) y los únicos de los factores utilizados originalmente para la derivación de iPSC que no son expresados de forma natural por las PGC.

## **6- EGC COMO MODELO DE ESTUDIO DE LA PLURIPOTENCIALIDAD**

Durante el desarrollo normal de un organismo las células mantienen o restringen su potencialidad. Es por ello que estos fenómenos, en los que una célula diferenciada aumenta su potencialidad, resultan extraordinariamente interesantes y suponen un modelo muy prometedor sobre el que trabajar para llegar a comprender tanto los procesos de determinación y diferenciación celular como los de adquisición de pluripotencialidad, en la fertilización y en el establecimiento de las poblaciones de progenitores en los diferentes tejidos. Los avances realizados al respecto pueden tener gran importancia en el uso terapéutico de las células madre así como en el diagnóstico temprano y el tratamiento del cáncer testicular y otros. Además, la relativa facilidad técnica con la que las PGC adquieren características de células madre pluripotentes las convierte en objetos de estudio ideales para comprender la potencialidad y plasticidad celular.

Otra característica que hace a las PGC un interesante modelo de estudio para las células madre pluripotentes es la relación existente entre la línea germinal y las células ES. La derivación de ESC a partir de la ICM se consigue preferentemente con células que expresan *Blimp1* y otros marcadores de línea germinal (*IFITM3* (Interferon-induced Transmembrane Protein 3), *Lin28*, *Prdm14*, *Stella* y *c-Kit*) (Chu et al., 2011), lo que parece indicar una identidad de las ESC como células provenientes de la línea germinal. Igualmente la experimentación con modelos animales puede darnos valiosos datos que no sería posible obtener de otro modo. En el caso del estudio de las EpiSC, más parecidas a ESC humanas que de ratón como ya hemos visto, ha servido para sugerir la posibilidad de que las características de las ESC humanas, más diferenciadas que las de ratón, fueran debidas a una diferencia en el estado en el que se encontraban y no una diferencia interespecífica, por lo que podría ser posible derivar ESC humanas menos diferenciadas (Buecker et al., 2010).

El mayor inconveniente en la utilización de PGC como modelo de estudio es el escaso número de células disponibles en el momento del desarrollo en el que la reprogramación es más eficiente, esto es, entre 50 y 100 células por embrión de ratón a los 8.5 d.p.c., lo que requiere un gran número de embriones de ratón sincronizados para realizar cada experimento (McLaren, 2003). Esto, unido a la imposibilidad de expandir *in vitro* la población de PGC al sobrevivir poco más de una semana en cultivo, dificulta la realización de estudios en los que se requiere un gran volumen de células, como Western Blot o microarrays.

## **7- ESTADO EPIGENÉTICO**

Además del genotipo de cada organismo, existen otros mecanismos que alteran la expresión génica, como es el caso de la epigenética. La epigenética se refiere a los cambios heredables reversibles en el DNA que hace que unos genes se expresen o no dependiendo de factores ajenos al genoma. Estos cambios pueden producirse en la propia cadena de DNA o en las histonas asociadas a ésta. Las principales modificaciones epigenéticas son la metilación del DNA, la metilación de las histonas y la acetilación de las histonas. Las dos primeras suelen tener una función inhibidora, al contrario que la acetilación, que suele

promover la activación de la expresión génica. Esto es debido a que las diversas modificaciones epigenéticas provocan un cambio en el estado de la cromatina, pudiendo tener ésta una configuración más “abierta” permitiendo el acceso a la maquinaria transcripcional y, por lo tanto, promoviendo la activación, o más “cerrada” reprimiendo la expresión génica (Gius et al., 2005).

La metilación del DNA en mamíferos tiene lugar, por lo general, en los dinucleótidos CpG (Citosina-fosfato-Guanina), pasando de citosina (C) a 5-metilcitosina (5mC). Cuando se localizan gran cantidad de éstos en una misma región se habla de “islas CpG”, las cuales se encuentran principalmente en los promotores y *enhancers* y cumplen una importante función en la represión génica. Esta metilación es llevada a cabo por las metiltransferasas Dnmt3a y Dnmt3b y mantenida por Dnmt1 (Okano et al., 1999).

Las modificaciones en las histonas se producen en las histonas nucleosomales H2A, H2B, H3, y H4 y consisten en diversas modificaciones, tales como la acetilación (ac) y la metilación (me). Existen gran cantidad de modificaciones o marcadores de histonas que indican diferentes niveles de activación genómica, nombrándose mediante una clave que indica la histona modificada (pe: H3), el residuo de aminoácido y su posición en la proteína (pe: K27 indicaría lisina en la posición 27) y el tipo y número de modificaciones (pe: me). En células madre pluripotentes los genes relacionados con el estado de célula madre presentan marcadores de cromatina activa como H3K4me o H3K9ac, mientras que los genes relacionados con un estado de célula totalmente diferenciada presentan marcadores de cromatina reprimida como H3K27me. Finalmente, aquellos genes que se expresan en células no totalmente diferenciadas, como las células madre multipotentes o unipotentes, presentan ambos tipos de marcadores de histonas, tanto activadores como represores, definiendo así un estado bivalente (Vallier et al., 2009).

Las PGC experimentan varios procesos de reprogramación epigenética durante el desarrollo embrionario. Tras su especificación en el epiblasto (6.5 d.p.c.) sufren una pérdida global del marcador H3K9me2 y un incremento de los marcadores H3K4me3 y H3K27me3, asociado a la reactivación del cromosoma X inactivo (Seki et al., 2005;

Hajkova et al., 2008; Hayashi y Surani, 2009). Más adelante, durante su migración hacia las crestas genitales (8.5-10.5 d.p.c.), comienza la demetilación global del genoma, imprescindible tanto para el borrado de la impronta como para la reactivación del cromosoma X inactivo y los elementos móviles del genoma (Reik, 2007). El borrado de la impronta consiste en la eliminación de las diferencias existentes en el estado de metilación de los genes de impronta (H19, Igf-2, Igf-2R y SNRPN (Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide N) entre otros) (Lee et al., 2002; Surani et al., 2007). De esta forma se pasa de un patrón de expresión en el que uno de los alelos se encuentra inactivo (impronta) en 9.5 d.p.c. a un patrón de expresión bialélico en 10.5 d.p.c. (Yamazaki et al, 2003). Este proceso se considera crucial para la restauración de la totipotencia latente en la línea germinal (Hayashi y Surani, 2009).

## **8- HIPOXIA**

La concentración ambiental de oxígeno parece estar relacionada con el desarrollo y mantenimiento de las células madre pluripotentes. De hecho se sabe que la embriogénesis temprana en mamíferos ocurre en un ambiente bajo en oxígeno (Ezashi et al., 2005), similar al existente en la médula ósea, donde se encuentran las células madre hematopoyéticas y mesenquimales (Cipolleschi et al., 1993). Parece existir una conexión entre el establecimiento y mantenimiento de las células madre y las condiciones de hipoxia, tal vez debido a que de esta forma se reducen los daños oxidativos en el ADN (Keith y Simon, 2007).

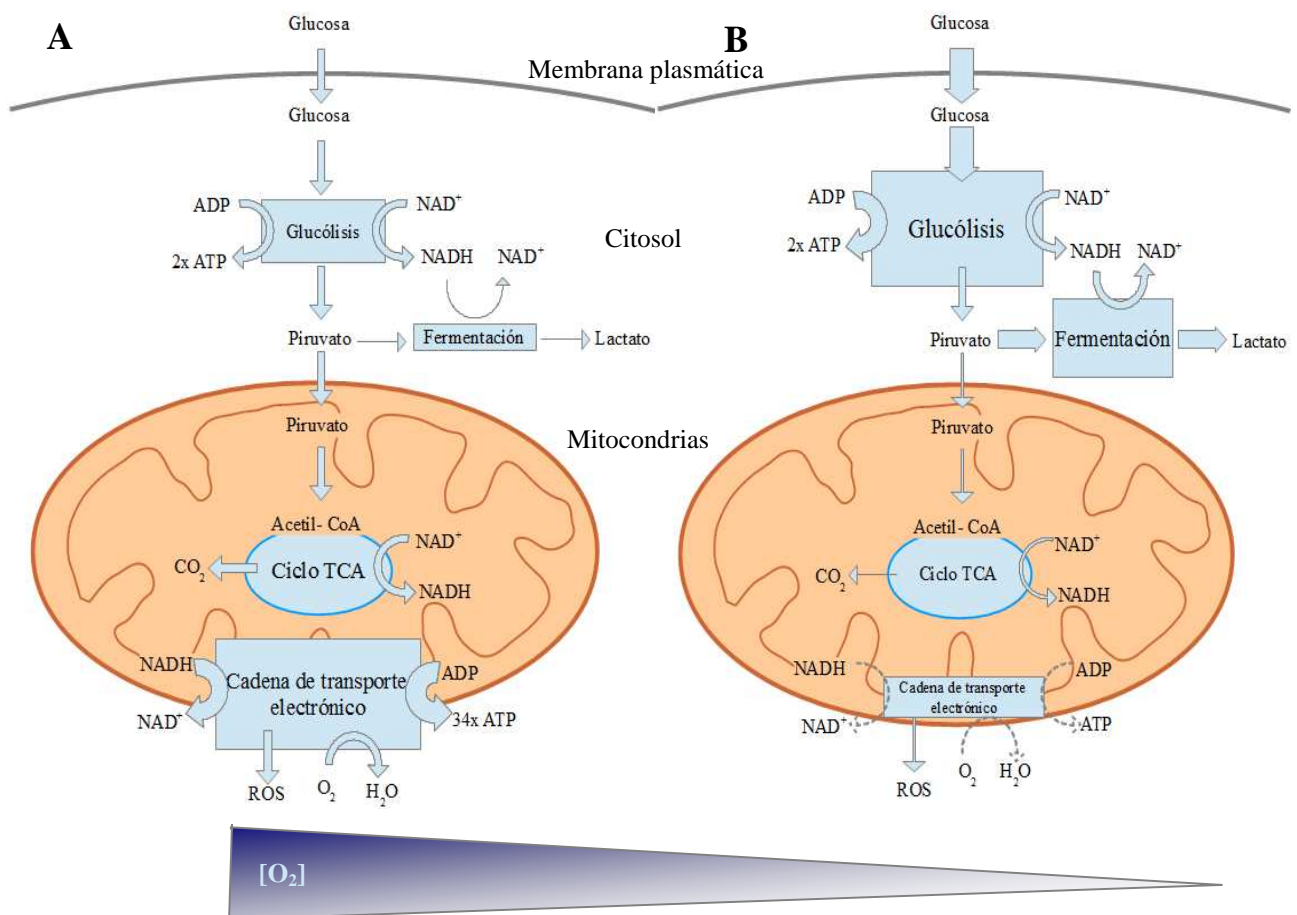
Experimentalmente se ha observado que la hipoxia inhibe la diferenciación y mejora el crecimiento de diversos tipos de células madre. En hipoxia las ESC humanas sufren menos diferenciaciones y, tras someterlas a un protocolo de formación de EBs, forman más cuerpos embrioides (Ezashi et al., 2005). Las células madre hematopoyéticas se ven claramente afectadas por la concentración de oxígeno, aumentando su supervivencia y autorrenovación (Danet et al., 2003). Las células madre neuronales y las miogénicas aumentan su proliferación y mantienen su estado pluripotente sin diferenciarse (Gustafsson et al., 2005). Las células madre de neuroblastoma o cáncer de mama conservan un fenotipo más inmaduro en hipoxia (Axelson et al., 2005). Incluso recientemente se ha observado un



aumento en la expresión de genes de pluripotencialidad (Oct4, Nanog y Sox2) en ESC de ratón y humanas utilizando el mimético de hipoxia CCCP (Carbonil Cianuro 3-Clorofenilhidrazona) (Mandal et al., 2011).

### 8.1- Metabolismo de la glucosa.

En condiciones de hipoxia se produce un cambio en el metabolismo celular de la glucosa, pasando de la respiración oxidativa a la glucólisis como principal fuente de energía para la célula (Fig.1).



**Figura1:** Esquema del cambio metabólico que se produce en condiciones hipóxicas. **A:** En normoxia la mayor parte del ATP se produce en la cadena de transporte electrónico, obteniéndose unas 36 moléculas de ATP por molécula de glucosa. **B:** En hipoxia la cadena de transporte electrónico se inhibe y la mayor parte del ATP se produce en la glucólisis, obteniéndose 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa, por lo que la demanda de glucosa aumenta para cubrir las necesidades energéticas. El grosor de las flechas indica la preferencia en las rutas metabólicas.

Esto supone un gran incremento en la demanda de glucosa (sólo se producen 2 ATP por molécula de glucosa, mientras que la respiración produce 36 ATP) así como una bajada del pH intracelular (debido a la formación de ácido láctico) y variaciones en las Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) (Hamanaka et al., 2009).

La relación entre el metabolismo glucolítico y la adquisición de características de célula madre, tales como la autorrenovación y capacidad de diferenciación a otros tipos celulares, se encuentra bien representada en el conocido efecto Warburg, según el cual las células cancerosas prescinden de la respiración oxidativa incluso en condiciones de normoxia. Teniendo en cuenta estas similitudes existentes entre células tumorales y células madre se pensó en la relación entre el metabolismo glucolítico y la pluripotencialidad (Bartrons y Caro, 2007; Brahimi-Horn et al., 2007). De forma similar, se ha observado muy recientemente que en la derivación de iPSC de ratón se produce un cambio metabólico hacia glucólisis poco antes de la adquisición de características de célula madre (Folmes et. al., 2011). Además de todo esto, varios de los factores del sistema de transducción de señales de bFGF, como PTEN (Phosphatase and Tensin homolog), Ras o Myc, estimulan la glucólisis frente a la respiración oxidativa (Brahimi-Horn, 2007).

Existen pocos datos relativos al metabolismo de las PGC. Se ha visto que las PGC premigratorias (7.5 d.p.c.) poseen un número muy bajo de mitocondrias (<10) y que éste va aumentando durante su desarrollo (Ramalho-Santos J. et al., 2009). En un estudio previo a esta Tesis doctoral, una comparativa de expresión génica entre EGC y PGC de ratón reveló 11 genes sobreexpresados en EGC más de 1.5 veces con respecto a PGC. Sorprendentemente, entre estos genes no se encontraban genes tradicionalmente relacionados con pluripotencialidad sino factores de transcripción (*Ascc1*), moléculas ribosomales (*Mrps31*, *Rpl31*), y genes relacionados con metabolismo, especialmente de la glucosa, (*Ap2m1*, *Atp2a2*, *Eno1*, *Pgam1*, *Pisd*) y remodelación de cromatina (*Eed*) (comunicación personal de Dra. De Miguel).

## 8.2- HIF

La respuesta a hipoxia está mediada por diversos elementos que reaccionan a la concentración de oxígeno, ya sea a nivel sistémico como los quimiorreceptores centrales y arteriales; o a nivel celular como la Neuroglobina, la Angiopoyetina 2 o los canales de iones sensibles a oxígeno (Sharp y Bernaudin, 2004). Entre estos elementos el principal mediador de la respuesta celular a hipoxia son los Factores Inducidos por Hipoxia (HIFs). Éstos son factores de transcripción heterodiméricos formados por una subunidad HIF- $\alpha$  variable y otra HIF- $\beta$  constante, también llamada ARNT (Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator), que se expresa constitutivamente en todas las células. Los HIF regulan gran cantidad de genes mediante la unión a los llamados Elementos de Respuesta a Hipoxia (HRE) en los promotores/*enhancers* de sus genes diana (Bruick, 2003). En mamíferos existen 3 tipos de subunidades HIF- $\alpha$ : HIF-1 $\alpha$ , expresado en todo el organismo; HIF-2 $\alpha$ , cuya expresión se encuentra más restringida, expresándose principalmente en células endoteliales (Wenger, 2002); y HIF-3 $\alpha$ , con una expresión también restringida y cuya isoforma 4 actúa como regulador de los anteriores, impidiendo su unión a los HRE (Maynard et al., 2005).

La regulación de las subunidades HIF- $\alpha$  tiene lugar a varios niveles, siendo el más importante el cambio en la estabilidad de la proteína. Las subunidades HIF- $\alpha$  se expresan constitutivamente, pero en condiciones de normoxia son degradadas rápidamente por el sistema ubiquitina-proteosoma. En condiciones hipóxicas no se produce esta degradación, estabilizándose la proteína, translocándose al núcleo donde se une a la subunidad  $\beta$  y uniéndose a los HRE y, por tanto, regulando los genes diana (Bruick, 2003).

Entre los más de 150 genes diana regulados por HIF se encuentran varios relacionados con la potencialidad celular, como Notch y ETS-1 regulados por HIF-1 (Gustafsson et al., 2005; Oikawa et. el., 2001) u Oct4 y c-Myc regulados por HIF-2 (Covello et al., 2006; Gordon et al., 2007). Como se ha explicado anteriormente, Oct4 y c-Myc son elementos de gran importancia en la red transcripcional responsable del estado de célula madre; Notch es un receptor transmembrana que inhibe la diferenciación de varios tipos celulares como las células madre hematopoiéticas (Pear y Aster, 2004); y ETS-1

regula numerosos genes y está relacionado con el desarrollo de las células madre, tumorigénesis, senescencia y muerte celular (Dwyer et al., 2007). También se ha descrito la regulación de la expresión de TERT (Transcriptasa Inversa de la Telomerasa) proteína responsable de la actividad telomerasa que, como hemos visto, es imprescindible para la autorrenovación de las células madre por HIF-1 (Nishi et al., 2004). Además HIF-1 media el cambio metabólico visto en hipoxia, al inhibir la fosforilación oxidativa impidiendo la conversión de piruvato en acetil-CoA (Shaw et al., 2006; Brahimi-Horn et al., 2007).

Experimentalmente se ha visto que HIF promueve la adopción de características típicas de células madre, como la autorrenovación o la multipotencialidad, en células tumorales en condiciones hipóxicas (Keith y Simon, 2007). HIF tiene también un efecto directo sobre las PGC, ya que la pérdida de HIF-2 $\alpha$  supone una reducción drástica de su número en embriones de ratón (Covello et al., 2006).

# **OBJETIVOS**



**El objetivo principal es profundizar en el conocimiento de los mecanismos celulares involucrados en la reprogramación celular usando un modelo *in vitro* con células germinales primordiales de ratón, con dos subapartados:**

a) Habiéndose visto la relación existente entre el estado pluripotente de las EGC y la expresión de genes relacionados con el metabolismo, se sometieron las PGC a diferentes concentraciones de glucosa en cultivo, así como a condiciones de hipoxia reales o simuladas mediante inhibidores farmacológicos de la respiración para ver su efecto en la supervivencia y reprogramación de las PGC.

b) Igualmente la evidencia de la remodelación de la cromatina en estados reprogramados y, por tanto, la importancia del estado epigenético tanto en el desarrollo de las PGC como en la derivación de diferentes células madre pluripotentes nos ha llevado a comprobar el efecto de varios agentes modificadores del estado epigenético de la célula sobre el crecimiento y reprogramación de las PGC.

Identificar el papel de los modificadores epigenéticos y de la concentración de oxígeno y glucosa en la reprogramación de las PGC para dar lugar a células madre pluripotentes como las EGC nos puede proporcionar importantes conocimientos acerca de la inducción de pluripotencialidad, así como del mantenimiento o restricción de la totipotencialidad en la línea germinal. Estos conocimientos podrían aplicarse, no sólo a la obtención de iPSC de forma más eficiente y segura, sino a la mejora en la derivación de otros tipos de células madre pluripotentes, así como a la prevención y tratamiento del cáncer testicular y otros.





# **MATERIAL Y MÉTODOS**

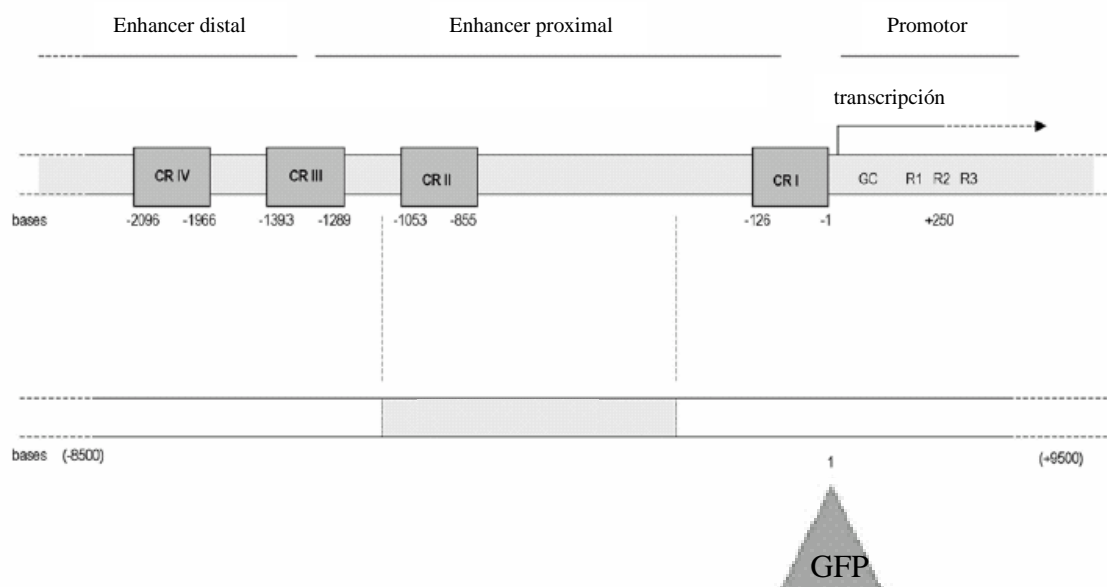


## 1- ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Todos los estudios animales fueron proyectados y realizados con la aprobación del comité ético de bienestar animal (CEBA) del Hospital La Paz de Madrid.

La utilización de PGC de ratón (*Mus musculus*) como modelo experimental se debió a la facilidad de manejo de la especie y la similitud biológica con el ser humano. El gran número de crías por camada (entre 3 y 12), el elevado número de camadas anuales (5-10), así como su corto periodo de gestación (entre 19 y 21 días), unido a su temprano destete y llegada a la madurez sexual, nos proporciona un gran volumen de embriones con los que poder trabajar. Además se ha visto que las PGC de humano y ratón responden de la misma forma a los factores necesarios para la reprogramación en EGC (Shamblott et al., 1998), por lo que los resultados que se obtengan podrán extrapolarse en gran medida a los que se obtendrían en PGC humanas.

Se utilizaron ratones transgénicos Oct4-GFP (Proteína Fluorescente Verde), que permite la identificación de las PGC *in vivo*, ya que fluorescen al expresar GFP bajo el promotor de Oct4 (Fig. 2).



**Figura 2:** Esquema de la construcción Oct4-GFP tranfectada en los ratones utilizados en la realización de los experimentos de esta Tesis (modificado de Boiani et al., 2004).

Estos transgénicos fueron desarrollados por Boiani et al., (2004) a partir de ratones C57BL/6J, raza utilizada por ser muy fértil y tener frecuentemente un número elevado de embriones por camada, por lo que el número total de hembras a sacrificar se reduce, y fueron donados a nuestro laboratorio por el grupo de Hans Schöler del Instituto Max Planck de Biomedicina Molecular.

Las PGC se extrajeron de embriones de 8.5 d.p.c. Las ratonas desarrollan un tapón vaginal tras la cópula relativamente fácil de observar y que nos servirá para indicarnos si se ha producido el apareamiento. Se disponen 2 hembras por cada semental y se comprueba cada mañana la presencia o ausencia de este tapón. El momento más probable de la cópula se sitúa en el inicio de la noche, por lo que 8 días después de observar el tapón vaginal y entorno a las 11:00 los embriones habrán alcanzado el estado de desarrollo deseado.

## **2- GENOTIPADO RATONES OCT4-GFP**

### **2.1- Aislamiento de DNA de colas de ratón**

1. Utilizando tijeras desinfectadas por calor que cauterizan el corte se cortaron menos de 1 cm de cola de los ratones que se deseaba genotipar y se mantuvieron en hielo.
2. Se añadió 0,5 ml de buffer de lisis por muestra, que incluye 0,1 M TrisCl pH=8,5, 5 mM EDTA (Ácido Etilendiaminotetraacético) (Sigma, San Louis, MS, USA), 0,2% SDS, 0,2 M NaCl (Merck, Darmstadt, Germany) y 0,2 mg/mL Proteinasa K (Boehringer Ingelheim GMBH, DL).
3. Las muestras se dejaron toda la noche a 55°C en un baño con agitación permitiendo la digestión enzimática del tejido.
4. Agitación durante 1' en vortex (VELP Scientifica. Milan, Italia).
5. Centrifugado 5' a 14000 g. en centrífuga Nahita Minivite 2716 (Auxilab, Beriáin, España).
6. El sobrenadante se vertió sobre 0,5 ml de isopropanol (Amresco, Solon, OH, USA) para precipitar el DNA.

7. Se agitaron los tubos suavemente hasta que se observaron las hebras de DNA y se recogieron con capilares de cristal (Kimble Chase, Rockwood, TN, USA) estériles.
8. Se depositaron las muestras en 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada donde permanecieron toda la noche a temperatura ambiente con el fin de disolver el DNA.
9. Las muestras se guardaron a  $4^\circ\text{C}$ .

## 2.2- PCR Oct4-GFP

1. Se midió la concentración de DNA en un espectrofotómetro (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) a una longitud de onda de 280nm.
2. Se diluyeron las muestras en  $\text{H}_2\text{O}$  estéril hasta una concentración de DNA de 122 ng/ $\mu\text{l}$ , concentración del control positivo que se comprobó como ideal para la observación de la banda.
3. Para realizar la PCR se incluyó 1  $\mu\text{l}$  de cada muestra diluida en tubos de 200  $\mu\text{l}$  (Eppendorf, Hamburg, Germany) con 2  $\mu\text{l}$  buffer 10X (Qiagen, CA, USA), 0,25  $\mu\text{l}$  HotStarTaq-DNA Polymerase (Qiagen, 2,5 unidades/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  Yellow Food Color (YJ, McCormick, Sparks, MD, USA), 0,5  $\mu\text{l}$  dNTP's 10nM (Sigma), 0,5  $\mu\text{l}$  Cebador 1, 0,5  $\mu\text{l}$  Cebador 2 y 13,25  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  estéril. Total volumen reacción 20ul. Se utilizaron los siguientes cebadores diseñados con ayuda del programa CLC Workbench (CLC Bio, Aarhus, Denmark):
  - eGFPP66 (18 nt): 5'-CGT AAA CGG CCA CAA GTT-3'
  - eGFPR379 (19 nt):5'-TCA GCT CGA TGC GGT TCA C -3'
4. En cada PCR se incluyó un control negativo (en el que se omitió en la disolución el DNA) y un control positivo perteneciente a muestras de los ratones originales.
5. Se realizó posteriormente una PCR programando el termociclador (Biometra GmbH, Goettingen, Germany) con 15' a  $95^\circ\text{C}$ ; 30 ciclos de  $94^\circ\text{C}$  30'',  $59^\circ\text{C}$  1' y  $72^\circ\text{C}$  1'; 10' a  $72^\circ\text{C}$  y conservación a  $4^\circ\text{C}$ .
6. Los productos de PCR de 313 pares de bases fueron separados por electroforesis (Fuente de alimentación a 120mV. (Cultek, Madrid, España)) en un gel de agarosa (Seachem, Madison, GA, USA) al 1% + 0,034  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de bromuro de etidio durante

el tiempo suficiente para ver la banda. Como marcador de peso molecular se utilizó utilizar 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

7. El resultado de la PCR se observó y fotografió por medio de un transiluminador UV (Uvitec, Cambridge, UK).

### **3- AISLAMIENTO DE PGC**

Las hembras de 8.5 d.p.c. se sacrificaron mediante dislocación cervical. Se escogieron PGC de embriones de 8.5 d.p.c. porque se reprograman más fácilmente que otras de embriones más tardíos y son más fáciles de diseccionar (De Miguel y Donovan, 2000). Para obtener los embriones, primero se diseccionó la ratona en un ambiente lo más estéril posible. Se abrió el abdomen con unas tijeras cortando piel y peritoneo dejando al descubierto las ramas del útero. A continuación se cortaron las dos ramas del útero y se separaron las placentas de forma que la decidua quedó parcialmente visible. Las placentas se recogieron en una placa p100 (Corning, NY, USA) con PBS (Solución tampón Fosfato Salino) enfriado con hielo. Por último, se extrajeron los embriones de su interior a través de la porción de decidua descubierta. Para esto se deben situar las placentas en una nueva placa Petri con PBS limpio y trabajar con la ayuda de una lupa (Lan Optics) y luz fría (Edmund Optics, Barrington, NJ, USA). A los 8.5 d.p.c. las PGC se localizan en la parte posterior del embrión, sobre todo en el mesodermo extraembrionario. Una vez separada la zona caudal del embrión y eliminadas las membranas extraembrionarias asociadas, se recoge el fragmento en FBS (Suero Bovino Fetal) en hielo para su conservación hasta el momento de la disgregación.

Para disgregar las PGC se eliminó el FBS (con cuidado para no aspirar los fragmentos de embriones) y se incubaron con 0,05g/L tripsina/0,02g/L EDTA (Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) durante 8 minutos a 37 °C. A continuación se añadió medio de cultivo de PGC para neutralizar la acción enzimática de la tripsina y se procedió a la disgregación mecánica de los fragmentos mediante un cuidadoso pipeteo para obtener una suspensión de células sueltas.

## 4- CULTIVO CELULAR

### 4.1- Células nutricias

Las PGC no pueden cultivarse de manera aislada, por lo que se siembran sobre células nutricias STO (Sandoz Thioguanine- and Ouabain-resistant, disponibles en la American Type Culture Collection (ATCC)), una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón, las cuales proporcionarán soporte y determinados factores necesarios para la supervivencia de las PGC como KL (Ligando de Kit) transmembrana (De Miguel y Donovan, 2003). El medio de cultivo utilizado para las STO consiste en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) con 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato sódico y glutamax (862 mg/L L-Alanyl-Glutamine) (Gibco), Penicilina/Streptomocina 1% (Gibco) y FBS 10% (Gibco). Los cultivos de STO, así como todos aquellos que no requieran de condiciones hipóxicas, se mantuvieron en normoxia a 37° C y 5% de CO<sub>2</sub> (incubador HERA cell 150, VWR, Radnor, PA, USA). Estas células se cultivaron en placas p100 para su expansión, manteniéndolas en una concentración de entre el 20-99% de la superficie de cultivo, impidiendo que lleguen a confluencia. Una vez alcanzada la sub-confluencia, se despegaron las células de la placa utilizando 0,5 g/L tripsina + 0,2 g/L EDTA durante 1 minuto, inhibiendo su acción añadiendo medio de cultivo. A continuación se pipeteó la suspensión para disgregar totalmente las células.

Para obtener una monocapa de densidad específica de células STO éstas son irradiadas con radiación gamma ( $\gamma$ ) con una dosis de 50 Gy (Martin y Evans, 1975; según Donovan et al., 1986), una vez se encuentren en confluencia dentro del pocillo, de forma que se inhiba su crecimiento pero se mantengan sus demás características. Las STO deben sembrarse a una densidad de  $\sim 15 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para que alcancen la confluencia al día siguiente, en el momento de la irradiación, antes de sembrar las PGC sobre ellas. También pueden descongelarse células previamente irradiadas y congeladas. Se utilizaron 3 irradiadores diferentes: Tubo de rayos X Smart 200E con caja protectora KrautKramerFoster y unidad de control SmartS83; acelerador ELEKTA Sli y acelerador ELEKTA Precise (Elekta, Stockholm, Sweden).

Para el posterior cultivo de las EGC se utilizaron Fibroblastos Embrionarios de Ratón (MEF) como capa nutricia. A diferencia de las STO se trata de un cultivo primario no inmortalizado. Se utilizaron MEF de 2 procedencias diferentes:

- MEF comerciales EmbryoMax® Primary Ratón Embryo Fibroblasts, Strain CF1, passage 3 (Millipore, Billerica, MA, USA).
- MEF obtenidos en el laboratorio. Para ello se utilizaron embriones de ratón C57BL/6J de 13.5 d.p.c. El sacrificio, disección y separación de placentas se realiza igual que para la obtención de PGC. Una vez eliminada la placenta, se retiraron la cabeza, miembros y vísceras. Las fracciones obtenidas se trocean en fragmentos lo más pequeños posible utilizando las propias pinzas o tijeras de punta fina. A continuación se incuban estos fragmentos en 0,5 g/L tripsina + 0,2 g/L EDTA durante 15 minutos a 37°C y se disgregan mecánicamente mediante pipeteo. Por último se resuspenden en medio de cultivo y se siembran en placas de cultivo.

Los MEF se cultivaron igual que las STO, salvo por la adición de 0,1 mM de aminoácidos no esenciales (Invitrogen) al medio de cultivo. Al no tratarse de una línea celular inmortalizada no se utilizaron más allá de pase 5, el máximo tiempo en cultivo recomendado antes de que comiencen a sufrir apoptosis. Además, debido a su mayor tamaño con respecto a las STO, es necesario sembrarlas a menor densidad ( $\sim 10 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>) para que alcancen la confluencia al día siguiente de la siembra y previo a la irradiación.

#### **4.2- Cultivo de PGC**

El cultivo de las PGC se realizó sobre células nutricias irradiadas en placas de diferente tamaño, entre las que se encuentran placas de 96, 24 y 6 pocillos (Corning), Terasaki de 384 pocillos (BDFalcon, Franklin Lakes, NJ, USA) sembrando habitualmente el equivalente a 3 embriones por cm<sup>2</sup>. El medio de cultivo de PGC consiste en DMEM con 4,5 g/L glucosa, 110 mg/L piruvato sódico y 862 mg/L glutamax, Penicilina/Streptomina 1%, FBS 15%, LIF/ESGRO (10<sup>3</sup> U/ml) (Millipore), SCF (Stem Cell Factor) (10 ng/ml) (R&D Systems, Minneapolis, MN USA) y Forskolina (40 µg/ml) (Sigma).



Con el fin de obtener cultivos a largo plazo de EGC, fue necesario subcultivar las células sobre una nueva monocapa de células nutricias. Para realizar el pase de las EGC se utilizó 0,5 g/L tripsina/0,2 g/L EDTA durante <4 minutos y, tras inhibir con medio de cultivo, se pipeteó hasta conseguir una suspensión celular. Esta suspensión se sembró sobre una nueva monocapa de células nutricias con medio de cultivo de EGC, consistente en DMEM con 4,5 g/L glucosa y glutamax, Penicilina/Streptomocina 1%, FBS 15%, LIF/ESGRO ( $10^3$  U/ml) y aminoácidos no esenciales 0,1 mM. Este proceso de resembrado es necesario debido al efecto pasajero de la radiación sobre el crecimiento de la capa nutricia, el cual va desapareciendo a partir de una semana.

Se utilizaron otros medios de cultivo propios de EpiSC (Células Madre de Epiblasto) para cultivar las EGC obtenidas a partir de pase 1. Llamaremos a estos medio de cultivo por el nombre del autor principal que lo describió. Así, el medio Smith consiste en activina A (20ng/ml; R&D Systems) y bFGF (12 ng/ml; R&D Systems) en medio N2B27 (Guo et al., 2009); mientras que el medio McKay consiste en DMEM-F12 (Invitrogen) con 20% knockout serum replacement (KSR; Invitrogen), bFGF 5ng/ml, 0,1 mM 2-mercaptoethanol, 2mM L-glutamine (Sigma), y 0,1mM non-essential amino acids (Tesar et al., 2007).

### **4.3- INDUCCIÓN DE PLURIPOTENCIALIDAD**

Se utilizaron diferentes tratamientos para inducir pluripotencialidad en las PGC, ya fueran modificadores epigenéticos, variación en la concentración de oxígeno o la administración de diversos fármacos. A modo de control positivo se utilizó el Factor de Crecimiento Fibroblástico básico (bFGF) suministrado todos los días a una concentración de 10 ng/ml. También, como control positivo, se trataron los cultivos de PGC en día 3 con 2 inhibidores (2i) de MEK (Mitogen-activated protein kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK) Kinase) y GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3): PD0325901 (Calbiochem/Merck) y CHIR99021 (Sigma), los cuales han demostrado recientemente su capacidad para la derivación de EGC a partir de PGC de ratón (Leitch et al., 2010).

Se utilizaron varias sustancias que alteran el estado epigenético de las células:

- 5-Aza-2-Desoxicitidina (AzaC), un análogo de nucleótido que bloquea la acción de las DNA metiltransferasas, impidiendo así la metilación del DNA y provocando un efecto activador de la transcripción general. Para tener efecto ha de incorporarse al DNA de las PGC durante la replicación de éstas, por lo que el tratamiento debe mantenerse durante varios ciclos celulares (que es de unas 16 horas en PGC) (Tam y Snow, 1981). El tratamiento con AzaC se mantuvo durante todo el tiempo de cultivo (10 días), utilizándose concentraciones de 5nM y 50nM.
- Tricostatina A (TSA), un inhibidor de las Desacetilasas de Histonas (HDAC) que tiene un efecto casi inmediato en la célula. En este caso el efecto activador se produciría por la acetilación de las histonas. El tratamiento con TSA se realizó en una sola dosis lavada tras 6, 12 ó 24 horas en los días 2 ó 9 de cultivo, manteniendo éste durante 10 días. Las dosis utilizadas fueron de 0,5nM a 500nM.

Tanto para el TSA como el AzaC las concentraciones de partida para nuestros experimentos (AzaC 500nM y TSA 150nM) se obtuvieron de los estudios de Ruau et al.,(2008) en células de neuroesfera.

- BIX-01294 inhibe la metiltransferasa de histonas G9a. Esto provoca un descenso en el marcador de represión H3K9me2 (dimetilación en la lisina 9 de la histona H3) (Kubicek et al., 2007). En ESC de ratón se consigue un descenso del 20% de este marcador utilizando una concentración de 4µM, que ha sido la concentración de partida en nuestros experimentos. Se utilizaron concentraciones de 4µM, 400nM y 40nM durante los 10 días de cultivo.

Con respecto a las condiciones hipóxicas, los diferentes tratamientos utilizados fueron los siguientes:

- Variación en la concentración de glucosa del medio. Las células se cultivaron en medio con baja (1 g/L), media (4'5 g/L) y alta (10 g/L) concentración de glucosa.
- Condiciones hipóxicas. Se incubaron los cultivos a una concentración de oxígeno del 3% o del 1% en un incubador CO<sub>2</sub>/N<sub>2</sub> (Sanyo O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> incubator MCO-18M, Moriguchi, Osaka, Japan).

- CCCP (Carbonyl Cyanidem-Chloro Phenyl hydrazone, Sigma), (20  $\mu$ M) y Antimicina A (Sigma, 25  $\mu$ M). El CCCP desacopla la fosforilación oxidativa en la mitocondria y la Antimicina inhibe el funcionamiento del complejo de citocromos b-c1 en la cadena de transporte electrónico (Paniagua et al., 2007), lo cual impide la respiración de forma similar a la hipoxia. Tras añadir estos tratamientos, se dejan incubar los cultivos 30 minutos y después se sustituye totalmente el medio por medio fresco sin tratamiento.
- $\text{CoCl}_2$  (Merck). Se trata de un agente químico que provoca una respuesta biológica y molecular similar a la de la hipoxia impidiendo la degradación de HIFs por la inhibición de las PHDs (Prolyl Hydroxylases) (Vengellur et al., 2005). Se utilizó a una concentración de 150  $\mu$ M durante todo el tiempo de cultivo.
- Tratamiento con isoflurano (Arkema, Colombes, France), debido a su efecto activador de HIF (Li et al., 2008; Hieber et al., 2009). Se disolvió en el medio utilizando un vaporizador (Abbott Laboratories, North Chicago, IL, USA) con  $\text{O}_2$  y 2% de isoflurano durante 30 minutos.
- Mitramicina (Sigma): Inhibidor farmacológico de HIF. Se utilizó a una concentración de 100nM durante todo el tiempo de cultivo.

Para evaluar el efecto de las diferentes condiciones en la inducción de pluripotencialidad en las PGC en todos los experimentos se incluyeron controles positivos y negativos. Éstos consisten en las condiciones comunes a todos los cultivos con 4'5 g/L de glucosa y concentración ambiental de oxígeno ( $\approx 21\%$ ), con y sin bFGF respectivamente.

El medio de cultivo se cambió cada 24 horas como máximo, sin llegar nunca a retirarse todo el medio, sino entre  $\frac{1}{2}$  y  $\frac{2}{3}$  del total para evitar levantar las PGC y eliminar los factores proporcionados por las STO. Todos los tratamientos se realizaron por triplicado y, al menos, tres veces independientes, testándose además su efecto tanto con como sin bFGF y en algunos casos 2 condiciones diferentes de forma combinada.

#### 4.4- Cultivo de células control

##### Células Madre Embrionarias (ESC)

Se utilizaron células madre embrionarias (ESC) de ratón de la línea E14Tg2a (American Type Culture Collection) a modo de control positivo de pluripotencialidad con el que comparar las células obtenidas (Hooper et al., 1987). Así, sirvieron de control tanto para la expresión de marcadores de proteínas como SSEA1, Klf4 o c-Myc; como para la formación de cuerpos embrioides o la diferenciación a diferentes tipos celulares. Estas células no necesitan células nutricias para su cultivo, por lo que se cultivaron directamente sobre placas tratadas con gelatina 0,1% (Sigma). El medio de cultivo utilizado consiste en GMEM (Glasgow Minimum Essential Medium, Sigma) con L-Glutamina 2mM, Penicilina/Streptomocina 1%, 10%, FBS específico para células ES (ES qualified, Whittaker Bioproducts, Walkersville, MD, USA) aminoácidos no esenciales 0,1 mM, Piruvato sódico 1mM (Sigma) y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,1 mM (Sigma). Se deben mantener entre un 25-99% de confluencia, para lo cual se pasaron de forma similar a las STO, pero eliminando toda la tripsina mediante centrifugación cada vez que era necesario levantar el cultivo. Para los cultivos se utilizó la centrifuga Hettich Universal 32 R (Hettich, Tuttlingen, Germany).

##### EGC de la línea TGC10

Siendo las ESC de la línea E14Tg2a un excelente control de células pluripotentes, observamos que su comportamiento en cultivo difería en gran medida del de nuestras células EGC. Esto fue especialmente llamativo a la hora de formar cuerpos embrioides, ya que, a diferencia de nuestras EGC formaban EBs de gran tamaño y con facilidad. Por ello, para perfeccionar la técnica de formación de EBs sin necesidad de recurrir a las escasas PGC de las que disponíamos, se utilizó la línea de EGC TGC10 (Labosky et al., 1994). Estas células se cultivaron de la forma ya descrita para EGC provenientes de cultivo primario.

### COS-7

La línea celular COS-7 (CV-1 en Origen que contiene SV40) proviene de las células de riñón de *Cercopithecus aethiops* CV-1 inmortalizadas mediante la transfección de SV40 (Simian Vacuolating virus 40) mutante que expresa el antígeno T (Gluzman, 1981), disponibles en ATCC. Estas células son utilizadas frecuentemente como control de la expresión de las HIFs y se cultivaron igual que las células STO.

## **5- FIJACIÓN, HISTOQUÍMICA FOSFATASA ALCALINA Y RECuento CELULAR**

La fijación se realizó mediante paraformaldehído (Panreac, Castellar del Vallès, Barcelona, España) pH 7.4 al 4% en PBS durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para disolver el paraformaldehído se calentó la disolución hasta 60°C, se añadieron unas gotas de NaOH 4N y se agitó hasta que se volvió transparente.

Para realizar el recuento de las PGC y EGC se realizó histoquímica para fosfatasa alcalina, de forma que las células que presentan esta enzima (fosfatasa alcalina positiva) se tiñen de color rojo intenso (De Miguel y Donovan, 2000). Para ello se lavaron los pocillos con agua destilada antes de añadir una mezcla de 1 mg/ml Fast Red TR (Sigma) y 40 µl/ml de Naphthol AS-MX (Sigma) en agua destilada a pH 9. Se incubaron en oscuridad y temperatura ambiente durante 30 minutos o hasta que se observó tinción, momento en el que se volvieron a lavar los pocillos con dH<sub>2</sub>O.

Mediante un microscopio óptico invertido (Axiovert 200, Zeiss, Jena, Germany) se procedió a contar el número total de células teñidas y de colonias por pocillo. Se tomó como colonia toda agrupación de 8 o más células teñidas, considerando que estas células habían sufrido reprogramación, ya que las PGC crecen de forma aislada, mientras que las EGC lo hacen en forma agrupada en colonias (Donovan et al., 1986).

## 6- ESTUDIO ESTADÍSTICO

Se realizó mediante la *t* de Student a una significación del 0'05 utilizando el programa SigmaPlot Scientific Graphing System 4.10 (Systal Software, Chicago, IL, USA). Para la representación gráfica de las medias y desviaciones estándar del número de PGC, EGC y colonias de cada una de las diferentes condiciones de cada experimento, realizadas por triplicado, se utilizó el programa Microsoft Excel 2002 para Windows.

## 7- Diferenciación por medio de Formación de Cuerpos Embrioides (EBs)

La generación de cuerpos embrioides (EBs) que contengan células de las 3 hojas embrionarias se realizó mediante el cultivo no adherente de las colonias de EGC. Para ello se levantó el cultivo de EGC con colagenasa tipo I (Sigma) durante 15 minutos, tras lo cual se inhibió su actividad con medio de cultivo de PGC sin factores de crecimiento. La suspensión celular resultante se dejó reposar 30 minutos en una p100 normal (adherente) para permitir que las STO se pegaran al fondo de la placa y así retirarlas del cultivo. Este paso se realizó 2 veces antes de pasar las células a una p100 no adherente donde se dejaron crecer los EBs durante unos 10 días, tiempo en el cual se dejaba de observar cambios morfológicos en el desarrollo de los EBs o comenzaban a necrosarse.

Una vez obtenidos, los EBs se incluyeron en Tissue-Tek OCT (Optimal Cutting Temperature, Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) para la realización de criocortes, o se permitió que se adhirieran para su posterior diferenciación sembrándolos de nuevo en pocillos de cultivo adherente. Para la realización de bloques con OCT se dispuso una capa de menos de 1 cm en un criomolde de plástico y con una micropipeta se inyectaron los EBs dentro del OCT. A continuación se introdujo rápidamente el bloque en isopentano (Sigma) enfriado en N<sub>2</sub> líquido para congelarlo. El bloque resultante se talló con la ayuda de una cuchilla alrededor del lugar donde se encontraban los EBs para facilitar su localización en los cortes. Se realizaron cortes de ~5 µm en un criostato (Leica, Solms, Germany) y se adhirieron por contacto a portaobjetos (Hirschmann Laborgerate, Eberstadt, Germany) tratados 5' con Silano (Panreac) 1,5% en acetona (VWR) a temperatura ambiente, los cuales se guardaron a -80°C hasta el momento de realizar la inmunofluorescencia.

La diferenciación de los cuerpos embrioides puede ser espontánea, en la que se cultivan los EBs con medio PGC sin factores de crecimiento; o dirigida, en la que se utilizaron medios que promueven la diferenciación de estos EBs hacia una hoja embrionaria concreta:

- Endodermo: DMEM F-12 (Sigma) con 10% FBS y 1% Penicilina/Streptomicina.
- Mesodermo: Medio EB + 100 ng/ml BMP4 (R&D)
- Neuroectodermo: Medio EB + 10 µg/ml ácido retinoico (Sigma).

Estos cultivos se fijaron con paraformaldehído pH 7.4 al 4% en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente para realizar inmunofluorescencia de marcadores de las 3 hojas embrionarias.

## **8- INMUNOFLUORESCENCIA**

### **8.1- ICC marcadores PGC/EGC**

Para observar la expresión de diversas proteínas en los cultivos de PGC/EGC se realizaron técnicas de inmunofluorescencia siguiendo el siguiente protocolo. Como control positivo se utilizó la línea de células madre embrionarias (ESC) de ratón E14Tg2a. Se realizó doble inmunofluorescencia con SSEA1 (R&D Systems), molécula de adhesión con un importante papel en el proceso de compactación y la migración (Fenderson et al., 1987) y que, como ya hemos visto, se expresa tanto en células madre pluriotentes como en PGC, por lo que sirvió para localizar tanto las PGC como las EGC. Con el fin de asegurar la observación de las proteínas buscadas, se amplificó la señal mediante el uso de secundarios biotinilados. En el caso del marcaje por SSEA1 no hizo falta al ser la señal suficientemente intensa sin amplificación (Fenderson et al., 2005).

1. Permeabilización: Tritón x-100 (Sigma) 0.5% 10' a temperatura ambiente.
2. Bloqueo: 10% suero en PBS + 1% Albúmina Sérica Bovina (BSA, Sigma) 1h RT. Se utilizaron suero de caballo (Sigma) y conejo (Sigma) en función del anticuerpo secundario utilizado.

3. Anticuerpos primarios se disolvieron en PBS con 1% BSA y se incubaron con los cultivos durante toda la noche a 4°C:
  - a. 1. Anticuerpo anti-SSEA1 (R&D Systems) hecho en ratón (1:200).
  - b. Anti- KLF4 hecho en cabra 1:100 (R&D Systems).
  - c. Anti- C-MYC hecho en conejo 1:25 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).
  - d. Anti- LIFR hecho en conejo 1:200 (Santa Cruz Biotechnology).
  - e. Anti- C-KIT hecho en rata 1:100 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)
  - f. Anti- HIF-1 $\alpha$  1:1500 (desarrollado por la Dr. Berra, CicBioGUNE, Derio, España)
4. Lavados: 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con PBS con 1% de BSA .
5. Anticuerpos secundarios, RT:
  - a. Anticuerpo secundario biotinilado adecuado en función del anticuerpo primario utilizado: anti-cabra (Vector Labs. Burlingame, CA, USA), anti-conejo (Vector) o anti-rata (Vector) 1:100 en PBS + 1% BSA, 30' a temperatura ambiente (1h en el caso del anti-rata).
  - b. anti-ratón IgM-texas Red (Vector) 1:200 en PBS.
6. Lavados: 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con 1% de BSA en PBS.
7. Avidin Fluorescein (Vector) 1:750 en PBS 10' a temperatura ambiente en oscuridad.
8. Lavados: 3 veces durante 5 minutos a temperatura ambiente con PBS con 1% de BSA .
9. Tinción de los núcleos con DAPI (4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato, Sigma), colorante fluorescente que tiñe el DNA, 0,5  $\mu$ g/ml en PBS 5' en oscuridad
10. Montaje en Vectashield (Vector Labs. Burlingame, CA,USA) 1:10 en PBS.



El protocolo de inmunofluorescencia de HIF-1 $\alpha$  incluye algunos cambios con respecto al anterior:

- Se utilizaron células COS-7 en hipoxia como control positivo.
- El bloqueo consistió en 0,2% gelatina en PBS + 1% BSA, 30' a temperatura ambiente.
- El anticuerpo primario se diluyó en la solución de bloqueo.
- En lugar de Avidin Fluorescein se utilizó Strept. Cy3 (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) 1:5000 en PBS 20' a temperatura ambiente en oscuridad.

## **8.2- ICC marcadores hojas embrionarias**

Para observar la expresión de marcadores de las 3 hojas embrionarias en los cultivos de EBs diferenciados, se realizaron técnicas de inmunofluorescencia siguiendo un protocolo similar al ya descrito con algunas leves diferencias:

- No se realizó permeabilización previa.
- Las diluciones de los anticuerpos se realizaron en TBS (Tris-Buffered Saline) en lugar de PBS.
- Bloqueo en suero de cabra (Vector) durante 30' en lugar de 1h.
- Anti-conejo biotinilado 1h. En lugar de 30'.
- Avidin Fluorescein 1:100 30'.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron:

- a) Anti- S-100 hecho en conejo 1:50 (Dako, Glostrup, DK). Marcador de Ectodermo.
- b) Anti-  $\alpha$ -Fetoproteína hecho en conejo 1:100 (Dako). Marcador de Endodermo temprano.
- c) Anti- Albúmina hecho en conejo 1:100 (Dako). Marcador de Endodermo. En

el protocolo de inmunofluorescencia de Albúmina lógicamente no se utilizó BSA por interferir con la técnica.

d) Anti-  $\alpha$ -actina hecho en conejo 1:20 (Dako). Marcador de Mesodermo.

Para realizar la técnica de inmunofluorescencia para  $\alpha$ -Actina (marcador de Mesodermo), se utilizó un protocolo optimizado para citoesqueleto (Herzog et. al., 1994):

1. Los cultivos fueron lavados en Buffer de Citoesqueleto (CB) pH=6.1 consistente en 150 mM NaCl, 5mM EGTA (Sigma), 5 mM MgCl<sub>2</sub> y 5mM glucosa en H<sub>2</sub>O.
2. Permeabilización: Tritón x-100 0,1% en CB 1'.
3. Bloqueo: 2% suero de caballo + 1% BSA en TBS, 5' a temperatura ambiente.
4. Anti-  $\alpha$ -Actina (Dako) 1:20 en bloqueo 1h.
5. Lavados: 3 veces durante 5' a temperatura ambiente con TBS.
6. Anti-ratón biotinilado (Vector) 1:100 en TBS 30'
7. Lavados: 3 veces durante 5' a temperatura ambiente con TBS.
8. Avidin Texas Red (Vector) 1:50 en TBS 20'
9. Lavados: 3 veces durante 5' a temperatura ambiente con TBS.
10. DAPI 1/10000 5' oscuridad.
11. Montaje en Vectashield 1:10 en PBS.

### **8.3- Inmunofluorescencia sobre criocortes.**

Se utilizó el mismo protocolo que en cultivos, salvo por la fijación que se realizó sumergiendo los portaobjetos con los cortes en metanol (BDH Prolabo, VWR) durante unos segundos y dejando secar a temperatura ambiente. Como control positivo se utilizaron criocortes de EBs obtenidos de la línea de células EG TGC10 por diferenciación espontánea en cultivo no adherente.

Como controles negativos se utilizaron cultivos a los que no se le había añadido anticuerpo primario, o bien condiciones de no activación de la molécula implicada.

Todos los anticuerpos utilizados del laboratorio farmacéutico Dako fueron cedidos por el Dr. Nistal, de la Unidad de Anatomía Patológica del Hospital Universitario La Paz.

## **9- OBTENCIÓN DE IMÁGENES**

Para realizar las fotografías se utilizó el controlador Nikon DS-U2 conectado al microscopio y el software NIS-Elements F22 (Nikon, Shinjuku, Tokyo, Japan).

## **10- CITOMETRÍA DE FLUJO**

La expresión de Oct4 en PGC se cuantificó por Citometría de Flujo Fluorescente (FACS) usando el anticuerpo SSEA-1 para marcar las PGC tras el cultivo de PGC en condiciones de normoxia e hipoxia a diferentes días. Dado que nuestras células proceden de ratones transgénicos que expresan GFP bajo el promotor de Oct4, se pudo cuantificar la expresión de Oct4 sin necesidad de marcaje por anticuerpos.

### **1. Inmunocitoquímica anti-SSEA1:**

- a. Se preincubaron los anticuerpos primario y secundario Anti-SSEA1 1:200 + anti-ratón APC (eBioscience, San Diego, CA, USA) 1:200 durante 30' a 37°C en PBS/FBS 1:1.
  - Como control negativo se utilizó Isotipo IgM hecho en ratón (Sigma) + anti-ratón APC.
- a. Se levantaron los cultivos de PGC como se describió para el pase de las EGC.
- b. Se centrifugaron las suspensiones celulares para eliminar la tripsina a 400 g durante 5' a 4°C.
- c. Se resuspendieron las células con los anticuerpos preincubados.

- d. Se lavaron 2 veces durante 5' con PBS/FBS 1:1 y centrifugación a 1200 r.p.m.
  - e. Se resuspendieron en PBS con 2% FBS y 5nM EDTA.
2. Las poblaciones celulares se adquirieron en el citómetro de flujo fluorescente (FACSCalibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA) equipado con tres rayos laser: azul 488nm (600v), rojo 633nm (550v) y violeta 405nm (650v); y para el analisis se utilizó el programa CellQuest Pro (Becton Dickinson).

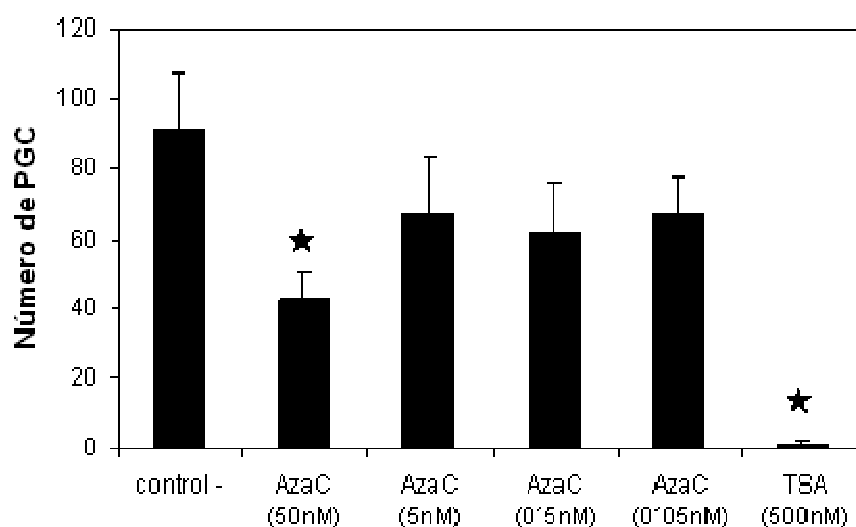
# **RESULTADOS**



## **1- La modificación del estado epigenético no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC.**

5-Aza-2-Desoxicitidina (AzaC) y Tricostatina A (TSA) son dos fármacos que modifican el estado epigenético de las células, provocando la demetilación del DNA y la acetilación de histonas respectivamente. En primer lugar, se ajustó su dosis a la sensibilidad, tanto de las PGC como de las células nutricias STO. Para ello, se sometieron las STO sin irradiar, ya que la proliferación es necesaria para el efecto demetilante del AzaC, a diferentes concentraciones logarítmicas de ambos fármacos. Así, se observó que a una concentración de AzaC de 500nM las células STO comenzaban a desprenderse tras 3 días en cultivo, no así a 50nM. Del mismo modo se comprobó que ninguna de las concentraciones de TSA testadas provocaba daños en las STO. De esta forma se establecieron las concentraciones de partida para los experimentos con PGC en 50nM para el AzaC y 500nM para el TSA. En ningún caso se observaron diferencias morfológicas con respecto a los controles tras un análisis microscópico con contraste de fase. Tampoco se observaron diferencias morfológicas en los núcleos teñidos con DAPI.

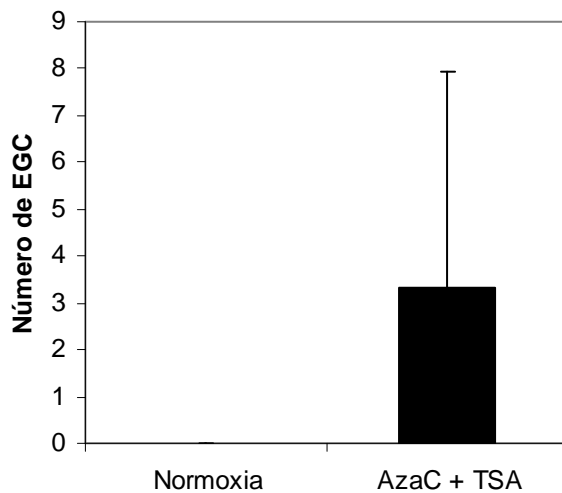
Primero se observó el efecto individual de cada uno de estos fármacos sobre las PGC. En ningún caso se detectó una mejora en la supervivencia o reprogramación a EGC, pero se establecieron las dosis a partir de las cuales resultaban perjudiciales para las PGC a partir de 3 diferentes experimentos por triplicado. Así, una concentración de 50nM de AzaC produce un descenso significativo de la supervivencia, mientras que a menores concentraciones no se apreció diferencia alguna. En el caso del TSA se comprobó que una concentración de 500nM durante 24 horas afectaba de forma muy negativa a la supervivencia de las PGC (Fig. 3).



**Figura 3:** Número de PGC tras 7 días en cultivo con diferentes concentraciones de AzaC y TSA. Se aprecia un descenso significativo (★,  $p < 0,05$ ) del número de PGC con AzaC 50nM y TSA 500nM. Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.

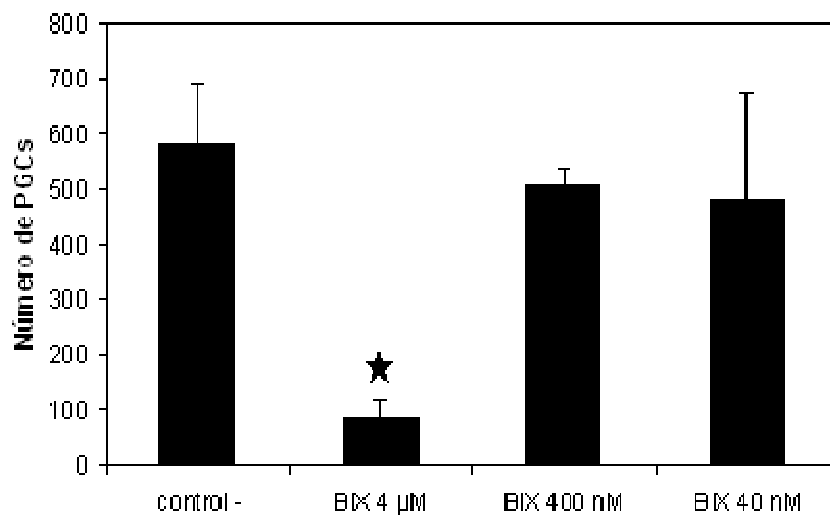
No habiéndose observado mejoría en la supervivencia o reprogramación de las PGC con estos fármacos aplicados de forma individual, se procedió a utilizarlos de forma conjunta reduciendo las dosis. En total, se realizaron 19 experimentos, siempre por triplicado, con estos tratamientos. Se realizaron diferentes combinaciones de concentraciones y tiempos de tratamiento, concluyendo que concentraciones iguales o inferiores a 5nM en el caso del AzaC y de 500nM durante 12 horas en el caso del TSA no afectaban negativamente a la supervivencia de las PGC. Pensando que tal vez la toxicidad de estos fármacos estuviera enmascarando los efectos positivos, se disminuyó aún más la dosis de éstos, llegando a observarse un aumento no significativo en la formación de colonias al utilizar AzaC en días alternos y TSA durante 12 horas (Fig. 4).





**Figura 4:** Formación de colonias en cultivos de PGC a los 7 días. TSA 50nM se administró durante 12 horas en día 2 y AzaC 5nM en los días 2,3,5 y 7. La gráfica corresponde a un experimento realizado por triplicado en donde los resultados no resultaron significativos con  $p < 0,05$ .

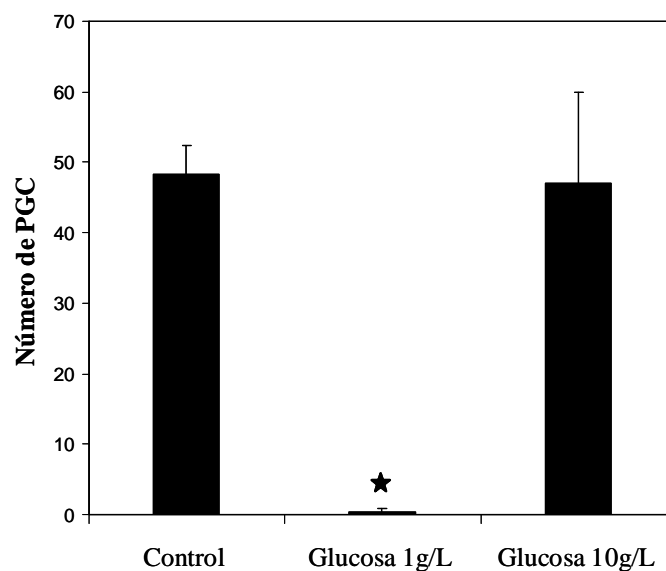
Finalmente, se estudió el efecto de un modificador de histonas, el BIX-01294, responsable de la inhibición de la metiltransferasa de histonas G9a. Al igual que con los anteriores tratamientos, se utilizaron diferentes concentraciones, observándose un efecto nocivo sobre la supervivencia de las PGC con dosis de 4 $\mu$ M, y ningún efecto de mejora significativo sobre el crecimiento o la reprogramación de las PGC en las demás concentraciones (Fig. 5).



**Figura 5:** Efecto del tratamiento con diferentes concentraciones de BIX-01294 en los cultivos de PGC a los 7 días. El único efecto observado es el descenso en el número de PGC con 4 $\mu$ M (★,  $p < 0,05$ ). Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.

## 2- La concentración de glucosa en el medio no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC.

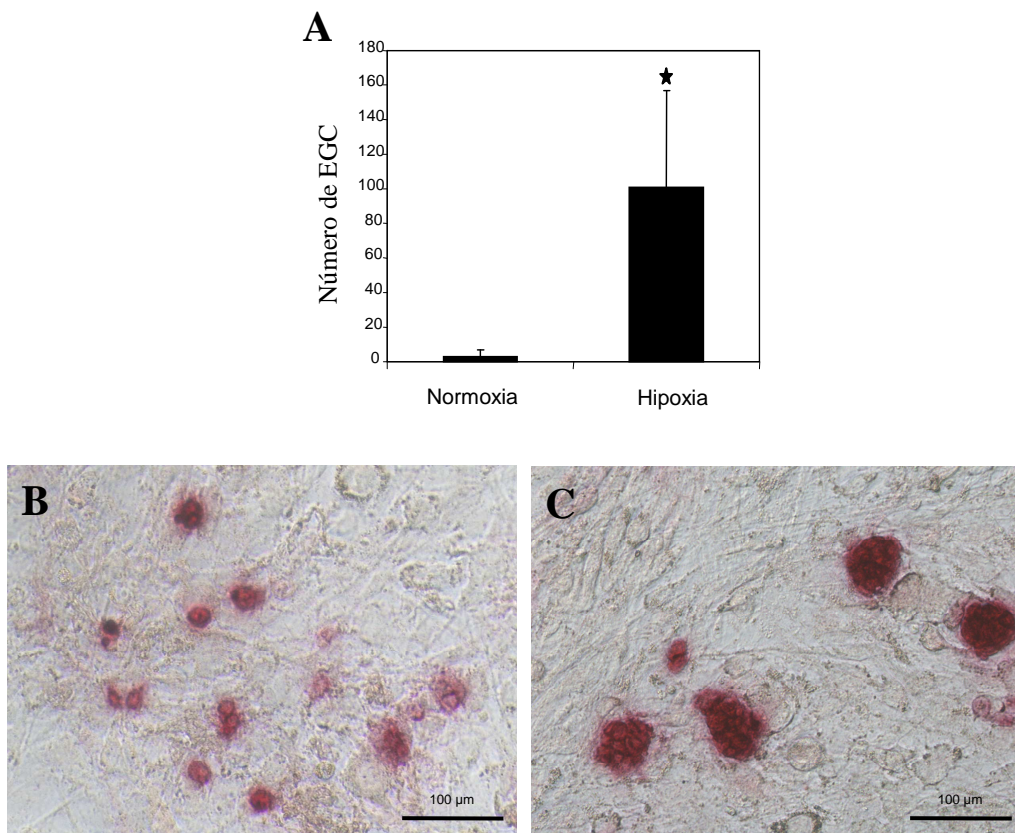
Se cultivaron las PGC con diferentes concentraciones de glucosa con el fin de averiguar su efecto en la inducción de pluripotencialidad. Se observó que un bajo nivel de glucosa (1g/L) afectaba negativamente al crecimiento de las PGC en cultivo. Por otro lado, un alto nivel de glucosa (10g/L) no variaba el crecimiento o inducción de pluripotencialidad con respecto a la concentración estándar (4.5g/L) (Fig. 6).



**Figura 6:** Una baja concentración de glucosa en el medio (1g/L) afecta negativamente al crecimiento de las PGC tras 7 días en cultivo, mientras que una concentración de glucosa de 10g/L no provoca ningún cambio. 4 $\mu$ M (★,  $p < 0,05$ ). Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.

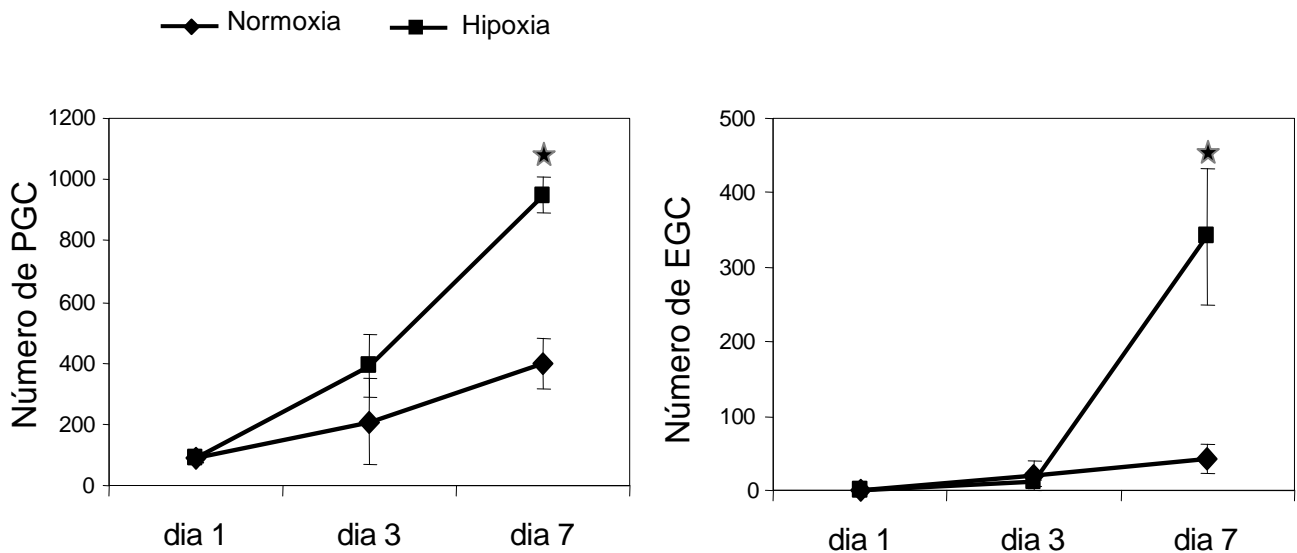
### 3- La hipoxia provoca la formación de colonias en las PGC.

En los experimentos realizados en hipoxia se observó un aumento significativo en el número de PGC con respecto al control en normoxia. Además, la hipoxia también contribuyó a un incremento en el número de células similares a EGC, formando colonias, desarrollándose éstas incluso en ausencia de bFGF, 2i u otro tratamiento utilizado para la reprogramación de las PGC (Fig. 7). Estos resultados demuestran que las PGC en hipoxia son capaces de reprogramarse de forma similar a como lo hacen en presencia de bFGF.



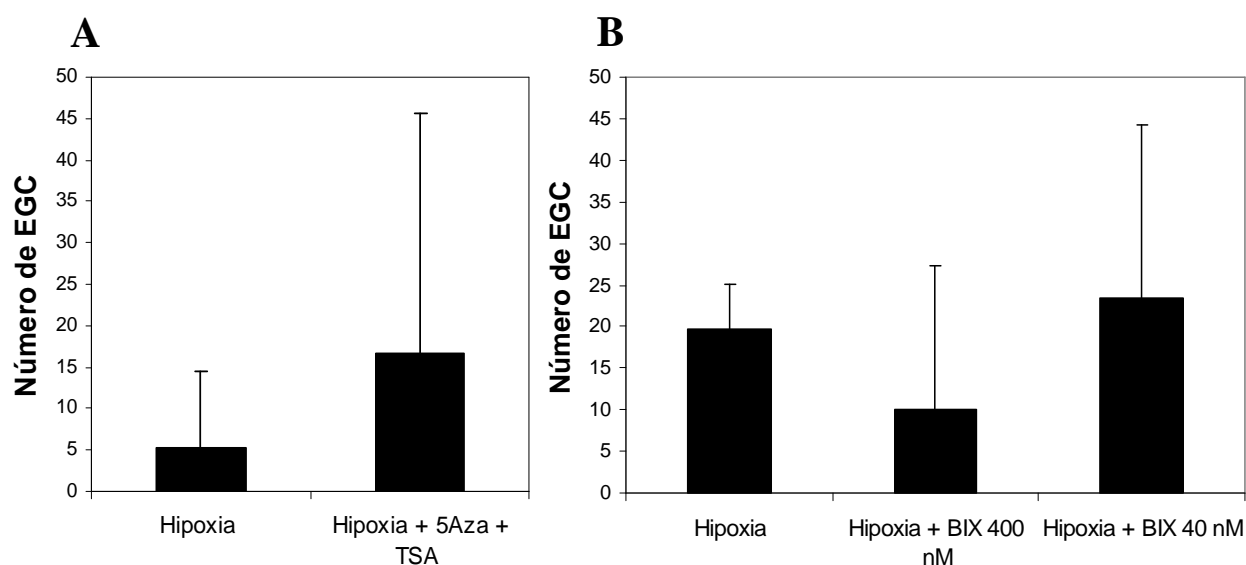
**Figura 7:** Las condiciones hipóxicas inducen la formación de colonias en PGC en ausencia de bFGF tras 7 días en cultivo. **A:** Número de EGC en normoxia e hipoxia correspondiente a un experimento representativo realizado por triplicado ( $\star$ ,  $p < 0,05$ ). **B:** PGC fijadas tras 7 días en normoxia teñidas mediante inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina. **C:** Cultivo de PGC que han dado lugar a colonias tras 7 días de cultivo en hipoxia teñido mediante inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina.

Para observar la dinámica de la mejora en el crecimiento de las PGC y la formación de colonias, se fijaron los cultivos en los días 1, 3 y 7 después de la siembra, observándose diferencias significativas entre normoxia e hipoxia sólo al cabo de 7 días (Fig. 8).



**Figura 8:** En cultivos de PGC en ausencia de bFGF el aumento del número de PGC y EGC en hipoxia, es significativo a partir del día 7 de cultivo (\*,  $p < 0,05$ ). Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.

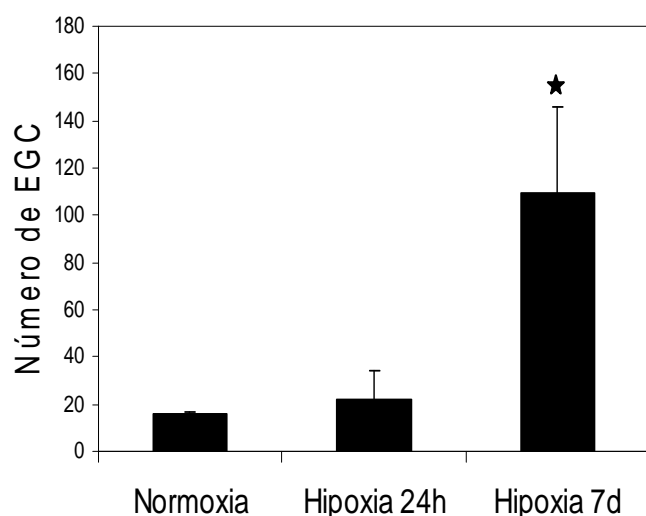
Habiendo observado efectos positivos en la reprogramación celular de las PGC con hipoxia, se combinó esta condición con los fármacos utilizados anteriormente, AzaC, TSA y BIX-01294, pero no se detectó sinergia entre las diferentes condiciones de manera significativa (Fig. 9)



**Figura 9:** Formación de colonias en cultivos de PGC tras 7 días en cultivo en hipoxia con o sin modificadores epigenéticos. **A:** TSA 50nM se durante 12 horas en día 2 y AzaC 5nM en los días 2,3,5 y 7 (igual que en Fig. 3). **B:** Combinación de hipoxia con 2 concentraciones no tóxicas para las PGC de BIX-01294. Los resultados muestran que no existen diferencias significativas al añadir estos tratamientos a los cultivos en hipoxia ( $p < 0,05$ ). Cada gráfica corresponde a un experimento representativo realizado por triplicado.

#### **4- Es necesario mantener las condiciones hipóxicas para inducir pluripotencialidad en las PGC.**

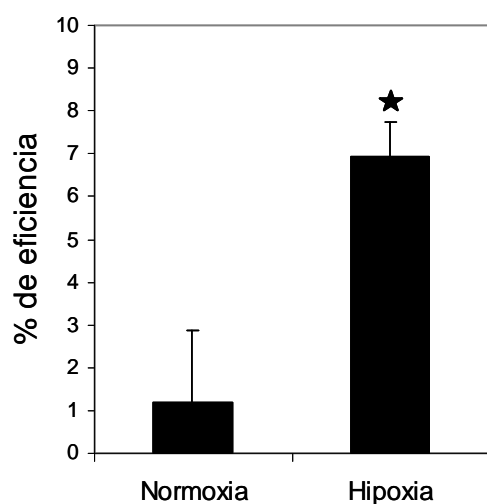
Con el fin de averiguar si es necesario mantener las condiciones hipóxicas para producir los efectos descritos en las PGC, se realizaron 4 experimentos en los cuales se compararon cultivos en normoxia, en hipoxia sólo durante las primeras 24 horas y en hipoxia continuada. Los resultados indicaron que, al contrario que el bFGF, cuyo efecto sobre las PGC se consigue con sólo administrarlo durante las primeras 24 horas del cultivo, la hipoxia debe ser mantenida para inducir pluripotencialidad en las PGC (Fig. 10).



**Figura 10:** Número de EGC tras 7 días en cultivo. El efecto inductor de la pluripotencialidad en las PGC se produce manteniendo las condiciones hipóxicas durante 7 días pero no si estas se limitan a las primeras 24 horas (\*,  $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden a un experimento representativo realizado por triplicado.

### 5- La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia es de aproximadamente un 7%.

Se calculó la eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia sembrando una PGC por pocillo en placas Terasaki de 384 pocillos. Tras 7 días de cultivo en condiciones hipóxicas, se procedió a observar la presencia de colonias fosfatasa alcalina positivas. El resultado de los 3 experimentos realizados indica que el 6,9% de un total de 135 PGC sembradas dieron lugar a colonias (Fig. 11). Además, de esta forma se comprobó que la formación de colonias es a partir de una sola PGC, y no como resultado del efecto de la agregación de PGC migratorias en el cultivo.

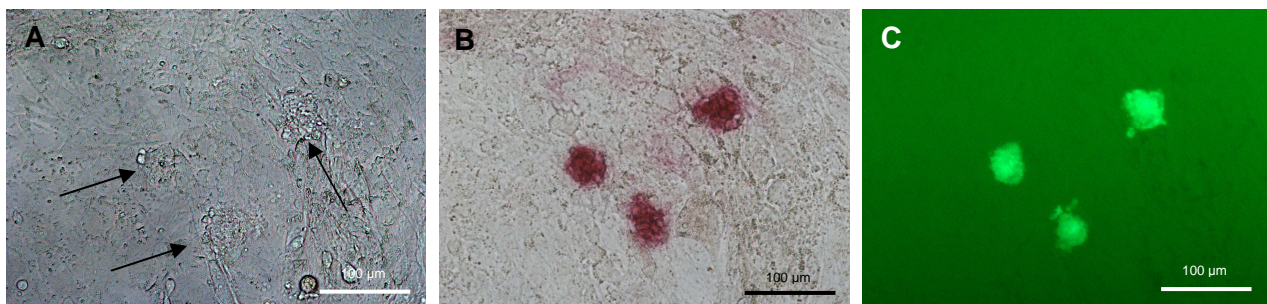


**Figura 11:** La eficiencia de inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia es de un 6,9%. Para medir esta eficiencia se sembró una PGC en cada pocillo de placas Terasaki de 384 pocillos y se observó la formación de colonias tras 7 días en cultivo. (\*,  $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden a la media de 3 experimentos independientes.

## 6- Las células obtenidas de PGC reprogramadas en hipoxia comparten características con las células madre pluripotentes.

### 6.1- Las colonias producidas por la hipoxia son Oct4 positivas.

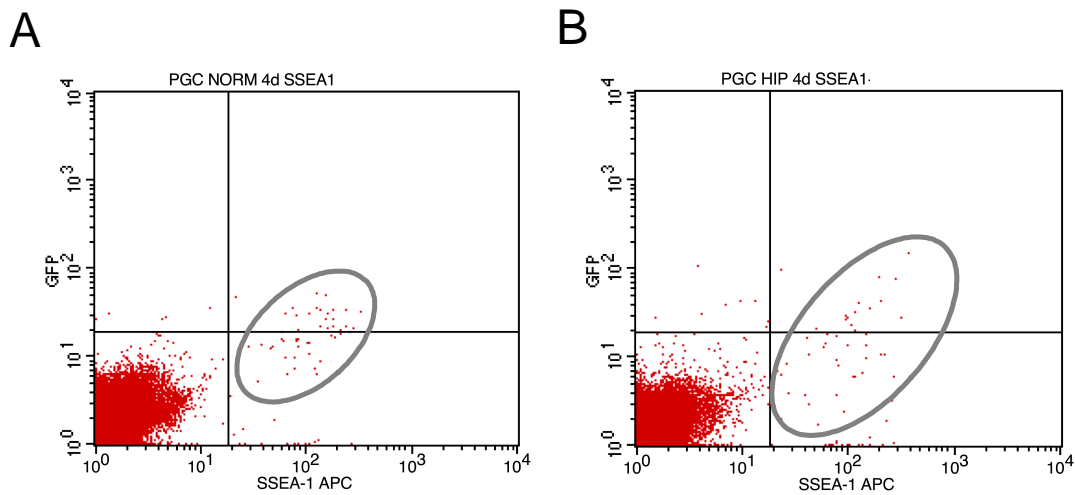
Las colonias obtenidas cultivando las PGC en hipoxia y en ausencia de bFGF son morfológicamente normales y fosfatasa alcalina positivas. Además, el uso de ratones transgénicos Oct4-GFP permitió demostrar su expresión del marcador de pluripotencia Oct4 (Fig.12).



**Figura 12:** Colonias obtenidas de PGC por hipoxia. **A:** Contraste de fase. Las flechas señalan las 3 colonias. **B:** Inmunohistoquímica para fosfatasa alcalina tiñe las colonias. **C:** En fluorescencia se aprecia que las colonias son Oct4-GFP positivas.

### 6.2- La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC.

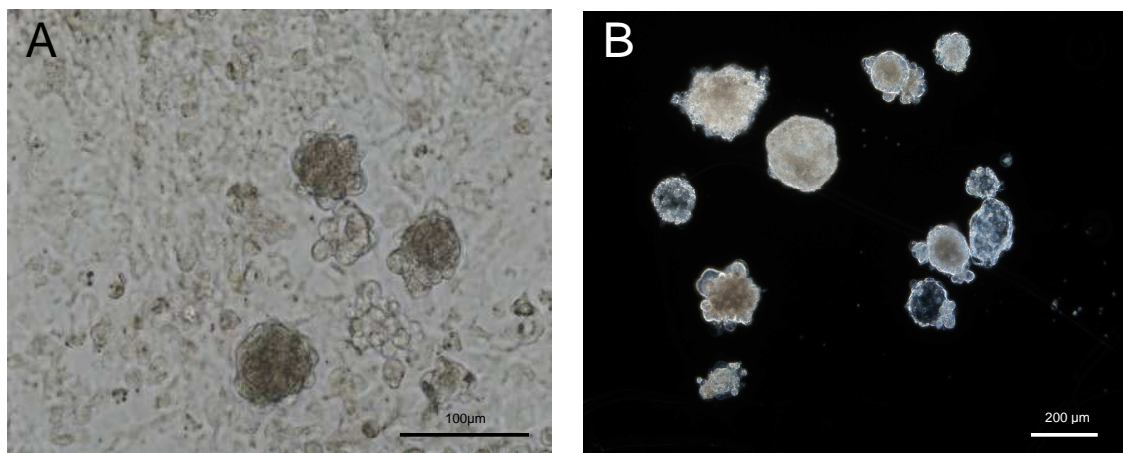
Mediante citometría de flujo se estudió el efecto de la hipoxia en la expresión de Oct4. El objetivo era observar cambios en la expresión de Oct4 en las PGC durante el proceso de inducción de pluripotencialidad por hipoxia que pudieran ayudar a explicar el mecanismo celular implicado. Se observó que, a los 4 días en cultivo, las PGC en normoxia expresaban Oct4 de forma homogénea, mientras que en hipoxia la expresión de Oct4 se muestra más heterogénea (Fig. 13).



**Figura 13:** Citometría de flujo frente a SSEA1 y Oct4-GFP de PGC cultivadas durante 4 días en normoxia (**A**) e hipoxia (**B**). Se puede observar la mayor heterogeneidad de la expresión de Oct4-GFP en las PGC (células positivas para SSEA1) en hipoxia (círculos).

### 6.3- Las células obtenidas de PGC en hipoxia son pluripotentes.

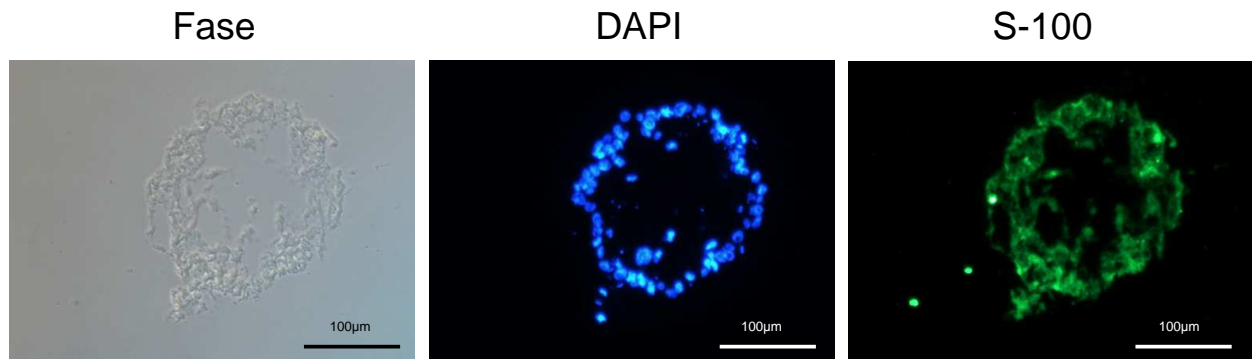
Se obtuvieron Cuerpos Embrioides (EBs) de los cultivos de PGC en hipoxia, tanto de forma espontánea como tras cultivar las colonias obtenidas en condiciones no adherentes (Fig. 14).



**Figura 14:** EBs obtenidos a partir de cultivos de PGC en hipoxia de forma espontánea (**A**) o tras cultivo en condiciones no adherentes (**B**).



Mediante inmunohistoquímica de criocortes de estos EBs se demostró que contenían células de Ectodermo (Fig. 15).



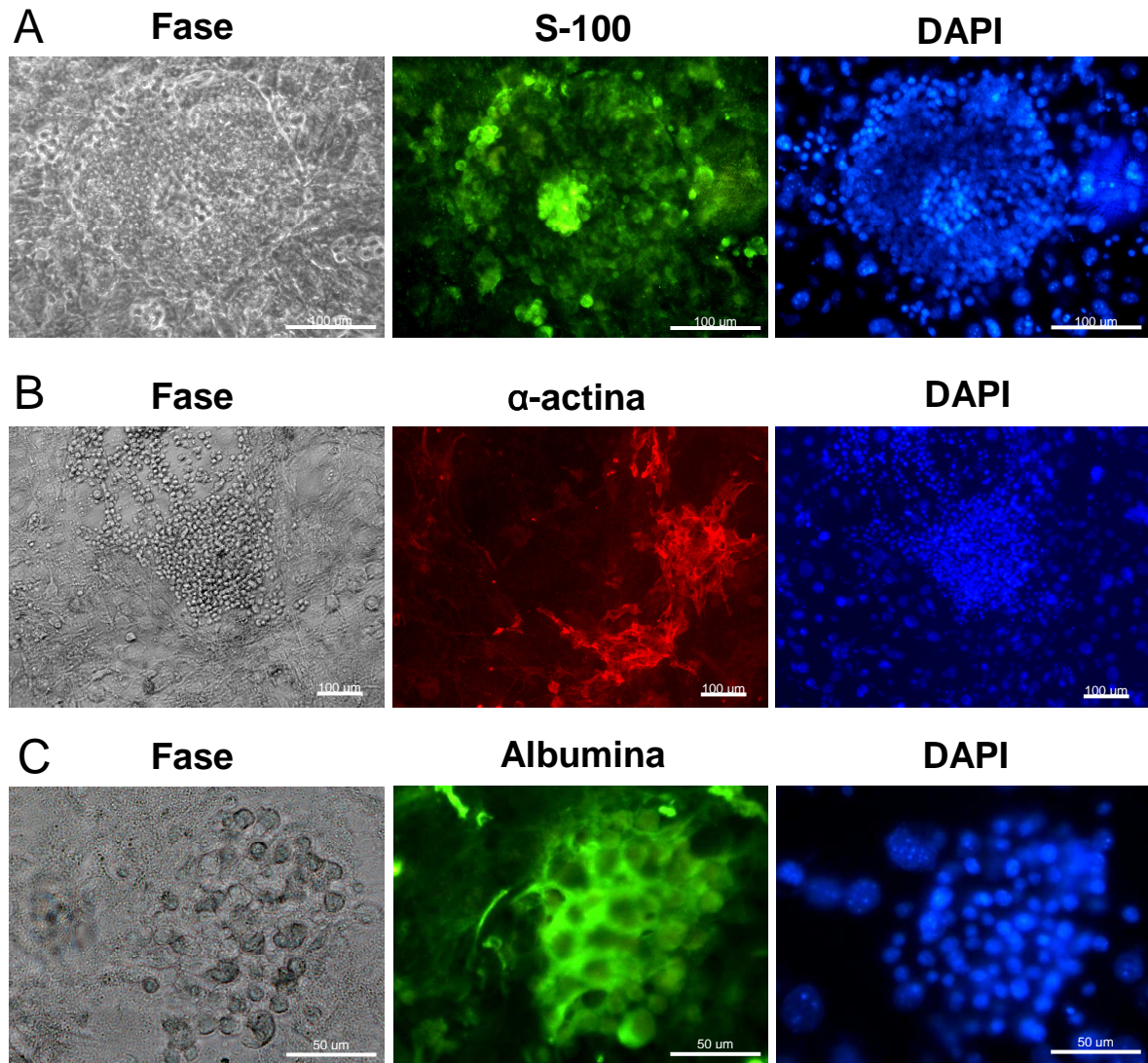
**Figura 15:** Expresión de S-100 (ectodermo) en criocortes de EB obtenidos del cultivo en condiciones no adherentes de colonias provenientes de cultivos de PGC en hipoxia.

Se permitió que los EBs se adhirieran de nuevo a las placas de cultivo para que se diferenciaran espontáneamente (Fig. 16).



**Figura 16:** Adhesión de un EB obtenido de PGC en hipoxia a la placa de cultivo y posterior diferenciación espontánea.

Mediante inmunohistoquímica se demostró que los EBs podían diferenciarse hacia las 3 hojas embrionarias. Se utilizaron los siguientes marcadores: S-100 para marcar ectodermo,  $\alpha$ -actina para marcar mesodermo y albúmina para marcar endodermo (Fig. 17).

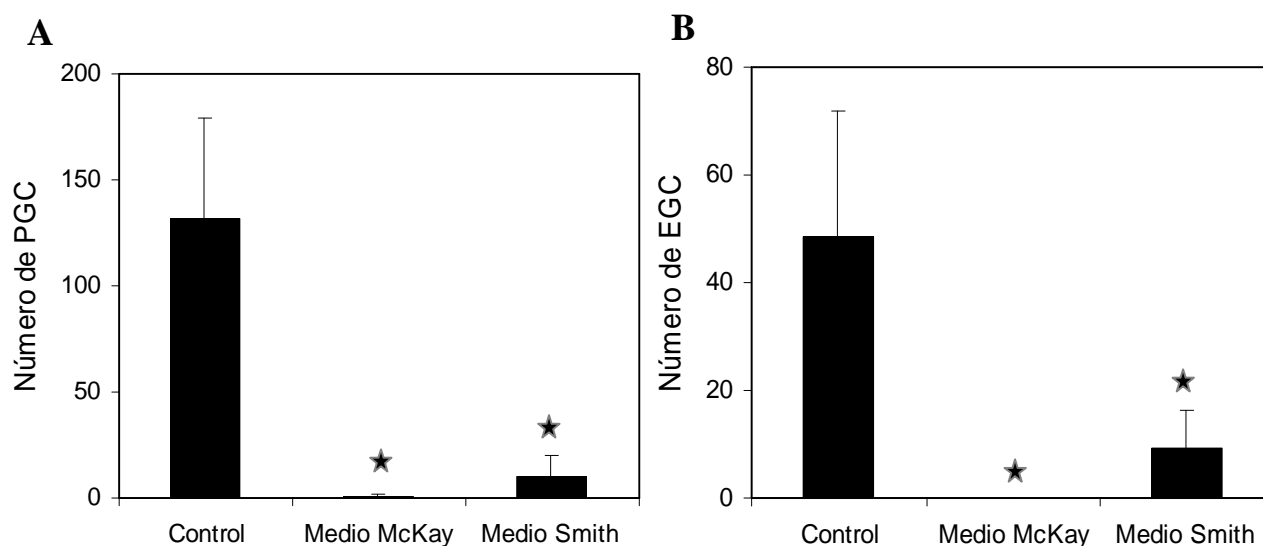


**Figura 17:** Los cuerpos embrioides obtenidos de PGC en hipoxia pueden diferenciarse hacia las 3 hojas embrionarias. **A:** Inmunofluorescencia frente a S-100 que demuestra la diferenciación hacia ectodermo. **B:** Inmunofluorescencia frente a  $\alpha$ -actina que demuestra la diferenciación hacia mesodermo. **C:** Inmunofluorescencia frente a albúmina que demuestra la diferenciación hacia endodermo.

#### 6.4- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia no proliferan a largo plazo.

Ya que hemos demostrado que la hipoxia es un inductor de pluripotencialidad en PGC por sí solo, se procedió entonces a aumentar la duración de los experimentos. De esta manera comprobamos que las colonias obtenidas eran de hecho EGC, ya que las PGC no sobreviven más de una semana en cultivo. Se mantuvieron los cultivos durante varias semanas, para lo cual se tuvieron que realizar varios subcultivos. Aunque se pudieron realizar los pases adecuadamente, no llegamos a observar colonias positivas para Oct4 y fosfatasa alcalina más allá de la tercera semana (pase 2), lo que demuestra la presencia de células pluripotentes pero no inmortales.

La incapacidad de estas células para sobrevivir a largo plazo en cultivo nos llevó a pensar en una posible identidad diferente a la de EGC, tal vez más parecida a la de EpiSC. El cultivo en condiciones no adecuadas para estas células podría ser el motivo de su no supervivencia a largo plazo, por lo que se procedió a cultivar estas células con diferentes medios propios de EpiSC. Al cultivar las PGC en hipoxia con estos medios se redujo drásticamente su número en cultivo en relación con el medio utilizado habitualmente (Fig. 18A), así como el de colonias derivadas de éstas (Fig. 18B).

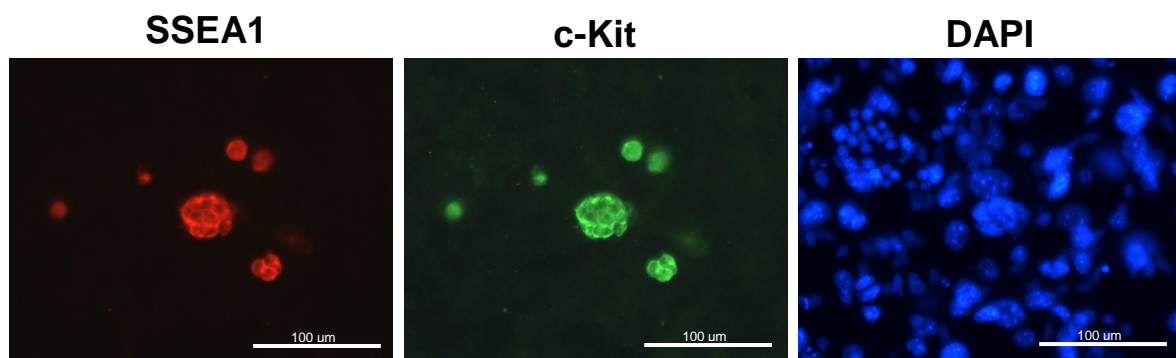


**Figura 18:** Efecto de los medios de cultivo de EpiSC sobre los cultivos de PGC tras 7 días en hipoxia. Los medios McKay y Smith (ver material y métodos pag. 47) resultan perjudiciales para el crecimiento (A) y formación de colonias (B) de las PGC (★,  $p < 0,05$ ). Los resultados corresponden a un experimento representativo realizado por triplicado.

Habiendo observado el efecto perjudicial de estos medios sobre las PGC se procedió a utilizarlos únicamente tras el primer pase, después de haber obtenido colonias en medio PGC en hipoxia. Las pocas colonias que se mantuvieron en cultivo con estos medios no sobrevivieron más tiempo que con el medio propio de EGC.

#### 6.5- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia expresan el marcador de línea germinal c-Kit.

Con el fin de averiguar más acerca de la identidad de las células obtenidas, se realizó inmunofluorescencia frente al marcador de línea germinal c-Kit, presente en EGC pero no en ESC o EpiSC (Fig. 19). La presencia de este marcador en las células pluripotentes inducidas por hipoxia en PGC indica una mayor proximidad a las EGC que a otros tipos de células madre pluripotentes.

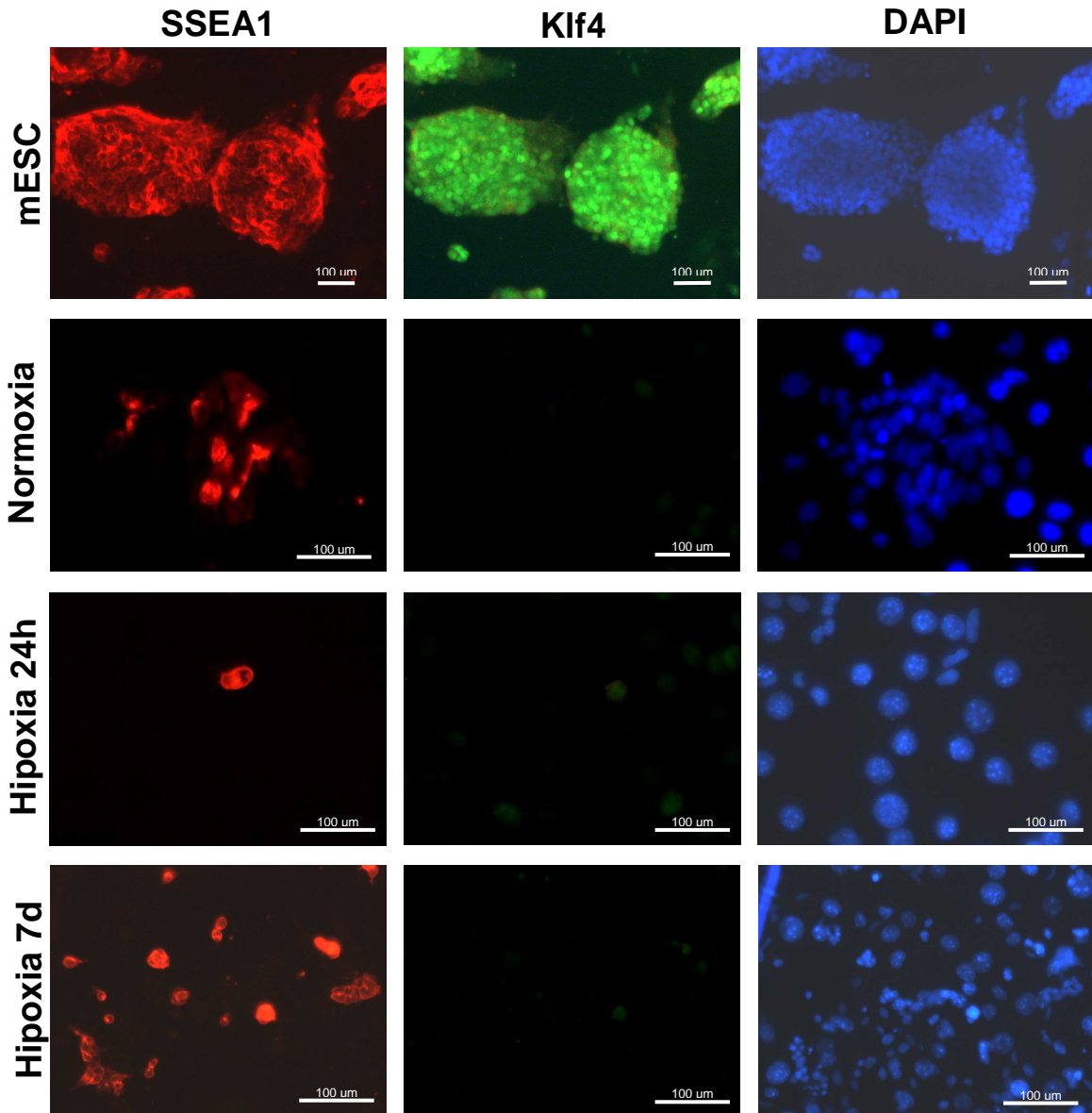


**Figura 19:** Inmunofluorescencia frente al marcador de línea germinal c-Kit. Las colonias obtenidas de PGC en hipoxia son claramente positivas.

#### 6.6- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia no expresan Klf4 y c-Myc.

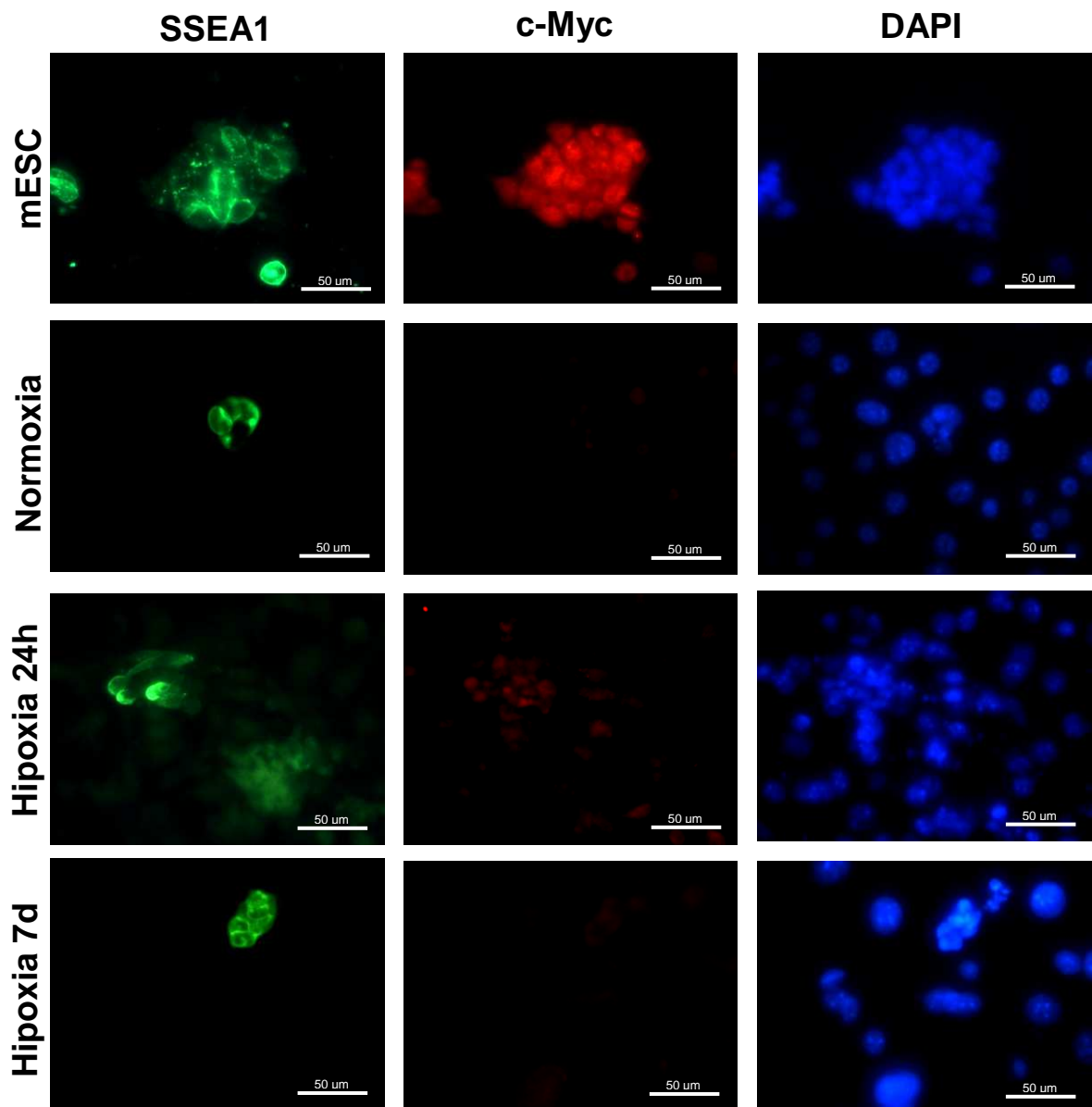
Puesto que la inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia no da lugar a células capaces de sobrevivir en cultivo a largo plazo, se procedió a investigar el motivo de esta diferencia con respecto a otras células pluripotentes. Mediante inmunofluorescencia frente a marcadores de células madre, se descubrió que las células obtenidas en hipoxia no expresaban Klf4 (Fig. 20) ni c-Myc (Fig. 21), al contrario que las ESC o líneas inmortales de EGC. Con el fin de comprobar una posible expresión transitoria de estos marcadores en los primeros días de cultivo en hipoxia, se realizó inmunofluorescencia frente a estos marcadores a las 24 horas tanto como a los 7 días. Los resultados descartaron esta

expresión transitoria. La ausencia de estos marcadores podría explicar que no sean células inmortales.



**Figura 20:** Inmunofluorescencia frente al marcador de células madre Klf4. Como control positivo se utilizaron células ESC de ratón de la línea E14Tg2a. Tanto las PGC en normoxia e hipoxia como las colonias obtenidas de PGC en hipoxia no mostraron presencia de este marcador, al contrario que las ESC.

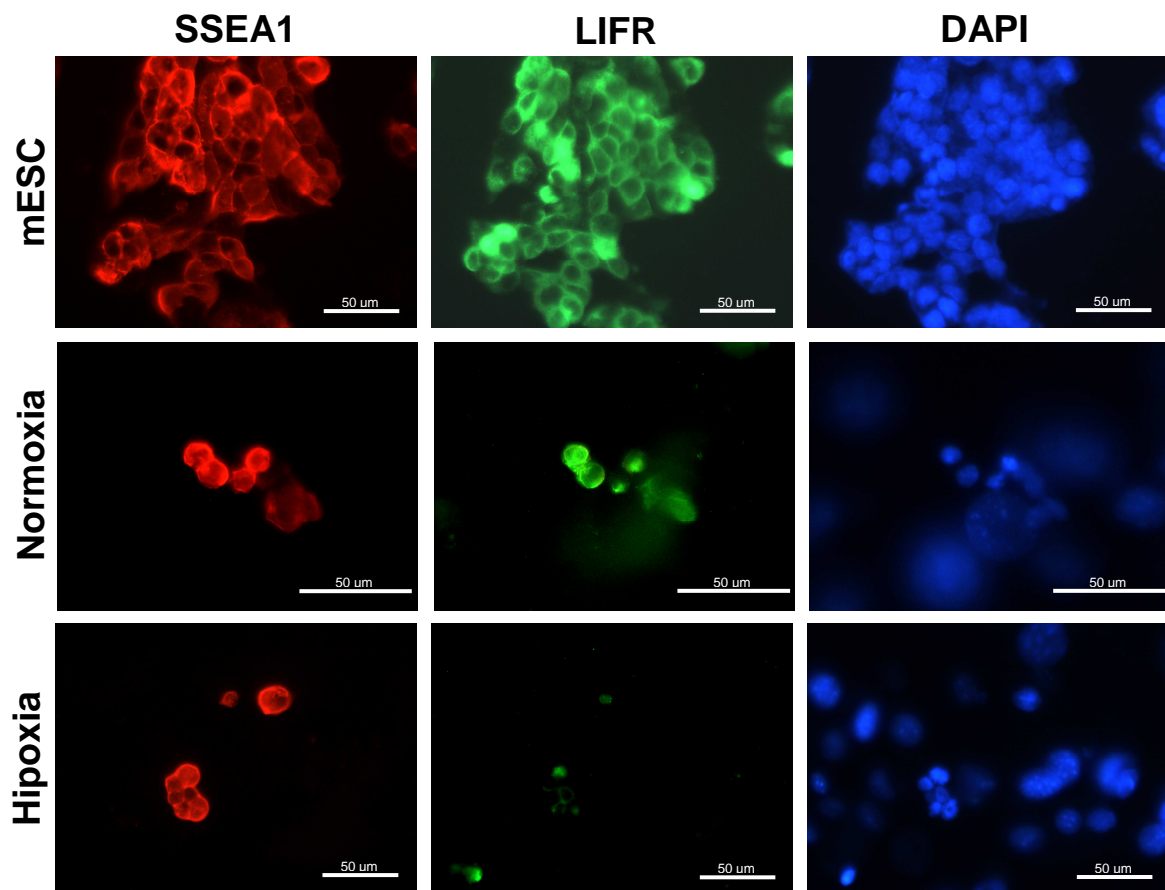




**Figura 21:** Inmunofluorescencia frente al marcador de células madre c-Myc. Como control positivo se utilizaron células ESC de ratón de la línea E14Tg2a. Tanto las PGC en normoxia e hipoxia como las colonias obtenidas de PGC en hipoxia no mostraron presencia de este marcador, al contrario que las ESC.

### 6.7- La expresión del receptor de LIF (LIFR) se inhibe en PGC en hipoxia.

La no supervivencia a largo plazo de las células obtenidas de PGC en hipoxia, así como la rápida diferenciación espontánea de los EBs, sugirió la hipótesis de que la hipoxia puede tener un segundo efecto sobre estas células como promotor de la diferenciación. Debido a que en ESC la hipoxia puede provocar este efecto inhibiendo la expresión de LIFR y por lo tanto la imposibilidad del efecto sobre el mantenimiento de la pluripotencialidad ejercido por LIF, se estudió la expresión de esta proteína en las PGC en hipoxia. Se realizó inmunofluorescencia frente a LIFR en PGC en hipoxia demostrándose su inhibición con respecto a normoxia (Fig. 22).

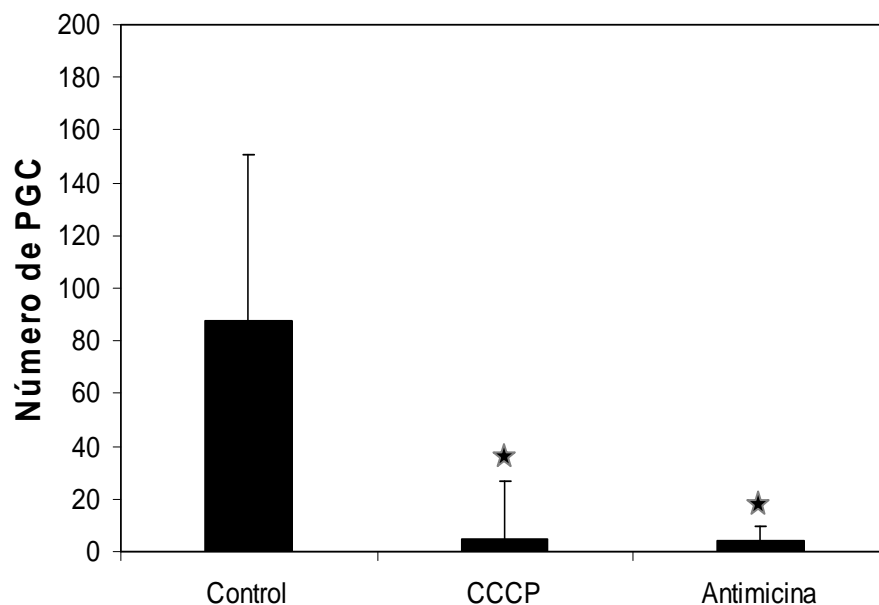


**Figura 22:** Inmunofluorescencia frente a LIFR muestra su inhibición de la expresión en PGC en hipoxia en contraste con ESC y PGC en normoxia.

## 7- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIFs.

### 7.1- El tratamiento con inhibidores farmacológicos de la función mitocondrial no provocó la inducción de pluripotencialidad en PGC.

Uno de los efectos de la hipoxia es la reducción de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, ya que ésta depende de la presencia de oxígeno. Con el propósito de comprobar si este cambio metabólico es el responsable de la inducción de pluripotencialidad en las PGC en hipoxia, se utilizaron 2 inhibidores farmacológicos de la función mitocondrial: CCCP y Antimicina. Ambos fármacos resultaron ser tóxicos para las PGC, tanto en normoxia como en hipoxia (Fig. 23).

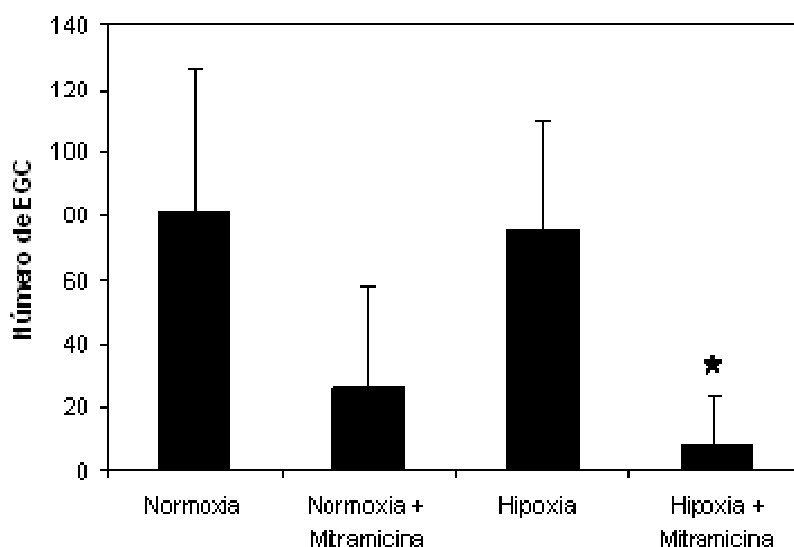


**Figura 23:** Los tratamientos con CCCP y Antimicina afectan negativamente al crecimiento y no inducen pluripotencialidad en las PGC (★  $p < 0,05$ ). Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.



### 7.2- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIF-1

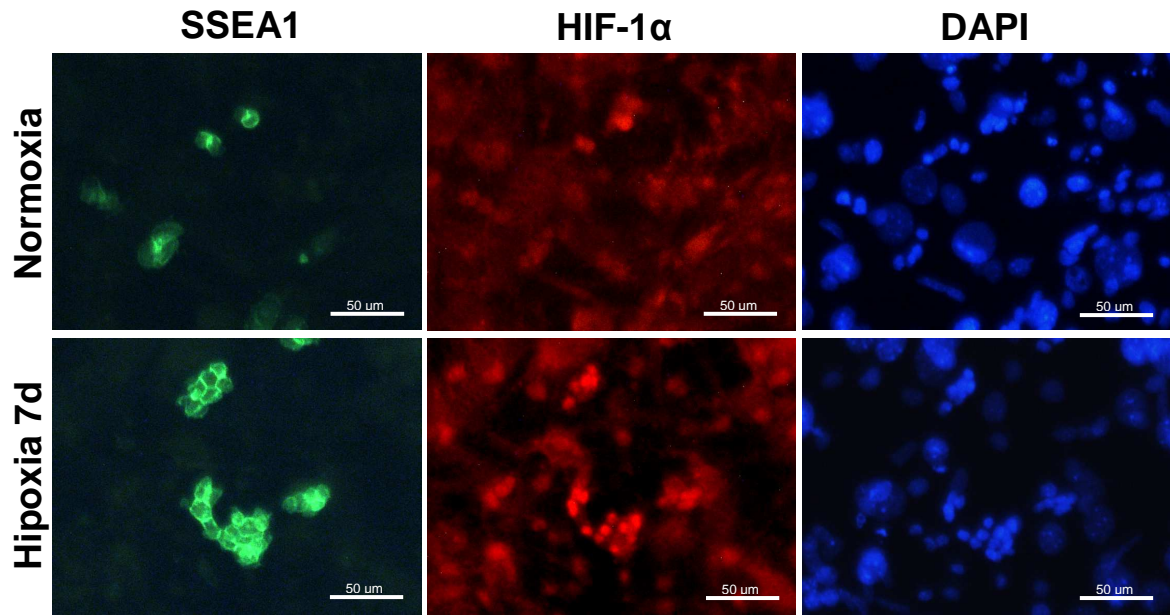
La inducción de la expresión de HIFs es el mayor responsable de la respuesta celular a hipoxia. Para intentar dilucidar el mecanismo celular por el cual la hipoxia induce pluripotencialidad en las PGC se realizaron 4 experimentos en los que se trataron las PGC tanto en normoxia como en hipoxia con mitramicina, un inhibidor farmacológico de HIF. Tal y como se esperaba, en los cultivos en normoxia no se observó efecto alguno sobre el crecimiento de las PGC. Por el contrario, en los cultivos en hipoxia los efectos positivos sobre el crecimiento y la formación de colonias promovidos por la hipoxia fueron eliminados (Fig. 24).



**Figura 24:** El tratamiento con mitramicina afecta significativamente a la inducción de pluripotencialidad en las PGC en hipoxia pero no así en normoxia. (★,  $p < 0,05$ ). Los resultados correspondan a un experimento representativo realizado por triplicado.

Asimismo, se realizaron 3 experimentos en los cuales se trataron las PGC en normoxia con isoflurano para activar HIF. No se pudo observar su efecto sobre las PGC debido a que el tratamiento provocó el levantamiento de la capa de células STO, y con ellas todo el cultivo.

Con el fin de dilucidar cuál de los HIFs es responsable de la inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia, se realizó inmunofluorescencia frente a HIF-1 $\alpha$ . Los resultados muestran la expresión en el núcleo de HIF-1 $\alpha$  en las PGC y colonias de células pluripotentes obtenidas en hipoxia (Fig. 25).



**Figura 25:** Inmunofluorescencia frente a HIF-1 $\alpha$  muestra la expresión nuclear de esta proteína en las colonias obtenidas de PGC en hipoxia (flechas).

# **DISCUSIÓN**



En este estudio se ha evaluado el efecto de diferentes tratamientos y condiciones de cultivo en la derivación de EGC a partir de PGC de ratón de 8.5 d.p.c. Para ello se han utilizado 3 diferentes fármacos capaces de modificar el estado epigenético de la célula, diferentes concentraciones de glucosa en el medio y condiciones hipóxicas. Los resultados obtenidos demuestran la capacidad de las PGC para dar lugar a células pluripotentes cuando son cultivadas a una concentración de oxígeno del 3%. Esta inducción de pluripotencialidad está mediada por HIF-1 e implica al factor de transcripción Oct4. Además, las células obtenidas no tienen capacidad de autorrenovación ilimitada ni expresan c-Myc ni Klf4, lo cual indica una separación entre las características de las células madre habitualmente ligadas: pluripotencialidad y autorrenovación. Demuestra así que se pueden inducir estas características de forma independiente, implicando a diferentes factores de transcripción. Los datos obtenidos pueden tener aplicaciones en la derivación de iPSC y la comprensión de los procesos de malignificación en células tumorales.

### **1- La modificación del estado epigenético no afecta a la inducción de pluripotencialidad en PGC.**

Se probaron 3 diferentes fármacos que alteran el estado epigenético de la célula para ver su efecto sobre la adquisición de pluripotencialidad en las PGC. Cada uno de estos fármacos provoca una de las principales modificaciones epigenéticas: metilación del DNA, metilación de histonas y acetilación de histonas. 5-Aza-2-Desoxicitidina (AzaC) provoca una demetilación global del DNA al bloquear la acción de las DNA metiltransferasas (Taylor y Jones, 1982). BIX-01294 afecta a la metilación de histonas inhibiendo a la metiltransferasa de histonas G9a, la enzima responsable de la marca represora H3K9me2 (Kubicek et al., 2007). Tricostatina A (TSA) provoca un aumento global en la acetilación de histonas al inhibir las Desacetilasas de Histonas (HDAC) (Yoshida et al., 1990). El efecto común de estos tres fármacos es el de promover un estado epigenético más abierto o activador que permita un aumento en la expresión génica. Nuestra hipótesis consistía en que este estado epigenético provocaría o facilitaría el paso de PGC a EGC, es decir, la reprogramación de las células PGC unipotentes en células EGC pluripotentes. Esta hipótesis se basaba principalmente en 2 hechos:

1. El estado epigenético de las células madre pluripotentes, que presentan una configuración de la cromatina más abierta que las células diferenciadas (Meissner, 2010, Gaspar-Maia et al., 2011).
2. Mimetizar los procesos de reprogramación epigenética que experimentan las PGC durante el desarrollo embrionario. Especialmente llamativa es la demetilación global del DNA que sufren las PGC durante el periodo en el que son capaces de transformarse en EGC *in vitro* (Reik, 2007).

El empleo de estos tratamientos de modificación epigenética no tuvo el efecto esperado, al no provocar ningún efecto positivo sobre la supervivencia, proliferación o inducción de pluripotencialidad en las PGC. Es posible que la toxicidad de estos fármacos, bien directamente sobre las PGC o indirectamente sobre los fibroblastos nutricios irradiados, esté enmascarando un efecto positivo sobre la adquisición de pluripotencialidad. Las PGC, al igual que todas las células de la línea germinal, tienen una gran sensibilidad hacia los tóxicos u otros tratamientos mutagénicos, en especial aquéllos que dañan el DNA (Richburg et al., 2000). Por ejemplo, los tumores testiculares, como el carcinoma embrionario, son especialmente sensibles a Cisplatino, un agente alquilante que produce enlaces cruzados entre las cadenas de DNA (Chaganti y Houldsworth, 2000). Esta gran sensibilidad a los daños en el DNA puede deberse a que cualquier defecto en el genoma de estas células pasaría a la siguiente generación, sugiriendo un mecanismo evolutivo de protección frente a mutaciones en la línea germinal.

En consonancia con nuestra hipótesis de partida, se ha demostrado que el empleo de alguno de estos agentes, como el TSA o el AzaC, puede llevar, por ejemplo, a la reprogramación de las células de neuroesfera en células madre hematopoiéticas, con la consecuente adquisición de potencialidad (Schmittwolf et al., 2005). Este cambio se produce mediante un cambio global de la expresión génica que implica la activación de varios genes asociados con la pluripotencialidad, como Oct4, Nanog, Klf4, Sox2 o c-Myc (Ruau et al., 2008).

Igualmente, se ha visto que la alteración del estado epigenético en la derivación de iPSCs aumenta la eficiencia de la misma y es capaz de sustituir la transducción de determinados factores, ya sea de forma directa utilizando modificadores del estado epigenético como el BIX-01294 (Shi et al., 2008), AzaC (Mikkelsen et al., 2008) y Ácido Valproico (VPA) (Huangfu et al., 2008) o de forma indirecta por la expresión de Prdm14 en fibroblastos tanto humanos como de ratón (Chia et al., 2010, Nagamatsu et al., 2011). Estos efectos de los modificadores epigenéticos concuerdan con los profundos cambios epigenéticos observados en la derivación de células iPS a partir de células somáticas, que permiten la reexpresión de genes de pluripotencia silenciados, así como el silenciamiento de los genes específicos de diferenciación (Hayashi y Surani, 2009).

La importancia de las modificaciones epigenéticas inducidas por Prdm14, tanto en la determinación de la línea germinal como en la obtención de iPSCs, demuestra la profunda relación existente entre estos procesos, por lo que se deben seguir probando nuevas combinaciones de éstas u otras sustancias que alteren el estado epigenético en PGC. Entre las sustancias a utilizar, una de las más prometedoras es el VPA, un inhibidor de las desacetilasas de histonas que mejora notablemente la inducción de pluripotencialidad en MEF mediante transducción de Oct4, Sox2 y Klf4 (Huangfu et al., 2008).

## **2- La hipoxia provoca la inducción de pluripotencialidad en las PGC.**

En el presente estudio se obtuvieron células pluripotentes a partir de PGC cultivadas en hipoxia en ausencia de bFGF, 2i u otros tratamientos capaces de provocar este fenómeno (Matsui et al., 1992; Resnick et al., 1992; Durcova-Hills et al., 2008; Leitch et al., 2010). La pluripotencialidad de estas células se ha demostrado tanto por la formación de Cuerpos Embrioides como por su capacidad para diferenciarse *in vitro* hacia células de las 3 hojas embrionarias.

Este efecto de la hipoxia en la adquisición de pluripotencialidad va en consonancia con diversos estudios que relacionan el desarrollo y mantenimiento de las células madre pluripotentes con las condiciones de baja concentración de oxígeno. *In vivo* esta relación se

ve durante el desarrollo temprano (Ezashi et al., 2005), el entorno en el que se encuentran las células madre hematopoyéticas y mesenquimales (Cipolleschi et al., 1993) o la promoción y mantenimiento de las células madre cancerígenas (Banhart y Simon, 2007). Además, *in vitro*, diferentes tipos de células madre ven favorecidas características como la supervivencia, autorrenovación, el mantenimiento del estado indiferenciado o la expresión de marcadores de pluripotencialidad cuando son cultivadas en hipoxia (HSC, Danet et al., 2003; NSC, Gustafsson et al., 2005; células madre de neuroblastoma, Axelson et al., 2005; ESC, Ezashi et al., 2005).

Recientemente se han utilizado las condiciones hipóxicas para mejorar la eficiencia de obtención de iPSCs, tanto de ratón como humanas, sugiriendo incluso un papel decisivo en esta reprogramación, al permitir la derivación de iPSCs utilizando sólo Oct4 y Klf4 (Yoshida et al., 2009). Este efecto de la hipoxia como inductor de características de células madre, en lugar de sólo promover su mantenimiento, va en consonancia con la hipótesis defendida por muchos autores de que las células madre cancerígenas pueden derivarse *in vivo* de células diferenciadas (Krivtsov et al., 2006), en contraste con la hipótesis de un origen de célula madre de las células cancerígenas. Según esta hipótesis, la relación entre la hipoxia y las células cancerígenas no quedaría limitada al mantenimiento de una pluripotencialidad previamente adquirida, sino a la propia inducción de ésta.

Además de la adquisición de pluripotencialidad en PGC, tanto la hipoxia como el tratamiento con 2i, coinciden en su efecto beneficioso sobre la inducción de iPSC de ratón (Yoshida et al., 2009; Silva et al., 2008), así como la prevención de la diferenciación en ESC (Ezashi et al., 2005; Ying et al., 2008). Por otro lado, a pesar de tener el mismo efecto sobre las PGC, los tratamientos con bFGF y 2i dan lugar a resultados contrapuestos en varias células madre pluripotentes; como en iPSC humanas y EpiSC, las cuales proliferan en cultivo con bFGF (Takahashi et al., 2007; Tesar et al., 2007) pero sufren diferenciación cuando son cultivada con 2i + LIF (Hirano et al., 2012; Guo et al., 2009).



### **3- Es necesario mantener las condiciones hipóxicas para inducir pluripotencialidad en las PGC.**

Mientras que la derivación de EGC mediante bFGF tan sólo requiere de éste durante las primeras 24 horas (Donovan et al., 2001; Durcova-Hills et al., 2006), la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia necesita que ésta se mantenga continuamente en cultivo. Este fenómeno coincide con la necesidad continuada de hipoxia para el mantenimiento del estado indiferenciado en ESC humanas (Prasad et al., 2009), así como de la de los inhibidores de GSK3 y MEK (2i) en la derivación de PGC (Leitch et al., 2010) y sugiere unos mediadores diferentes a los implicados con bFGF.

De hecho, los tratamientos con 2i y bFGF siguen rutas de señalización diferentes para inducir la reprogramación de las PGC a EGC. A través de bFGF se inhibe la expresión de Blimp, principal responsable de la determinación de la línea germinal y provoca la sobreexpresión de Klf4 y c-Myc (Durcova-Hills et al., 2008). El hecho de que nuestras células no expresan ninguno de estos genes de pluripotencialidad es un nuevo indicio de las diferencias entre el mecanismo de la hipoxia y del bFGF a la hora de inducir pluripotencialidad en las PGC. También se ha descrito la actuación de bFGF estimulando la cascada de señalización de MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) (Eiselleova et al., 2009). Por otro lado, el tratamiento con 2i actúa inhibiendo las rutas de GSK3 y MEK. GSK3 actúa inhibiendo la ruta de Wnt/ $\beta$ -catenina, pudiendo, de esta forma, ser responsable de la regulación negativa de genes de pluripotencialidad como c-Myc, Oct4 y Esrrb (Wray et al., 2011; Martello et al., 2012). De manera similar, la ruta de MEK puede regular negativamente la expresión de otros genes de pluripotencialidad como Nanog y Sox2 mediante la inhibición de Tbx3 (Niwa et al., 2009). Los paralelismos existentes entre el efecto de la hipoxia y de los 2i pueden estar indicando similitudes en su mecanismo de actuación. De acuerdo con esto, se ha visto que la hipoxia, mediante la inducción de HIF-1, provoca la inhibición de GSK3 (Mottet et al., 2003).

#### **4- La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia es de aproximadamente un 7%.**

La eficiencia de inducción de pluripotencialidad en PGC mediante bFGF es de en torno al 1-2% (Durcova-Hills et al., 2006; Matsui y Tokitake, 2009; Leitch et al., 2010), por lo que los resultados obtenidos mediante hipoxia representan una mejora en la eficiencia de más de 3 veces el descrito con anterioridad. Recientemente se han obtenido eficiencias similares (2-10%) mediante el uso de inhibidores de GSK3 y MEK (2i) (Leitch et al., 2010). No se observó ninguna mejora en la inducción de pluripotencialidad al combinar el tratamiento con 2i con la hipoxia, lo cual puede explicarse por la redundancia del mecanismo, como hemos visto anteriormente.

Como ya hemos visto, la eficiencia de inducción de pluripotencialidad durante la derivación de iPSC varía en gran medida dependiendo tanto de las células de origen como de los métodos utilizados para su reprogramación. Originalmente se obtuvieron eficiencias del 0,1% en fibroblastos de ratón (Okita et al., 2007) y del 0,02% en fibroblastos humanos (Takahashi et al., 2007) mediante la transfección retroviral de 4 factores de reprogramación. Los intentos de derivar iPSC de forma más segura generalmente han afectado negativamente a la eficiencia de reprogramación. Así, al eliminar c-Myc se redujo en más de un orden de magnitud (Nakagawa et al., 2008), y al sustituir Klf4 por Esrrb se redujo a la mitad (Feng et al., 2009). También la utilización de vectores adenovirales y plásmidos de expresión en lugar de retrovirus redujo la eficiencia en torno a 100 veces (Stadtfeld et al., 2008; Okita et al., 2008). Sin embargo, el uso de diversos fármacos, entre los que se encuentran varios modificadores epigenéticos, ha permitido aumentar la eficiencia de reprogramación, como es el caso de AzaC (Mikkelsen et al., 2008) y VPA (Huangfu et al., 2008) que aumentan la eficiencia de reprogramación de fibroblastos de ratón transducidos con 4 factores hasta el 7% y el 12% respectivamente; o BIX-01294 que multiplica por 5 la eficiencia de reprogramación con 2 factores (Shi et al., 2008). Gracias a estos avances, se han podido eliminar la transducción de algunos factores sin perder eficiencia, como es el caso de la sustitución de Sox2 mediante un inhibidor de TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ) (Ichida et al., 2009). Igualmente, las condiciones hipóxicas han permitido multiplicar por 4 la eficiencia de obtención de iPSCs tanto de

ratón como humanas (Yoshida et al., 2009). Por otro lado, se ha visto que, en líneas generales, cuanto más diferenciada sea la célula de origen menor será la eficiencia de reprogramación. Un buen ejemplo de esto son los experimentos de derivación de iPSC a partir de células hematopoyéticas de ratón, los cuales mostraron una gran variación en la eficiencia, desde el 28% de los progenitores mieloides hasta el 0,35% de los macrófagos utilizando la transfección de 4 factores mediante retrovirus (Eminli et al., 2009).

### **5- Las células pluripotentes inducidas por hipoxia en PGC representan un estado intermedio entre PGC y EGC.**

Además de la pluripotencialidad, las células obtenidas de PGC en hipoxia comparten otras características típicas de las células madre pluripotentes, como el crecimiento en forma de colonia, la actividad fosfatasa alcalina y la expresión de Oct4 y SSEA1. Sin embargo, presentan algunas características que las diferencian, como la no expresión de c-Myc y Klf4 y la incapacidad de proliferar a largo plazo. Con respecto a la autorrenovación, fue posible realizar los pases adecuadamente con las células obtenidas, es decir, las células sobrevivían en los pases pero no proliferaban, pero no se llegaron a observar colonias positivas para Oct4 y fosfatasa alcalina más allá de la tercera semana. Estos resultados demuestran la presencia de células pluripotentes pero no inmortales, lo que nos sugiere una separación entre estos dos procesos, que están siendo regulados independientemente y pudiendo así inducir pluripotencia sin inducir inmortalidad. Siguiendo esta hipótesis, c-Myc y Klf4, los cuales no se expresan en nuestras células pluripotentes, serían necesarios para la adquisición de inmortalidad, pero no así de pluripotencialidad. La comparativa de expresión génica entre iPSC y OF (“Oncogenic Foci”, células tumorales derivadas *in vitro* mediante la transfección de factores de transcripción en células somáticas) apoya la teoría de que la función de c-Myc y Klf4 es independiente de la red transcripcional que regula la pluripotencialidad. La principal función de estos factores de transcripción sería la de reprimir la expresión de genes de diferenciación, lo cual explicaría la ausencia de autorrenovación ilimitada de nuestras células basada en una rápida diferenciación de las mismas (Riggs et al., 2013).

Las células obtenidas parecen, por lo tanto, encontrarse en un estado intermedio en la adquisición de características de célula madre pluripotente, como si el proceso de reprogramación desde el estado de PGC al de EGC no se hubiera podido completar. Durante la derivación de iPSC desde células somáticas éstas pasan por una serie de estadios intermedios hasta alcanzar el estado final. Antes de la activación de la red transcripcional responsable del estado de célula madre, las células somáticas sufren una serie de cambios, ya sea morfológicos, metabólicos o de expresión génica. Basándose en perfiles de expresión génica de células individuales, se ha visto que esta primera fase estaría definida por la expresión heterogénea de diversos genes relacionados con pluripotencialidad, entre los cuales *Esrrb*, *Utf1*, *Lin28* y *Dppa2* serían los mejores indicadores de las células que alcanzarán el estado de iPSC (Buganim et al., 2012). Esta primera fase parece estar relacionada con la llamada MET (Mesenchymal to Epitelial Transition), proceso contrario al ETM (Epitelial to Mesenchymal Transition) que ocurre durante la gastrulación, y que consiste en cambios en las interacciones de la célula con otras células y con la matriz extracelular, pasando de tener características de célula mesenquimal a célula epitelial (Li et al., 2010). La expresión de *Klf4* en células epiteliales, la importancia del marcador epitelial E-caderina en la reprogramación, así como el efecto inhibitorio de la misma por parte del inductor de EMT TGF- $\beta$ , apoyan esta hipótesis (Li et al., 2010). No es hasta el final del proceso de reprogramación que se estabiliza la expresión de los genes de pluripotencialidad. En fibroblastos de ratón no se observa la expresión endógena de *Oct4* y *Nanog* hasta el día 16 tras la transducción, mientras que *SSEA1* comienza a expresarse en día 9, y Fosfatasa Alcalina (TNAP) en día 3 (Brambrink et al., 2008). Existe controversia en el orden e importancia de activación de los marcadores de célula madre en la última fase de la reprogramación a iPSC. Buganim et al., (2012) consideran a *Sox2* el activador de la red transcripcional, mientras que otros autores consideran su reactivación como un proceso tardío (Brambrink et al., 2008) y la teoría de la MET señala a *Klf4* (Li et al., 2010).

Al ser las PGC TNAP, *SSEA1*, *Oct4* y *Sox2* positivas, no es posible situar nuestras células madre pluripotentes inducidas por hipoxia en uno de los estadios intermedios de la inducción de iPSC. Sin embargo, los estudios realizados al respecto nos pueden ayudar a comprender más profundamente los procesos de adquisición de pluripotencialidad. Existen

2 modelos que explican el proceso de reprogramación hacia iPSC: el modelo estocástico y el modelo jerárquico.

- El modelo estocástico especula que los factores transfectados inician una secuencia de eventos probabilísticos que permiten la derivación de iPSC a partir de un impredecible grupo de células. El análisis clonal apoya esta teoría al haberse visto que células hijas del mismo fibroblasto activan genes de pluripotencia en diferentes momentos (Meissner, 2007; Buganim et al., 2012). Atendiendo al modelo estocástico, el escaso número de PGC disponibles para el estudio, unido a la todavía escasa eficiencia de reprogramación (7%) hasta el estado intermedio y la predecible escasa eficiencia para pasar al siguiente estadio, podrían estar enmascarando una posible reprogramación completa hasta un estado totalmente desdiferenciado.
- En contraposición al modelo estocástico, se encuentra el jerárquico o determinístico. Este modelo es apoyado por la reprogramación por transferencia nuclear o fusión celular, más homogénea (Boiani et al., 2002; Bhutani et al., 2010). Siguiendo el modelo determinístico, es posible que nuestras células sean incapaces de dar el siguiente paso hacia la total reprogramación al carecer de la expresión de importantes genes de pluripotencialidad como Klf4 y c-Myc. Se ha visto que la transfección de Klf4 en EpiSC puede revertir su estado a uno más indiferenciado, similar al de las mESC (Guo et al., 2009). Igualmente, en ESC provenientes de ratones NOD se ha podido pasar de un estado similar al de EpiSC a otro similar al de mESC mediante la sobreexpresión de Klf4 o c-Myc (Hanna et al., 2009).

La primera explicación que se consideró para esta reprogramación incompleta fue la de una identidad equivocada de las células con las que estábamos trabajando. Pensamos que tal vez se tratase de células más cercanas a las EpiSC, ya que estas células también son pluripotentes, expresan SSEA1 y Oct4, y están estrechamente ligadas a la línea germinal (Gilith et al., 2012). A diferencia de las EGC y ESC de ratón, las EpiSC no dependen de LIF para su mantenimiento en cultivo pero sí de Activina/Nodal, por lo que su cultivo en

condiciones no adecuadas podría provocar que no llegaran a completar el proceso de reprogramación o sufrieran diferenciación espontánea tras la reprogramación. Esta hipótesis contradecía alguna de las características de nuestras células ya que, al igual que las EGC y a diferencia de las EpiSC (Brons et al., 2007), presentan una intensa actividad fosfatasa alcalina, colonias pequeñas y compactas y expresan el marcador de línea germinal c-Kit. Para descartar definitivamente esta posibilidad se procedió a cultivar las células con diferentes medios propios de EpiSC sin que se lograra supervivencia durante más tiempo que con el medio propio de EGC, descartando por tanto la identidad de nuestras células pluripotentes con EpiSC.

Otra posible hipótesis implicaría la inducción de apoptosis por HIF-1, que bajo condiciones de hipoxia crónica puede inducir la expresión de factores proapoptóticos como Nip3 y Noxa (Bruick, 2000; Kim et al., 2004). Esta hipótesis no parece corresponder con nuestras observaciones de la dinámica del cultivo ni con la rápida aparición de cuerpos embrioides, lo cual sugiere que podría ser la temprana diferenciación la causante de la no proliferación a largo plazo de nuestras células. Esta otra posible explicación de la no proliferación a largo plazo de las células obtenidas serían los efectos contradictorios de la hipoxia en relación a la diferenciación. Es posible que la hipoxia, tras inducir la adquisición de pluripotencialidad en PGC, tenga un efecto promotor de la diferenciación en las células resultantes. Esto coincidiría con el efecto inhibitorio de la autorrenovación y promotor de la diferenciación de la hipoxia en ESC de ratón (Jeong et al., 2007). Entre los mecanismos moleculares propuestos por los que la hipoxia podría promover la diferenciación, se encuentra la inhibición de Oct4 por HIF-1 mediante la unión de éste a los Elementos de Respuesta a Hipoxia inversos (rHRE) (Lee et al., 2012). Dado que Oct4 sigue expresándose en nuestras células después de varios días en hipoxia, no creemos que éste sea el mecanismo por el que se produzca su temprana diferenciación. Otro posible mecanismo molecular para la diferenciación promovida por hipoxia es la inhibición del Receptor de LIF (LIFR). La señalización por LIF es indispensable, tanto para el mantenimiento del estado indiferenciado en ES de ratón (Evans y Kaufman, 1981), como para la derivación y mantenimiento de línea de EGC (Koshimizu et al., 1996). En nuestras PGC en hipoxia se observó la inhibición de la expresión de LIFR, el cual, junto a gp130, forma un complejo receptor responsable de mediar el efecto de LIF sobre la célula (Hara et

al., 1998). Esta inhibición de LIFR y, por lo tanto, de la ruta de STAT3 asociada podría ser la causante de la ausencia de capacidad de autorrenovación a largo plazo (De Felici, 2011), lo cual coincide con el efecto visto anteriormente en ESC en hipoxia. En estas células, HIF-1 inhibe directamente la expresión de LIFR mediante su unión al promotor, induciendo su diferenciación en hipoxia (Jeong et al., 2007). Esta ruta se relaciona igualmente con la ausencia de c-Myc, ya que es una de las principales dianas de STAT3, y se ha demostrado la dependencia de la capacidad de autorrenovación de las ESC por la activación de c-Myc a través de la ruta LIF/STAT3 (Cartwright et al., 2005).

Por otro lado, cuando se habla de la hipoxia hay que considerar el rango de concentraciones de oxígeno utilizados y la sensibilidad de las células al mismo. Así, se han visto efectos opuestos utilizando un 1% o un 5% de oxígeno: mientras que la concentración más baja tenía efectos negativos en la supervivencia de las hESC, la más alta mejoraba la autorrenovación a largo plazo (Prasad et al., 2009).

Como ya hemos visto, las células madre pluripotentes no son homogéneas, sino que existen diferentes niveles de desarrollo entre ellas. Las ESC de ratón representan el estado más inmaduro, caracterizado por su gran capacidad para contribuir a quimeras o su alta eficiencia en el pase; mientras que las ESC humanas y EpiSC representan un estado más diferenciado (De Miguel et al., 2010; De Miguel et al., 2011). En algunos casos, estas diferencias se han podido salvar o paliar simplemente cambiando las condiciones de cultivo, permitiendo que aquellas células que presentaban un estado de célula madre más diferenciado revirtieran a uno más inmaduro, como es el caso de EpiSC, revirtiendo a un estado similar al de mESC en respuesta a LIF-STAT3 (Bao et al., 2009). Igualmente, se puede recorrer este camino en dirección contraria, pasando de un estado de mESC al de EpiSC mediante señalización por TGF- $\beta$ , Activina y bFGF (Hanna et al., 2010), lo que demuestra la plasticidad de las células madre pluripotentes en respuesta a las condiciones de cultivo.

Las células obtenidas en este estudio, sin capacidad de autorrenovación ilimitada ni la expresión de marcadores de pluripotencialidad como Klf4 y c-Myc, corresponderían a un estado de célula madre pluripotente aún más diferenciado que el visto en EpiSC, aunque no se pueda descartar la posibilidad de que sean capaces de pasar a un estado más inmaduro. Las células pluripotentes de nuestros experimentos provienen de PGC de 8.5 d.p.c. las cuales se originan más tarde durante el desarrollo embrionario de las mismas células del epiblasto que dan lugar *in vitro* a las EpiSC. Esto podría interpretarse como una relación entre el momento de desarrollo de las células de origen y el nivel de diferenciación de las células pluripotentes obtenidas si no fuera porque las EGC obtenidas de PGC de ratón se encuentran en un estado más indiferenciado. Por lo tanto, concluimos que el estado intermedio de nuestras células pluripotentes es debido al método utilizado para su derivación.

#### **6- El cambio metabólico de fosforilación oxidativa a glucólisis provocado por la hipoxia no es responsable directo de la inducción de pluripotencialidad en PGC.**

El mecanismo celular por el cual se produce esta inducción de pluripotencialidad en respuesta a hipoxia aún debe ser estudiado. Es posible que sea debido al cambio metabólico necesario ante la escasa disponibilidad de oxígeno, lo que forzaría a la célula a abandonar o limitar su obtención de energía a partir de la fosforilación oxidativa sustituyéndola por un aumento de la glucólisis en forma de fermentación láctica, lo cual podría tener otros efectos derivados de la bajada del pH (Shaw et al., 2006; Brahim-Horn, 2007).

Al igual que con la relación existente entre células madre e hipoxia, existen numerosos estudios que relacionan directamente las células madre con el metabolismo glucolítico. Ya en 1924 Warburg et al observaron que las células cancerígenas presentaban un metabolismo glucolítico incluso en condiciones de normoxia, lo que pasaría a conocerse como efecto Warburg. Teniendo en cuenta las similitudes existentes entre células madre tumorales, las responsables de la iniciación y propagación de los tumores, y células madre pluripotentes, como la autorrenovación ilimitada o la capacidad de dar lugar a diferentes tipos celulares, esto nos hace pensar en la relación entre el metabolismo glucolítico y la



pluripotencialidad (Bartrons y Caro, 2007; Brahim-Horn et al., 2007).

Además, se ha observado un cambio metabólico similar al descrito en el efecto Warburg, desde la fosforilación oxidativa a la glucólisis, en ESC de ratón en normoxia (Kondoh et al., 2007). Durante la derivación de iPSC, también tiene lugar este cambio metabólico previo a la expresión de los marcadores de pluripotencialidad. Se observó que los MEF de ratón, a los 7 días de ser transducidos, ya sobreexpresaban diversos genes relacionados con glucólisis (Glut1, Hxk2, Pfkfb3 y Ldha), mientras que los genes de pluripotencialidad (Fgf4, Nanog, Oct4 y Sox2) se mantenían a niveles bajos (Folmes et al., 2011). No queda claro si es la activación del programa celular de célula madre lo que modifica el metabolismo o si es la modificación del metabolismo lo que activa este programa; lo que queda demostrado es que estos dos procesos están relacionados, tal vez a modo de retroalimentación positiva (Kawauchi et al., 2008). De acuerdo con la segunda hipótesis, se ha observado que el tratamiento con D-Fructosa-6-Fosfato (F6P) aumenta la eficiencia de reprogramación de fibroblastos (Panopoulos et al., 2012). En nuestro estudio, al provocar este cambio metabólico en las PGC en normoxia mediante el uso de inhibidores farmacológicos de la respiración, no se logró el efecto inductor de la pluripotencialidad visto en hipoxia. Los fármacos empleados fueron Antimicina A y CCCP (Carbonil cianuro 3-clorofenilhidrazona), cuyo efecto es el de desacoplar la fosforilación oxidativa en la mitocondria inhibiendo el complejo de citocromos b-c1 y la citocromo c oxidasa respectivamente (Paniagua et al., 2003). Sin embargo, los resultados de estos experimentos fueron inconcluyentes debido a la alta toxicidad de estas sustancias sobre las PGC. Estos tratamientos, además de inhibir la respiración, tienen efectos no deseados en las células, como la alteración del intercambio de H<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> (CCCP) o la inducción de apoptosis (Antimicina A) (Guha et al., 2010). También es posible que la respuesta transcripcional a hipoxia no se dispare con el uso de los inhibidores de la respiración, por lo que los efectos positivos de esta respuesta sobre la supervivencia se pierdan. Sin embargo en células ES, más resistentes que las PGC, se ha descrito un efecto positivo sobre el mantenimiento de la pluripotencialidad con Antimicina A mediado por un aumento de Nanog (Varum et al., 2009). Igualmente, el tratamiento con CCCP también ha demostrado su capacidad para promover pluripotencialidad en hESC aumentando la expresión de genes de pluripotencia como Oct4, Sox2 y Nanog (Mandal et al., 2011), lo

que sugiere que son esos efectos no deseados sobre las PGC lo que enmascaran la posible actuación de estos fármacos sobre la reprogramación de las PGC.

Considerando que el aumento de la demanda de glucosa en hipoxia podría suponer un factor limitante para el crecimiento de las PGC en cultivo y los procesos a los que estuvieran expuestas se procedió a aumentar la concentración de glucosa en el medio. Además, se ha visto que, durante la reprogramación de MEF de ratón hacia iPSC, la suplementación con glucosa aumenta la glucólisis, reduce la función mitocondrial y aumenta el número de células reprogramadas. Igualmente, en ausencia de glucosa se ha observado una reducción drástica de la reprogramación de los MEF (Folmes et. al., 2011). En nuestros experimentos, mientras que un bajo nivel de glucosa (1g/L) afectaba negativamente al crecimiento de las PGC en cultivo, el aumento de la concentración de glucosa hasta 10 g/L no supuso ningún cambio en el crecimiento o inducción de pluripotencialidad con respecto a la concentración estándar (4.5g/L). Esto demuestra que la concentración de 4.5 g/L de glucosa ya es lo suficientemente elevada para una supervivencia óptima. Por otro lado, el efecto negativo de la baja concentración de glucosa en el medio indica que nuestras células tienen un comportamiento más cercano al de las hESC y EpiSC que a las mESC, ya que se ha visto que las primeras son más dependientes de la glucólisis, siendo incapaces de sobrevivir al inhibirse ésta, al contrario de lo observado en ESC de ratón (Zhou et al., 2012).

En resumen, ninguno de nuestros intentos de modificación del metabolismo con el fin de promover la glucólisis frente a la fosforilación oxidativa tuvo efectos similares a los provocados por la hipoxia. Es probable que el efecto de la hipoxia sobre la adquisición de pluripotencialidad en las PGC no sea debido exclusivamente a los cambios metabólicos e implique otros mecanismos, tales como la regulación de factores de transcripción por parte de HIF. En el caso de que la modificación del metabolismo fuera el principal responsable del efecto observado sobre nuestras PGC al promover la glucólisis mediante CCCP o Antimicina A, debería haberse visto un efecto similar al de la hipoxia. aunque los efectos tóxicos de estos fármacos nos impiden descartar por completo esta hipótesis.

## **7- La inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia está mediada por HIF-1.**

En nuestros experimentos hemos demostrado la expresión en el núcleo de HIF-1 $\alpha$  en las PGC y colonias de células pluripotentes obtenidas en hipoxia a diferencia de las PGC en normoxia. Además, se ha demostrado que su expresión es indispensable para producir esta inducción, ya que el tratamiento con mitramicina, un inhibidor farmacológico de HIF, eliminó los efectos positivos sobre el crecimiento y la formación de colonias promovidos por la hipoxia. Los experimentos de activación de HIF en normoxia mediante isoflurano no fueron concluyentes al producir este tratamiento el levantamiento de la capa nutricia y con ello la pérdida del cultivo. Además se ha visto que las ESC expresan elevados niveles de HIF-1 $\alpha$  incluso en normoxia (Coussens et al., 2010).

La implicación de HIF-1 en la reprogramación de las PGC en hipoxia no es excluyente con una posible participación del cambio metabólico sufrido por estas células, ya que HIF es igualmente responsable de este fenómeno, promoviendo la expresión de varias proteínas relacionadas como GLUT1 y 3 (Transportador de Glucosa), LDHA (Lactato Deshidrogenasa A), ENO1 (Enolasa 1), Aldolasa A, PGK1 (Fosfoglicerato Kinasa 1), GAPDH (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase), Hexoquenasa 1 y 2, PFK2 (Fosfofructoquinasa-2), PFKL, etc. (Semenza, 2002; Shaw et al., 2006; Brahimi-Horn et al., 2007).

La implicación de la inducción de TERT, responsable de la actividad telomerasa, por HIF-1 (Nishi et al., 2004) en la inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia parece poco probable, ya que las PGC muestran actividad telomerasa al menos hasta 12.5 d.p.c. (Coussens et al., 2006) y nuestras células no presentan autorrenovación ilimitada, principal característica promovida por TERT (Counter, 1996).

Nuestros resultados indican que HIF-1 está implicado en la inducción de pluripotencialidad de las PGC en hipoxia. Los Factores Inducidos por Hipoxia (HIF) son los principales mediadores de la respuesta a hipoxia. Son factores de transcripción heterodiméricos formados por una subunidad HIF- $\alpha$  variable y otra HIF- $\beta$  constante que

regulan gran cantidad de genes, entre los que se encuentran varios relacionados con la potencialidad celular, como Oct4 y c-Myc, regulados por HIF-2 (Covello et al., 2006; Gordan et al., 2007) o Notch y ETS-1 regulados por HIF-1 (Oikawa et al., 2001; Gustafsson et al., 2005). Como ya explicamos antes, Oct4 tiene una función central en el mantenimiento de la potencialidad celular, manteniendo la autorrenovación en las células madre embrionarias e inhibiendo su diferenciación (Lee et al., 2006), c-Myc es un conocido oncogén que promueve el crecimiento y transformación en muchos tipos de cáncer (Gordan et al., 2007) y que mejora la eficiencia de inducción de potencialidad en MEF (Takahashi y Yamanaka, 2006), mientras que Notch es un receptor transmembrana que inhibe la diferenciación en varios tipos celulares como las células madre hematopoiéticas (Pear y Aster, 2004) y ETS-1 está relacionado con el desarrollo de las células madre y tumorigénesis (Dwyer et al., 2007).

### **8- La hipoxia provoca variaciones en la expresión de Oct4 en PGC.**

Oct4 es un factor de transcripción clave en la pluripotencialidad que, aun expresándose a bajos niveles en PGC de 8.5 d.p.c. (Sabour et al., 2011), es imprescindible para su supervivencia (Kehler et al., 2004). Su papel central en la adquisición de pluripotencialidad queda demostrado al ser el único factor cuya transfección resulta imprescindible en la formación de iPSC, independientemente del origen de las células transfectadas (Kim et al., 2009), no pudiendo reemplazarse por otros miembros de la familia de Oct (Nakagawa et al., 2008). No sólo está demostrada la importancia de Oct4 en la potencialidad celular, sino que se ha visto que sus efectos son producidos por pequeñas variaciones en su expresión. Así, durante la derivación de iPSC, variaciones en la expresión de Oct4 provocan variaciones en la eficiencia de la misma (Papapetrou et al., 2009) y, durante la diferenciación de ESC, un aumento de dos veces en su expresión induce diferenciación hacia mesodermo, mientras que un descenso en la misma proporción cambia el destino de la diferenciación hacia trofoectodermo (Niwa et al., 2000). En ESC humanas y MSC se ha visto que la hipoxia provoca un gran aumento en la expresión de Oct4 (Rajala et al., 2011; Grayson et al., 2007).

Con el fin de profundizar en el mecanismo de inducción de pluripotencialidad en PGC en hipoxia mediado por HIF-1, se comparó la expresión de Oct4 entre las PGC de normoxia e hipoxia. Aunque es HIF-2 el Factor Inducido por Hipoxia relacionado habitualmente con Oct4, recientemente se ha visto que HIF-1 puede regular la expresión de Oct4, ya sea de forma negativa en EBs provenientes de mESC (Lee et al., 2012), o positiva en células 786, en las que la expresión de HIF-1 $\alpha$  no degradable induce la expresión de Oct4 en normoxia (Mathieu et al., 2011). Mientras que en normoxia las PGC tras 4 días en cultivo expresan Oct4 de forma homogénea, en hipoxia esta expresión se muestra más heterogénea. Debido a que sólo un 7% de las PGC adquieren pluripotencialidad, es posible que éstas se correspondan con aquéllas cuya expresión de Oct4 sea más extrema, ya sea por sobreexpresión como por disminución de la expresión. Las dificultades técnicas derivadas de la escasez de células y su limitada autorrenovación nos han impedido hasta el momento comprobar esta hipótesis e identificar cuáles son las células que se reprograman. Al igual que para el proceso de reprogramación en iPSC (Buganim et al., 2012), los avances en el análisis de la expresión génica sobre células individuales podrían ayudarnos a comprender mejor el proceso de reprogramación de las PGC en hipoxia, los mecanismos implicados y su cronología, así como identificar las características de las PGC que adquieren pluripotencia.

## **9- Relevancia del estudio.**

Durante los últimos años, la investigación con células madre ha experimentado un gran auge debido al enorme potencial terapéutico de estas células. La capacidad para dar lugar a cualquier célula del organismo hace de las células madre pluripotentes un inmejorable objeto de estudio para la regeneración de tejidos y el tratamiento de enfermedades degenerativas. Desde 2006, a raíz de los experimentos del reciente Premio Nobel de Fisiología y Medicina, Shinya Yamanaka (Takahashi y Yamanaka, 2006), gran parte de los esfuerzos en este campo se dirigen hacia la obtención de células madre pluripotentes a partir de células adultas de los pacientes, lo cual permitiría superar los problemas inmunológicos por el uso de células ajenas al paciente, así como los problemas éticos derivados del uso de células embrionarias. El gran potencial terapéutico de las células iPS sigue viéndose limitado por diversos obstáculos, principalmente debidos al

riesgo de formación de tumores debido a la necesidad de introducir factores de transcripción, así como la relación de estos factores con cáncer. Como ya hemos visto, se han realizado grandes avances en la derivación de iPSC, evitando la inserción de factores exógenos en el genoma, sustituyendo factores relacionados con cáncer y aumentando la eficiencia de reprogramación; pero siguen sin solventar completamente las limitaciones al empleo clínico de estas células. El empleo de métodos de reprogramación sin integración génica no sólo es menos eficiente, sino que, con frecuencia, da lugar a células más diferenciadas. Del mismo modo, los avances en la obtención de iPSC procedentes de diferentes células plantea nuevos problemas relativos a su seguridad y potencial de diferenciación, tal vez debidos a la memoria epigenética. Así, la diferenciación neural de iPSC de ratón derivadas de MEF, hepatocitos, estómago o TTF (Tail Tip Fibroblast) provoca tumorigénesis (Miura et al., 2009); mientras que las iPSC derivadas de progenitores sanguíneos, las cuales presentan una gran eficiencia de diferenciación hacia células hematopoyéticas, muestran una eficiencia muy baja de diferenciación hacia neuronas (Kim et al., 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio pueden tener aplicaciones en el desarrollo de iPSC y también para la comprensión de los procesos de malignificación en células tumorales. El papel de HIF-1 y las pequeñas variaciones en la expresión de Oct4 en la inducción de pluripotencialidad pueden sugerir posibles vías alternativas para la derivación de iPSC, tales como el empleo de genes diana de HIF-1 como factores exógenos. Igualmente, el estudio de células con un estado intermedio en la adquisición de características de células madre pluripotentes puede ayudar a comprender mejor este proceso, pudiendo servir, no sólo a la derivación de iPSC desde células somáticas, sino también a la reversión de las ESC e iPSCs humanas hasta un estado aún menos diferenciado similar a las ESC de ratón. Hasta ahora, los intentos en esta dirección no han sido del todo satisfactorios, consiguiéndose estados intermedios entre las hESC y las mESC (Buecker et al., 2010) que, además, necesitan de la continua expresión de factores exógenos. En el caso de las EpiSC, sí se ha logrado esta reversión sin necesidad de introducir factores de transcripción en respuesta a LIF/Stat3 (Bao et al., 2009), lo cual incita a pensar que este proceso también puede ser posible en células madre pluripotentes humanas.

La ausencia de autorrenovación de las células obtenidas en el presente trabajo implica la imposibilidad de expansión, lo cual impide disponer más que de un escaso número de células. Esto supone importantes complicaciones, tanto para su estudio como para su posible uso terapéutico futuro. Al mismo tiempo, la existencia de células pluripotentes con proliferación limitada abre importantes vías de investigación para la aplicación clínica. La posibilidad de generar células madre pluripotentes incapaces de proliferar a largo plazo puede permitir terapias más seguras, al eliminar la capacidad para generar tumores. Células iPS a las que se les pudiera eliminar su capacidad de autorrenovación en el momento de su uso en pacientes supondrían la herramienta ideal para el uso terapéutico de las células madre, ya que mantendrían todas sus ventajas y eliminarían sus principales inconvenientes. Estudiar la posibilidad de derivar iPSCs con c-Myc y Klf4 reprimidos puede ser el primer paso para la obtención de estas células.





# **CONCLUSIONES**



Las principales conclusiones de este trabajo son las siguientes:

1. Bajo condiciones de hipoxia, las PGC de ratón adquieren características de célula madre pluripotente, como la formación de colonias y la capacidad de formar cuerpos embrioides y dar lugar a células de las 3 hojas embrionarias. Estas características sólo se inducen cuando las condiciones hipóxicas son mantenidas en el cultivo durante al menos 7 días.
2. La eficiencia de la inducción de pluripotencialidad en PGC por hipoxia es de aproximadamente un 7%, superior tanto a la obtenida con bFGF como a la eficiencia de derivación de iPSC.
3. Estas células representan un estado intermedio entre PGC y EGC, ya que carecen de autorrenovación ilimitada y de la expresión de c-Myc y Klf4. Estas características pueden resultar muy beneficiosas para la aplicación terapéutica de las células madre, por lo que se debe profundizar en su estudio.
4. El factor de transcripción HIF-1 es el principal responsable de la inducción de pluripotencialidad en PGC por la hipoxia. El mecanismo de actuación implica variaciones en la expresión de Oct4 inducidos por HIF-1.



# **BIBLIOGRAFÍA**



- 
- Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes. *Nat Biotechnol.* 2008 Nov; 26 (11): 1276-84.
  - Aoi T, Yae K, Nakagawa M, Ichisaka T, Okita K, Takahashi K, Chiba T, Yamanaka S. Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science.* 2008 Aug 1; 321 (5889): 699-702.
  - Axelson H, Fredlund E, Ovenberger M, Landberg G, Pålman S. Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells--a mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. *Semin Cell Dev Biol.* 2005 Aug-Oct; 16 (4-5): 554-63.
  - Bao S, Tang F, Li X, Hayashi K, Gillich A, Lao K, Surani MA. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature.* 2009 Oct 29; 461 (7268): 1292-5.
  - Barnhart BC, Simon MC. Metastasis and stem cell pathways. *Cancer Metastasis Rev.* 2007 Jun; 26 (2): 261-71.
  - Bartrons R, Caro J. Hypoxia, glucose metabolism and the Warburg's effect. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun; 39 (3): 223-9.
  - Beddington RS, Robertson EJ. An assessment of the developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development.* 1989 Apr; 105 (4): 733-7.
  - Bhutani N, Brady JJ, Damian M, Sacco A, Corbel SY, Blau HM. Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation. *Nature.* 2010 Feb 25; 463 (7284): 1042-7.
  - Boiani M, Eckardt S, Schöler HR, McLaughlin KJ. Oct4 distribution and level in mouse clones: consequences for pluripotency. *Genes Dev.* 2002 May 15; 16 (10): 1209-19.
  - Boiani M, Kehler J, Schöler HR. Activity of the germline-specific Oct4-GFP transgene in normal and clone mouse embryos. *Methods Mol Biol.* 2004; 254: 1-34.
  - Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell.* 2005 Sep 23; 122(6):947-56.
  - Brahimi-Horn MC, Chiche J, Pouyssegur J. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology* 2007 19, 223-229.

- 
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell*. 2008 Feb 7;2(2):151-9.
  - Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*. 2007 Jul 12;448(7150):191-5.
  - Bruick RK. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev*. 2003 Nov 1;17(21):2614-23.
  - Buecker C, Chen HH, Polo JM, Daheron L, Bu L, Barakat TS, Okwieka P, Porter A, Gribnau J, Hochedlinger K, Geijsen N. A murine ESC-like state facilitates transgenesis and homologous recombination in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Jun 4;6(6):535-46.
  - Buganim Y, Faddah DA, Cheng AW, Itskovich E, Markoulaki S, Ganz K, Klemm SL, van Oudenaarden A, Jaenisch R. Single-cell expression analyses during cellular reprogramming reveal an early stochastic and a late hierarchic phase. *Cell*. 2012 Sep 14;150(6):1209-22.
  - Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 2005 Mar;132(5):885-96.
  - Chaganti RS, Houldsworth J. Genetics and biology of adult human male germ cell tumors. *Cancer Res*. 2000 Mar 15;60(6):1475-82.
  - Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, Kumar P, Yang L, Jiang J, Lau MS, Huss M, Soh BS, Kraus P, Li P, Lufkin T, Lim B, Clarke ND, Bard F, Ng HH. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature*. 2010 Nov 11;468(7321):316-20.
  - Chu LF, Surani MA, Jaenisch R, Zwaka TP. *Blimp1* expression predicts embryonic stem cell development in vitro. *Curr Biol*. 2011 Oct 25;21(20):1759-65.
  - Cipolleschi MG, Dello Sbarba P, Olivetto M. The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993 Oct 1;82(7):2031-7.
  - Counter CM. The roles of telomeres and telomerase in cell life span. *Mutat Res*. 1996 Oct;366(1):45-63.
  - Coussens M, Davy P, Brown L, Foster C, Andrews WH, Nagata M, Allsopp R. RNAi screen for telomerase reverse transcriptase transcriptional regulators identifies HIF1 $\alpha$  as critical for telomerase function in murine embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 3;107(31):13842-7.



- 
- Coussens M, Yamazaki Y, Moisyadi S, Suganuma R, Yanagimachi R, Allsopp R. Regulation and effects of modulation of telomerase reverse transcriptase expression in primordial germ cells during development. *Biol Reprod.* 2006 Nov;75(5):785-91.
  - Covello KL, Kehler J, Yu H, Gordan JD, Arsham AM, Hu CJ, Labosky PA, Simon MC, Keith B. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 2006 Mar 1;20(5):557-70.
  - Danet GH, Pan Y, Luongo JL, Bonnet DA, Simon MC. Expansion of human SCID-repopulating cells under hypoxic conditions. *J Clin Invest.* 2003 Jul;112(1):126-35.
  - De Felici M, Farini D, Dolci S. In or out stemness: comparing growth factor signalling in mouse embryonic stem cells and primordial germ cells. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2009 May;4(2):87-97.
  - De Felici M. Nuclear reprogramming in mouse primordial germ cells: epigenetic contribution. *Stem Cells Int.* 2011;2011:425863.
  - De Miguel MP, Cheng L, Holland EC, Federspiel MJ, Donovan PJ. Dissection of the c-Kit signaling pathway in mouse primordial germ cells by retroviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Aug 6;99(16): 10458-63.
  - De Miguel MP, Donovan PJ. Isolation and culture of embryonic germ cells. *Methods Enzymol.* 2003; 365:353-63.
  - De Miguel MP, Donovan PJ. Isolation and culture of mouse germ cells. *Methods Mol Biol.* 2000;137:403-8.
  - De Miguel MP, Federspiel MJ, Donovan PJ. Regulation of growth and survival in the mammalian germline. En: Goldberg E (ed.) *The Testis: From Stem Cell to Sperm Function.* New York: Springer-Verlag; 2000: 55-70.
  - De Miguel MP, Fuentes-Julián S, Alcaina Y. Pluripotent stem cells: origin, maintenance and induction. *Stem Cell Rev.* 2010 Dec;6(4):633-49.
  - De Miguel MP, Kerr CL, López-Iglesias P, Alcaina Y. Techniques and conditions for embryonic germ cell derivation and culture. En: Michael S. Kallos (ed) *Embryonic Stem Cells - Basic Biology to Bioengineering.* Rijeka. Intech publishing. 2011 22: 425-448.
  - Deng J, Shoemaker R, Xie B, Gore A, LeProust EM, Antosiewicz-Bourget J, Egli D, Maherali N, Park IH, Yu J, Daley GQ, Eggan K, Hochedlinger K, Thomson J, Wang W, Gao Y, Zhang K. Targeted bisulfite sequencing reveals changes in DNA methylation associated with nuclear reprogramming. *Nat Biotechnol.* 2009 Apr;27(4):353-60.

- 
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet.* 2009 Dec;41(12):1350-3.
  - Donovan PJ, de Miguel M, Cheng L, Resnick JL. Primordial germ cells, stem cells and testicular cancer. *APMIS.* 1998 Jan;106(1):134-41.
  - Donovan PJ, De Miguel MP, Hirano MP, Parsons MS, Lincoln AJ. Germ cell biology--from generation to generation. *Int J Dev Biol.* 2001;45(3):523-31.
  - Donovan PJ, De Miguel MP. The role of the C-Kit/Kit Ligand Axis in Mammalian Gametogenesis. En: Matzuc MM, Brown CW, Kumar TR (eds). *Contemporary Endocrinology: Transgenics in Endocrinology.* Totowa NJ. Humana Press Inc. 2001 7: 147-163.
  - Donovan PJ, de Miguel MP. Turning germ cells into stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 2003 Oct;13(5):463-71.
  - Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC. Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell.* 1986 Mar 28;44(6):831-8.
  - Durcova-Hills G, Adams IR, Barton SC, Surani MA, McLaren A. The role of exogenous fibroblast growth factor-2 on the reprogramming of primordial germ cells into pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2006 Jun;24(6):1441-9.
  - Durcova-Hills G, Tang F, Doody G, Tooze R, Surani MA. Reprogramming primordial germ cells into pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2008;3(10):e3531.
  - Dwyer J, Li H, Xu D, Liu JP. Transcriptional regulation of telomerase activity: roles of the the Ets transcription factor family. *Ann N Y Acad Sci.* 2007 Oct;1114:36-47.
  - Eiselleova L, Matulka K, Kriz V, Kunova M, Schmidtova Z, Neradil J, Tichy B, Dvorakova D, Pospisilova S, Hampl A, Dvorak P. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells.* 2009 Aug;27(8):1847-57.
  - Eminli S, Foudi A, Stadtfeld M, Maherali N, Ahfeldt T, Mostoslavsky G, Hock H, Hochedlinger K. Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nat Genet.* 2009 Sep;41(9):968-76.
  - Eminli S, Utikal J, Arnold K, Jaenisch R, Hochedlinger K. Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells.* 2008 Oct;26(10):2467-74.

- 
- Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981 Jul 9;292(5819):154-6.
  - Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O<sub>2</sub> tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Mar 29;102(13):4783-8.
  - Fenderson BA, Andrews PW, Nudelman E, Clausen H, Hakomori S. Glycolipid core structure switching from globo- to lacto- and ganglio-series during retinoic acid-induced differentiation of TERA-2-derived human embryonal carcinoma cells. *Dev Biol*. 1987 Jul;122(1):21-34.
  - Fenderson BA, De Miguel MP, Pyle AD, Donovan PJ. Staining embryonic stem cells using monoclonal antibodies to stage-specific embryonic antigens. *Methods Mol Biol*. 2006;325:207-24.
  - Feng B, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Heng JC, Chan YS, Yaw LP, Zhang W, Loh YH, Han J, Vega VB, Cacheux-Rataboul V, Lim B, Lufkin T, Ng HH. Reprogramming of fibroblasts into induced pluripotent stem cells with orphan nuclear receptor Esrrb. *Nat Cell Biol*. 2009 Feb;11(2):197-203.
  - Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A. Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab*. 2011 Aug 3;14(2):264-71.
  - Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation*. 2002 Jan;69(4-5):188-97. Review.
  - Gaspar-Maia A, Alajem A, Meshorer E, Ramalho-Santos M. Open chromatin in pluripotency and reprogramming. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Jan;12(1):36-47. doi: 10.1038/nrm3036. Review. Erratum in: *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011 Apr;12(4):273.
  - Gillich A, Bao S, Grabole N, Hayashi K, Trotter MW, Pasque V, Magnúsdóttir E, Surani MA. Epiblast stem cell-based system reveals reprogramming synergy of germline factors. *Cell Stem Cell*. 2012 Apr 6;10(4):425-39.
  - Gius D, Bradbury CM, Sun L, Awwad RT, Huang L, Smart DD, Bisht KS, Ho AS, Nguyen P. The epigenome as a molecular marker and target. *Cancer*. 2005 Nov 1;104(9):1789-93.
  - Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981 Jan;23(1):175-82.
  - Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007 Apr;11(4):335-47.

- 
- Grayson WL, Zhao F, Bunnell B, Ma T. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Jul 6;358(3):948-53.
  - Guha G, Mandal T, Rajkumar V, Ashok Kumar R. Antimycin A-induced mitochondrial apoptotic cascade is mitigated by phenolic constituents of *Phyllanthus amarus* aqueous extract in Hep3B cells. *Food Chem Toxicol*. 2010 Dec;48(12):3449-57.
  - Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, Smith A. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development*. 2009 Apr;136(7):1063-9.
  - Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S, Lundkvist J, Ruas JL, Poellinger L, Lendahl U, Bondesson M. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell*. 2005 Nov;9(5):617-28.
  - Hajkova P, Ancelin K, Waldmann T, Lacoste N, Lange UC, Cesari F, Lee C, Almouzni G, Schneider R, Surani MA. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. *Nature*. 2008 Apr 17;452(7189):877-81.
  - Hamanaka RB, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2009 Dec;21(6):894-9.
  - Hanna J, Markoulaki S, Mitalipova M, Cheng AW, Cassady JP, Staerk J, Carey BW, Lengner CJ, Foreman R, Love J, Gao Q, Kim J, Jaenisch R. Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):513-24.
  - Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey BW, Beard C, Wernig M, Creighton MP, Steine EJ, Cassady JP, Foreman R, Lengner CJ, Dausman JA, Jaenisch R. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*. 2008 Apr 18;133(2):250-64.
  - Hanna JH, Saha K, Jaenisch R. Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*. 2010 Nov 12;143(4):508-25.
  - Hara T, Tamura K, de Miguel MP, Mukoyama Y, Kim HJ, Kogo H, Donovan PJ, Miyajima A. Distinct roles of oncostatin M and leukemia inhibitory factor in the development of primordial germ cells and sertoli cells in mice. *Dev Biol*. 1998 Sep 15;201(2): 144-53.
  - Hayashi K, Surani MA. Resetting the epigenome beyond pluripotency in the germline. *Cell Stem Cell*. 2009 Jun 5;4(6):493-8.
  - Heng JC, Feng B, Han J, Jiang J, Kraus P, Ng JH, Orlov YL, Huss M, Yang L, Lufkin T, Lim B, Ng HH. The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Feb 5;6(2):167-74.

- Herzog M, Draeger A, Ehler E, Small JV. 1994. Immunofluorescence microscopy of the cytoskeleton: double and triple immunofluorescence. En: Celis JE, (ed). Cell biology: a laboratory handbook. New York. Academic Press. 355–360.
- Hieber S, Huhn R, Hollmann MW, Weber NC, Preckel B. Hypoxia-inducible factor 1 and related gene products in anaesthetic-induced preconditioning. *Eur J Anaesthesiol*. 2009 Mar;26(3):201-6.
- Hirano K, Nagata S, Yamaguchi S, Nakagawa M, Okita K, Kotera H, Ainscough J, Tada T. Human and mouse induced pluripotent stem cells are differentially reprogrammed in response to kinase inhibitors. *Stem Cells Dev*. 2012 May 20;21(8):1287-98.
- Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature*. 1987 Mar 19-25;326(6110):292-5.
- Huangfu D, Maehr R, Guo W, Eijkelenboom A, Snitow M, Chen AE, Melton DA. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008 Jul;26(7):795-7.
- Ichida JK, Blanchard J, Lam K, Son EY, Chung JE, Egli D, Loh KM, Carter AC, Di Giorgio FP, Koszka K, Huangfu D, Akutsu H, Liu DR, Rubin LL, Eggan K. A small-molecule inhibitor of *tgf-Beta* signaling replaces *sox2* in reprogramming by inducing *nanog*. *Cell Stem Cell*. 2009 Nov 6;5(5):491-503.
- International Stem Cell Initiative Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol*. 2007 Jul;25(7):803-16.
- Jeong CH, Lee HJ, Cha JH, Kim JH, Kim KR, Kim JH, Yoon DK, Kim KW. Hypoxia-inducible factor-1 alpha inhibits self-renewal of mouse embryonic stem cells in Vitro via negative regulation of the leukemia inhibitory factor-STAT3 pathway. *J Biol Chem*. 2007 May 4;282(18):13672-9.
- Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH. A core *Klf* circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2008 Mar;10(3):353-60.
- Judson RL, Babiarz JE, Venere M, Belloch R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*. 2009 May;27(5):459-61.
- Kawauchi K, Araki K, Tobiume K, Tanaka N. p53 regulates glucose metabolism through an *IKK-NF-kappaB* pathway and inhibits cell transformation. *Nat Cell Biol*. 2008 May;10(5):611-8.
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomelí H, Nagy A, McLaughlin KJ, Schöler HR, Tomilin A. *Oct4* is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep*. 2004 Nov;5(11):1078-83.

- Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*. 2007 May 4;129(3):465-72.
- Kidder BL, Yang J, Palmer S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2008;3(12):e3932.
- Kim JB, Sebastiano V, Wu G, Araúzo-Bravo MJ, Sasse P, Gentile L, Ko K, Ruau D, Ehrich M, van den Boom D, Meyer J, Hübner K, Bernemann C, Ortmeier C, Zenke M, Fleischmann BK, Zaehres H, Schöler HR. Oct4-induced pluripotency in adult neural stem cells. *Cell*. 2009 Feb 6;136(3):411-9.
- Kim JY, Ahn HJ, Ryu JH, Suk K, Park JH. BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1alpha. *J Exp Med*. 2004 Jan 5;199(1):113-24.
- Kim K, Doi A, Wen B, Ng K, Zhao R, Cahan P, Kim J, Aryee MJ, Ji H, Ehrlich LI, Yabuuchi A, Takeuchi A, Cunniff KC, Hongguang H, McKinney-Freeman S, Naveiras O, Yoon TJ, Irizarry RA, Jung N, Seita J, Hanna J, Murakami P, Jaenisch R, Weissleder R, Orkin SH, Weissman IL, Feinberg AP, Daley GQ. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010 Sep 16;467(7313):285-90.
- Kishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui HT, Balbach S, Ogura A, Boiani M, Wakayama T. Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer. *Nat Protoc*. 2006;1(1):125-38.
- Kondoh H, Leonart ME, Nakashima Y, Yokode M, Tanaka M, Bernard D, Gil J, Beach D. A high glycolytic flux supports the proliferative potential of murine embryonic stem cells. *Antioxid Redox Signal*. 2007 Mar;9(3):293-9.
- Krivtsov AV, Twomey D, Feng Z, Stubbs MC, Wang Y, Faber J, Levine JE, Wang J, Hahn WC, Gilliland DG, Golub TR, Armstrong SA. Transformation from committed progenitor to leukaemia stem cell initiated by MLL-AF9. *Nature*. 2006 Aug 17;442(7104):818-22.
- Kubicek S, O'Sullivan RJ, August EM, Hickey ER, Zhang Q, Teodoro ML, Rea S, Mechtler K, Kowalski JA, Homon CA, Kelly TA, Jenuwein T. Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell*. 2007 Feb 9;25(3):473-81.
- Labosky PA, Barlow DP, Hogan BL. Embryonic germ cell lines and their derivation from mouse primordial germ cells. *Ciba Found Symp*. 1994; 182:157-68; discussion 168-78.
- Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL. Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev*. 1999 Feb 15;13(4):424-36.

- Lee J, Inoue K, Ono R, Ogonuki N, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ogura A, Ishino F. Erasing genomic imprinting memory in mouse clone embryos produced from day 11.5 primordial germ cells. *Development*. 2002 Apr;129(8):1807-17.
- Lee SW, Jeong HK, Lee JY, Yang J, Lee EJ, Kim SY, Youn SW, Lee J, Kim WJ, Kim KW, Lim JM, Park JW, Park YB, Kim HS. Hypoxic priming of mESCs accelerates vascular-lineage differentiation through HIF1-mediated inverse regulation of Oct4 and VEGF. *EMBO Mol Med*. 2012 Sep;4(9):924-38.
- Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, Surani MA, Smith A. Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development*. 2010 Jul;137(14):2279-87.
- Li JY, Christophersen NS, Hall V, Soulet D, Brundin P. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends Neurosci*. 2008 Mar;31(3):146-53.
- Li QF, Zhu YS, Jiang H. Isoflurane preconditioning activates HIF-1 $\alpha$ , iNOS and Erk1/2 and protects against oxygen-glucose deprivation neuronal injury. *Brain Res*. 2008 Dec 15;1245:26-35.
- Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, He W, Chen J, Li F, Zhuang Q, Qin B, Xu J, Li W, Yang J, Gan Y, Qin D, Feng S, Song H, Yang D, Zhang B, Zeng L, Lai L, Esteban MA, Pei D. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010 Jul 2;7(1):51-63.
- Loh YH, Agarwal S, Park IH, Urbach A, Huo H, Heffner GC, Kim K, Miller JD, Ng K, Daley GQ. Generation of induced pluripotent stem cells from human blood. *Blood*. 2009 May 28; 113(22): 5476-9.
- Maherali N, Sridharan R, Xie W, Utikal J, Eminli S, Arnold K, Stadtfeld M, Yachechko R, Tchieu J, Jaenisch R, Plath K, Hochedlinger K. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell*. 2007 Jun 7;1(1):55-70.
- Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U. Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2011 Mar;29(3):486-95.
- Marion RM, Strati K, Li H, Tejera A, Schoeftner S, Ortega S, Serrano M, Blasco MA. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Feb 6;4(2):141-54.

- 
- Martello G, Sugimoto T, Diamanti E, Joshi A, Hannah R, Ohtsuka S, Göttgens B, Niwa H, Smith A. Esrrb is a pivotal target of the Gsk3/Tcf3 axis regulating embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2012 Oct 5;11(4):491-504.
  - Martin GR, Evans MJ. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Apr;72(4): 1441-5.
  - Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, Wang AJ, Heddleston JM, Pinna CM, Hubaud A, Stadler B, Choi M, Bar M, Tewari M, Liu A, Vessella R, Rostomily R, Born D, Horwitz M, Ware C, Blau CA, Cleary MA, Rich JN, Ruohola-Baker H. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells. *Cancer Res*. 2011 Jul 1;71(13):4640-52.
  - Matsui Y, Tokitake Y. Primordial germ cells contain subpopulations that have greater ability to develop into pluripotential stem cells. *Dev Growth Differ*. 2009 Sep;51(7):657-67.
  - Matsui Y, Zsebo K, Hogan BL. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*. 1992 Sep 4; 70 (5): 841-7.
  - Maynard MA, Evans AJ, Hosomi T, Hara S, Jewett MA, Ohh M. Human HIF-3alpha4 is a dominant-negative regulator of HIF-1 and is down-regulated in renal cell carcinoma. *FASEB J*. 2005 Sep;19(11):1396-406.
  - McKay R. Stem cells in the central nervous system. *Science*. 1997 Apr 4;276(5309):66-71.
  - McLaren A. Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol*. 2003 Oct 1;262(1):1-15.
  - Meissner A. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol*. 2010 Oct;28(10):1079-88.
  - Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, Wernig M, Schorderet P, Bernstein BE, Jaenisch R, Lander ES, Meissner A. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 2008 Jul 3;454(7200):49-55.
  - Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2009;114:185-99.
  - Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Ohnuki M, Ogawa D, Ikeda E, Okano H, Yamanaka S. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009 Aug;27(8):743-5.
  - Mottet D, Dumont V, Deccache Y, Demazy C, Ninane N, Raes M, Michiels C. Regulation of hypoxia-inducible factor-1alpha protein level during hypoxic conditions by the phosphatidylinositol 3-



- kinase/Akt/glycogen synthase kinase 3beta pathway in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 2003 Aug 15;278(33):31277-85.
- Nagamatsu G, Kosaka T, Kawasumi M, Kinoshita T, Takubo K, Akiyama H, Sudo T, Kobayashi T, Oya M, Suda T. A germ cell-specific gene, Prmt5, works in somatic cell reprogramming. *J Biol Chem.* 2011 Mar 25;286(12):10641-8.
  - Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 2008 Jan;26(1):101-6.
  - Nishi H, Nakada T, Kyo S, Inoue M, Shay JW, Isaka K. Hypoxia-inducible factor 1 mediates upregulation of telomerase (hTERT). *Mol Cell Biol.* 2004 Jul;24(13):6076-83.
  - Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 2000 Apr;24(4):372-6.
  - Niwa H, Ogawa K, Shimosato D, Adachi K. A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature.* 2009 Jul 2;460(7251):118-22.
  - Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovskiy A, Saitou M, Surani MA. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature.* 2005 Jul 14;436(7048):207-13.
  - Oikawa M, Abe M, Kurosawa H, Hida W, Shirato K, Sato Y. Hypoxia induces transcription factor ETS-1 via the activity of hypoxia-inducible factor-1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Nov 23;289(1):39-43.
  - Okamura D, Hayashi K, Matsui Y. Mouse epiblasts change responsiveness to BMP4 signal required for PGC formation through functions of extraembryonic ectoderm. *Mol Reprod Dev.* 2005 Jan;70(1):20-9.
  - Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell.* 1999 Oct 29;99(3):247-57.
  - Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007 Jul 19;448(7151):313-7.
  - Okita K, Nakagawa M, Hyenjong H, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors. *Science.* 2008 Nov 7;322(5903):949-53.

- 
- Okita K, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011 Aug 12;366(1575):2198-207.
  - Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Álvarez-Uría M, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ. *Biología celular* (2ª ed). McGraw-Hill / Interamericana de España S.A. 2003.
  - Panopoulos AD, Yanes O, Ruiz S, Kida YS, Diep D, Tautenhahn R, Herrerías A, Batchelder EM, Plongthongkum N, Lutz M, Berggren WT, Zhang K, Evans RM, Siuzdak G, Izpisua Belmonte JC. The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Res.* 2012 Jan;22(1):168-77.
  - Papapetrou EP, Tomishima MJ, Chambers SM, Mica Y, Reed E, Menon J, Tabar V, Mo Q, Studer L, Sadelain M. Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12759-64.
  - Pashai N, Hao H, All A, Gupta S, Chaerkady R, De Los Angeles A, Gearhart JD, Kerr CL. Genome-wide profiling of pluripotent cells reveals a unique molecular signature of human embryonic germ cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e39088.
  - Pear WS, Aster JC. T cell acute lymphoblastic leukemia/lymphoma: a human cancer commonly associated with aberrant NOTCH1 signaling. *Curr Opin Hematol.* 2004 Nov;11(6):426-33.
  - Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009 Nov;27(11):2686-90.
  - Prasad SM, Czepiel M, Cetinkaya C, Smigielska K, Weli SC, Lysdahl H, Gabrielsen A, Petersen K, Ehlers N, Fink T, Minger SL, Zachar V. Continuous hypoxic culturing maintains activation of Notch and allows long-term propagation of human embryonic stem cells without spontaneous differentiation. *Cell Prolif.* 2009 Feb;42(1):63-74.
  - Quinlan GA, Williams EA, Tan SS, Tam PP. Neuroectodermal fate of epiblast cells in the distal region of the mouse egg cylinder: implication for body plan organization during early embryogenesis. *Development.* 1995 Jan;121(1):87-98.
  - Rajala K, Vaajasaari H, Suuronen R, Hovatta O, Skottman H. Effects of the physiochemical culture environment on the stemness and pluripotency of human embryonic stem cells. 2011. *Stem Cell Studies* 1, No 1.

- Ramalho-Santos J, Varum S, Amaral S, Mota PC, Sousa AP, Amaral A. Mitochondrial functionality in reproduction: from gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. *Hum Reprod Update*. 2009 Sep-Oct; 15(5): 553-72.
- Reik W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature*. 2007 May 24;447(7143):425-32.
- Resnick JL, Bixler LS, Cheng L, Donovan PJ. Long-term proliferation of mouse primordial germ cells in culture. *Nature*. 1992 Oct 8;359(6395):550-1.
- Richburg JH, Nañez A, Williams LR, Embree ME, Boekelheide K. Sensitivity of testicular germ cells to toxicant-induced apoptosis in *gld* mice that express a nonfunctional form of Fas ligand. *Endocrinology*. 2000 Feb;141(2):787-93.
- Riggs JW, Barrilleaux BL, Varlakhanova N, Bush KM, Chan V, Knoepfler PS. Induced pluripotency and oncogenic transformation are related processes. *Stem Cells Dev*. 2013 Jan 1;22(1):37-50.
- Rossant J. Stem cells from the Mammalian blastocyst. *Stem Cells*. 2001;19(6):477-82.
- Ruau D, Ensenat-Waser R, Dinger TC, Vallabhapurapu DS, Rolletschek A, Hacker C, Hieronymus T, Wobus AM, Müller AM, Zenke M. Pluripotency associated genes are reactivated by chromatin-modifying agents in neurosphere cells. *Stem Cells*. 2008 Apr;26(4):920-6.
- Rugg-Gunn PJ, Ferguson-Smith AC, Pedersen RA. Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet*. 2007 Oct 15;16 Spec No. 2:R243-51.
- Sabour D, Araúzo-Bravo MJ, Hübner K, Ko K, Greber B, Gentile L, Stehling M, Schöler HR. Identification of genes specific to mouse primordial germ cells through dynamic global gene expression. *Hum Mol Genet*. 2011 Jan 1;20(1):115-25.
- Saitou M, Barton SC, Surani MA. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature*. 2002 Jul 18;418(6895):293-300.
- Schmittwolf C, Kirchhof N, Jauch A, Dürr M, Harder F, Zenke M, Müller AM. In vivo haematopoietic activity is induced in neurosphere cells by chromatin-modifying agents. *EMBO J*. 2005 Feb 9;24(3):554-66.
- Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990 Mar 29; 344(6265): 435-9.

- 
- Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci.* 2003 Mar;26(3):125-31.
  - Seki Y, Hayashi K, Itoh K, Mizugaki M, Saitou M, Matsui Y. Extensive and orderly reprogramming of genome-wide chromatin modifications associated with specification and early development of germ cells in mice. *Dev Biol.* 2005 Feb 15;278(2):440-58.
  - Semenza G. Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Pharmacol.* 2002 Sep;64(5-6):993-8.
  - Semenza GL. Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci.* 2012 Apr;33(4):207-14.
  - Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR, Gearhart JD. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Nov 10;95(23):13726-31. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999 Feb 2;96(3):1162
  - Sharp FR, Bernaudin M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2004 Jun;5(6):437-48.
  - Shaw RJ. Glucose metabolism and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2006 Dec;18(6):598-608.
  - Shi Y, Desponts C, Do JT, Hahm HS, Schöler HR, Ding S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell.* 2008 Nov 6;3(5):568-74.
  - Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 2008 Oct 21;6(10):e253.
  - Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature.* 2008 May 8;453(7192):223-7.
  - Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science.* 1988 Jul 1;241(4861):58-62.
  - Stadtfeld M, Brennand K, Hochedlinger K. Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol.* 2008 Jun 24;18(12):890-4.
  - Stevens LC. Origin of testicular teratomas from primordial germ cells in mice. *J Natl Cancer Inst.* 1967 Apr;38(4):549-52.

- 
- Stewart CL, Gadi I, Bhatt H. Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol.* 1994 Feb;161(2): 626-8.
  - Surani MA, Hayashi K, Hajkova P. Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell.* 2007 Feb 23;128(4): 747-62.
  - Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
  - Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4): 663-76.
  - Tam PP, Snow MH. Proliferation and migration of primordial germ cells during compensatory growth in mouse embryos. *J Embryol Exp Morphol.* 1981 Aug;64: 133-47.
  - Taranger CK, Noer A, Sørensen AL, Håkelién AM, Boquest AC, Collas P. Induction of dedifferentiation, genomewide transcriptional programming, and epigenetic reprogramming by extracts of carcinoma and embryonic stem cells. *Mol Biol Cell.* 2005 Dec;16(12): 5719-35.
  - Taylor SM, Jones PA. Mechanism of action of eukaryotic DNA methyltransferase. Use of 5-azacytosine-containing DNA. *J Mol Biol.* 1982 Dec 15; 162(3): 679-92.
  - Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature.* 2007 Jul 12; 448(7150): 196-9.
  - Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998 Nov 6; 282(5391): 1145-7.
  - Toyooka Y, Tsunekawa N, Takahashi Y, Matsui Y, Satoh M, Noce T. Expression and intracellular localization of mouse Vasa-homologue protein during germ cell development. *Mech Dev.* 2000 May;93(1-2):139-49.
  - Tsang TE, Khoo PL, Jamieson RV, Zhou SX, Ang SL, Behringer R, Tam PP. The allocation and differentiation of mouse primordial germ cells. *Int J Dev Biol.* 2001; 45(3): 549-55.
  - Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MW, Cho CH, Martinez A, Rugg-Gunn P, Brons G, Pedersen RA. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development.* 2009 Apr; 136(8): 1339-49.

- 
- Varum S, Momcilović O, Castro C, Ben-Yehudah A, Ramalho-Santos J, Navara CS. Enhancement of human embryonic stem cell pluripotency through inhibition of the mitochondrial respiratory chain. *Stem Cell Res.* 2009 Sep-Nov; 3(2-3): 142-56.
  - Vengellur A, Phillips JM, Hogenesch JB, LaPres JJ. Gene expression profiling of hypoxia signaling in human hepatocellular carcinoma cells. *Physiol Genomics.* 2005 Aug 11;22(3): 308-18.
  - Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, Bikoff EK, Robertson EJ. The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development.* 2005 Mar; 132(6): 1315-25.
  - Wang Y, Liu Y, Malek SN, Zheng P, Liu Y. Targeting HIF1 $\alpha$  eliminates cancer stem cells in hematological malignancies. *Cell Stem Cell.* 2011 Apr 8; 8(4): 399-411.
  - Warburg O, Posener K, Negelein E. Ueber den Stoffwechsel der Tumoren. *Biochemische Zeitschrift.* 1924 152:319-344. (German). Reprinted in: Warburg O. *On metabolism of tumors* Constable. London. 1930.
  - Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1): 157-68.
  - Wenger RH. Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1151-62.
  - West JA, Viswanathan SR, Yabuuchi A, Cunniff K, Takeuchi A, Park IH, Sero JE, Zhu H, Perez-Atayde A, Frazier AL, Surani MA, Daley GQ. A role for Lin28 in primordial germ-cell development and germ-cell malignancy. *Nature.* 2009 Aug 13;460(7257):909-13.
  - Wilmut I, Beaujean N, de Sousa PA, Dinnyes A, King TJ, Paterson LA, Wells DN, Young LE. Somatic cell nuclear transfer. *Nature.* 2002 Oct 10;419(6907):583-6.
  - Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, Smith A. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol.* 2011 Jun 19;13(7):838-45.
  - Yabuta Y, Kurimoto K, Ohinata Y, Seki Y, Saitou M. Gene expression dynamics during germline specification in mice identified by quantitative single-cell gene expression profiling. *Biol Reprod.* 2006 Nov; 75(5): 705-16.
  - Yamaguchi S, Kimura H, Tada M, Nakatsuji N, Tada T. Nanog expression in mouse germ cell development. *Gene Expr Patterns.* 2005 Jun;5(5): 639-46.

- 
- Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009 Apr 3;137(1):13-7.
  - Yamazaki Y, Mann MR, Lee SS, Marh J, McCarrey JR, Yanagimachi R, Bartolomei MS. Reprogramming of primordial germ cells begins before migration into the genital ridge, making these cells inadequate donors for reproductive cloning. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct 14;100(21):12207-12.
  - Yeom YI, Fuhrmann G, Ovitt CE, Brehm A, Ohbo K, Gross M, Hübner K, Schöler HR. Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*. 1996 Mar;122(3):881-94.
  - Ying QL, Nichols J, Evans EP, Smith AG. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature*. 2002 Apr 4; 416(6880): 545-8.
  - Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008 May 22; 453(7194): 519-23.
  - Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T. Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*. 1990 Oct 5; 265(28):17174-9.
  - Yoshida Y, Takahashi K, Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Sep 4;5(3):237-41.
  - Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences. *Science*. 2009 May 8; 324(5928): 797-801.
  - Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007 Dec 21; 318(5858): 1917-20.
  - Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Schöler HR, Duan L, Ding S. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*. 2009 May 8;4(5):381-4.
  - Zhou W, Choi M, Margineantu D, Margaretha L, Hesson J, Cavanaugh C, Blau CA, Horwitz MS, Hockenbery D, Ware C, Ruohola-Baker H. HIF1 $\alpha$  induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *EMBO J*. 2012 Mar 23;31(9):2103-16.