

**Departamento de Biología Molecular
Facultad de Ciencias
Universidad Autónoma de Madrid**



**PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO SOBRE LA ESTABILIDAD
GENÉTICA Y LA BIOSEGURIDAD DE LAS CÉLULAS MADRE
MESENQUIMALES HUMANAS ADULTAS**

Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Juan Camilo Estrada Rodríguez
para optar al grado de Doctor

Directores de Tesis:

Dr. Antonio Bernad Miana
Dr. Enrique Samper Rodríguez

**Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares - CNIC
Instituto de Salud Carlos III - ISCIII**



*A mis madres,
Amparo y Doris*

“Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía”
Frankenstein. Mary Shelley
1818

AGRADECIMIENTOS

No puede existir mejor forma de empezar esta memoria, que agradeciendo a todas las personas que con su calidad humana y apoyo profesional han contribuido a mi proceso de formación y han hecho posible el desarrollo de este trabajo. Es para mí un verdadero placer expresarles mis más sinceros e infinitos agradecimientos.

De antemano, agradecer a mis dos directores de tesis que pusieron siempre a disposición los medios necesarios para llevar a cabo todas las actividades propuestas en este proyecto. Muchas gracias Antonio por haberme permitido formar parte de tu grupo de investigación y depositar la confianza necesaria para que yo realizase este trabajo; gracias por intentar hacer siempre un hueco en tu agenda para solventar mis triviales dudas y problemas, por sacar el tiempo suficiente en la corrección de esta tesis y sobre todo por mantener ese trato tan familiar y cercano con todos nosotros, espero seguir manteniendo esta buena relación por siempre. Enrique, me faltarían líneas para expresar la gratitud que siento hacia tí, más que mi mentor y tutor científico has sido un gran amigo; tu guía ha sido un aporte invaluable en el desarrollo de esta tesis y en mi formación como investigador, gracias por abrirme los ojos ante el mundo de la ciencia (y la empresa) y por supuesto, por brindarme tu amistad; me siento realmente afortunado de haberte tenido como "jefe".

Son muchas las horas que se pasan en el laboratorio y las vivencias que se comparten; he tenido la suerte de coincidir con gente maravillosa y de excepcional calidad humana que han hecho que la actividad científica en este centro sea de un increíble agrado. Quiero agradecer a todo el personal del CNIC tanto de administración como de las diferentes unidades a los que tanto he molestado y que a pesar de ello, siempre han ofrecido de manera incondicional su ayuda. Especialmente quiero agradecer a Marta R "nuestra secre", por transmitir esa simpatía y alegría contagiosa que logra sacar una sonrisa en cualquier circunstancia...gracias por hacer más amenos los días en el laboratorio. A todos los compañeros del departamento con los que he compartido espacio y siempre mostraron solidaridad e interés durante el arduo proceso de escritura...Raúl, Aída, Sandra E, Laura, Ana, Dani, Abel, Lorena, Melisa, Teresa, Julio, Eva, Luis, Elena y otros tantos con los que espero seguir compartiendo algo más que espacio. No quiero olvidar, a los que en su día formaron parte de la 3S y que se trasladaron por razones ajenas...vane, Dani, Lucía y piedad, gracias por las entretenidas conversaciones que tenemos cada vez que nos juntamos y que aíslan por completo de la rutina diaria del trabajo.

Por supuesto quiero agradecer a todos los compañeros que integran e integraron el grupo de Antonio Bernad y que de alguna u otra forma me han ayudado a crecer a nivel científico y personal, muchas gracias Silvia, Toni, David H, David L, Kausi, Xonia, Iñigo, Virginia, Lupe, Isa, Jose Luis, Juan B, Susana, Manuel, Vane, Bea E, Bea G, Rosa y Carmen...Carmen!! mil gracias por aguantar mis incontables dudas, por tener esa infinita paciencia y sentido de colaboración...es indudable que tus conocimientos han contribuido en gran medida al desarrollo de esta tesis; ha sido muy enriquecedor haber coincidido contigo en el grupo.

No podría continuar sin antes agradecer a aquellas personas con las que he "convivido" el día a día y con las que he compartido tan buenos momentos fuera y dentro del CNIC...de cierto modo os habéis convertido en una segunda familia. Quiero empezar agradeciendo a Yaíma, por que eres una compañera estupenda, por querer ayudarme en todo momento, por irradiar esa alegría enorme que te caracteriza y por que tu llegada a animado muchísimo mi estancia en el laboratorio. A Juan Carlos por tus consejos, tu preocupación constante, las prolongadas divagaciones mutuas que siempre me hacen salir de la monotonía del trabajo y por supuesto por querer enseñarme cultura española...eres un gran tipo!!!. Nuria, por los innumerables desayunos, comidas y charlas...el compartir contigo siempre es y será un placer. Aurora, por estar tan pendiente de todos y de todo, por ofrecer siempre tu ayuda incondicional y estar dispuesta a hechar una mano cuando se necesita, gracias por estar ahí. A Marta "martita"...gracias por los buenos momentos que hemos pasado juntos, por esas cañas en la latina, por las fiestas, por los cumpleaños, por los viajes y por tener ese particular sentido del humor que tanta gracia me hace...simplemente gracias por brindarme tu amistad. Mi señorita María Tomé!!!...hay tanto que

agradecerte...desde permítirme acompañarte cada día hasta ayudarme a hacer esto; gracias por mostrarme a diario esa simpatía y alegría descomunal que hace que los días siempre sean mejores, gracias por enseñarme a ver la vida desde otra perspectiva y a valorar lo que realmente importa...nuestro viaje acaba de empezar.

Quiero agradecer a mis dos cómplices de siempre...amigos de esos que están cuando se necesitan y brindan su apoyo sin condición. He de agradecer a mi camarada y compañero de andaduras desde la facultad Gabriel, por las innumerables conversaciones que hemos tenido intentando arreglar el mundo, por lo mucho que he aprendido de la vida contigo y por lo mucho que seguiré aprendiendo, gracias por ser mi amigo. A Omar, gracias por todos los años compartidos y los buenos momentos vividos, ahora que ha nacido Mateo toca una nueva etapa...gracias por crecer conmigo.

Quiero, como no, tener muy presente en estos momentos a toda mi gente a los que les debo todo, absolutamente todo lo que soy. A mi madre, por los infinitos esfuerzos realizados para que yo lograra terminar mis estudios siendo para mí la mejor herencia. A mis hermanos Arman y Jaquí, que me han dado siempre su ánimo y aliento a pesar de la dureza de la distancia y por ser lo máspreciado que tengo...sin ustedes tres estaría perdido. A mi padre porque siempre quiso inculcar los buenos valores y conductas en mí y porque siempre fue un ejemplo a seguir, motivo de orgullo y admiración. A mi tía...simplemente, no tengo palabras para describir la gratitud que siento hacia ti, jamás encontraré la forma de agradecer el que me hayas acogido como a un hijo más y que procurases que nunca me faltase nada, a ti y a mi madre va dedicada mi carrera, mi tesis y todo lo bueno que en un futuro pueda llegar a sacar de mí. A mi tío Humberto, por haberme brindado su cobijo y procurar ayudarme en todo lo que estuviese a su alcance, siempre le estaré agradecido. A mi primo Diego, por las infinitas vivencias que hemos pasado juntos y las que nos quedan por vivir, gracias por ser mi hermano y amigo del alma. A mis tíos y a mis primos Carolina, David, Hector, Julián, Dani, Sebastián, Juan Sebastián, Ricardo, Johnny, Fernando, Saray, Hernán, Andrés, Alejandro, Juan Ramón, Estéfany y Alejandra...a todos gracias por dejar en mi mente tan gratos y bonitos recuerdos.

Gracias a todos por hacer posible esta tesis y haber hecho de esta etapa una de mis mejores vivencias personales y profesionales. Gracias por formar parte de todo esto.

Informe de los directores de Tesis

El uso actual de células madre adultas de origen humano en terapia celular supone una gran promesa para el tratamiento de numerosas patologías asociadas con la degeneración tisular, que a día de hoy carecen de tratamientos eficaces para su cura. Las mejoras en las técnicas de biología molecular y celular han permitido identificar células troncales en un gran número de tejidos demostrando una considerable capacidad de diferenciación, replicación, migración, colonización, diferenciación e incluso inmunomodulación que las ha convertido a su vez en el tipo celular por excelencia más utilizado en los ensayos clínicos.

En la práctica totalidad de ensayos clínicos con células madre, se requiere una expansión celular previa *in vitro* con una duración aproximada de 8-12 semanas de cultivo. Este periodo de expansión, se realiza mediante tradicionales métodos de cultivo que son sustancialmente subóptimos para las células y que fomentan el estrés celular y la senescencia. Uno de los parámetros más deletéreos para la estabilidad celular incluido en las condiciones estándar de cultivo actuales, es el empleo de la concentración de oxígeno atmosférica (21%O₂), la cual promueve un estado pro-oxidativo en las células madre que compromete el mantenimiento de la estabilidad y calidad celular.

Con la intención de mejorar las posibilidades de aprovechamiento de las células madre en clínica, en el presente trabajo se ha planteado analizar el grado de influencia que posee el estrés oxidativo generado durante el cultivo sobre la estabilidad genética de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de tejido adiposo y su impacto sobre la senescencia replicativa. De forma adicional, el proyecto ha pretendido la identificación y validación de nuevos biomarcadores de senescencia, esencialmente de naturaleza génica, que permitan sentar las bases de un control de calidad más fiable para la expansión *in vitro* de hMSC y que a su vez pueda contribuir a mejorar la eficacia de los protocolos actuales destinados a la terapia con células madre.

Para el desarrollo de este trabajo, se ha estudiado comparativamente el crecimiento de hMSC en condiciones estándar (21%O₂) de cultivo frente al crecimiento de hMSC en condiciones más semejantes a las fisiológicas (3%O₂). Se analizaron y caracterizaron diversos parámetros citogenéticos y cambios en el perfil de expresión en las dos condiciones de oxígeno, con la finalidad de revelar el potencial efecto del estrés oxidativo derivado de las elevadas tensiones de oxígeno sobre la estabilidad genética y el desencadenamiento de la senescencia celular en cultivo. De modo semejante, tanto los estudios citogenéticos detallados para la detección de alteraciones génicas como el análisis de cambios en el perfil de expresión transcripcional durante tiempos prolongados de cultivo en condiciones estándar (21%O₂), han permitido encontrar y validar potenciales biomarcadores del proceso de senescencia celular y por tanto de calidad de las células a lo largo del proceso de expansión.

Los resultados obtenidos en este proyecto, han confirmado que reduciendo la tensión de oxígeno empleada en cultivo hasta una tensión de oxígeno más próxima a la fisiológica es posible mejorar considerablemente las condiciones de expansión. El crecimiento celular en estas condiciones permite mejorar la eficacia y seguridad de la producción celular *in vitro*, ya que es capaz de aumentar la tasa de proliferación, retrasar la senescencia, reducir el daño en el ADN, disminuir el acortamiento telomérico y mejorar el control de la estabilidad genética. Adicionalmente, en la presente memoria se plantea un posible mecanismo por el cual los cultivos de bajo oxígeno promueven estos efectos beneficiosos para las células y en el que se involucran el mantenimiento de un correcto balance metabólico, la reducción de la producción de especies reactivas del oxígeno y el daño clastogénico en la células.

La caracterización detallada a nivel citogenético y de expresión génica en hMSC durante tiempos prolongados de cultivo, permitió establecer que el control de la ploidía celular es un parámetro que se altera significativamente durante el proceso de senescencia celular en cultivo. Se evidenció un cambio citogenético recurrente durante la senescencia de hMSC en condiciones estándar de cultivo y que hace referencia a la adquisición de copias extras para las regiones cromosómicas de todo el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20. Adicionalmente se identificaron y validaron cuatro nuevos biomarcadores de senescencia celular en cultivo (SCIN, EDN1, AKAP9 y CXCL12), previamente relacionados con el control de la estabilidad genética en otros modelos celulares.

Proponemos los genes descritos en este trabajo como potenciales biomarcadores de senescencia replicativa de las hMSC en cultivo; su validación estadística permitirá establecer si pueden convertirse en una alternativa a los biomarcadores de senescencia actualmente utilizados en terapia celular dentro del ámbito de la bioseguridad.

El trabajo experimental recopilado en esta memoria, ha dado lugar a un artículo científico y otro en preparación, con perspectivas a su publicación inmediata.

Estrada JC, Albo C, Benguría A, Dopazo A, López-Romero P, Carrera-Quintanar L, Roche E, Clemente EP, Enríquez JA, Bernad A, Samper E. Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. **Cell Death and Differentiation**; 2 december 2011. doi: 10.1038/cdd.2011.172. [Epub ahead of print]

Estrada JC, Albo C, Samper E, Bernad A. Proliferative senescence of hMSC is associated with the deregulation of ploidy controlling genes and the duplication of chromosome 10 and 20q. 2012; En preparación.

Igualmente, durante este periodo se han realizado diferentes colaboraciones puntuales en otras dos publicaciones del equipo.

Lucas D, Escudero B, Ligos JM, Segovia JC, **Estrada JC**, Terrados G, Blanco L, **Samper E, Bernad A.** Altered hematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double-strand break repair. **PLoS Genet.** 2009 Feb;5(2):e1000389.

Samper E, Morgado L, Estrada JC, Bernad A, Hubbard A, Cadenas S, Melov S. Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas. **Free Radic Biol Med.** 2009 Feb 1;46(3):387-96.

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado bajo la dirección del Dr. Enrique Samper Rodríguez y el Dr. Antonio Bernad Miana en el laboratorio de regulación de la expresión génica y estabilidad genética de células madre somáticas, perteneciente al programa de Biología de las Células Madre del Departamento de Desarrollo y Reparación Cardiovascular del Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC, ISCIII).

Los datos obtenidos a lo largo de este trabajo, han sido debidamente controlados, contrastados y desarrollados con adecuado rigor científico siendo parcialmente presentados en congresos científicos y publicados en revistas internacionales. Por ello consideramos que la presente memoria titulada "Papel del estrés oxidativo sobre la estabilidad genética y la bioseguridad de las células madre mesenquimales humanas adultas" del que es autor Juan Camilo Estrada Rodríguez, reúne la calidad científica y originalidad requeridas para ser defendida por el interesado con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Informamos favorablemente que Juan Camilo Estrada Rodríguez pueda proceder a su defensa y para que conste a todos los efectos, firma la presente certificación.

En Madrid, a 29 de enero de 2012

V^oB^o del Director y Tutor de la Tesis

V^oB^o del Director de la Tesis

Dr. Antonio Bernad Miana

Dr. Enrique Samper Rodríguez

RESUMEN

En la mayoría de salas blancas de producción celular, la expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) se realiza bajo tensiones de oxígeno altamente hiperóxicas (21%O₂). El crecimiento celular en estas condiciones pro-oxidativas puede dar lugar a elevados niveles de estrés oxidativo e inestabilidad genética. En el presente trabajo hemos demostrado, que el mantenimiento celular en condiciones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O₂) aumenta significativamente la proliferación y retrasa la entrada en senescencia, reduciendo los niveles de estrés oxidativo, daño en el ADN, acortamiento telomérico e inestabilidad genética. Constatamos que la disminución de la tensión de oxígeno en el cultivo, promueve un cambio en el perfil de expresión transcripcional que potencialmente favorece un estado metabólico “natural”, asociado a un incremento en la actividad glucolítica y una disminución en la actividad mitocondrial. Planteamos que la disrupción de este balance metabólico natural, ocurrida al 21%O₂ resulta en un aumento anormal de la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) por parte de la mitocondria, los cuales promoverán a su vez un mayor daño oxidativo y por tanto una mayor inestabilidad genética. Estas observaciones sugieren, que las vías de control bioenergético están íntimamente ligadas a la regulación de la proliferación celular e influyen decisivamente sobre la estabilidad genética de las hMSC. Concluimos que la expansión de hMSC para su uso clínico debería realizarse en condiciones de oxígeno más próximas a las fisiológicas, con el propósito de asegurar una mayor bioseguridad y eficiencia en la terapia.

Adicionalmente, en el presente trabajo hemos caracterizado el fenómeno de la senescencia celular *in vitro* de las hMSC derivadas de tejido adiposo, para la potencial identificación y validación de nuevos biomarcadores de senescencia. Hemos encontrado, que durante la senescencia de las hMSC en cultivo, se produce un cambio en el perfil de expresión génica que altera diversas funciones indispensables para la supervivencia celular, entre las que destaca principalmente la desregulación del control de la ploidía y en la que participan los genes SCIN, EDN1, AKAP9 y CXCL12. Comprobamos que durante el crecimiento celular prolongado, hay una fuerte representación de células aneuploides en el cultivo, la cual incrementa progresivamente con el tiempo de expansión y que favorece especialmente la acumulación recurrente específica para todo el cromosoma 10. Proponemos que tanto el aumento del contenido génico para el cromosoma 10 como la desregulación de los genes implicados en el control de la ploidía (SCIN, EDN1, AKAP9 y CXCL12) podrían ser atractivos biomarcadores de senescencia celular en cultivo que podrían ser usados como una herramienta adicional, para aumentar los controles estándar de bioseguridad aplicados actualmente en clínica.

SUMMARY

In most clean rooms of cellular production, the expansion of human mesenchymal stem cells (hMSC) is performed to hyperoxic levels of oxygen tensions (21%O₂). The cellular growth in these pro-oxidative conditions can lead to oxidative stress and genetic instability. Herein we demonstrate that culture of human mesenchymal stem cells at more physiological oxygen tension (3%O₂), significantly promote their growth and delays the cellular senescence, reducing oxidative stress, DNA damage, telomere shortening and genetic instability. We found that growth at reduced oxygen tensions favors a “natural” metabolic state of increased glycolysis and reduced mitochondrial respiration. We further propose that this balance is disturbed at 21%O₂, resulting in abnormally increased levels of mitochondrial reactive oxygen species, which promote genetic instability. These observations suggest that bioenergetics pathways are intertwined with the control of lifespan and decisively influence the genetic stability of hMSC. We therefore conclude that the expansion of hMSC for human therapy should be performed at low oxygen tensions to increase biosafety and efficiency.

Additionally, in the present work we have characterized the cellular senescence phenomenon of the adipose tissue derived hMSC associated with long term expansion. The work has been focused on the identification and validation of new potential senescence biomarkers. We confirmed that during culture senescence there occurs a gene expression profile change that affects several essential functions for the cellular survival. Among these, ploidy control plays a critical role. We found that the senescence associated aneuploidy is linked with the deregulation of four specific genes (SCIN, EDN1, AKAP9 and CXCL12). We corroborate that during long-term culture there is a strong increase of aneuploidy cells, which progressively accumulates with the continuous expansion. Specifically, recurrent copy number increase of chromosome 10 was detected in long-term culture, suggesting a clonal growth advantage for the stem cells that acquire such chromosomal gain. Finally, we propose that both the increase in aneuploidy of chromosome 10 and deregulation of ploidy control genes (SCIN, EDN1, AKAP9 and CXCL12) could be used as cellular senescence biomarkers that may improve the current biosafety controls.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	25
MARCO TEÓRICO	33
Introducción	33
I. Células madre	33
1.1 Tipos y clasificación de células madre	33
1.2 Células madre adultas	35
1.2.1. Células madre mesenquimales humanas (hMSC)	35
1.3 Caracterización de las hMSC	36
II. Expansión celular <i>in vitro</i>	37
2.1 La senescencia replicativa	37
2.2 El estrés oxidativo en cultivo	40
2.2.1 Producción de ROS por la cadena transportadora de electrones mitocondrial	40
2.2.2 Senescencia prematura inducida por estrés	42
2.3 Mecanismos de inducción de la senescencia celular en cultivo	43
2.3.1 Senescencia inducida por daño en el ADN	43
2.3.1.1 Mecanismo de respuesta a daño en el ADN	44
2.3.2 Senescencia inducida por acortamiento telomérico	44
2.3.2.1 Factores implicados en el acortamiento telomérico	45
2.3.2.2 Susceptibilidad del telómero al daño oxidativo	46
2.1.2.3 Inestabilidad genética por acortamiento telomérico	47
2.3.3 Senescencia inducida por activación del locus <i>INK4A-ARF</i>	47
2.3.3.1 Locus <i>INK4A-ARF</i> y el estrés oxidativo	48
III. Fisiología del oxígeno	49
3.1 El oxígeno y los nichos de células madre	49
3.2 Mecanismos celulares de respuesta al oxígeno	50
3.2.1 Regulación de HIF por oxígeno	51
3.3 Relevancia del oxígeno en cultivo	52
3.3.1 Regulación de la actividad metabólica por el oxígeno	53
3.3.2 La actividad metabólica y la senescencia celular	54
IV. Variación genómica y senescencia	55
4.1 Aneuploidía en cultivo	58
OBJETIVOS	63
RESULTADOS	67

I.	Los cultivos celulares al 3%O₂ mejoran la proliferación celular y retrasan la senescencia de las hMSC	67
1.1	Caracterización fenotípica y multipotencial de las hMSC	67
1.2	El crecimiento de las hMSC a presiones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O ₂) mejora el potencial proliferativo de las hMSC	67
1.3	El crecimiento de hMSC al 3%O ₂ retrasa la senescencia celular en cultivo	70
II.	El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ reduce el estrés oxidativo, el daño en el ADN y el acortamiento telomérico en cultivo	70
2.1	El crecimiento de las hMSC al 3%O ₂ reduce el estrés oxidativo en las células	70
2.2	El crecimiento de las hMSC al 3%O ₂ reduce el daño en el ADN	72
2.3	El crecimiento de las hMSC al 3%O ₂ retrasa el acortamiento telomérico	73
III.	La sobreexpresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) inhibe la senescencia replicativa de las hMSC en cultivo	76
IV.	Los cultivos de hMSC desarrollados al 3%O₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la inestabilidad genética	80
4.1	El crecimiento de las hMSC al 3%O ₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la aparición de aberraciones cromosómicas estructurales	80
4.2	El crecimiento de las hMSC al 3%O ₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la aneuploidía en cultivo	81
4.3	El crecimiento celular al 3%O ₂ reduce la aparición de usos mitóticos multipolares	84
V.	El estrés oxidativo induce aneuploidía en cultivo	85
VI.	La sobreexpresión de hTERT reduce el estrés oxidativo	88
VII.	La tensión de oxígeno en el cultivo altera el metabolismo celular	89
VIII.	La aneuploidía como un posible marcador de senescencia	96
8.1	La senescencia celular de las hMSC en cultivo es heterogénea y progresiva	96
8.2	Potenciales biomarcadores de senescencia celular en cultivo	99
8.2.1	Presencia de aneuploidía recurrente para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 en los cultivos de hMSC crecidos al 21%O ₂	103
DISCUSIÓN		109
I.	La terapia celular y la problemática de la expansión celular <i>in vitro</i>	109
II.	La regulación de la tensión de oxígeno en el cultivo es crucial en el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo, la producción de ROS y el control de la estabilidad genética	110
2.1	La estabilidad de HIF mantiene el metabolismo celular y reduce el estrés oxidativo	111
2.2	La hiperoxia (21%O ₂) compromete la viabilidad y la bioseguridad del cultivo	113

2.2.1	La hiperoxia promueve el acortamiento telomérico	114
2.2.2	La hiperoxia promueve la inestabilidad genética	115
2.3	La homeostasis de la actividad mitocondrial como efector de la senescencia en cultivo	116
III.	La sobreexpresión de hTERT reduce la producción de ROS y mejora la estabilidad genética	117
IV.	La aneuploidía como un posible marcador de senescencia	119
6.1	La triploidía y la tetraploidía del cromosoma 10 como marcador de senescencia celular en cultivo	121
CONCLUSIONES		127
MATERIALES Y MÉTODOS		131
I.	Cultivos celulares	131
1.1	Condiciones de cultivo	131
1.2	Curvas de crecimiento	131
1.3	Tratamientos	131
1.3.1	ROS exógeno	131
1.3.2	Diferenciación <i>in vitro</i>	132
1.3.2.1	Diferenciación osteogénica	132
1.3.2.2	Diferenciación adipogénica	132
II.	Ensayo SA-β-Galactosidasa	132
III.	Western-blot	133
3.1	Aislamiento y cuantificación proteica	133
3.2	Electroforesis, transferencia, incubaciones y revelado	133
IV.	Oxidación celular	134
4.1	Detección de carbonilos	134
4.2	Detección de malondialdehídos (MDA)	134
V.	Técnicas citogenéticas	134
5.1	iFISH (<i>interphase Fluorescence In Situ Hybridization</i>)	134
5.1.1	Preparación de las muestras	135
5.1.2	Desnaturalización/Hibridación <i>in situ</i>	135
5.2	mFISH (<i>metaphase Fluorescence In Situ Hybridization</i>)	135
5.2.1	Preparación de las muestras	135
5.2.2	Desnaturalización/Hibridación <i>in situ</i>	136
5.2.3	Aberraciones cromosómicas estructurales	136
5.3	Captura digital de imágenes	136
5.4	Cuantificación de fluorescencia telomérica	136

VI.	Actividad telomerasa – Ensayo TRAP	137
	6.1 Amplificación telomérica	137
	6.2 Cuantificación de la amplificación telomérica	137
VII.	Ensayos de expresión génica (ARN)	138
	7.1 Ensayos TaqMan	138
	7.1.1 Aislamiento de ARN	138
	7.1.2 RT-PCR	138
	7.1.3 qRT-PCR	138
	7.2 <i>Microarrays</i> de expresión	139
VIII.	Técnicas de evaluación de contenido génico y huella genética (ADN)	140
	8.1 Array de CGH (aCGH)	140
	8.1.1 Aislamiento del ADN	140
	8.1.2 Preparación de las muestras, hibridación de los <i>Microarrays</i> y adquisición de imagen	140
	8.2 Perfil polimórfico de nucleótido simple	140
IX.	Infección lentiviral	141
	9.1 Obtención de sobrenadantes virales	141
	9.2 Titulación de sobrenadantes virales	141
	9.3 Titulación de hMSC	141
X.	Citometría de flujo	142
	10.1 Análisis de antígenos de superficie	142
	10.2 Cuantificación del radical superóxido (O ₂ ⁻)	142
	10.3 Selección celular por tamaño (FCS) y complejidad (SSC)	143
XI.	Inmunocitoquímica	143
	11.1 Detección de focos de 53BP1	143
	11.2 Detección de usos mitóticos	143
	11.3 Captura digital de imágenes	144
XII.	Medidas de actividad metabólica	144
	12.1 Detección de acidificación del medio y consumo de oxígeno (Seahorse)	144
	12.1.1 Preparación de las placas	144
	12.1.2 Obtención de las medidas experimentales	144
	12.1.3 Generación de datos	145
	12.2 Medición de lactato intracelular	145
XIII.	Análisis estadístico	145
	BIBLIOGRAFÍA	149
	ANEXOS.....	179

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

aARN	ácido ribonucleico amplificado; (<i>amplified RNA</i>)
aCGH	array de hibridación genómica comparada; (<i>array-Comparative Genomic Hybridization</i>)
Akap9	proteína quinasa de anclaje A9; (<i>A Kinase (PRKA) Anchor Protein (yotiao) 9</i>)
ALDOC	aldolasa C, fructosa-bifosfato; (<i>Aldolase C, Fructose-Bisphosphate</i>)
aprox.	aproximadamente
ARTNT	receptor nuclear aryl hidrocarburo translocador; (<i>aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator</i>)
ATM	proteína ataxia telangiectasia mutada; (<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>)
ATR	proteína relacionada con la proteína de la ataxia telangiectasia; (<i>Ataxia Telangiectasia-related protein</i>)
β actina	beta Actina; (<i>beta actin</i>)
BER	reparación por excisión de bases; (<i>Base Excision Repair</i>)
bHLH-PAS	del inglés, <i>basic helix-loop-helix-Per-Arnt-Sim</i>
BrEt	bromuro de etidio; (<i>Ethidium Bromide</i>)
BSA	albúmina de suero bovino; (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
c-Myc	proteína oncogénica viral homóloga de myelocytomatosis (v-Myc) c; (<i>Myelocytomatosis viral oncogene homolog (v-Myc) c</i>)
cADN	ADN complementario; (<i>complementary DNA</i>)
CAT	catalasa; (<i>Catalase</i>)
CAT	comité para terapias avanzadas; (<i>Commitee for Advanced Therapies</i>)
CBP	proteína de unión a CREB; (<i>CREB-binding protein</i>)
CDC25	proteína del ciclo de división celular 25 homóloga de <i>S. Cerevisiae</i> ; (<i>Cell Division Cycle 25 homolog (S. Cerevisiae)</i>)
CDER	centro para la evaluación e investigación de medicamentos; (<i>Center for Drug Evaluation and Research</i>)
cen	centrómero; (<i>Centromere</i>)
CHK1	proteína de punto de chequeo CHK1 homóloga de <i>S. Pombe</i> ; (<i>CHK1 checkpoint homolog (S.pombe)</i>)
CHK2	proteína de punto de chequeo CHK2 homóloga de <i>S. Pombe</i> ; (<i>CHK2 checkpoint homolog (S.pombe)</i>)
CNIC	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares
CNV	variación en el número de copia; (<i>Copy Number Variation</i>)
CO₂	dióxido de carbono; (<i>Carbon dioxide</i>)
Cr	cromosoma; (<i>Chromosome</i>)
CREB	elemento de unión de respuesta a AMPc; (<i>cAMP response element-binding</i>)
CXCL12	quimioquina (C-X-C motivo) ligando 12; (<i>chemokine (C-X-C motif) Ligand 12</i>)
DC	divisiones celulares
DCFDA	2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína ; (<i>2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetate</i>)
DDR	respuesta celular al daño en el ADN; (<i>DNA Damage Response</i>)
DHE	dihidroetidio; (<i>Dihydroethidium</i>)
DICER	endoribonucleasa de la familia RNasa tipo III; (<i>endoribonuclease in the RNase III family</i>)
DMEM	del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	dimetil-sulfóxido; (<i>Dimethyl Sulfoxide</i>)
DNP	2,4 dinitrofenol; (<i>2,4-Dinitrophenol</i>)
DNPH	dinitrofenilhidrazina; (<i>dinitrophenylhydrazine</i>)
dNTP	desoxirribonucleótidos trifosfato; (<i>deoxyribonucleotide triphosphate</i>)
DSB	roturas de doble cadena; (<i>Double Strand Breaks</i>)
DTT	ditiotreitol; (<i>Dithiothereitol</i>)

dUTP	desoxirribonucleótido uridín trifosfato; (<i>deoxyuridine triphosphate</i>)
ECAR	tasa de acidificación extracelular; (<i>Extra Cellular Acidification Rate</i>)
EDN1	endotelina 1; (<i>Endothelin 1</i>)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético; (<i>Ethylene Diamino Tetraacetic Acid</i>)
EGTA	ácido etilenglicoltetraacético; (<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>)
EMEA	agencia europea del medicamento; (<i>European Medicines Agency</i>)
EPAS	proteína endotelial PAS; (<i>endothelial PAS protein</i>)
ES	células madre embrionarias; (<i>Embryonic Stem Cells</i>)
FBS	suero fetal bovino; (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FCCP	carbonilcianuro-p-trifluorometoxi-hidrazona; (<i>protonophore carbonilo cynide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone</i>)
FCS	dispersión frontal; (<i>Forward Scatter</i>)
FDA	administración de medicación y alimentos; (<i>Food and Drug Administrations</i>)
FDR	razón de falsos descubrimientos; (<i>False Discovery Rate</i>)
FIH	factor de inhibición de HIF; (<i>Factor Inhibiting Hypoxia</i>)
FISH	hibridación fluorescente <i>in situ</i> ; (<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>)
FITC	isotiocianato de fluoresceína; (<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>)
GFP	proteína verde fluorescente; (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GMP	buenos procedimientos de producción; (<i>Good Manufacture Procedures</i>)
GO	ontología génica; (<i>Gen Ontology</i>)
H₂O	Agua; (<i>water</i>)
H₂O₂	peróxido de hidrógeno; (<i>hydrogen peroxide</i>)
HBSS	del inglés, (<i>Hank's Buffered Salt Solution</i>)
HCl	ácido clorhídrico; (<i>hydrochloric acid</i>)
HDM2	proteína doble minuto humana; (<i>Human Doble Minute 2 protein</i>)
HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico; (<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>)
HIFα	factor inducido por hipoxia, subunidad alfa; (<i>Hypoxia Inducible Factor alpha</i>)
HIFβ	factor inducido por hipoxia, subunidad beta; (<i>Hypoxia Inducible Factor beta</i>)
HLF	factor tipo HIF alfa; (<i>HIF alpha-Like Factor</i>)
HPLC	cromatografía líquida de alto rendimiento; (<i>High-performance liquid chromatography</i>).
HR	recombinación homologa; (<i>Homologous Recombination</i>)
HRF	factor relacionado con HIF; (<i>HIF-related factor</i>)
HRP	peroxidasa de rábano picante; (<i>Horseradish peroxidase</i>)
HSC	células madre hematopoyéticas; (<i>Hematopoietic Stem Cells</i>)
hTERT	telomerasa transcriptasa humana inversa; (<i>human Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
ICM	masa celular interna; (<i>Inner Cell Mass</i>)
IGF2	factor de crecimiento insulínico 2 (Somatomedina A); (<i>Insulin-like Growth Factor 2 (somatomedin A)</i>)
IgG	inmunoglobulina G; (<i>Immunoglobulin G</i>)
IgM	inmunoglobulina M; (<i>Immunoglobulin M</i>)
iPS	células madre pluripotenciales inducidas; (<i>induced Pluripotent Stem Cells</i>)
KCl	cloruro potásico; (<i>Potassium chloride</i>)
Klf4	kruppel tipo factor 4; (<i>Kruppel-Like Factor 4</i>)
Kpb	kilopares de bases; (<i>Kilo base pair</i>)
LDHA	lactato deshidrogenasa A; (<i>Lactate Dehydrogenase A</i>)
MDA	malondialdehído; (<i>Malondialdehyde</i>)
MDC1	proteína 1 mediadora de daño en el ADN; (<i>Mediator of DNA damage checkpoint protein 1</i>)
MEF	fibroblasto embrionario de ratón; (<i>Mouse Embryonic Fibroblast</i>)
MgCl₂	cloruro de magnesio; (<i>Magnesium chloride</i>)

mIgG	inmunoglobulina G de ratón; (<i>mouse Immunoglobulin G</i>)
MSC	células madre mesenquimales; (<i>Mesenchymal Stem Cells</i>)
N₂	nitrógeno; (<i>Nitrogen</i>)
NaCl	cloruro sódico; (<i>Sodium chloride</i>)
NCBI	centro nacional para la información biotecnológica; (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
NDUFA4L2	NADH deshidrogenasa [Ubiquinona] subcomplejo 1 alfa, 4-tipo 2; (<i>NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 Alpha subcomplex, 4-Like 2</i>)
NER	reparación por excisión de nucleótidos; (<i>Nucleotide Excision Repair</i>)
NHEJ	unión de extremos no homólogos; (<i>Non-homologous end Joining</i>)
Notch	proteína Notch asociada a traslocación, homóloga de <i>Drosophila</i> (<i>Notch homolog , translocation-associated (Drosophila)</i>)
NP40	nonil fenoxipoli-etoxil-etanol 40; (<i>Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol 40</i>)
ns	no significativo
O₂	Oxígeno; (<i>oxygen</i>)
O₂⁻	superóxido; (<i>Superoxide</i>)
OCR	tasa de consumo de oxígeno; (<i>Oxygen Consumption Rate</i>)
Oct3/4	factor de transcripción 3/4 de unión a octámero; (<i>Octamer-binding transcription factor 3/4</i>)
ODD	degradación dependiente de oxígeno; (<i>Oxygen-dependent degradation</i>)
OIS	senescencia inducida por oncogenes; (<i>Oncogene-Induced Senescence</i>)
P14	CDKN2D (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2D); (<i>Cdkn1a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2D)</i>)
P16	CDKN2A (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 2A); (<i>Cdkn1a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A)</i>)
P21	CDKN1a (inhibidor de quinasa dependiente de ciclina 1A); (<i>Cdkn1a (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A)</i>)
p300	proteína E1A de unión a p300; (<i>E1A binding protein p300</i>)
P53	proteína supresora de tumor P53 (antígeno Li-Fraumeni); (<i>tumor Protein P53 (Li-Fraumeni Antigen)</i>)
Pb	pares de bases; (<i>Base Pair</i>)
PBS	tampón salino de fosfato; (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa; (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD	duplicación de la población; (<i>Population Doubling</i>)
PDH	piruvato deshidrogenasa; (<i>Pyruvate Dehydrogenase</i>)
PDK	piruvato deshidrogenasa quinasa; (<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1</i>)
PDK1	piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1; (<i>Pyruvate Dehydrogenase Kinase isozyme 1</i>)
PE	ficoeritrina; (<i>Phycoerythrin</i>)
PFKB3	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3; (<i>6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase 3</i>)
PFKB4	6-fosfofructo-2 quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 4; (<i>6-Phosphofructo-2-Kinase / Fructose-2,6-Biphosphatase 4</i>)
PGK1	fosfoglicerato quinasa 1; (<i>Phosphoglycerate Kinase 1</i>)
PHD	prolil hidroxilasas; (<i>Prolyl hydroxylases</i>)
PKCδ	proteína quinasa C delta; (<i>Protein Kinase C delta</i>)
PNA	péptido de ácido nucleico; (<i>Peptide Nuclei Acid</i>)
PQ	paraquat; (<i>Paraquat</i>)
pVHL	producto génico supresor de tumores Von Hippel-Lindau; (<i>Von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>)
Q-FISH	hibridación fluorescente <i>in situ</i> cuantitativa; (<i>Quantitative Fluorescent in situ Hybridization</i>)
qRT-PCR	transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa; (<i>quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)

RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN; (<i>RNA-dependent RNA polymerase</i>)
rlgG	inmunoglobulina G de rata; (<i>rat Immunoglobulin G</i>)
RMRP	componente de la endoribonucleasa procesadora de ARN de la mitocondria; (<i>RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease</i>)
ROS	especies reactivas del oxígeno; (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RT-PCR	transcripción inversa de la reacción en cadena de la polimerasa; (<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>)
SA-β-gal	senescencia asociada a actividad beta galactosidasa; (<i>senescence associated beta-galactosidase</i>)
SC	Suero de Caballo; (<i>horse serum</i>)
SCNI	scinderina; (<i>Scinderin</i>)
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; (<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
SEM	error estándar de la media; (<i>Standard Error of the Mean</i>)
SiARN	ARN pequeño de interferencia; (<i>Small interfering RNA</i>)
SIPS	senescencia prematura inducida por estrés; (<i>Stress-Induced Premature Senescence</i>)
SLC2A1	transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa); (<i>Solute Carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1</i>)
SOD	superóxido dismutasa; (<i>Superoxide Dismutase</i>)
SSB	rotura de cadena sencilla; (<i>Single-Strand Breaks</i>)
SSC	complejidad de dispersión lateral; (<i>Side Scatter Complexity</i>)
SSC buffer	tampón salino de citrato sódico; (<i>Saline-Sodium Citrate Buffer</i>)
SVZ	zona subventricular; (<i>Sub Ventricular Zone</i>)
TA	Temperatura Ambiente; (<i>Room Temperature</i>)
TAD	dominio de activación transcripcional C-terminal; (<i>Transcriptional Activation Domine</i>)
TBA	4,6-dihidroxi-2-tiopirimidina; (<i>4,6 dihydroxy-2-thiopirimidin</i>)
TBE	tetraetoxipropano; (<i>Tetraethoxypropane</i>)
tel	telómero; (<i>Telomere</i>)
TERC	componente de ARN de la telomerasa; (<i>Telomerase RNA Component</i>)
TERT	telomerasa transcriptasa inversa; (<i>Telomerase Reverse Transcriptase</i>)
TOPB1	proteína topoisomerasa 1 de unión al ADN; (<i>Topoisomerase (DNA) II binding protein 1</i>)
TPI1	triosa fosfato isomerasa 1; (<i>Triosephosphate Isomerase 1</i>)
TRAP	protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas; (<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>)
U.S	Estados Unidos; (<i>United Sates</i>)
UV	ultravioleta; (<i>Ultraviolet</i>)
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana; (<i>human immunodeficiency virus</i>)
Wnt	proteína de integración en MMTV perteneciente a la familia de las proteínas sin alas; (<i>Wingless-type MMTV integration site family</i>)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido; (<i>5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside</i>)
cm	centímetros
cm²	centímetros cuadrados
g	gramo
Gy	gray, unidad internacional de medida de radiación
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro

mM	milimolar
mm	milímetros
mm Hg	milímetros de mercurio
ng	nogramo
nM	nanomolar
nm	nanómetros
°C	grados Celsius
pMol	picomoles
U	unidades víricas
Xg	fuerza centrífuga relativa
µg	microgramo
µl	microlitro
µM	micromolar
µM	micrómetro

MARCO TEÓRICO

MARCO TEÓRICO

INTRODUCCIÓN

La terapia con células madre, busca restaurar funciones dañadas o pérdidas de órganos y/o tejidos mediante el uso de células progenitoras como agentes terapéuticos, ofreciendo de este modo, una novedosa alternativa al uso convencional de fármacos. Estos procedimientos aportan una nueva herramienta para tratar patologías que a día de hoy no poseen ningún tipo de tratamiento eficaz; De acuerdo con estimaciones recientes, en Estados Unidos más de 128 millones de personas (aproximadamente la mitad del país) podrían llegar a beneficiarse de este tipo de intervenciones gracias sus propiedades en la regeneración tisular o facilitando la tolerancia a trasplantes. En la actualidad, la terapia con células madre es una de las áreas de más rápido crecimiento en la medicina experimental moderna, de hecho, desde que se inició el primer ensayo clínico en 1995 con células madre hasta la fecha, se han llevado a cabo ya más de 3870 procedimientos clínicos en todo el mundo de los cuales 2150 han concluido, revelando resultados prometedores para la cura de diferentes patologías relacionadas con la degeneración tisular y complicaciones inmunológicas (datos publicados por el Instituto nacional de la salud de Estados Unidos (NIH, *National Institute of Health*) a Enero de 2012; <http://www.clinicaltrials.gov>). Estos datos muestran claramente que las aplicaciones terapéuticas de las células madre no son el futuro sino una realidad que ya se está empleando en la clínica.

I. CÉLULAS MADRE

Las células madre se definen como un tipo de célula indiferenciada que posee la capacidad de **autorrenovación y diferenciación** a lo largo de las divisiones celulares. La capacidad de autorrenovación le confiere la habilidad de generar células hijas con idénticas características a las de la célula inicial conservando el estado indiferenciado, permitiendo su renovación periódica sin perder la funcionalidad; por otro lado, la capacidad de diferenciación le confiere la habilidad de generar células hijas comprometidas a diferentes linajes celulares con funciones y morfología especializada, facilitando la regeneración del tejido (Potten & Loeffler, 1990).

1.1 Tipos y clasificación de células madre

Uno de los principales criterios para clasificar las células madre es mediante su potencial de diferenciación. Las células madre pueden clasificarse como células madre **totipotenciales** capaces de producir células de todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios (trofoblasto y placenta) de un individuo, células madre **pluripotenciales** capaces de diferenciar a tejidos de cualquiera de las tres capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo) exceptuando las estructuras extraembrionarias, células madre **multipotenciales** capaces de diferenciar a múltiples tipos celulares procedentes de la misma capa embrionaria y células madre **oligopotenciales** o células progenitoras específicas de linaje capaces de dar lugar a uno o pocos tipos celulares de un mismo tejido (revisado en (Wagers & Weissman, 2004)). Dado que en la actualidad se han logrado aislar e identificar una gran variedad de células madre procedentes de diferentes tejidos tanto embrionarios como de origen adulto, se ha requerido la utilización de un sistema de clasificación más definido (revisado en (Bongso & Lee, 2005)). De este modo y en un intento de clasificar de una manera más detallada los distintos tipos de células madre actualmente conocidos, las células madre pueden subdividirse en función de su origen dependiendo de la capa germinal del que procedan y el tipo de tejido que las alberga (**figura i1**).

Tradicionalmente y de forma muy generalizada, las células madre se han dividido en dos grandes grupos, **células madre embrionarias** procedentes del blastocisto embrionario con capacidad pluripotencial y **células madre adultas o somáticas** procedentes de tejidos ya desarrollados, las cuales por norma general presentan multipotencialidad. No obstante, recientes trabajos sugieren que algunos tipos de células madre adultas son capaces de diferenciar a tejidos derivados de otras capas embrionarias manteniendo cierto grado de "pluripotencialidad" (Herzog et al., 2003; Phinney & Prockop, 2007). A pesar de la existencia de éste fenómeno, que actualmente es conocido como transdiferenciación y que continúa siendo objeto de estudio, a día de hoy es un hecho que las células

madre adultas poseen un espectro más restrictivo en su capacidad de diferenciación que el que poseen las propias células madre embrionarias.

Por otra parte, es importante mencionar la existencia de un nuevo tipo de célula madre pluripotencial, que se ha logrado mediante ingeniería genética induciendo desdiferenciación de células somáticas diferenciadas a células madre pluripotenciales (iPS, *Induced pluripotent stem cells*). Este proceso se ha desarrollado mediante la expresión ectópica de los genes Oct3/4, Nanog, Sox2, c-Myc, Klf4 y lin28, en diferentes combinaciones, sobre una gran variedad de células adultas humanas, permitiendo la reprogramación del núcleo (Takahashi & Yamanaka, 2006; Yu et al., 2007). Tras este proceso de reprogramación, estas células son capaces de diferenciarse a tejidos de las tres capas germinales y aparentemente presentar características equivalentes a las de una célula madre embrionaria pluripotencial (Bock et al., 2011).

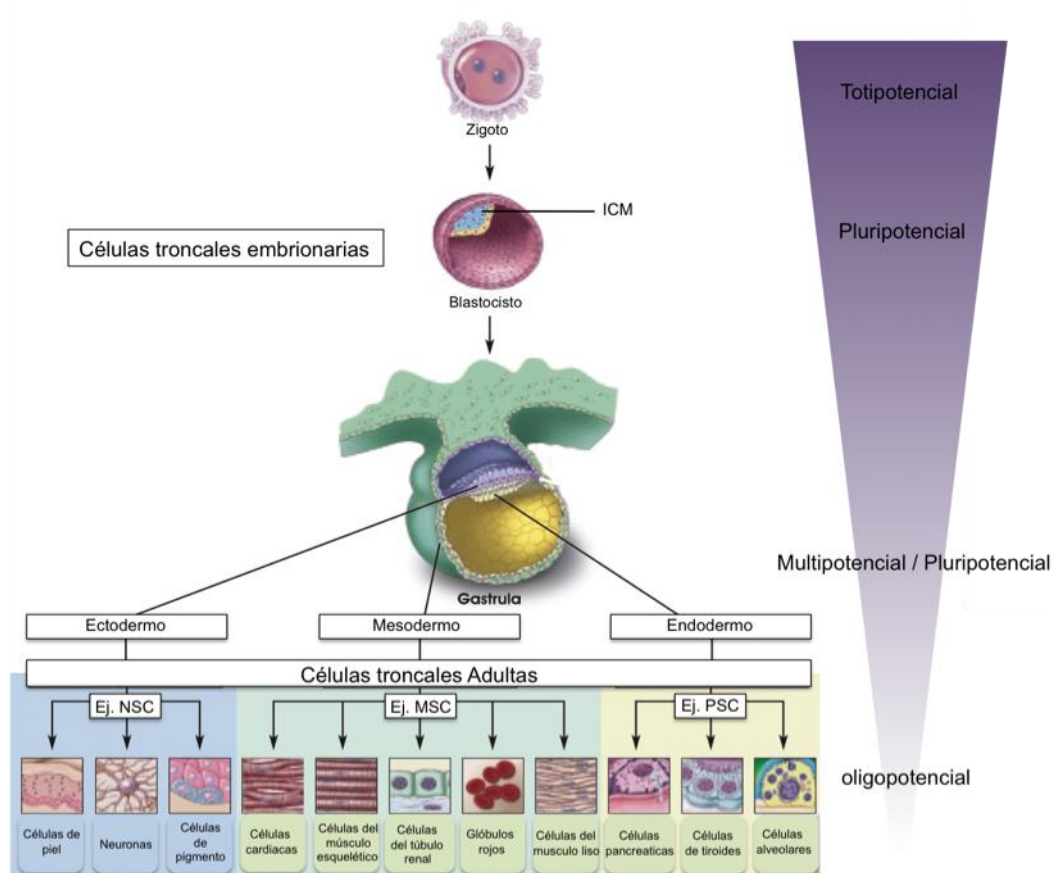


Figura i1. Esquema representativo del origen y potencialidad de los diferentes tipos de células madre y sus destinos tisulares durante el desarrollo

Las células madre se clasifican en función de su origen, tejido que las alberga y potencialidad de diferenciación. El cigoto es la célula progenitora totipotencial por defecto, capaz de generar todos los tipos celulares del individuo; las células madre derivadas de la masa celular interna (ICM, *Inner Cell Mass*) poseen pluripotencialidad y son capaces de producir todos los tipos celulares provenientes de las tres capas germinales del embrión; las células madre adultas provenientes del desarrollo embrionario tras la gastrulación, son consideradas generalmente como multipotenciales y son capaces de diferenciarse a tejidos pertenecientes a una misma capa embrionaria y por último, las células madre oligopotenciales, poseen un espectro más restrictivo de diferenciación y sólo se diferencian a uno o pocos tipos celulares pertenecientes a un mismo tejido (modificado de <http://stemcells.nih.gov>). Abreviaturas: NSC, células madre neurales (*Neural Stem Cell*); MSC, células madre mesenquimales (*Mesenchymal Stem Cell*); PSC, células madre pancreáticas (*Pancreatic Stem Cell*).

1.2 Células madre Adultas

En condiciones fisiológicas, todos los tejidos del organismo mantienen una tasa de renovación que varía dependiendo del propio tejido. Una célula madre adulta, es una célula indiferenciada que se encuentra en el interior de los tejidos adultos y que posee la capacidad de autorrenovación y diferenciación que le permite formar nuevas células del tejido u órgano al que pertenece (Weissman, 2000); su función principal es la de mantener la homeostasis del tejido tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La primera evidencia de la existencia de células madre adultas progenitoras fue descrita en el sistema hematopoyético, gracias al desarrollo de trasplantes de médula ósea realizados en ratones irradiados. McCulloch y James Till demostraron que tras el trasplante medular, los ratones irradiados presentaban en sus bazo células con características clonogénicas procedentes de la médula ósea de los ratones donantes (Becker et al., 1963; Till & Mc, 1961) y que además eran capaces de reconstituir todo el linaje celular sanguíneo de un individuo receptor tras subsecuentes trasplantes (Siminovitch et al., 1963), este hecho permitió describir por primera vez la existencia de **células madre hematopoyéticas** en la médula ósea adulta (HSC, *Hematopoietic Stem Cells*). Tras estos descubrimientos, en 1970 Friedenstein y colaboradores describieron una línea celular progenitora no hematopoyética residente en el estroma de la médula ósea que era capaz de adherirse a placas de cultivo y de formar colonias. Esta línea celular fue inicialmente definida como unidad fibroblastoide formadora de colonias (CFU-F, *Colony Forming Units-Fibroblastoid*) que además poseía la capacidad de diferenciar a células maduras de linaje mesenquimático (Friedenstein et al., 1976). Este hecho, hizo que varios grupos de investigación se dieran a la tarea de caracterizar la población celular residente dentro de la médula ósea estableciendo que el estroma medular se componía de una población heterogénea de células que incluían células reticulares, adipocitos, osteocitos, células de músculo liso, células endoteliales y macrófagos (Owen, 1988) en donde también se albergaban estas células “madre” (CFU-F) que parecían estar asociadas al tejido conjuntivo de la médula, y que eran capaces de dar origen a los distintos tipos celulares del estroma medular, entre ellos hueso y cartílago (Owen & Friedenstein, 1988; Piersma et al., 1983). Años más tarde, se denominó a estas células como **células madre mesenquimales** (MSC, *mesenchymal stem cells*) por su procedencia de tejido mesodérmico estromático (Caplan, 1991) y se estableció su capacidad de diferenciación a tejidos como condrocitos, osteocitos, adipocitos o miocitos confirmado de este modo su multipotencialidad (Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997).

Actualmente, el concepto de células madre se ha ido extendiendo a muchos tejidos, cambiando por completo la visión clásica del mantenimiento de la homeostasis celular de los órganos que se restringía a un número constante y limitado de células sin capacidad de renovación tisular. Se han descrito poblaciones de células madre adultas en un gran número de tejidos procedentes de las distintas capas embrionarias, pudiéndose aislar de tejido hematopoyético (Till & Mc, 1961), neural (Doetsch et al., 1999), músculo esquelético (Qu-Petersen et al., 2002; Seale & Rudnicki, 2000), epidermis (Janes et al., 2002), músculo cardíaco (Beltrami et al., 2003), páncreas (Puglisi et al., 2008), intestino (Marshman et al., 2002), hígado (Strain & Crosby, 2000), córnea (Ahmad et al., 2000) o placenta (Yen et al., 2005) entre muchos otros. Todas estas evidencias, sugieren que probablemente la mayoría de los órganos y tejidos del cuerpo disponen de una población minoritaria de células madre que les confiere la capacidad de renovar y mantener el tejido que permite contrarrestar los efectos deletéreos generados por el envejecimiento o por situaciones patológicas a la que están sometidos normalmente los organismos.

1.2.1 Células madre Mesenquimales Humanas (hMSC)

Las células madre mesenquimales humanas (hMSC, *human Mesenchymal Stem Cells*), también conocidas como células madre estromales o células madre multipotenciales, se definen como un tipo de célula madre adulta que procede del mesodermo embrionario y que es capaz de diferenciar a todos los tejidos mesenquimáticos no hematopoyéticos de un organismo (Bianco et al., 2008; Salem & Thiemermann). Se cree que están localizadas en el tejido estromático o conectivo que soporta los órganos que las albergan y que están principalmente asociadas a los nichos perivascuales (Crisan et al., 2008; Kuhn & Tuan; Shi & Gronthos, 2003; Zannettino et al., 2008).

Estas células representan una población de células madre “multipotentes” de origen mesodérmico con morfología fibroblastoide y plasticidad hacia diversos linajes celulares. Las hMSC residen principalmente en la médula ósea adulta (Prockop, 1997) aunque diversos hallazgos han demostrado también su presencia en otros tipos de tejidos tanto adultos como fetales lográndose aislar y caracterizar de tejidos tan diferentes como músculo esquelético (Williams et al., 1999), tejido adiposo (Zuk et al., 2002), hueso compacto (Guo et al., 2006), periostio (De Bari et al., 2001a; De Bari et al., 2006; Nakahara et al., 1991), cartílago articular (Dowthwaite et al., 2004), sangre periférica (Zvaifler et al., 2000), sangre de cordón umbilical (Erices et al., 2000; Sarugaser et al., 2005), líquido amniótico (In 't Anker et al., 2003), membrana sinovial (De Bari et al., 2001b; De Bari et al., 2003), líquido sinovial (Jones et al., 2004), tejido fetal (Campagnoli et al., 2001), pupa dental (Gronthos et al., 2000), tejido pulmonar (Sabatini et al., 2005) o placenta (Miao et al., 2006). A pesar de la generalizada presencia en un gran número de tejidos, hoy en día en lo que respecta a la terapia celular, las células madre mesenquimales mejor caracterizadas y más utilizadas en la regeneración de tejidos, son las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, cordón umbilical y tejido adiposo debido en esencia a su elevada facilidad de extracción y aislamiento (Bieback et al., 2008; Kern et al., 2006).

Las hMSC poseen un alto potencial de proliferación, autorrenovación y diferenciación que las convierte en una atractiva herramienta para la terapia celular e ingeniería tisular. El carácter multipotente de estas células está marcado principalmente por la capacidad de diferenciación hacia al menos tres linajes celulares de origen mesodérmico: linaje óseo, adiposo y condrocítico mediante el uso de protocolos específicos de diferenciación que utilizan una combinación de factores de crecimiento y citoquinas suplementadas en el medio (Bianco et al., 2001; Pittenger et al., 1999; Prockop, 1997). Sin embargo, cada vez parece más evidente que estas hMSC derivadas de múltiples órganos, no son sólo capaces de generar células maduras de estos tres linajes celulares, sino que también son capaces de diferenciar a otros tejidos de origen mesodérmico como músculo cardíaco (Behfar & Terzic, 2006; Toma et al., 2002) o incluso, no mesodérmico (Jiang et al., 2002; Lange et al., 2005) como es el caso de la diferenciación de las hMSC derivadas de médula ósea a tejido hepático (Luk et al., 2005) y neural (Dezawa et al., 2004; Hermann et al., 2004; Jori et al., 2005; Woodbury et al., 2000). Por esta razón, muchos investigadores han comenzado a utilizar el término “pluripotencial” para definir la capacidad de diferenciación de las hMSC.

1.3 Caracterización de las hMSC

A día de hoy, no se cuenta con una técnica estandarizada para la obtención de hMSC de los diferentes tejidos ni con una nomenclatura aceptada universalmente para su definición (Bianco et al., 2008); tampoco se ha identificado una única molécula específica que permita obtener y distinguir de manera selectiva las hMSC de los distintos tipos celulares que forman parte de los tejidos que las albergan (revisado en (Bianco et al., 2008)). A pesar de estas dificultades en el aislamiento y definición, en la actualidad se han llegado a identificar una batería de antígenos que se expresan de manera preferencial aunque no exclusiva en todas las células madre mesenquimales, lo que ha permitido que se utilicen anticuerpos monoclonales para el aislamiento e identificación de las hMSC.

Según los criterios propuestos por la Sociedad Internacional para la Terapia Celular (**ISCT, *International Society for Cellular Therapy***), las hMSC están principalmente definidas por su capacidad de adherencia al plástico en cultivo, por el inmunofenotipo de expresión de marcadores presentes en la superficie de la membrana y por la capacidad multipotente (o pluripotente) de diferenciación *in vitro* (revisado en (Dominici et al., 2006)). El criterio mínimo de expresión de marcadores en humanos definido por la ISCT fue determinado por la presencia de tres antígenos de superficie en la membrana CD105, CD73 y CD90 y por la expresión muy reducida o nula de los marcadores de membrana específicos de células de origen hematopoyético CD14 o CD11b, CD34, CD45, CD79 α o CD19 y HLDA-DR. Además del fenotipo inmune propuesto por la ISCT, otros autores han añadido nuevos antígenos de superficie útiles para la detección de hMSC como stro1 (Simmons & Torok-Storb, 1991), CD44, CD166, CD13, CD106, CD29, y otros marcadores de selección negativa de origen hematopoyético o endotelial como CD31, CD117, CD56, CD68, CD133 y CD43 (Augello et al., 2010; Kolf et al., 2007; Salem & Thiemermann, 2010).

Aunque todas las hMSC procedentes de las distintas fuentes ostentan las características anteriormente descritas, hay que destacar que muchas de ellas presentan cierta heterogeneidad. Estudios comparativos entre las principales fuentes de obtención de hMSC procedentes de médula ósea, tejido adiposo y cordón umbilical aparentemente muestran equivalencia respecto a su morfología y fenotipo inmune, pero sin embargo, mantienen diferencias en lo que respecta a la tasa de éxito de aislamiento, formación de colonias y capacidad de diferenciación (Baksh et al., 2007; Izadpanah et al., 2006; Kern et al., 2006; Wagner et al., 2005). Algunos autores postulan, que las diferencias observadas pueden ser producto de la diversidad celular encontrada en la fracción de aislamiento inicial, debida a la existencia de diferentes poblaciones clonales de hMSC en el extracto de partida (Phinney & Prockop, 2007) o bien al efecto aleatorio que ejerce la manipulación celular *ex vivo* sobre las hMSC y que podría influir sobre las propiedades de proliferación, autorrenovación y diferenciación (Bonab et al., 2006; Bork et al.; Jones et al., 2002). Por un lado, todos estos factores aumentan la complejidad para definir, caracterizar y manipular las hMSC *in vitro*, limitando a su vez la estandarización de estrategias para el desarrollo de la terapia celular; sin embargo, parece ser que ninguna de estas diferencias afecta las características biológicas básicas o las propiedades regenerativas globales de las hMSC (Bieback et al., 2008), las cuales son avaladas por los numerosos ensayos preclínicos y clínicos realizados hasta la fecha con diferentes tipos de hMSC y que demuestran un efectiva regeneración tisular (Bieback et al., 2008; www.clinicaltrials.gov).

II. Expansión celular *in vitro*

Si bien las hMSC pueden ser extraídas de diferentes tejidos, la frecuencia de estas en el organismo adulto suele ser escasa. Debido a que en la mayoría de protocolos de terapia celular se usan entre 10 – 400 millones de hMSC totales dependiendo del tipo de tratamiento (www.clinicaltrials.gov), es necesario expandirlas previamente *in vitro* durante un periodo de 8 a 12 semanas antes de proceder a su implantación (**figura i2**). La capacidad de expansión *in vitro* depende principalmente del fondo genético del donante, la edad del donador y del tejido del que procedan (Wagner et al., 2009; Wagner et al., 2008). Sin embargo, durante este periodo de manipulación, las hMSC pueden verse afectadas también por los efectos negativos inherentes al estrés generado por el aislamiento y el propio cultivo (Carrancio et al., 2008; Duggal & Brinchmann; Mannello & Tonti, 2007; Sotiropoulou et al., 2006). No obstante, además de estos factores que alteran el crecimiento celular *in vitro*, existe también un mecanismo celular innato que impide la replicación celular por largos periodos de tiempo en condiciones estándar de cultivo. A este límite de la proliferación celular que afecta de manera indiscriminada a la mayoría de tipos celulares humanos primarios adultos incluidas las hMSC, se le ha denominado **senescencia replicativa o “límite de Hayflick”**, en consideración a su descubridor (Hayflick & Moorhead, 1961).

2.1 La senescencia replicativa

Las hMSC presentan un límite de divisiones celulares que impide su crecimiento indefinido en condiciones estándar de cultivo. Este límite de proliferación que sufren todos los cultivos de células primarias fue inicialmente descrito por Leonard Hayflick en 1960 al que se le denominó “límite de Hayflick” o senescencia replicativa. Este fenómeno, se caracteriza por generar alteraciones en las células que provocan un considerado aumento en la talla celular (Bayreuther et al., 1988), resistencia a apoptosis (Wang, 1995) e incapacidad para realizar divisiones celulares futuras de modo permanente pero conservando su actividad metabólica (Hayflick & Moorhead, 1961). Además de estos cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales derivados de la senescencia replicativa, se han sugerido una gran variedad de biomarcadores para la identificación de las células senescentes en cultivo. Uno de los biomarcadores más generalizado y mejor caracterizado, es el relacionado con la actividad anormal de la enzima lisosomal β -galactosidasa (SA- β -gal), la cual normalmente es detectada a pH 4 pero en células senescentes puede ser detectada a pH 6 (Dimri et al., 1995). Aunque no se conocen con exactitud los mecanismos subyacentes a este fenómeno, se ha propuesto que esta actividad enzimática particular deriva de un aumento en el contenido y masa lisosomal ocurrida durante la senescencia y que permite la detección de la actividad a un pH subóptimo (Kurz et al., 2000; Lee et al., 2006).

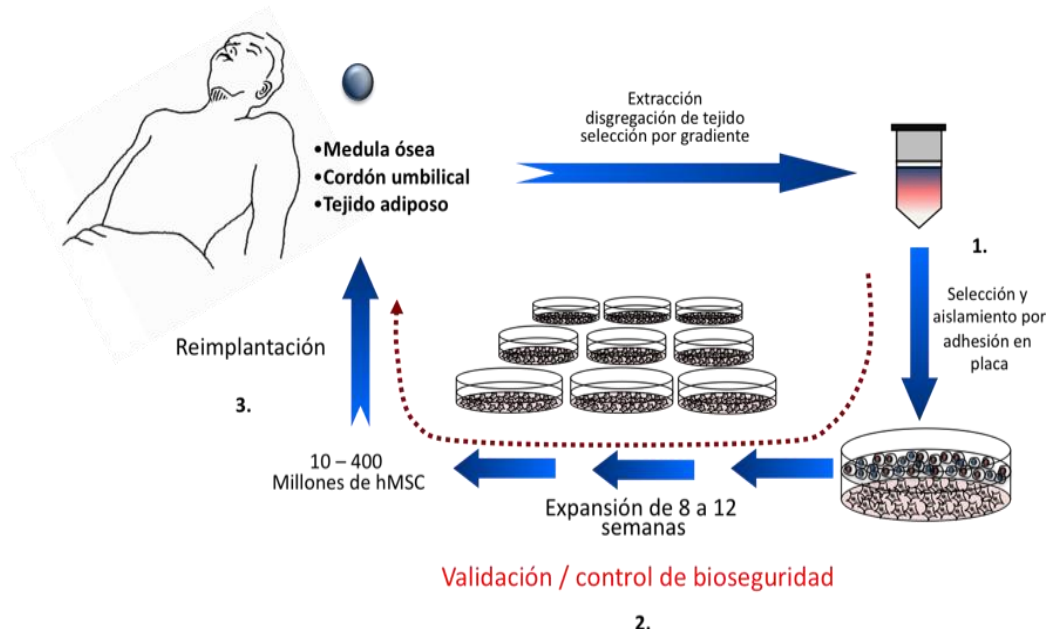


Figura i2. Protocolo estandarizado de terapia celular

El tratamiento autólogo con hMSC desarrollado actualmente en clínica, se realiza principalmente mediante el uso de hMSC procedentes de médula ósea, cordón umbilical o tejido adiposo. El esquema terapéutico consiste en un primer paso de extracción y aislamiento; un segundo paso de identificación, expansión y validación; y un tercer paso de reimplantación. Durante el periodo de expansión es necesario realizar exhaustivos controles de calidad y de bioseguridad que permitan validar el cultivo, mediante la utilización de controles serológicos, cariotipado o presencia de patógenos, entre otros; este periodo de expansión puede durar de 8 a 12 semanas dependiendo del número total de células a implantar y del tamaño del explante original. Abreviaturas: hMSC: Células madre mesenquimales humanas (*human Mesenchymal Stem Cells*).

Una vez las células primarias son puestas en cultivo y estas comienzan a dividirse, el fenómeno de Hayflick o proceso de senescencia replicativa inicia, promoviendo la reducción gradual del potencial de proliferación y disminuyendo la capacidad de diferenciación (si son células madre adultas) hasta inhabilitar sus propiedades terapéuticas (Banfi et al., 2000; Bonab et al., 2006; Wagner et al., 2008). Así por ejemplo, en condiciones estándar de cultivo los fibroblastos humanos pueden alcanzar un máximo de 50-70 divisiones celulares (Hayflick & Moorhead, 1961), mientras que las hMSC sólo logran dividirse entre 20-50 divisiones antes de comenzar a perder su potencial de proliferación y capacidad de diferenciación (Banfi et al., 2000; Bonab et al., 2006; Bruder et al., 1997; Stenderup et al., 2003; Wagner et al., 2008).

Si bien existe homología entre las MSC procedentes de distintas especies de mamíferos, cuando estas son puestas en cultivo exhiben diferencias en cuanto a su estabilidad genética y capacidad de proliferación. Por ejemplo, se ha demostrado que los cultivos celulares prolongados de MSC murinas además de poseer un alta capacidad proliferativa adquieren una gran cantidad de aberraciones cromosómicas, que las hace susceptibles de sufrir transformación espontánea en cultivo. Esta transformación espontánea, generalmente esta asociada a la adquisición de una incrementada actividad telomerasa, sobreexpresión del oncogén *c-Myc* y pérdida de expresión de los genes supresores de tumores *Tp53* y *Ink4a* (Li et al., 2007; Miura et al., 2006). Por el contrario, las MSC de origen humano (hMSC; *human Mesenchymal Stem Cells*) suelen ser más estables cromosómicamente y aún no se ha demostrado fehacientemente que sufran procesos similares de transformación tras tiempos prolongados de cultivo (Bernardo et al., 2007; Garcia et al., 2010; Izadpanah et al., 2008; Torsvik et al., 2010).

Las células tumorales o células transformadas, presentan alteraciones en la expresión de genes supresores de tumores o protooncogenes y mecanismos de mantenimiento de la longitud del telómero, que les confiere la habilidad de sobrepasar el límite de divisiones celulares impuesto por la senescencia replicativa (Hahn & Weinberg, 2002). Esta evidencia, pone de manifiesto que los mecanismos subyacentes a la senescencia celular están estrechamente ligados con los procesos involucrados en la

protección de las células frente a la transformación neoplásica; y bajo esta óptica se puede considerar a la senescencia replicativa como un proceso supresor de tumores, potencialmente implicado en el envejecimiento de los organismos (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Collado et al.; Serrano, 2007).

A día de hoy, se considera que el fenómeno de la senescencia celular en cultivo puede desencadenarse mediante dos vías estrechamente ligadas entre sí. Una dependiente de factores extrínsecos a la célula que deriva esencialmente del estrés que las células experimentan cuando son expandidas *in vitro* (“**estrés del cultivo**”) y otra mediada por factores intrínsecos que depende de un proceso genéticamente programado (“**reloj mitótico**”) (Sherr & DePinho, 2000). Aunque las causas moleculares por las cuales estas dos vías rigen el fenómeno de la senescencia no están totalmente identificadas, hoy en día se pueden atribuir al menos a tres mecanismos de respuesta celular fundamentales: i) **acumulación de daño en el ADN** ii) **acortamiento telomérico y/o** iii) **sobreexpresión del locus *INK4A-ARF*** (revisado en (Collado et al., 2007)). Es importante reseñar que a pesar de la existencia de tres mecanismos principales de inducción de la senescencia celular, todos ellos presentan una relación con el **estrés oxidativo** y además generan un único tipo de respuesta que converge en la activación de las rutas de las proteínas supresoras de tumores P53 y la proteína del retinoblastoma (RB, *Retinoblastoma protein*); proteínas que constituyen una herramienta imprescindible para evitar la tumorigénesis mediante el desencadenamiento de la senescencia celular o apoptosis (revisado en (Ben-Porath & Weinberg, 2005)) (**figura i3**).

Dada la importancia del estrés oxidativo en la activación de la senescencia celular y de cómo esta impera sobre el proceso de expansión de las hMSC en cultivo; es de gran relevancia estudiar como las condiciones de cultivo alteran los niveles de estrés oxidativo en el medio y modulan la respuesta celular encargada de desencadenar la senescencia. Esto no sólo permitirá comprender mejor los mecanismos moleculares que median la respuesta al estrés y de como estos desencadenan la senescencia, sino también conocer las condiciones de cultivo idóneas que permitan realizar un proceso de expansión celular mas bioseguro y eficaz.

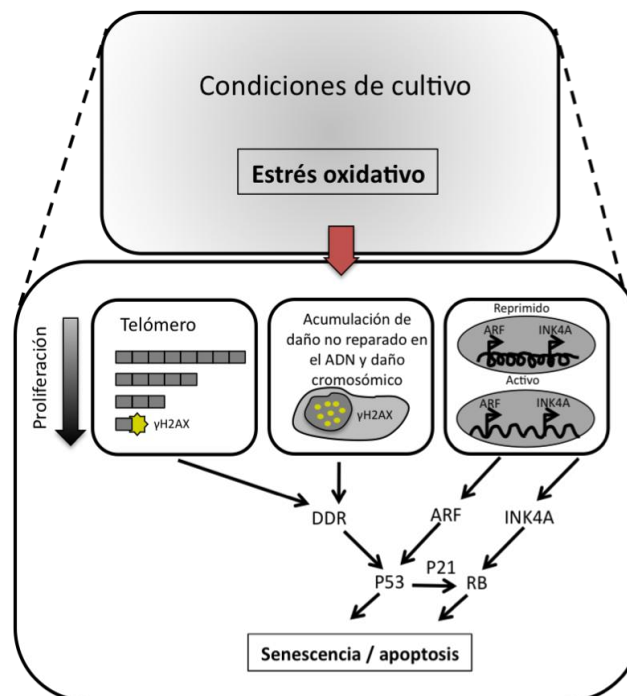


Figura i3. Mecanismos de inducción de senescencia celular en cultivo

Descripción de los tres mecanismos principales implicados en la inducción de la senescencia celular en cultivo. El acortamiento telomérico, la acumulación de daño en el ADN y la desrepresión del locus *INK4A/ARF*, los cuales convergen en las dos principales rutas desencadenantes de la senescencia celular o apoptosis; la de las proteínas supresoras de tumores P53 y del retinoblastoma (RB) (Modificado de (Collado et al 2007)). Las condiciones de cultivo y el estrés oxidativo derivado de él, influyen sobre el desencadenamiento de estos tres mecanismos. Abreviaturas: DDR, respuesta de daño al ADN (*DNA Damage Response*).

2.2 El Estrés oxidativo en cultivo

El estrés oxidativo en la célula se produce por un desequilibrio entre la producción de **especies reactivas del oxígeno (ROS, Reactive Oxygen Species)** y la capacidad del sistema para detoxificarlos o reparar el daño resultante (revisado en (Griendling & FitzGerald, 2003)). Bajo la denominación de ROS se incluyen varias especies derivadas de la reducción del oxígeno molecular (O_2) fundamentalmente el anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^\cdot) todos ellos altamente reactivos y con capacidad de provocar daño en la célula. Estas especies reactivas, pueden generarse de manera natural exhibiendo una relevante función en la biología celular o por inducción de agentes oxidantes en el medio (revisado en (Devasagayam et al., 2004)).

En condiciones fisiológicas o normales para la célula, continuamente se producen especies reactivas del oxígeno que son inactivadas o eliminadas mediante mecanismos enzimáticos de protección celular (antioxidantes naturales) (revisado en (Sies, 1997)). La formación de ROS, se produce en múltiples compartimentos celulares como consecuencia de la acción de una gran variedad de enzimas. Dichas enzimas, participan en diversos procesos necesarios para la función celular, como la beta oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas, la inactivación de compuestos xenobióticos por las enzimas citocromo p450 en el retículo endoplásmico, el metabolismo de las purinas por la xantina oxidasa en el citoplasma, la defensa antimicrobiana por acción de la NADPH oxidasa en células fagocíticas del sistema inmune y/o por el transporte de electrones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC, *Electron Transport Chain*) (Beckman & Ames, 1998). Dado que en condiciones normales para la mayoría de tipos celulares como es el caso de las células madre, la fuente primaria de ROS es la ETC (revisado en (Balaban et al., 2005)), consideramos relevante centrar nuestra atención en las especies reactivas del oxígeno procedentes del metabolismo de la mitocondria.

2.2.1 Producción de ROS por la cadena transportadora de electrones mitocondrial

Una consecuencia inevitable del metabolismo del oxígeno, necesario para la generación de ATP y por lo tanto para la supervivencia celular, es la producción de ROS (Saraste, 1999). Este proceso tiene lugar mediante el transporte de electrones desde el NADH o el $FADH_2$ al oxígeno molecular a través de una serie de transportadores situados en la membrana mitocondrial interna que constituyen la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC, *Electron Transport Chain*). En distintos puntos de la ETC, electrones derivados del NADH o $FADH_2$ pueden reaccionar directamente con el oxígeno molecular generando el anión superóxido (O_2^-). La generación de O_2^- en la ETC se localiza fundamentalmente a nivel de los complejos I (Kushnareva et al., 2002) y III (Chen et al., 2003) aunque, algunos autores sugieren también la participación del complejo II (Turrens, 2003). Los complejos I y II generan superóxido en la matriz mitocondrial, mientras que el complejo III posee la habilidad de generarlos en la matriz y el espacio intermembrana mitocondrial (Chandel & Budinger, 2007) (**figura i4**). Con intención de detoxificar la célula, el radical libre (O_2^-) producido durante el flujo de electrones en la ETC se convertirá en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por acción de las enzimas superóxido dismutasas (SOD1, 2 y 3, *Superoxide Dismutase*) y en presencia de metales de transición reducidos, vía reacción de Fenton podrá convertirse en anión hidroxilo (OH^\cdot), un potente oxidante (Giulivi et al., 1995) o ser metabolizado en agua por las enzimas catalasa (CAT, *Catalase*), glutation peroxidasas, y/o peroxiredoxinas entre otras. Por otro lado, las especies reactivas del oxígeno generados durante el metabolismo (particularmente el O_2^-), pueden reaccionar con el óxido nítrico dando lugar a las especies reactivas de nitrógeno (RNS, *Reactive Nitrogen Species*) que son potencialmente perjudiciales para la célula pero que poseen una importante función en la señalización celular (Brown & Borutaite, 2001).

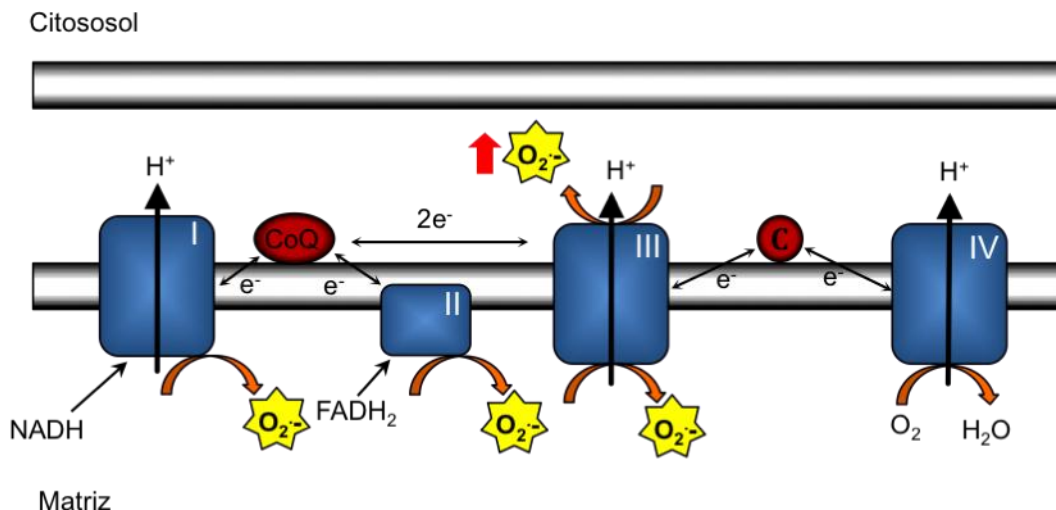


Figura i4. Representación esquemática de la cadena de transporte eléctrico mitocondrial

Representación del flujo de electrones (flechas negras finas) a lo largo de todos los complejos que conforman la cadena de transporte electrónico mitocondrial (CTE). La energía obtenida a través de la transferencia de electrones a lo largo de la CTE es usada para bombear protones (flechas negras gruesas) desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, creando el gradiente electroquímico de protones que permitirá la posterior formación de ATP. Los electrones son cedidos por el NADH y/o el FADH₂ y se dirigen hasta el aceptor final el oxígeno molecular. Se señalan los principales puntos de producción de aniones superóxido (O₂^{•-}); los complejos I y II liberan el radical superóxido al interior de la matriz mitocondrial y el complejo III promueve su liberación en el espacio intermembrana y en la matriz de la mitocondria (modificado de (Klimova & Chandel, 2008)). Abreviaturas: CoQ, coenzima Q; C, citocromo C.

La producción neta de ROS en una célula es extremadamente variable, siendo sensible al potencial eléctrico de membrana mitocondrial, al estado redox de los complejos transportadores de la ETC, a la tensión de oxígeno o a la presencia de moléculas antioxidantes en el medio, entre otros. Tradicionalmente, llevando a cabo experimentos de aislamiento mitocondrial se ha estimado que entre un 0,4-4% del oxígeno total consumido durante la respiración mitocondrial se convierte en radical O₂^{•-} (Boveris, 1984; Turrens & Boveris, 1980). No obstante, trabajos recientes realizados en condiciones más rigurosas concluyen que el valor basal de producción de ROS puede ser significativamente menor, situándolo en un valor cercano al 0,2% (St-Pierre et al., 2002; Staniek & Nohl, 2000). Al margen del valor basal de producción de ROS, se sigue considerando a la mitocondria como la fuente principal de producción estos radicales libres (revisado en (Balaban et al., 2005)).

La presencia de elevados niveles de ROS en la célula es perjudicial para el mantenimiento de la homeostasis celular. Las especies reactivas del oxígeno, pueden dañar directamente diversas moléculas orgánicas, produciendo modificaciones químicas en el ADN (Bohr, 2002), inactivando proteínas celulares mediante oxidación de aminoácidos (Hainaut & Mann, 2001; Wu et al., 1996) o induciendo peroxidación de ácidos grasos afectando a los fosfolípidos de membrana (Marnett et al., 1985). El daño oxidativo generado por estas especies en el ADN es considerado como uno de los efectos más nocivos para la célula, ya que pueden producir cambios irreversibles en el genoma, alterando la expresión de genes supresores de tumores o protooncogenes promoviendo efectos tumorigénicos o incapacitando la funcionalidad celular (Wiseman & Halliwell, 1996).

Se sabe que las especies reactivas del oxígeno pueden inducir al menos una veintena de modificaciones químicas sobre la estructura del ADN, entre las cuales se encuentran roturas de hebra, modificaciones de los azúcares, oxidaciones de las cuatro bases nitrogenadas o generación de sitios abásicos (Gajewski et al., 1990). Se estima que este tipo de daño puede generarse con una frecuencia de entre 10⁴ - 10⁵ mutaciones en el ADN por célula y día (Beckman & Ames, 1997). Este daño en el ADN posee además un claro carácter clastogénico llegando a generar diversas alteraciones cromosómicas estructurales como deleciones, inserciones o translocaciones que amplían el espectro tóxico para la célula (Beckman & Ames, 1997, 1998). Todo el daño genotóxico originado por estas especies, activará en la célula una respuesta de reparación para intentar solventar el daño generado; si éste no es

eficientemente reparado, la célula entrará en un estado de senescencia celular, apoptosis o transformación celular.

2.2.2 Senescencia prematura inducida por estrés

Desde los primeros trabajos de Ross Harrison en 1907 en los que se desarrollaron los primeros cultivos de células, se le ha prestado una fuerte atención a las condiciones necesarias para mantener cultivos celulares *in vitro* mediante el control en el balance de nutrientes, factores de crecimiento y pH, procurando que fuesen condiciones semejantes a las encontradas en los nichos naturales de las células (Carrel, 1912). Sin embargo, en la actualidad el uso de hMSC en clínica se lleva a través de técnicas de aislamiento y cultivo que no son completamente idóneas para la expansión celular *in vitro* (Carrancio et al., 2008; Duggal & Brinchmann; Mannello & Tonti, 2007; Sotiropoulou et al., 2006). De hecho, se ha demostrado que dichas prácticas se desarrollan en un ambiente altamente oxidante y citotóxico debido a la presencia de concentraciones subóptimas de suero, glucosa o tensión de oxígeno entre muchas otras, que son perjudiciales para la célula y comprometen la viabilidad e integridad genética (Duggal & Brinchmann; Loo et al., 1987; Mannello & Tonti, 2007; Miura et al., 2006; Ramirez et al., 2001; Sherr & DePinho, 2000; Woo & Poon, 2004).

El estrés en cultivo es capaz de inducir senescencia prematura antes de que el reloj mitótico celular afecte el potencial proliferativo de las células. Esto se ha evidenciado por ejemplo, en cultivos de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, *Mouse Embryonic Fibroblast*), los cuales a pesar de presentar una alta actividad telomerasa y telómeros sustancialmente largos, padecen una acelerada aparición del fenómeno de la senescencia tras haber sufrido un corto periodo de tiempo en cultivo (Serrano et al., 1993; Serrano et al., 1996). La forma en que el estrés subcitotóxico puede acelerar la aparición del fenotipo senescente ha sido considerada como una forma de senescencia celular que se conoce actualmente como **senescencia prematura inducida por estrés (SIPS, Stress-Induced Senescence)** (Brack et al., 2000; Ramirez et al., 2001; Serrano & Blasco, 2001). Esta consideración se ha establecido, debido a que la SIPS es capaz de inducir las características propias de la senescencia replicativa en la célula (tradicionalmente restringida al acortamiento telomérico) tales como el aumento de la actividad SA- β -gal, carencia de capacidad de síntesis de ADN en presencia de factores de crecimiento y presencia de incrementados niveles de P21, P53 y/o RB, entre otros (revisado en (Kuilman et al., 2010)) (**figura i5**).

Dependiendo del grado de estrés, las células responderán de una u otra forma. Una elevada dosis de estrés citotóxico producirá en la célula fuertes cambios bioquímicos y estructurales que desencadenarán directamente en una muerte celular por necrosis, pero si el nivel de daño es moderado, la célula activará vías de señalización de protección que conducirán a la senescencia celular o muerte celular programada (apoptosis) (revisado en (Toussaint et al., 2002)). Un variado número de agentes estresantes se han postulado como inductores de SIPS, entre los cuales destacan diferentes recursos de estrés oxidativo (Campisi & d'Adda di Fagagna, 2007; Toussaint et al., 2002), sobreexpresión de oncogenes (Serrano et al., 1997; Zhu et al., 1998), activación de señales mitogénicas (Dimri et al., 2000) o varios tratamientos que afectan el remodelado de la cromatina (Jacobs et al., 1999; Ogryzko et al., 1996). Una variedad de estos factores inductores de senescencia, en esencia aquellos relacionados con los recursos de estrés oxidativo e inducción mitogénica, están presentes en las condiciones estándar de cultivo que se utilizan para la expansión de la mayoría de células primarias (Shay & Wright, 2007; Sherr & DePinho, 2000) incluidas las propias hMSC. Es de señalar que el estrés oxidativo juega un papel crucial en la inducción de SIPS. Diversos ensayos han demostrado que mediante el uso de diferentes tipos de antioxidantes en condiciones estándar de cultivo, se puede retrasar significativamente la senescencia celular y potenciar la capacidad endógena de proliferación celular (Atamna et al., 2000; Chen et al., 1995; Furumoto et al., 1998; Lee et al., 1999; Serra et al., 2003; von Zglinicki et al., 2000).

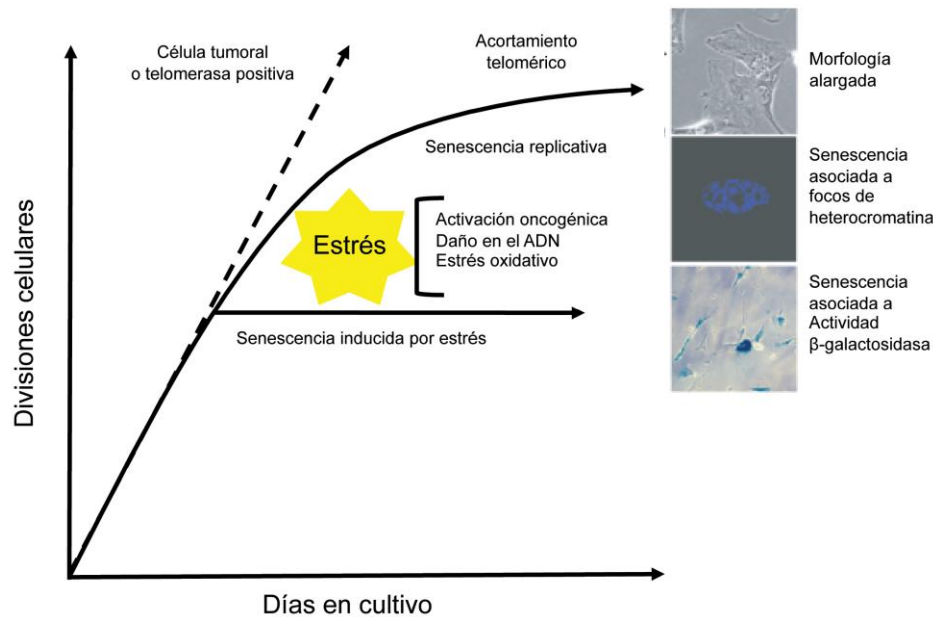


Figura i5. Senescencia celular en cultivo

Las células somáticas humanas, entran en un estado de parada del ciclo celular irreversible después de que alcanzan un número finito de divisiones celulares en cultivo, el cual es causado esencialmente por el acortamiento telomérico. La activación de la telomerasa y el mantenimiento de una longitud telomérica constante son características típicas de células madre embrionarias, germinales o células tumorales las cuales pueden proliferar indefinidamente en cultivo. Se ha demostrado, que la senescencia celular puede ser también inducida prematuramente por diversos tipos de estrés como estímulos oncogénicos, estrés oxidativo y daño en el ADN, antes de llegar al límite de proliferación celular innato. Este tipo de senescencia celular es denominado “senescencia prematura inducida por estrés” (SIPS) y presenta las características clásicas de la senescencia replicativa, generando células con un fenotipo alargado, elevada actividad β -galactosidasa y poseer focos de heterocromatina, entre otros (Adaptado de (Ohtani et al., 2009))

2.3 Mecanismos de inducción de la senescencia celular en cultivo

Tres mecanismos esenciales de respuesta celular son los encargados de desencadenar la senescencia en cultivo, siendo todos ellos susceptibles de sufrir alteración por parte de estímulos exógenos como las condiciones de cultivo o el estrés oxidativo que deriva de él. A continuación, nos centraremos en el estudio de estos mecanismos y su relación con las condiciones de expansión *in vitro*.

2.3.1 Senescencia inducida por daño en el ADN

Es un hecho que el daño en el ADN contribuye al envejecimiento celular (Gensler & Bernstein, 1981; Hoeijmakers, 2009). El daño severo al ADN que ocurre en cualquier punto del genoma gracias a la acción de diferentes tipos de estrés genotóxico como la radiación ionizante (rayos χ o γ), agentes químicos, nucleasas celulares o metabolismo celular puede llegar a generar oxidación de bases y/o roturas de una sola (SSB, *Single Strand Breaks*) o doble hebra (DSB, *Double Strand Breaks*) (Di Leonardo et al., 1994; Hoeijmakers, 2009). Este tipo de daño podría alterar la integridad del genoma y por tanto comprometer la viabilidad de la célula, por esta razón la célula posee mecanismos de defensa que posibilitan la reparación de dicho daño cuando se produce algún tipo de rotura (SSB y/o DSB). Este mecanismo de protección es comúnmente denominado como “**respuesta a daño en el ADN**” (DDR, **ADN Damage Response**).

La función del DRR consiste en retrasar la progresión del ciclo celular para que los sistemas de reparación de la célula corrijan el ADN dañado y esta pueda continuar con la división sin presentar alteraciones en el genoma incompatibles con la viabilidad celular; no obstante si el daño persiste o es excesivamente elevado, las células entran en parada del ciclo celular de forma permanente (senescencia celular) o apoptosis (Di Leonardo et al., 1994). Existen cuatro mecanismos principales de reparación de

roturas en el ADN que son: el sistema de reparación por escisión nucleotídica (NER, *Nucleotid Excision Repair*), el sistema de reparación por escisión de bases (BER, *Base Excision Repair*), el sistema de recombinación homóloga (HR, *Homologous Recombination*) y el sistema de unión de extremos no homólogos (NHEJ, *Non-Homologous End Joining*) (Lindahl & Wood, 1999), todos ellos encargados de mantener la integridad del genoma durante la progresión natural del ciclo celular o en situaciones de estrés. NER y BER reparan principalmente lesiones de una sola hebra, mientras que HR y NHEJ reparan lesiones de doble hebra.

2.3.1.1 Mecanismo de respuesta a daño en el ADN

En esencia, la respuesta DDR se basa en la “detección” de las SSB y/o DSB por complejos proteicos especializados que reclutan y activan dos proteínas quinasas (ATM, *Ataxia-telangiectasia mutated* y ATR, *Ataxia-telangiectasia Rad3-related*) en el sitio de la lesión (Goodarzi et al., 2003; Shiloh, 2003). La incorporación de cualquiera de estas dos quinasas al sitio de daño, provoca una fosforilación local de la histona H2AX (γ H2AX) (Burma et al., 2001; Ward & Chen, 2001) que inicia un sistema de retroalimentación positiva ayudado por proteínas mediadoras (MDC1, 53BP1, TOPBP1 y Claspin, entre otras) que facilitarán una mayor incorporación de ATM/ATR al sitio de la lesión incrementando a su vez la actividad local de estas quinasas, traducándose en una mayor propagación de la fosforilación de H2AX a lo largo de cientos de kilobases de cromatina adyacente al sitio de daño (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Cuando se produce un incremento suficiente de la actividad ATM/ATR, estas proteínas fosforilarán y activarán otras quinasas con capacidad de difundir por el núcleo (CHK1 y CHK2), las cuales permitirán la inactivación de la fosfatasa CDC25 (esencial para la progresión del ciclo) (Mailand et al., 2000) o la estabilización y acumulación de P53 en el núcleo. Esta estabilización permitirá la expresión de inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas como P21 lo cual resultará finalmente en la parada del ciclo celular (Di Leonardo et al., 1994). Cabe destacar que varias de estas proteínas colocalizan con el daño en el ADN a modo de focos pudiendo ser detectadas en células senescentes y en algunos casos coincidir con las estructuras teloméricas (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; Takai et al., 2003). Una vez la lesión es reparada, los focos del DDR son desensamblados por la desfosforilación de γ H2AX a través de fosfatasas específicas y toda una maquinaria encargada del remodelado de la cromatina (revisado en (Downey & Durocher, 2006)).

La severidad del daño es un importante factor en la respuesta, por lo que se ha postulado la existencia de dos niveles de respuesta DDR, transitoria o permanente, que conducirían a parada de ciclo celular o apoptosis, respectivamente (Campisi, 2003; Finkel et al., 2007). Es importante recordar que la senescencia y la apoptosis constituyen mecanismos antitumorales de gran importancia para evitar la transformación celular (Collado & Serrano, 2010). Si estas células no son eficientemente reparadas y adquieren mutaciones en los genes reguladores del ciclo, podrían ser incapaces de responder al daño y sufrir una replicación celular continuada favoreciendo la transformación neoplásica o malignización.

2.3.2 Senescencia inducida por acortamiento telomérico

En mamíferos, el acortamiento de longitud telomérica ha demostrado correlacionar rigurosamente con el envejecimiento (Canela et al., 2007; Cawthon et al., 2003; Herbig et al., 2006). Algunos estudios revelan que el acortamiento telomérico está relacionado con el desarrollo de enfermedades asociadas a la edad (Ogami et al., 2004; Panossian et al., 2003), síndromes de envejecimiento prematuro (Blasco, 2005) o incluso a factores externos como obesidad y estrés psicológico que podrían afectar la longevidad (Epel et al., 2004; Valdes et al., 2005).

Los telómeros en células de mamífero, son unas estructuras de ADN repetitivo en tándem que poseen la secuencia TTAGGG y se sitúan al final de los cromosomas (Blackburn, 1991; McClintock, 1941). Estas estructuras están asociadas a un complejo proteico especializado de seis proteínas denominado “*Shelterina*” que protege la propia estructura telomérica y en algunos casos regula la actividad telomerasa (de Lange, 2005). La pérdida progresiva de la longitud telomérica o la modificación parcial de su estructura constituye el principal mecanismo encargado de desencadenar la senescencia

replicativa propiamente dicha en células somáticas humanas incluyendo las hMSC (Allsopp et al., 1992; d'Adda di Fagagna et al., 2003; Griffith et al., 1999; Harley et al., 1990).

En la mayoría de los organismos eucarióticos, la longitud telomérica es mantenida por la enzima reverso transcriptasa telomerasa, la cual está formada por un componente proteico con actividad catalítica TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) y un componente ribonucleico que contiene la secuencia molde de ARN para la síntesis de las nuevas repeticiones teloméricas TERC (*Telomerase ARN Component*) (Blackburn, 2001). La mayoría de las células humanas primarias no presentan actividad telomerasa, Sin embargo, las líneas celulares germinales y el 90% de las células tumorales expresan TERT manifestando una elevada actividad telomerasa y por tanto cierta habilidad para mantener constante la longitud de los telómeros a lo largo de las divisiones celulares (Meyerson et al., 1997; Wright et al., 1996) (**figura i5**). En humanos, la telomerasa es activa durante la embriogénesis (Wright et al., 1996), suprimida en la mayoría de tejidos somáticos postnatales (Kim et al., 1999) pero se mantiene activa en células germinales y en algunas poblaciones celulares (progenitores celulares) pertenecientes a tejidos con alta tasa de renovación tisular (Collins & Mitchell, 2002; Flores & Blasco; Hiyama et al., 2001; Wright et al., 1996). A menudo estos niveles basales de telomerasa que poseen ciertos tipos de células progenitoras no son suficientes para prevenir el acortamiento telomérico asociado con la renovación de los tejidos deteriorados por la edad o con los pases en cultivo (Collins & Mitchell, 2002; Tam et al., 2007). Estos datos son contrastados por ejemplo, con la imposibilidad de las células madre hematopoyéticas (HSC) entre otras, para mantenerse indefinidamente como una línea generacional ya sea *in vitro* usando sistemas de cultivos o *in vivo* mediante trasplantes seriados (Janzen et al., 2006; Vaziri et al., 1994; Widmann et al., 2005).

Así mismo, se sabe que la expresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa humana, hTERT, es capaz de immortalizar las células humanas sin que ello conlleve a un estado de inestabilidad genética o de transformación, al menos en etapas iniciales del cultivo (Bodnar et al., 1998; Morales et al., 1999; Vaziri & Benchimol, 1998). Estos datos confirman el papel esencial que posee la telomerasa en la inhibición de la senescencia replicativa y su posible participación en la reparación del daño. No obstante, no todos los tipos celulares humanos responden del mismo modo a la sobreexpresión de hTERT. De este modo, para lograr una efectiva immortalización en células epiteliales humanas, además de la telomerización se necesita una inactivación de la proteína supresora de tumores P16^{INK4a} (Forsyth et al., 2003; Jarrard et al., 1999; Kiyono et al., 1998) o en su defecto una mejora en las condiciones de cultivo que sean más apropiadas para el tipo celular en cuestión (Herbert et al., 2002; Mathon et al., 2001; Ramirez et al., 2001; Tang et al., 2001), sugiriendo la importancia que poseen las condiciones de cultivo para el crecimiento e immortalización de las líneas celulares humanas.

2.3.2.1 Factores implicados en el acortamiento telomérico

Actualmente se conocen varios factores que influyen sobre el acortamiento telomérico, uno de ellos es la síntesis incompleta por parte de las ADN polimerasas convencionales, que durante el periodo de replicación celular dejan los extremos de la cadena de síntesis sin completar y como consecuencia favorecen el acortamiento telomérico paulatino tras las divisiones celulares (Ohki et al., 2001; Olovnikov, 1971). Otro de los procesos que afecta el acortamiento telomérico está relacionado con la presencia de nucleasas con actividad exonucleasa 5'→3' capaces de degradar los extremos protuberantes de las regiones teloméricas (Crabbe et al., 2004; Makarov et al., 1997; Ohki et al., 2001; Sfeir et al., 2005) y que podrían participar en el mantenimiento de la estabilidad estructural del telómero (Li et al., 2009). Finalmente, el acortamiento telomérico puede generarse por el **estrés oxidativo** que depende principalmente del estado oxidativo de la célula o las condiciones oxidantes del medio (von Zglinicki et al., 2001; von Zglinicki et al., 1995) que pueden o no favorecer la formación de radicales libres e inducir roturas en el ADN (Beckman & Ames, 1997, 1998). Muchas de estas roturas pueden ocurrir en las regiones teloméricas (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Herbig et al., 2004; von Zglinicki et al., 2000) y consecuentemente facilitar el acortamiento de los telómeros (von Zglinicki, 2002; von Zglinicki et al., 2000). Cuando los telómeros se acortan hasta una longitud telomérica crítica, las células entran en un estado de senescencia replicativa debido a la activación de señales de daño celular mediadas por el DDR las cuales activarán el gen supresor de tumores p53 y su diana transcripcional p21

generando la parada de ciclo celular y senescencia (Choudhury et al., 2007; d'Adda di Fagagna et al., 2003; de Lange, 2002; Herbig et al., 2004; Smogorzewska & de Lange, 2002).

La longitud telomérica media de los cromosomas humanos varía entre 7 y 15 kpb y la senescencia replicativa se desencadena habitualmente cuando dicha región adquiere una longitud media de entre 4 a 6kpb (Campisi, 2003; Chiu & Harley, 1997; De Lange et al., 2006). Según estimaciones recientes la tasa de acortamiento telomérico predicha para el problema de la síntesis incompleta es de aproximadamente 3pb por extremo y división celular (De Lange et al., 2006), por lo tanto las células humanas serían capaces de dividirse muchas más veces de lo que usualmente lo hacen (50-70 divisiones celulares) antes de que el problema de la síntesis incompleta genere telómeros críticamente cortos y/o disfuncionales. Varios estudios experimentales han comprobado que las células somáticas humanas sin actividad telomerasa pierden entre 50 y 200 pb de 5'-TTAGGG-3' por división celular (Counter et al., 1992; Harley et al., 1990; Schulz et al., 1996; Vaziri et al., 1993). Este exceso de pérdida de TTAGGG por división celular, podría ser atribuido a la presencia de estrés oxidativo en el medio o a la participación de exonucleasas activas capaces de generar extremos 3' protuberantes que acelerarían el proceso de acortamiento telomérico; aunque su contribución al fenómeno no está del todo esclarecida. Por otro lado, es importante enfatizar que la desprotección del telómero por parte de una desestabilización del complejo shelterina es capaz de desencadenar un respuesta DDR similar a la que desencadenaría un DSB (d'Adda di Fagagna et al., 2003; Takai et al., 2003) y que el acortamiento telomérico *per se*, también es capaz de desestabilizar este complejo (Griffith et al., 1999), facilitando la entrada en senescencia antes de la aparición de telómeros críticamente cortos.

El estrés oxidativo y la oxidación del telómero ha demostrado ser uno de los principales causantes del acortamiento telomérico (von Zglinicki., 2002; von Zglinicki, 2002). Varios trabajos han reportado que el exceso de estrés oxidativo es capaz de acelerar el acortamiento de la longitud del telómero (von Zglinicki et al., 1995) y que la reducción del estrés oxidativo en el medio, mediante el uso de antioxidantes, enzimas o bajas presiones parciales de oxígeno reducen el acortamiento del telómero (Richter & von Zglinicki, 2007; Saretzki et al., 2003; Serra et al., 2003). De éste modo, podría decirse que el acortamiento telomérico no sólo refleja el historial proliferativo de la célula, sino que también manifiesta la acumulación del daño oxidativo que ha sufrido la misma (Richter & von Zglinicki, 2007; von Zglinicki et al., 2003).

2.3.2.2 Susceptibilidad del telómero al daño genotóxico

Algunos estudios proponen que los telómeros son potencialmente más susceptibles de sufrir daño genotóxico que el resto del genoma especialmente mediante la formación de SSB (Ayouaz et al., 2008; Rochette & Brash); este fenómeno se ha justificado por el hecho de que plásmidos que contienen secuencias teloméricas TTAGGG llegan a presentar hasta siete veces más roturas de SSB que otras secuencias control bajo las mismas condiciones (Henle et al., 1999) o por el hecho de que los tripletes de guanina tienden a sufrir una mayor oxidación que el resto de secuencias presentes a lo largo del genoma (Oikawa et al., 2001). Se ha constatado que la eficiencia de reparación de las SSB en los telómeros es menos efectiva que en el resto del ADN (Kruk et al., 1995; Petersen et al., 1998) y que basta con que unos pocos telómeros presenten una longitud telomérica críticamente corta para desencadenar la senescencia en la célula (Hemann et al., 2001; Martens et al., 2000).

A pesar de estas evidencias, se sabe que el estrés oxidativo también puede inducir senescencia replicativa mediante daño generalizado en el ADN, de forma independiente al acortamiento telomérico (Chen et al., 2001; Toussaint et al., 2000). Para encajar estas dos ideas, algunos autores proponen que la senescencia celular mediada por daño en el ADN puede desencadenarse mediante dos vías, una vía derivada de la respuesta celular al daño agudo y persistente en el genoma, que generará DSB con alta frecuencia dificultando su reparación por el sistema NHEJ o HR, proporcionando a su vez una elevada respuesta DDR y liberando una rápida senescencia; y otra vía derivada de la respuesta celular a un daño crónico de baja intensidad, el cual originará esencialmente la modificación oxidativa de bases en el telómero promoviendo la formación de SSB mediante la participación del sistema de reparación BER, el cual facilitará el acortamiento telomérico y por consiguiente la senescencia celular (O'Sullivan & Karlseder, 2010). De modo global, actualmente está bastante aceptado que bajo condiciones medias de

estrés, los telómeros pueden funcionar a modo de “sensor” de daño y ser capaces de generar la senescencia celular a través del DDR (O'Sullivan & Karlseder, 2010; Sitte et al., 1998; von Zglinicki et al., 1995).

2.3.2.3 Inestabilidad genética por acortamiento telomérico

Cuando en una especie con un cariotipo estable se producen variaciones que modifican al azar el número normal de cromosomas, o bien se observan alteraciones cromosómicas estructurales que modifican el complemento cromosómico celular (deleciones, amplificaciones, translocaciones no balanceadas etc.), se dice que presenta **inestabilidad genética** (o genómica, o cromosómica). La inestabilidad genética puede generarse por mutaciones individuales en un gen concreto, por pérdida o ganancia de cromosomas o lo que parece ser más frecuente, por reorganizaciones a gran escala de los cromosomas (Nowak et al., 2002). Por otra parte, los telómeros además de ser aparentemente más sensibles al daño genotóxico, son esenciales para salvaguardar la estabilidad genética de la célula. El papel de los telómeros en el mantenimiento de la estabilidad de los cromosomas se propuso hace más de 70 años (McClintock, 1939) y una gran variedad de estudios posteriores han demostrado que un excesivo acortamiento telomérico conduce a una incrementada inestabilidad cromosómica en células somáticas (Blackburn, 2000). Actualmente, es aceptado que un acortamiento telomérico severo o una disfunción telomérica por la falta de función de las proteínas asociadas, implica la aparición de aberraciones cromosómicas estructurales (revisado en (Martinez & Blasco, 2011)).

El daño telomérico o la disfunción del complejo shelterina será reconocido como un DSB que desencadenará una respuesta del tipo DDR al final de los cromosomas (d'Adda di Fagagna et al., 2003; de Lange, 2002). Estos telómeros disfuncionales serán reparados del mismo modo que un DSB por la activación de los sistemas de reparación de roturas por recombinación homóloga (HR) o por unión de extremos no homólogos (NHEJ) (de Lange, 2009; Denchi, 2009; Pfeiffer et al., 2000), si esta reparación se produce de un modo ineficiente dará lugar a cambios en la longitud telomérica, deleciones terminales o fusiones entre cromátidas que promoverán la aparición de una gran variedad de **aberraciones cromosómicas estructurales** (Artandi et al., 2000; Martinez & Blasco, 2011; O'Sullivan & Karlseder, 2010; Pfeiffer et al., 2000). Recientemente se ha demostrado que el acortamiento telomérico o la disfunción telomérica también puede generar cambios en el contenido génico celular a través de procesos de endoreplicación y generar tetraploidización por fallo en la activación de la parada del ciclo celular originada por el DDR (Davoli et al., 2010).

2.3.3 Senescencia inducida por activación del locus *INK4A-ARF*

Existe un mecanismo de inducción de senescencia alternativo al acortamiento telomérico y al daño en el ADN. Este mecanismo está mediado principalmente por la expresión del locus ***INK4A-ARF*** (también llamado *CDKN2A*) el cual codifica las proteínas supresoras de tumores P14^{Arf} y P16^{INK4a} (Nobori et al., 1994; Serrano et al., 1996). En los mamíferos, el locus *INK4A-ARF* es silenciado durante el desarrollo y el inicio de la vida pos-natal del individuo, siendo expresado en muy bajos niveles en la mayoría de tejidos jóvenes pero progresivamente aumentado desde la edad adulta hasta la senectud (Krishnamurthy et al., 2004; Ressler et al., 2006). Actualmente no se conocen al detalle los mecanismos moleculares responsables de la acumulación de P16^{INK4a} durante la senescencia celular. Sin embargo, algunos trabajos sugieren una posible regulación negativa mediada por la acción de la familia de las proteínas polycomb, capaces de remodelar la cromatina e inhibir la expresión génica (Bracken et al., 2007; Ressler et al., 2006; Sparmann & van Lohuizen, 2006).

Paradójicamente el producto génico de la expresión del locus *INK4A-ARF*, conduce a la senescencia celular en células primarias de mamífero mediante su activación por la estimulación oncogénica o por la exposición a fuertes estímulos mitogénicos, hecho por el cual a este fenómeno se le ha denominado **“senescencia inducida por oncogenes” (OIS, *Oncogene-Induced Senescence*)** (Serrano et al., 1993; Serrano et al., 1997). Tras la exposición al estímulo mitogénico, se activa la transcripción del locus *INK4A-ARF* que genera por un lado la expresión de P16^{INK4a} el cual actuará como un potente inhibidor de las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6, bloqueando la progresión

del ciclo celular. Estas dos quinasas en su estado natural fosforilan e inhiben a la proteína del retinoblastoma (RB), limitando su capacidad de unión y represión a la familia de factores de transcripción E2F, los cuales transcriben genes indispensables para la replicación del ADN y por tanto la continuidad del ciclo (revisado en (Chicas et al., 2010)). Por otro lado, tras la exposición al estímulo mitogénico, se activará también la expresión de la proteína P14^{Arf} que inactivará la ubiquitin ligasa HDM2 (*Human Double Minutes 2 protein*) y promoverá la estabilidad de la proteína supresora de tumores P53 facilitando la parada del ciclo celular (Gil & Peters, 2006; Kim & Sharpless, 2006).

Es de señalar que esta cooperación entre el las vías de P53 y RB ha sido recientemente reforzada, mediante nuevas evidencias que sugieren que la OIS en algunas circunstancias y tipos celulares puede desencadenarse por la activación robusta del DDR como consecuencia a la exacerbada replicación del ADN que es originada a su vez por la aberrante estimulación mitogénica (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006; Gorgoulis et al., 2005; Mallette et al., 2007). Estos datos demuestran que la senescencia celular inducida por activación del locus *INK4-ARF* esta sustancialmente ligada al establecimiento del sistema DDR y que por tanto la expresión del locus *INK4A-ARF* gobierna tanto la activación de la vía de RB como la de P53 para el desencadenamiento de la senescencia en la célula. Algunos autores consideran dos tipos de senescencia celular *in vitro*, una reversible mediada por P53 y otra irreversible mediada por la acción concomitante de P53 y la vía de P16^{INK4a}/RB (Beausejour et al., 2003). Se ha propuesto que la vía P16^{INK4a}/RB podría actuar como una segunda barrera para prevenir el crecimiento de células en condiciones estresantes o en presencia de estímulos que favorezcan la transformación neoplásica (Beausejour et al., 2003; Jacobs & de Lange, 2004; Robles & Adami, 1998).

2.3.3.1 Locus *INK4A-ARF* y el estrés oxidativo

Recientes trabajos, han puesto de manifiesto una posible relación entre la inducción de expresión del locus *INK4A-ARF* por estímulos mitogénicos y el estrés oxidativo, lo cual podría esclarecer el papel de la activación del locus en el escenario del envejecimiento y la senescencia celular. Por un lado, se ha demostrado que la sobreexpresión del oncogén RAS incrementa los niveles de ROS en fibroblastos humanos y que este incremento es indispensable para la establecimiento de la senescencia, ya que el tratamiento con antioxidantes como la N-acetil cisteína o el crecimiento en bajo oxígeno bloquea el fenotipo senescente en presencia de activación por RAS (Irani et al., 1997; Lee et al., 1999). Nuevas evidencias sugieren que el daño oxidativo generado durante la estimulación oncogénica podría ser el promotor de la expresión del locus *INK4A-ARF* a través de la activación de la ruta de la proteína P38-MAPK (Bulavin et al., 2004; Iwasa et al., 2003; Sun et al., 2007; Wang et al., 2002). Esto se ha confirmado por ejemplo, en células madre hematopoyéticas (HSC) en donde las especies reactivas del oxígeno son el desencadenante principal de la activación de la ruta P38-MAPK la cual, tras su activación, limita la funcionalidad de las células y disminuye su capacidad de proliferación (Ito et al., 2006).

Por otro lado, se ha observado que el incremento en la producción de ROS mediado por la estimulación mitogénica, a su vez puede activar la vía de señalización de la PKC δ (Takahashi et al., 2006; Wheaton & Riabowol, 2004) y que en células humanas, esta vía puede participar activamente en el establecimiento de la parada del ciclo celular irreversible en la citocinesis (Takahashi et al., 2006; Yang et al., 2004). Estos datos revelarían el importante aporte que presentan las especies reactivas del oxígeno en el desarrollo de la senescencia en células humanas. Aunque todavía no existe un consenso generalizado sobre el mecanismo por el cual RAS o la estimulación mitogénica incrementa los niveles de ROS, se ha sugerido que dicho incremento podría estar sujeto a un aumento de la biogénesis y disfunción mitocondrial que promovería el daño oxidativo en el ADN y contribuiría a la senescencia generada por OIS (Moiseeva et al., 2009); sin embargo este mecanismo sería dependiente de la funcionalidad de P53 y RB y por tanto no sería causal de la acumulación de estas dos proteínas.

III. Fisiología del oxígeno

La presión parcial de oxígeno en la atmósfera ($20,84\%O_2$ (159mm Hg); $78,62\%N_2$ (597mm Hg); $0,04\%CO_2$ (0,3mm Hg); $0,50\%H_2O$ (3,8mm Hg) (Total: 760mm Hg; al nivel del mar) es sustancialmente superior a la encontrada en la mayoría de los tejidos de los organismos. En mamíferos, la difusión del oxígeno hacia los tejidos es posible gracias a una cascada de gradiente de presión, desde el aire ambiental hasta la mitocondria. Cuando el aire es introducido por las vías respiratorias, este se entibia y humedece rápidamente, por la influencia de la presión de vapor de agua promoviendo la disminución de la concentración de oxígeno en el pulmón y situándola en un valor cercano al $15,27\%O_2$ (110mm Hg). A continuación, por el efecto de la presión del CO_2 y la difusión del oxígeno a través de la membrana alveolo-capilar, la presión de oxígeno en los capilares pulmonares se establece en un $13,89\%O_2$ (100mm Hg), aproximadamente. Una vez el oxígeno ha difundido al torrente circulatorio, este rápidamente se une a la hemoglobina saturándola casi por completo, manteniendo el 97% de oxígeno total unido a ella y el 3% de oxígeno restante disuelto en plasma (Dickerson & Geis, 1983). Tras esta incorporación del oxígeno al torrente circulatorio, la presión de oxígeno en sangre arterial se mantiene en un $12,5\%O_2$ (90mm Hg) y cuando los tejidos han sido oxigenados la presión de oxígeno en sangre venosa se ha estimado en un valor medio cercano al $5,56\%O_2$ (40mm Hg) (revisado en (Guyton, 1966)).

Como se ha mencionado anteriormente, a pesar de la gran importancia del oxígeno para la supervivencia de los organismos, los niveles de oxígeno en los tejidos son bastante limitados. Por lo general en mamíferos en condiciones normales para el desarrollo del embrión y el organismo adulto, la presión parcial de oxígeno puede variar en un rango que oscila entre un 2 y un $12\%O_2$ (14,4-86,4mm Hg) (Atkuri et al., 2007; Fischer & Bavister, 1993; Rodesch et al., 1992; Vaupel et al., 1989). Sin embargo, debido a la densidad vascular o morfología propia de cada tejido, en algunos tejidos con zonas relativamente menos irrigadas los niveles de oxígeno pueden establecerse en valores inferiores a los habituales, situándose en niveles cercanos al $1\%O_2$ (7,2mm Hg) (Brahimi-Horn & Pouyssegur, 2007; Spradling et al., 2001). Esto ocurre por ejemplo, en algunas áreas del cerebro, cartílago, timo, médula renal o médula ósea, donde la densidad vascular es considerablemente inferior (revisado en (Ivanovic, 2009; Mohyeldin et al., 2010)). De modo semejante, en algunas situaciones patológicas como enfermedades infecciosas, isquemias o tumores pueden establecerse estados crónicos de anoxia en los que los niveles de oxígeno se sitúan en valores próximos al $0\%O_2$.

3.1 El oxígeno y los nichos de las células madre

El nicho específico en el que se desarrollan y mantienen las células madre puede definirse como aquella estructura anatómica que incluye tanto componentes celulares como acelulares que integran las señales locales y sistémicas en un especializado microambiente y pueden regular la biología y función de las mismas (Scadden, 2006). La interacción de las células madre con estos componentes es esencial para preservar su particular capacidad de autorrenovación y multipotencialidad (Spradling et al., 2001).

En este sentido, la fisiología del oxígeno juega un papel crucial en el mantenimiento del nicho de las células madre. Se ha postulado que el oxígeno tiene un importante papel en la regulación de la diferenciación y pluripotencialidad de estas células. Esto se ha puesto de manifiesto con estudios que demuestran que los cambios en la disponibilidad de oxígeno que se producen durante el desarrollo embrionario, son capaces de regular el proceso de diferenciación y coordinar el propio desarrollo del embrión (Genbacev et al., 1997). Así mismo, en el individuo adulto los "nichos" o microambientes en los que se desenvuelven las células madre poseen una presión parcial de oxígeno más baja que el resto del tejido (Eliasson & Jonsson; Panchision, 2009) llegando en muchos casos a establecerse en valores inferiores al $1\%O_2$ (revisado en (Mohyeldin et al., 2010)) (**figura i6**). Estos datos se han reforzado con recientes estudios que sugieren que los reducidos niveles de oxígeno presentes en los microambientes pueden llegar a activar las vías implicadas en el mantenimiento de la potencialidad y la quiescencia de estas células. Así por ejemplo, la presencia de bajo oxígeno en el medio es capaz de activar las vías de Notch, Wnt y Oct-4 promoviendo el estado de indiferenciación (Covello et al., 2006; Gustafsson et al., 2005; Kaidi et al., 2007). Siguiendo la directriz de estos experimentos, recientes trabajos han establecido que para mantener las propiedades multipotenciales de las células madre en sus nichos biológicos, además de la presencia de bajo oxígeno es necesario mantener unos niveles adecuados del factor

inducido por hipoxia ($HIF\alpha$, *Hypoxia-inducido factor alpha*), uno de los principales reguladores de la respuesta celular a la carencia de oxígeno en el ambiente (Panchision, 2009; Takubo et al., 2010).

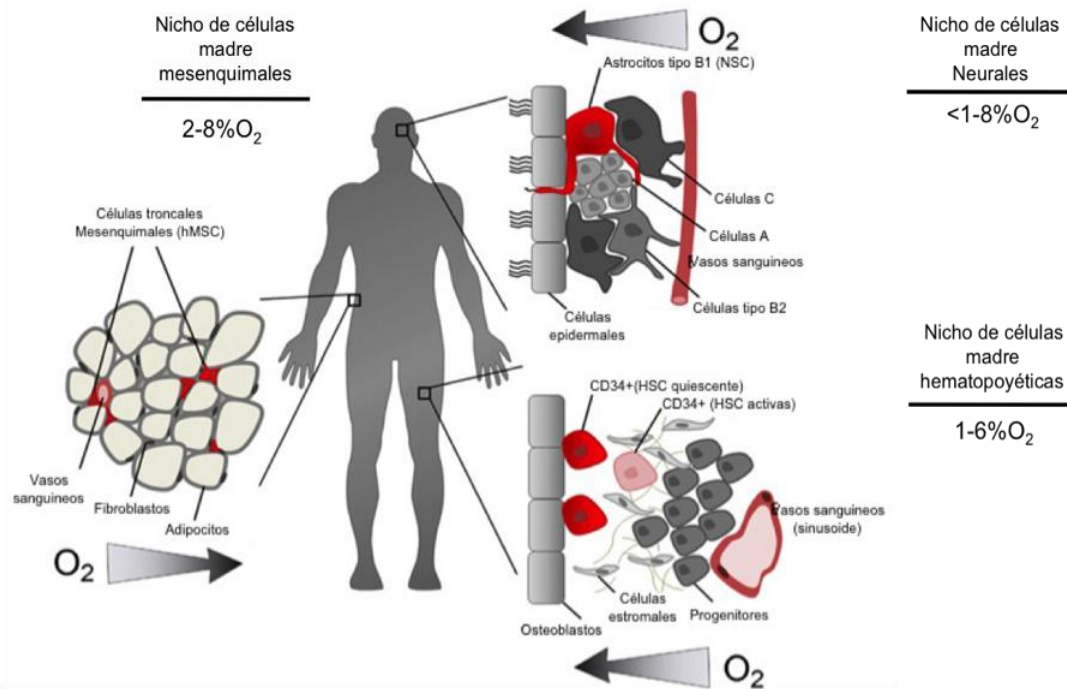


Figura 6. Presión de oxígeno en los nichos de células madre

En el organismo adulto, los tejidos exhiben una tensión de oxígeno substancialmente inferior a la atmosférica (21% O_2 (147 mm Hg)). La presión de oxígeno en los alvéolos pulmonares es de aproximadamente un 15% O_2 (110mm Hg) y una vez el oxígeno a entrado al torrente circulatorio, la presión parcial en sangre arterial se sitúa alrededor de un 12% O_2 (100mm Hg). La concentración de oxígeno aproximada en el interior de los tejidos adultos sanos, puede variar desde un 2% O_2 a un 12% O_2 . En la figura se representa un modelo esquemático mostrando los nichos celulares de algunas células madre adultas para los sistemas hematopoyético, mesenquimático y neural en la médula ósea, tejido adiposo, y la zona subventricular (SVZ, *Sub Ventricular Zone*) del cerebro, respectivamente. Se muestran las variaciones de oxígeno encontradas en cada uno de los nichos celulares las cuales se han obtenido de experimentos realizados con medidas directas sobre el tejido o mediante aproximaciones matemáticas. Las referencias relacionadas, están incluidas en la revisión original (adaptado de Mohyeddin et al 2010).

3.2 Mecanismos celulares de respuesta al oxígeno

Para poder adaptarse a la disponibilidad de oxígeno en el ambiente, las células de mamífero han desarrollado mecanismos de detección sensibles a las variaciones en la concentración de oxígeno. Aunque no existe información suficiente que permita comprender el método por el cual las células responden a estos cambios, se pueden definir al menos cuatro mecanismos implicados en la detección de la disponibilidad de oxígeno en el ambiente. El primero y probablemente mas importante, depende de la presencia de i) la familia de las enzimas proil-hidroxilasas que requieren oxígeno molecular para desarrollar su actividad y facilitar la degradación del factor de transcripción inducido por hipoxia ($HIF\alpha$), el cual controla la expresión de una batería de cientos de genes indispensables para la adaptación de la célula a la baja disponibilidad de oxígeno. En segundo lugar, se encuentra ii) la familia de las enzimas NAD(P)H oxidasas capaces de producir ROS, que funcionan a su vez como segundos mensajeros y modulan la respuesta de sensibilización al oxígeno, el tercero se produce a través de la existencia de iii) canales iónicos sensibles a ROS que como se ha mencionado, depende también de las variaciones de oxígeno en el ambiente y finalmente el cuarto mecanismo depende de iv) la propia cadena transportadora de electrones mitocondrial que modula la producción de ROS, la cual también está sujeta a la concentración de oxígeno en el ambiente (revisado en (Giaccia et al., 2004)).

Uno de los mecanismos más importantes y mejor caracterizados implicados en la detección de los cambios en la variación de oxígeno, es el relacionado con la familia de proteínas inducidas por hipoxia (HIFs). Dado el enfoque del presente trabajo, a continuación nos centraremos en el estudio de la regulación de HIF α por el oxígeno y su relevancia en el metabolismo celular.

3.2.1 Regulación de HIF por oxígeno

La familia de las proteínas inducidas por hipoxia son fuertes factores de transcripción que poseen una estructura bHLH-PAS (básica hélice-bucle-hélice-per-arnt-sim) que les confiere la capacidad de formar heterodímeros (Gu et al., 2000). Estas proteínas están compuestas de un heterodímero formado por dos subunidades pertenecientes a la familia de las bHLH-PAS, una subunidad alfa denominada HIF α y una subunidad beta denominada HIF β o también llamada receptor nuclear aryl hidrocarburo translocador (ARNT). En mamíferos, las subunidades α de HIF están codificadas por 3 genes; HIF1 α , HIF2 α y HIF3 α , los cuales son notablemente regulados por hipoxia. HIF1 α se expresa de forma ubicua en prácticamente todos los tejidos, mientras que HIF2 α (también llamado EPAS (proteína endotelial PAS), HLF (HIF1 α -como factor) o HRF (factor relacionado con HIF)) y HIF3 α exhiben una distribución más restrictiva. HIF1 β /ARNT es constitutivamente expresado y es insensible a cambios en la concentración de oxígeno, mientras que las tres subunidades alfa son extremadamente reguladas por hipoxia (Yang et al., 2005).

Los genes que codifican las proteínas HIF α se transcriben y traducen con una alta velocidad en bajo oxígeno, pero son rápidamente degradadas en presencia del oxígeno (Schofield & Ratcliffe, 2004). En condiciones de elevado oxígeno, el dominio oxígeno dependiente de degradación (ODD) de las proteínas HIF α , que están bastante conservados en las 3 isoformas, es hidroxilado en dos residuos de prolina por la familia de las prolil hidroxilasas PHD1, PHD2, PHD3 (Ivan et al., 2002). Esta hidroxilación es reconocida por el producto génico supresor de tumores Von Hippel-Lindau (pVHL) (Un componente del complejo ubiquitin-ligasa) que genera la poliubiquitinización covalente de los residuos y permite la degradación de la proteína por el proteosoma 26S (Min et al., 2002). En condiciones de bajo oxígeno, la hidroxilación y la interacción con pVHL es inhibida, por lo que las subunidades HIF α se acumulan en el citoplasma y se traslocan al núcleo donde dimerizan con la subunidad beta HIF1 β /ARNT a través de sus dominios bHLH-PAS y se unen a las secuencias génicas específicas de respuesta a HIF que están localizadas en regiones promotoras (intrones y potenciadores en extremos 3') de un gran número de genes de expresión regulada por el oxígeno (Yang et al., 2005). Durante este proceso, el dominio de activación transcripcional C-terminal (TAD) de los heterodímeros, interactuará con coactivadores como p300/CBP (proteínas de unión a CREB, el cual es un elemento de unión a secuencias CRE (Ema et al., 1999)) para poder mantener estable la actividad de HIF, la cual es también regulada por hidroxilación dependiente del oxígeno y que es realizada por el factor de inhibición de HIF (FIH) de manera similar a la generada por las prolil hidroxilasas (Lando et al., 2002).

La respuesta a los cambios en la concentración de oxígeno mediada por HIF1 α es prácticamente íntegra y abarca todos los procesos necesarios para conseguir un aprovechamiento más eficaz del oxígeno y suplir las necesidades de la célula en función de la disponibilidad del oxígeno. En la actualidad se conoce la implicación de HIF1 α en migración celular, crecimiento, apoptosis, regulación hormonal, metabolismo energético y angiogénesis (revisado en (Schofield & Ratcliffe, 2004)). Una de las más relevantes respuestas adaptativas promovidas por la disminución de oxígeno y la consecuente estabilización de HIF1 α , es la reprogramación metabólica desde un estado metabólico más oxidativo a un estado de metabolismo más glucolítico (**figura i7**). Esta adaptación deriva esencialmente de la carencia de disponibilidad de oxígeno como sustrato para la producción de energía mediante un metabolismo aeróbico. HIF1 α regula esta respuesta mediante la transcripción directa de genes implicados en la ruta glucolítica promoviendo la expresión tanto de proteínas involucradas en el transporte de glucosa como de enzimas que participan en el proceso de la glucólisis (Iyer et al., 1998; Seagroves et al., 2001). Por otra parte, HIF1 α promueve el estado metabólico proglucolítico mediante la reducción de la respiración mitocondrial. Esta disminución se realiza principalmente a través de la transcripción de la proteína PDK1, la cual fosforilará e inactivará la enzima PDH reprimiendo el flujo de piruvato hacia el interior de la mitocondria reduciendo así los sustratos necesarios para la respiración

(Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). Recientes trabajos demuestran que HIF α es capaz de reducir la respiración mitocondrial no solo disminuyendo el flujo de sustratos hacia el interior de la mitocondria, sino también afectando el propio funcionamiento de la ETC mediante la inhibición del complejo I por la transcripción de la proteína NDUFA4L2 (Tello et al., 2011) o a través de la transcripción de la citocromo c oxidasa (complejo IV), optimizando la eficiencia de la respiración (Fukuda et al., 2007).

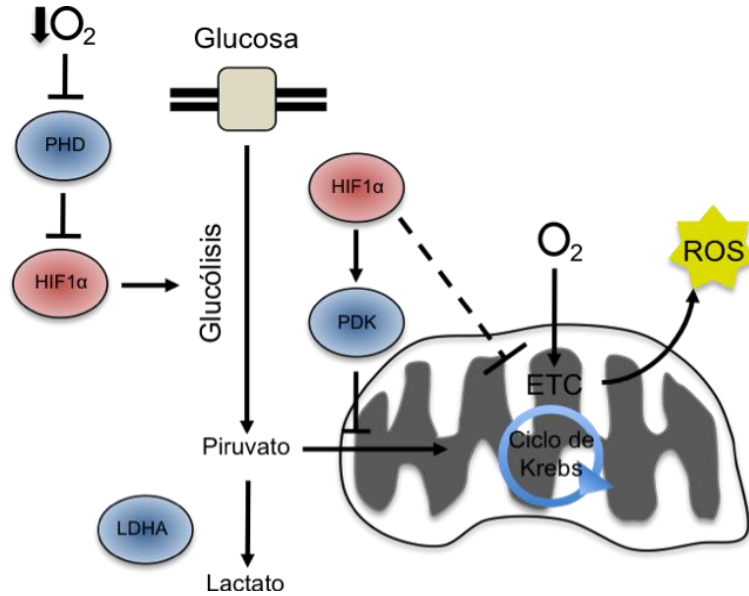


Figura i7. Regulación del metabolismo celular mediada por HIF1 α

HIF1 α puede modular el metabolismo de las células para facilitar la adaptación celular a una baja disponibilidad de oxígeno en el ambiente. Cuando la presencia de oxígeno disminuye, HIF1 α se mantiene notablemente más estable gracias a la inhibición de la actividad de las prolin hidroxilasas (PHD), las cuales son las encargadas de iniciar la degradación de HIF1 α mediante la vía del proteosoma. La estabilidad de HIF1 α promueve el consumo de glucosa mediante la activación de la expresión de enzimas glucolíticas y disminuye la fosforilación oxidativa a través de la expresión transcripcional directa de la enzima PDK1, evitando la entrada de piruvato en la mitocondria o potencialmente inhibiendo directamente el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial (ETC, *Electronic Transport Chain*). La actividad de la ETC es considerada como el principal motor productor de ROS (*Reactive Oxygen Species*) en la célula (revisado en (Balaban et al., 2005)).

La regulación de la respiración mitocondrial bajo condiciones de relativa baja disponibilidad de oxígeno parece depender sustancialmente de la presencia de HIF α en el medio. La respiración mitocondrial *per se* sólo se ve comprometida si la concentración de oxígeno cae por debajo del 0,1% O_2 , ya que el complejo IV mitocondrial presenta una alta afinidad por el oxígeno (Gnaiger et al., 1998; Smolenski et al., 1991; Stumpe & Schrader, 1997; Wikström et al., 1981). Por otro lado, la respuesta mediada por HIF1 α se produce en intervalos de concentración de oxígeno entre 0-5% O_2 con un máximo de respuesta entre un 1-2% O_2 (Jiang et al., 1996; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006), demostrando que la vía de señalización de HIF1 α es un mecanismo esencial para el control de la respiración mitocondrial y no tanto la propia disminución de oxígeno como sustrato. Este fino mecanismo de modulación del metabolismo mediado por HIF1 α en el que se alteran las dos vías principales de obtención de energía, es indispensable para que la célula pueda continuar con una adecuada producción energética ante la carencia de disponibilidad de oxígeno y conserve el correcto balance metabólico y oxidativo preservando así la homeostasis natural de la célula.

3.3 Relevancia del oxígeno en cultivo

Para elucidar el efecto de la presión de oxígeno sobre los cultivos celulares primarios y comprender cuál es su relevancia sobre los procesos celulares, es necesario establecer unos adecuados criterios en la definición de los cambios en la concentración de oxígeno a nivel celular. Tradicionalmente, se ha asociado de forma imprecisa a la "normoxia" con la presión de oxígeno

atmosférica (20,84%O₂) y a la hipoxia con niveles de oxígeno entre 0,5-2%O₂ (Papandreou et al., 2005), basándose en experimentos realizados con células tumorales bioenergéticamente muy activas o sin tener en cuenta la procedencia celular y el estado fisiológico real de la célula. Por esta razón y siguiendo un criterio más estricto, se podría definir a la normoxia como aquel estado en el que las células disponen del oxígeno requerido para desarrollar sus funciones metabólicas normales, las cuales serán por axioma, las mismas de las que dispone la célula en su nicho natural (aprox. 1-12%O₂, si abarcamos todos los tipos celulares) (revisado en (Atkuri et al., 2007; Ivanovic, 2009; Simon & Keith, 2008)). Por consiguiente, la “hipoxia” celular podría definirse como aquel fenómeno patológico que se produce cuando la concentración de oxígeno cae por debajo de los niveles fisiológicos requeridos por la mitocondria para producir una adecuada formación de ATP, comprometiendo el mantenimiento de la homeostasis celular (porcentaje de oxígeno específico para cada tipo celular y tejido).

El control de la concentración de oxígeno en condiciones fisiológicas dentro de los incubadores de cultivo (un parámetro evidente a tener en cuenta) ha pasado completamente desapercibido durante décadas, probablemente debido a la adecuación de los cultivos a la expansión de líneas celulares transformadas que presentan claras diferencias en el metabolismo respecto a los cultivos de células primarias (Warburg, 1956). La regulación de la presión de oxígeno en los cultivos celulares primarios a niveles próximos a los fisiológicos, ha demostrado tener un impacto significativo sobre la tasa replicativa de las células. Desde los primeros trabajos que señalaron que los cultivos de células de mamífero mantenidos a bajas concentraciones de oxígeno aumentaban la capacidad proliferativa (Cooper et al., 1958; Packer & Fuehr, 1977; Zwartouw & Westwood, 1958), un gran número de estudios ha demostrado efectos similares en otros tipos celulares (Carswell et al., 2000; Jensen et al., 2011; Parrinello et al., 2003; Zhang et al., 2010), incluidas las células madre humanas que poseen una mayor aplicabilidad en la clínica (Carrancio et al., 2008; Estrada et al., 2011; Fehrer et al., 2007; Forsyth et al., 2006; Grayson et al., 2007; Li et al., 2011). Notablemente, el efecto de la reducción de la tensión de oxígeno sobre cultivos celulares inmortalizados o transformados no parece presentar efectos sobre el potencial proliferativo de las células (Falanga & Kirsner, 1993; Saito et al., 1995).

Se ha demostrado, que en cultivos de fibroblastos humanos crecidos a concentraciones de oxígeno próximas a las fisiológicas, por ejemplo al 3%O₂, se puede alcanzar hasta un 50% más de divisiones celulares que cuando son desarrollados a concentraciones de oxígeno atmosféricas (21%O₂) presentando además una tasa de proliferación incrementada y un retraso en la senescencia celular (Chen et al., 1995). Se ha demostrado que este aumento en la capacidad proliferativa asociada a este tipo de cultivos, correlaciona a su vez con la presencia de niveles reducidos de estrés oxidativo y daño en el ADN (Busuttill et al., 2003; Chen et al., 1995; Karanjawala et al., 2002; Parrinello et al., 2003). Estos datos contrastan, con los resultados obtenidos en cultivos celulares crecidos a tensiones de oxígeno hiperóxicas, por ejemplo al 40%O₂, donde se produce un bloqueo irreversible de la proliferación celular promoviendo una incrementada tasa de acortamiento telomérico y permitiendo sólo unas pocas divisiones celulares antes de alcanzar el fenotipo senescente (von Zglinicki et al., 1995). Por otra parte, es importante destacar que el control de este parámetro en cultivo ha demostrado ser crítico para la estimulación de la senescencia mediada por expresión oncogénica (OIS), ya que este efecto puede llegar a ser inhibido si las células son cultivadas a concentraciones de oxígeno próximas a las fisiológicas (Lee et al., 1999).

A día de hoy, se ha demostrado que la reducción de oxígeno en el cultivo conlleva una diversidad de efectos beneficiosos para el mantenimiento *in vitro* de las células madre. Se ha constatado, que la reducción de oxígeno es capaz de conferir un aumento en la capacidad proliferativa, favorecer la formación de colonias, preservar el carácter multipotencial, reducir la inestabilidad genética, disminuir el acortamiento telomérico y retrasa el efecto de la senescencia (Carrancio et al., 2008; Estrada et al.; Fehrer et al., 2007; Forsyth et al., 2006; Grayson et al., 2007; Li et al.); todo ello demostrando el efecto tóxico que poseen las elevadas presiones de oxígeno sobre las células.

3.3.1 Regulación de la actividad metabólica por el oxígeno

Como hemos mencionado anteriormente, la presión de oxígeno en el ambiente puede modificar múltiples procesos celulares. Dentro de estos procesos destaca el cambio en el metabolismo

celular, el cual está íntimamente ligado a la producción de ROS y el estrés oxidativo en la célula. En este sentido, la formación de ROS parece mantener un papel clave como intermediario entre la concentración de oxígeno y el desencadenamiento de la senescencia celular en cultivo (Busuttill et al., 2003; Chen et al., 1995). Es ampliamente aceptado que el oxígeno es un elemento relativamente estable y poco reactivo, que no demuestra un efecto tóxico o deletéreo directo sobre las estructuras celulares (revisado en (Lu & Finkel, 2008)); sin embargo, las especies reactivas del oxígeno derivadas de su metabolismo ostentan un carácter altamente reactivo e inestable (ver sección 2.2).

Las fluctuaciones en la concentración de oxígeno, representan un importante parámetro en la regulación de la respiración mitocondrial y por consiguiente de la tasa de producción de ROS (Turrens et al., 1982). Actualmente la correlación entre la presión parcial de oxígeno y la formación de ROS es bastante controvertida. Esta controversia deriva en parte de la continua participación de enzimas antioxidantes como las SOD y CAT en el proceso de anulación de ROS y que inactivan los niveles de producción reales en un momento determinado (Powers & Lennon, 1999). Por otra parte, resulta metodológicamente complejo detectar la producción de ROS en condiciones “normales o fisiológicas” donde no interfieran agentes oxidantes externos que alteren la lectura. Finalmente, la falta de homogeneidad en los ensayos de detección de estas especies, dificultan también la interpretación común de los resultados; por un lado, se usan extractos mitocondriales procedentes de tejidos y en otras ocasiones procedentes de cultivos celulares (con células transformadas o a veces primarias) claramente menos fisiológicos, igualmente la diversidad en las técnicas de detección incrementan la complejidad en la interpretación de los datos, ya que en algunas ocasiones se estima la formación de ROS a través de la detección de la actividad citocromo c oxidasa y en otras ocasiones se realiza mediante medidas directas con el uso de sondas fluorescentes específicas para cada una de las especies (revisado en (Balaban et al., 2005; Murphy, 2009)).

A pesar de estas dificultades técnicas, ha sido colectivamente aceptado que la hiperoxia (entendida como la presión de oxígeno por encima del 21%O₂) favorece la formación de ROS y que el aumento en la generación de estas especies es proporcional al incremento de la concentración de oxígeno en el ambiente ((Boveris & Chance, 1973; Chance et al., 1979; Turrens et al., 1982) revisado en (Balaban et al., 2005; Murphy, 2009)). No obstante, esta relación no parece tan clara cuando se estudia la formación de ROS en condiciones de oxígeno más próximas a las fisiológicas (1-12%O₂). Algunos autores sostienen que la disminución de la concentración de oxígeno por debajo de la saturación del aire ambiental disminuye la producción de O₂⁻ (Kussmaul & Hirst, 2006) y H₂O₂ (Alvarez et al., 2003; Hoffman et al., 2007; Kudin et al., 2004) en línea con las observaciones iniciales. Sin embargo, otra vertiente de estudios desvela que las relativas bajas presiones de oxígeno en cultivo (consideradas hipóxicas por los propios investigadores (1,5%O₂, aproximadamente)), paradójicamente aumentan la producción de ROS mitocondrial (Brunelle et al., 2005; Chandel et al., 1998; Guzy et al., 2005; Mansfield et al., 2005), siendo estos además indispensables para la estabilización de HIF1α (Kaelin, 2005).

3.3.2 La actividad metabólica y la senescencia celular

Fuera de las consideraciones relacionadas con la tensión de oxígeno y la producción de ROS; es un hecho que las funciones mitocondriales poseen un relevante papel como agentes reguladores de la senescencia celular (revisado en (Balaban et al., 2005)). Desde que Harman planteó hace más de 50 años la teoría del envejecimiento mediada por la formación de radicales libres como un subproducto de la respiración mitocondrial (Harman, 1956), la función mitocondrial y los agentes oxidantes han estado ligados a la senescencia y el envejecimiento (Harman, 2009; Lu & Finkel, 2008). Uno de los mecanismos artificialmente generado y que puede influir sobre el aumento en la producción de ROS mitocondrial, es la inhibición de la cadena de transporte eléctrico mitocondrial, ya que los electrones se acumulan en las primeras fases de la ETC y pueden ser donados directamente al oxígeno molecular dando lugar al anión superóxido (Albayrak & Grimm, 2003; Chandel et al., 1998; Li et al., 2003). De hecho, varios estudios han descrito que mutaciones en el ADN mitocondrial que afectan la actividad de distintos componentes de la cadena de transporte electrónico promueven la generación de ROS (Birket et al., 2009; Gonzalo et al., 2005; Li et al., 2008).

Es de señalar, que los componentes mitocondriales son especialmente sensibles a la acción de ROS. Esto se debe fundamentalmente a la proximidad con el principal sitio de generación de ROS en la célula (la ETC en la membrana mitocondrial interna) y la particular vulnerabilidad del ADN mitocondrial (ADNm) a la acción de estas especies, ya que carece de las histonas protectoras y de muchos de los mecanismos de reparación presentes en el genoma nuclear (Clayton et al., 1974; Croteau et al., 1999; Yakes & Van Houten, 1997). De modo semejante, el daño oxidativo en este orgánulo puede afectar la eficiencia de la respiración mitocondrial incrementando a su vez la tasa de producción de ROS (Stadtman, 1992). Este efecto, generará un sistema de retroalimentación positiva que promoverá un mayor deterioro de la célula cuando hay un desbalance en la producción de ROS reforzando así la inducción de la senescencia.

Por otro lado, se ha demostrado que tanto la restricción calórica como una modesta inhibición de la respiración mitocondrial puede extender la vida media en una amplia variedad de especies (revisado en (Kenyon, 2010)). Así por ejemplo, un reciente estudio revela que tras un desacoplamiento mitocondrial leve se puede reducir la producción del anión superóxido, mejorando el mantenimiento de la longitud de los telómeros y extendiendo la vida media celular en cultivo (Passos et al., 2007a). A pesar de estas evidencias es importante reseñar, que numerosos estudios realizados en modelos animales genéticamente modificados, en los que se interfiere con la función mitocondrial o el sistema antioxidante, demuestran que una ablación considerable de la producción de ROS no siempre correlaciona con una reducción en la senescencia celular (revisado en (Muller et al., 2007)).

Una variedad de trabajos manifiestan que la **disfunción mitocondrial o ineficiencia en el metabolismo** podrían ser la causa central de la inducción de la senescencia ((Martinez & Blasco, 2011; Passos & von Zglinicki, 2005; von Zglinicki et al., 2003). Se ha demostrado que durante la senescencia celular, la función mitocondrial se ve alterada dejando una ineficacia metabólica y un aumento en la producción de ROS (Allen et al., 1999; Hutter et al., 2004; Laderman et al., 1996; Passos et al., 2007a; Shigenaga et al., 1994; Zwerschke et al., 2003). Experimentalmente, mediante el tratamiento severo con un agente desacoplante de la membrana mitocondrial (FCCP; *protonophore carbonyl cyanide p-trifluoromethoxy-phenylhydrazone*), se ha observado una incrementada tasa de producción de ROS, que correlaciona a su vez con una acusada respuesta DDR, un mayor acortamiento telomérico, mayor inestabilidad genética y una senescencia celular potenciada (Liu et al., 2002b). Por otra parte se ha demostrado que la disfunción mitocondrial y la formación de ROS contribuyen considerablemente en la senescencia inducida por activación oncogénica (Moiseeva et al., 2009). El conjunto de los anteriores estudios, pone de manifiesto el papel causal que posee la mitocondria en el desarrollo de la senescencia celular tanto telómero dependiente como telómero independiente (Passos et al., 2007b).

IV. Variación genómica y senescencia

El ser humano está compuesto por cerca de 10^{14} células de 210 tipos diferentes que se han originado a partir de un único cigoto el cual ha tenido que sufrir un gran número de divisiones celulares (10^{16}) hasta alcanzar el estadio adulto (Iourov et al., 2010). Este organismo además, requiere un recambio celular constante que mantenga estable la homeostasis celular en los tejidos y que contrarreste los efectos negativos generados por el desgaste natural de la vida. Estos datos, hacen suponer que un proceso de replicación genómica idéntica y fidedigna no puede producirse sin la generación de algunos errores dando lugar a genomas celulares no idénticos (variación genómica somática, VGS). Se ha observado, que el genoma humano es susceptible de sufrir dichos cambios durante su ontogenia y que en muchas ocasiones, esos cambios atañen a las variaciones en el número de copia del ADN (Chen et al., 2011; Kidd et al., 2010; Lou et al., 2011). De hecho, se ha identificado que al menos un 12% del genoma destinado a codificar proteínas implicadas en el desarrollo de enfermedades cambia en relación a su número de copia entre individuos (Redon et al., 2006).

Se sabe que los mamíferos poseen un conjunto de cromosomas con carácter diploide y que las diferencias en el contenido cromosómico entre distintas células en un mismo individuo se definen como un tipo de variación genómica denominada **mosaicismo cromosómico o aneuploidía** si es una situación patológica (Rieger et al., 1976). Aunque la relación entre el envejecimiento de los mamíferos y el incremento de aneuploidía con el correspondiente aumento del tamaño celular se describió por primera

vez hace ya varias décadas (Epstein, 1967; Jacobs et al., 1963), el significado fisiológico del mosaicismo cromosómico en humanos continúa siendo pobremente entendido. Este desconocimiento se debe en gran parte a la carencia de datos experimentales que revelen los niveles basales o normales de aneuploidía en cada tejido u órgano de individuos adultos sanos (revisado en (Iourov et al., 2008)). Recientes estudios señalan que el mosaicismo cromosómico en organismos diploides puede ser más frecuente de lo que hasta ahora se pensaba y que este a su vez puede tener un significado biológico más relevante en el desarrollo de los individuos. En efecto, una reciente recopilación de datos manifiesta que los niveles de mosaicismo cromosómico pueden variar en función del tejido y la edad del sujeto, incrementando con el envejecimiento en algunos tejidos y vinculándose a enfermedades asociadas con la edad (**tabla i1**) (revisado en (Iourov et al.; Storchova & Pellman, 2004)). Podría decirse que además del envejecimiento existen otros factores que correlacionan con el aumento del mosaicismo cromosómico en los tejidos. Algunos estímulos estresantes son capaces de inducir la formación de células poliploides en el individuo adulto, por ejemplo, el daño oxidativo en el hígado y la hepatectomía parcial incrementan la población de células poliploides (Gorla et al., 2001; Gupta, 2000), de forma semejante células del músculo cardíaco y del músculo liso, se vuelven aneuploides por hipertensión arterial o por su siembra en cultivo (Hixon et al., 2000; Vliegen et al., 1995) y fibroblastos adultos pueden volverse tetraploides mediante la generación de heridas o biopsias (Oberringer et al., 1999). En todos los casos la formación de células poliploides se ha interpretado como una respuesta a procesos de estrés mecánico o metabólico.

Se cree que este fenómeno puede desencadenarse al menos mediante tres mecanismos de manera fisiológica o por situaciones de estrés. Dichos mecanismos son la **fusión celular, endoreplicación y los ciclos abortivos** (Storchova & Pellman, 2004) (**figura i8**). La fusión celular ocurre de manera natural mediante un proceso programado durante el desarrollo en algunos tipos celulares como miocitos, hepatocitos u osteoblastos (Taylor, 2002; Vignery, 2000), además de ocurrir también en situaciones patológicas como infecciones virales o en los cultivos celulares (Deaven & Kreizinger, 1971; Hernandez et al., 1996). La endoreplicación también es un proceso programado que consiste en un desacoplamiento de la replicación del ADN y la división celular, en el cual las células realizan una o varias rondas de replicación del ADN antes de proceder con la mitosis celular produciendo un aumento de todo el material genético de las células, las cuales generalmente no proliferan (Edgar & Orr-Weaver, 2001). En mamíferos el ejemplo más estudiado es en la formación de plaquetas por los megacariocitos en la médula ósea (Ravid et al., 2002). Los ciclos abortivos, se pueden generar por una gran variedad de defectos durante la división celular debido a errores en la replicación del ADN, en la disolución de la cohesión de cromáticas hermanas, en la formación del uso mitótico o en la citocinesis. Estos defectos producirán la activación de los puntos de chequeo que bloquearan la progresión del ciclo y en algunos casos inducirán apoptosis. Al igual que en el DDR, si el error no es eficientemente corregido, algunas células podrían evadir el bloqueo y producir células aneuploides por la defectiva división celular (Elledge, 1996) y promover la formación de células transformadas.

SGV en tejidos normales humanos		
Tipo celular/ tejido	tipo de SGV	Descripción
Embrión preimplantación	Aneuploidía	15-91% de las muestras (media aprox 50%)
	reordenamientos estructurales, aneuploidía CNV*, duplicación segmental, disomía uniparental	>90% de las muestras (83% - aneuploidía)
Embrión / Feto (7-12 semanas)		
Citotrofoblasto	Aneuploidía	20-60% de las células
Cerebro	Aneuploidía	1,45% de las células [^]
Vellosidades coriónicas	Aneuploidía	0,98% de las células [^]
Piel	Aneuploidía	0,82% de las células [^]
Ovarios	Trisomía del cromosoma 21 (aneuploidía)	Incremento estadísticamente significativo de aneuploidía
Diagnostico prenatal: CVS** o amniocentesis		
Amniocentesis	Aneuploidía	0,25% de las muestras
Placenta	Aneuploidía	1-2% de las muestras
Recién nacidos / pediátricos		
Linfocitos	Aneuploidía	>0,1% (población clínica?)
Linfocitos	Aneuploidía	0,73% (autosomas) y 1,11% (cromosoma X) de células - población inafectada [^]
Linfocitos	Reordenamientos estructurales	0,01% (población clínica?)
Adultos (Edad media)		
Linfocitos	Aneuploidía	1-3% de las células [^]
Linfocitos	Reordenamientos estructurales	0,6% de las células [^]
Fibroblastos de piel	Aneuploidía	2,2% de las células [^]
Hígado	Aneuploidía	3% de las células [^]
Cerebro	Aneuploidía	0,3-0,9% de las células [^]
Cerebro	CNV*	CNV tejido específico; cantidad de células y porcentaje de muestras no están disponibles
Piel		
Corazón		
Riñón		
Hígado		
Linfocitos-T	Reordenamientos estructurales sutiles o CNV	Mosaismo tejido específico probablemente originado a partir de inestabilidad cromosómica
Células linfoblastoides B inmortalizadas		
Fibroblastos de piel		
Adultos (individuos envejecidos)		
Linfocitos	Aneuploidía	1-2% (autosomas) y 4-7% (cromosoma x) de las células [^]
Fibroblastos de piel	Aneuploidía	4,4% de las células [^]
Cerebro	Aneuploidía	0,3-0,9% de las células [^]
* Variación en número de copia ** muestras de vellosidades coriónicas [^] por cromosoma		

Tabla i1. variación genómica somática (SGV) presenten en diferentes tejidos humanos sanos a lo largo de su ontogenia

En la tabla se indican los tipos de SGV y el porcentaje de células afectadas para diversos tejidos humanos a lo largo de la ontogenia del organismo. Los datos están basados en una recopilación de estudios realizados para uno o varios cromosomas. Abreviaciones: CNV; variación en número de copia (*Copy Number Variation*) (adaptado de (Iourov et al., 2010)).

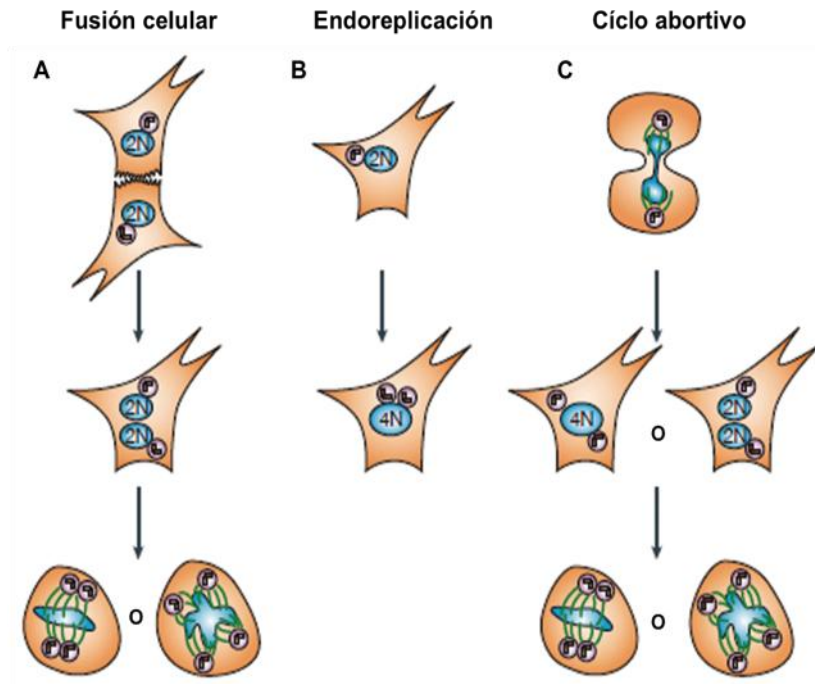


Figura i8. Modelos de formación de células aneuploides

A) fusión celular: Tras la fusión, las células entran en progresión del ciclo con dos centrosomas, los cuales son subsecuentemente duplicados. La envoltura nuclear se desmonta y las células desarrollan la mitosis. Si los centrosomas duplicados se agrupan, se produce una mitosis bipolar (izquierda), pero si no, se produce una mitosis multipolar (derecha) **B)** endoreplicación: Es la replicación del ADN en ausencia de una mitosis completa. Las células que se someten a endoreplicación pueden saltarse los diferentes aspectos de la mitosis, incluyendo la duplicación del centrosoma son llegar a realizar la citocinesis **C)** ciclo celular abortivo: se produce tras un fallo crucial durante el proceso de división celular, dando como resultado una célula tetraploide (4n) en fase G1. Si el defecto ocurre en la fase tardía de la anafase o en la citocinesis, la célula puede tener dos núcleos. Al igual que en el apartado A) estas células 4n pueden someterse a una mitosis bipolar o a una mitosis multipolar (adaptado de (Storchova & Pellman, 2004)).

4.1 Aneuploidía en cultivo

Saksela y Moorhead fueron los primeros en demostrar que en cultivos de fibroblastos humanos primarios con un cariotipo inicialmente diploide, aumentaba la frecuencia de aparición de anomalías cromosómicas tras periodos prolongados de cultivo (Saksela & Moorhead, 1963). Estos trabajos permitieron que otros investigadores demostraran que el mosaicismo cromosómico o aneuploidía en particular estaba considerablemente representada en la senescencia celular en cultivo y que esta se originaba mediante eventos de fusión celular o fallos en la división que promovían células multinucleadas o poliploides (Matsumura, 1980). En la actualidad, está ampliamente documentado que las alteraciones cromosómicas se acumulan tras la expansión celular en cultivo y que esta se produce en una variedad de tipos celulares humanos incluyendo las células madre adultas, embrionarias y las denominadas iPS (Ben-David et al., 2011; Estrada et al., 2011; Hussein et al., 2011; Narva et al., 2010; Peterson et al., 2011; Vanneste et al., 2009; Yurov et al., 2005).

Cuando las células se ven sometidas a una situación de estrés como son las condiciones estándar de cultivo; la supervivencia celular depende de la habilidad de estas para adaptarse o resistir a las condiciones ambientales estresantes (Finkel & Holbrook, 2000). Esta habilidad está supeditada al fondo genético de la célula o a la adquisición de desordenes genéticos que pudiesen proporcionar un ventaja adaptativa en las condiciones de crecimiento (Baker et al., 2007). De forma alternativa, si la célula no es capaz de adaptarse a los insultos generados por el ambiente, estas pueden responder al estímulo entrando en apoptosis o senescencia (Ott et al., 2007). Recientes trabajos demuestran que en cultivos celulares de larga duración esencialmente de células madre pluripotenciales (las cuales no sufren senescencia replicativa en cultivo), se producen alteraciones genéticas y epigenéticas que son

detectadas de forma recurrente y que podrían ser consecuencia de una selección celular de aquellos clones que han adquirido alteraciones genéticas que les confieren una ventaja de adaptabilidad al medio de cultivo (Baker et al., 2007; Ben-David et al., 2011; Draper et al., 2004; Hussein et al., 2011; Narva et al., 2010; Peterson et al., 2011; Spits et al., 2008).

Indiscutiblemente, la presencia de cualquier tipo de alteración génica además de poder contribuir al proceso de transformación, también favorece la disfunción celular o la promoción de la senescencia. Por tanto, el establecimiento de una anomalía genética durante el cultivo, limitará el uso clínico de las células tanto por motivos de bioseguridad como de funcionalidad. Para el mantenimiento de hMSC *in vitro*, es de gran relevancia controlar y desarrollar las condiciones óptimas de cultivo que minimicen al máximo el riesgo de aparición de este tipo de alteraciones. El resultado de estos avances, permitirá garantizar la producción de lotes celulares con una alta viabilidad, óptima preservación del potencial terapéutico y bajo contenido en alteraciones genéticas mejorando la eficacia de la terapia.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Formulación y justificación del problema

En la actualidad, la expansión *in vitro* de las células madre mesenquimales humanas (hMSC) es requerida en la gran mayoría de intervenciones clínicas que usan este tipo de células para el tratamiento de diferentes patologías asociada con la regeneración tisular. Este proceso de expansión celular, hace necesario ahondar en el estudio de los agentes que interfieren en el mantenimiento celular *ex vivo* y de cómo éstos perturban la homeostasis natural de la célula. El estrés oxidativo derivado de las inapropiadas condiciones de cultivo, es uno de los parámetros más deletéreos sobre la utilidad de las células; por lo tanto, el estudio del efecto de este parámetro sobre las estructuras subcelulares y moleculares junto con los mecanismos de respuesta que las células poseen ante estos efectos nocivos, permitirán comprender mejor el fenómeno de la senescencia celular en cultivo y mejorar los procedimientos de expansión actuales para aumentar la eficacia de la terapia en la clínica.

Con objeto de entender a un nivel más académico el fenómeno de la senescencia, creemos necesario estudiar los cambios moleculares subyacentes al fenómeno y los mecanismos que los originan. La caracterización de los cambios bioquímicos, citogenéticos y transcripcionales que se produzcan durante tiempos prolongados de cultivo, nos permitirá identificar y validar nuevos biomarcadores de senescencia celular que servirán como una herramienta adicional para realizar un control de calidad más riguroso y fiable de las células madre expandidas *in vitro*.

Con el propósito de resolver estos dos planteamientos, nos hemos propuesto los siguientes objetivos concretos:

Objetivos

1. Caracterizar la influencia de la tensión de oxígeno próxima a la fisiológica (3%O₂) sobre el proceso senescencia celular de las hMSC en cultivo; evaluando los efectos sobre la producción de ROS, capacidad proliferativa, acortamiento telomérico, inestabilidad genética y expresión génica.
2. Determinar el posible mecanismo involucrado en la reducción de la inestabilidad genética en los cultivos de hMSC crecidos al 3%O₂.
3. Estudiar el papel de la aneuploidía en la senescencia celular y su relación con el estrés oxidativo en cultivo.
4. Evaluar el papel de la telomerasa sobre el crecimiento de las hMSC en condiciones estándar de cultivo (21%O₂) y su relevancia en el control de la estabilidad genética.
5. Identificar y validar nuevos biomarcadores putativos de senescencia celular en cultivo, que nos permita realizar un control de calidad más riguroso y fiable de la expansión celular *in vitro*.

RESULTADOS

RESULTADOS

I. Los cultivos celulares al 3%O₂ mejoran la proliferación celular y retrasan la senescencia de las hMSC

Adquirimos cuatro muestras de hMSC primarias derivadas de tejido adiposo pertenecientes a diferentes donantes adultos sanos, de sexo femenino con edades comprendidas entre 35 y 45 años de edad. Las muestras fueron expandidas durante tiempos prolongados en condiciones estándar de cultivo a tensión de oxígeno atmosférica (21%O₂) y a tensión de oxígeno próxima a la fisiológica (3%O₂). A lo largo del proceso de expansión, se evaluaron diversos parámetros relacionados con el fenómeno de la senescencia celular, los cuales describiremos a continuación.

1.1 Caracterización fenotípica y multipotencial de las hMSC

Para corroborar las potenciales propiedades regenerativas de las células suministradas por la casa comercial, decidimos caracterizar fenotípicamente mediante citometría de flujo la expresión de los clásicos antígenos de superficie específicos para las células madre mesenquimales (CD29, CD44, CD90, CD105, CD11b, HLADR, CD19 y CD45). Pudimos confirmar que las cuatro líneas de hMSC eran positivas para CD29, CD44, CD90 y CD105 y negativas para CD11b, HLADR, CD19 y CD45 (**figura r1A**) presentando el patrón de expresión característico de las células madre mesenquimales humanas (Kolf et al., 2007). A su vez, realizamos ensayos de diferenciación *in vitro* a pase temprano, hacia tejido óseo y adiposo para comprobar la capacidad multipotencial de las células. La capacidad de diferenciación osteogénica y adipogénica de las cuatro líneas tras 21 días de exposición a los agentes inductores de diferenciación en cultivo fue confirmada, ya que las muestras presentaron una tinción positiva para rojo Alizarin, marcador de depósitos de calcio (Pittenger et al., 1999) en el caso de diferenciación a tejido óseo y para aceite rojo O, marcador de lípidos (Farmer, 2006) en el caso de diferenciación a tejido adiposo (**figura r1B**).

1.2 El crecimiento de las hMSC a presiones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O₂) mejora el potencial proliferativo de las hMSC

Una vez confirmada la multipotencialidad en nuestro modelo celular, procedimos a cultivar las cuatro líneas de hMSC por largos periodos de tiempo en condiciones estándar de cultivo a dos presiones parciales de oxígeno; 21%O₂ (presión atmosférica) y 3%O₂ (presión próxima a la fisiológica) (ver sección de materiales y métodos). Durante este periodo se analizó la tasa de proliferación celular y se hicieron curvas de crecimiento para establecer la cinética de proliferación en ambas condiciones (**figura r2A**). En primera instancia, pudimos constatar que el cultivo al 3%O₂ promueve una mayor tasa de proliferación celular durante las primeras cinco semanas de cultivo (5 pases) y que tras este periodo de tiempo, la tasa de recambio celular disminuye considerablemente en ambas condiciones de oxígeno (**figura r2B**). La media en el aumento de la tasa de replicación celular al 3%O₂ respecto al 21%O₂ durante las primeras cinco semanas, fue de $0,1644 \pm 0,035$ divisiones celulares/día ($p=0,010$; T-test pareado) (**figura r2B y r2C**) y la media de divisiones celulares totales durante ese mismo periodo, fue de $16,73 \pm 1,22$ DC en células crecidas al 3%O₂ y de $10,98 \pm 0,86$ DC en células crecidas al 21%O₂ ($p=0,01$; T-test pareado) (**figura r2A**); dejando como resultado, un exceso de divisiones celulares de aproximadamente 6 ciclos celulares de replicación más al 3%O₂ que al 21%O₂. Estos datos indican, que si por ejemplo, tras el lipoaspirado inicial partiéramos de un número relativamente bajo de hMSC (por ejemplo: 1×10^4 hMSC/explante); en tan sólo 5 semanas de cultivo, obtendríamos teóricamente más de 1×10^9 células en los cultivos desarrollados al 3%O₂, mientras que al 21%O₂ sólo llegaríamos a obtener 2×10^7 células en el mismo periodo de tiempo. Por lo tanto, durante los primeros cinco pases de crecimiento *in vitro*, los cultivos de hMSC desarrollados al 3%O₂ aumentan la producción celular hasta en 50 veces más el número total de células que los cultivos llevados a cabo de manera tradicional (21%O₂); todo esto, según la fórmula ($1 \times 10^4 \times 2^{DC}$; donde DC = Divisiones celulares).

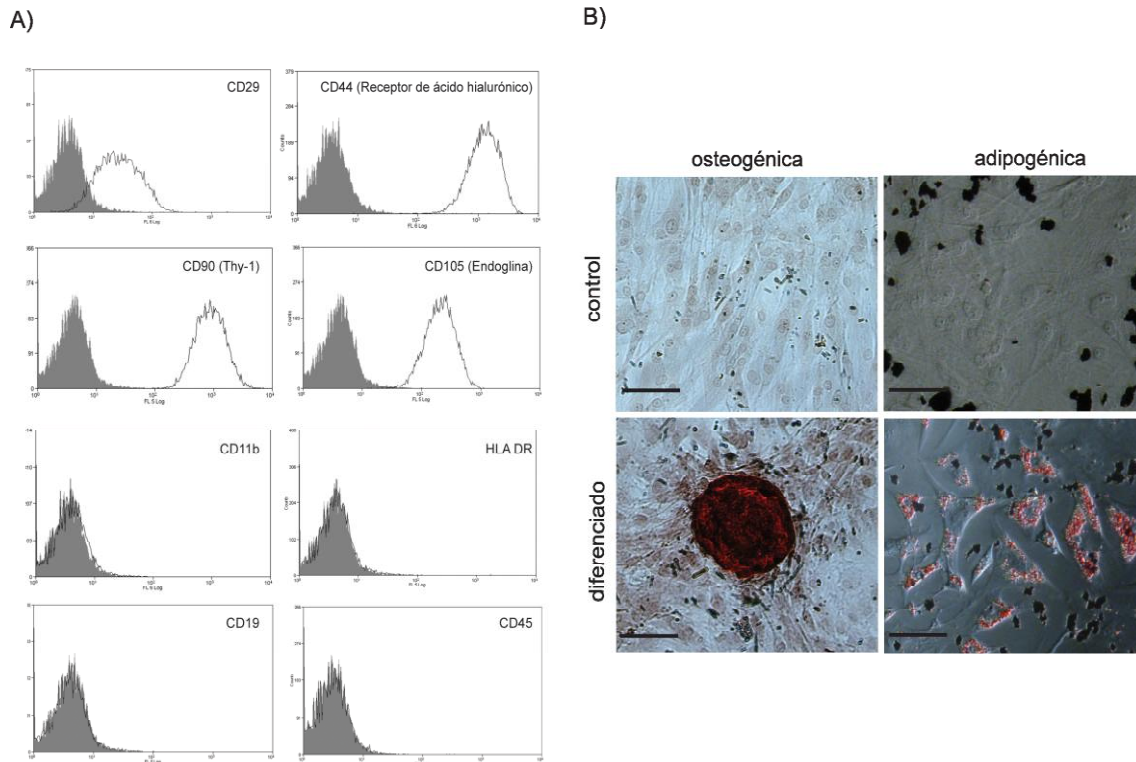


Figura r1. Caracterización fenotípica y capacidad de diferenciación de las hMSC

A) Caracterización fenotípica de las hMSC mediante citometría de flujo usando anticuerpos específicos contra antígenos de superficie y marcados con fulorescencia. El análisis muestra que las hMSC son positivas para la expresión de los antígenos de superficie CD29, CD44, CD90 y CD105 y negativas para la expresión de CD11b, HLA DR, CD19 y CD45, siguiendo un patrón de expresión característico de hMSC (Dominici et al., 2006). Los histogramas grises representan la señal de los respectivos controles de isotipo de cada anticuerpo y los histogramas delineados en negro representan la señal de expresión para cada antígeno de superficie. Se muestran los histogramas representativos de una de las líneas de hMSC (n=4) **B)** diferenciación osteogénica y adipogénica de las hMSC usando medios condicionados con factores de diferenciación, seguido de la tinción con rojo Alizarin S para tejido óseo y acetite rojo O para tejido adiposo. Los controles negativos se llevaron a cabo mediante el cultivo de hMSC con medios sin condicionar. Se muestran imágenes representativas de una de las líneas de hMSC (n=4). Barra de escala, 50µm.

Por otro lado, observamos que durante las 22 semanas que duró la monitorización del ensayo de crecimiento celular *in vitro*, las células crecidas al 3%O₂ se dividieron un total de 35,48± 0,96 veces, mientras que al 21%O₂ sólo se llegaron a dividir 28,68± 1,3 veces, evidenciando un aumento claro de la vida media del cultivo en aproximadamente 6,8 veces más en condiciones de bajo oxígeno (p=0,0021; T-test pareado) (**figura r2A y r2D**). A pesar del incremento en el crecimiento acumulado observado en las condiciones de bajo oxígeno, las curvas de proliferación muestran claramente que las células alcanzan la senescencia tras los 22 pases y que ninguna de ellas presenta signos de inmortalización espontánea en ninguna de las dos condiciones, en concordancia con la teoría del límite de Hayflick (Hayflick & Moorhead, 1961).

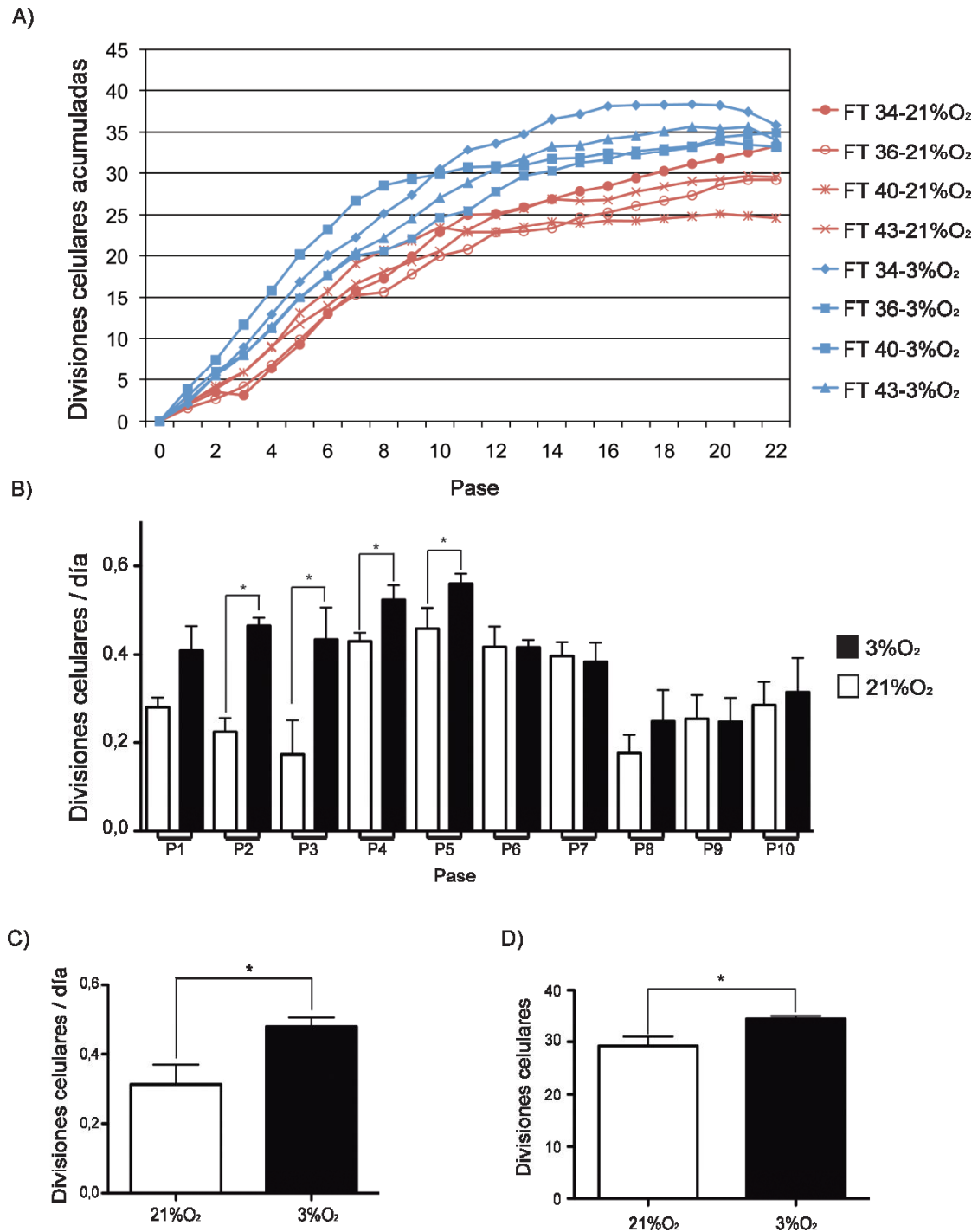


Figura r2. El cultivo al 3%O₂ incrementa el potencial proliferativo de las hMSC

A) Curvas de crecimiento de las cuatro líneas de células madre mesenquimales humanas (hMSC) cultivadas al 3%O₂ (líneas azules) y al 21%O₂ (líneas rojas) mostrando el número de divisiones celulares acumuladas a lo largo de 22 pases. Todas las líneas alcanzaron la senescencia celular alrededor del pase 15 en ambas condiciones de oxígeno y no se observaron procesos de immortalización espontánea durante este periodo **B)** tasa media de proliferación celular por día en cada uno de los pases durante los primeros 10 pases de cultivo, en las hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂. Sólo se observaron diferencias significativas desde el pase 2 al pase 5 de cultivo **C)** tasa media de proliferación celular por día durante los primeros 5 pases de cultivo en las hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂ **D)** media del número de divisiones celulares totales alcanzado por las cuatro líneas de hMSC al 21%O₂ y al 3%O₂, tras 22 pases de cultivo. Todos los experimentos se realizaron en las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos son representados como medias \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado).

1.3 El crecimiento de hMSC al 3%O₂ retrasa la senescencia celular en cultivo

Durante las primeras semanas de cultivo, las células conservaron una apariencia morfológica similar en ambas condiciones de oxígeno pero tras subsecuentes pases y un tiempo prolongado de cultivo, las células comenzaron a sufrir cambios fenotípicos adoptando una morfología alargada, expandida y aplanada característica de la senescencia celular (Campisi, 2000). Procedimos a comprobar cual era el efecto del cultivo a baja concentración de oxígeno sobre la senescencia de las hMSC mediante la detección de la actividad de la enzima lisosomal SA-β-gal (Kurz et al., 2000). Confirmamos que a pases medios de cultivo (pase 7), las células crecidas a bajas concentraciones de oxígeno (3%O₂) presentaban una menor acumulación significativa de células SA-β-gal positivas que a concentraciones de oxígeno suprafisiológicas (21%O₂), mostrando un 20,61± 1,4% de células SA-β-gal positivas al 3%O₂ y un 41,34± 3,45% de células SA-β-gal positivas al 21%O₂ (p = 0,008; T-test pareado) (**figura r3A**).

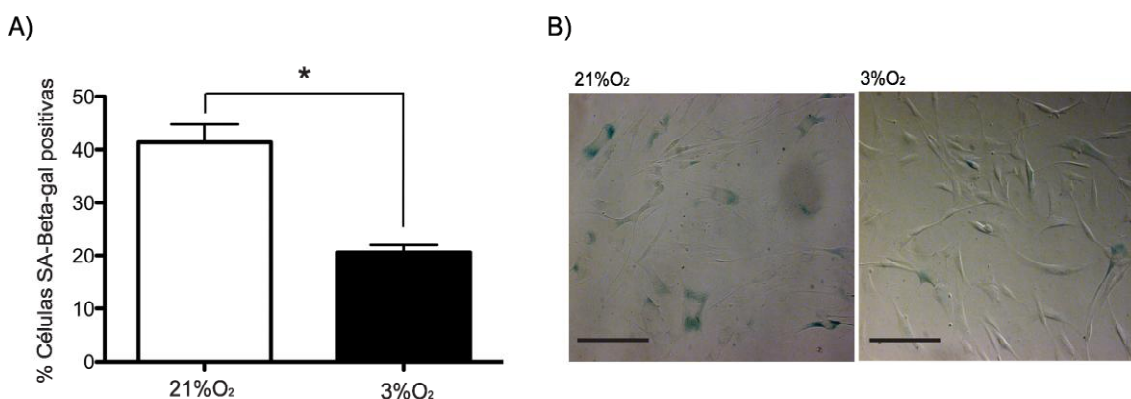


Figura r3. Cultivos al 3%O₂ disminuyen la senescencia replicativa

A) Media del porcentaje de células SA-β-gal positivas de las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂ a pases medios de cultivo (pase 7). La acumulación de células SA-β-gal positivas a bajas concentraciones de oxígeno es significativamente menor que al 21%O₂. Los datos se muestran en medias ± SEM. (P* < 0,05; T test pareado) **B)** imágenes representativas de la presencia de células SA-β-gal positivas en los cultivos de hMSC crecidas en ambas condiciones de oxígeno. Barra de escala, 50 μm.

II. El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ reduce el estrés oxidativo, el daño en el ADN y el acortamiento telomérico en cultivo

2.1 El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ reduce el estrés oxidativo en las células

Uno de los principales factores inductores de la senescencia celular que afecta a las células primarias humanas en cultivo, es el estrés oxidativo (Serrano & Blasco, 2001). Para comprobar si la proliferación celular de las hMSC derivadas de tejido adiposo, puede verse afectada por la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en cultivo, analizamos mediante citometría de flujo los niveles de anión superóxido (O₂⁻) presente en el citoplasma celular de las hMSC crecidas en las dos condiciones de oxígeno. Para ello, utilizamos un indicador relativo fluorescente del contenido de los niveles de esta especie, denominado di-hidroetidina (DHE) y que es capaz de reaccionar directamente con el radical O₂⁻ emitiendo fluorescencia a 630nm tras su oxidación. Evaluamos los niveles de DHE oxidada en los cuatro donantes y en las dos condiciones de oxígeno en tres puntos diferentes a lo largo del cultivo (pase temprano (p1-p5), pase medio (p5-p10) y pase tardío (>p10)). Los resultados demuestran que las hMSC crecidas al 21%O₂ presentan un aumento en la acumulación de los niveles de anión O₂⁻ a lo largo de todos los pases y que este aumento se produce de una forma gradual en ambas condiciones de oxígeno, siendo mas pronunciada y con mayor dispersión al 21%O₂ (**figura r4A**). Estos datos indican, que los cultivos de hMSC desarrollados a concentraciones de oxígeno más fisiológicas mantienen un menor grado de producción de ROS y que por lo tanto son menos susceptibles de sufrir los potenciales efectos deletéreos causados por estas especies. Para confirmar que el incremento en los niveles de ROS presentes al 21%O₂ podrían ser causa de un mayor daño oxidativo en la célula, medimos los niveles de oxidación de proteínas por detección de carbonilos (Levine et al., 1994) y de peroxidación de lípidos por

detección de malondialdehídos (MDA) (Wong et al., 1987). Comparamos las líneas de hMSC crecidas en ambas tensiones de oxígeno a pases medios de cultivo (p5-p8; 18 ± 2 divisiones celulares) y confirmamos que el crecimiento al 21%O₂ fomenta la acumulación de oxidación de proteínas un 29% (p=0,016; T-test pareado) y la peroxidación de lípidos un 107% (p=0,066, T-test pareado) en comparación con las líneas celulares crecidas a bajas condiciones de oxígeno (**figura r4B**).

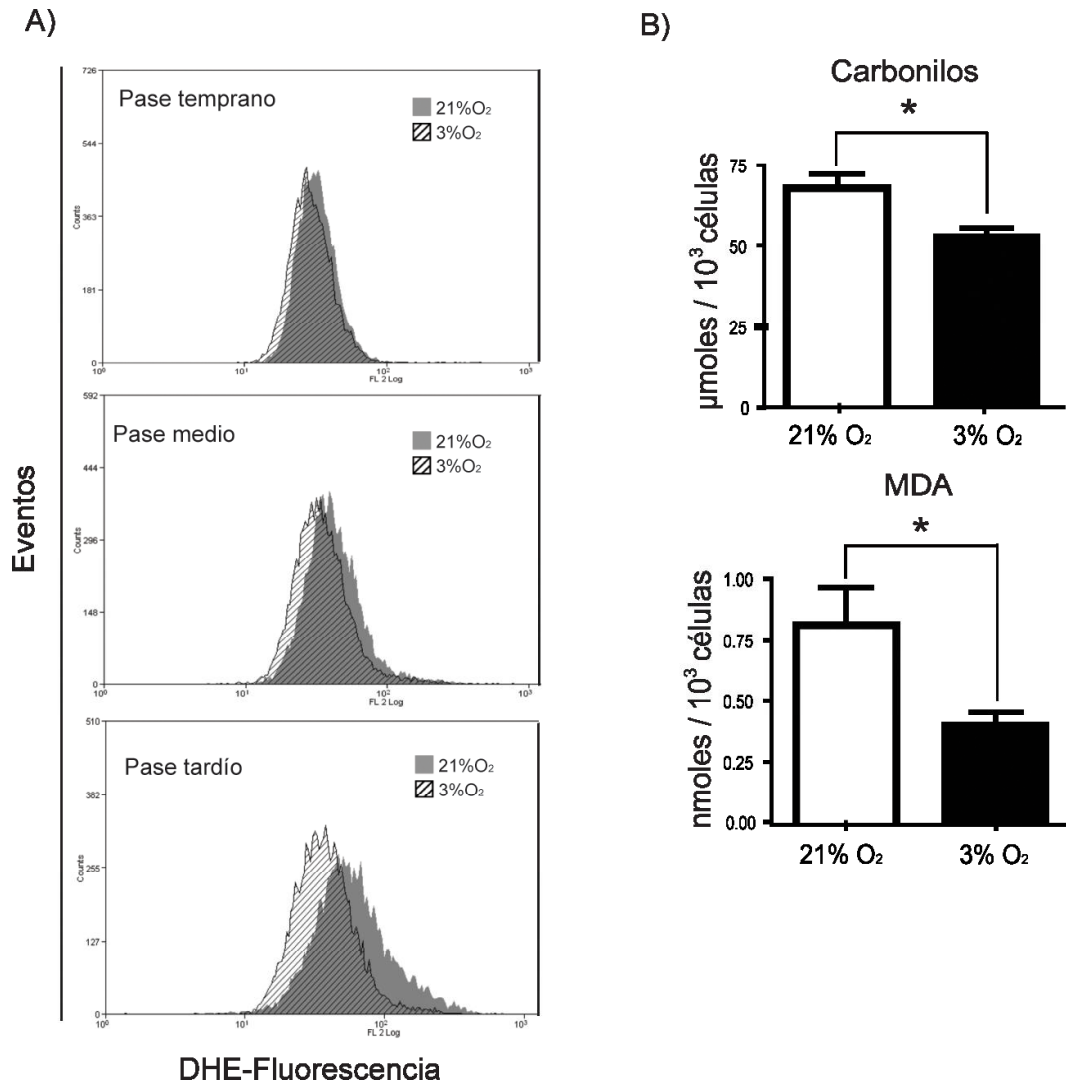


Figura r4. Los cultivos celulares desarrollados al 3%O₂ disminuyen el estrés oxidativo durante el cultivo

A) Detección de los niveles del radical superóxido (O₂⁻) mediante citometría de flujo por tinción fluorescente con Dihidroetidio (DHE). Se analizaron los cultivos de hMSC crecidas al 21%O₂ (histogramas grises) y al 3%O₂ (histogramas rayados) a pase temprano (p1-p5), medio (p5-p10) y tardío de cultivo (>p10). Los niveles de acumulación del radical O₂⁻ fueron superiores en las células mantenidas al 21%O₂ a tiempos similares de cultivo y presentaron a su vez un mayor aumento de acumulación del radical O₂⁻ con los pases que en los cultivos desarrollados en condiciones de bajo oxígeno. En la figura, se muestran los histogramas representativos de una de las líneas independientes de hMSC (n=4) **B)** detección de los derivados de grupos carbonilo de proteínas oxidadas y de MDA de peróxidos lipídicos en las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ y 3%O₂. Los datos revelan, que los cultivos celulares desarrollados al 3%O₂ reducen significativamente los niveles de acumulación de los subproductos derivados del estrés oxidativo. Los datos se representan como medias ± SEM de las cuatro líneas independientes de hMSC. (P* < 0,05; T test pareado).

2.2 El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ reduce el daño en el ADN

Se ha demostrado que el estrés oxidativo, además de promover la oxidación de proteínas y la peroxidación de lípidos, induce daño en el ADN (Chen et al., 1995; Chen et al., 2001). Para determinar si

los elevados niveles de estrés oxidativo derivados de los cultivos desarrollados al 21%O₂ son suficientes para generar una mayor genotoxicidad celular, analizamos por inmunofluorescencia la acumulación de focos de la proteína 53BP1 a nivel nuclear (clásico marcador específico de DSB) (Fernandez-Capetillo et al., 2002; Schultz et al., 2000) a pases medios de cultivo (p5-p8; 18± 2 divisiones celulares). El análisis demostró que las hMSC crecidas al 21%O₂ mantienen una mayor acumulación de este tipo de daño respecto a las células cultivadas al 3%O₂. Observamos que al 21%O₂ las hMSC presentan un 63,31± 0,11% de células positivas para focos de 53BP1 mientras que al 3%O₂ las células mantienen un 44,68± 6,8% de focos para éste marcador (p=0,013, T-test pareado) (**figura r5A y r5C**). Al analizar en mayor detalle el número de focos por célula, comprobamos que las células crecidas a elevadas tensiones de oxígeno retienen un mayor número de focos por célula que cuando son cultivadas a concentraciones de oxígeno más fisiológicas, presentando niveles de 1,37± 0,4 focos/célula al 21%O₂ y de 0,69± 0,11 focos/célula al 3%O₂, aunque sin presentar diferencias significativas (p=0,15; T-test pareado) (**figura r5B y r5C**). Estos datos comprueban que los cultivos llevados a cabo en condiciones de oxígeno hiperóxicas, fomentan el daño genético y aumentan el número de asociaciones protéicas a modo de focos de daño en el núcleo.

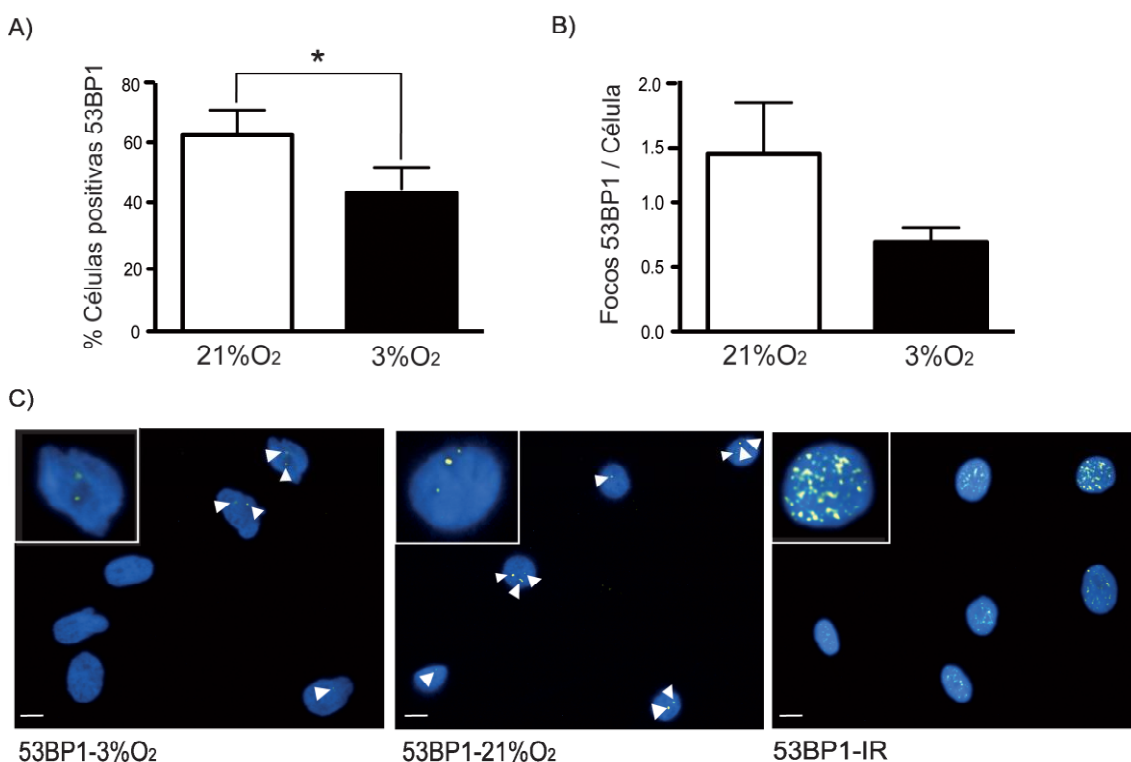


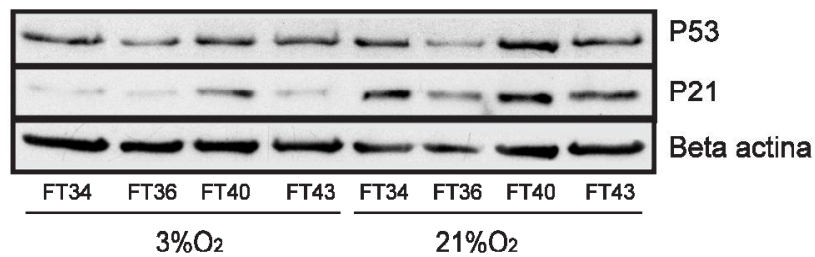
Figura r5. Los cultivos al 3%O₂ reducen el daño en el ADN

A) Cuantificación de células positivas para focos nucleares de la proteína 53BP1 en las cuatro líneas independientes de hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂ a pases medios de cultivo (18±2 divisiones celulares). Se observa una reducción significativa del porcentaje de células positivas para este marcador al 3%O₂ (P* < 0,05; T test pareado) **B)** cuantificación del número medio de focos por núcleo para 53BP1, al 21%O₂ y al 3%O₂ en las cuatro líneas de hMSC, mostrando una tendencia a reducir el número de focos por célula en los cultivos desarrollados al 3%O₂. Los datos se representan como medias ± SEM **C)** imágenes representativas de células crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂ marcadas con un anticuerpo específico para 53BP1 (amarillo) y núcleos contrateñidos con DAPI (azul). Se muestra como control positivo células irradiadas con 10Gy. Las flechas blancas indican focos individualizados. Los recuadros de la esquina superior izquierda de cada foto muestran una ampliación representativa de los núcleos en cada condición. Barra de escala, 10µm.

Para comprobar si el aumento del estrés oxidativo generado al 21%O₂, además de producir un incremento en la acumulación de roturas de doble hebra (Focos de 53BP1), también se traduce en una mayor activación del mecanismo de respuesta a daño en el ADN (DDR), medimos la presencia de dos de las proteínas participantes en la respuesta DDR, P21 y P53. Mediante *Western-blot*, cuantificamos los niveles de acumulación proteica para P21 y P53 en ambas condiciones de oxígeno en las cuatro líneas de hMSC a pases medios de cultivo (p5-p8; 18± 2 divisiones celulares). Los resultados de la

cuantificación por densitometría, demostraron que los niveles de P53 están incrementados un 32% en condiciones de alto oxígeno ($p=0,026$) (**figura r6A y r6B**) y que los niveles de P21 están robustamente incrementados en aproximadamente un 275% ($p=0,0018$) (**figura r6A y r6B**) en esta misma condición. Estos datos sugieren que los mayores niveles de estrés oxidativo presentes en las células cultivadas al 21%O₂, potencialmente están activando las vías de prevención y respuesta a daño genotóxico a través de la acumulación de la proteína supresora de tumores P53 y al menos una de sus dianas transccripcionales directas P21.

A)



B)

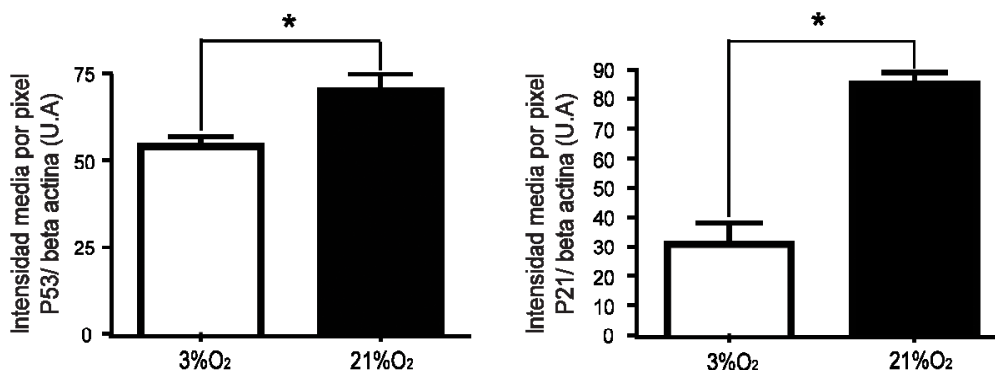


Figura r6. Los cultivos al 21%O₂ mantienen elevados niveles de P21 y P53

A) *Western-blot* de P21 y P53 para las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂ a pases medios de cultivo (18 ± 2 divisiones celulares) mostrando un leve incremento de los niveles de P53 y un fuerte incremento de los niveles de P21 al 21%O₂ **B)** cuantificación densitométrica del *Western-blot* para P21 y P53, normalizados frente al control de carga β actina. Todos los datos se representan como medias \pm SEM ($P^* < 0,05$; T test pareado).

2.3. El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ retrasa el acortamiento telomérico

Prácticamente ninguna célula humana primaria adulta expresa suficientes niveles de telomerasa para poder replicarse indefinidamente, lo cual las hace susceptibles de sufrir un progresivo acortamiento telomérico con las divisiones celulares permitiendo su entrada en senescencia (Harley et al., 1990). Decidimos investigar si la senescencia celular generada en nuestro modelo celular era consecuencia del acortamiento telomérico producido por las divisiones celulares y si éste a su vez, podría estar influenciado por los altos niveles de estrés oxidativo presentes al 21%O₂. Con este fin, cuantificamos la longitud telomérica media de las cuatro líneas de hMSC a pase temprano (p2) y a pase tardío (p15) de cultivo en las dos condiciones de oxígeno. Dado que a pases tardíos la tasa de proliferación celular y por tanto el número de células en metafase es extremadamente bajo, decidimos evaluar la longitud telomérica media en células en interfase (de Pauw et al., 1998). Se hibridaron núcleos celulares en interfase con sondas PNA (*PNA, Peptide Nucleic Acid*) específicas para regiones teloméricas y cuantificamos la longitud de los telómeros mediante la técnica de cuantificación de fluorescencia por hibridación *In situ* Q-FISH (Q-FISH, *Quantitative Fluorescent in situ hybridization*). Los resultados mostraron que durante el cultivo celular prolongado se produce un acortamiento telomérico en ambas condiciones de oxígeno, siendo este más acentuado en cultivos desarrollados a elevadas

tensiones de oxígeno (21%O₂) (**figura r7A**). La cuantificación reveló que la longitud telomérica media de las hMSC al 21%O₂ a pase 2 y pase 15 es de $8,43 \pm 1,28$ y $3,76 \pm 0,7$ kb, respectivamente y que la longitud telomérica media al 3%O₂ a pase 2 y pase 15 es de $8,21 \pm 1,1$ y $5,04 \pm 0,95$ kb, respectivamente (**figura r7A y r7B**). Del mismo modo, se observó que tras 15 pases de cultivo, las células crecidas al 3%O₂ mantuvieron una longitud telomérica media mayor a pesar de haber sufrido un incrementado número de divisiones celulares ($25,78 \pm 0,90$ DC al 21%O₂ y $33,39 \pm 1,33$ DC al 3%O₂; aprox. 7,6 veces divisiones celulares más) (**figura r7A, r7B y r7D**) y que cuando estimamos la media de la tasa de acortamiento telomérico en ambas condiciones de cultivo, los cultivos de hMSC desarrollados al 21%O₂ mantienen una tasa de acortamiento telomérico de aproximadamente un 24% mayor que al 3%O₂ ($p=0,015$), siendo ésta de $0,47 \pm 0,061$ kb/DC para los cultivos al 21%O₂ y de $0,37 \pm 0,046$ kb/DC en los cultivos al 3%O₂ (**figura r7C**).

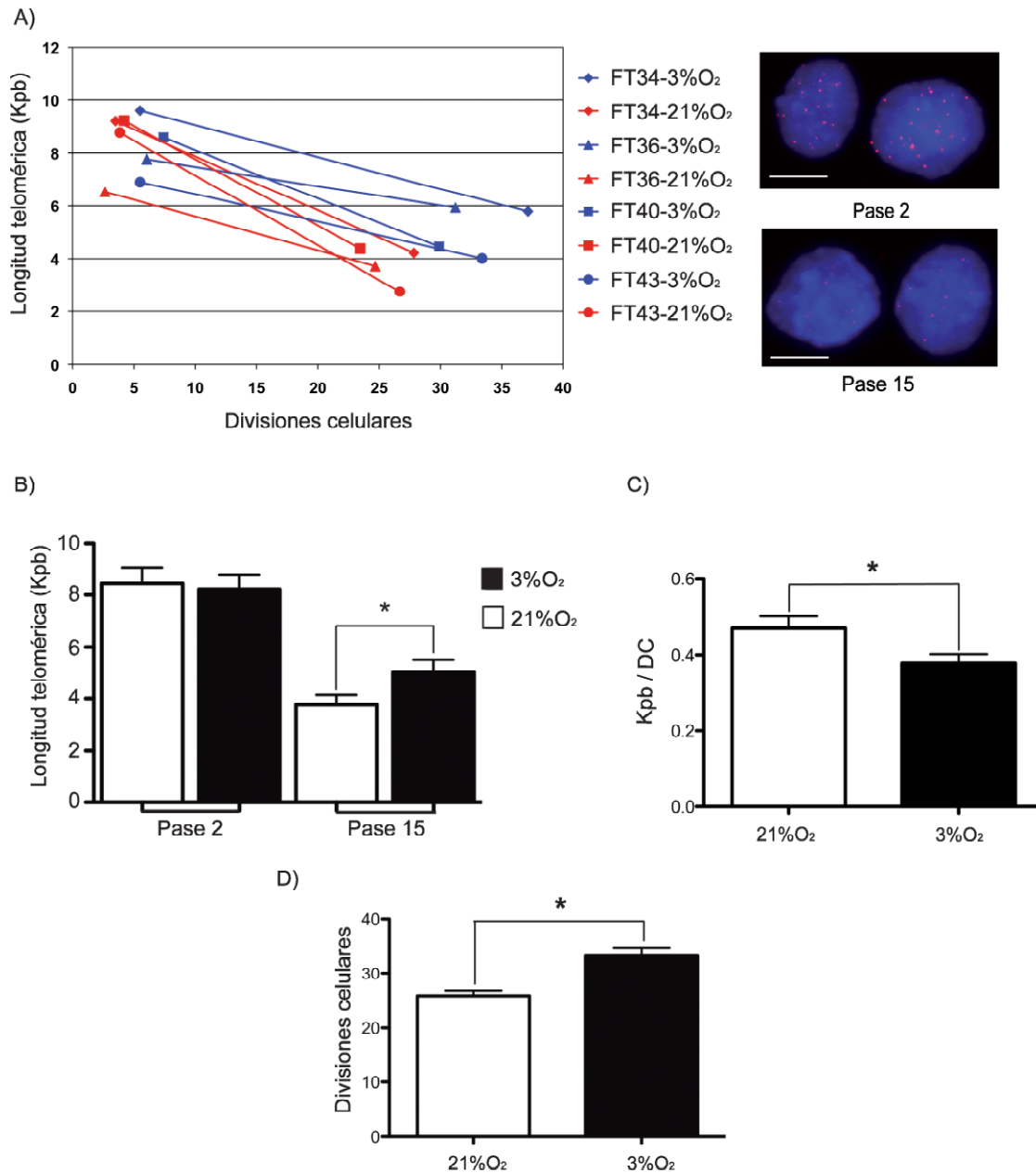


Figura r7. Los cultivos al 3%O₂ reducen la tasa de acortamiento telomérico

A) Análisis de la longitud telomérica media mediante Q-FISH en interfase a pase 2 y pase 15 de cultivo para las cuatro líneas independientes de hMSC, cultivadas a ambas tensiones de oxígeno. La longitud telomérica se representa en función de las divisiones celulares acumuladas en cada una de las líneas. Las unidades de fluorescencia relativa fueron ajustadas a kpb mediante la interpolación de las unidades de fluorescencia relativa de cada una de las líneas, sobre una recta patrón diseñada con líneas celulares de longitud telomérica estable y conocida (TIN2 y TIN2-13) (Kim et al., 1999; Rubio et al., 2002). Las imágenes de la derecha muestran una tinción representativa de la intensidad de fluorescencia de las sondas específicas para las regiones teloméricas (Rojo) a pase 2 y pase 15. Barra de escala, 10µm **B)** media de la longitud telomérica a pase 2 y pase 15 de las cuatro líneas de hMSC crecidas en las dos condiciones de oxígeno. La cuantificación revela una menor longitud telomérica media al 21%O₂ tras 15 pases de cultivo **C)** estimación de la tasa de acortamiento telomérico al 21%O₂ y al 3%O₂ en kpb por división celular (DC). Los cultivos celulares crecidos al 21%O₂ ostentan una mayor tasa de acortamiento telomérico de aproximadamente un 24% mayor que al 3%O₂ **D)** número medio de divisiones celulares a los 15 pases de cultivo de las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂. Al 3%O₂ las células exhibieron 7,6 rondas de divisiones celulares más que al 21%O₂. En todos los casos, los datos se representan como medias ± SEM. (P* < 0,05; T test pareado).

III. La sobreexpresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) inhibe la senescencia replicativa de las hMSC en cultivo

Con el fin de estudiar en mayor detalle la relación existente entre el acortamiento telomérico y la senescencia replicativa en nuestro modelo celular, decidimos transducir las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ con un vector lentiviral que contenía un constructo para la sobreexpresión de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT), que como se ha descrito, es uno de los componentes enzimáticos encargados de mantener la longitud de los telómeros. La transducción se confirmó, a través del análisis de expresión del transcrito (ARNm) de hTERT por PCR cuantitativa mediante utilización de ensayos TaqMan. La cuantificación reveló, que sólo dos de las cuatro líneas de hMSC transducidas (ft34 y ft40) presentaban una expresión cuantificable del ARNm y que ninguna de las líneas control era capaz de expresar el transcrito a pases tempranos de cultivo (pase 2) (**figura r8A**). Para constatar si la sobre expresión de hTERT conducía a un aumento en la actividad de esta enzima, decidimos medir la actividad enzimática de la telomerasa mediante un ensayo TRAP (*Telomeric Repeat Amplification Protocol*), en los mismos pases en los que se cuantificó la expresión del ARNm de hTERT. Comprobamos que la actividad telomerasa para las dos líneas de hMSC transducidas (ft34hTERT y ft40hTERT) fue de 11 y 60 veces más que en sus respectivos controles (**figura r8B y r8C**) y que la actividad enzimática entre líneas no transducidas no manifestaba diferencias significativas apreciables.

Tras observar el aumento de la actividad telomerasa en las células transducidas, decidimos comprobar el potencial efecto de la sobreexpresión de hTERT sobre la longitud telomérica. Mediante la hibridación de metafases con sondas PNA (*PNA, Peptide Nucleic Acid*) específicas para regiones teloméricas, cuantificamos la longitud telomérica media usando la técnica de cuantificación de fluorescencia por hibridación *In situ* Q-FISH (*Q-FISH, Quantitative Fluorescent in situ hybridization*). La cuantificación reveló que las células transducidas con hTERT a pase 17 (12 pases después de la infección) presentaban una longitud telomérica media de aproximadamente 16,09± 6,0 kpb para ft34 hTERT y de 14,16±4,4 kpb para ft40 hTERT, mientras que las células sin transducir exhibían una longitud telomérica media de tan sólo 5,54± 1,1 kpb para ft34 y de 5,50± 0,9 kpb para ft40 a pase 9 de cultivo (**figura r8D**). Estos datos confirman, que efectivamente la transducción con la subunidad catalítica de la telomerasa en las hMSC, tiene un impacto positivo sobre el mantenimiento de la longitud de los telómeros y que ésta es capaz de aumentar la longitud de los telómeros en aproximadamente tres veces más respecto a las células sin infectar. Finalmente, constatamos que la sobreexpresión de hTERT en las hMSC conduce a la inmortalización celular, ya que tras algunos pases en cultivo (aprox. pase 9 – 10) se apreciaron claras divergencias en las curvas de crecimiento y un evidente escape de la senescencia replicativa, confirmada por la elevada tasa de proliferación celular continuada a lo largo de 21 pases (**figura r9A**). La ausencia de senescencia replicativa en los cultivos de hMSC transducidas, fue corroborada mediante análisis de detección de células senescentes SA-β-gal positivas a pases tardíos de cultivo (pase 30), demostrando la práctica inexistencia de células senescentes en este tipo celular (**figura r9B**).

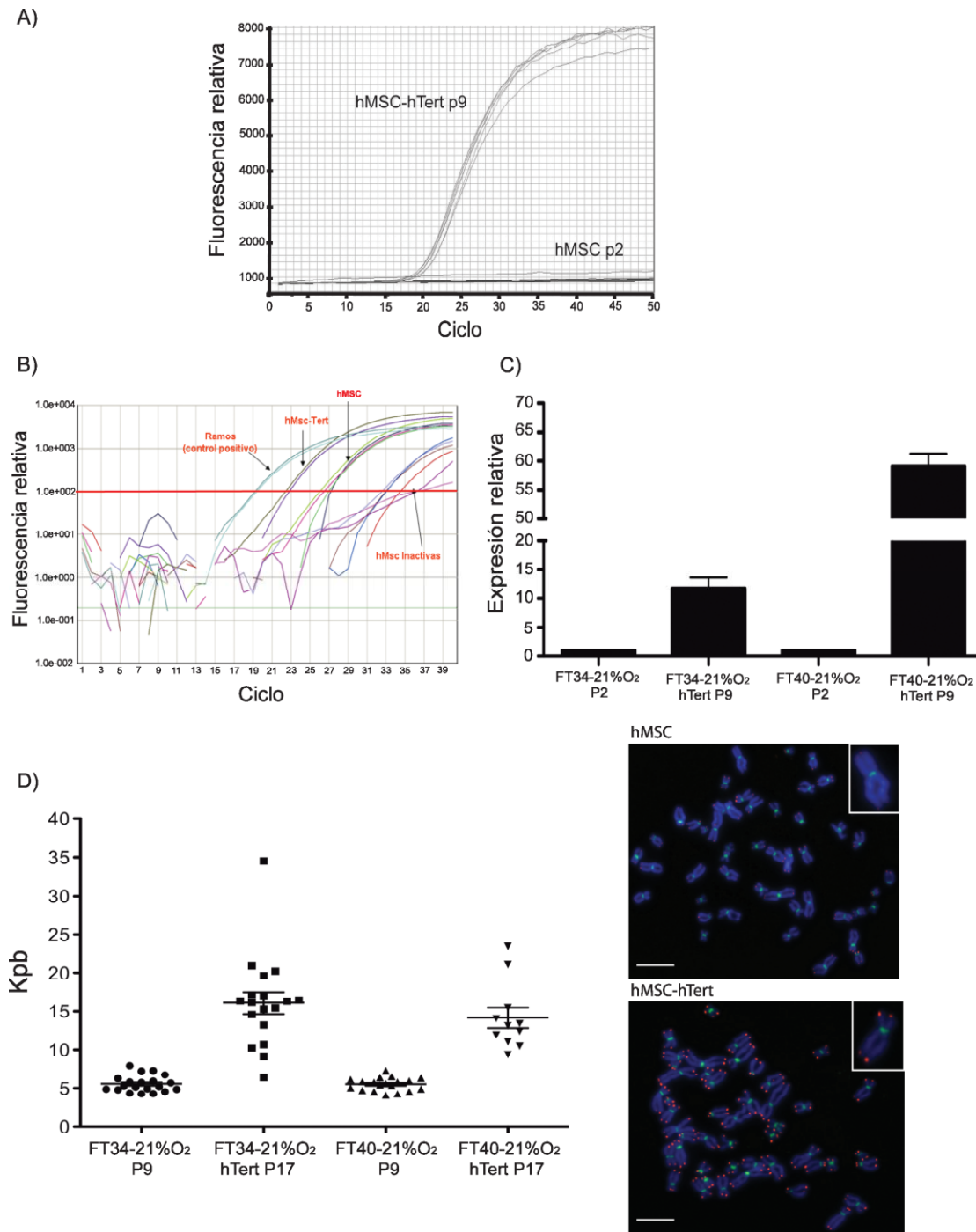


Figura r8. La expresión ectópica de hTERT alarga la longitud telomérica

A) Gráfica de PCR cuantitativa de la expresión relativa de ARNm para la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) en hMSC inmortalizadas a fase 9 y sin inmortalizar a fase temprano (fase 2). Sólo dos de las líneas transducidas con hTERT mostraron expresión cuantificable del transcrito y en el resto de líneas no se detectó amplificación mediante la técnica usada

B) gráfica de PCR cuantitativa para el producto de amplificación de la telomerasa mediante ensayo TRAP (Herbert et al., 2006) en hMSC inmortalizadas fase 9 y sin inmortalizar a fase 2 junto con una línea celular Ramos telomerasa positiva y las mismas líneas con la enzima telomerasa inactivada

C) cuantificación relativa de la actividad telomerasa para las líneas ft34 y ft40 transducidas a fase 9 y sin transducir a fase 2 junto con sus respectivos controles. Los experimentos se realizaron por triplicado para cada una de las líneas independientes de hMSC analizadas

D) análisis de la longitud telomérica media, mediante Q-FISH en metafase de las hMSC ft34 y ft40 a fase 9 y ft34hTERT y ft40hTERT a fase 17. Cada símbolo representa la media de intensidad de fluorescencia de los telómeros de cada metafase analizada. Las unidades de fluorescencia relativa fueron ajustadas a kpb por comparación con líneas control de fibroblastos con longitudes teloméricas estables y conocidas (TIN2 y TIN2-13) (Kim et al., 1999; Rubio et al., 2002). Las imágenes de la derecha muestran metafases representativas de las hMSC transducidas y sin transducir. Las metafases fueron teñidas con sondas PNA teloméricas (rojo) y sondas PNA centroméricas (verde) y el recuadro de la esquina superior derecha muestra una amplificación de uno de los cromosomas de la metafase correspondiente. Barra de escala, 10µm. En todos los casos cuantificables, los datos se muestran en medias \pm SEM.

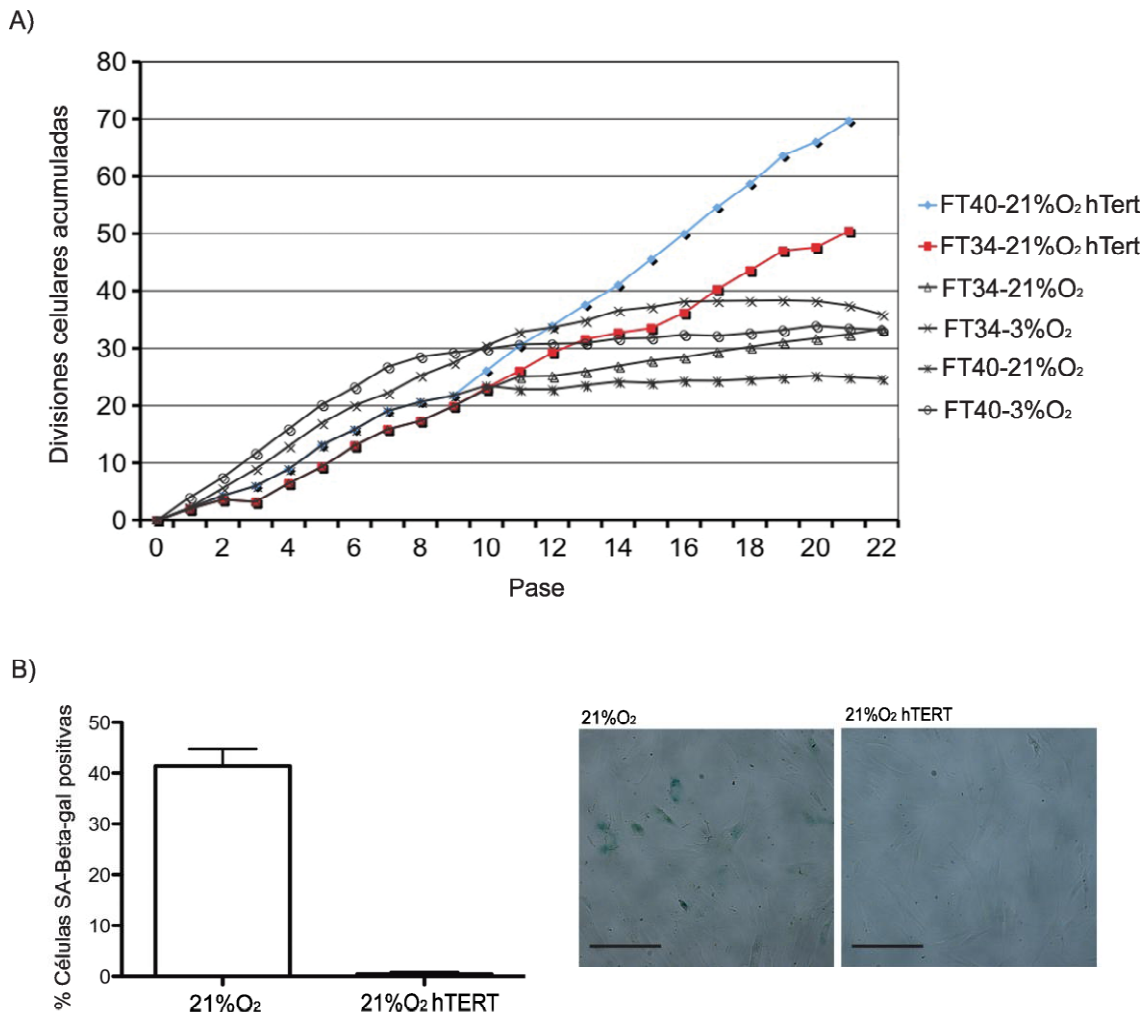


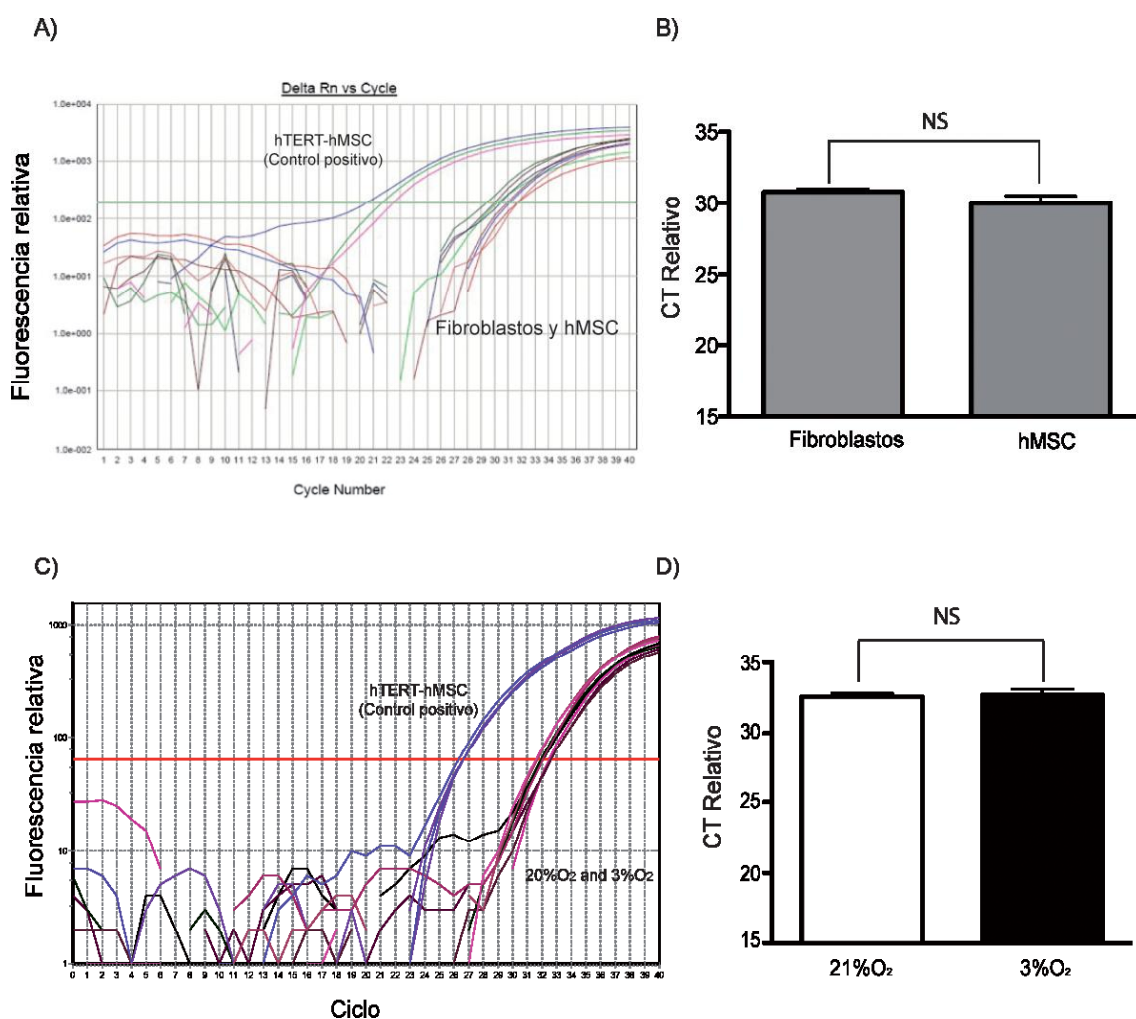
Figura r9. La expresión ectópica de hTERT inhibe la senescencia replicativa

A) Curvas de crecimiento de las dos líneas independientes de hMSC immortalizadas con hTERT. Las curvas revelan un crecimiento continuado de las hMSC transducidas por más de 50 divisiones celulares a lo largo de 21 pases de cultivo, en contraste con las líneas control sin transducir que alcanzan la senescencia replicativa en ambas tensiones de oxígeno **B)** porcentaje medio de células SA-β-gal positivas de las cuatro líneas de hMSC sin infectar a pase 7 de cultivo y de las dos líneas de hMSC transducidas con hTERT a pase 30. Los datos reflejan la total eliminación de la presencia de células SA-β-gal positivas tras la sobreexpresión de hTERT en el cultivo. Las imágenes de la derecha, muestran áreas representativas de los cultivos de hMSC crecidas al 21%O₂ transducidas y sin transducir con hTERT y teñidas con el compuesto orgánico cromogénico X-gal. Los datos se representan como medias ± SEM. Abreviaturas: X-gal, 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido.

La actividad telomerasa es el principal mecanismo de mantenimiento de la longitud telomérica (Blackburn, 1991). Como constatamos anteriormente, los cultivos celulares desarrollados a concentraciones de oxígeno próximas a la fisiológica (3%O₂) poseen una menor tasa de acortamiento telomérico pero también una mayor tasa de proliferación celular. Este efecto podría atribuirse a que el bajo oxígeno está promoviendo un aumento en la actividad telomerasa o a que los reducidos niveles de estrés oxidativo favorecen el mantenimiento de la longitud del telómero. Por esta razón, decidimos comprobar si las hMSC en cultivo poseen alguna actividad telomerasa basal y si ésta podría estar potencialmente influenciada por las condiciones de oxígeno.

Como se observó anteriormente, las hMSC a pase temprano (pase 2) en ninguna de las dos condiciones de oxígeno exhiben expresión alguna del transcrito para la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) (**figura r8A**). Sin embargo, los datos de la cuantificación de la actividad enzimática, demuestran que bajo estas condiciones es posible establecer valores potencialmente cuantificables, aunque bajos, de la actividad de esta enzima (**figura r8B**); por esta razón decidimos comprobar si estos

valores eran mayores que los presentados en otras líneas celulares primarias comprometidas y sin capacidad multipotencial. Para ello, llevamos a cabo un ensayo TRAP a pases tempranos de cultivo (pase < 5) comparando la actividad telomerasa presente en hMSC crecidas al 21%O₂ y fibroblastos humanos, crecidos en esa misma condición y los cuales son comúnmente considerados como telomerasa negativos. Los resultados demostraron que las hMSC poseen niveles basales de actividad telomerasa similares a los encontrados en los fibroblastos humanos crecidos en condiciones estándar de cultivo (21%O₂) (**figura r10A y r10B**). Para conocer el potencial efecto que podría ejercer la concentración de oxígeno sobre la actividad telomerasa, cuantificamos la actividad de esta enzima a pases tempranos de cultivo (pase < 5), comparando células crecidas en ambas condiciones de oxígeno (**figura r10C y r10D**). Los datos revelaron, que el oxígeno no ejerce ningún efecto significativo sobre la actividad basal de la telomerasa ya que no se observó diferencia alguna entre las células crecidas a diferentes presiones parciales de oxígeno. Tomados en su conjunto, los datos anteriormente presentados, sugieren que el aumento en la tasa de acortamiento telomérico presente en los cultivos de hMSC crecidos al 21%O₂ es principalmente promovida por el aumento del estrés oxidativo observado en esta condición y no como consecuencia de efectos colaterales sobre la actividad telomerasa endógena presente en las hMSC.



IV. Los cultivos de hMSC desarrollados al 3%O₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la inestabilidad genética

La consecuencia más dramática del daño en el ADN o la disfunción telomérica, es la aparición de aberraciones cromosómicas estructurales como roturas, translocaciones o fusiones cromosómicas, las cuales dejan una pérdida o ganancia considerable de material genético (Artandi et al., 2000; Obe et al., 2002; Pfeiffer et al., 2000) que pueden promover cambios en la expresión génica que alteren la homeostasis natural de la célula y faciliten su malignización. Por lo tanto, el estudio y control de este tipo de anomalías génicas en los cultivos de hMSC es fundamental para el desarrollo de una adecuada terapia celular y poder así emplear estas células en la clínica.

4.1 El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la aparición de aberraciones cromosómicas estructurales

Para identificar la relevancia que poseen estos desórdenes genéticos en nuestro modelo celular (hMSC) y esclarecer la relación que poseen con el alto nivel de estrés oxidativo presentado en condiciones estándar de cultivo (21%O₂), decidimos llevar a cabo un detallado estudio citogenético comprobando la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales en metafase. Mediante el uso de sondas PNA teloméricas y centroméricas, teñimos metafases procedentes de las hMSC crecidas a ambas condiciones de oxígeno a pases medios de cultivo (p5-p8; 18± 2 divisiones celulares) y analizamos la presencia de las siguientes alteraciones cromosómicas: cromosomas dicéntricos, roturas de cromátidas y fusiones cromosómicas (ver apartado 5.2.3 de la sección de materiales y métodos), todas ellas indicadoras de daño genotóxico y derivadas de la formación de DSB (revisado en (Martinez& Blasco, 2011)). Evidenciamos, que las células crecidas al 3%O₂ exhibían una reducción no significativa del número total del porcentaje de aberraciones cromosómicas en metafase, en aproximadamente dos ordenes de magnitud respecto a las hMSC crecidas a elevadas tensiones de oxígeno (**figura r11A**). Cada una de las alteraciones analizadas, reflejó una reducción en su incidencia en los cultivos al 3%O₂, siendo de 2 veces menor para las fusiones cromosómicas, 1,5 veces menor para las roturas de cromátida y 2,6 veces menor para la formación de cromosomas dicéntricos; presentando estas últimas una diferencia significativa (p=0,048, T-test pareado) (**figura r11A**). Estos datos confirman que el crecimiento de las hMSC al 21%O₂, además de inducir un exceso de roturas en el ADN, estas se traducen en un incremento de los desórdenes genéticos a gran escala que potencialmente sería capaces de comprometer la viabilidad celular o promover la transformación de las células.

Sorprendentemente, tras examinar la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales en las metafases de las células transducidas con hTERT y crecidas durante 22 semanas en condiciones hiperóxicas (21%O₂), observamos una desaparición completa de las aberraciones cromosómicas relacionadas con las fusiones cromosómicas y los cromosomas dicéntricos y una reducción considerable en la presencia de roturas de cromátida (**figura r11A**). Estos datos, ponen de manifiesto el importante papel que posee la telomerasa o la actividad enzimática de hTERT sobre la prevención en la formación de este tipo de anomalías génicas en cultivo y que constituirían una amenaza para la adecuada funcionalidad de la célula o su bioseguridad.

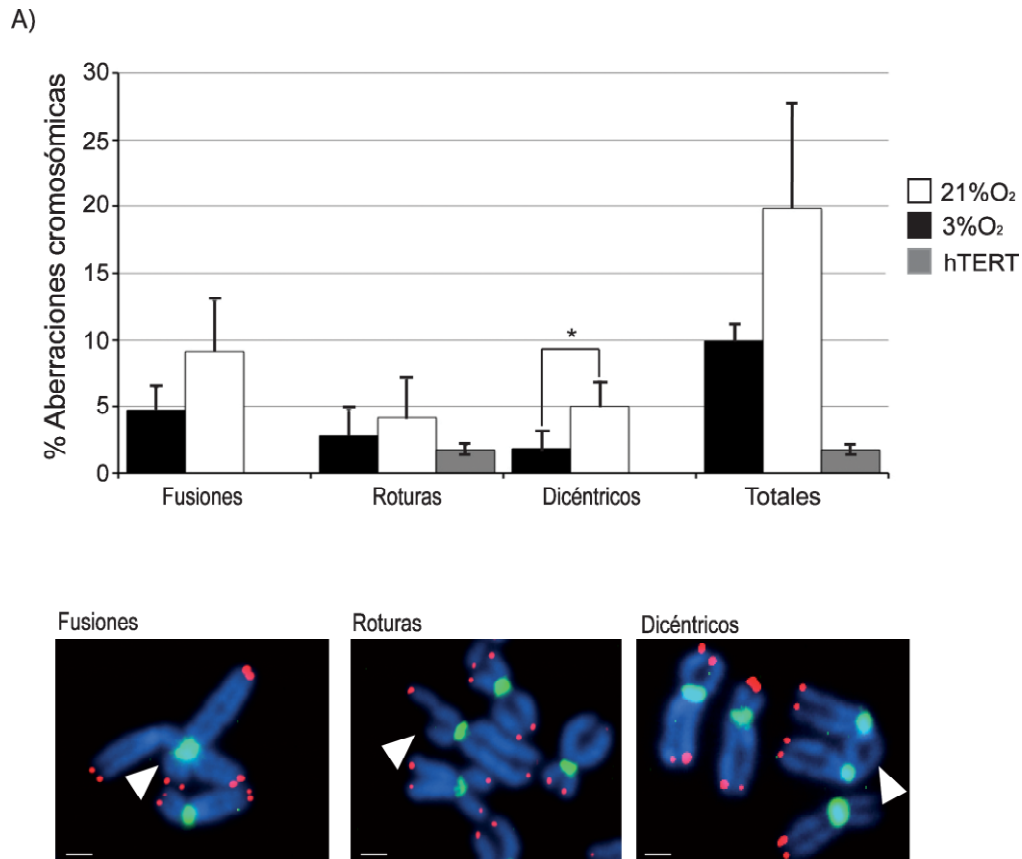


Figura r11. Los cultivos al 3%O₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la presencia de aberraciones cromosómicas estructurales

A) Cuantificación del porcentaje de aberraciones cromosómicas estructurales en metafase de las hMSC crecidas al 21%O₂, al 3%O₂ y transducidas con hTERT. Los cultivos al 3%O₂ reducen la incidencia de aparición de anomalías cromosómicas exhibiendo particularmente una reducción significativa en la aparición de cromosomas dicéntricos frente a los cultivos desarrollados al 21%O₂. La transducción con hTERT en hMSC crecidas al 21%O₂ inhibe casi por completo la aparición de este tipo de anomalías incluso tras 22 pases en cultivo. En todos los experimentos se analizaron las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos se muestran en medias de porcentaje de aberraciones cromosómicas \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado). Las imágenes son ejemplos representativos de aberraciones cromosómicas estructurales en metafase, procesadas por FISH usando sondas específicas contra las regiones teloméricas (rojo) y centroméricas (verde). Barra de escala, 1 μ m.

4.2 El crecimiento de las hMSC al 3%O₂ y la sobreexpresión de hTERT reducen la aneuploidía en cultivo

Acorde con los resultados obtenidos en el análisis citogenético, y por la conocida y bien documentada relación entre envejecimiento, acortamiento telomérico e incremento de inestabilidad genética, procedimos a medir los niveles de inestabilidad genética mediante la detección de células aneuploides a lo largo de los cultivos en las dos condiciones de oxígeno. Estudiamos la presencia de aneuploidías cromosómicas en interfase mediante el uso de sondas comerciales que reconocen regiones centroméricas específicas de los cromosomas 8, 11 y 17. Cabe destacar, que estos cromosomas contienen secuencias codificantes de importantes genes supresores de tumores y oncogenes que controlan la integridad del genoma (como por ejemplo: *c-myc* (*myelocytomatosis viral oncogene homolog*) en el cromosoma 8, *CCND1* (gen de la ciclina D1) o *ATM* (*Ataxia telangiectasia mutated*) en el cromosoma 11 y *p53* en el Cromosoma 17); además de ser potenciales biomarcadores de eventos neoplásicos en el desarrollo temprano de tumores primarios de cáncer de mama (Ichikawa et al., 1996; Persons et al., 1996). Por esta razón sugerimos que desordenes en el contenido génico de estos cromosomas podrían tener relevancia en el control de la bioseguridad y viabilidad del cultivo y podrían ser una buena herramienta para evaluar los niveles de estabilidad genética en los cultivos de hMSC, a modo de cribado, como una primera aproximación. No obstante, podría evaluarse el contenido génico de cualquier otro cromosoma.

El análisis de aneuploidía en interfase para al menos uno de los 3 cromosomas, indicó que durante los cultivos de hMSC se induce un aumento gradual de la aneuploidía a medida que las células son expuestas a largos periodos de cultivo. Observamos que los niveles de aneuploidía para el conjunto de los tres marcadores, incrementó progresivamente desde un 13% a pase temprano (pase 2), hasta un 35% a pase tardío (pase 15). Se comprobó, que esta inestabilidad puede ser reducida de forma significativa por lo menos durante las 10 primeras semanas de cultivo (10 pases) si las células son expuestas a tensiones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O₂) (**figura r12A**). Cabe destacar, que tras el cultivo celular prolongado, se fomentó la aparición recurrente de ganancias en el contenido génico para cualquiera de los tres cromosomas ($n>46$), seleccionándose de un modo preferente las trisomías ($n=3$ por cromosoma) en ambas condiciones de oxígeno (**tabla r1**). Por otro lado, los datos demostraron que el cultivo celular prolongado, favorece una subrepresentación de las alteraciones cromosómicas asociadas a las nulisomías ($n=0$ por cromosoma) y polisomías ($n>4$ por cromosoma) para cualquier cromosoma, exhibiendo valores de aneuploidía para el conjunto de los tres marcadores inferiores al 6% (**tabla r1**). Otro aspecto relevante del análisis, concierne a la aleatoria distribución de las ganancias o pérdidas del contenido génico para cualquiera de los tres cromosomas, ya que en principio no encontramos diferencias significativas en la incidencia de aneuploidía entre estos cromosomas en ninguno de los puntos analizados, aunque parece existir cierta tendencia a la acumulación de aneuploidías para los cromosomas 11 y 17 (**tabla r2**).

	Pase	nulisomía (0)	monosomía (1)	disomía (2)	trisomía (3)	tetrasomía (4)	polisomía (>4)
3%O ₂	p2	0.00%	6.48%	79.78%	5.94%	7.51%	0.30%
	p5	0.61%	8.68%	76.15%	8.10%	6.46%	0.00%
	p10	0.00%	11.71%	63.24%	16.15%	7.98%	0.93%
	p15	0.60%	7.48%	46.18%	26.57%	16.94%	2.23%
21%O ₂	p2	0.13%	9.07%	72.73%	10.19%	7.36%	0.52%
	p5	1.70%	12.65%	59.77%	8.41%	15.65%	1.83%
	p10	0.46%	14.10%	53.05%	20.93%	10.25%	1.22%
	p15	1.36%	9.91%	44.48%	22.42%	16.24%	5.59%

Tabla r1. Porcentaje medio de aneuploidía total para cada tipo de aneuploidía y pase en las dos condiciones de oxígeno

Tabla resumen del porcentaje medio de aneuploidía para los cromosomas 8, 11 y 17, presente a pase 2, 5, 10 y 15 en los cultivos de hMSC crecidos al 21%O₂ y al 3%O₂. Los datos reflejan una representación considerable y un aumento progresivo con los pases, de las trisomías respecto a los otros tipos de alteraciones en ambas condiciones de oxígeno. Los porcentajes son el resultado de presencia de células aneuploides para cualquiera de los tres marcadores. Los datos se presentan en porcentajes medios de las cuatro líneas.

Con el fin de confirmar los resultados anteriores, decidimos analizar la presencia de aneuploidías cromosómicas en metafase en las cuatro líneas celulares a ambas concentraciones de oxígeno a pases medios de cultivo, comparando líneas que han sufrido divisiones celulares similares (p5-p8; 18 ± 2 divisiones celulares). Estos experimentos mostraron que un $70,07 \pm 8,71\%$ de las metafases analizadas de células crecidas al 21%O₂ poseen un número anormal de cromosomas ($\neq 46$) y que las células crecidas a bajas concentraciones de oxígeno reducen significativamente los niveles de aneuploidía en metafase hasta un $45,17 \pm 5,02\%$ ($p < 0,05$) (**figura r12B y r12C**). Tanto el análisis de aberraciones cromosómicas estructurales, como el de aneuploidía cromosómica en interfase y en metafase, sugieren que la exposición prolongada a estrés oxidativo generado por las condiciones estándar de cultivo (21%O₂) promueve la inestabilidad genética celular y compromete por ende la bioseguridad de las células.

Como se ha mencionado anteriormente, uno de los posibles mecanismos que podría atribuirse al incremento de inestabilidad genética o aneuploidía con los pases, es la presencia de telómeros críticamente cortos o disfuncionales. Para confirmar si el fenómeno del acortamiento telomérico esta incidiendo sobre el control de la ploidía celular, decidimos analizar el porcentaje de células aneuploides presente en los cultivos de las células inmortalizadas con hTERT. Comprobamos que estas células mantenidas por tiempos prolongados de cultivo (22 pases) y cultivadas bajo concentraciones de oxígeno hiperóxicas (21%O₂), mantienen un porcentaje de células aneuploides semejante a los niveles basales encontrados en los cultivos de hMSC a pases iniciales de cultivo (pase 2), siendo de 19,48% para ft34

hTERT y de 13,70% para ft40 hTERT (**figura r12A**). Estos datos revelan que el acortamiento telomérico puede jugar un papel crucial en el control de la ploidía y que la sobreexpresión de hTERT limita significativamente la aparición de inestabilidad genética en cultivo, reduciendo tanto la incidencia de aberraciones cromosómicas estructurales como el porcentaje de células aneuploides (**figura r12A y tabla r2**).

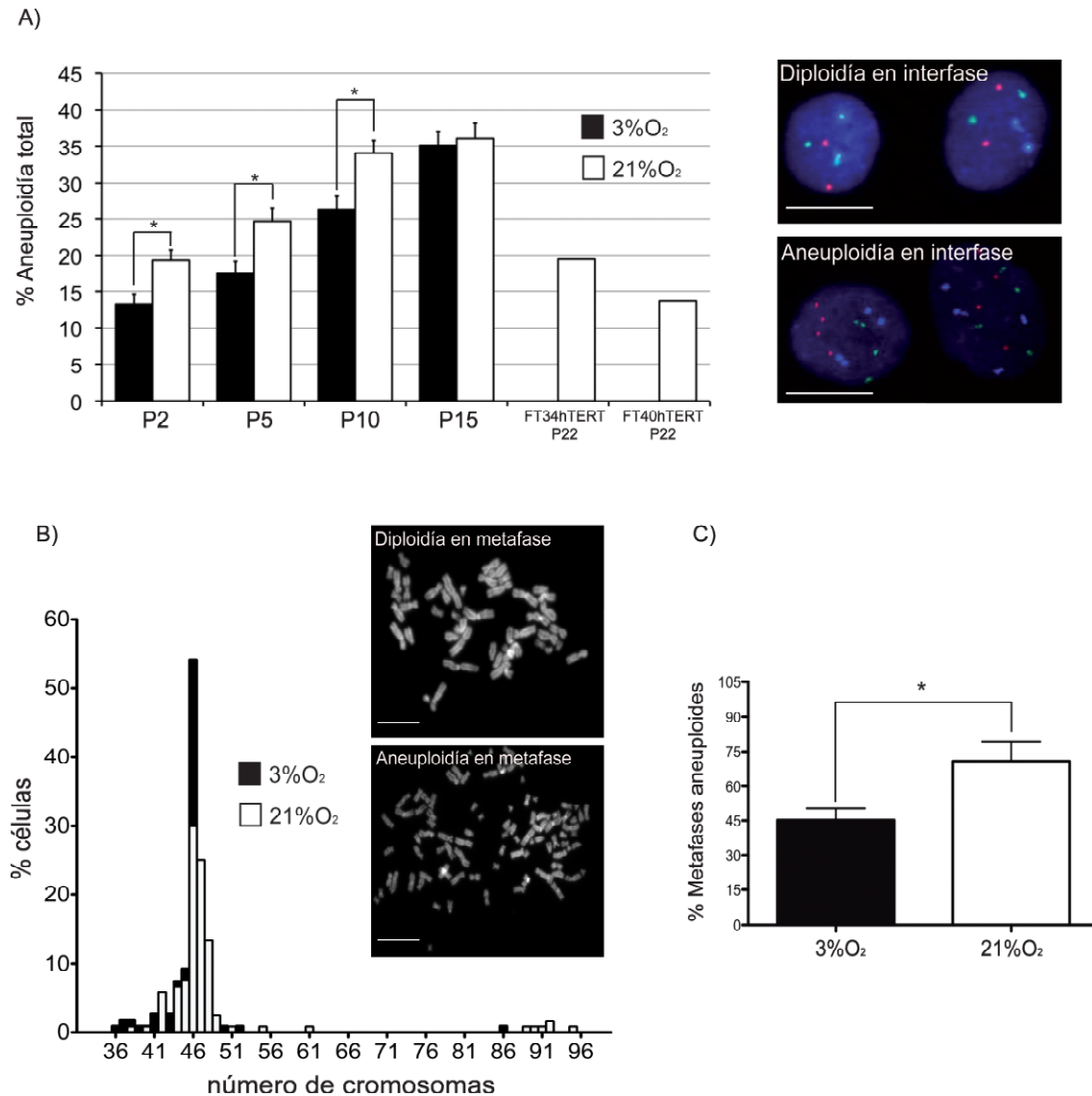


Figura r12. Los cultivos de hMSC desarrollados a tensiones de oxígeno próxima a la fisiológica (3%O₂) retrazan la aparición de células aneuploides en cultivo

A) Media del porcentaje de células aneuploides en interfase para las cuatro líneas independientes de hMSC a pases 2, 5, 10 y 15 en las dos condiciones de oxígeno y para las células transducidas con hTERT a pase 22 al 21%O₂. Las imágenes de la derecha muestran ejemplos de células diploides y aneuploides en interfase teñidas por FISH para los cromosomas 8 (rojo), 11 (verde) y 17 (azul) y contrateñidos con DAPI (azul). Barra de escala, 10μm. El crecimiento al 3%O₂ reduce significativamente la incidencia de aneuploidía durante los primeros 10 pases de cultivo. Se analizaron de 100 a 200 núcleos por línea celular y condición de oxígeno. Los datos representan las medias de aneuploidía de las cuatro líneas \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado) **B)** histograma de frecuencias de número de cromosomas por metafase de hMSC expandidas al 21%O₂ y al 3%O₂ a pases medios de cultivo (18 ± 2 divisiones celulares). Las imágenes de la derecha muestran metafases diploides y aneuploides. Barra de escala, 10μm **C)** Representación del porcentaje medio de metafases aneuploides para las dos condiciones de oxígeno (18 ± 2 divisiones celulares). Se analizaron las cuatro líneas independientes de hMSC usando entre 25 y 30 metafases por línea y condición ($n=120$ al 21%O₂ y $n=107$ al 3%O₂). Los datos se muestran en medias \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado).

(% Aneuploidía al 21%O ₂)					(% Aneuploidía al 3%O ₂)					
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media		Cr 8	Cr 11	Cr 17	media	
ft34 (p2) - 3.5DC	6.70	9.28	9.79	8.59		ft34 (p2) - 5.5DC	4.76	12.16	6.88	7.93
ft36 (p2) - 2.64DC	10.34	11.03	13.79	11.72		ft36 (p2) - 6.05DC	5.17	8.62	6.70	6.83
ft40 (p2) - 7.41DC	7.47	7.05	12.45	8.99		ft40 (p2) - 4.2DC	5.56	4.86	6.94	5.79
ft43 (p2) - 3.85DC	5.88	7.84	7.45	7.06	total	ft43 (p2) - 5.5DC	6.13	6.75	6.13	6.34
media	7.60	8.80	10.87	9.09	19.33+/-1.37	media	5.41	8.10	6.66	6.72
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media			Cr 8	Cr 11	Cr 17	media
ft34 (p5) - 9.28DC	8.77	14.04	17.54	13.45		ft34 (p5) - 16.87DC	7.20	7.20	8.00	7.47
ft36 (p5) - 9.85DC	10.70	13.20	15.30	13.07		ft36 (p5) - 14.89DC	14.57	7.91	10.70	11.06
ft40 (p5) - 13.05DC	13.80	14.60	12.30	13.57		ft40 (p5) - 20.16DC	6.99	11.90	10.50	9.80
ft43 (p5) - 11.73DC	10.20	14.30	11.60	12.03	total	ft43 (p5) - 15.01DC	12.00	6.50	4.60	7.70
media	10.87	14.04	14.19	13.03	24.69+/-1.75	media	10.19	8.38	8.45	9.01
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media			Cr 8	Cr 11	Cr 17	media
ft34 (p10) - 22.82DC	13.51	14.10	16.76	14.79		ft34 (p10) - 30.46DC	8.09	11.56	15.03	11.56
ft36 (p10) - 19.97DC	17.23	20.23	17.86	18.44		ft36 (p10) - 24.67DC	3.95	14.69	7.91	8.85
ft40 (p10) - 23.45DC	8.88	18.93	19.53	15.78		ft40 (p10) - 29.89DC	19.13	16.52	17.39	17.68
ft43 (p10) - 20.55DC	10.90	14.74	9.62	11.75	total	ft43 (p10) - 27.03DC	7.38	13.11	12.30	10.93
media	12.63	17.00	15.94	15.19	34.03+/-1.83	media	9.64	13.97	13.16	12.26
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media			Cr 8	Cr 11	Cr 17	media
ft34 (p15) - 27.83DC	18.78	15.15	20.00	17.98		ft34 (p15) - 37.14DC	18.18	23.03	23.03	21.41
ft36 (p15) - 24.68DC	20.90	23.18	16.82	20.30		ft36 (p15) - 31.22DC	12.56	15.57	14.57	14.23
ft43 (p15) - 26.68DC	17.27	22.27	17.00	18.85	total	ft43 (p15) - 33.39DC	16.17	20.43	18.00	18.20
media	18.98	20.20	17.94	18.85	36.12+/-2.04	media	15.64	19.68	18.53	17.95
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media			Cr 8	Cr 11	Cr 17	media
ft34 (p20) - 31.75DC	20.00	22.96	28.89	23.95						
ft36 (p20) - 28.60DC	26.05	29.41	30.25	28.57						
ft43 (p20) - 29.23DC	17.65	17.65	32.03	22.44	total					
media	21.23	23.34	30.39	24.99	46.68+/-1.63					
	Cr 8	Cr 11	Cr 17	media			Cr 8	Cr 11	Cr 17	media
FT34hTert (P22) - 50.42DC	9.74	9.09	9.74	9.52						
FT40hTert (P22) - 69.66DC	4.84	4.84	7.26	5.65	total					
media	7.29	6.97	8.50	7.59	16.6+/-4.08					

Tabla r2. Porcentaje de aneuploidía por cromosoma y pase en cada una de las líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂

Tabla resumen del porcentaje de células aneuploides para cada uno de los cromosomas a pase 2, 5, 10, 15 y 20 en las dos condiciones de oxígeno y en cada una de las líneas de hMSC. Se muestra el porcentaje medio de aneuploidía para cada cromosoma en cada pase y el porcentaje de aneuploidía total de los tres cromosomas por pase. Nótese que es posible obtener más de una alteración cromosómica por núcleo, por lo tanto el porcentaje medio de aneuploidía total por pase para los tres marcadores no es la suma de sus medias. Los datos se muestran en medias \pm SEM. Abreviaturas: Cr, Cromosoma; DC, Divisiones Celulares; hTERT, subunidad catalítica de la telomerasa humana; p, pase; %, porcentaje.

4.3. El crecimiento celular al 3%O₂ reduce la aparición de usos mitóticos multipolares

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por el estudio citogenético que revela una elevada presencia de aberraciones cromosómicas estructurales y una incrementada incidencia de aneuploidía celular en condiciones de alto oxígeno, decidimos evaluar el potencial efecto de otros mecanismos alternativos capaces de incidir sobre la inestabilidad genética celular, además del ya sugerido acortamiento telomérico. Uno de los mecanismos que puede dar origen a aneuploidías cromosómicas o variaciones en el número de copia de juegos cromosómicos completos, es la formación de "husos mitóticos aberrantes" (Storchova & Pellman, 2004). Una formación inadecuada del huso

mitótico durante la mitosis puede dar lugar a una aberrante segregación cromosómica facilitando la formación de células aneuploides durante el cultivo. En algunos casos, estas alteraciones pueden provenir de la formación de metafases multipolares, con más de dos centrosomas por división celular (Nasmyth, 2002).

Para determinar si este fenómeno podría estar afectando la estabilidad genética de los cultivos de hMSC y comprobar si esta de algún modo influenciado por la concentración de oxígeno, decidimos cuantificar el número de metafases multipolares presente en las dos condiciones de oxígeno a pases medios de cultivo ($p5-p8$; 18 ± 2 divisiones celulares). Mediante tinción específica de la alfa-tubulina incorporada en los microtúbulos de los husos mitóticos celulares, pudimos comprobar que un $9,74 \pm 3,6\%$ de las metafases observadas exhibían multipolaridad al $21\%O_2$, mientras que sólo un $3,44 \pm 2,4\%$ de las metafases al $3\%O_2$ mostraban dicha aberración ($p=0,02$) (**figura r13A**). Estos resultados demuestran que la estabilidad genética en el cultivo puede estar influenciada por diversos mecanismos celulares que pueden ser potencialmente alterados por las condiciones de oxígeno en el cultivo y que en el caso de la formación de husos mitóticos aberrantes, esta anomalía está afectada por la tensión de oxígeno o el ROS derivado de su metabolismo. Finalmente, podemos afirmar que la inestabilidad genética o la aneuploidía celular generada en los cultivos de hMSC puede desencadenarse al menos mediante dos mecanismos; uno derivado del acortamiento telomérico y otro por defectos en la segregación de los cromosomas durante la metafase.

A)

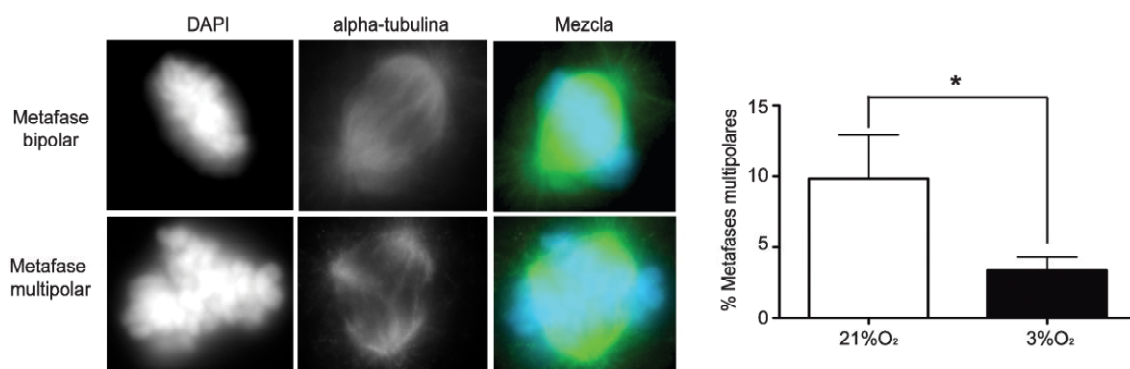


Figura r13. Los cultivos a bajo oxígeno reducen la formación de metafases multipolares

A) Porcentaje medio de metafases multipolares presentes en los cultivos al $21\%O_2$ y al $3\%O_2$ a pases medios de cultivo comparando líneas que han sufrido divisiones celulares similares (18 ± 2 divisiones celulares). Se observa una reducción significativa de la formación de metafases multipolares al $3\%O_2$ y los datos se muestran como medias \pm SEM de las cuatro líneas ($P^* < 0,05$; T test pareado). Las imágenes son ejemplos representativos de metafases bipolares (normales) y metafases multipolares (aberrantes) teñidas con un anticuerpo específico para α -tubulina en el uso mitótico (verde) y tinción nuclear con DAPI (azul).

V. El estrés oxidativo induce aneuploidía en cultivo

Para corroborar que las especies reactivas del oxígeno (ROS) son una de las principales causas de formación de aneuploidía en las hMSC, decidimos tratar las células con dos agentes clastogénicos inductores de ROS, Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (Paraquat - PQ) un conocido agente inductor del radical superóxido (O_2^-) y Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) un conocido intermediario del estrés oxidativo. Cultivamos una línea independiente de hMSC a ambas condiciones de oxígeno y la tratamos con PQ a una dosis de $40\mu M$ y H_2O_2 a una dosis de $100\mu M$ (concentraciones habitualmente usadas en experimentos de inducción de estrés oxidativo en cultivos primarios) (Chen et al., 1998; Chen et al., 2001; Peng et al., 2004).

Pudimos constatar que tras el tratamiento con PQ en las dos condiciones de oxígeno se produce una reducción en la tasa de proliferación llegando a inhibir la proliferación celular al $21\%O_2$ e incluso inducir muerte celular a partir del primer pase, y al $3\%O_2$ tan sólo alcanzar 10 divisiones

celulares antes de llegar a la senescencia (**figura r14A y r14C**). Al analizar la incidencia de aneuploidía celular tras los cultivos tratados con PQ, confirmamos que la adición de este compuesto genera un fuerte incremento en la acumulación de células aneuploides para los cromosomas 8, 11 y 17; siendo de $36,3\% \pm 5,2$ a pase 2 al $21\%O_2$ y de $35,1\% \pm 4,6$ a pase 5 y de $53,6\% \pm 4,1$ a pase 10 al $3\%O_2$ (**figura r14B, r14D y r14G**). Del mismo modo, el tratamiento con H_2O_2 en células cultivadas al $3\%O_2$ indujo senescencia prematura y apoptosis, inhibiendo por completo la proliferación celular e incrementando en más de 3 veces los niveles de aneuploidía al cabo de tan sólo 2 pases estableciendo valores de aneuploidía de $61,3\% \pm 6,2$ (**figura r14F y r14G**). El tratamiento con H_2O_2 en el cultivo al $21\%O_2$ mostró una toxicidad elevada y fue imposible mantener su crecimiento continuado, por lo que no se obtuvieron células suficientes para el desarrollo del análisis de aneuploidía. Estos resultados sugieren que ambos estímulos inductores de estrés oxidativo y con carácter clastogénico conocido causan senescencia y aneuploidía en las hMSC. Sorprendentemente, al analizar los efectos de las ROS exógenas sobre la longitud telomérica no evidenciamos cambios significativos en la longitud del telómero con ninguno de los dos tratamientos a ninguna de las dos condiciones de oxígeno. Este resultado, puede ser debido a la elevada toxicidad de los tratamientos que podrían estar promoviendo la senescencia prematura a través de mecanismos alternativos al acortamiento telomérico como el excesivo daño en el ADN o la activación de la vía Rb/p16 (Chen et al., 2001; Toussaint et al., 2000).

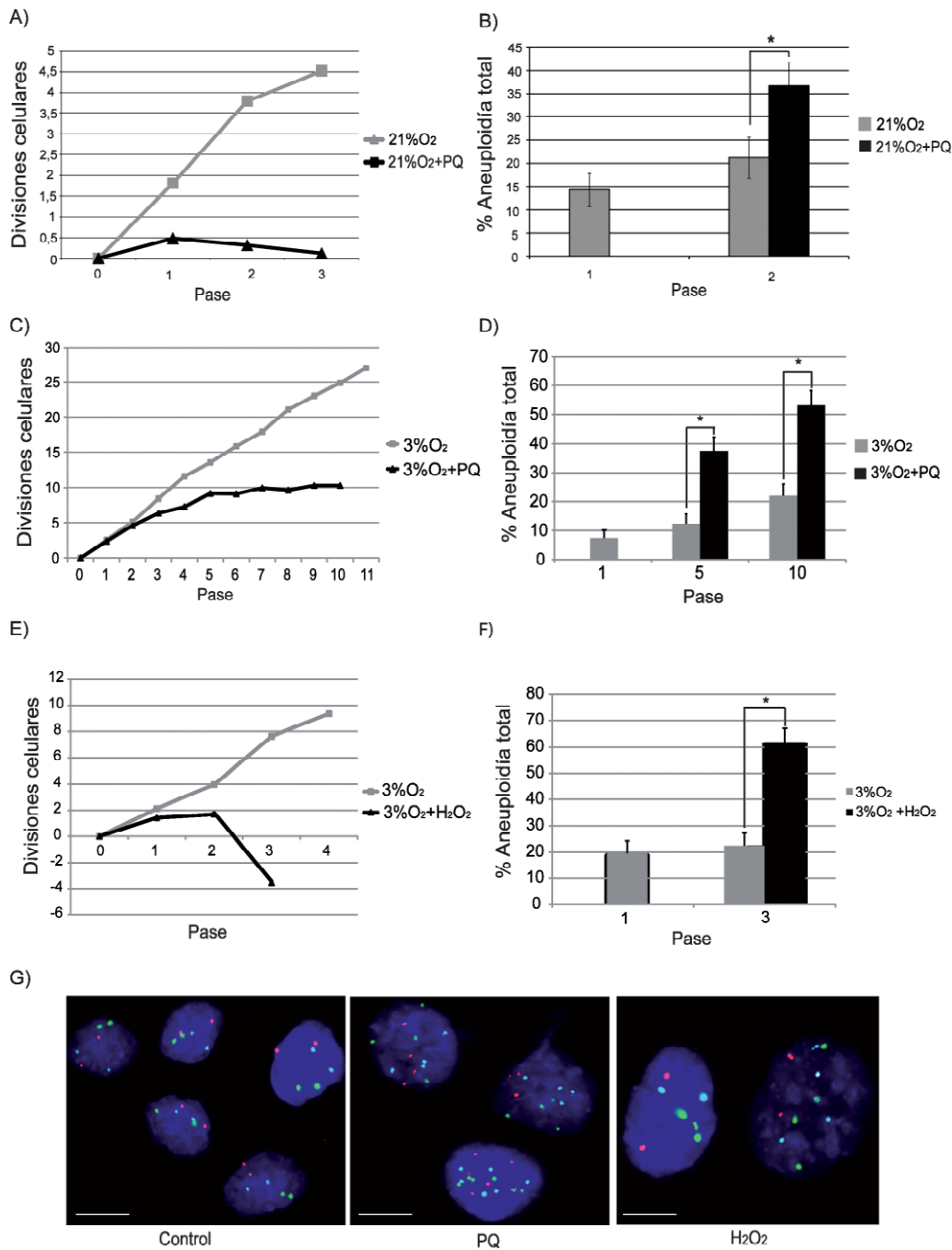


Figura r14. El estrés oxidativo promueve la senescencia celular y aumentan la presencia de células aneuploides en cultivo

A) Dinámica de crecimiento de una línea de hMSC, cultivada al 21%O₂ con y sin tratamiento de Paraquat (PQ-40μM) como recurso exógeno de ROS. El tratamiento con PQ al 21%O₂ inhibió casi por completo la proliferación e incluso promovió la muerte celular a partir del primer pase **B)** niveles de aneuploidía celular para los cromosomas 8, 11 y 17 en células control y tratadas con PQ (40μM) al 21%O₂ a pase 1 y 2, mostrando un incremento significativo de la aneuploidía en las células tratadas con PQ a pase 2 **C)** dinámica de crecimiento de una línea de hMSC crecida al 3%O₂ con y sin tratamiento de Paraquat (PQ-40μM) como recurso exógeno de ROS. Se observa una clara disminución en la tasa de proliferación y una rápida entrada en senescencia de las células tratadas con PQ **D)** niveles de aneuploidía para los cromosomas 8, 11 y 17 en células control y tratadas con PQ (40μM) al 3%O₂ a pase 1, 5 y 10. El tratamiento continuado con PQ indujo un aumento significativo de las células aneuploides en los cultivos a pase 5 y 10 **E)** dinámica de crecimiento de una línea de hMSC crecida al 3%O₂ tratada y sin tratar con 100μM peróxido de hidrógeno (H₂O₂) como recurso exógeno de ROS. Se observa una disminución en el crecimiento y aumento de la muerte celular tras el tratamiento con H₂O₂ **F)** niveles de aneuploidía celular para los cromosomas 8, 11 y 17 en células control y tratadas con 100μM peróxido de hidrógeno (H₂O₂). El tratamiento con H₂O₂ indujo un aumento significativo de las células aneuploides a pase 3 de cultivo. Para el análisis estadístico en todos los experimentos, se calculó la fracción de células aneuploides en cada condición y se aplicó el test de Fisher. P* < 0,05 fue considerado como significativo **G)** imágenes representativas de hMSC sin tratar, tratadas con PQ (40μM) y tratadas con H₂O₂ (100μM). Las células fueron hibridadas con sondas CEP mediante FISH en interfase para los cromosomas 8 (señal roja), 11 (señal verde) y 17 (señal azul claro). Barra de escala, 10μm.

VI. La sobreexpresión de hTERT reduce el estrés oxidativo

Dado que la inducción de senescencia en las hMSC correlaciona con los niveles de estrés oxidativo presentes en la célula (**figura r3 y r4**) y que las células immortalizadas con hTERT inhiben por completo la senescencia replicativa en nuestros cultivos (**figura r6 y r7**), quisimos testar la hipótesis de si las células transducidas con hTERT podrían estar regulando los niveles de ROS en cultivo como han sugerido algunos autores (Indran et al., 2011; Massard et al., 2006). Se analizaron los niveles del radical superóxido (O_2^-) presente en las dos líneas transducidas con hTERT a pase 22 y sus líneas homólogas crecidas al 21% O_2 y 3% O_2 a pase 5 de cultivo. Se observó que la sobreexpresión de hTERT redujo claramente la acumulación del radical superóxido (O_2^-) en las dos líneas analizadas respecto a sus líneas homologas crecidas al 21% O_2 y al 3% O_2 (**figura r15A**) incluso habiendo sufrido 22 pases en cultivo. De igual modo, se midieron los niveles de acumulación de subproductos de la oxidación como grupos carbonilos y MDA y comprobamos que la infección de hTERT también reduce drásticamente los niveles de estos dos subproductos de la oxidación con 22 semanas de cultivo (**figura r15B**).

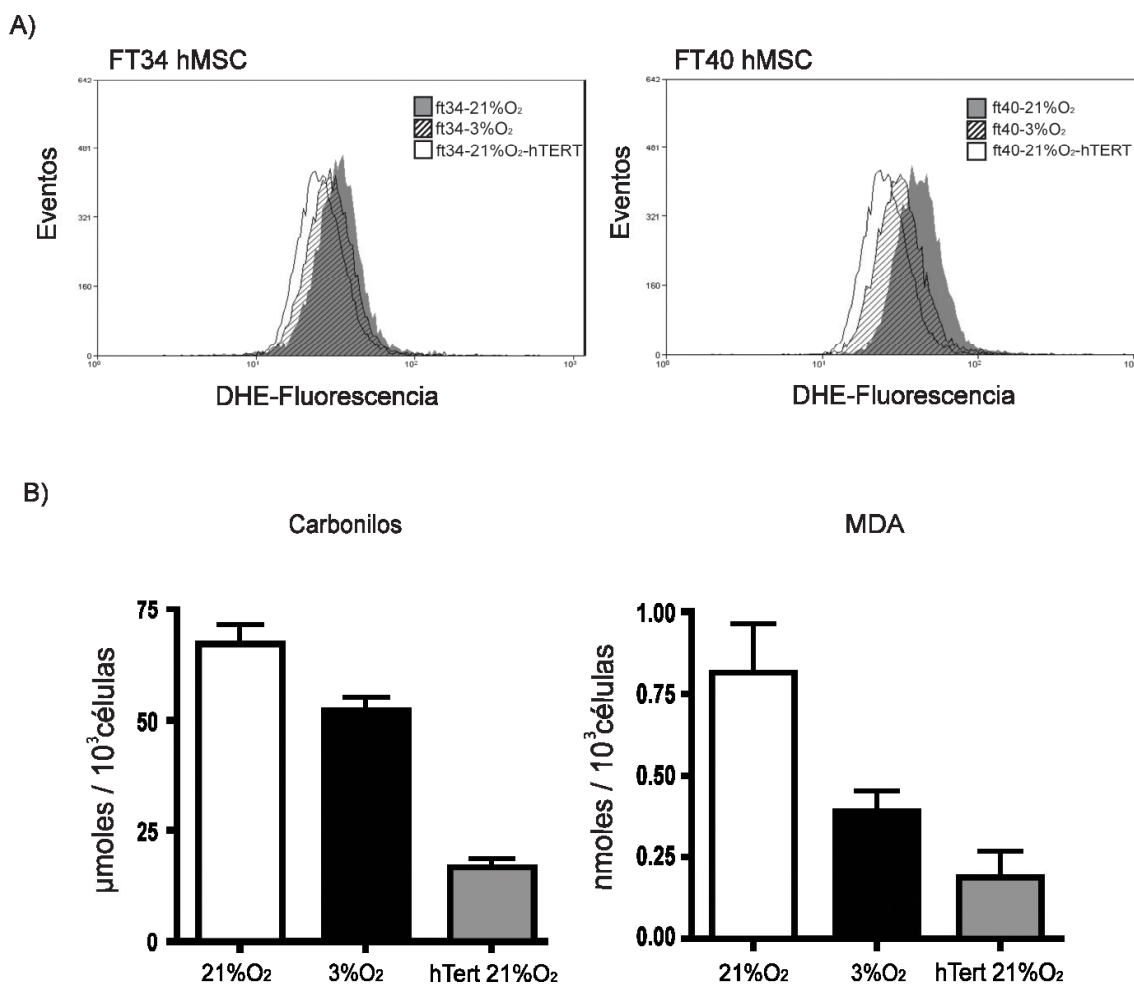


Figura r15. La sobreexpresión de hTERT reduce el estrés oxidativo en cultivo

A) Detección de los niveles del radical superóxido (O_2^-) por citometría de flujo mediante tinción fluorescente con Dihidroetidio (DHE) en cultivos de hMSC (ft34 y ft40) crecidos al 21% O_2 y al 3% O_2 , a pase 5 de cultivo y transducidas con hTERT a pase 22. Los niveles de acumulación de O_2^- fueron menores en células transducidas con hTERT respecto a las otras dos condiciones **B)** medición de acumulación de derivados de grupos carbonilo de proteínas y de malondialdehído (MDA) en las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21% O_2 y al 3% O_2 a pase 5 y en las líneas transducidas con hTERT a pase 22, mostrando una considerable disminución de la acumulación de estos dos subproductos de la oxidación en las hMSC transducidas con hTERT. Los datos se muestran en medias \pm SEM.

VII. La tensión de oxígeno en el cultivo altera el metabolismo celular

Para comprender el mecanismo por el cual los cultivos a bajas concentraciones de oxígeno reducen el estrés oxidativo, mantienen la estabilidad genética e incrementan la capacidad proliferativa de las células, decidimos analizar los cambios de expresión génica producidos a bajas concentraciones de oxígeno a pase temprano de cultivo (pase < 5) mediante un análisis de *Microarrays*. El análisis del cambio en el perfil de expresión génica nos permitió identificar 822 genes (3,01% del total de genes analizados) alterados significativamente ($q < 0,05$) en células crecidas a bajas concentraciones de oxígeno (**tabla r3**) (ver material suplementario (Estrada et al., 2011)). Al realizar un análisis funcional de Ontología Génica (GO; *Gene Ontology*) y estudiar aquellas funciones biológicas que podrían estar alteradas significativamente por la reducción de oxígeno en el cultivo, pudimos identificar 42 procesos biológicos potencialmente modificados y que presentaban una significancia de $p < 0,05$ (**Tabla r4**). El GO reveló que los procesos biológicos con mayor significancia estadística están relacionados con la glucólisis, el metabolismo de la glucosa, el metabolismo de las hexosas, el metabolismo del alcohol y el metabolismo de carbohidratos (**tabla r4**). Dentro de estas categorías, únicamente tres genes presentaron una reducción significativa en la expresión y doce exhibieron un aumento significativo de su expresión en las condiciones de bajo oxígeno, sugiriendo una fuerte participación del metabolismo glucolítico cuando las células son expuestas al 3%O₂ (**tabla r5**). Sorprendentemente, sólo uno de los 42 procesos biológicos alterados significativamente está relacionado con el crecimiento, ciclo celular, supervivencia o apoptosis, el cual es denominado por el GO como “regulación negativa de la producción de genes implicados en supervivencia” (GO:0008634). Este proceso celular está compuesto por los genes BNIP3 (con 1,2 veces de sobreexpresión al 3%O₂), BNIP3L (con 0,68 veces de sobreexpresión 3%O₂) y HRK (con -0,93 veces de regulación a la baja al 3%O₂) (**tabla r4**), los cuales codifican proteínas proapoptóticas en donde al menos dos de ellas BNIP3 y BNIP3L pertenecen a la familia Bcl-2 que como se sabe están reguladas directamente por hipoxia o por la expresión de HIF1 α (Bruick, 2000).

Uno de los principales y mejor caracterizados elementos de regulación positiva de la glucólisis, es la activación del factor de transcripción de respuesta a hipoxia HIF1 α (Giaccia et al., 2003; Schofield & Ratcliffe, 2004), el cual funciona a modo de sensor de la disponibilidad de oxígeno y permite a la célula mantener una actividad metabólica proglucolítica cuando los niveles de oxígeno son relativamente bajos. Nuestro análisis de expresión génica, revela que doce genes diana de HIF1 α (Schofield & Ratcliffe, 2004) están significativamente sobre expresados en los cultivos de hMSC al 3%O₂, en un rango que oscila entre 1,2 y 2,3 veces (valor $q < 0,05$) (**tabla r6**), sugiriendo una notable activación de esta vía en condiciones de bajo oxígeno. Para esclarecer la participación del factor inducido de hipoxia (HIF1 α) en el incremento de la expresión de los genes glucolíticos al 3%O₂, decidimos cuantificar los niveles de HIF-1 α por *Western-blot* en ambas condiciones de oxígeno a pases tempranos de cultivo (pase < 5). Confirmamos que al 3%O₂ hay un incremento significativo de la concentración de HIF1 α de aproximadamente 4 veces más que al 21%O₂ (**figura r16A y r16B**). En base a estas observaciones, podemos sugerir que la reducción de oxígeno al 3%O₂ incrementa los niveles de HIF-1 α y por lo tanto potencialmente favorece la expresión de todos sus genes diana incluidos aquellos que participan en el metabolismo de la glucosa (Giaccia et al., 2003) (**tabla r6**).

Símbolo	Nombre	Veces relativas	FDR valor q
PFKFB4	6-fosfofructo-2 quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 4	2.7856	0.0006
NA	NA	2.5298	0.0006
TAF9B	ARN polimerasa II TAF9B, proteína de unión a secuencia TATA ,	2.8699	0.0006
NA	NA	7.0861	0.0006
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1	3.4414	0.0006
BNIP3	proteína de interacción 3, BCL2/adenovirus E1B 19kDa	2.2974	0.0006
HIF3A	Factor inducible por hipoxia 3 alfa	2.9160	0.0007
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	2.1780	0.0007
CXCL2	Quimioquina ligando 2 (C-X-C motivo)	0.4969	0.0017
ALDOC	aldolasa C, fructosa-bifosfato	2.3587	0.0019
PFKFB3	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3	2.2863	0.0020
NA	NA	2.1705	0.0020
SLC2A1	Transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa)	2.7645	0.0020
DGAT2	Diacilglicerol O-aciltransferasa homólogo 2 (ratón)	0.5848	0.0020
RASSF7	Miembro 7 de la familia de asociación a Ras (RalGDS/AF-6) dominio (N-terminal)	2.7934	0.0020
NA	NA	1.7703	0.0020
NA	NA	0.5637	0.0020
CRABP2	Proteína de unión a ácido retinoico celular	1.8830	0.0020
NA	NA	0.3582	0.0020
NQO1	NAD(P)H deshidrogenasa, quinona 1	0.5340	0.0020
PPFIA4	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo f polipéptido (PTPRF), proteína de interacción (liprin), alfa 4	4.9760	0.0020
SPAG4	Antígeno 4 asociado a esperma	2.7953	0.0020
NA	NA	1.8340	0.0020
DUSP5P	Pseudogén fosfatasa 5 con especificidad dual	1.7255	0.0020
GYS1	Glucógeno sintasa 1 (musculo)	1.7666	0.0022
NA	NA	1.7291	0.0022
LRRC17	Proteína con 17 repeticiones ricas en leucina	2.9140	0.0022
GLYATL1	Glicina N acetiltransferasa 1	1.6702	0.0023
ZNF395	Proteína dedos de zinc 395	2.3006	0.0023
COL18A1	Colágeno tipo XVIII, alfa 1	0.5909	0.0026
EGLN1	Proteína egl nueve homóloga 1 (C. elegans)	1.8366	0.0026
NA	NA	1.7267	0.0028
NA	NA	1.7231	0.0028
C1orf113	Marco de lectura abierto 113 del cromosoma 1	2.3718	0.0030
PRELID2	PRELI conteniendo el dominio 2	1.5551	0.0033
SLC16A3	Transportador de solutos 3 de la familia 16 (transportador de ácido monocarboxílico 4)	1.7219	0.0036
KCNIP3	Calsenilin, proteína de interacción con canal Kv	0.5430	0.0038
HHIP	Proteína de interacción con la proteína de erizo (<i>hedgehog</i>)	2.1184	0.0038
NA	NA	1.6178	0.0039
NA	NA	1.6923	0.0039
NA	NA	1.7423	0.0039
ENO2	Enolasa 2 (gama, neuronal)	2.1856	0.0039
tcag7.1015	Pseudogén de triosafosatoisomerasa 1	1.8163	0.0039
AK3L1	Adenilato ciclasa 3	1.7136	0.0043
PLOD1	Procolágeno lisina 1, 2-oxoglutarato 5- dioxigenasa 1	1.8493	0.0043
MGC42105	Proteína quinasa NIM1 serina/treonina	1.6166	0.0043
P4HA1	Polipéptido alfa I, prolil 4 hidroxilasa	2.0705	0.0043
NA	NA	1.7617	0.0043
LAPTM4B	Proteína transmembrana lisosomal beta 4	0.6625	0.0046
EGR1	Proteína de respuesta temprana al crecimiento 1	0.6237	0.0046

Tabla r3. Cambio en el perfil de expresión génica comparando células crecidas al 3%O₂ frente a células crecidas al 21%O₂

En la tabla se muestran los primeros 50 genes desregulados significativamente cuando se crecen las hMSC al 3%O₂. Los genes están ordenados en función de su significancia estadística y se muestra el número de veces relativas de expresión alterada que posee cada uno de los genes al 3%O₂ respecto al 21%O₂. En las casillas grises se señalan aquellos genes implicados en el metabolismo de carbohidratos. Para ver el listado de genes completo, consultar el siguiente artículo (Estrada et al., 2011) .

Término GO	p valor	Tamaño Univ.	Tamaño muestra	Símbolo
Metabolismo de la glucosa	0.001	22	10	ENO3,PGK1,PK1,ALDH5A1,IGF2,ALDOC,ENO2,TPI1,LDHA,PGD
Glucólisis	0.001	9	6	ENO3,PGK1,ALDOC,ENO2,TPI1,LDHA
Catabolismo de las hexosas	0.001	13	7	ENO3,PGK1,ALDOC,ENO2,TPI1,LDHA,PGD
Catabolismo del alcohol	0.001	17	8	ENO3,PGK1,ALDOC,ENO2,TPI1,NUDT5,LDHA,PGD
Catabolismo de carbohidratos	0.003	19	8	ENO3,PGK1,ALDOC,ENO2,TPI1,NUDT5,LDHA,PGD
Fosforilación de aminoácidos en proteínas	0.008	100	24	CLK1,IGFBP3,WNT2,MKNK2,PK1,MEX3B,TEK,STK38L,CCL2,BCL2,HCLS1,MYLK,IL11,ZAP70,ADRA2C,PXK,STK32C,DAPK1,DAPK2,RAGE,PRKX,MGC42105,CDKL2,NEK7
Desarrollo de epidermis	0.008	35	11	KRT17,CTGF,CRABP2,EREG,COL5A1,CSTA,PLOD1,LAMC2,KRT14,UGCG,COL7A1
Oxidación / reducción	0.008	90	22	ENOX1,PTGS2,AKR1C1,ERO1L,ALDH5A1,SOD2,NQO1,AKR1B10,PLOD1,EGLN1,PTGS1,P4HA1,ME1,KDM3A,LDHA,PLOD2,AIFM2,GPX7,PGD,ASPHD1,AKR1B1,CYB5A
Metabolismo del fosfato	0.011	147	32	CLK1,IGFBP3,WNT2,MKNK2,PGK1,PK1,MEX3B,TEK,STK38L,CCL2,PPP1R14A,PTPRR,BCL2,EREG,HCLS1,TLR3,PTPRB,MYLK,IL11,ZAP70,DUSP5,ADRA2C,PXK,STK32C,DAPK1,DAPK2,RAGE,PPA1,PRKX,MGC42105,CDKL2,NEK7
Condensación del cartílago	0.011	4	3	SOX9,CTGF,MGP
Transporte de aniones orgánicos	0.011	4	3	SLC1A3,SLC16A3,SLC4A11
Proteína de homotetramerización	0.011	4	3	ALDH5A1,SOD2,PCBD1
Metabolismo de carbohidratos	0.014	58	15	DGAT2,PK1,PFKFB3,ALDH5A1,IGF2,B3GALT4,ME1,RENBP,ST6GAL1,B4GALT5,AKR1B1,PPP1R3C,SLC2A5,PFKFB4,GYS1
Respuesta a hipoxia	0.019	20	7	VEGFA,BCL2,PLOD1,ITPR1,EGLN1,PLOD2,BNIP3
Procesos de modificación de proteínas	0.021	36	10	PLAT,CPE,MMP15,HERC6,PLOD1,TLL7,B3GALT4,PLOD2,ST6GAL1,ASPHD1
Metabolismo de la fructosa 2,6-bisfosfato	0.022	2	2	PFKFB3,PFKFB4
Metabolismo del glutamato	0.022	2	2	SLC1A3,ALDH5A1
Metabolismo de la glicolceramida	0.022	2	2	ALDH5A1,UGCG
Transporte de ácidos biliares	0.022	2	2	AKR1C1,ABCC3
Transporte axónico en mitocondrias	0.022	2	2	UCHL1,NEFL
Desarrollo de células de Purkinje	0.022	2	2	MYH10,RORA
Cadena transportadora de electrones	0.022	2	2	ALDH5A1,SOD2
Homeostasis del oxígeno	0.022	2	2	SOD2,EGLN1
Homeostasis del calcio en el retículo endoplásmico	0.022	2	2	BCL2,WFS1
Proceso de biosíntesis de derivados de pteridina	0.022	2	2	MOCOS,PCBD1
Crecimiento del pelo	0.022	2	2	PTGS2,MREG
Selección positiva de células T en timo	0.022	2	2	ZAP70,DOCK2
Regulación de la permeabilidad de la membrana mitocondrial	0.022	2	2	BCL2,BNIP3
Respuesta a daño en el axón	0.022	2	2	BCL2,SOD2
Diferenciación celular en músculo ventricular cardíaco	0.022	2	2	RXRA,MYH10
Metabolismo del NADP	0.025	5	3	ME1,TPI1,PGD
regulación negativa de la producción de genes implicados en supervivencia	0.025	5	3	BNIP3,HRK,BNIP3L
Replicación del genoma vírico	0.025	5	3	CCL2,BCL2,APOBEC3G
Desarrollo del metaencéfalo	0.025	5	3	MYH10,BCL2,RORA
Selección de células T	0.025	5	3	BCL2,ZAP70,DOCK2
Diferenciación de células pigmentarias	0.025	5	3	BCL2,SOD2,MREG
Metabolismo de cofactores	0.032	22	7	MOCOS,ALDH5A1,SOD2,GGT5,ME1,TPI1,PGD

Término GO	p valor	Tamaño Univ.	Tamaño muestra	Símbolo
Procesos metabólicos del aldehído	0.045	6	3	AKR1B10,KDM3A,TPI1
Biosíntesis del óxido nítrico	0.045	6	3	SOD2,NQO1,RORA
Biosíntesis de eicosanoides	0.046	10	4	PTGS2,MIF,GGT5,PTGS1
Respuesta a defensa vírica	0.046	10	4	BCL2,APOBEC3G,BNIP3,BNIP3L
Respuesta a estímulos hormonales	0.050	39	10	WNT2,TRH,IGF2,BCL2,HCLS1,TIMP3,MGP,ME1,KDM3A,FOXO1

Tabla r4. Análisis funcional de ontología génica (GO) para el cambio en el perfil de expresión génica de las células crecidas al 3%O₂ frente a células crecidas al 21%O₂

En la tabla se muestran aquellas funciones génicas que presentan una mayor alteración significativa cuando las células son crecidas en condiciones de bajo oxígeno y se comparan con células crecidas a concentraciones de oxígeno atmosféricas. Los términos GO están ordenados según su significancia estadística ($p < 0,05$) y se indican los genes del array que están implicados en cada término GO. La casilla gris señala el único proceso biológico relacionado con el control del ciclo celular, supervivencia o apoptosis.

Para validar los resultados de expresión génica, realizamos ensayos de expresión cuantitativa por qRT-PCR mediante el uso de sondas TaqMan comparando las dos condiciones de oxígeno a pases tempranos de cultivo ($p < 5$). Detectamos un aumento significativo en la expresión de varios genes ($p < 0,05$) con valores que oscilan entre 1,5 y 8 veces: Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1 (*PDK1*); subunidad alfa del factor inducible por hipoxia 3, (*HIF3 α*); fosfoglicerato quinasa 1 (*PGK1*); 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (*PFKFB3*); 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 4 (*PFKFB4*); aldolasa C, fructosa-bifosfato (*ALDOC*); triosa fosfato isomerasa 1 (*TPI1*); transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa) (*SLC2A1*); lactato deshidrogenasa A (*LDHA*); factor de crecimiento insulínico 2 (Somatomedina A) (*IGF2*) (**figura r16C**). En resumen, el análisis de expresión génica, la ontología génica y la cuantificación relativa por qRT-PCR revelan que los cultivos al 3%O₂ aumentan fuertemente el metabolismo de carbohidratos, particularmente el metabolismo de la glucosa debido a la sobreexpresión de genes glucolíticos y que está potencialmente mediada por la presencia de HIF1 α .

Para estudiar como la sobreexpresión de los genes glucolíticos generada al 3%O₂ impacta sobre el metabolismo celular, decidimos monitorizar la tasa de consumo de oxígeno (OCR, *Oxygen Consumption Rate*) y la tasa de acidificación del medio (ECAR, *Extra Cellular Acidification Rate*) (medida directa de secreción de ácido láctico al medio y por tanto actividad glucolítica celular) en tres de las líneas de hMSC a ambas condiciones de oxígeno a pase temprano (pase < 5) usando la tecnología no invasiva de "Seahorse™" (www.seahorsebio.com). De este modo, observamos una tendencia de las células cultivadas al 3%O₂ a mantener un menor grado de consumo basal de oxígeno como se aprecia en los primeros cuatro puntos de las gráficas de respiración antes de la adición de oligomicina (inhibidor de la ATP sintasa y por tanto de la respiración mitocondrial) (**figura r17A y r17B**). De forma similar, la capacidad máxima de respiración mitocondrial observada tras la adición de Dinitrofenol (DNP) (desacoplante de la respiración mitocondrial, que permite el flujo libre de protones a través de la membrana mitocondrial) al 3%O₂ tiende a ser menor que al 21%O₂, aunque sin encontrar diferencias significativas entre las dos condiciones (**figura r17A y r17C**). Al medir la actividad glucolítica por acidificación del medio, observamos que las células cultivadas a bajas condiciones de oxígeno mantienen un mayor grado de acidificación del medio y por tanto mayor flujo glucolítico que al 21%O₂, aunque sin encontrar diferencias estadísticamente significativas (**figura r17A y r17D**). Los anteriores datos son contrastados por la mayor acumulación significativa de ácido láctico encontrada en el interior celular de las células crecidas al 3%O₂ (**figura r17E**).

Finalmente, al evaluar el balance del aporte energético entre la energía suministrada por el consumo de oxígeno (OCR, *Oxygen Consumption Rate*) y el metabolismo glucolítico (ECAR, *Extra Cellular Acidification Rate*) (índice OCR/ECAR) en condiciones basales en las dos concentraciones de oxígeno, pudimos confirmar que la relación existente entre OCR y ECAR fue significativamente mayor en hMSC crecidas al 21%O₂, siendo de $2188 \pm 123,89$ pMol/mpH al 21%O₂ y de $1021 \pm 79,72$ pMol/mpH al 3%O₂ ($p = 0,002$) (**figura r18A y r18B**). El conjunto de los datos demuestra, que el principal mecanismo de obtención de energía por parte de las hMSC crecidas a bajas tensiones de oxígeno es a través de la glucólisis a expensas de una reducción de la fosforilación oxidativa respecto a la disponibilidad

energética observada en cultivos con alta concentración de oxígeno (21%O₂), en concordancia con los datos obtenidos por el análisis de la expresión génica.

Dianas de HIF				
Símbolo	Nombre	Veces relativas	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1	3.441	0.001	0.001
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacción de proteínas 3	2.297	0.001	0.001
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	2.178	0.002	0.001
SLC2A1	Transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa)	2.764	0.004	0.002
EGLN1	Egl nueve homólogo 1 (C. elegans)	1.837	0.006	0.003
PLOD1	Procolágeno-lisina 1, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa	1.849	0.009	0.004
BCL2	Célula B CLL/lifoma 2	0.566	0.011	0.005
PLOD2	Procolágeno-lisina 1, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	1.974	0.019	0.009
LDHA	Lactato deshidrogenasa A	1.562	0.019	0.009
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular, tipo 1	1.656	0.021	0.010
ITPR1	Receptor trifosfato inositol 1,4,5 tipo 1	0.696	0.023	0.010
ADRA2C	Receptor adrenérgico, Alfa 2C	0.562	0.027	0.012
TFR2	Receptor de transferrina 2	1.290	0.029	0.013
CA9	Anhidrasa carbónica IX	2.169	0.040	0.018
SERPINE1	Inhibidor de peptidasa serpin, clado E (nexin, activador inhibidor de plasminogeno tipo 1), miembro 1	1.753	0.053	0.024

Tabla r5. Cambios de expresión génica de los genes implicados en el metabolismo de carbohidratos

Tabla resumen de los genes incluidos en las categorías funcionales del GO que presentan una alta significancia estadística ($p < 0,005$) (ver tabla r4) y que están asociados al metabolismo de los carbohidratos. Los genes están ordenados en función de su significancia estadística y se muestra el número de veces relativas que están desregulados al 3%O₂ respecto al 21%O₂.

Metabolismo de carbohidratos				
Símbolo	Nombre	Veces relativas	FDR BH (t)	FDR valor q (t)
PDK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1	3.441	0.001	0.001
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacción de proteínas 3	2.297	0.001	0.001
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	2.178	0.002	0.001
SLC2A1	Transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa)	2.764	0.004	0.002
EGLN1	Egl nueve homólogo 1 (C. elegans)	1.837	0.006	0.003
PLOD1	Procolágeno-lisina 1, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa	1.849	0.009	0.004
BCL2	Célula B CLL/lifoma 2	0.566	0.011	0.005
PLOD2	Procolágeno-lisina 1, 2-oxoglutarato 5-dioxigenasa 2	1.974	0.019	0.009
LDHA	Lactato deshidrogenasa A	1.562	0.019	0.009
VEGFA	Factor de crecimiento endotelial vascular, tipo 1	1.656	0.021	0.01
ITPR1	Receptor trifosfato inositol 1,4,5 tipo 1	0.696	0.023	0.01
ADRA2C	Receptor adrenérgico, Alfa 2C	0.562	0.027	0.012
TFR2	Receptor de transferrina 2	1.29	0.029	0.013
CA9	Anhidrasa carbónica IX	2.169	0.04	0.018
SERPINE1	Inhibidor de peptidasa serpin, clado E (nexin, activador inhibidor de plasminogeno tipo 1), miembro 1	1.753	0.053	0.024

Tabla r6. Cambios de expresión génica de los genes diana de HIF1 α

En la tabla se presentan aquellos genes diana de HIF1 α que poseen una desregulación estadísticamente significativa en el array de expresión de las células crecidas al 3%O₂ respecto a las células crecidas al 21%O₂. Los genes están ordenados en función de su significancia estadística y se muestra el número de veces relativas que están desregulados al 3%O₂ respecto al 21%O₂.

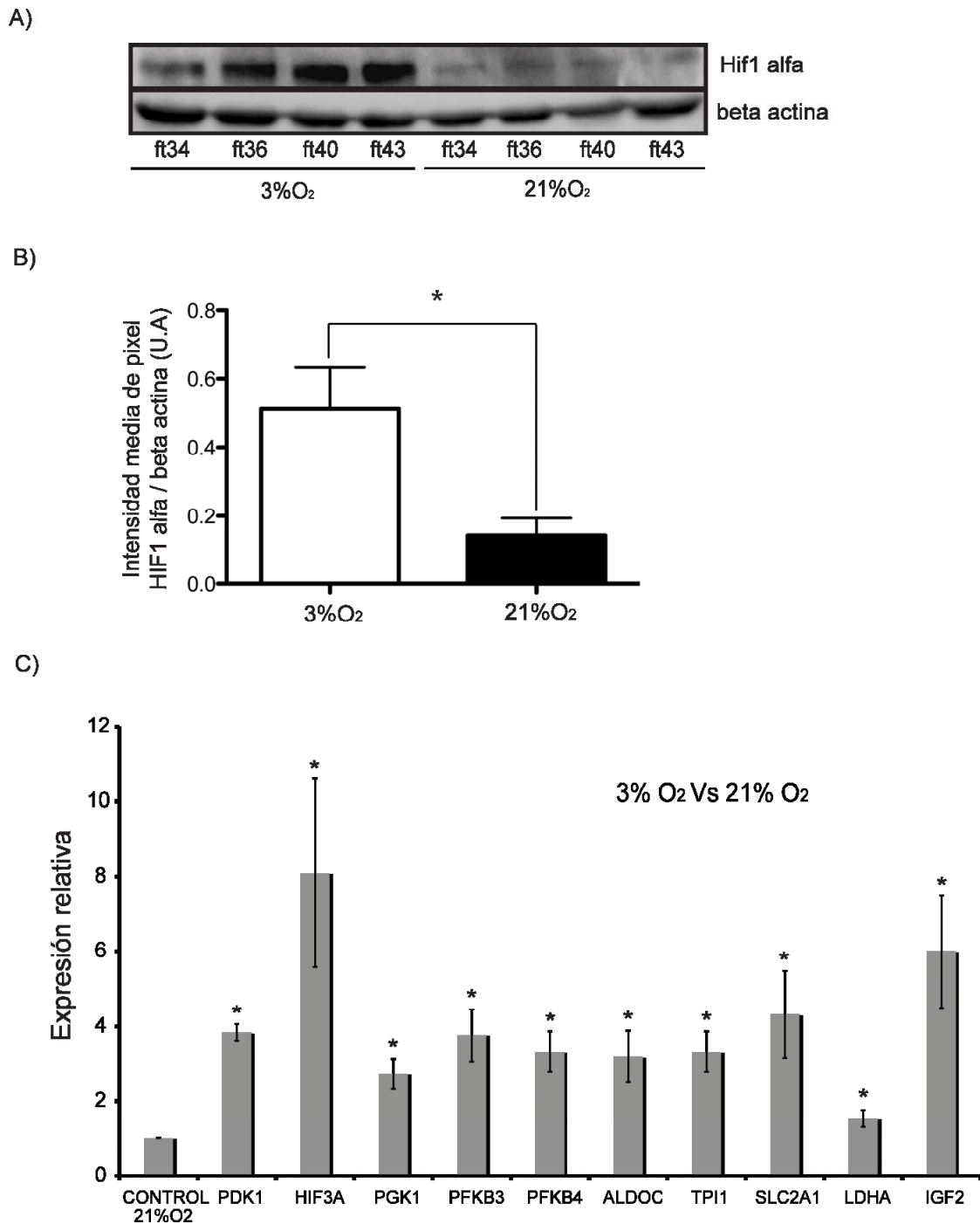


Figura r16. Los cultivos de bajo oxígeno aumentan la estabilidad de HIF1 α y sobreexpresan sus dianas transcripcionales implicadas en glucólisis

A) *Western-blot* para HIF1 α y β -actina (control de carga) realizado en las cuatro líneas independientes de hMSC al 21%O₂ y al 3%O₂ a pase 5 de cultivo B) cuantificación densitométrica del *Western-blot* para HIF1 α , normalizado frente al control de carga. Los datos se muestran en medias \pm SEM. (P* < 0,05; T test pareado) C) análisis de qRT-PCR con sondas TaqMan para la expresión génica de piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1 (PDK1); factor 3 inducible por hipoxia (HIF3 α); fosfoglicerato quinasa 1 (PGK1); 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3); 6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 4 (PFKFB4); aldolasa C, fructosa-bifosfato (ALDOC); triosa fosfato isomerasa 1 (TPI1); transportador soluble de la familia 2 (transportador facilitador de glucosa), miembro 1 (SLC2A1); lactato deshidrogenasa A (LDHA); y factor de crecimiento 2 similar a la insulina (IGF2). Los datos son presentados en número de veces de expresión relativa en las células crecidas al 3%O₂ frente a células crecidas al 21%O₂. Todos lo genes analizados presentan una sobreexpresión significativa al 3%O₂ (P* < 0,05; T test pareado). Los experimentos se realizaron por triplicado en las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos se muestran en medias \pm SEM.

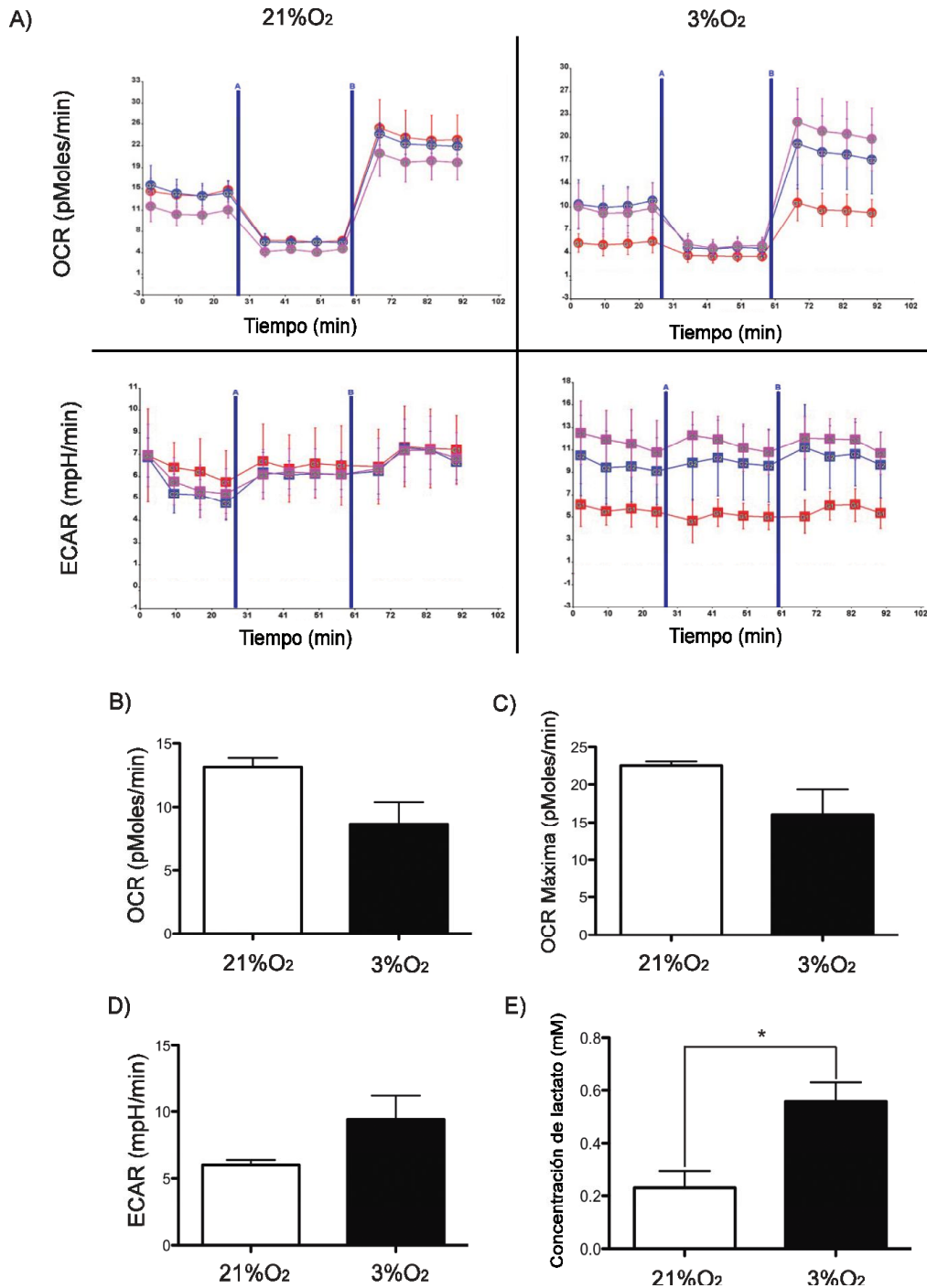


Figura r17. Los cultivos de hMSC crecidos en condiciones de oxígeno más fisiológicas reducen el consumo de oxígeno y promueven la glucólisis

A) Curvas de velocidad de consumo de oxígeno (OCR) y acidificación del medio (ECAR) generadas a partir del analizador FX96 Flux de tecnología Seahorse™ de tres líneas de hMSC independientes expuestas al 3%O₂ y al 21%O₂. La línea A indica el tiempo de adición de oligomicina (inhibidor de la respiración mitocondrial) y la línea B indica el tiempo de adición de DNP (desacoplador de la respiración mitocondrial). Los primeros cuatro puntos representan los niveles basales de la tasa de consumo de oxígeno expresado en (pMol/min) o la tasa de acidificación del medio expresada en (mpH/min). Los experimentos se realizaron con ocho replicas para cada línea y punto en el tiempo; los datos se presentan como medias ± SEM

B) media de la velocidad basal de consumo de oxígeno para las tres líneas de hMSC mostrando disminución del consumo de oxígeno al 3%O₂

C) media de la velocidad máxima de consumo de oxígeno para las tres líneas de hMSC mostrando una tenencia a mantener baja la capacidad máxima de respiración por parte de las células crecidas el 3%O₂

D) media de la velocidad basal de acidificación del medio para las tres líneas de hMSC mostrando aumento en la tasa de acidificación del medio al 3%O₂

E) media de la concentración intracelular de lactato de las tres líneas de hMSC crecidas al 3%O₂ y al 21%O₂ a pases medios de cultivo (18 ± 2 divisiones celulares). La células cultivadas al 3%O₂ presentaron una mayor acumulación de lactato que las células cultivadas al 21%O₂. En todos los casos, los datos se muestran como medias ± SEM (P* < 0,05; T test pareado).

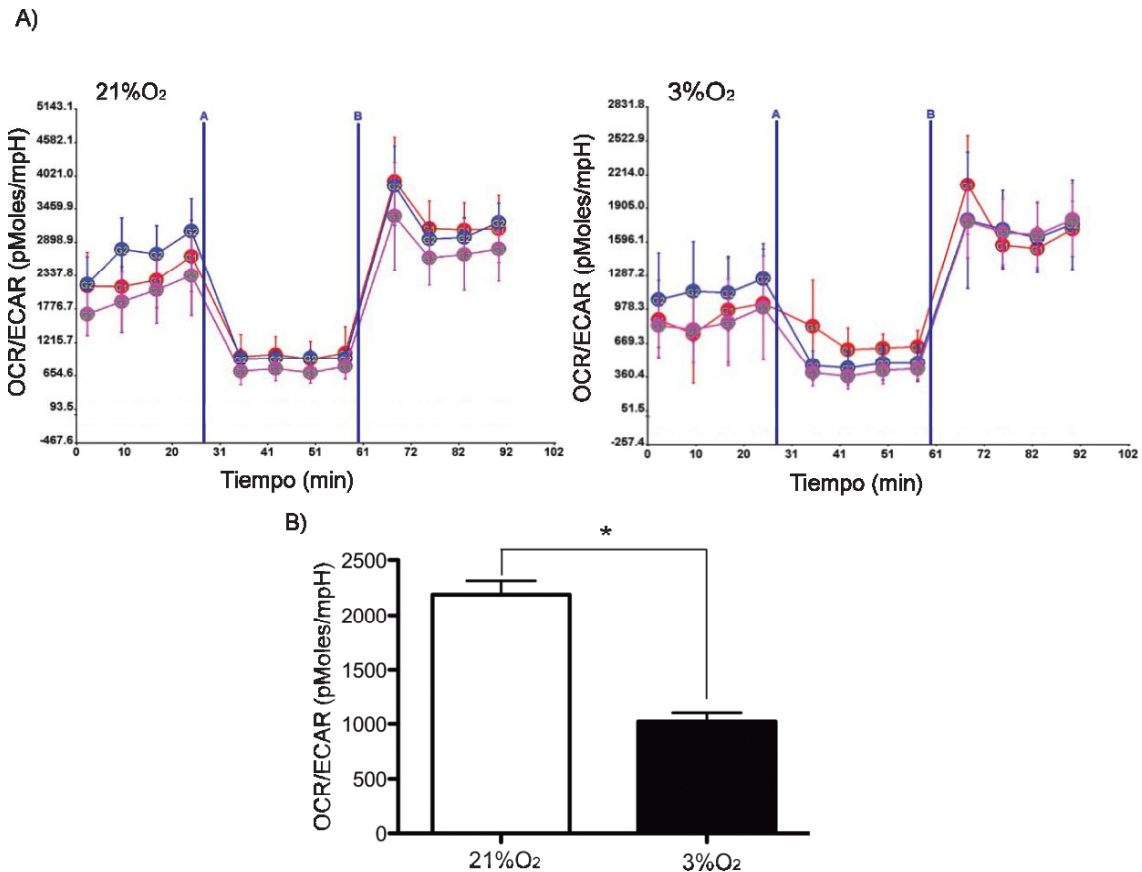


Figura r18. Los cultivos de hMSC crecidos en condiciones de oxígeno más fisiológicas mantienen un balance energético menos oxidativo

A) Curvas de relación entre velocidad de consumo de oxígeno y actividad glucolítica (OCR/ECAR) generadas a partir del analizador FX96 Flux de tecnología *Seahorse™* (ver apartado de materiales y métodos) de tres líneas de hMSC independientes expuestas al 3%O₂ y al 21%O₂. La línea A indica el tiempo de adición de oligomicina (inhibidor de la respiración mitocondrial) y la línea B indica el tiempo de adición de DNP (desacoplador de la respiración mitocondrial). Los experimentos se realizaron con ocho replicas por cada línea y punto en el tiempo y los datos se presentan como medias \pm SEM. Los primeros cuatro puntos de las gráficas indican los niveles basales de la tasa de OCR/ECAR expresado en (pMol/impH) **B)** media de la tasa OCR/ECAR (pMol/impH) para las tres líneas de hMSC crecidas al 3%O₂ y al 21%O₂ mostrando una reducción significativa de la relación OCR/ECAR al 3%O₂ sugiriendo un mayor aporte energético proveniente del metabolismo glucolítico y un menor aporte energético proveniente de la fosforilación oxidativa en los cultivos de hMSC crecidos al 3%O₂. Los experimentos se realizaron por triplicado con las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos muestran las medias \pm SEM ($P^* < 0,05$; T test pareado).

VIII. La aneuploidía como un posible marcador de senescencia

El fenómeno de la senescencia celular ha sido estudiado en gran detalle por una gran variedad de grupos durante mucho tiempo, logrando entender en buena parte los mecanismos subyacentes a ella. Sin embargo, debido a la relevancia que este proceso posee en la expansión celular y la importancia de las células madre como las hMSC en el desarrollo de la terapia celular, es necesario ahondar aún más en el entendimiento de todos los procesos que la inducen o interfieren en su desarrollo con el fin de mejorar las técnicas de cultivo y fomentar el desarrollo de la terapia celular.

8.1 La senescencia celular de las hMSC en cultivo es heterogénea y progresiva

Para caracterizar que efectos produce la senescencia sobre el fenotipo celular, capacidad proliferativa y contenido génico de las hMSC, decidimos comparar perfiles citométricos de ciclo celular realizados mediante tinción con yoduro de propidio (IP) al 21%O₂, comparando células de pase temprano (p5) frente a células de pase tardío (p15) (potencialmente más senescentes). Los análisis de tamaño celular (SSC, *Side Scatter Complexity*) y complejidad celular (FSC, *Forward Scatter*) muestran que las

hMSC tras periodos prolongados de cultivo poseen una población celular mas heterogenea presentando células con mayor tamaño y mayor complejidad respecto a las células con pocas semanas en cultivo (**figura r19A**). Los perfiles citométricos de ciclo celular con IP, indican que las hMSC en senescencia poseen mayores coeficientes de variación en los picos G1 y G2 y una mayor población de células con alto contenido génico (>4n) características comunes de cultivos celulares con gran inestabilidad genética (**figura r19B**).

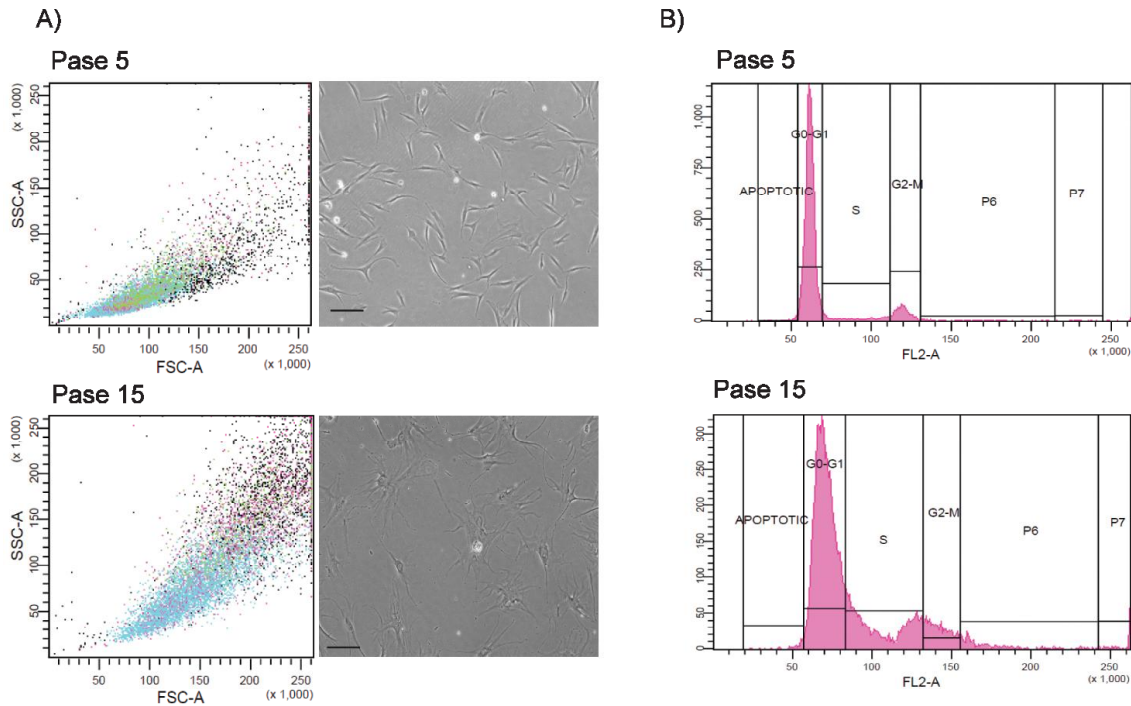


Figura r19. Los cultivos prolongados de hMSC afectan el fenotipo celular y el contenido génico

A) Diagrama de puntos representando el tamaño celular (SSC) y la complejidad celular (FSC) en una línea de hMSC a pase temprano (pase 5) y pase tardío (pase 15) en condiciones estándar de cultivo (21%O₂), a la derecha del diagrama se muestran imágenes representativas de las células cultivadas a pase temprano (pase 5) y pase tardío (pase 15), respectivamente. Barra de escala 50μm. Se observa, que a tiempos prolongados de cultivo aumenta el número de células que poseen mayor tamaño y mayor complejidad **B)** perfil citométrico de ciclo celular mediante tinción nuclear con yoduro de propicio (IP) de una línea de hMSC a pase temprano (pase 5) y pase tardío (pase15). A pases tardíos se incrementa el coeficiente de variación de los picos G1 y G2 y el número de células con un contenido génico superior a 4n. Los experimentos se llevaron a cabo con las cuatro líneas de hMSC (n=4) y se muestran ejemplos representativos para cada condición.

Conociendo la relación existente entre la senescencia, el tamaño celular y el contenido génico puesta de manifiesto por nuestros experimentos y descrito por otros autores (Bayreuther et al., 1988; Epstein, 1967; Iourov et al., 2010; Jacobs et al., 1963), decidimos comprobar si esta población celular de mayor tamaño y complejidad presente en nuestros cultivos conserva mayores características senescentes que el resto de las células. Para ello, cultivamos una línea de hMSC durante siete pases hasta obtener una población celular suficientemente heterogénea respecto a los parámetros de tamaño (SSC) y complejidad (SFC); y mediante el uso de un separador celular seleccionamos dos poblaciones, una de menor tamaño y complejidad (aprox. $\approx 1,0 \times 10^6$ células/muestra seleccionada) y otra de mayor tamaño y complejidad (aprox. $1,0 \times 10^4$ células/muestra seleccionada) que posteriormente mantuvimos en cultivo durante cinco pases a igual densidad (**figura r20A**). Tras la separación de las dos poblaciones evaluamos el potencial proliferativo por monitorización con curvas de crecimiento, la senescencia celular mediante detección de células SA-β-gal positivas, la longitud telomérica en interfase a través de Q-FISH con sondas PNA teloméricas y los niveles de aneuploidía usando las sondas centroméricas específicas para los cromosomas 8, 11 y 17.

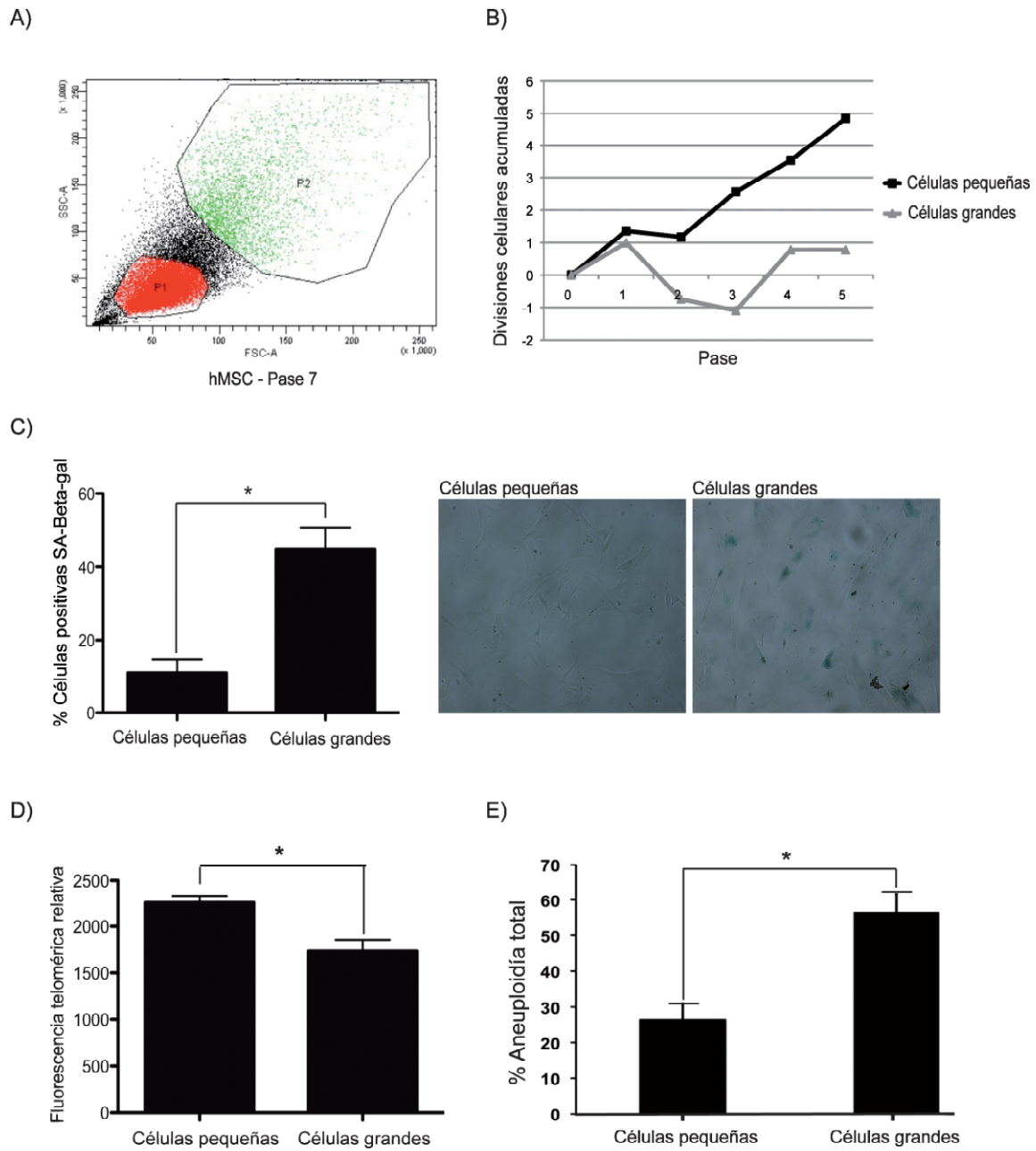


Figura r20. Las hMSC de mayor tamaño y complejidad son potencialmente más senescentes y más inestables genéticamente

A) Diagrama de puntos de las células seleccionadas en función de su tamaño (SSC) y complejidad (FSC) a pase 7 de cultivo donde se indican las áreas seleccionadas para separar cada población celular (P1, menor tamaño (SSC) y complejidad (FSC) y P2, mayor tamaño (SSC) y complejidad (FSC)).

B) Curvas de crecimiento a lo largo de 5 pases en cultivo de las dos poblaciones celulares seleccionadas en función del tamaño y complejidad, mostrando incapacidad de crecimiento continuado de las células de mayor talla y complejidad.

C) Media del porcentaje de células SA-β-gal positivas para las dos poblaciones celulares a pase uno de cultivo después de la separación. La acumulación de células SA-β-gal positivas fue más representativa en la población celular de mayor tamaño y complejidad. Las imágenes de la derecha muestran ejemplos representativos de áreas de cultivo teñidas con x-gal para cada condición.

D) Media de la longitud telomérica relativa de las dos poblaciones mediante Q-FISH en interfase usando sondas PNA teloméricas. La cuantificación se realizó tras la selección celular a pase uno de cultivo, mostrando una menor longitud telomérica media de las células de mayor talla y complejidad.

E) Análisis del porcentaje de células aneuploides para alguno de los cromosomas 8, 11 y 17 a pase dos de cultivo tras la selección celular. Los datos revelan un enriquecimiento significativo del número de células aneuploides totales para los tres marcadores en las células de mayor tamaño. Todos los experimentos se realizaron por triplicado en una de las líneas de hMSC y los datos se muestran como medias \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado).

Las curvas de crecimiento para las dos poblaciones, mostraron que las células de gran tamaño poseen una menor capacidad proliferativa e incapacidad para progresar a lo largo del cultivo (**figura r20B**), esta incapacidad de proliferación fue acompañada por una mayor población de células senescentes SA- β -gal positivas, presentando a su vez una aparente menor longitud telomérica y un alto índice de células aneuploides (**figura r20C, r20D y r20E**). El conjunto de datos demuestra que el mantenimiento celular en cultivo promueve la senescencia celular de modo heterogéneo probablemente afectando a los clones celulares más susceptibles al daño y que éstas células senescentes se acumulan progresivamente con los pases.

8.2 Potenciales biomarcadores de senescencia celular en cultivo

Dadas las implicaciones funcionales que tiene el estudio de la senescencia de las hMSC en cultivo, decidimos intentar elucidar cuales podrían ser los cambios transcripcionales implicados durante la senescencia celular y la posible relación con la inestabilidad genética. De este modo y mediante un array de expresión de genoma completo, comparamos los cambios de expresión génica que ocurren en las hMSC, durante las fases tardías del cultivo (pase 21) respecto a las fases tempranas (pase 2) en los cuatro donantes al 21%O₂. Tras el análisis, pudimos identificar 42 genes diana cuya expresión presentaba una modificada significativa durante la senescencia celular con un valor de significancia ajustada a test múltiple $q \leq 0,05$ (**tabla r7**). Se llevo a cabo un análisis de ontología génica usando los genes más significativos con un valor estadístico $q \leq 0,12$ (96 genes) (**tabla r7**), mediante el uso del programa informático *Ingenuity* (Ingenuity Systems; www.ingenuity.com). El análisis generó más de mil posibles funciones celulares alteradas, englobadas en 54 categorías posibles con un valor $p < 0,05$ que afectaban una gran variedad de procesos, como la regulación del ciclo celular, proliferación, control de la ploidía, muerte celular, quimiotaxis e inflamación, entre otras; todas ellas imprescindibles para mantener la viabilidad celular y la bioseguridad de las células.

Dada la relevancia que ostenta la estabilidad genética para nuestro estudio y en particular el control de la ploidía o la poliploidización, decidimos focalizarnos en el análisis de los genes incluidos en estas funciones y que además poseen una elevada significancia estadística ($p < 0,02$) (**tabla r8**). Dentro de estas funciones, encontramos cuatro genes desregulados, tres de ellos con una sobreexpresión durante la senescencia (Scinderina (SCIN), proteína de anclaje quinasa A9 (AKAP9), y endotelina (EDN1)) y uno de ellos con expresión negativa en la senescencia, el ligando receptor de quimioquina 12 (CXCL12) (**tabla r7**). Para confirmar los datos obtenidos por el array de expresión, cuantificamos la expresión de estos genes implicados en control de la ploidía por PCR cuantitativa mediante ensayo TaqMan, comparando células de pase temprano (p2) con células de pase tardío (p22) en todos los donantes. Así pudimos constatar una sobreexpresión significativa ($p < 0,05$, T-Test pareado) para los genes SCIN, EDN1 y AKAP9 de $10,46 \pm 3,65$, $3,90 \pm 0,72$ y $2,64 \pm 0,39$ veces, respectivamente y una regulación negativa para la expresión del gen CXCL12 de $-3,26 \pm 0,97$ aunque sin significancia estadística ($p=0,09$) en células de pase 22 (**figura r21A**).

Sabiendo que estas proteínas están relacionadas con el control de la ploidía (Guerriero et al., 2001; Keryer et al., 2003; Kim et al., 2005; Nelson et al., 2003; Zunino et al., 2001) y que sus niveles de expresión se encuentran modificados durante la senescencia, decidimos comprobar el efecto del cultivo a bajas concentraciones de oxígeno sobre la desregulación de estos genes. Comparando los niveles de ARNm de células crecidas al 21%O₂ con células crecidas al 3%O₂ a divisiones celulares similares (p5-p8; 17 ± 2 divisiones celulares), encontramos que los niveles de expresión de SCIN, EDN1 y AKAP9 presentan un incremento de expresión de 4 ($p=0,063$), 1,76 ($p=0,018$) y 1,8 ($p=0,043$) veces respectivamente en los cultivos al 21%O₂ y que la expresión de CXCL12 mantiene menores niveles de expresión al 21%O₂ que al 3%O₂ con un valor de -1,28 veces ($p=0,001$) (**figura r21B**). Estos datos sugieren que los cultivos al 3%O₂ podrían estar retrasando la desregulación de estos genes a lo largo de las divisiones celulares en cultivo. Debido a que la sobreexpresión de hTERT en las hMSC induce inmortalización celular, reduce significativamente los niveles de ROS y además disminuye los niveles de aneuploidía en cultivo, quisimos comprobar el efecto de la sobreexpresión de hTERT sobre el perfil de expresión de estos genes desregulados a pase tardío. De este modo confirmamos que la expresión de hTERT revierte el perfil de expresión de los genes implicados en el control de la ploidía durante la senescencia (**figura r21C**).

Los resultados anteriores muestran que la modulación de varios de estos genes correlaciona con la senescencia en cultivo, niveles de estrés oxidativo, actividad telomerasa y aneuploidía cromosómica indicando que estos genes podrían ser nuevos candidatos para ser biomarcadores específicos de estabilidad genética y senescencia celular en hMSC.

Símbolo	Nombre	Veces relativas	FDR valor q
AK126405	cADN FLJ44441 fis, clone UTERU2020242	0.06144	0.00000
CXCL1	Quimioquina (C-X-C motivo) ligando 1 (Estimulador del crecimiento en melanomas, alfa)	0.09130	0.00000
PEAR1	Receptor endotelial 1 de agregación de plaquetas	0.16540	0.00000
HIST1H1B	Grupo de histonas 1, H1b	0.17444	0.00000
BG216229	BG216229 RST35803 atersis librería RAGE Homo sapiens cADN	4.76091	0.00000
TMEM130	Proteína transmembrana	3.74712	0.00000
C1orf92	Marco de lectura abierta 92 del cromosoma 1	0.33217	0.00000
KRTAP1-5	Proteína asociada a queratina 1-5	2.48026	0.00000
FLJ39822	Proteína hipotética FLJ39822	8.90523	0.02950
SYNPO2L	Sinaptopodina 2	3.44588	0.02950
BG542103	602571323F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cADN clon IMAGE:4695748 5'	3.35120	0.02950
RP4-692D3.1	Proteína hipotética LOC728621 (LOC728621)	9.19692	0.02950
SCIN	Scinderina	12.30827	0.02950
ACVR1C	Receptor de activina A, tipo IC	2.94315	0.02950
AK090546	cADN FLJ33227 fis, clon ASTRO2001088	2.38171	0.02950
CD70	CD70	0.09732	0.03688
CXCL12	ARNm para proteína FLJ00404	0.13728	0.03688
SGIP1	Proteína de interacción 1 (SGP1), dominio SH3 similar a GRB2 (endofilina)	3.87213	0.03951
FBXL16	Proteína con 16 residuos ricos en leucina y caja F (FBXL16)	19.18797	0.03951
TTLL7	Tubulina tirosina ligasa 7 (Proteína de desarrollo de testis NYD-SP30)	2.57914	0.03951
LOC441461	Gen hipotético codificado por BC030123, ARNm	3.63509	0.04338
SGIP1	Proteína de interacción 1, con dominio SH3 similar a GRB2 (endofilina)	3.89454	0.04338
DKFZP547L112	ARNm; cADN DKFZp547L112 (clon DKFZp547L112)	5.53903	0.04338
FBXO41	Proteína con motivo caja F 41	3.32792	0.04338
STON1	Estonina 1	3.34887	0.04338
TMEM155	Proteína transmembrana 155	4.12279	0.04338
FRY	Proteína peluda homóloga de Drosophila	2.71585	0.04338
AK001903	cADN FLJ11041 fis, clon PLACE1004405	2.24094	0.04338
DMGDH	Dimetilglicina deshidrogenasa, gen nuclear de codificación de proteína mitocondrial	2.27945	0.04338
EXOC6	Componente 6 del complejo de exocitosis, variante de transcripción 2	2.20574	0.04338
C9orf125	Marco de lectura abierta 125 del cromosoma 9	2.06867	0.04338
EGR2	Proteína de respuesta a crecimiento 2 (homóloga a Krox-20, Drosophila)	0.19656	0.04609
CXCL2	Quimioquina (C-X-C motivo) ligando 2	0.19017	0.04609
GALNT12	UDP-N-acetil-alfa-D-galactosamina:polipéptido N-acetilgalactosaminiltransferasa 12 (GalNAc-T12)	0.35715	0.04609
THC2727302	ALU6_HUMAN (P39193); Subfamilia Alu SP de aviso de contaminación parcial (9%)	0.34618	0.04609
LOC285141	Similar a CG14853-PB	0.22451	0.04609
WHSC1	Proteína candidata 1 del síndrome de Wolf-Hirschhorn (WHSC1), variante de transcripción 1	0.35256	0.04609
C6orf105	Marco de lectura abierta 105 del cromosoma 6	0.40563	0.04609
DGCR8	Región crítica del gen 8 del síndrome	0.43498	0.04609
CXorf57	Marco de lectura abierta 57 del cromosoma X	0.44806	0.04609
CR602569	Longitud completa del clon de cADN CS0DC001YL20 de Neuroblastoma Cot 25-normalizado de Homo sapiens	0.45495	0.04609
HIST2H2AC	Histona perteneciente al grupo de histonas H2ac	0.49847	0.04609
OLFML1	Olfactomedina 1	0.27922	0.05028
PCGF5	Dedo anular 5 del grupo policomb	2.42607	0.05028
MANEAL	Manosidasa, endo-alfa, variante de transcripción 2	2.75872	0.05028
ATRX	Proteína ligada a síndrome de alfa talasemia/retraso mental (homóloga de RAD54, S. cerevisiae) (ATRX), variante de transcripción 1	2.77504	0.05028
STYK1	Serina/treonina/tirosina quinasa 1	3.84266	0.05028
CDA	Citidina deaminasa	4.14992	0.05028
C5orf23	Marco de lectura abierta 23 del cromosoma 5	5.54761	0.05028

Símbolo	Nombre	Veces relativas	FDR valor q
PLCB4	Fosfolipasa C beta 4, variante de transcripción 1	5.58003	0.05028
DKFZP686A01	Proteína hipotética (DKFZP686A01247)	2.61596	0.05028
TUBA4A	Tubulina alfa 4a	2.43547	0.05028
BX111520	BX111520 Soares placenta Nb2HP Homo sapiens cADN clon IMAGp998L15208,	2.14481	0.05028
BAMBI	Inhibidor encuadrado de membrana para BMP y Activina (homólogo de BAMBI, Xenopus laevis)	2.49490	0.05028
LOC728783	Proteína hipotética LOC728783	10.76472	0.05028
NEXN	Nexilina (proteína de unión a actina F)	2.09252	0.05028
CHML	Coroïderemia tipo 2 (proteína 2 escolta de Rab)	2.05838	0.05028
C9orf125	Proteína sin caracterizar C9orf125	2.01613	0.05028
KRTAP1-1	Proteína asociada a queratina 1-1	2.02812	0.05028
AMN1	Proteína perteneciente a la red 1 de procesos antagonistas de la salida de mitosis (S. cerevisiae)	1.63594	0.05028
INA	Proteína intermediaria alfa de filamentos neuronales	1.67648	0.05028
CALD1	Caldesmon 1, variante de transcripción 1	1.73308	0.05028
FLJ23569	cADN: FLJ23569 fis, clon LNG11861	1.78550	0.05028
THC2657938	Q77LW4_9NUCL (Q77LW4) Fgf, parcial (5%)	1.79151	0.05028
EDN1	Endotelina 1	1.89266	0.05028
C3orf23	Marco de lectura abierta 23 del cromosoma 23, variante de transcripción 1	1.91169	0.05028
STAU2	Proteína de unión a ARN, Staufen (homóloga 2 de STAU2 en Drosophila)	1.92488	0.05028
IBRDC2	Proteína de dominio 2 conteniendo IBR	5.92232	0.05344
LOC201229	Proteína hipotética LOC201229	1.58697	0.05344
ITIH5	Inhibidor H5 Inter-alfa (globulina), variante de transcripción 1	0.16884	0.05980
CDCA7	Proteína 7 asociada a división del ciclo celular, variante de transcripción 1	0.17146	0.05980
CLDN11	Claudina 11 (proteína transmembrana de oligodendrocitos)	0.42055	0.05980
LOC91461	Proteína hipotética BC007901 (LOC91461)	0.42061	0.05980
FANK1	Fibronectina tipo III y dominios de repetición de ankirina 1	2.11843	0.05980
REEP2	Accesorio 2 de proteína receptora	2.51215	0.06308
THAP2	Proteína 2 asociada a apoptosis conteniendo el dominio THAP	2.40176	0.06308
CXCL2	Quimioquina (C-X-C motif) ligando 2	0.21181	0.11107
ABI3BP	cADN: FLJ21551 fis, clon COL06266	0.36997	0.11107
CLDN11	Claudina 11 (proteína transmembrana de oligodendrocitos)	0.46275	0.11107
LMOD1	Leiomodina 1 (músculo liso) (LMOD1)	3.30487	0.11107
KBTBD3	Dominio 3 de repeticiones kelch y BTB (POZ), variante de transcripción 2	2.65074	0.11107
ANKRD15	Dominio 15 de repeticiones ankirina (ANKRD15), variante de transcripción 2	1.60689	0.11107
AK026459	cADN: FLJ22806 fis, clon KAIA2845	1.87246	0.11107
VPS13A	Proteína vacuolar de selección 13, variante de transcripción A (homóloga de VPS13A en S. cerevisiae)	1.92798	0.11107
CYBRD1	Citocromo b reductasa 1 (CYBRD1)	1.98528	0.11107
BATF2	Factor de transcripción con cremallera de residuos básicos de leucina, ATF-tipo 2	0.23247	0.11499
G0S2	Interruptor G0/G1 2 (G0S2)	0.30523	0.11499
HSD17B6	Hidroxiesteroide (17-beta) deshidrogenasa 6 (homólogo de ratón HSD17B6)	3.94771	0.11499
AKAP9	Proteína de anclaje quinasa A (PRKA) (yotiao) 9 (AKAP9), variante de transcripción 1	2.35947	0.11499
DYNLT3	Cadena ligera de la dineína tipo 3 (Tctex)	2.22825	0.11499
ERGIC2	Proteína del retículo endoplasmático-golgi del compartimento 2 [Source:Uniprot/SWISSPROT;Acc:Q96RQ1]	1.70246	0.11499
FAM82A	ARNm desconocido	1.75436	0.11499
SLC1A1	Transportados de solutos de la familia 1 (transportador de alta afinidad de glutamato, neuronal/epitelial)	1.79960	0.11499
SCAMP1	Proteína transportadora de secreción 1	2.02674	0.11499
DBT	Transacilasa dihidrolipoamida de cadena ramificada E2; proteína mitocondrial codificada por gen nuclear	1.52564	0.11499

Tabla r7. Cambio en el perfil de expresión génica comparando hMSC de pase tardío (pase 21) frente a hMSC de pase temprano (pase 2) al 21%O₂

Listado de genes presentes en el cambio de expresión génica ocurrido a pases tardíos de cultivo, ordenados en función de su significancia estadística y con un valor de significancia FDR $q < 0,12$. En la tabla, se indican las veces relativas de desregulación que presenta cada uno de los genes a pases tardíos de cultivo frente a pases tempranos. Las casillas grises señalan los genes implicados en las funciones de control de la ploidía o poliploidización.

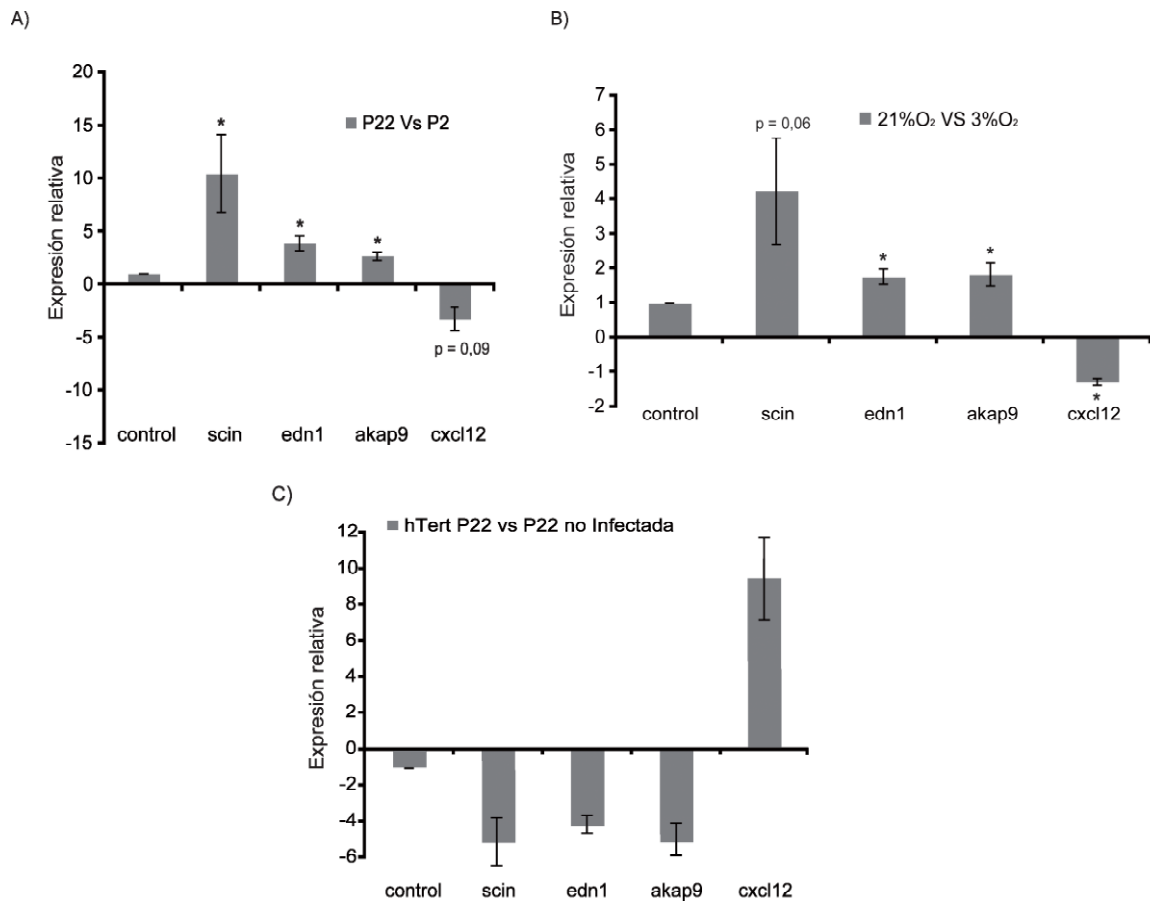


Figura r21. Desregulación de genes que controlan la ploidía en la senescencia

A) Cuantificación relativa de los cambios en la expresión génica mediante qRT-PCR (ensayo TaqMan) de los genes relacionados con el control de la ploidía (SCIN, EDN1, AKAP9 y CXCL12) comparando células senescentes (pase 22) con células de pase temprano (pase 2). Los experimentos se realizaron por triplicado con las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos se muestran en medias \pm SEM ($P^* < 0,05$; T test pareado) **B)** cuantificación relativa de los cambios de expresión génica de los genes implicados en el control de la ploidía comparando células crecidas al 21%O₂ con células crecidas al 3%O₂ a pases medios de cultivo (18 ± 2 divisiones celulares). Los experimentos se realizaron por triplicado con las cuatro líneas independientes de hMSC y los datos muestran las medias \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado) **C)** cuantificación relativa de los cambios de expresión génica de los genes implicados en control de la ploidía comparando células senescentes y células transducidas con hTERT a pase 22 mostrando una reversión del patrón de expresión en células inmortalizadas. Los experimentos se realizaron por triplicado con las dos líneas transducidas y sin transducir. Los resultados se muestran como medias \pm SEM.

Categoría	Función	Función de anotación	valor P	Moléculas
Ciclo celular	Ploidía	ploidía de células	0.00031	AKAP9, CXCL12, EDN1
Ciclo celular	Ploidía	ploidía	0.000368	AKAP9, CXCL12, EDN1
Ciclo celular	poliploidización	poliploidización de líneas celulares de leucemias	0.00388	SCIN
Ciclo celular	Ploidía	ploidía de células eucariotas	0.00643	AKAP9, CXCL12
Ciclo celular	Ploidía	ploidía de líneas celulares de cáncer cervical	0.0116	AKAP9
Ciclo celular	poliploidización	poliploidización de líneas celulares tumorales	0.0154	SCIN
Ciclo celular	Ploidía	ploidía de megacariocitos	0.0192	CXCL12

Tabla r8. Genes implicados en las funciones de ploidía y poliploidización

Análisis funcional de ontología génica en el que se muestran las funciones génicas relacionadas con el control de la ploidía y la poliploidización y que presentan una alteración significativa ($p < 0,02$). En la tabla también se indican los genes que están incluidos en cada una de las funciones desreguladas

8.2.1 Presencia de aneuploidía recurrente para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 en los cultivos de hMSC crecidos al 21%O₂

Dada la incrementada presencia de células aneuploides durante los cultivos en ambas condiciones de oxígeno a lo largo de los pases, nos planteamos realizar un análisis citogenético más detallado detectando variaciones génicas en número de copia a lo largo de todo el genoma mediante un array de Hibridación genómica comparada (CGH, *Comparative Genomic Hybridization*) (Kallioniemi et al., 1992; Pollack et al., 1999). Esta técnica nos permite elucidar con una gran precisión y significancia estadística la existencia de pérdidas o ganancias de regiones génicas de un tamaño cercano a 250kpb. Se analizaron las 4 líneas independientes de hMSC a pase tardío (pase >18) en las dos condiciones de oxígeno junto con las líneas inmortalizadas hTERT (34Tert y 40Tert). Los resultados mostraron un aumento en el contenido génico de todo el cromosoma 10 para las líneas ft34-21%O₂, ft34 hTERT-21%O₂ y ft40 hTERT-21%O₂ y un aumento en el contenido génico del brazo corto (q) del cromosoma 20 para las líneas ft34-21%O₂ y ft34 hTERT-21%O₂ (**figura r22A y r22B**). Decidimos corroborar estas amplificaciones en todas las líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ a pases tardíos del cultivo (pase >15) mediante la realización de FISH en interfase usando una sonda alfa satélite - CEP específica para la región centromérica del cromosoma 10 y del brazo corto (q) del cromosoma 20. Sorprendentemente, encontramos que un alto porcentaje de células crecidas en estas condiciones de oxígeno y que han sufrido periodos prolongados de expansión *in vitro* presentan copias extras para estas regiones cromosómicas en todas las líneas analizadas, llegando a alcanzar niveles superiores al 80% de aneuploidía para el cromosoma 10 y 70% para el brazo corto (q) del cromosoma 20 en algunas de las líneas (**figura r23A – r23C**); todo esto teniendo en cuenta que los valores de aneuploidía para los otros tres cromosomas analizados (cromosoma 8, cromosoma 11 y cromosoma 17) son inferiores a un 30% en células de pase tardío (valor p<0,002) (**figura 23A y tabla r2**).

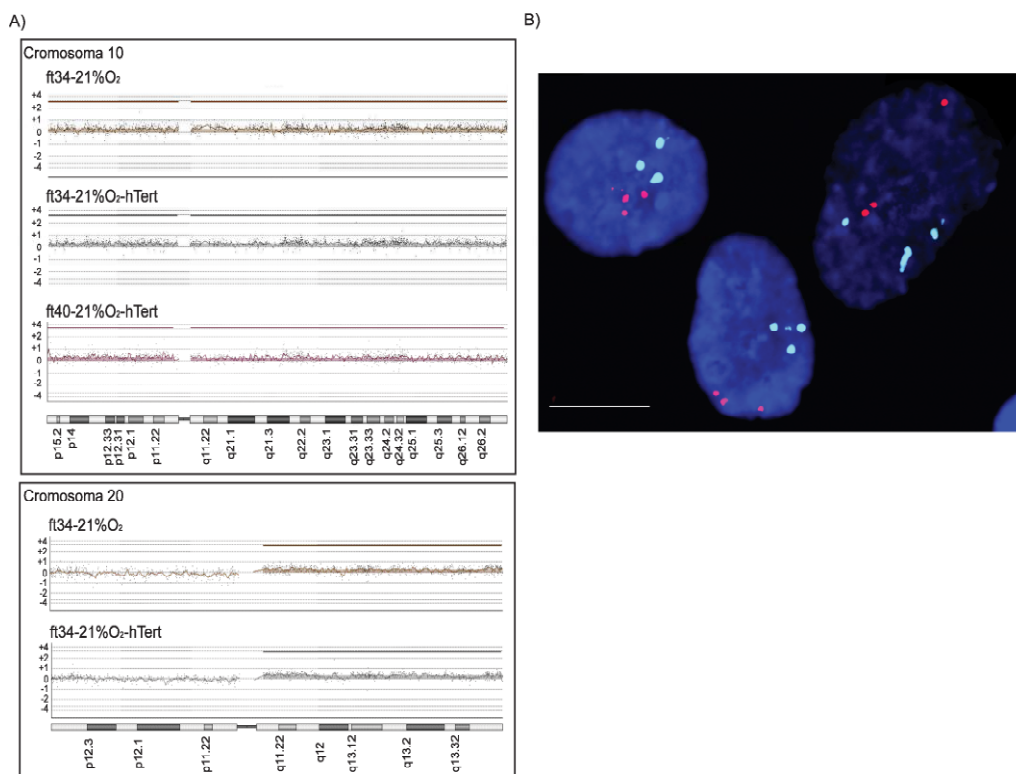


Figura r22. Los cultivos de hMSC crecidos por largos periodos de tiempo al 21%O₂ presentan amplificaciones del Cromosoma 10 y del brazo corto (q) del cromosoma 20

A) Imágenes del estudio del análisis comparativo de genoma completo (CGH) de hMSC de pase corto frente a hMSC de pase largo, revelando una amplificación de todo el cromosoma 10 para las líneas ft34-21%O₂, ft34-21%O₂ hTERT y ft40-21%O₂ hTERT y una amplificación del brazo corto (q) del cromosoma 20 para las líneas ft34-21%O₂, ft34-21%O₂ hTERT a tiempos prolongados de cultivo (pase 22). El área coloreada sobre la línea basal en 0, ejemplifica el incremento en el contenido génico **B)** imagen representativa del FISH para la región centromérica del cromosoma 10 (azul) y el brazo corto (q) del cromosoma 20 (rojo) en los cultivos de hMSC a pase 20, mostrando una clara triploidía para estas dos regiones cromosómicas. Barra de escala, 10µm.

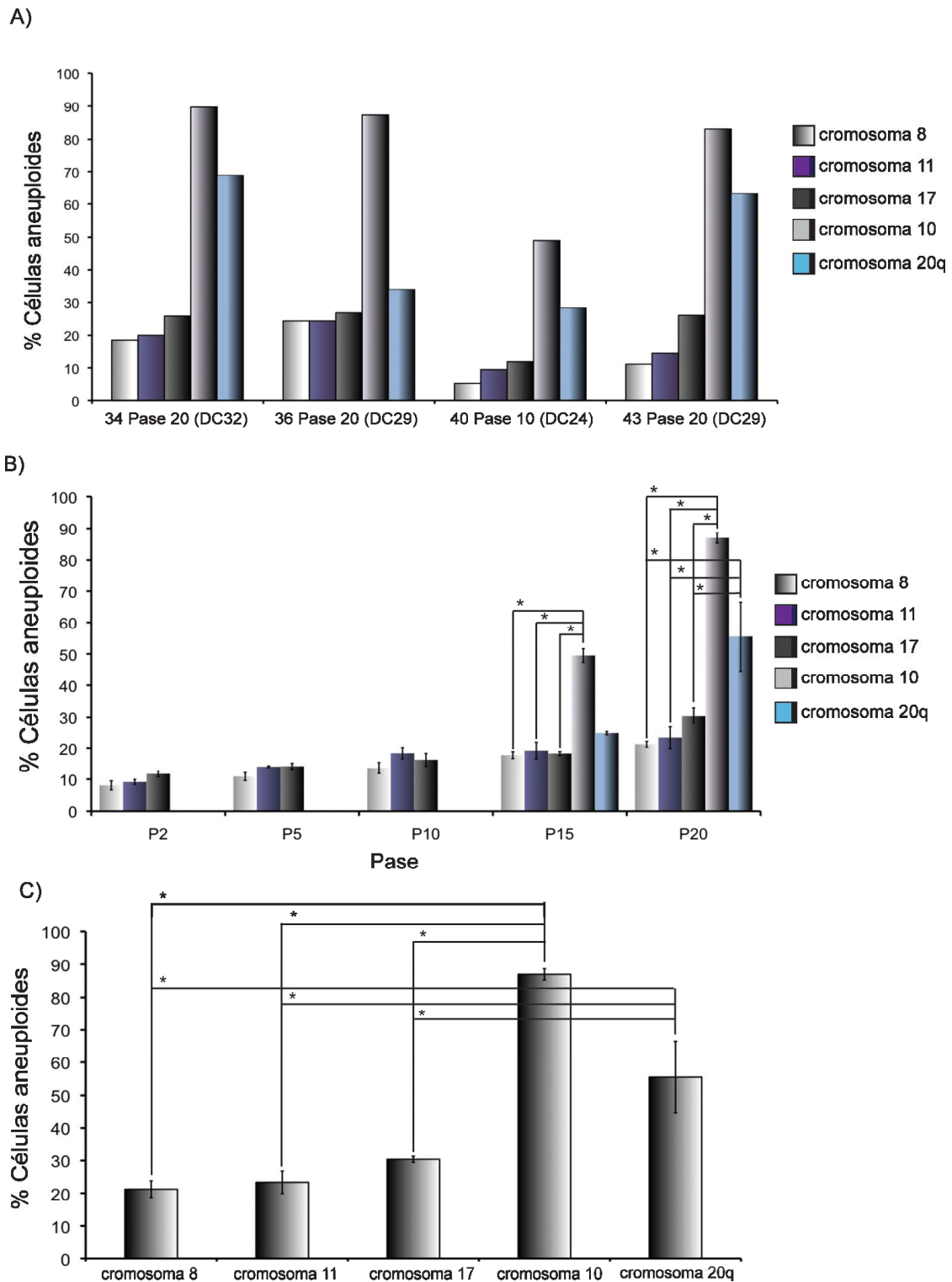


Figura r23. Los cultivos prolongados al 21%O₂ poseen de forma recurrente amplificaciones para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20

A) Porcentaje de células aneuploides en interfase para los cromosomas 8, 11, 17, 10 y brazo corto (q) del cromosoma 20 en cada una de las hMSC crecidas al 21%O₂ a pase 15 de cultivo. Se aprecia una fuerte representación de la aneuploidía para las sondas del cromosoma 10 y 20q respecto a los otros tres cromosomas **B)** Porcentaje medio de células aneuploides en interfase de las cuatro líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ para los cromosomas 8, 11, 17 desde el pase 2 hasta el pase 20 y para los cromosomas 10 y brazo corto (q) del cromosoma 20 a pase 15 y 20 de cultivo. Los resultados se muestran como medias \pm SEM. ($P^* < 0,05$; T test pareado) **C)** Porcentaje medio de células aneuploides a pase 20 de cultivo para las cuatro líneas hMSC crecidas al 21%O₂, mostrando los niveles de aneuploidía para los cromosomas 8, 11, 17, 10 y brazo corto (q) del cromosoma 20. Los datos revelan un aumento significativo de la presencia de células aneuploides para los cromosomas 10 y 20q respecto a los otros cromosomas analizados. Los datos se muestran como medias \pm SEM ($P^* < 0,05$; T test pareado).

Con objeto de descartar cualquier suceso de contaminación cruzada entre las líneas cultivadas por largos periodos de tiempo, decidimos validar la pureza de cada una de las líneas independientes a pases tardíos a ambas presiones de oxígeno y transducidas con hTERT. Para este fin, se realizó un experimento de huella genética (*fingerprinting*) usando nueve marcadores de polimorfismos de nucleótidos simples (SNP, *Single nucleotide Polymorphism*) con un amplio rango de heterocigocidad, el cual nos permite validar la identidad genética de cada una de las líneas por separado. Se obtuvieron muestras de ADN genómico de tres de las líneas a pase inicial de cultivo y se estableció el patrón específico de polimorfismos de los nueve marcadores en cada línea. De modo similar, se estableció el patrón de expresión para los mismos marcadores en las células transducidas y sin transducir expuestas a periodos prolongados de cultivo en ambas condiciones de oxígeno. El análisis confirmó que ninguna de las líneas analizadas poseía alteraciones en la homocigosis o heterocigosis de los marcadores y que el perfil polimórfico de cada una de las líneas a pases tardíos coincidía con su respectivo control de pase inicial (**Tabla r9**).

	GC03	V046	V051	V056	V063	V072	V078	V085	V089
ft34-21%p3	Indeterminado	Indeterminado	GFP Heterocigoto	Indeterminado	Indeterminado	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft34-21%p20	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	Indeterminado	FAM Heterocigoto	Indeterminado	VIC Homocigoto
ft34-3%p10	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft34hTERT p20 21%O ₂	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
Perfil genético ft34	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft36_21%p3	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	Indeterminado	VIC Homocigoto
ft36_21%p20	Indeterminado	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	Indeterminado	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft36_3%p10	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
Perfil genético ft36	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	FAM Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft40-21%p3	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto	VIC Homocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft40-21%P12	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto	VIC Homocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft40-3%p10	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto	VIC Homocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto
ft40TERT p20 21%O ₂	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto	VIC Homocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto
Perfil genético ft40	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto	VIC Homocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	GFP Heterocigoto	FAM Heterocigoto	VIC Homocigoto

Tabla r9. Perfil polimórfico de nucleótidos para diferentes líneas de hMSC crecidas al 20%O₂, 3%O₂ y transducidas con hTERT

Representación gráfica del perfil polimórfico de nueve polimorfismos de un solo nucleótido (GC03, V046, V051, V056, V063, V072, V078, V085 y V090) para tres de las cuatro líneas de hMSC (FT34, FT36 y FT40) crecidas durante tiempos prolongados de cultivo al 21%O₂ y al 3%O₂ y transducidas con hTERT. Para descartar la homocigosis o heterocigosis en cada polimorfismo, el ensayo se realizó mediante tres fluorocromos distintos (VIC, FAM y GFP). Los resultados confirman que cada línea posee un perfil polimórfico característico y que a pases tardíos de cultivo no se han producido eventos de contaminación cruzada entre líneas.

En base a estas observaciones, podemos concluir que las mutaciones recurrentes observadas en el cambio del número de copia para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 se generaron de forma independiente en los cultivos de mesenquimales crecidos en estas condiciones y que además estos dos tipos de alteraciones podrían estar asociados al desarrollo de la senescencia de las hMSC en cultivo. Por otro lado, en base a los anteriores datos podemos suponer que alteraciones en el número de copia de estas dos regiones cromosómicas están proporcionando de algún modo una ventaja adaptativa que permite la acumulación de estas células en las condiciones de cultivo estándar (21%O₂).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

I. La terapia celular y la problemática de la expansión celular *in vitro*

El desarrollo de terapias mediante el uso de células ha crecido enormemente durante los últimos años. Dadas las propiedades regenerativas que ostentan las células madre, tanto embrionarias como adultas, estas se han convertido en la herramienta más utilizada en el campo de la terapia celular para el tratamiento de diferentes patologías. Sin embargo, debido a las consideraciones éticas, legales y de bioseguridad que conlleva el empleo de células madre embrionarias en la clínica, el uso de células madre adultas se ha visto incrementado vertiginosamente en los últimos años. En este contexto, el uso de hMSC en particular, se ha establecido como una de las herramientas fundamentales en los esquemas terapéuticos debido en parte a su presencia en una gran variedad de tejidos y a que ostentan procesos metodológicamente sencillos de aislamiento, manipulación y expansión (revisado en (Bianco et al., 2008)). Es de destacar, que las hMSC derivadas de tejido adiposo han demostrado poseer ciertas ventajas respecto a sus homologas pertenecientes a otra fuentes tisulares ya que además de estar enriquecidas ampliamente en el tejido, son potencialmente más accesibles y su procedimiento de extracción presenta una mayor reproducibilidad (Zuk et al., 2001).

Una de las problemáticas centrales a las que se enfrenta el uso de células madre en medicina regenerativa, atiende al periodo de expansión *in vitro*, el cual es necesario para llevar a cabo la mayoría de intervenciones terapéuticas aplicadas hoy en día en terapia celular. Como se ha mencionado en el apartado de introducción, para poder seleccionar y purificar un extracto de hMSC procedente de cualquiera de las fuentes tisulares actualmente conocidas, es necesario realizar procedimientos artificiales como la siembra en placas, ya que este es uno de los criterios inherentes a su definición (Dominici et al., 2006) y la expansión celular *in vitro* que es indispensable para alcanzar el número celular necesario para realizar el trasplante (www.clinicaltrials.gov). Las condiciones estándar de cultivo implementadas en la actualidad, han demostrado ser ciertamente estresantes para las células, por lo que surgen una serie de interrogantes acerca de la bioseguridad y la aplicabilidad de estas técnicas.

Resulta evidente que todas las condiciones de expansión deberían realizarse intentando emular el entorno natural de la célula. Sin embargo, en la mayoría de salas blancas de producción celular las condiciones estándar de cultivo no se asemejan a las condiciones naturales de la célula y por tanto no son las más apropiadas para conservar el normal potencial proliferativo y multipotencial que las células madre adultas poseen. El impedimento actual para expandir las células en condiciones óptimas, deriva esencialmente de la imposibilidad metodológica que representa la simulación *in vitro* de las condiciones naturales de la célula, debido en parte a la carencia de conocimiento respecto a la totalidad de factores solubles y no solubles que intervienen en el desarrollo y fisiología celular, de su interacción con otros tipos celulares o la disposición espacial que estas presentan en sus nichos naturales (Shay & Wright, 2007; Wright & Shay, 2002). Por otra parte, a pesar de existir los conocimientos y herramientas necesarias para mejorar en algunos aspectos los protocolos de expansión, la mayoría de laboratorios continúan utilizando prácticas de cultivo tradicionales, en parte por la indiferencia de los propios investigadores y probablemente por el esfuerzo y costo añadido que conlleva el cambio de una práctica metodológica habitual (Shay & Wright, 2007).

Uno de los parámetros potencialmente modificables que ha demostrado mejoras en la calidad de las células en cultivo, es el control de la concentración de oxígeno en los incubadores. Nosotros y otros autores hemos demostrado que disminuyendo la concentración de oxígeno en los cultivos hasta una tensión de oxígeno más próxima a la fisiológica, es posible mejorar el rendimiento y la eficacia de la producción celular, además de otros parámetros que discutiremos más adelante (Estrada et al., 2011; Fehrer et al., 2007; Grayson et al., 2007; Li et al., 2011). A día de hoy, regular la tensión de oxígeno en los incubadores es económica y metodológicamente factible (Shay & Wright, 2007; Wright & Shay, 2006); sin embargo, la regulación de la tensión de oxígeno a lo largo de todo el procedimiento de manipulación (procesamientos fuera del incubador); resulta costosa y técnicamente compleja, ya que este tipo de tecnología se encuentra todavía en fases iniciales de desarrollo (véase por ejemplo (<http://www.biospherix.com/cell-culture-equipment/hypoxia.html>)). El adelanto en este tipo de

metodologías como en la de otras técnicas que permitan simular de un modo más preciso las condiciones naturales de las células *in vitro*, serán una de las claves necesarias para poder implementar de una manera más eficiente y biosegura la terapia celular en un futuro en la regeneración de tejidos (discutido en (Ahrlund-Richter et al., 2009; Goldring et al.)).

De cara a la terapia celular, la manipulación celular *ex vivo* debe ser rigurosamente controlada y las condiciones de cultivo además de estar completamente definidas y caracterizadas, deben asegurar la calidad y bioseguridad del producto (Halme & Kessler, 2006). En base a estas y las anteriores consideraciones, creemos que la expansión celular *in vitro* a tensiones de oxígeno fisiológicas podría ser incluida dentro de los criterios necesarios para la producción celular definidos dentro de los “buenos procedimientos de producción” (GMP, *Good Manufacturing Practice*) y que por tanto deberían ser evaluados rigurosamente por las agencias reguladoras competentes como la FDA (*Food and Drug Administrations*) o el CDER (*Center for Drug Evaluation and Research*) en Estados Unidos y el EMEA (*European Medicines Agency*) o el CAT (*Committee for Advanced Therapies*) en la unión europea.

En líneas generales, los estudios con hMSC han reportado considerables beneficios clínicos para el paciente y no han manifestado poseer riesgos para la salud de los individuos tras el trasplante. Sin embargo, a pesar de estos avances aún quedan numerosos aspectos por desentrañar en lo que respecta al aislamiento, caracterización y definición como tal, a su capacidad multi o pluripotencial y a su relación con el entorno y de cómo afecta este a su biología. En este sentido, ahondar en el estudio de las hMSC en el contexto de nichos particulares teniendo en cuenta las variaciones observadas según la fuente de obtención, microambiente donde se desarrollan y función biológica *in vivo*, permitirá optimizar y estandarizar mejor los protocolos de aislamiento y expansión de las diferentes fuentes de hMSC, para que de esta manera se puedan aprovechar más eficientemente las propiedades regenerativas que estos tipos celulares poseen.

II. La regulación de la tensión de oxígeno en el cultivo es crucial para el mantenimiento de la homeostasis del metabolismo, la producción de ROS y el control de la estabilidad genética

Es previsible entender que las células de mamífero hayan optado por una estrategia evolutiva de adaptación metabólica a concentraciones de oxígeno relativamente bajas, que por supuesto se ajustan a las concentraciones encontradas en la mayoría de los tejidos *in vivo* (1-12%O₂; normoxia). Estos niveles de oxígeno, están condicionados por un complejo sistema respiratorio y circulatorio que asegura el adecuado abastecimiento de oxígeno a los tejidos, manteniéndolo en un rango estrecho que optimiza el balance entre el suministro y la demanda, acorde con la actividad energética de cada tejido (revisado en (Das, 2006)). Metodológicamente es difícil establecer la concentración de oxígeno a nivel celular, sin embargo muchos investigadores han logrado estimar mediante diferentes técnicas las posibles concentraciones de oxígeno encontradas en los microambientes o nichos celulares, en muchos casos delimitándolos por debajo del 1%O₂ como es el caso de algunas zonas de la médula ósea o el cerebro (revisado en (Ivanovic, 2009; Mohyeldin et al., 2010)). Estos valores por lo tanto no serían tóxicos para las células y nos llevarían a un replanteamiento de los valores de oxígeno asociados tradicionalmente a los términos de hipoxia (<2%O₂), normoxia (21%O₂) e hiperoxia (>21%O₂), en donde cada uno de estos términos sería específico para cada tipo celular correspondiente. En base a estas observaciones, la presión de oxígeno atmosférica (21%O₂) sería por tanto una condición de oxígeno bastante elevada para el mantenimiento del balance energético natural de la célula, pudiendo generar cierta toxicidad celular (Papandreou et al., 2005; Toussaint et al., 2011). Aparte de las consideraciones semánticas, sugerimos que el mantenimiento de los cultivos celulares primarios debería realizarse a concentraciones de oxígeno próximas a las condiciones fisiológicas específicas de cada tipo celular dependiendo de su origen tisular. Así por ejemplo, si consideramos el caso de los cultivos de hMSC derivadas de tejido adiposo, el mantenimiento celular debería realizarse en un rango de tensión de oxígeno que oscile entre un 2%O₂ y un 8%O₂ (**Figura i6; apartado de introducción**) (revisado en (Mohyeldin et al., 2010)).

En este trabajo, demostramos que los cultivos de hMSC procedentes de tejido adiposo, mantienen una mayor capacidad proliferativa cuando son cultivadas a concentraciones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O₂). Estos datos, corroboran los resultados obtenidos por diversos grupo

de investigación que aprecian fenómenos similares mediante el uso de otros tipos celulares primarios de mamífero cultivados a tensiones de oxígeno semejantes (Carswell et al., 2000; Falanga & Kirsner, 1993; Fehrer et al., 2007; Forsyth et al., 2006; Grayson et al., 2007; Li et al.; Packer & Fuehr, 1977; Parrinello et al., 2003; Poullos et al., 2007). Las gráficas modelo de las curvas de crecimiento en los cultivos de hMSC, reflejan que a tiempos cortos de cultivo (cinco semanas) podemos llegar a obtener hasta 50 veces más de células al 3%O₂ que al 21%O₂, lo que a efectos prácticos se traduce en una reducción notable del tiempo de expansión aumentando considerablemente la eficiencia de la terapia. Además de este efecto favorable en la velocidad de replicación, evidenciamos también que el crecimiento celular al 3%O₂ reduce considerablemente la aparición de células senescentes a pases medios de cultivo y que el número total de divisiones celulares acumulables que pueden alcanzar las hMSC en esta condición, es significativamente mayor (**figura r2A y r3; apartado de resultados**). Estos datos revelan que la presencia de oxígeno en los cultivos influye decisivamente sobre la proliferación celular y la aparición del fenotipo senescente en cultivo y que las condiciones de oxígeno hiperóxicas (21%O₂) son perjudiciales para la integridad de la célula.

2.1 La estabilidad de HIF mantiene el metabolismo celular y reduce el estrés oxidativo

El oxígeno por sí mismo es un elemento inocuo para los sistemas biológicos que lo emplean como fuente principal de energía. Por el contrario, las especies reactivas del oxígeno derivadas de su metabolismo son considerablemente tóxicas y promueven el daño celular a distintos niveles. En este contexto, proponemos al estrés oxidativo como esencial mediador entre el desencadenamiento de la senescencia prematura y el mantenimiento celular a concentraciones de oxígeno suprafisiológicas (21%O₂).

Nuestros resultados revelan que los cultivos de hMSC desarrollados a concentraciones de oxígeno suprafisiológica, producen un cambio en el balance de obtención energético que favorece una mayor disposición de energía proveniente del metabolismo de la fosforilación oxidativa y una menor disposición energética proveniente del metabolismo glucolítico. Este hecho se ve reflejado en nuestros experimentos de bioenergética celular (*Seahorse*) y detección de lactato, que confirman un elevado consumo de oxígeno y una reducida producción de lactato en las líneas de hMSC mantenidas al 21%O₂. Comprobamos que este cambio en el metabolismo puede estar mediado al menos por uno de los mecanismos de sensibilización a oxígeno del que disponen las células y que es dependiente del factor de inducción de hipoxia HIF1 α . Como muestran nuestros datos de expresión génica y el análisis de ontología génica (GO) para los cultivos desarrollados a diferentes presiones parciales de oxígeno, acreditamos que el cultivo celular al 3%O₂ causa un cambio en el perfil de expresión transcripcional que se asocia principalmente a un aumento de genes y funciones celulares que están implicadas en el metabolismo anaeróbico de la glucosa. El hecho de que HIF1 α esté detrás de este cambio transcripcional, es soportado en primer lugar por su conocida y bien documentada relación con el metabolismo y la expresión de genes glucolíticos que permiten la adaptación de las células a condiciones de bajo oxígeno (Kim et al., 2006; Lum et al., 2007; Seagroves et al., 2001); en segundo lugar, porque en nuestro modelo celular confirmamos que la expresión de HIF1 α se mantiene notablemente más estable al 3%O₂ que al 21%O₂ y en tercer lugar, porque constatamos que 12 de los genes detectados en el perfil de expresión génica implicados en el cambio metabólico son a su vez dianas transcripcionales directas de HIF1 α (Schofield & Ratcliffe, 2004).

Desde el planteamiento de la teoría del envejecimiento descrita por Harman hace más de 50 años, en la que se propone a las especies reactivas del oxígeno como uno de los principales desencadenantes del envejecimiento (Harman, 1956), numerosas evidencias señalan que una desregulación en la producción de ROS por parte de la mitocondria podría conducir a la senescencia prematura y contribuir al envejecimiento de los organismos (Hutter et al., 2004; Liu et al., 2002b; Moiseeva et al., 2009; Passos et al., 2007a).

En este trabajo, hemos comprobado la existencia de una correlación entre los cultivos de hMSC crecidos a altas tensiones de oxígeno (21%O₂) y una elevada presencia de estrés oxidativo. El aumento del estrés oxidativo en las células quedó demostrado por el elevado contenido del radical superóxido (O₂⁻) y la incrementada acumulación de los subproductos derivados de la oxidación de componentes

celulares, como el carbonilo y el malondialdehído. De modo semejante, constatamos que la producción del radical O_2^- a bajas tensiones oxígeno se mantiene parcialmente más estable a lo largo del tiempo que cuando las células son cultivadas a tensiones de oxígeno suprafisiológicas, en donde la producción de este radical incrementa de forma gradual y en mayor medida a lo largo de los pases. Estos datos sugirieren la existencia de algún mecanismo que mantiene más estable la producción de este radical al 3% O_2 incluso tras el efecto deletéreo que ejerce la senescencia en cultivo. Podemos suponer que este exceso de daño oxidativo presente en las hMSC crecidas al 21% O_2 , está mediado por el aumento no fisiológico de la actividad metabólica mitocondrial.

Por una parte, sabemos que HIF1 α posee una fuerte influencia sobre la modulación e inhibición de la respiración mitocondrial (Fukuda et al., 2007; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006; Tello et al., 2011) y por otra, que ésta proteína suele ser rápidamente degradada cuando las concentraciones de oxígeno superan el 5% O_2 (Jiang et al., 1996), por lo tanto la elevada concentración de oxígeno en el cultivo ejercerá una degradación inmediata no natural de la presencia de HIF1 α en las células que promoverá un inadecuado funcionamiento de la actividad mitocondrial afectando la producción de ROS. En esta misma línea, podría sugerirse que el aumento de la disponibilidad de oxígeno como sustrato podría favorecer de modo directo una mayor actividad mitocondrial, sin embargo el hecho de que la enzima citocromo c oxidasa (complejo IV) encargada de la reducción del oxígeno a H_2O mantenga una constante de Michaelis (K_m) excesivamente baja ($<1\mu M \approx 0,1\%O_2$) (Gnaiger et al., 1998; Smolenski et al., 1991; Stumpe & Schrader, 1997; Wikström et al., 1981) pone en duda la posibilidad esta hipótesis. De éste modo, podemos considerar a la presencia de HIF α en las células y a su respuesta transcripcional como uno de los principales mecanismos moleculares encargados de controlar la adecuada actividad metabólica mitocondrial y por consiguiente de la producción de ROS endógeno. De hecho, un reciente trabajo confirma que HIF1 α es necesario para reducir la formación de ROS mediante la disminución del consumo de oxígeno a través de la inhibición de la actividad del complejo I de la ETC en la mitocondria (Tello et al., 2011).

Aunque es comúnmente asumido que el incremento en el consumo de oxígeno produce un aumento en la formación de ROS por parte de la ETC, la existencia de datos contradictorios mantiene cierta controversia al respecto (revisado en (Balaban et al., 2005; Murphy, 2009)). El abordaje experimental que llevamos a cabo en este trabajo, no nos permite desvelar el mecanismo molecular por el cual el aumento del consumo de oxígeno al 21% O_2 está asociado a la sobreproducción del radical O_2^- por la ETC. Sin embargo, persuasivamente proponemos que el hecho de mantener las hMSC en condiciones de oxígeno altamente hiperóxicas (no fisiológicas), produce una alteración en el balance energético natural de la célula que es desencadenado en esencia por la degradación de HIF α (importante regulador del metabolismo) y que promueve a su vez una mayor actividad metabólica mitocondrial “no natural” la cual será la encargada de liberar una mayor producción de ROS y consecuentemente un mayor daño oxidativo (**figura d1**).

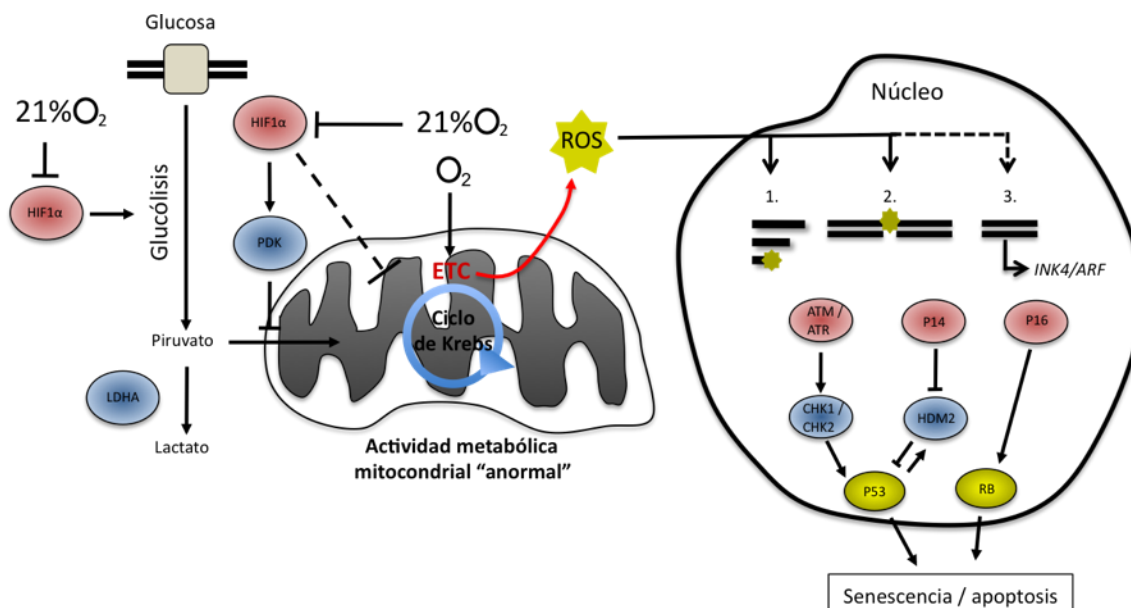


Figura d1. Relación entre el metabolismo mitocondrial y el desencadenamiento de la senescencia celular

La exposición celular a tensiones de oxígeno hiperóxicas, promoverán la degradación del factor de transcripción de inducción por hipoxia (HIF1 α). La ausencia anormal de HIF1 α en las células generará un cambio en la homeostasis del metabolismo pasando de un estado más glucolítico y de baja respiración mitocondrial, a un estado de menor actividad glucolítica y mayor respiración mitocondrial. El aumento anormal de la actividad metabólica mitocondrial favorecerá la formación de ROS por parte de la ETC y promoverá el daño oxidativo en las células. El ROS generado durante la respiración, podrá afectar a los tres mecanismos principales de desencadenamiento de la senescencia celular; 1. Acortamiento telomérico, 2. Daño en el ADN y 3. Desrepresión del locus *INK4/ARF*, aunque en este último no existe una evidencia clara sobre su modo de acción. La activación de estos tres factores promoverá la respuesta del DDR o la expresión de las proteínas P14 y P16. Tanto la activación del DDR como la expresión de P14 y P16 convergerán en la activación de las proteínas supresoras de tumores P53 y RB, las cuales serán las encargadas de desencadenar la parada del ciclo celular, senescencia o apoptosis, dependiendo del grado e intensidad del daño.

2.2. La hiperoxia compromete la viabilidad y la bioseguridad del cultivo

El estrés oxidativo es un importante factor a tener en cuenta en el desarrollo de la terapia celular, especialmente durante el periodo de expansión celular en cultivo, ya que este ocupa un periodo importante dentro de los protocolos diseñados para la aplicación de la terapia. Por otra parte, la presencia de ROS en el cultivo es determinante en la aparición de la senescencia prematura, la cual puede producirse mediante la activación de respuestas celulares específicas a daño, como la del daño en el ADN (von Zglinicki et al., 2001), el acortamiento telomérico (von Zglinicki et al., 2003) o la desrepresión del locus *INK4-ARF* (Ito et al., 2006; Iwasa et al., 2003). El daño en el ADN es uno de los efectos más nocivos de las especies reactivas del oxígeno para las células, ya que además de promover la senescencia celular, genera mutaciones y aberraciones cromosómicas que si no son eficientemente reparadas y afectan secuencias génicas implicadas en la expresión de proteínas que controlan el proceso de división celular (oncogenes o genes supresores de tumores) pueden favorecer la transformación de las células (Hahn & Weinberg, 2002).

Nuestro estudio revela que los cultivos de hMSC desarrollados a elevadas tensiones de oxígeno y asociados a una mayor presencia de ROS, además de poseer un incrementado daño oxidativo generalizado, presentan una acrecentada frecuencia de roturas en el ADN, marcada por el elevado número de focos nucleares de la proteína 53BP1 y por la incrementada aparición de aberraciones cromosómicas estructurales, las cuales son un reflejo de la formación de DSB (**figura r5A-C y figura r10; apartado de resultados**). Este aumento del daño génico fue acompañado por una mayor acumulación de las proteínas controladoras de la proliferación celular P21 y P53 y que a su vez pertenecen al sistema de respuesta a daño génico (DDR). El aumento significativo de estas proteínas y por tanto de mayor activación del sistema de protección celular frente a daño, sugiere que como respuesta a este exceso de daño genotóxico, se está generando un retraso en la progresión del ciclo para permitir previsiblemente la actuación de los mecanismos de reparación frente a daño génico; NER, BER, HR y NHEJ. De este

modo, La aumentada activación del DDR podría suponerse como uno de los principales mecanismos culpables de la aminorada capacidad proliferativa que ostentan las hMSC al 21%O₂, esencialmente observada durante los primeros pases de cultivo.

Aunque se han presentado un gran número de hipótesis intentando elucidar la posible relación entre las variaciones en la concentración de oxígeno y el control de genes controladores del ciclo celular como P53, todavía no existe un consenso generalizado al respecto (revisado (Sermeus& Michiels)). En este punto, es importante enfatizar que a pesar de que los cultivos de hMSC al 3%O₂ exhiben una mayor capacidad proliferativa, el análisis de ontología génica sólo reveló una posible función alterada relacionada con el control del ciclo celular, supervivencia y/o apoptosis, en donde incluso dos de las tres proteínas implicadas en esta función están asociadas con la hipoxia y la expresión de HIF1 α (Bruick, 2000). Esto sugiere que el efecto proliferativo asociado a las bajas condiciones de oxígeno es sustancialmente promovido por un cambio transcripcional metabólico derivado de la presencia de HIF α , más que por un efecto directo sobre el control de los genes que regulan el ciclo celular, como pueden ser oncogenes o genes supresores de tumores. Sin embargo, es de mencionar que no es posible descartar la posibilidad de que el incremento en el crecimiento celular observado al 3%O₂, sea consecuencia de un efecto paracrino o autocrino supeditado a la secreción de citoquinas o quimioquinas también dependiente de la activación de HIF1 α (Coppe et al., 2008; Toussaint et al., 2011). No obstante, nuestro análisis de GO no mostró modificaciones significativas en funciones relacionadas con la activación de este tipo de moléculas y sólo la expresión de una quimioquina (CXCL2) aparece modificada significativamente en el listado de los 828 genes del array (**tabla r3; apartado de resultados**).

Teniendo en cuenta los hechos anteriormente descritos, proponemos una posible relación indirecta entre la regulación del metabolismo celular y el control de la proliferación celular, en el que el vínculo de ambos sería la formación de ROS y el daño oxidativo. Brevemente, la excesiva presencia de oxígeno en el ambiente promoverá una desregulación metabólica que favorecerá a su vez la formación de ROS mitocondrial, generando un incrementado daño en el ADN que consecuentemente podrá activar una mayor respuesta DDR y posteriormente promoverá una aminorada proliferación celular (**figura d1**); todo ello sin descartar el efecto de la secreción de factores de crecimiento al medio que igualmente podrían alterar la proliferación de las células.

2.2.1 La hiperoxia promueve el acortamiento telomérico

El exceso de daño en el ADN mediado por la presencia de ROS, puede afectar el mantenimiento y la longitud del telómero (von Zglinicki, 2002; von Zglinicki et al., 2000). Nuestros resultados indican que las hMSC en cultivo, no expresan ni mantienen actividad telomerasa endógena al igual que la mayoría de los cultivos celulares primarios humanos. La ausencia de actividad telomerasa en nuestro modelo celular, implica que estas células son susceptibles de sufrir el fenómeno del acortamiento telomérico con las divisiones celulares y que por tanto, son capaces de alcanzar la senescencia replicativa con los pases.

Nuestro análisis de longitud telomérica reveló que los cultivos de hMSC crecidos al 21%O₂, que están asociados a elevadas concentraciones de ROS y daño génico, mantienen una incrementada tasa de acortamiento telomérico respecto al 3%O₂, llegando a ser un 27% mayor tras 15 pases en cultivo (**figura r9C y r9D; apartado de resultados**). Por otro lado, comprobamos que el cambio en la concentración de oxígeno en el medio no generó ningún efecto sobre la expresión ni la actividad de la telomerasa, demostrando que el efecto observado sobre el acortamiento telomérico es independiente de la actividad de esta enzima. En base a estas observaciones y en línea con las evidencias de otros investigadores (von Zglinicki et al., 2003), podemos concluir que el incrementado daño en el ADN generado al 21%O₂ puede ocurrir en las regiones teloméricas y favorecer una mayor tasa de acortamiento del telómero e interferir de este modo con el reloj mitótico celular. Estas evidencias son contrastadas por el reducido número de divisiones celulares totales observado tras las 22 semanas de cultivo, el cual limitó a un 17% menos el número de divisiones celulares acumuladas al 21%O₂ respecto al 3%O₂ (**figura r2; apartado de resultados**). Es notable resaltar que tras 15 pases de cultivo y habiendo soportado un incrementado número de divisiones celulares, las hMSC crecidas al 3%O₂ continuaban

manteniendo una longitud telomérica media mayor que sus homólogas crecidas al 21%O₂, demostrando que el exceso de estrés oxidativo observado al 21%O₂ posee un efecto más relevante sobre la longitud del telómero que el propio problema endógeno de la síntesis incompleta generado por la replicación celular.

En su conjunto, los datos nos permiten concluir que el fenómeno de la senescencia celular observado en las dos condiciones de oxígeno, son consecuencia del efecto sinérgico entre el daño oxidativo directo de las diferentes estructuras celulares y la activación de sistemas de protección frente a daño, como el DDR. La activación de este sistema, puede ser tanto telómero dependiente como telómero independiente y ser a su vez altamente influenciado por las tensiones de oxígeno en el ambiente. El efecto acusado de la activación del DDR podría proponerse como una de las principales causas de la aminorada capacidad proliferativa de las hMSC crecidas al 21%O₂ durante los primeros cinco pases de cultivo y también de la acrecentada senescencia celular prematura presente en esta condición. La presencia de daño oxidativo al 3%O₂ aunque bajo pero existente, sugiere que es posible retrasar aún más la senescencia en este tipo de cultivos, dejan abierto el debate propuesto por otros autores, de si es posible mejorar las condiciones de cultivo de tal forma que se deje como barrera única de la proliferación al efecto de la senescencia generada por el problema de la síntesis incompleta o senescencia replicativa propiamente dicha (Serrano & Blasco, 2001; Sherr & DePinho, 2000).

2.2.2 La hiperoxia promueve la inestabilidad genética

Cualquier lesión genética que incremente la tasa de mutación tendrá como consecuencia un aumento en la adquisición de nuevas mutaciones y aumentarán la probabilidad de desarrollo de inestabilidad genética y por tanto de transformación celular (Nowak et al., 2002). El proceso de inestabilidad genómica conduce habitualmente a una situación de aneuploidía, en la cual las células presentan un mayor o menor número del complemento normal de cromosomas de la especie. La inestabilidad genética en el cultivo, puede verse reflejada por un aumento de las aberraciones cromosómicas estructurales entendidas como desordenes en el contenido cromosómico (aneuploidía), roturas de cromátida o fusiones entre cromosomas, entre otras (revisado en (Martinez & Blasco, 2011)). Las situaciones de inestabilidad genómica (así como la aneuploidía) son muy frecuentes en células cancerosas, constituyendo de hecho una "marca distintiva" de estas células. Por esta razón, un aumento en la inestabilidad genética en el cultivo supondrá una mayor propensión a la transformación espontánea limitando por supuesto su uso terapéutico.

Dada la asociación habitual entre la elevada capacidad proliferativa de una población celular y la predisposición de esta a poseer una mayor habilidad tumorogénica; *a priori* podría suponerse que los cultivos celulares al 3%O₂ son potencialmente más tumorogénicos. Sin embargo, el hecho de que los cultivos de hMSC mantenidos en condiciones atmosféricas posean una mayor acumulación de daño en el ADN y una incrementada tasa de acortamiento telomérico sugiere que estas células son susceptibles de sufrir una mayor inestabilidad genética que sus homólogas crecidas a bajas condiciones de oxígeno. De hecho, nuestro estudio citogenético detallado así lo demuestra; la detección de alteraciones cromosómicas estructurales, el análisis de aneuploidía de células en interfase de los cromosomas 8, 11 y 17 y el análisis del contenido cromosómico en metafase, reveló que los cultivos celulares crecidos al 21%O₂ mantienen una mayor inestabilidad genética generalizada que las células crecidas al 3%O₂. Este aumento de inestabilidad cromosómica al 21%O₂, confirma que este tipo de cultivos favorece la formación de clones celulares con niveles de bioseguridad comprometidos o disfuncionales que dificultarán en mayor medida su uso en medicina regenerativa que aquellos desarrollados a bajas tensiones de oxígeno. Tomando en cuenta que la hiperoxia es una condición desfavorable para el mantenimiento de la homeostasis celular y que ésta está relacionada a una mayor inestabilidad genética, podemos sugerir que la elevada actividad proliferativa observada al 3%O₂ (condición más fisiológica) es una consecuencia de la mejora en las condiciones de crecimiento celular que de cierta forma retienen aún más las propiedades proliferativas nativas de las células, más que por un posible efecto de transformación asociada a esta condición.

En este trabajo ponemos de manifiesto, que el exceso de especies reactivas del oxígeno generado por el tratamiento con Paraquat (PQ) y H₂O₂, es capaz de aumentar robustamente el número

de células aneuploides en interfase (indicativas de inestabilidad genética) y además promover la senescencia celular de manera considerable. Este hecho demuestra, que las especies reactivas del oxígeno, por tanto son uno de los intermediarios entre el incrementado número de células aneuploides y los cultivos mantenidos al 21%O₂. El no evidenciar un mayor acortamiento telomérico en las condiciones oxidantes (PQ y H₂O₂), indica por una parte que la senescencia mediada por estrés oxidativo se produce de forma independiente a la longitud telomérica (probablemente debido al efecto agudo del daño oxidativo que generan los tratamientos (von Zglinicki, 2002)) y por otro lado que el acortamiento telomérico no es la única causa de inestabilidad genética generada en cultivo; por lo menos, en lo que respecta al cambio en el contenido génico de los cromosomas. Por consiguiente, existen mecanismos alternativos que promueven la aneuploidía celular en cultivo, que están supeditados al estrés oxidativo y que no dependen del acortamiento telomérico. Potencialmente, estos mecanismos podrían ser eventos de fusión celular, endoreplicación o ciclos abortivos (Storchova & Pellman, 2004), los cuales estamos pendientes de analizar.

Dentro de los ciclos abortivos, uno de los procesos capaz de promover la aneuploidía celular, es la formación de usos mitóticos aberrantes, los cuales se producen por fallos en la maquinaria de división celular durante la mitosis y la citocinesis. Este fenómeno se conoce como uno de los principales mecanismos implicados en la inducción de aneuploidía, debido a fallos en la segregación cromosómica durante la mitosis celular por la formación de usos mitóticos multipolares. Nuestros datos revelan que los cultivos al 21%O₂ producen aproximadamente 3 veces más usos mitóticos aberrantes que al 3%O₂, lo que sugiere un mecanismo adicional al acortamiento telomérico aparentemente supeditado a ROS por el cual se podría generar aneuploidía en los cultivos. Finalmente, consideramos que defectos en la maquinaria de segregación cromosómica o la adquisición aberrante de un juego de cromosomas podría suponerse como un mecanismo adicional capaz de promover la senescencia celular. Sin embargo de momento no disponemos de datos experimentales suficientes que permitan sustentar esta hipótesis.

2.3. La homeostasis de la actividad mitocondrial como efector de la senescencia en cultivo

Hasta el momento, todos los datos aportados en este y otros trabajos, demuestran de manera global, que la modulación del oxígeno en el cultivo es un parámetro fundamental a tener en cuenta para la expansión celular *in vitro* y que claramente los cultivos tradicionales desarrollados a tensiones de oxígeno hiperóxicas como la atmosférica aumentan la toxicidad inherente asociada a las condiciones artificiales del cultivo. En este estudio planteamos un posible mecanismo por el cual los cultivos de hMSC crecidos a concentraciones de oxígeno próximas a las fisiológicas retrasan la aparición del fenotipo senescente y mantienen una mayor calidad de las células. El retraso en la senescencia y la mejoría en la calidad celular se ve reflejada, además de por la aminorada presencia de células senescentes –SA-β-gal- (la evidencia más directa), por la aumentada capacidad de proliferación y el incrementado número de divisiones celulares totales que poseen las células. La mejora en estos parámetros, es una evidencia directa del retraso en la senescencia, tanto telómero dependiente como telómero independiente.

En este trabajo, postulamos un modelo de interacción entre el metabolismo celular y la estabilidad genética, que sin lugar a duda creemos que afecta decisivamente a la proliferación celular en cultivo. Proponemos, que defectos en la actividad mitocondrial que alteren el balance natural en la producción de ROS, generarán daño citotóxico en la célula promoviendo la senescencia prematura y a su vez incrementando el riesgo de padecer eventos de transformación en cultivo. Particularmente, en nuestro modelo celular, sugerimos que la ausencia (anormal) de HIF1α originada por las elevadas tensiones de oxígeno como la atmosférica, generan un aberrante aumento del consumo de oxígeno y por tanto de la actividad mitocondrial, que actuará como el principal catalizador de la sobreproducción del radical superóxido (O₂⁻). El exceso de ROS celular, será la causa fundamental del elevado daño oxidativo tanto citotóxico como genotóxico, el cual potenciará la activación de los mecanismos de protección frente a daño en el ADN (DDR) (**Figura d1**). El excesivo daño genotóxico, tanto telomérico como no telomérico, la promoción de la inestabilidad genética y la consecuente activación del DDR serán una de las causas fundamentales en la aparición de la senescencia celular prematura en cultivo, y paradójicamente también serán la causa principal de la aparición de una posible transformación celular

espontánea; aunque de momento no se ha demostrado que esta ocurra en los cultivos de células de origen humano.

En conclusión, proponemos que para salvaguardar más apropiadamente el equilibrio natural de las células, tanto de hMSC como de cualquier otro tipo celular primario, es indispensable realizar la expansión celular *in vitro* acorde a las concentraciones de oxígeno más próximas a sus fisiológicas. Esta condición, permitirá mejorar el metabolismo e indirectamente mantener una mayor estabilidad genética en cultivo (**figura d3**).

III. La sobreexpresión de hTERT reduce la producción de ROS y mejora la estabilidad genética

Como hemos discutido, el fenómeno de la senescencia replicativa tiene un papel crucial en el mantenimiento de las células madre en cultivo, por lo tanto es necesario entender de un modo preciso los procesos moleculares que la inducen. El mantenimiento de la longitud telomérica es uno de los mecanismos más estudiados y mejor caracterizados que evita la senescencia replicativa. En este trabajo corroboramos que la expresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) en las hMSC derivadas de tejido adiposo revierte el fenotipo asociado a la senescencia, alarga la longitud telomérica y permite el crecimiento celular continuado por tiempo indefinido en condiciones estándar de cultivo (21%O₂).

El acortamiento telomérico severo es una de las principales causas de formación de alteraciones cromosómicas estructurales (revisado en (Martinez& Blasco, 2011)). Nuestro análisis de detección de anomalías cromosómicas confirmó que la sobreexpresión de hTERT reduce por completo la presencia de fusiones de cromátida y en un importante porcentaje disminuye la aparición de roturas cromosómicas, incluso tras tiempos prolongados de cultivo (pase 22) (**figura r11; apartado de resultados**) corroborando de este modo la importante función de hTERT en el mantenimiento de la estabilidad genética. Por otro lado, sorprendentemente evidenciamos que la transducción de hTERT fue capaz de mantener los niveles “basales” de aneuploidía en interfase de los cromosomas 8, 11 y 17 tras 22 semanas de cultivo (**figura r12; apartado de resultados**), reflejando el importante efecto protector que esta enzima posee sobre un proceso menos estudiado pero no menos importante como es el mantenimiento de la ploidía celular en cultivo. Aunque el mecanismo protector frente a la aneuploidía es menos evidente que el observado en otras aberraciones cromosómicas estructurales; se ha postulado al mantenimiento de la longitud del telómero como el principal mecanismo protector frente a la formación de células aneuploides, ya que éste limita la formación de eventos de fusión-puente-rotura durante la mitosis celular y evita una inadecuada segregación cromosómica (Gisselsson, 2005; van Steensel et al., 1998). Sin embargo, el hecho de que la aneuploidía se genere “robustamente” en nuestros cultivos y que esta pueda ocurrir mediante otros procesos no relacionados con la longitud del telómero, (como así lo demuestran nuestros experimentos de tratamientos con PQ y H₂O₂; los cuales inducen elevados niveles de aneuploidía manteniendo estable la longitud telomérica), insinúan que hTERT puede proteger frente a la formación de células aneuploides mediante otras funciones no canónicas.

Los resultados presentados en este trabajo, manifiestan el potente efecto protector que ha demostrado poseer hTERT en los cultivos celulares; el cual es capaz de mantener prácticamente inalterados los niveles de aneuploidía “generalizada” (aprox. 10%, para los cromosomas 8, 11 y 17), incluso tras 22 pases de cultivo y con más de 50 divisiones celulares en condiciones estresantes. Por esta razón, es más que una presunción pensar que hTERT posee un efecto protector frente a la aneuploidía derivado de otro mecanismo ajeno al mantenimiento de la integridad del telómero y la inhibición de formación de eventos de fusión-puente-rotura. Algunas hipótesis avalan esta idea, sugiriendo que la actividad telomerasa posee un efecto directo sobre el alineamiento de los cromosomas en los usos mitóticos (Liu et al., 2002a) o que la integridad de los mismos protege frente a tetraploidización evitando saltos en la mitosis (Davoli et al., 2010). Sin embargo ninguna de ellas ha sido estudiada en profundidad y por tanto no existe un consenso claro al respecto.

Hasta hace poco tiempo el papel que se le asignaba a la telomerasa se reducía principalmente al mantenimiento de la longitud del telómero. Recientes trabajos han sugerido que la telomerasa es

capaz de participar en otros procesos celulares como en la reparación del daño en el ADN, la regulación del estado de la cromatina en respuesta al daño en el ADN (Masutomi et al., 2005) o la modulación de la expresión transcripcional de genes como Myc y Wnt (Choi et al., 2008). No obstante, ninguna de estas funciones se ha confirmado fehacientemente (revisado en (Cong & Shay, 2008)). Aparte de estas funciones telómero independientes, novedosos estudios revelan que la telomerasa reverso transcriptasa (hTERT) está presente en la mitocondria (Haendeler et al., 2009; Santos et al., 2006; Sharma et al., 2011) y que ésta puede tener un papel fundamental en el control de la producción de ROS; de hecho, algunos autores sugieren que hTERT es capaz de mejorar la función de la cadena transportadora de electrones mitocondrial y disminuir la producción de ROS endógeno (Ahmed et al., 2008; Indran et al., 2011; Kovalenko et al., 2010; Sahin et al., 2011). Brevemente, se sabe que hTERT contiene un péptido señal de localización mitocondrial en el extremo N-terminal que le permite traslocar y acceder a la mitocondria manteniendo su actividad (Santos et al., 2004). Una vez en la mitocondria, hTERT es capaz de asociarse con el componente de ARN de la endoribonucleasa procesadora de ARN mitocondrial (RMRP, *RNA component of mitochondrial RNA processing endoribonuclease*) (Maida et al., 2009) y formar el complejo hTERT-RMRP, el cuál actuará como una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase*) siendo capaz de generar un ARN de doble hebra a partir del propio RMRP, que posteriormente podrá ser procesado en el citosol por la endoribonucleasa DICER (*endoribonuclease in the RNase III family*) generando pequeños ARN de interferencia (siARN), los cuales a su vez controlarán los propios niveles endógenos de RMRP (Maida et al., 2009). De este modo se ha especulado que hTERT sería capaz de asociarse con otros tipos de ARN pudiendo regular la expresión de otros genes mediante la generación de otros tipos de siARN.

Nuestros datos preliminares confirman que ambas líneas de hMSC transducidas con hTERT son capaces de reducir la presencia del radical superóxido (O_2^-), incluso tras un alto número de pases en cultivo y que este reducido nivel de O_2^- es capaz de traducirse en un menor daño oxidativo para la célula (**figura r14; apartado de resultados**). Estos datos soportan el hasta ahora ignorado papel de hTERT en la regulación de la formación de ROS y apoyan la reciente evidencia que sugiere que hTERT actúa sobre la mitocondria de forma alternativa a su actividad reverso transcriptasa nuclear. El posible control de hTERT sobre la producción de ROS, introduce un parámetro mas a tener en cuenta sobre la capacidad que posee esta enzima para regular la estabilidad genética celular; ya que esta propiedad de modular la formación de ROS endógeno, le permitiría controlar indirectamente el potencial daño oxidativo derivado de estas especies (**figura d2**). Por otra parte, hay que remarcar que este aparente efecto promiscuo que posee la telomerasa o específicamente su subunidad catalítica hTERT, sería mucho más convincente a la hora de explicar los efectos “beneficiosos” generalizados que produce la sobreexpresión de esta enzima sobre los cultivos celulares. Con el fin de contrastar nuestros datos y los datos presentados por otros autores, actualmente en el laboratorio estamos infectando un mayor número de líneas hMSC de distintas fuentes y comprobando diferentes parámetros relacionados con la senescencia, malignidad y regeneración de tejidos; todo esto, de cara a evaluar su potencial uso en la clínica.

Cabe mencionar que la combinación de la terapia génica con la terapia celular podría ser una opción para solventar el problema de la expansión celular en cultivo y la senescencia replicativa. Al igual que se ha especulado con el posible uso de las iPS en terapia celular o se ha intentado mediante el uso de las ES (véase la discusión del primer ensayo clínico con ES en lesión de médula espinal -GRNOPC1- cancelado (Frantz, 2012; Wirth et al., 2011)), las cuales poseen una elevada actividad telomerasa, potente capacidad proliferativa y elevado potencial tumorigénico; no es del todo descabellado postular una estrategia combinada en la que se sobreexpresa hTERT en hMSC para aplicar en terapia (Klinger et al., 2006). Trabajos iniciales sugirieron que la inmortalización de células somáticas con telomerasa no conducía a cambios asociados con el cáncer (Jiang et al., 1999; Morales et al., 1999). Sin embargo, tras subsecuentes estudios más detallados se demostró la vulnerabilidad de estas células para sufrir cambios genéticos y epigenéticos que promueven su transformación en cultivo (Milyavsky et al., 2003; Noble et al., 2004; Serakinci et al., 2004). Se puede dar por sentado, que la eliminación de la barrera de la senescencia replicativa por parte de la sobreexpresión de hTERT apunta a que estas células sean proclives a sufrir transformación ya que la senescencia por si misma es uno de los mecanismos básicos de protección frente al cáncer cuando las células han sido dañadas (Collado & Serrano, 2010; Hanahan & Weinberg, 2011). De la misma manera, el uso de terapia génica que conlleve la integración de ADN (ej. infección lentiviral) conforma un riesgo añadido para sufrir mutaciones y por tanto transformación. Por

tanto, únicamente estrategias que puedan aumentar de forma transitoria los niveles de actividad telomerasa (inducción química, uso de vectores no integrativos, etc.) son en este momento consideradas para un uso clínico. No obstante, dado el importante potencial replicativo y regenerativo que poseen estos tipos celulares inmortales, telomerasa positivos o reprogramados con factores definidos (ES, iPS o células primarias transducidas con hTERT); creemos que deberían continuar centrándose los esfuerzos en conocer mejor su biología para poder llegar a controlar de un modo preciso su potencial de malignización.

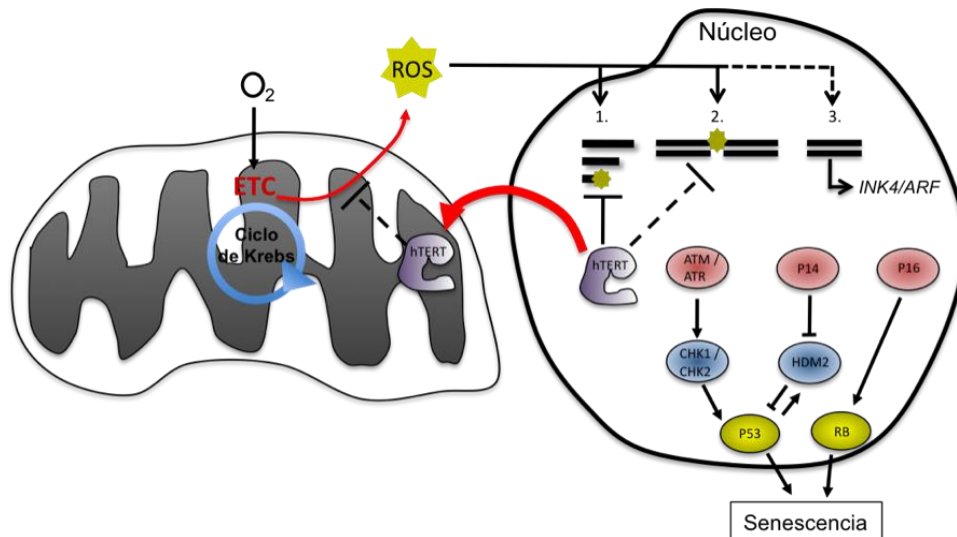


Figura d2. Papel de la sobreexpresión de hTERT sobre la regulación de la actividad metabólica mitocondrial y la inhibición de la senescencia

Recientes evidencias ponen de manifiesto la elevada promiscuidad que posee la subunidad catalítica de la telomerasa (hTERT) para afectar múltiples procesos celulares independientes al mantenimiento de la longitud del telómero. Se ha demostrado su potencial efecto sobre la reparación del daño en el ADN, la regulación de la estructura de la cromatina, el control del ciclo celular, la segregación cromosómica, la modulación de la expresión transcripcional o la regulación de la actividad mitocondrial (revisado en (Cong & Shay, 2008; Martínez & Blasco, 2011)). En la representación gráfica se muestra el efecto inhibitorio que ejerce la sobreexpresión de hTERT sobre el desencadenamiento de la senescencia celular. Esta inhibición, además de realizarse a través de la vía clásica del mantenimiento de la longitud del telómero podrá producirse por un aumento en la eficiencia de reparación del daño en el ADN (Masutomi et al., 2005) o indirectamente mediante la regulación del metabolismo mitocondrial, controlando la producción de ROS por parte de la ETC (Indran et al., 2011).

IV. La aneuploidía como un posible marcador de senescencia

Para lograr una expansión biosegura y eficaz de las células madre en cultivo, es importante conocer todos los cambios celulares que se producen a lo largo de este periodo, ya que serán parte de la causa o consecuencia del alcance de la senescencia. Uno de los cambios fenotípicos más evidentes que se produce tras la senescencia de las células en cultivo, es el aumento del tamaño celular (Bayreuther et al., 1988), característica que ha demostrado mantener una relación con la baja longitud telomérica (von Zglinicki et al., 2003). Por otra parte, hace varias décadas que se ha descrito que en muchos tipos celulares de mamífero el aumento del tamaño celular va acompañado de un incremento lineal en el contenido génico (Epstein, 1967; Jacobs et al., 1963). La idea de que el aumento en el contenido génico este asociado con la senescencia celular, está reforzada por varios estudios que revelan que el mosaicismos cromosómico o aneuploidía se presenta en la ontogenia de los organismos acumulándose progresivamente con la edad (revisado en (Iourov et al., 2010)). Nuestro análisis de aneuploidía en interfase revela, que incluso a pasajes bajos de cultivo (pase 2) y a concentraciones de oxígeno fisiológicas (3%O₂) se exhiben notables niveles “basales” de aneuploidía para el conjunto de los tres marcadores, presentando niveles cercanos al 10% (**figura r12, apartado de resultados**), lo que sugiere que las células aneuploides podrían estar presentes en el organismo de partida y no generarse como consecuencia del estrés generado en cultivo. Por otro lado, nuestros datos demuestran que tras tiempos prolongados de cultivo se produce un aumento gradual de la presencia de células aneuploides para los cromosomas 8,

11 y 17, así como de un evidente aumento del tamaño celular, que apunta a que este cambio en el contenido génico se correlaciona con la senescencia celular en cultivo, sugiriendo que el cambio en el contenido génico podría ser un parámetro importante a tener en cuenta en la detección de senescencia celular en cultivo.

Tras la realización de los experimentos de selección celular mediante separación citométrica de flujo (*sorting*) usando los parámetros de tamaño y complejidad, corroboramos que en nuestro modelo celular, las células de mayor talla y complejidad se asocian en toda regla a células senescentes. El aislamiento de las dos subpoblaciones celulares reveló que la subpoblación de células con un tamaño incrementado y una mayor complejidad posee un enriquecimiento en células SA- β -gal positivas, un mayor contenido de células aneuploides, una longitud telomérica media menor y una incrementada incapacidad para progresar a lo largo de los pases en el cultivo (**figura 19; apartado de resultados**). En conjunto, estos datos nos permiten confirmar que el proceso de senescencia celular *in vitro*, es un proceso gradual que afecta de modo heterogéneo al conjunto de células en cultivo y que ciertamente aquellas células que adquieren las características fenotípicas asociadas a una elevada talla son potencialmente más senescentes.

El análisis del cambio de la expresión génica durante la expansión celular *in vitro* a lo largo del tiempo, demostró que durante la senescencia de hMSC en cultivo se produce un gran número de cambios transcripcionales que interfieren en una diversidad de procesos esenciales para la supervivencia celular (**tabla 8; apartado de resultados**). Pudimos evidenciar, que el mantenimiento del control de la ploidía esta presente dentro de estos cambios y que al menos cuatro genes implicados en esta función se encuentran desregulados en las células senescentes. Pocos trabajos describen la participación de estos genes (SCIN, AKAP9, EDN1 y CXCL12) en el control de la ploidía y ninguno en relación con la senescencia. Brevemente, se ha descrito por ejemplo, que SCIN es una proteína de ruptura de filamentos de actina que requiere calcio para su actividad y se ha sugerido como un factor promotor de la ploidía y talla celular, además de inhibir la proliferación en células de leucemia megacarioblástica (Zunino et al., 2001). AKAP9 se ha establecido como una proteína de soporte que participa en la maquinaria de señalización en los centrosomas; el desplazamiento de AKAP9 del centrosoma afecta la homeostasis del centriolo y previene la progresión del ciclo dejando una marcada presencia de aneuploidía (Keryer et al., 2003). EDN1 se ha señalado como un factor de crecimiento que esta asociado frecuentemente a células cancerosas (Kim et al., 2005) y participa en la inducción de cáncer de colon (Nelson et al., 2003). CXCL12 ha sido implicado en poliploidización de células hematopoyéticas y su diferenciación a linaje megacariocítico (Guerriero et al., 2001).

Por otra parte, el hecho de que la desregulación de estos genes a lo largo del tiempo, sufra un retraso en células cultivadas a concentraciones de oxígeno más fisiológicas (3%O₂) y que la sobreexpresión de hTERT a pases tardíos de cultivo sea capaz de revertir el perfil de desregulación de estos genes, corrobora en cierta medida la potencial implicación de estas dianas en el control de la aneuploidía celular y la senescencia. En base a estas consideraciones, nos encontramos por tanto, ante unas potenciales dianas implicadas en el desencadenamiento de la senescencia celular en cultivo, las cuales estarían encargadas de mantener el control de la ploidía celular. Por lo tanto, sugerimos que la sobreexpresión de SCIN, AKAP9 y EDN1 y la regulación a la baja de CXCL12 pueden conducir a un aumento de la ploidía celular en cultivo y a su vez ser potenciales biomarcadores de senescencia.

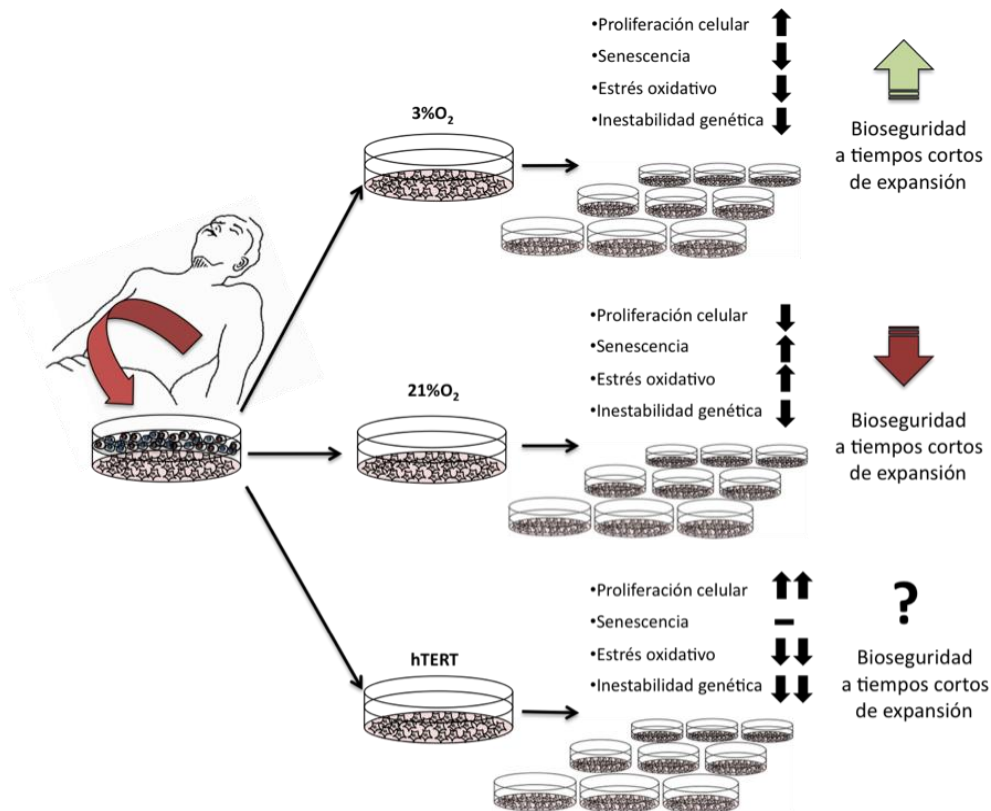


Figura d3. Los cultivos de hMSC desarrollados a tensiones de oxígeno próximas a las fisiológicas y transducidas con hTERT mejoran la estabilidad celular durante la expansión *in vitro*

Esquema representativo de los tres modelos de crecimiento celular desarrollados en este trabajo y que atienden al crecimiento celular en condiciones tradicionales de cultivo a tensiones de oxígeno atmosférica (21%O₂), próxima a la fisiológica (3%O₂) y sobreexpresando hTERT. Los resultados obtenidos en este trabajo, demuestran que a tiempos cortos de cultivo el crecimiento celular al 3%O₂ aumenta la proliferación celular, reduce el porcentaje de células senescentes, disminuye el estrés oxidativo y favorece la estabilidad genética respecto a los cultivos desarrollados al 21%O₂. Estos datos sugieren que los cultivos crecidos a tensiones de oxígeno próximas a las fisiológicas son potencialmente más bioseguros y de mayor calidad que aquellos desarrollados al 21%O₂. Por otro lado, demostramos que la transducción con hTERT aumenta considerablemente la capacidad de proliferación, inhibe la senescencia, reduce los niveles de estrés oxidativo y mantiene la estabilidad genética siempre tiempos prolongados de cultivo. Carecemos de datos experimentales que revelen el papel que posee la sobreexpresión de hTERT a tiempos cortos de expansión y su efecto sobre la bioseguridad del cultivo.

6.1 Triploidía y tetraploidía del cromosoma 10 como marcador de senescencia celular en cultivo

Como hemos mencionado, durante las divisiones celulares de las hMSC en cultivo la aparición de desordenes genéticos no es un fenómeno inusual. De hecho, una parte de la comunidad científica enfocada a la investigación con células madre en terapia celular da por sentada esta evidencia, indicando que la mayoría, si no todos los tipos celulares de mamífero adquieren algún tipo de cambio genético durante cualquier proceso de expansión celular en cultivo (revisado en (Goldring et al., 2011; Hyun et al., 2008)). Así por ejemplo, un gran número de estudios ha reportado que durante el cultivo celular prolongado, generalmente de células inmortales (ES, iPS) y eventualmente de células madre adultas (probablemente por el reducido número de ensayos), se adquieren mutaciones puntuales (Gore et al., 2011; Laurent et al., 2011), cambios subcariotípicos (Hussein et al., 2011) y alteraciones cromosómicas estructurales (Mayshar et al., 2010; Narva et al., 2010) que en muchas ocasiones se producen de modo recurrente (Baker et al., 2007; Draper et al., 2004; Lefort et al., 2008; Sareen et al., 2009; Spits et al., 2008; Tarte et al., 2010). Algunos autores sugieren, que es posible utilizar esta recurrencia como un marcador de adaptación a las condiciones específicas de cultivo (Baker et al., 2007; Mayshar et al., 2010).

Nuestros resultados confirman, que al menos las alteraciones cromosómicas como la aneuploidía están fuertemente representadas en los cultivos de hMSC derivadas de tejido adiposo, y que ésta aneuploidía incrementa paulatinamente con el tiempo de expansión independientemente de la tensión de oxígeno en el medio de cultivo. Observamos que no se produce una variación aleatoria en la ganancia o pérdida de copias para los cromosomas 8, 11 y 17 presentándose principalmente la adquisición de una copia extra para cada uno de los cromosomas inicialmente analizados (células triploides). Por el contrario, las alteraciones como las nulisomías y polisomías mostraron una considerablemente subrepresentación en la población celular; sugiriendo que este tipo de anomalías cromosómicas son perjudiciales para la viabilidad de las células y que por tanto son presuntamente eliminadas por apoptosis. La no aleatoria habilidad que ostentan las células triploides y modestamente las tetraploides para acumularse y sobrevivir durante tiempos prolongados, demuestra que este tipo de anormalidades otorgan una posible ventaja adaptativa en las condiciones en las que se desarrollan los cultivos y que es independiente de las variaciones de oxígeno en el medio. Es interesante resaltar que, a pesar de la existencia de una selección preferencial de tipo de aneuploidía, la acumulación específica de alguna de las variantes cromosómica de los cromosomas 8, 11 y 17 no fue evidenciada.

Dada la fuerte representación de la aneuploidía en los cultivos celulares senescentes, nos propusimos evaluar de un modo más exhaustivo los cambios en la variación en el número de copia a lo largo de todo el genoma, mediante la técnica de alto rendimiento (aCGH, *array-Comparative Genomic Hybridization*), comparando el ADN de células de pase temprano (pase 2) con células de pase tardío (pase 21) tanto transducidas con hTERT como sin transducir y crecidas al 21%O₂ y al 3%O₂. El análisis reveló, que al menos tres de las líneas de hMSC crecidas al 21%O₂ poseían alteraciones en algún punto del genoma y ninguna línea crecida al 3%O₂ mantenía algún tipo de alteración. En concreto, la línea ft34 transducida y sin transducir con hTERT presentó un aumento en el número de copia para todo el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 y la línea ft40-hTERT presentó una acumulación del cromosoma 10. Sorprendentemente, la confirmación de estos resultados para estas dos regiones cromosómicas mediante FISH en interfase demostró que estas no eran las únicas líneas crecidas al 21%O₂ que ostentaban esta acumulación selectiva, desvelando que las otras tres líneas no transducidas también poseían altos niveles de aneuploidía para estas dos regiones cromosómicas y en especial para la del cromosoma 10, llegando incluso a afectar a más del 80% de las células tras tiempos prolongados de cultivo (**figura r23; apartado de resultados**).

El conjunto de datos nos permite establecer que durante el cultivo celular, se fomenta la adquisición aleatoria de variaciones en el número de copia de diferentes regiones cromosómicas que se acumulan progresivamente durante el cultivo y que además se pueden producir de forma selectiva para ciertas secuencias génicas. La aparición recurrente del cromosoma 10 y del brazo corto (q) del cromosoma 20 en los cultivos prolongados de hMSC, sugiere que estas alteraciones génicas confieren de algún modo una ventaja adaptativa a aquellas células que las adquieren, permitiendo su selección clonal en las condiciones específicas en las que se desarrolla el cultivo. Por lo tanto, proponemos que la acumulación recurrente del cromosoma 10 podría utilizarse como un posible biomarcador para el crecimiento celular prolongado (o senescencia) de las hMSC derivadas de tejido adiposo en condiciones estándar de cultivo (**figura d4**). Actualmente estamos confirmando estos datos mediante un análisis más riguroso; aumentando el tamaño muestral, evaluando otros tipos celulares y valorando el posible efecto que pudiese tener el estrés oxidativo en cultivo sobre la recurrencia en esta alteración genética.

Por otro lado, el hecho de que las hMSC-TERT inmortalizadas presenten una selección clonal de las células con copias extras para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 a pesar de poseer una elevada estabilidad genética y niveles basales de aneuploidía para los cromosomas 8, 11 y 17, podría suponer que la selección clonal de estas alteraciones pudo generarse antes del proceso de transducción vírica.

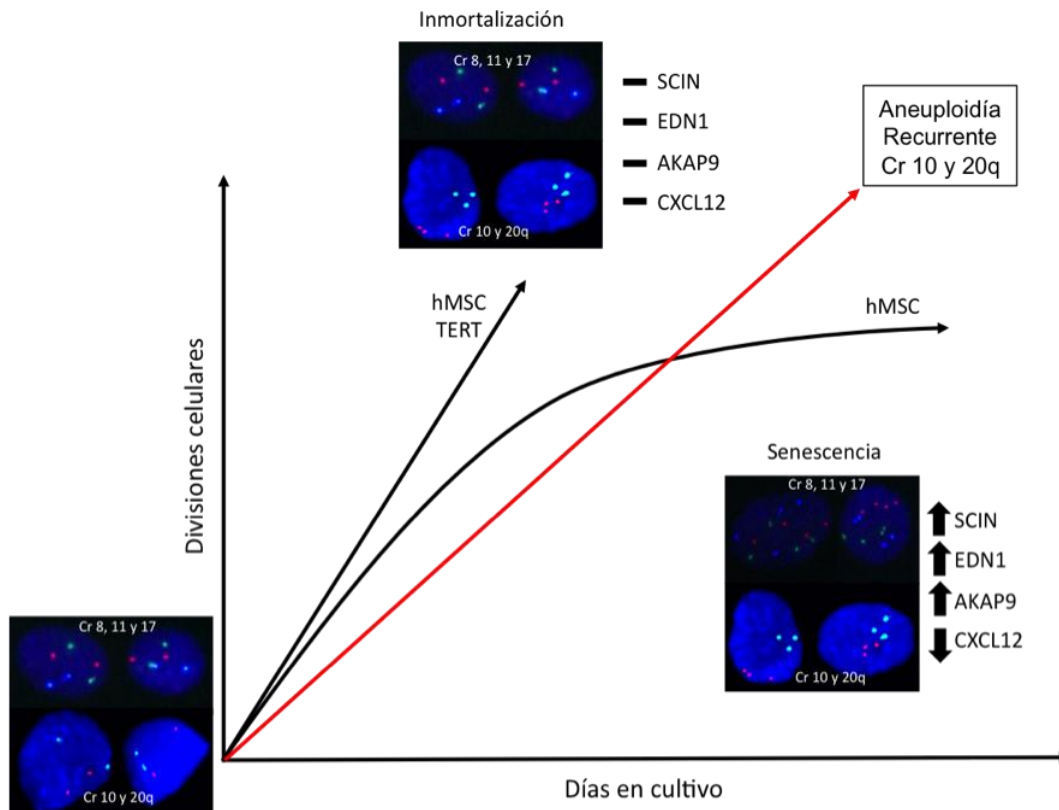


Figura d4. Marcadores de senescencia celular *in vitro* en condiciones estándar de cultivo

Durante el cultivo celular prolongado se produce un aumento gradual del número de células aneuploides para los cromosomas (cr) 8, 11 y 17, al igual que un cambio en el perfil de expresión génica que altera la expresión de genes implicados en el control de la ploidía, induciendo la sobreexpresión de los genes SCIN, EDN1 y AKAP9 y una expresión a la baja del gen CXCL12. La sobreexpresión de hTERT en las hMSC genera la inmortalización celular, mantiene estables los niveles de expresión de SCIN, EDN1, AKAP9 y CXCL12 y mantiene estable el número de células aneuploides para los cromosomas 8, 11 y 17. El array de CGH y la confirmación de éste a través de FISH en interfase demostraron que el incremento de aneuploidía celular se produce de forma recurrente para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20 tanto en células inmortalizadas como en células sin inmortalizar cultivadas en condiciones estándar de cultivo.

Sabemos, que las alteraciones cromosómicas como la aneuploidía, son una marca específica de los cánceres humanos (Hanahan & Weinberg, 2011) y que el cultivo celular *per se* y el periodo de expansión promueven la inestabilidad genética; por tanto el crecimiento celular *ex vivo* compromete sustancialmente el uso de cualquier tipo celular en la clínica. Resulta de especial relevancia establecer una serie de controles de calidad que determinen que las células expandidas retienen adecuadamente sus propiedades regenerativas y no son potencialmente tumorigénicas. Actualmente, se realizan rigurosos estudios de calidad y bioseguridad que controlan gran parte de los efectos deletéreos asociados al cultivo (Halme & Kessler, 2006). Sin embargo, en el marco de la bioseguridad y enfocándonos en la estabilidad genética, sólo se realizan análisis de cariotipo para la detección de alteraciones génicas; los cuales excluyen la detección de alteraciones subcariotípicas como mutaciones puntuales, reordenamientos génicos o variaciones en número de copia de bajo tamaño; que como hemos mencionado, ocurren con elevada frecuencia en el cultivo (Gore et al., 2011; Hussein et al., 2011; Laurent et al., 2011). Por esta razón, es de verdadera importancia aplicar métodos citogenéticos más precisos y con mayor poder resolutivo que permitan realizar una evaluación genética íntegra y que aseguren de un modo más eficiente la estabilidad genética de un cultivo determinado. Dichas técnicas, podrían ser técnicas de aCGH o arrays de polimorfismos de nucleótidos simples (aSNP, *Single Nucleotide Polymorphism-array*).

Por otra parte, a pesar de conocer la inherente habilidad de los cultivos para generar cambios génicos en el número de copia (CNV), también sabemos que dentro de un organismo las células somáticas presentan habituales alteraciones génicas relacionadas con este fenómeno que no son patológicas para el individuo e incluso pueden llegar a mantener una relevante función en el desarrollo

natural del organismo (revisado en (Iourov et al., 2010; Storchova& Pellman, 2004)). Estos datos hacen suponer que no todas las aneuploidias encontradas en un cultivo aumentan inexorablemente la tumorigenicidad del mismo o lo excluyen tajantemente del uso en la clínica. De hecho el uso actual de células madre expandidas previamente *in vitro* (posiblemente aneuploides) y que no provocan efectos adversos tras el trasplante, corroboran en parte esta hipótesis. El entendimiento funcional y fisiológico de las alteraciones genéticas que ocurren tanto en el organismo como en un determinado cultivo, supondrán la herramienta esencial que permitirá delimitar los grados aceptables de inestabilidad genética del cultivo para que de este modo puedan ser utilizados sin ningún riesgo en el paciente (Goldring et al., 2011).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Los cultivos de células madre mesenquimales humanas (hMSC) derivadas de tejido adiposo sometidos a tensiones de oxígeno próximas a las fisiológicas (3%O₂), mejoran la capacidad de proliferación y retrasan la aparición de la senescencia celular en comparación con las células crecidas en condiciones estándar de cultivo (21%O₂).
2. La expansión celular *in vitro* de las hMSC en condiciones de oxígeno próximas a las fisiológicas disminuye el estrés oxidativo, reduce el daño en el ADN, retrasa el acortamiento telomérico y promueve la estabilidad genética celular.
3. La aparición de células aneuploides durante los cultivos de hMSC incrementa progresivamente con el tiempo de expansión *in vitro* y es retrasada de manera significativa en los cultivos de hMSC desarrollados a tensiones de oxígeno próximas a las fisiológicas.
4. La presencia de células aneuploides en los cultivos de hMSC es sustancialmente promovida por la hiperoxia (21%O₂) y el estrés oxidativo del cultivo y puede originarse de manera independiente al acortamiento telomérico mediante la formación de husos mitóticos aberrantes.
5. Los cultivos de hMSC sometidos a concentraciones de oxígeno próximas a las fisiológicas mantienen un estado metabólico celular caracterizado por una elevada actividad glucolítica y una reducida actividad mitocondrial que es sugerentemente dependiente de la estabilidad del factor de transcripción de inducción por hipoxia HIF1 α .
6. La expresión ectópica de la subunidad catalítica de la telomerasa humana (hTERT) en los cultivos de hMSC, reduce significativamente el estrés oxidativo, aumenta la estabilidad genética e inhibe la aparición de la senescencia celular en condiciones estándar de cultivo (21%O₂).
7. El crecimiento prolongado de hMSC en condiciones estándar de cultivo promueve un cambio de expresión transcripcional que afecta una diversidad de funciones indispensables para el control de la homeostásis celular, entre las que destaca el control del mantenimiento de la ploidía en la célula. Se han señalado los genes SCNI, AKAP9, EDN1 y CXCL12 como potenciales biomarcadores de detección temprana de senescencia y/o elevada aneuploidía celular en cultivo.
8. Los cultivos prolongados de hMSC en condiciones estándar de cultivo (21%O₂), ostentan elevados niveles de aneuploidía recurrente para el cromosoma 10 y el brazo corto (q) del cromosoma 20.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Cultivos celulares

Las cuatro líneas de células madre mesenquimales humanas derivadas de tejido adiposo (hMSC) se obtuvieron a partir de lipoaspirados procedentes del banco de células madre “*Inbiobank Stem Cell Bank*” (Inbiomed, San Sebastian, España). Todas las muestras fueron procesadas bajo estrictas condiciones, siguiendo los buenos procedimientos de producción (GMP, *Good Manufacture Procedures*) basados en el ISO9001:2000. Cada uno de los donantes fue testado y encontrado negativo para VIH-1, VIH-2, Hepatitis B y C, y micoplasma. Las hMSC fueron caracterizadas por el proveedor mediante protocolos específicos de diferenciación *in vitro* y marcaje linaje específico a condrocitos, osteoblastos y adipocitos; además de por fenotipo inmune presentando el siguiente perfil de expresión CD29+, CD73+ (SH3 y SH4), CD105+ (SH2), CD166+, CD45- y CD31-.

1.1 Condiciones de cultivo

Las células fueron sembradas en placas convencionales de cultivo (BD Bioscience, San José, CA, US) usando medio de cultivo estándar *Dubecco's Modified Eagle's* (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, US) con alta glucosa (4,5mg/ml), suplementado con suero fetal bovino al 10% (FBS, *Fetal bovine serum*, Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina (Lonza, Basilea, Suiza) y 10^5 U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza). Los cultivos celulares se mantuvieron en sendos incubadores a 37°C, en una atmósfera con CO₂ al 5% y a dos presiones parciales de oxígeno; 21%O₂ (presión atmosférica) y 3%O₂ (presión próxima a la fisiológica). El nivel de oxígeno al 3%O₂ se controló mediante la utilización de un incubador trigásico (N₂, O₂ y CO₂) *Forma series II 3110 water-jacketed incubator model* (Thermo Scientific, NC, US) el cual está adaptado a una fuente externa de nitrógeno que permite el desplazamiento del oxígeno en el interior del incubador.

1.2 Curvas de Crecimiento

Para el desarrollo de las curvas de crecimiento y control de la viabilidad celular, las células se contabilizaron mediante el uso de cámara de Neubauer y tinción con azul de tripan al 0,05% (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). Las células se sembraron periódicamente una vez por semana a una concentración inicial de 1×10^3 células/cm² hasta alcanzar la subconfluencia (70-80%) y el medio de cultivo fué renovado cada tres o cuatro días. Los pases se realizaron mediante reacción de tripsinización retirando el medio de cultivo, lavando las hMSC adherentes con tampón salino (PBS, *Phosphate Buffered Saline*) y añadiendo 0,025ml/cm² de la solución de tripsinización (Tripsina 0,25% y 1mM de EDTA, Gibco, NY, US) por placa sembrada, durante 5 minutos a 37°C. Transcurrido el tiempo de reacción, la enzima se inactivó añadiendo el equivalente a 5 volúmenes de DMEM completo por volumen de tripsina utilizada. Una vez las células fueron recolectadas y mantenidas en suspensión, se procedió a su contabilización y posterior siembra en placa (BD Bioscience).

La monitorización del crecimiento celular se llevo a cabo mediante curvas de crecimiento, representando el número de divisiones celulares acumuladas (DC) por pase de cultivo. El número de divisiones celulares se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula: $DC (n / (n-1)) = (\log (N_n / N_{n-1})) / \log 2$ (n: pase; N: número de células).

1.3 Tratamientos

1.3.1 ROS exógeno

Para el tratamiento de las hMSC con los agentes químicos inductores de estrés oxidativo, se trataron los cultivos celulares crecidos en DMEM completo a pase uno de cultivo y en un estado de subconfluencia cercano al 70% con una dosis de 40µM de Dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat, (PQ), Sigma-Aldrich) renovada periódicamente cada tres o cuatro días y una única dosis de 100µM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) (Foret SA, Barcelona, España).

1.3.2 Diferenciación *in vitro*

Para el ensayo de diferenciación, se sembraron las cuatro líneas independientes de hMSC a pase uno de cultivo al 21%O₂ a una concentración inicial de 2x10⁴ células/cm² en placas multipocillo de 6 pocillos (BD Bioscience) con DMEM completo. Tras 24 horas de cultivo, el medio de cultivo estándar se reemplazó por el correspondiente medio de diferenciación osteogénica o adipogénica según fuese caso.

1.3.2.1 Diferenciación osteogénica

Una vez sembradas las células a la concentración adecuada y transcurridas 24 hora en condiciones estándar de cultivo, se añadió el medio de inducción osteogénica compuesto por DMEM completo y suplementado con 10mM de β-glicerol fosfato (Sigma-Aldrich), 0,1μM de dexametasona (Sigma-Aldrich) y 0,2mM de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich). El medio de diferenciación se renovó cada tres o cuatro días, durante un periodo de tres semanas; periodo tras el cual las células se fijaron en etanol al 70% durante 1 hora a 4°C y se dejaron secar 15 minutos a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las células se tiñeron con 40mM de rojo Alizarín (Sigma-Aldrich) a pH 4,1 durante 5 minutos a TA y se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y precipitados. Los cúmulos de calcio se tiñeron de color rojo-marrón y fueron captados por un microscopio óptico de campo claro IX51 Olympus con un objetivo de 40X (Olympus, Melville, NY, US). El experimento se realizó por triplicado en las cuatro líneas independientes y se observó marcaje en todas las réplicas.

1.3.2.2 Diferenciación adipogénica

Una vez sembradas las células a la concentración adecuada y transcurridas 24 hora en condiciones estándar de cultivo, se añadió el medio de inducción adipogénica compuesto por DMEM completo y suplementado con 0,01μM de dexametasona (Sigma-Aldrich), 0,5mM de 3-isobutil-1-metil xantina (IBMX, Sigma-Aldrich) y 60μM de indometacina (Sigma-Aldrich). El medio de diferenciación se renovó cada tres o cuatro días, durante un periodo de tres semanas; periodo tras el cual las células se fijaron en una solución de paraformaldehído al 4% en PBS durante 30 minutos a TA. Una vez fijadas, las células se lavaron 2 veces con agua destilada y se incubaron 5 minutos con una solución de isopropanol al 60% en agua destilada. Después de 10 minutos de secado, las células se tiñeron con una solución de 1mg/ml de Aceite rojo O en isopropanol al 60% en agua destilada durante 5 minutos a TA y se lavaron con agua destilada hasta eliminar el exceso de colorante y precipitados. Los cúmulos lipídicos intracelulares se tiñeron de rojo y fueron captados por un microscopio óptico de campo claro IX51 Olympus con un objetivo de 40X (Olympus). El experimento se realizó por triplicado en las cuatro líneas independientes y se observó marcaje en todas las réplicas.

II. Ensayo SA-β-Galactosidasa

Para este ensayo, las hMSC fueron sembradas a 5x10³ células/cm² en placas multipocillo de 35mm (Nalge Nunc, Rochester, NY, US) en ambas condiciones de oxígeno. Tras 48 horas de cultivo, las células se procesaron según las instrucciones del kit “*senescence Beta-Galactosidase staining kit*” (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US). Brevemente, las células fueron lavadas con 2ml de PBS por pocillo y fijadas durante 15 minutos a TA con 1ml de la respectiva solución de fijación. Posteriormente las células se lavaron dos veces con 2ml de PBS y se incubaron toda la noche a 37°C con la específica solución de tinción. Tras la incubación se añadió a cada pocillo 3 ml de glicerol al 70% y las muestras se almacenaron a 4°C hasta la captura digital de las imágenes. Las células SA-β-galactosidasa positivas presentaron una tinción intracelular de color azul y fueron captadas a través de un microscopio óptico de campo claro IX51 Olympus con un objetivo de 40X (Olympus, Melville, NY, US). Los experimentos se realizaron por triplicado por cada línea celular analizada y se capturaron 10 campos por pocillo de forma aleatoria, equivalentes a más de 400 células por línea.

III. Western-blot

3.1 Aislamiento y cuantificación proteica

Para realizar la extracción proteica, los cultivos celulares en subconfluencia (70-80%) se lavaron rápidamente dos veces con PBS a 4°C y posteriormente se lisaron mediante la adición directa de 10µl/cm² de tampón de lisis RIPA (Tris-HCl 50mM pH 7,4, 1%NP40, 0,25% Na-deoxicolato, NaCl 150mM, EDTA 1mM e inhibidores de proteasas “*mini complete*” (Roche, Basilea, Suiza)) por superficie cultivada. Tras 2 minutos de incubación a 4°C, el extracto proteico se procesó raspando homogéneamente la superficie de la placa mediante un rascador celular (BD Bioscience). El lisado celular se recolectó en un Eppendorf de 1,5ml y seguidamente se incubó durante 30 minutos a 4°C. Para descartar los restos subcelulares, el extracto de lisis se centrifugó a 16000Xg durante 20 minutos a 4°C y el sobrenadante fue alícuotado y guardado a -80°C hasta su uso.

Para determinar la concentración proteica en cada una de las muestra, se midió la absorbancia del sobrenadante a 650nm mediante el uso del kit “*DC Protein Assay*” (Bio-Rad, Hercules, CA, US) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cuantificar la concentración proteica absoluta, se realizó una recta patrón de absorbancia a 650nm con diluciones seriadas de concentraciones de albúmina de suero bovino conocidas (BSA, *Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich) y se interpolaron las medidas de absorbancia obtenidas en cada una de las muestras problema. Una vez conocidas las concentraciones en cada extracto, las muestras se mezclaron con tampón de carga 5x (0,125mM Tris-HCl, 4% SDS, 20% glicerol, 0,2 MDTT, 0,02% azul de bromofenol, pH 6,8) y se desnaturalizaron por choque térmico a 95°C, 5 minutos y 4°C, 1 minuto. Los extractos proteicos se almacenaron a -20°C hasta su uso.

3.2 Electroforesis, transferencia, incubaciones y revelado

Los extractos proteicos (25-40µg de proteína por muestra) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE, *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) a un porcentaje de 12 o 15% dependiendo de la proteína a analizar y se transfirieron a una membrana de PVDF con un tamaño de poro de 0,45µm (Millipore, Billerica, MA, US). Dicha transferencia se realizó en condiciones semihúmedas con el dispositivo de transferencia “*iblot SD*” (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez realizada la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de PBS-0,1%Tween20 y 10% de leche desnatada durante 1 hora a TA; periodo tras el cual, la membrana se incubó con los respectivos anticuerpos primarios en una solución de PBS-0,1%Tween20 y 1% de leche durante 2 horas a TA. Tras la incubación, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-0,1%Tween20 durante 5 minutos y se incubaron durante 1 hora a TA con los respectivos anticuerpos secundarios marcados con peroxidasa de rábano picante (HRP, *Horseradish peroxidase*, Dako, Carpinteria, CA, US) y diluidos en una solución de PBS-0,1%Tween20 y 1% de leche desnatada. Después de la incubación, la membrana se lavó 3 veces con PBS-0,1%Tween20 durante 5 minutos a TA y para llevar a cabo el revelado, la membrana se incubó con el sistema de detección quimioluminiscente ECL (GE Healthcare) durante 1 minuto a TA. Transcurrido este tiempo, se situó la membrana en un casete de revelado junto con una película radiográfica (AGFA, Mortsel, Belgium) durante 30, 60, 120 o más segundos y se reveló mediante la máquina de revelado Kodak x-Omat 2000.

La relación de anticuerpos primarios utilizados para este ensayo y sus respectivas diluciones de uso se encuentra resumida en la **tabla m1**.

Anticuerpo	Especie/isotipo	Dilución de uso	Casa comercial	Referencia
Anti P53	Ratón / IgG1	1:500	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, US	Pab240
Anti P21	Ratón / IgG2a	1:500	Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, CA, US	F-5
Anti HIF1α	Conejo / IgG2b	1:1000	Cell signaling, Beverly, MA, US	3716
Anti βactina	Ratón / IgG1	1:1000	Abcam, Cambridge, MA, US	8226
Anti conejo HRP	Cabra / IgG1	1:2000	Dako, Carpinteria, CA, US	P0448
Anti ratón HRP	Cabra / IgG1	1:2000	Dako, Carpinteria, CA, US	P0447

Tabla m1. Listado de anticuerpos y diluciones utilizadas para el ensayo de *Western-blot*

IV. Oxidación celular

4.1 Detección de carbonilos

Para la detección de carbonilos derivados de la oxidación en las hMSC, se desarrolló una adaptación del método de Levine (Levine et al., 1994) con algunas modificaciones. Brevemente, una vez los cultivos de hMSC llegaron a subconfluencia, las células se levantaron por tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C mediante centrifugación a 300Xg. Tras los lavados, se generaron “*pellets*” celulares que se mezclaron con una solución de 30% de ácido tricloroacético (v/v) para inducir la precipitación proteica. Los precipitados celulares, fueron resuspendidos en una solución de 10mM de 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) e incubados durante 60 minutos a 37°C. Las muestras fueron nuevamente precipitadas con una solución de 20% de ácido tricloroacético (v/v) y centrifugadas durante 10 minutos a 1000Xg a 4°C. Se lavaron los precipitados dos veces con etanol:acetato de etilo (1:1; v/v) para remover el exceso de DNPH y se incubaron en tampón fosfato 2mM a pH 2,3 con 6M de guanidina durante 40 minutos a 37°C. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras a 3000Xg durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se midió la absorbancia del sobrenadante a 360nm y la absorción molar de 22000 M⁻¹ cm⁻¹ se usó para cuantificar los niveles de carbonilos de proteínas expresados como μmols/10³ células. Las muestras fueron analizadas contra un blanco de solución de guanidina.

4.2 Detección de malondialdehídos (MDA)

Los niveles de MDA se determinaron por cromatografía líquida de alta presión (HPLC, *High Pressure Liquid Chromatography*) mediante una adaptación del método de Wong (Wong et al., 1987), con algunas modificaciones. Para este fin, se levantaron las hMSC en subconfluencia mediante tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C por centrifugación a 300Xg. Tras los lavados, se generaron “*pellets*” celulares los cuales fueron resuspendidos en una solución de 0,5M EDTA/agua destilada a una concentración de 10³ células/μl. Paralelamente, se realizaron diluciones seriadas de una solución de 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TBE, Sigma-Aldrich) en agua destilada a 0,61, 1,22 2,43 y 4,86 μM, para establecer una recta patrón. Se añadieron 50μl de cada una de las muestras y las diluciones seriadas de TBE a una solución de 1,45 ml de ácido fosfórico a 440mM (Sigma-Aldrich) y 4,6-dihidroxi-2-thiopirimidina a 42mM (TBA, Sigma-Aldrich). Para permitir la hidrólisis de los lipoperóxidos y facilitar la reacción con el TBA, La mezcla de reacción fue calentada a 100°C durante 1 hora. Para estabilizar la formación de los complejos MDA-TBA, se añadieron 500μl de la mezcla de reacción a 500μl de una solución de 100mM Metanol/NaOH (Sigma-Aldrich). Para permitir la sedimentación de precipitados proteicos, la mezcla de reacción se centrifugó a 9500Xg durante 5 minutos a 4°C y se mantuvieron a 4°C hasta realizar el análisis por HPLC.

Se equilibraron las columnas de HPLC mediante un flujo de 2ml/minuto de tampón 50mM de fosfato potásico a pH 6,8 durante 30 minutos y posteriormente, se inyectaron en las columnas 50μl de las muestras acomplejadas. Se midió la absorbancia por espectrofotometría del líquido efluente a 532nm y se analizó el pico de absorbancia asociado a la media de retención de los complejos MDA-TBA (4,2 minutos). Los resultados fueron expresados en nmol/10³ células.

V. Técnicas citogenéticas

5.1 iFISH (*interphase Fluorescence In Situ Hybridization*)

Para el análisis de la ploidía en interfase, se utilizó el kit comercial “*Breast Aneusomy Multi-Color Probe*” (Abbott Laboratories, Libertyville, IL, US), que contiene las sondas específicas que reconocen las secuencias de las regiones CEP de los centrómeros de los cromosomas 1, 8, 11 y 17 y que están conjugadas con los fluorocromos que emiten en los espectros del dorado, rojo, verde y azul, respectivamente. Debido a fallos en la hibridación de la sonda asociada al cromosoma 1, el análisis se realizó mediante el conteo de los centrómeros de los cromosomas 8, 11 y 17.

5.1.1 Preparación de las muestras

Las células crecidas en ambas condiciones de oxígeno se recolectaron mediante tripsinización al llegar a subconfluencia (70-80%), en los respectivos puntos en los que se desarrollo el análisis (pase 2, 5, 10, 15 y 20). Una vez en suspensión, las células se trataron con una solución hipotónica de KCl al 0,56% durante 15 minutos a 37°C. Tras el choque hipotónico, las células fueron fijadas tres veces durante 5 minutos en una solución de metanol:ácido acético glacial fresco en una proporción 3:1 a 4°C, y se guardaron a -80°C hasta su uso. Una vez fijadas, las células fueron depositadas en portaobjetos (Deltalab, Barcelona, España) y se dejaron endurecer y secar en el cristal al menos durante una noche a TA, para favorecer su adhesión. Posteriormente, para eliminar los restos de proteína y de membrana que pudiesen interferir con la hibridación, las muestras fueron incubadas con una solución 2X de tampón salino (SSCb, *Saline-Sodium Citrate buffer*) durante 2 minutos a 73°C y tratadas con una solución de pepsina ácida al 0,1% (Sigma) y HCl al 0,03% durante 10 minutos a 37°C. Después del tratamiento, las muestras se lavaron con PBS durante 5 minutos a TA, se fijaron en una solución del 4% de formaldehído/PBS durante 5 minutos a TA y se lavaron nuevamente con PBS durante 5 minutos a TA. Finalmente, las muestras se deshidrataron con incubaciones seriadas de etanol/PBS al 70%, 90% y 100% durante 5 minutos y posteriormente se dejaron secar 10 minutos a TA.

5.1.2 Desnaturalización/ Hibridación *in situ*

La desnaturalización se realizó en un horno de hibridación (GE Healthcare), mediante la adición *in situ* de dos gotas de 15µl de una solución 70% formamida desionizada y 2X de tampón salino SSCb a pH 5,3 e incubadas durante 5 minutos a 73°C. A continuación, las muestras se deshidrataron mediante concentraciones crecientes de etanol/PBS como se describió anteriormente y se dejaron secar por 10 minutos a TA. Tras la deshidratación, las muestras se hibridaron con 3µl de la sonda comercial previamente precalentada durante al menos 5 minutos a 73°C (para favorecer su reconstitución) y se incubaron durante 24 horas a 37°C en oscuridad. Al terminar la hibridación, las muestras se lavaron en dos pasos, mediante la incubación en una solución de 0,4X SSCb/0,3% NP40 durante 2 minutos a 73°C y una solución de 2X SSCb/0,1% NP40 durante 1 minuto a TA. Posteriormente, las preparaciones se dejaron secar 5 minutos a TA y se tiñeron los cromosomas mediante la adición de 1 gota de 10µl de medio de montaje *Vectashield H-1200* con 4,6-diamidino-2 fenilindol (DAPI, Vector laboratories, Burlingame, CA, US). Los portas se guardaron a 4°C en la oscuridad hasta la captura digital de las imágenes. Se captaron de forma aleatoria al menos 100 núcleos por muestra y condición de oxígeno.

5.2 mFISH (*metaphase Fluorescence In Situ Hybridization*)

Para la realización del FISH en metafase se utilizaron sondas PNA (*Peptide Nuclei Acid*) análogos de ADN en la que se ha remplazado el esqueleto de desoxirribosa-fosfato con un péptido sintético compuesto normalmente de unidades de N-2 amino etil-glicina y acoplados a un marcador fluorescente (Nielsen, 2001). Particularmente, para llevar a cabo este estudio, se usó una sonda PNA de secuencia LL(CCCTAA)3 (Eurogentec, Liège, Belgium) específica para las regiones teloméricas y conjugada con Cy3 y una sonda PNA de secuencia LL(ATTGTTGGAAACGGGA) específica para regiones alfa satélite centroméricas (Eurogentec) y conjugada con FITC (Lansdorp et al., 1996).

5.2.1 Preparación de las muestras

Para la obtención de metafases procedentes de los cultivos de hMSC crecidos a ambas condiciones de oxígeno, se trataron las células en subconfluencia (70-80%) con 10µg/ml de Colcemida (Invitrogen) durante 4h a 37 °C. Tras este periodo, las metafases se recolectaron mediante tripsinización y se trataron en suspensión con una solución hipotónica de KCl al 0,56% durante 15 minutos a 37°C. Una vez realizado el choque hipotónico, las metafases fueron fijadas tres veces por 5 minutos en metanol:ácido acético glacial fresco en proporción 3:1 a 4°C y se guardaron a -80°C hasta su uso. Una vez fijadas, las metafases se tiraron mediante un capilar de cristal sobre portaobjetos limpios (Deltalab, Barcelona, España) con una película de agua destilada para favorecer la disgregación de los cromosomas y de este modo facilitar su captura. Una vez en el portaobjetos, las metafases se dejaron endurecer y secar sobre el cristal al menos una noche a TA. Transcurrido este tiempo, las muestras se hidrataron con PBS 1X durante 15 minutos a TA, se fijaron en una solución al 4% formaldehído/PBS durante 2 minutos a

TA y se lavaron 3 veces en PBS durante 5 minutos a TA. Para eliminar los restos de proteína y de membrana que pudiesen interferir con la posterior hibridación, las muestras se incubaron con una solución de pepsina ácida al 0,1% (Sigma) y HCl al 0,03% durante 10 minutos a 37°C. A continuación, las muestras se lavaron 2 veces con PBS a TA, se fijaron nuevamente en 4% formaldehído/PBS durante 2 minutos, se lavaron 3 veces en PBS y se deshidrataron en soluciones seriadas de etanol al 70%, 90% y 100% durante 5 minutos a TA. Las preparaciones se dejaron secar 10 minutos a TA para posteriormente continuar con la hibridación.

5.2.2 Desnaturalización/Hibridación *in situ*

Para la hibridación, se añadieron 2 gotas de 15µl de la mezcla de desnaturalización/hibridación (10mM Tris HCl pH 7,2, 70% formamida desionizada, 0,5% de reactivo de bloqueo (Roche), 0,5µg/ml de sonda PNA-tel-Cy3, 5µg/ml de sonda PNA-Cen-FITC y 5% de tampón Mg con 25mM de MgCl₂, 9mM ácido cítrico, 82mM de Na₂HPO₄) sobre un cubreobjetos de 60X20mm (Menzel-glaser, Braunschweig, Alemania). El cubreobjetos se depositó sobre las preparaciones y estas se situaron en un horno de hibridación (GE Healthcare) durante 3 minutos a 80°C, para permitir la desnaturalización. Inmediatamente después, para permitir la hibridación, las preparaciones se dejaron en una cámara húmeda durante 3 horas a TA en oscuridad. Al terminar la hibridación, las preparaciones se lavaron 3 veces en PBS-0,1%Tween20 durante 10 minutos a 60°C y se sometieron a una segunda ronda de deshidratación como se describió anteriormente. Tras la deshidratación, las preparaciones se dejaron secar durante 5 minutos a TA y se tiñeron los cromosomas mediante la adición de 2 gotas de 10µl de medio de montaje Vectashield H-1200 con DAPI (Vector laboratories). Los portales se guardaron a 4°C en la oscuridad hasta la captura digital de las imágenes. Se capturaron de forma aleatoria al menos 25 metafases o núcleos por muestra y condición de oxígeno, equivalentes a más de 100 metafases o núcleos por condición de oxígeno.

5.2.3 Aberraciones cromosómicas estructurales

Para el estudio de la detección de aberraciones cromosómicas estructurales, se analizaron las metafases hibridadas simultáneamente con la sonda telomérica y centromérica y se contó el número de aberraciones cromosómicas existentes en cada una de las líneas. Estas alteraciones fueron consideradas y clasificadas bajo los siguientes criterios:

- **Rotura:** Interrupciones en la señal de DAPI con desplazamiento del fragmento respecto al resto del cromosoma y/o ausencia de la señal telomérica al final de la estructura cromosómica.
- **Cromosoma dicéntrico:** Cromosomas con dos centrómeros claramente separados pero unidos por la misma estructura teñida con DAPI y sin presentar telómeros en el punto de unión.
- **Fusiones:** Dos cromosomas unidos sin señal telomérica en el punto de fusión y presentando una única señal centromérica.

5.3 Captura digital de imágenes

Las imágenes fueron captadas a través de un microscopio Nikon 90i equipado con un objetivo 100 X “plan fluor 1,3 N/A” de inmersión en aceite con filtros apropiados UV/Aqua/FITC/GOLD/RED/TxRED y acoplado a una lámpara de fluorescencia “Hg Intensilight” (Nikon Instruments, Melville, NY, US). Las imágenes digitales fueron adquiridas por una cámara JAI monocromática enfriada CCD (Kushima City, Miyazaki, Japón) y analizadas mediante el programa informático Cytovision Genus (Genetix, Boston, MA, US). Cada uno de los canales de fluorescencia UV/AQUA/FITC/GOLD/RED/TxRED se captó por separado y el programa generó automáticamente una imagen combinada de los canales captados.

5.4 Cuantificación de fluorescencia telomérica

Para cuantificar adecuadamente la señal telomérica de las metafases o núcleos captados, se determinó el rango óptimo de exposición de la señal, tomando imágenes de muestras con distinta

longitud telomérica a distintos tiempos de integración lineal 100, 250, 500 y 1000 ms. Así se observó, que un tiempo de adquisición de la imagen de 400ms era adecuado por estar en un rango lineal de cuantificación de la señal y por ser lo suficientemente intenso como para detectar telómeros de 3,4kb de TTAGGG.

Para determinar la longitud telomérica, se captaron al menos 100 metafases o 100 núcleos por cada condición de oxígeno y se adquirieron el mismo día con el mismo tiempo de exposición. La cuantificación de la señal telomérica se realizó usando el programa informático TFL-Telo versión 2 proporcionado por el laboratorio del Dr. Peter Lansdrop en el “*British Columbia Cancer Center*” en Vancouver, Canadá y disponible gratuitamente en la Web. La longitud telomérica en kpb se calculó interpolando en una recta patrón generada a partir de la fluorescencia telomérica emitida por la tinción de fibroblastos 82-6 inmortalizados con un vector lentiviral ppRL-Sin18 y los cuales expresan las proteínas TIN2 y TIN2-13 de manera estable. La sobreexpresión de estas dos proteínas permite generar telómeros estables y de longitud conocida con 3,4 para la línea TIN2 y 8,4kpb para la línea TIN2-13 (Kim et al., 1999; Rubio et al., 2002). Las dos líneas celulares, fueron gentilmente cedidas por el laboratorio de la Dra. Judith Campisi.

VI. Actividad telomerasa – ensayo TRAP

Para la realización del protocolo de detección de actividad telomerasa mediante amplificación de regiones teloméricas por el sistema de PCR cuantitativa, se utilizó el método descrito por Herbert (Herbert et al., 2006), con algunas modificaciones.

6.1 Amplificación telomérica

Para el desarrollo de este ensayo, en primer lugar se generaron extractos proteicos en cada uno de los puntos analizados durante el cultivo. Se levantaron las células por tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C mediante centrifugación a 300Xg. Tras los lavados, se generaron precipitados celulares (*pellets*) que se resuspendieron en buffer de lisis NP40 (10mM Tris-HCl a pH 8.0, 1mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1%NP40, 0,25mM Deoxicolato de sodio, 10% Glicerol, 150mM NaCl, 5mM β-mercaptoetanol e inhibidor de proteasa 1x – mini complete (Roche)) a una concentración de 1x10³ células/μl. El homogenizado se incubó durante 30 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó a 16000Xg por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se guardó a -80°C hasta su posterior uso. Se usaron 5μl de cada extracto para la cuantificación proteica usando el kit de detección de proteínas “*DC Protein assay*” (BIO-RAD, Hercules, CA, US) (apartado 3.1 de ésta sección). Conociendo la concentración proteica en cada extracto, se usaron entre 5 y 1μg de proteína por ensayo junto con un control negativo con 5μg de proteína inactivada por calor incubando los extractos durante 10 minutos a 80°C. A cada muestra se le añadió 5μl de mezcla de reacción de amplificación telomérica compuesta por tampón 10x de actividad telomerasa (500mM Tris AcH a pH 8,5, 500mM AcK, 30mM MgCl₂, 10mM spermina, 10mM EGTA y 50mM β-mercaptoetanol), 2mM dAGT (Sigma-Aldrich) y 1mM oligo TS (**tabla 2**) y se incubaron durante 1hora a 30°C.

6.2 Cuantificación de la amplificación telomérica

Para cuantificar la amplificación telomérica mediada por la telomerasa endógena de cada uno de los extractos, se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) que amplificaba el producto obtenido de la reacción anterior. Para este fin, se añadieron 2μl de la reacción de amplificación telomérica a 23μl de una mezcla de reacción de qPCR que contenía tampón 1 x *PCR Master Mix power SYBR Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, US), 5mM EGTA, 4ng/μl Oligo ACX y 2ng/μl Oligo TS (**tabla 2**). La reacción de PCR se realizó durante 40 ciclos, en los que cada ciclo correspondía a una oscilación de cambios de temperatura de 94°C por 10 minutos (iniciación), 94°C por 15 segundos (Desnaturalización) y 60°C por 1min (Alineamiento y extensión). La reacción de PCR se realizó mediante un termociclador “*ABI PRISM 7700 sequence detection*” (Applied Biosystems) y se monitorizó y analizó a través del programa informático 7900HT versión 2.3 (Applied Biosystems). Se realizaron réplicas triples de todas las reacciones de amplificación del apartado 6.1 de ésta sección incluidos los controles negativos.

Oligo	Secuencia
TS	5' AATCCGTCGAGCAGAGTT
ACX	5' GCGCGGC(TTACCC) ₄

Tabla m2. Secuencias de oligos usados en el ensayo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP)

VII. Ensayos de expresión génica (ARN)

7.1 Ensayos TaqMan

7.1.1 Aislamiento de ARN

Para el aislamiento del ARN (ácido ribonucleico), las células se trataron directamente en la placa de cultivo. Las células se lavaron dos veces con PBS a 4°C y se digirieron durante 5 minutos a 4°C mediante la adición directa de 1 ml de TRIzol Reagent (Invitrogen) por cada 10cm² de área de cultivo sembrada. La digestión celular se recolecto en un Eppendorf de 1,5ml rascando la placa mediante un rascador (BD, Bioscience) y se incubó por 5 minutos a TA. Una vez obtenido el lisado celular se le añadió 0,2 ml de cloroformo se agito suavemente, se incubó por 3 minutos a TA y se centrifugó durante 15 minutos a 1200Xg a 4°C. Después de la centrifugación, la fase acuosa se separó del resto de la mezcla en un nuevo tubo Eppendorf y se incubó con 0,5ml de alcohol isopropílico durante 10 minutos a TA; posteriormente la mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1200Xg a 4°C, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1ml de etanol 75% para seguidamente centrifugarlo a 7500Xg durante 5 minutos a 4°C. Nuevamente el sobrenadante fue eliminado y el precipitado se dejó secar durante 10 minutos para después resuspenderlo en 30µl de agua libre de enzimas degradadoras de ARN (*ARNsa free*). El ARN se cuantifico por densitometría a 260nm mediante el uso de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific) y las muestras se guardaron a -80°C hasta su uso.

7.1.2 RT-PCR

Para la síntesis de ADNc (ADN copia) a partir del ARN aislado, se utilizó el kit comercial de transcripción reversa “*Superscript III Reverse Transcriptase*” (Invitrogen). Brevemente, se añadió 1µg de ARN a una mezcla de reacción que contenía 250ng de cebadores aleatorios y una mezcla de desoxinucleótidos de adenina, timidina, guanina y citosina (dNTP, (Sigma-Aldrich)) a 0,77mM con agua *ARNsa free* en un volumen final de 13µl. Seguidamente, la mezcla de reacción se calentó durante 5 minutos a 65°C y se incubó durante un 1 minuto a 4°C. Posteriormente se añadieron 7µl de la mezcla de reacción de transcripción reversa compuesta por tampón estándar 5x (*standard buffer* (Invitrogen)), 5mM de DTT (Dithiothreitol), 0,1 unidades/µl de *ARNseOUT* (*Recombinant ARNse Inhibitor*) y 5U/µl de SuperScriptIII RT (Invitrogen). La mezcla se incubó durante 1 hora a 50°C para inducir la transcripción reversa y se inactivo mediante calor, incubando la mezcla a 70°C durante 15 minutos.

7.1.3 qRT-PCR

Para la cuantificación relativa de los niveles de expresión génica de ARN; en este trabajo se utilizaron sondas comerciales TaqMan (Applied Biosystemss) específicas para cada uno de los genes en cuestión (**tabla 3**). Una vez generado el cADN, se añadieron 10ng de cADN de cada una de las muestras, a una mezcla de reacción compuesta por 10µl de 2x PCR Master Mix (Applied Biosystems) y 1µl de los cebadores específicos para cada uno de los genes a estudiar, en un volumen final de 20µl. La reacción de PCR se realizó durante 40 ciclos, en los que cada ciclo correspondía a una oscilación de cambios de temperatura de 94°C por 10 minutos (desnaturalización inicial), 94°C por 15 segundos (desnaturalización) y 60°C por 1min (alineamiento y extensión). La reacción de PCR se realizó mediante un termociclador “*ABI PRISM 7700 sequence detection*” (Applied Biosystems) y se monitorizó y analizó a través del programa informático 7900HT versión 2.3 (Applied Biosystems). Se realizaron réplicas triples por cada muestra analizada.

Símbolo	Nombre	Referencia
β actina	Actina beta	Hs03023880_g1
SCN1	Scinderina	Hs00263961_m1
EDN1	Endotelina	Hs01115919_m1
Akap9	Proteína de anclaje quinasa A9	Hs00323978_m1
CXCL12	Quimioquina ligando 12	Hs00171022_m1
PK1	Piruvato deshidrogenasa quinasa, isoenzima 1	Hs01561850_m1
HIF3 α	Factor inducible por hipoxia 3, subunidad alfa	Hs00541709_m1
PGK1	Fosfoglicerato quinasa 1	Hs00943178_g1
PFKB3	6-fosfofructo-2-quinasa/fructosa-2,6-bifosfatasa 3	Hs00190079_m1
PFKB4	6-fosfofructo-2 quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 4	Hs00190096_m1
ALDOC	Aldolasa C, fructosa-bifosfato	Hs00193059_m1
TPI1	Triosa fosfato isomerasa 1	Hs03806547_s1
SLC2A1	Transportador de solutos 1 de la familia 2 (transportador de glucosa)	Hs00892681_m1
LDHA	Lactato deshidrogenasa A	Hs0085532_g1
IGF2	Factor de crecimiento insulínico 2 (Somatomedina A)	Hs00171254_m1
TERT	Telomerasa transcriptasa inversa	Hs00162669_m1

Tabla m3. Listado de sondas TaqMan (Applied Biosystems) usadas en este trabajo.

7.2 Microarrays de expresión

Para la detección de los cambios en el perfil de expresión génica en los cultivos celulares, se realizaron dos *Microarrays* comparando las cuatro líneas independientes de hMSC. En uno de ellos se comparó la diferencia de expresión génica entre células crecidas al 21%O₂ (n=4) y células crecidas al 3%O₂ (n=4) a pase 5 de cultivo. En el otro análisis, se comparó el cambio de expresión génica entre células de pase temprano a pase 2 de cultivo (n=4) y células de pase tardío a pase 21 de cultivo (n=4) crecidas en condiciones estándar de cultivo (21%O₂).

El ARN se aisló mediante el procedimiento anteriormente descrito (apartado 7.1.1 de ésta sección) y se marcó usando el protocolo de análisis para la expresión de genes basado en la tecnología de *Microarrays* (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). Se usaron 400ng del ARN total aislado para la reacción de transcripción reversa usando el oligo dT/promotor de polimerasa T7 y la transcriptasa reversa MMLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*). El cADN producto de la reacción fue convertido a aARN (ARN amplificado) usando la polimerasa ARN T7 (BD Bioscience), la cual amplificó simultáneamente el material diana e incorporó CTP marcados con 3 cianina. Tras la reacción, 1,65 μ g de aARN marcado con Cy3 fue hibridado con el genoma humano completo, en un *Microarray* de 4 x 44k (Agilent Technologies) durante 17 horas a 65°C en un horno de hibridación (Agilent Technologies), siguiendo las indicaciones del proveedor (*One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent Technologies*). Una vez hibridadas las muestras, el *Microarray* se lavó y escaneó en un escáner *Agilent ADN Microarray Scanner* (Agilent Technologies) a 5mm de resolución, usando los parámetros normales de 4 x 44 *one-color Arrays*. Las imágenes obtenidas por el escáner fueron analizadas usando el programa informático *Feature Extraction v10* (Agilent Technologies).

Los datos del programa *Feature Extraction* se importaron al software *GeneSpring® GX versión 9.0* (Agilent Technologies) y se cuantificaron los valores de la normalización y de la expresión (log2 transformado). Las sondas también se marcaron (presente, marginal, ausente) mediante *GeneSpring®* y se seleccionaron para los análisis aquellas sondas cuyos valores de señal se encontraban por encima del percentil más bajo (20) y marcadas como presente o marginal en el 100% de las replicaciones, en al menos una de las dos condiciones de estudio. El análisis estadístico de expresión diferencial génica se evaluó mediante el clásico análisis pareado SAM (Tusher et al., 2001). La maquinaria y el soporte técnico necesario para realizar este análisis se llevó a cabo en colaboración con el servicio técnico de la unidad de genómica del CNIC.

VIII. Técnicas de evaluación de contenido génico y huella genética (ADN)

8.1 Array de CGH (aCGH)

Para el desarrollo de este ensayo, se levantaron las hMSC de la placa mediante tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C a través de centrifugación a 300Xg. Tras los lavados, se generaron precipitados celulares (*pellets*) que se almacenaron a -80°C hasta su uso.

8.1.1 Aislamiento del ADN

Se aisló el ADN de los *pellets* celulares haciendo uso del kit de aislamiento de ADN *Wizard® SV Genomic ADN purification System* (Promega, Madison, WI, US) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, los *pellets* celulares se lisaron añadiendo 600µl de la correspondiente solución de lisado y disgregando el pellet mediante pipeteo. Inmediatamente después, se añadieron 3µl de solución ARNsA y se incubó la mezcla de reacción durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente se añadieron 200µl de solución de precipitación proteica (suministrada por el fabricante), se agitó la mezcla y se mantuvo en hielo durante 5 minutos para seguidamente centrifugar la mezcla durante 5 minutos a 16000Xg. El sobrenadante se mezcló con 600µl de isopropanol y se centrifugó a 16000Xg durante 1 minuto; se descartó el sobrenadante y se añadió al precipitado final 600µl de etanol al 70% para nuevamente centrifugar como se describió anteriormente. Tras la centrifugación, se descartó nuevamente el sobrenadante y se dejó secar el precipitado durante 15 minutos a TA. El ADN precipitado, se resuspendió en 50µl de agua miliQ y el ADN se cuantificó por densitometría a 260nm a través de un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Las muestras se guardaron a -20°C hasta su uso.

8.1.2 Preparación de las muestras, hibridación de los *Microarrays* y adquisición de imagen

Una vez aislado el ADN, se digirió con las enzimas Alu I y Rsa I (NEB, Ipswich, MA, US) durante 2 horas a 37°C y se inactivó la reacción por calor durante 20 minutos a 65°C. Para el marcaje, las muestras se incubaron con 5µl de cebadores aleatorios durante 20 minutos a 65°C y se incubaron con la mezcla de reacción de marcaje (5U de polimerasa Exo-Klenow (NEB), 0,5µl de dNTPs (Sigma-Aldrich) a 10µM y 3µl de dUTP a las muestras control (ADN humano) y 3µl de UTP-cianina (Cy3 o Cy5) a las muestras problema (ADN de las hMSC)). Posteriormente, el ADN se purificó mediante los filtros Microcon YM-30 (Millipore). Para la hibridación, los ADN marcados con Cy3 o Cy5 se mezclaron e hibridaron con el *Microarray* de Agilent® (4X44K). Los arrays fueron lavados y secados de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic ADN Analysis Enzymatic Labeling*, Agilent Technologies). Las imágenes fueron digitalizadas a 3 micras de resolución en el scanner de la casa comercial de los arrays (Agilent® Technologies), usando los parámetros asignados por defecto para los arrays de CGH en formato 4X44K. El análisis se realizó haciendo uso del programa informático del mismo fabricante (*Feature Extraction software v10,7*) y de *ADN Analytics* (Agilent® Technologies) en colaboración con el Dr. Javier Suela de la empresa NIMGenetics S.L. El análisis y procesamiento de los datos se realizaron con intermediación y soporte técnico de la *Spin Off NimGenetics S.A*

8.2 Perfil polimórfico de nucleótido simple

Para la detección de posibles contaminaciones cruzadas entre los cultivos de las diferentes líneas de hMSC, realizamos un ensayo de detección de polimorfismos de nucleótidos (SNP, *Single nucleotide Polymorphism*), seleccionando nueve SNP localizados en diferentes genes con un amplio rango de heterocigosidad (GC03, GC046, GC051, GC056, V063, V072, V078, V085, V089), según se muestra en la base de datos para la información biotecnológica (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*). Las sondas y oligos comerciales usados en este experimento se adquirieron de la casa comercial Applied Biosystems.

Se testaron tres líneas de hMSC a pase temprano y pase tardío crecidas en las dos condiciones de oxígeno y dos líneas de hMSC transducidas con el vector lentiviral hTERT a pase tardío y crecidas al 21%O₂. En primer lugar, se aisló el ADN de las muestras siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 11.1 de ésta sección y se procedió con el genotipado mediante qPCR usando 20ng de ADN

genómico y añadiéndolos sobre una mezcla de reacción de tampón *1xTaqMan PCR Master Mix*, 0,01u/ml de cada oligo TaqMan, 60nM de sonda nativa y 60nM de sonda variante (reactivos suministrados por Applied Biosystems) en un volumen final 5µl. La reacción de PCR se realizó mediante incubación de la mezcla durante 2 minutos a 50°C, desnaturalización por incubación durante 10 minutos a 95°C, seguidos de 40 ciclos de cambio de temperatura compuestos por los siguientes pasos: 92°C por 15 segundos (desnaturalización inicial), 94°C por 15 segundos (desnaturalización) y 60°C por 1 minuto (Alineamiento y extensión). Después de la PCR, el genotipado de cada muestra fue determinado automáticamente mediante medida directa de fluorescencia final alelo específica en el sistema de detección 7900HT Detection System (Applied Biosystems), usando el programa de discriminación alélica SDS 2.1 (Applied Biosystems). Dos personas diferentes evaluaron las muestras y no se observaron discrepancias.

IX. Infección lentiviral

9.1 Obtención de sobrenadantes virales

El vector lentiviral se obtuvo en la línea celular HEK293T mediante la cotransfección del vector de interés (pPRLhTERT.SIN18), junto con los vectores accesorios pMD2-VSVG, pulg/pRRE y pRSV-REV, necesarios para el adecuado empaquetamiento de los viriones. En la producción de sobrenadantes virales se utilizó el método descrito por (Yang et al., 1999) con algunas modificaciones. Brevemente, se transfectaron células HEK293T con el vector lentiviral pPRLhTERT.SIN18 (4,8x10⁶ células en una placa de 10 cm de diámetro (BD Bioscience)) mediante la precipitación del vector con fosfato clásico y en presencia de 25µM de cloroquina (Sigma-Aldrich). Tras 8 horas de transfección se reemplazó el medio por medio fresco y a las 12 horas siguientes se volvió a repetir el procedimiento. 24 horas después del último cambio de medio, se recogió el sobrenadante viral, del que se eliminaron los restos celulares mediante filtración (0,45µM, Millipore, Billerica, MA, US) y posteriormente se utilizó de manera inmediata o se conservó a -80°C hasta su uso.

Para la concentración de los sobrenadantes lentivirales, estos se sometieron a ultracentrifugación a 70000Xg durante 2 horas a 4°C y se resuspendieron en 200µl de suero salino incubando toda la noche a 4°C. Las suspensiones se clarificaron a baja velocidad y los sobrenadantes se titularon y conservaron a -80°C hasta su uso. El vector lentiviral fue preparado por la unidad de vectores virales del CNIC.

9.2 Titulación de sobrenadantes virales

La titulación se realizó en la línea celular HeLa. Se realizaron diluciones seriadas de los sobrenadantes y se añadieron sobre las células a una confluencia de 1,5x10⁴ células/cm² en presencia de 8µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich). Al día siguiente se retiraron las diluciones y se añadió medio fresco, dejando las células en cultivo 72 horas adicionales para permitir la expresión de los transgenes. Pasado este tiempo se analizó el porcentaje de células que presentaban expresión de GFP mediante citometría de flujo y el título del sobrenadante se calculó a través del uso de la siguiente fórmula: Unidades transducidas/ml (UI/ml) = (% de células positivas) x (número de células en el momento de la infección/100) x (factor de dilución).

9.3 Transducción de hMSC

Las hMSC a pase 5 se sembraron el día anterior a la transducción a una densidad de 5000células/cm² en placas petri de 10cm². Al día siguiente se añadió el sobrenadante viral diluido ½ con DMEM completo y con 8µg/ml de polibreno (Sigma-Aldrich), las células se incubaron durante 8 horas y posteriormente se sustituyó el medio de transducción por 10ml de medio completo sin sobrenadante viral. Para confirmar la sobreexpresión del gen hTERT se realizó qRT-PCR mediante el uso de una sonda comercial TaqMan específica para hTERT (**tabla 3, apartado de resultados**). La construcción lentiviral (pPRLhTERT.SIN18) fue gentilmente cedida por la Dra. Judith Campisi del *Buck Institute for Aging Research*.

X. Citometría de flujo

Los análisis de citometría de flujo se realizaron mediante un analizador de citometría de flujo Fascanto II (BD Biosciences), mientras que los experimentos de separación celular se llevaron a cabo a través de un citómetro de flujo separador *BD FACSAria II cell sorting system* bajo condiciones de asepsia (BD Bioscience). Maquinaria disponible en la Unidad de Celómica del CNIC. Todos los datos fueron analizados usando el programa informático *summit v4.3* (Dako).

10.1 Análisis de antígenos de superficie

Para la confirmación del patrón de expresión de antígenos de superficie característico de las hMSC, se utilizó la selección de anticuerpos descritos en la **tabla m4**. Se levantaron las células de la placa mediante tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C mediante centrifugación a 300Xg. Posteriormente las células se resuspendieron a una concentración de $1,0 \times 10^6$ células/ml en solución de bloqueo conteniendo 1% (v/v) de suero humano en PBS y se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Tras el bloqueo, las muestras se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos o sus controles de isotipo durante 30 minutos a 4°C a las concentraciones recomendadas por la casa comercial en reacciones separadas para cada ensayo y en un volumen final de 100µl. Tras la incubación, las células se lavaron 2 veces con 200µl de PBS mediante centrifugación a 300Xg y resuspendidas en 100µl de PBS para posteriormente analizar por el citómetro.

Anticuerpo	Especie	Fluorocromo	Referencia
CD29	Ratón / IgG2a	PE	556049 / BD
CD44 (<i>Hyaluronic Acid Receptor</i>)	Rata / IgG2b	PE	12-0441 / EBiosci
CD90 (Thy-1)	Ratón / IgG1	FITC	555595 / BD
CD105 (Endoglin)	Ratón / IgG1	FITC	MA1-80943/ Thermo
CD11b	Ratón / IgG1	PE	MCA551PE / Serotec
HLA DR	Ratón / IgG3	FITC	MCA1879F / Serotec
CD19	Ratón / IgG1	FITC	555412 / BD
CD45	Ratón / IgG1	FITC	MCA435AD / Serotec

Control de isotipo	Catálogo
mIgG2a-PE	IC003P / RD
rIgG2b-PE	553989 / BD
mIgG1-FITC	555748 / BD
mIgG1-FITC	555748 / BD
mIgG1-PE	555749 / BD
mIgG3-FITC	IC007F / RD
mIgG1-FITC	555748 / BD

Tabla m4. Listado de anticuerpos utilizados para la caracterización del inmunofenotipo de las hMSC por citometría de flujo

10.2 Cuantificación del radical superóxido (O_2^-)

Para detectar los niveles de ROS en los cultivos de hMSC a las dos tensiones de oxígeno, se levantaron las células de la placa a subconfluencia mediante tripsinización y se lavaron dos veces en PBS a 4°C mediante centrifugación a 300Xg. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en 1ml de tampón salino sin rojo fenol "*Hank's Buffered Salt Solution*" (HBSS, Invitrogen) y se incubaron con 5µM de dihidroetidina (DHE, Molecular Probes, Carlsbad, CA, US), un marcador específico del radical superóxido (O_2^-) total, durante un periodo de 30 minutos a 37°C. Después de la incubación, las células se lavaron con 1ml de HBSS mediante centrifugación a 300Xg y se resuspendieron a una concentración de $1,0 \times 10^3$ células/µl en una solución de 1µM *TO-PRO-3 iodine* (Invitrogen) en HBSS a 4°C, utilizado como marcador de viabilidad. La suspensión celular se pasó por el citómetro y se analizaron $1,0 \times 10^4$ células por muestra y condición en el canal FL-2 para el DHE y en el canal FL-3 para el TO-PRO-3. Para el análisis

sólo se tomaron en cuenta las células vivas descartando aquellas que eran positivas para la emisión de TO-PRO-®3.

10.3 Selección celular por tamaño (FCS) y complejidad (SSC)

Para la selección celular, se levantaron las células en subconfluencia mediante tripsinización a pase 7 de cultivo y se resuspendieron en medio de separación (HBSS, 0,5% de albúmina bovina (BSA, *Bovine serum albumin*, Sigma-Aldrich), 10mM de HEPES (Lonza), 2,5mM de EDTA, 10 μ M de MgCl₂ (Sigma-Aldrich) y 10⁵U/ml de penicilina/estreptomicina (Lonza)) a una concentración de 1,0x10⁷ células/ml. Se filtro la suspensión celular en filtros de 70 μ m (BD Bioscience) y se mantuvo a 4°C hasta su paso por el citómetro. La selección celular se realizó en función de los parámetros de tamaño (FCS, *Forward Scatter*) y complejidad (SSC, *Side Scatter complexity*) relativa. Tras la selección celular, las células fueron recogidas en 2ml de medio de recogida (HBSS y 50% FBS), se contabilizaron por cámara de Neubauer y se sembraron en placas multipocillo de 35mm (Nalge Nunc, Rochester NY, US) a 2,0x10³ células/cm².

XI. Inmunocitoquímica

11.1 Detección de focos de 53BP1

Para el ensayo de Inmunocitoquímica contra focos nucleares de la proteína 53BP1, se sembraron células hMSC en placas multipocillo de 35mm (Nalge Nunc) con DMEM completo a 1,0x10³ células/cm² y se dejaron crecer hasta llegar a la subconfluencia (70-80%). Una vez crecidas, las células se fijaron *in situ* con acetona durante 10 minutos a 4°C, se lavaron 3 veces con PBS a 4°C y se permeabilizaron con una solución de 0,5% Tritón X-100 durante 10 minutos a TA. Tras la permeabilización, se bloquearon con una solución de PBS-0,1%Tween20 y 10% de suero de cabra (SC, Abcam, Cambridge, UK) durante 1 hora a TA y se incubaron con el anticuerpo primario IgM de ratón específico contra la proteína 53BP1 (clon 05725 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, US) en una solución de PBS-0,1%Tween20 y 1% de Suero de Caballo (SC) a una dilución de 1:500 durante toda la noche a 4°C. Para eliminar el exceso de anticuerpo y las uniones inespecíficas, las células se lavaron 3 veces con PBS-0,1%Tween20 a TA y se marcaron fluorescentemente mediante incubación con un anticuerpo secundario IgG de cabra contra IgM de ratón conjugado con Alexa 546 (Invitrogen) a una dilución de 1:1000 en PBS-0,1%Tween20 y 1% de SC durante 1 hora a TA en oscuridad. Las células se lavaron 3 veces con PBS-0,1%Tween20 a TA y se dejaron secar durante 10 minutos a TA. Posteriormente, se realizó una contra tinción nuclear mediante la adición de 1 gota de 10 μ l de medio de montaje Vectashield H-1200 con DAPI (Vector laboratories). Las placas multipocillo se guardaron a 4°C en la oscuridad hasta la captura digital de las imágenes.

Como control positivo se usaron células hMSC irradiadas con 10Gy de radiación gamma 1 hora antes de la fijación y como control negativo células hMSC tratadas con el procedimiento anteriormente descrito exceptuando la incubación con el anticuerpo primario (las muestras no presentaron señal detectable).

11.2 Detección de usos mitóticos

Para el desarrollo de este experimento se sembraron 1,0x10³ células/cm² a pases medios de cultivo en las dos condiciones de oxígeno sobre cubres de cristal estériles de 60 x 24mm (Menzel Glaser) tratados con gelatina (Sigma-Aldrich) al 0,1% durante 30 minutos a 37°C. Cinco días después de la siembra, las células fueron lavadas *in situ* dos veces con PBS a TA y fijadas en 4% paraformaldehído (Sigma-Aldrich) durante 15 minutos a 4°C. Tras la fijación las células fueron permeabilizadas en PBS 0,25%Triton X-100 (Sigma-Aldrich) durante 10 minutos a TA y bloqueadas en PBS-0,1% Tween20, 1% BSA durante 1 hora a TA. Las células fueron incubadas con un anticuerpo de ratón anti α tubulina (clon CP06, Calbiochem, Nottingham, UK) en solución de bloqueo a una razón de 1:100 por 2 horas a TA. Tras la incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS a TA y se incubaron con un anticuerpo secundario IgG de conejo anti-ratón conjugado con Alexa Fluor-488 (Invitrogen) a una razón de 1:1000 en solución de bloqueo durante 1 hora a TA. Finalmente, los cubres se lavaron dos veces con PBS a TA y se les

añadió 2 gotas de 10 µl de medio de montaje Vectashield H-1200 con DAPI (Vector laboratories) para la tinción nuclear.

11.3 Captura digital de imágenes

Las imágenes fueron captadas a través de un microscopio Nikon 90i equipado con un objetivo 40 X “plan fluor 0,5 N/A” con filtros apropiados UV/Aqua/FITC/GOLD/RED/TxRED y una lámpara de fluorescencia “Hg Intensilight” (Nikon Instruments). Las imágenes digitales fueron adquiridas con el programa informático Cytovision Genus (Genetix, Boston, MA, US) acoplado a una cámara JAI enfriada monocromática CCD (Kushima City, Miyazaki, Japón). Cada uno de los canales de fluorescencia UV/Aqua/FITC/GOLD/RED/TxRED se captó por separado y el programa generó automáticamente una imagen combinada.

Para la tinción de focos de 53BP1, se captaron de forma aleatoria al menos 100 núcleos por muestra y condición de oxígeno y para la tinción de α tubulina se captaron de forma aleatoria entre 32-50 usos mitóticos por línea y condición de oxígeno. Se consideraron metafases multipolares aquellas que presentaban más de dos focos de concentración de microtúbulos (centrosomas) en la estructura mitótica.

XII. Medidas de actividad metabólica

Para determinar la actividad metabólica de las hMSC en cultivo y conocer el grado de consumo de oxígeno y actividad glucolítica, se utilizaron dos técnicas experimentales. La primera de ellas se realizó mediante un analizador de flujo extracelular de acidificación del medio y presencia de oxígeno molecular “Seahorse XF Extracelular Flux Analyzer” (Seahorse, North Billerica, MA, US) que permite cuantificar la actividad glucolítica y el consumo de oxígeno directamente sobre el cultivo; y la segunda mediante detección directa de acumulación de lactato en las células.

12.1 Detección de acidificación del medio y consumo de oxígeno (Seahorse)

12.1.1 Preparación de las placas

Siguiendo las instrucciones del fabricante, 48 horas antes de realizar las medidas, se sembraron las hMSC crecidas en ambas concentraciones de oxígeno con DMEM completo a una densidad de 5×10^3 células/cm² en una placa de 96 pocillos (XF96, Seahorse). Por otro lado, 24 hora antes de realizar las medidas, se equilibró la placa sensora de 96 electrodos (XF sensor cartridge hydration, Seahorse) con 200 µl de solución de calibración a PH 7,4 (Seahorse Bioscience calibrant, Seahorse) mediante incubación a 37°C en ausencia de CO₂ en una cámara de preparación (Prep Station, Seahorse). Igualmente, se preparó medio de cultivo carente de suero y bicarbonato para evitar el efecto tampón que ejercen estos compuestos sobre la acidificación del medio. El medio de cultivo se preparó a pH 7,4 con 1XDMEM en polvo sin glucosa (Sigma-Aldrich), 2mM de L-glutamina (Lonza), 1mM de piruvato sódico (Lonza), 1% de rojo fenol (Sigma-Aldrich) y 10⁵U/ml de penicilina/estreptomina (Lonza) y se almacenó a 4°C hasta su uso.

12.1.2 Obtención de las medidas experimentales

Antes de realizar las medidas en las placas XF96, se reemplazó el medio de cultivo DMEM-completo por DMEM sin suero y sin bicarbonato y se incubaron las placas en la cámara de preparación (Prep Station, Seahorse) durante 15 minutos a 37°C en ausencia de CO₂. Posteriormente, se adaptó la placa sensora ya calibrada a la placa de cultivo y se introdujo en el analizador “Seahorse XF Extracelular Flux Analyzer” (Seahorse) para proceder con las medidas de consumo de oxígeno y acidificación del medio. Para inducir el bloqueo de la fosforilación oxidativa mediante la inhibición de la fracción F₀ de la ATP sintasa se usó 10 µM de oligomicina (Sigma-Aldrich) y para el desacoplamiento de la respiración

mitocondrial se usó 130 μ M de dinitrofenol (DNP, Sigma-Aldrich), siguiendo las instrucciones del fabricante.

12.1.3 Generación de datos

Se realizaron ocho replicas por línea celular y condición de oxígeno y los datos se presentaron como medias y desviación estándar de la media en cada uno de los puntos analizados a lo largo del tiempo en cada una de las líneas de hMSC.

12.2 Medición de lactato intracelular

Para el desarrollo de este ensayo, los cultivos de hMSC llegados a subconfluencia se levantaron mediante tripsinización en cada uno de los pases respectivos, se contabilizaron pos cámara de Neubauer y se lavaron dos veces con PBS a 4°C mediante centrifugación a 300Xg. Tras los lavados, se generaron precipitados celulares (*pellets*) los cuales se guardaron a -80°C hasta su posterior uso. Para medir la concentración de lactato intracelular se utilizó el kit "*Lactate Colorimetric Assay Kit*" (Abcam, Cambridge, MA) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, el precipitado celular se resuspendió en "*Lactate Assay Buffer*" a una concentración de 1,0x10⁴ células/ μ l y separadamente se preparó una curva de reacción añadiendo concentraciones crecientes de lactato de 0-10 nmol/pocillo en un volumen final de 50 μ l. Se incubaron los 50 μ l de la curva de reacción y de la suspensión celular en placas de 96 pocillos con 50 μ l de "*Reaction Mix*" durante 30 minutos a TA en oscuridad. Posteriormente se midió la densidad óptica de cada muestra a 450nm en un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark Plus Bio-Rad). Se analizaron las cuatro muestras de hMSC por triplicado y la concentración de lactato se expreso en unidades relativas al número de células por pocillo.

XIII. Análisis estadístico

La mayoría de los datos presentados en este trabajo se muestran como la media \pm desviación estándar de la media usando cuatro o tres líneas independientes de hMSC. La significancia estadística se determinó por la prueba de t de *Student* comparando muestras pareadas considerando una *P < 0,05 como estadísticamente significativo. Excepcionalmente, en aquellos experimentos realizados con una única línea (tratamientos con PQ y H₂O₂) los datos se presentaron como frecuencias \pm desviación estándar. La significancia estadística se determinó mediante test de Fisher calculando las frecuencias esperadas si las muestras a analizar fuesen independientes y se considero *P < 0,05 como estadísticamente significativo. Para el análisis estadístico se usó el programa informático "*software GraphPad Prism*".

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, I., Tang, L., and Pham, H. (2000). Identification of neural progenitors in the adult mammalian eye. *Biochem Biophys Res Commun* 270, 517-521.
- Ahmed, S., Passos, J.F., Birket, M.J., Beckmann, T., Brings, S., Peters, H., Birch-Machin, M.A., von Zglinicki, T., and Saretzki, G. (2008). Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *J Cell Sci* 121, 1046-1053.
- Ahrlund-Richter, L., De Luca, M., Marshak, D.R., Munsie, M., Veiga, A., and Rao, M. (2009). Isolation and production of cells suitable for human therapy: challenges ahead. *Cell stem cell* 4, 20-26.
- Albayrak, T., and Grimm, S. (2003). A high-throughput screen for single gene activities: isolation of apoptosis inducers. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 772-776.
- Allen, R.G., Tresini, M., Keogh, B.P., Doggett, D.L., and Cristofalo, V.J. (1999). Differences in electron transport potential, antioxidant defenses, and oxidant generation in young and senescent fetal lung fibroblasts (WI-38). *Journal of cellular physiology* 180, 114-122.
- Allsopp, R.C., Vaziri, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E.V., Futcher, A.B., Greider, C.W., and Harley, C.B. (1992). Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 10114-10118.
- Alvarez, S., Valdez, L.B., Zaobornyj, T., and Boveris, A. (2003). Oxygen dependence of mitochondrial nitric oxide synthase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 771-775.
- Artandi, S.E., Chang, S., Lee, S.L., Alson, S., Gottlieb, G.J., Chin, L., and DePinho, R.A. (2000). Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406, 641-645.
- Atamna, H., Paler-Martinez, A., and Ames, B.N. (2000). N-t-butyl hydroxylamine, a hydrolysis product of alpha-phenyl-N-t-butyl nitron, is more potent in delaying senescence in human lung fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 275, 6741-6748.
- Atkuri, K.R., Herzenberg, L.A., Niemi, A.K., and Cowan, T. (2007). Importance of culturing primary lymphocytes at physiological oxygen levels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 4547-4552.
- Augello, A., Kurth, T.B., and De Bari, C. (2010). Mesenchymal stem cells: a perspective from in vitro cultures to in vivo migration and niches. *European cells & materials* 20, 121-133.
- Ayouaz, A., Raynaud, C., Heride, C., Revaud, D., and Sabatier, L. (2008). Telomeres: hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie* 90, 60-72.
- Baker, D.E., Harrison, N.J., Maltby, E., Smith, K., Moore, H.D., Shaw, P.J., Heath, P.R., Holden, H., and Andrews, P.W. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis in vivo. *Nature biotechnology* 25, 207-215.
- Baksh, D., Yao, R., and Tuan, R.S. (2007). Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow. *Stem Cells* 25, 1384-1392.
- Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.

- Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000). Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol* 28, 707-715.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Lontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.V., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* 444, 633-637.
- Bayreuther, K., Rodemann, H.P., Hommel, R., Dittmann, K., Albiez, M., and Francz, P.I. (1988). Human skin fibroblasts in vitro differentiate along a terminal cell lineage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, 5112-5116.
- Beausejour, C.M., Krtolica, A., Galimi, F., Narita, M., Lowe, S.W., Yaswen, P., and Campisi, J. (2003). Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J* 22, 4212-4222.
- Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1997). Oxidative decay of DNA. *The Journal of biological chemistry* 272, 19633-19636.
- Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1998). The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78, 547-581.
- Behfar, A., and Terzic, A. (2006). Derivation of a cardiopoietic population from human mesenchymal stem cells yields cardiac progeny. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 3 Suppl 1, S78-82.
- Beltrami, A.P., Barlucchi, L., Torella, D., Baker, M., Limana, F., Chimenti, S., Kasahara, H., Rota, M., Musso, E., Urbanek, K., *et al.* (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell* 114, 763-776.
- Ben-David, U., Mayshar, Y., and Benvenisty, N. (2011). Large-scale analysis reveals acquisition of lineage-specific chromosomal aberrations in human adult stem cells. *Cell stem cell* 9, 97-102.
- Ben-Porath, I., and Weinberg, R.A. (2005). The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 961-976.
- Bernardo, M.E., Zaffaroni, N., Novara, F., Cometa, A.M., Avanzini, M.A., Moretta, A., Montagna, D., Maccario, R., Villa, R., Daidone, M.G., *et al.* (2007). Human bone marrow derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms. *Cancer research* 67, 9142-9149.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P.G. (2001). Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19, 180-192.
- Bianco, P., Robey, P.G., and Simmons, P.J. (2008). Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell* 2, 313-319.
- Bieback, K., Kern, S., Kocaomer, A., Ferlik, K., and Bugert, P. (2008). Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng* 18, S71-76.
- Birket, M.J., Passos, J.F., von Zglinicki, T., and Birch-Machin, M.A. (2009). The relationship between the aging- and photo-dependent T414G mitochondrial DNA mutation with cellular senescence and reactive oxygen species production in cultured skin fibroblasts. *J Invest Dermatol* 129, 1361-1366.
- Blackburn, E.H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573.

- Blackburn, E.H. (2000). Telomere states and cell fates. *Nature* 408, 53-56.
- Blackburn, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106, 661-673.
- Blasco, M.A. (2005). Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *EMBO J* 24, 1095-1103.
- Bock, C., Kiskinis, E., Verstappen, G., Gu, H., Boulting, G., Smith, Z.D., Ziller, M., Croft, G.F., Amoroso, M.W., Oakley, D.H., *et al.* (2011). Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144, 439-452.
- Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., and Wright, W.E. (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279, 349-352.
- Bohr, V.A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic Biol Med* 32, 804-812.
- Bonab, M.M., Alimoghaddam, K., Talebian, F., Ghaffari, S.H., Ghavamzadeh, A., and Nikbin, B. (2006). Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC cell biology* 7, 14.
- Bongso, A., and Lee, E.H. (2005). *Stem cells : from bench to bedside* (Singapore ; Hackensack, NJ ; London: World Scientific).
- Bork, S., Pfister, S., Witt, H., Horn, P., Korn, B., Ho, A.D., and Wagner, W. (2010). DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Aging cell* 9, 54-63.
- Boveris, A. (1984). Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol* 105, 429-435.
- Boveris, A., and Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134, 707-716.
- Brack, C., Lithgow, G., Osiewacz, H., and Toussaint, O. (2000). EMBO WORKSHOP REPORT: Molecular and cellular gerontology Serpiano, Switzerland, September 18-22, 1999. *EMBO J* 19, 1929-1934.
- Bracken, A.P., Kleine-Kohlbrecher, D., Dietrich, N., Pasini, D., Gargiulo, G., Beekman, C., Theilgaard-Monch, K., Minucci, S., Porse, B.T., Marine, J.C., *et al.* (2007). The Polycomb group proteins bind throughout the INK4A-ARF locus and are disassociated in senescent cells. *Genes & development* 21, 525-530.
- Brahimi-Horn, M.C., and Pouyssegur, J. (2007). Oxygen, a source of life and stress. *FEBS letters* 581, 3582-3591.
- Brown, G.C., and Borutaite, V. (2001). Nitric oxide, mitochondria, and cell death. *IUBMB Life* 52, 189-195.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N., and Haynesworth, S.E. (1997). Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 64, 278-294.
- Bruick, R.K. (2000). Expresión of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 9082-9087.

- Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell metabolism* 1, 409-414.
- Bulavin, D.V., Phillips, C., Nannenga, B., Timofeev, O., Donehower, L.A., Anderson, C.W., Appella, E., and Fornace, A.J., Jr. (2004). Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* 36, 343-350.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., and Chen, D.J. (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry* 276, 42462-42467.
- Busuttil, R.A., Rubio, M., Dolle, M.E., Campisi, J., and Vijg, J. (2003). Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging cell* 2, 287-294.
- Campagnoli, C., Roberts, I.A., Kumar, S., Bennett, P.R., Bellantuono, I., and Fisk, N.M. (2001). Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood* 98, 2396-2402.
- Campisi, J. (2000). Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo* 14, 183-188.
- Campisi, J. (2003). Cellular senescence and apoptosis: how cellular responses might influence aging phenotypes. *Exp Gerontol* 38, 5-11.
- Campisi, J., and d'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nature reviews Molecular cell biology* 8, 729-740.
- Canela, A., Vera, E., Klatt, P., and Blasco, M.A. (2007). High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 5300-5305.
- Caplan, A.I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Carrancio, S., Lopez-Holgado, N., Sanchez-Guijo, F.M., Villaron, E., Barbado, V., Tabera, S., Diez-Campelo, M., Blanco, J., San Miguel, J.F., and Del Canizo, M.C. (2008). Optimization of mesenchymal stem cell expansion procedures by cell separation and culture conditions modification. *Exp Hematol* 36, 1014-1021.
- Carrel, A. (1912). Pure Cultures of Cells. *J Exp Med* 16, 165-168.
- Carswell, K.S., Weiss, J.W., and Papoutsakis, E.T. (2000). Low oxygen tension enhances the stimulation and proliferation of human T lymphocytes in the presence of IL-2. *Cytotherapy* 2, 25-37.
- Cawthon, R.M., Smith, K.R., O'Brien, E., Sivatchenko, A., and Kerber, R.A. (2003). Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 361, 393-395.
- Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59, 527-605.
- Chandel, N.S., and Budinger, G.R. (2007). The cellular basis for diverse responses to oxygen. *Free Radic Biol Med* 42, 165-174.
- Chandel, N.S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C.E., Simon, M.C., and Schumacker, P.T. (1998). Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 11715-11720.

- Chen, Q., Fischer, A., Reagan, J.D., Yan, L.J., and Ames, B.N. (1995). Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 4337-4341.
- Chen, Q., Vazquez, E.J., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *The Journal of biological chemistry* *278*, 36027-36031.
- Chen, Q.M., Bartholomew, J.C., Campisi, J., Acosta, M., Reagan, J.D., and Ames, B.N. (1998). Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication. *Biochem J* *332* (Pt 1), 43-50.
- Chen, Q.M., Prowse, K.R., Tu, V.C., Purdom, S., and Linskens, M.H. (2001). Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts. *Experimental cell research* *265*, 294-303.
- Chen, W., Hayward, C., Wright, A.F., Hicks, A.A., Vitart, V., Knott, S., Wild, S.H., Pramstaller, P.P., Wilson, J.F., Rudan, I., *et al.* (2011). Copy number variation across European populations. *PLoS one* *6*, e23087.
- Chicas, A., Wang, X., Zhang, C., McCurrach, M., Zhao, Z., Mert, O., Dickins, R.A., Narita, M., Zhang, M., and Lowe, S.W. (2010). Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence. *Cancer cell* *17*, 376-387.
- Chiu, C.P., and Harley, C.B. (1997). Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med* *214*, 99-106.
- Choi, J., Southworth, L.K., Sarin, K.Y., Venteicher, A.S., Ma, W., Chang, W., Cheung, P., Jun, S., Artandi, M.K., Shah, N., *et al.* (2008). TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS genetics* *4*, e10.
- Choudhury, A.R., Ju, Z., Djojotubroto, M.W., Schienke, A., Lechel, A., Schaetzlein, S., Jiang, H., Stepczynska, A., Wang, C., Buer, J., *et al.* (2007). Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation. *Nat Genet* *39*, 99-105.
- Clayton, D.A., Doda, J.N., and Friedberg, E.C. (1974). The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *71*, 2777-2781.
- Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* *130*, 223-233.
- Collado, M., and Serrano, M. (2010). Senescence in tumours: evidence from mice and humans. *Nature reviews Cancer* *10*, 51-57.
- Collins, K., and Mitchell, J.R. (2002). Telomerase in the human organism. *Oncogene* *21*, 564-579.
- Cong, Y., and Shay, J.W. (2008). Actions of human telomerase beyond telomeres. *Cell research* *18*, 725-732.
- Cooper, P.D., Burt, A.M., and Wilson, J.N. (1958). Critical effect of oxygen tension on rate of growth of animal cells in continuous suspended culture. *Nature* *182*, 1508-1509.
- Coppe, J.P., Patil, C.K., Rodier, F., Sun, Y., Munoz, D.P., Goldstein, J., Nelson, P.S., Desprez, P.Y., and Campisi, J. (2008). Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS biology* *6*, 2853-2868.

- Counter, C.M., Avilion, A.A., LeFeuvre, C.E., Stewart, N.G., Greider, C.W., Harley, C.B., and Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 11, 1921-1929.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes & development* 20, 557-570.
- Crabbe, L., Verdun, R.E., Haggblom, C.I., and Karlseder, J. (2004). Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306, 1951-1953.
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., *et al.* (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* 3, 301-313.
- Croteau, D.L., Stierum, R.H., and Bohr, V.A. (1999). Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat Res* 434, 137-148.
- d'Adda di Fagagna, F., Reaper, P.M., Clay-Farrace, L., Fiegler, H., Carr, P., Von Zglinicki, T., Saretzki, G., Carter, N.P., and Jackson, S.P. (2003). A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426, 194-198.
- Das, J. (2006). The role of mitochondrial respiration in physiological and evolutionary adaptation. *Bioessays* 28, 890-901.
- Davoli, T., Denchi, E.L., and de Lange, T. (2010). Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 141, 81-93.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., and Luyten, F.P. (2001a). Human periosteum-derived cells maintain phenotypic stability and chondrogenic potential throughout expansion regardless of donor age. *Arthritis Rheum* 44, 85-95.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F.P. (2001b). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44, 1928-1942.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J.R., Raymackers, J.M., and Luyten, F.P. (2003). Skeletal muscle repair by adult human mesenchymal stem cells from synovial membrane. *J Cell Biol* 160, 909-918.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I.M., Archer, C.W., Jones, E.A., McGonagle, D., Mitsiadis, T.A., Pitzalis, C., *et al.* (2006). Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 54, 1209-1221.
- de Lange, T. (2002). Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21, 532-540.
- de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development* 19, 2100-2110.
- de Lange, T. (2009). How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326, 948-952.
- De Lange, T., Lundblad, V., and Blackburn, E.H. (2006). *Telomeres*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- de Pauw, E.S., Verwoerd, N.P., Duinkerken, N., Willemze, R., Raap, A.K., Fibbe, W.E., and Tanke, H.J. (1998). Assessment of telomere length in hematopoietic interphase cells using in situ hybridization and digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 32, 163-169.

- Deaven, L.L., and Kreizinger, J.D. (1971). Cell fusion as a mechanism for the origin of polyploid cells in vitro. *Experientia* 27, 311-313.
- Denchi, E.L. (2009). Give me a break: how telomeres suppress the DNA damage response. *DNA Repair (Amst)* 8, 1118-1126.
- Devasagayam, T.P., Tilak, J.C., Bolor, K.K., Sane, K.S., Ghaskadbi, S.S., and Lele, R.D. (2004). Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *J Assoc Physicians India* 52, 794-804.
- Dezawa, M., Kanno, H., Hoshino, M., Cho, H., Matsumoto, N., Itokazu, Y., Tajima, N., Yamada, H., Sawada, H., Ishikawa, H., *et al.* (2004). Specific induction of neuronal cells from bone marrow stromal cells and application for autologous transplantation. *J Clin Invest* 113, 1701-1710.
- Di Leonardo, A., Linke, S.P., Clarkin, K., and Wahl, G.M. (1994). DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes & development* 8, 2540-2551.
- Di Micco, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre, M., Nuciforo, P.G., Bensimon, A., *et al.* (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* 444, 638-642.
- Dickerson, R.E., and Geis, I. (1983). *Hemoglobin : structure, function, evolution, and pathology* (Menlo Park, Calif.: Benjamin/Cummings Pub. Co.).
- Dimri, G.P., Itahana, K., Acosta, M., and Campisi, J. (2000). Regulation of a senescence checkpoint response by the E2F1 transcription factor and p14(ARF) tumor suppressor. *Mol Cell Biol* 20, 273-285.
- Dimri, G.P., Lee, X., Basile, G., Acosta, M., Scott, G., Roskelley, C., Medrano, E.E., Linskens, M., Rubelj, I., Pereira-Smith, O., *et al.* (1995). A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 9363-9367.
- Doetsch, F., Caille, I., Lim, D.A., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (1999). Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 97, 703-716.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Downey, M., and Durocher, D. (2006). gammaH2AX as a checkpoint maintenance signal. *Cell Cycle* 5, 1376-1381.
- Dowthwaite, G.P., Bishop, J.C., Redman, S.N., Khan, I.M., Rooney, P., Evans, D.J., Haughton, L., Bayram, Z., Boyer, S., Thomson, B., *et al.* (2004). The surface of articular cartilage contains a progenitor cell population. *J Cell Sci* 117, 889-897.
- Draper, J.S., Smith, K., Gokhale, P., Moore, H.D., Maltby, E., Johnson, J., Meisner, L., Zwaka, T.P., Thomson, J.A., and Andrews, P.W. (2004). Recurrent gain of chromosomes 17q and 12 in cultured human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 22, 53-54.
- Duggal, S., and Brinchmann, J.E. (2011). Importance of serum source for the in vitro replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Journal of cellular physiology* 226, 2908-2915.
- Edgar, B.A., and Orr-Weaver, T.L. (2001). Endoreplication cell cycles: more for less. *Cell* 105, 297-306.

- Eliasson, P., and Jonsson, J.I. (2010). The hematopoietic stem cell niche: low in oxygen but a nice place to be. *Journal of cellular physiology* 222, 17-22.
- Elledge, S.J. (1996). Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 274, 1664-1672.
- Ema, M., Hirota, K., Mimura, J., Abe, H., Yodoi, J., Sogawa, K., Poellinger, L., and Fujii-Kuriyama, Y. (1999). Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1 α in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J* 18, 1905-1914.
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., and Cawthon, R.M. (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 17312-17315.
- Epstein, C.J. (1967). Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the Mammalian liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 57, 327-334.
- Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.
- Estrada, J.C., Albo, C., Benguria, A., Dopazo, A., Lopez-Romero, P., Carrera-Quintanar, L., Roche, E., Clemente, E.P., Enriquez, J.A., Bernad, A., *et al.* (2011). Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell death and differentiation*.
- Falanga, V., and Kirsner, R.S. (1993). Low oxygen stimulates proliferation of fibroblasts seeded as single cells. *Journal of cellular physiology* 154, 506-510.
- Farmer, S.R. (2006). Transcriptional control of adipocyte formation. *Cell metabolism* 4, 263-273.
- Fehrer, C., Brunauer, R., Laschober, G., Unterluggauer, H., Reitingner, S., Kloss, F., Gully, C., Gassner, R., and Lepperdinger, G. (2007). Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging cell* 6, 745-757.
- Fernandez-Capetillo, O., Celeste, A., and Nussenzweig, A. (2003). Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. *Cell Cycle* 2, 426-427.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P.J., Morales, J.C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R.D., Motoyama, N., *et al.* (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol* 4, 993-997.
- Finkel, T., and Holbrook, N.J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Finkel, T., Serrano, M., and Blasco, M.A. (2007). The common biology of cancer and ageing. *Nature* 448, 767-774.
- Fischer, B., and Bavister, B.D. (1993). Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 99, 673-679.
- Flores, I., and Blasco, M.A. (2010). The role of telomeres and telomerase in stem cell aging. *FEBS letters* 584, 3826-3830.
- Forsyth, N.R., Evans, A.P., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2003). Developmental differences in the immortalization of lung fibroblasts by telomerase. *Aging cell* 2, 235-243.

- Forsyth, N.R., Musio, A., Vezzoni, P., Simpson, A.H., Noble, B.S., and McWhir, J. (2006). Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning Stem Cells* 8, 16-23.
- Frantz, S. (2012). Embryonic stem cell pioneer Geron exits field, cuts losses. *Nature biotechnology* 30, 12-13.
- Friedenstein, A.J., Gorskaja, J.F., and Kulagina, N.N. (1976). Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4, 267-274.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111-122.
- Furumoto, K., Inoue, E., Nagao, N., Hiyama, E., and Miwa, N. (1998). Age-dependent telomere shortening is slowed down by enrichment of intracellular vitamin C via suppression of oxidative stress. *Life Sci* 63, 935-948.
- Gajewski, E., Rao, G., Nackerdien, Z., and Dizdaroglu, M. (1990). Modification of DNA bases in mammalian chromatin by radiation-generated free radicals. *Biochemistry* 29, 7876-7882.
- Garcia, S., Bernad, A., Martin, M.C., Cigudosa, J.C., Garcia-Castro, J., and de la Fuente, R. (2010). Pitfalls in spontaneous in vitro transformation of human mesenchymal stem cells. *Experimental cell research* 316, 1648-1650.
- Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., and Fisher, S.J. (1997). Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science* 277, 1669-1672.
- Gensler, H.L., and Bernstein, H. (1981). DNA damage as the primary cause of aging. *Q Rev Biol* 56, 279-303.
- Giaccia, A., Siim, B.G., and Johnson, R.S. (2003). HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2, 803-811.
- Giaccia, A.J., Simon, M.C., and Johnson, R. (2004). The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes & development* 18, 2183-2194.
- Gil, J., and Peters, G. (2006). Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nature reviews Molecular cell biology* 7, 667-677.
- Gisselsson, D. (2005). Mitotic instability in cancer: is there method in the madness? *Cell Cycle* 4, 1007-1010.
- Giulivi, C., Boveris, A., and Cadenas, E. (1995). Hydroxyl radical generation during mitochondrial electron transfer and the formation of 8-hydroxydesoxyguanosine in mitochondrial DNA. *Arch Biochem Biophys* 316, 909-916.
- Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A., Rieger, G., and Margreiter, R. (1998). Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. *J Exp Biol* 201, 1129-1139.
- Goldring, C.E., Duffy, P.A., Benvenisty, N., Andrews, P.W., Ben-David, U., Eakins, R., French, N., Hanley, N.A., Kelly, L., Kitteringham, N.R., *et al.* (2011). Assessing the safety of stem cell therapeutics. *Cell stem cell* 8, 618-628.
- Gonzalo, R., Garcia-Arumi, E., Llige, D., Marti, R., Solano, A., Montoya, J., Arenas, J., and Andreu, A.L. (2005). Free radicals-mediated damage in transmitochondrial cells harboring the T14487C mutation in the ND6 gene of mtDNA. *FEBS letters* 579, 6909-6913.

- Goodarzi, A.A., Block, W.D., and Lees-Miller, S.P. (2003). The role of ATM and ATR in DNA damage-induced cell cycle control. *Prog Cell Cycle Res* 5, 393-411.
- Gore, A., Li, Z., Fung, H.L., Young, J.E., Agarwal, S., Antosiewicz-Bourget, J., Canto, I., Giorgetti, A., Israel, M.A., Kiskinis, E., *et al.* (2011). Somatic coding mutations in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471, 63-67.
- Gorgoulis, V.G., Vassiliou, L.V., Karakaidos, P., Zacharatos, P., Kotsinas, A., Liloglou, T., Venere, M., Dittullo, R.A., Jr., Kastrinakis, N.G., Levy, B., *et al.* (2005). Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434, 907-913.
- Gorla, G.R., Malhi, H., and Gupta, S. (2001). Polyploidy associated with oxidative injury attenuates proliferative potential of cells. *J Cell Sci* 114, 2943-2951.
- Grayson, W.L., Zhao, F., Bunnell, B., and Ma, T. (2007). Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* 358, 948-953.
- Griendling, K.K., and FitzGerald, G.A. (2003). Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108, 1912-1916.
- Griffith, J.D., Comeau, L., Rosenfield, S., Stansel, R.M., Bianchi, A., Moss, H., and de Lange, T. (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97, 503-514.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P.G., and Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13625-13630.
- Gu, Y.Z., Hogenesch, J.B., and Bradfield, C.A. (2000). The PAS superfamily: sensors of environmental and developmental signals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 519-561.
- Guerriero, R., Mattia, G., Testa, U., Chelucci, C., Macioce, G., Casella, I., Samoggia, P., Peschle, C., and Hassan, H.J. (2001). Stromal cell-derived factor 1alpha increases polyploidization of megakaryocytes generated by human hematopoietic progenitor cells. *Blood* 97, 2587-2595.
- Guo, Z., Li, H., Li, X., Yu, X., Wang, H., Tang, P., and Mao, N. (2006). In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells* 24, 992-1000.
- Gupta, S. (2000). Hepatic polyploidy and liver growth control. *Semin Cancer Biol* 10, 161-171.
- Gustafsson, M.V., Zheng, X., Pereira, T., Gradin, K., Jin, S., Lundkvist, J., Ruas, J.L., Poellinger, L., Lendahl, U., and Bondesson, M. (2005). Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 9, 617-628.
- Guyton, A.C. (1966). *Textbook of medical physiology*, 3d edn (Philadelphia,: Saunders).
- Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., and Schumacker, P.T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell metabolism* 1, 401-408.
- Haendeler, J., Drose, S., Buchner, N., Jakob, S., Altschmied, J., Goy, C., Spyridopoulos, I., Zeiher, A.M., Brandt, U., and Dimmeler, S. (2009). Mitochondrial telomerase reverse transcriptase binds to and protects mitochondrial DNA and function from damage. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29, 929-935.
- Hahn, W.C., and Weinberg, R.A. (2002). Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 347, 1593-1603.

- Hainaut, P., and Mann, K. (2001). Zinc binding and redox control of p53 structure and function. *Antioxid Redox Signal* 3, 611-623.
- Halme, D.G., and Kessler, D.A. (2006). FDA regulation of stem-cell-based therapies. *N Engl J Med* 355, 1730-1735.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Harley, C.B., Futcher, A.B., and Greider, C.W. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345, 458-460.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 11, 298-300.
- Harman, D. (2009). Origin and evolution of the free radical theory of aging: a brief personal history, 1954-2009. *Biogerontology* 10, 773-781.
- Hayflick, L., and Moorhead, P.S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Experimental cell research* 25, 585-621.
- Hemann, M.T., Strong, M.A., Hao, L.Y., and Greider, C.W. (2001). The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107, 67-77.
- Henle, E.S., Han, Z., Tang, N., Rai, P., Luo, Y., and Linn, S. (1999). Sequence-specific DNA cleavage by Fe²⁺-mediated fenton reactions has possible biological implications. *The Journal of biological chemistry* 274, 962-971.
- Herbert, B.S., Hochreiter, A.E., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2006). Nonradioactive detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nat Protoc* 1, 1583-1590.
- Herbert, B.S., Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). p16(INK4a) inactivation is not required to immortalize human mammary epithelial cells. *Oncogene* 21, 7897-7900.
- Herbig, U., Ferreira, M., Condel, L., Carey, D., and Sedivy, J.M. (2006). Cellular senescence in aging primates. *Science* 311, 1257.
- Herbig, U., Jobling, W.A., Chen, B.P., Chen, D.J., and Sedivy, J.M. (2004). Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Mol Cell* 14, 501-513.
- Hermann, A., Gastl, R., Liebau, S., Popa, M.O., Fiedler, J., Boehm, B.O., Maisel, M., Lerche, H., Schwarz, J., Brenner, R., *et al.* (2004). Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci* 117, 4411-4422.
- Hernandez, L.D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T.G., and White, J.M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 627-661.
- Herzog, E.L., Chai, L., and Krause, D.S. (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102, 3483-3493.
- Hixon, M.L., Obejero-Paz, C., Muro-Cacho, C., Wagner, M.W., Millie, E., Nagy, J., Hassold, T.J., and Gualberto, A. (2000). Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization. *The Journal of biological chemistry* 275, 40434-40442.
- Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., and Shay, J.W. (2001). Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia* 3, 17-26.

- Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N Engl J Med* 361, 1475-1485.
- Hoffman, D.L., Salter, J.D., and Brookes, P.S. (2007). Response of mitochondrial reactive oxygen species generation to steady-state oxygen tension: implications for hypoxic cell signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292, H101-108.
- Hussein, S.M., Batada, N.N., Vuoristo, S., Ching, R.W., Autio, R., Narva, E., Ng, S., Sourour, M., Hamalainen, R., Olsson, C., *et al.* (2011). Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471, 58-62.
- Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stockl, P., Jansen-Durr, P., and Gnaiger, E. (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem J* 380, 919-928.
- Hyun, I., Lindvall, O., Ahrlund-Richter, L., Cattaneo, E., Cavazzana-Calvo, M., Cossu, G., De Luca, M., Fox, I.J., Gerstle, C., Goldstein, R.A., *et al.* (2008). New ISSCR guidelines underscore major principles for responsible translational stem cell research. *Cell stem cell* 3, 607-609.
- Ichikawa, D., Hashimoto, N., Hoshima, M., Yamaguchi, T., Sawai, K., Nakamura, Y., Takahashi, T., Abe, T., and Inazawa, J. (1996). Analysis of numerical aberrations of specific chromosomes by fluorescent in situ hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. *Cancer* 77, 2064-2069.
- In 't Anker, P.S., Scherjon, S.A., Kleijburg-van der Keur, C., Noort, W.A., Claas, F.H., Willemze, R., Fibbe, W.E., and Kanhai, H.H. (2003). Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102, 1548-1549.
- Indran, I.R., Hande, M.P., and Pervaiz, S. (2011). hTERT overexpression alleviates intracellular ROS production, improves mitochondrial function, and inhibits ROS-mediated apoptosis in cancer cells. *Cancer research* 71, 266-276.
- Iourov, I.Y., Vorsanova, S.G., and Yurov, Y.B. (2008). Chromosomal mosaicism goes global. *Mol Cytogenet* 1, 26.
- Iourov, I.Y., Vorsanova, S.G., and Yurov, Y.B. (2010). Somatic genome variations in health and disease. *Current genomics* 11, 387-396.
- Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., and Goldschmidt-Clermont, P.J. (1997). Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. *Science* 275, 1649-1652.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., *et al.* (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med* 12, 446-451.
- Ivan, M., Haberberger, T., Gervasi, D.C., Michelson, K.S., Gunzler, V., Kondo, K., Yang, H., Sorokina, I., Conaway, R.C., Conaway, J.W., *et al.* (2002). Biochemical purification and pharmacological inhibition of a mammalian prolyl hydroxylase acting on hypoxia-inducible factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 13459-13464.
- Ivanovic, Z. (2009). Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm. *Journal of cellular physiology* 219, 271-275.
- Iwasa, H., Han, J., and Ishikawa, F. (2003). Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes Cells* 8, 131-144.

- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., *et al.* (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes & development* 12, 149-162.
- Izadpanah, R., Kaushal, D., Kriedt, C., Tsien, F., Patel, B., Dufour, J., and Bunnell, B.A. (2008). Long-term in vitro expansion alters the biology of adult mesenchymal stem cells. *Cancer research* 68, 4229-4238.
- Izadpanah, R., Trygg, C., Patel, B., Kriedt, C., Dufour, J., Gimble, J.M., and Bunnell, B.A. (2006). Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 99, 1285-1297.
- Jacobs, J.J., and de Lange, T. (2004). Significant role for p16INK4a in p53-independent telomere-directed senescence. *Curr Biol* 14, 2302-2308.
- Jacobs, J.J., Kieboom, K., Marino, S., DePinho, R.A., and van Lohuizen, M. (1999). The oncogene and Polycomb-group gene *bmi-1* regulates cell proliferation and senescence through the *ink4a* locus. *Nature* 397, 164-168.
- Jacobs, P.A., Brunton, M., Court Brown, W.M., Doll, R., and Goldstein, H. (1963). Change of human chromosome count distribution with age: evidence for a sex differences. *Nature* 197, 1080-1081.
- Janes, S.M., Lowell, S., and Hutter, C. (2002). Epidermal stem cells. *J Pathol* 197, 479-491.
- Janzen, V., Forkert, R., Fleming, H.E., Saito, Y., Waring, M.T., Dombkowski, D.M., Cheng, T., DePinho, R.A., Sharpless, N.E., and Scadden, D.T. (2006). Stem-cell ageing modified by the cyclin-dependent kinase inhibitor p16INK4a. *Nature* 443, 421-426.
- Jarrard, D.F., Sarkar, S., Shi, Y., Yeager, T.R., Magrane, G., Kinoshita, H., Nassif, N., Meisner, L., Newton, M.A., Waldman, F.M., *et al.* (1999). p16/pRb pathway alterations are required for bypassing senescence in human prostate epithelial cells. *Cancer research* 59, 2957-2964.
- Jensen, P., Gramsbergen, J.B., Zimmer, J., Widmer, H.R., and Meyer, M. (2011). Enhanced proliferation and dopaminergic differentiation of ventral mesencephalic precursor cells by synergistic effect of FGF2 and reduced oxygen tension. *Experimental cell research* 317, 1649-1662.
- Jiang, B.H., Semenza, G.L., Bauer, C., and Marti, H.H. (1996). Hypoxia-inducible factor 1 levels vary exponentially over a physiologically relevant range of O₂ tension. *Am J Physiol* 271, C1172-1180.
- Jiang, X.R., Jimenez, G., Chang, E., Frolkis, M., Kusler, B., Sage, M., Beeche, M., Bodnar, A.G., Wahl, G.M., Tlsty, T.D., *et al.* (1999). Telomerase expression in human somatic cells does not induce changes associated with a transformed phenotype. *Nat Genet* 21, 111-114.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jones, E.A., English, A., Henshaw, K., Kinsey, S.E., Markham, A.F., Emery, P., and McGonagle, D. (2004). Enumeration and phenotypic characterization of synovial fluid multipotential mesenchymal progenitor cells in inflammatory and degenerative arthritis. *Arthritis Rheum* 50, 817-827.
- Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. (2002). Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* 46, 3349-3360.
- Jori, F.P., Napolitano, M.A., Melone, M.A., Cipollaro, M., Cascino, A., Altucci, L., Peluso, G., Giordano, A., and Galderisi, U. (2005). Molecular pathways involved in neural in vitro differentiation of marrow stromal stem cells. *J Cell Biochem* 94, 645-655.

- Kaelin, W.G., Jr. (2005). ROS: really involved in oxygen sensing. *Cell metabolism* 1, 357-358.
- Kaidi, A., Williams, A.C., and Paraskeva, C. (2007). Interaction between beta-catenin and HIF-1 promotes cellular adaptation to hypoxia. *Nat Cell Biol* 9, 210-217.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O.P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J.W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992). Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* 258, 818-821.
- Karanjawala, Z.E., Murphy, N., Hinton, D.R., Hsieh, C.L., and Lieber, M.R. (2002). Oxygen metabolism causes chromosome breaks and is associated with the neuronal apoptosis observed in DNA double-strand break repair mutants. *Curr Biol* 12, 397-402.
- Kenyon, C.J. (2010). The genetics of ageing. *Nature* 464, 504-512.
- Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., and Bieback, K. (2006). Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 24, 1294-1301.
- Keryer, G., Witczak, O., Delouvee, A., Kemmner, W.A., Rouillard, D., Tasken, K., and Bornens, M. (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 14, 2436-2446.
- Kidd, J.M., Sampas, N., Antonacci, F., Graves, T., Fulton, R., Hayden, H.S., Alkan, C., Malig, M., Ventura, M., Giannuzzi, G., *et al.* (2010). Characterization of missing human genome sequences and copy-number polymorphic insertions. *Nature methods* 7, 365-371.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expresión of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism* 3, 177-185.
- Kim, S.H., Kaminker, P., and Campisi, J. (1999). TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23, 405-412.
- Kim, T.H., Xiong, H., Zhang, Z., and Ren, B. (2005). beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* 24, 597-604.
- Kim, W.Y., and Sharpless, N.E. (2006). The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell* 127, 265-275.
- Kiyono, T., Foster, S.A., Koop, J.I., McDougall, J.K., Galloway, D.A., and Klingelutz, A.J. (1998). Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396, 84-88.
- Klimova, T., and Chandel, N.S. (2008). Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell death and differentiation* 15, 660-666.
- Klinger, R.Y., Blum, J.L., Hearn, B., Lebow, B., and Niklason, L.E. (2006). Relevance and safety of telomerase for human tissue engineering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2500-2505.
- Kolf, C.M., Cho, E., and Tuan, R.S. (2007). Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther* 9, 204.
- Kovalenko, O.A., Caron, M.J., Ulema, P., Medrano, C., Thomas, A.P., Kimura, M., Bonini, M.G., Herbig, U., and Santos, J.H. (2010). A mutant telomerase defective in nuclear-cytoplasmic shuttling fails to immortalize cells and is associated with mitochondrial dysfunction. *Aging cell* 9, 203-219.

- Krishnamurthy, J., Torrice, C., Ramsey, M.R., Kovalev, G.I., Al-Regaiey, K., Su, L., and Sharpless, N.E. (2004). Ink4a/Arf expresión is a biomarker of aging. *J Clin Invest* *114*, 1299-1307.
- Kruk, P.A., Rampino, N.J., and Bohr, V.A. (1995). DNA damage and repair in telomeres: relation to aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 258-262.
- Kudin, A.P., Bimpong-Buta, N.Y., Vielhaber, S., Elger, C.E., and Kunz, W.S. (2004). Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of biological chemistry* *279*, 4127-4135.
- Kuhn, N.Z., and Tuan, R.S. (2010). Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *Journal of cellular physiology* *222*, 268-277.
- Kuilman, T., Michaloglou, C., Mooi, W.J., and Peeper, D.S. (2010). The essence of senescence. *Genes & development* *24*, 2463-2479.
- Kurz, D.J., Decary, S., Hong, Y., and Erusalimsky, J.D. (2000). Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells. *J Cell Sci* *113* (Pt 20), 3613-3622.
- Kushnareva, Y., Murphy, A.N., and Andreyev, A. (2002). Complex I-mediated reactive oxygen species generation: modulation by cytochrome c and NAD(P)⁺ oxidation-reduction state. *Biochem J* *368*, 545-553.
- Kussmaul, L., and Hirst, J. (2006). The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 7607-7612.
- Laderman, K.A., Penny, J.R., Mazzucchelli, F., Bresolin, N., Scarlato, G., and Attardi, G. (1996). Aging-dependent functional alterations of mitochondrial DNA (mtDNA) from human fibroblasts transferred into mtDNA-less cells. *The Journal of biological chemistry* *271*, 15891-15897.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K. (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes & development* *16*, 1466-1471.
- Lange, C., Schroeder, J., Stute, N., Lioznov, M.V., and Zander, A.R. (2005). High-potential human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev* *14*, 70-80.
- Lansdorp, P.M., Verwoerd, N.P., van de Rijke, F.M., Dragowska, V., Little, M.T., Dirks, R.W., Raap, A.K., and Tanke, H.J. (1996). Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* *5*, 685-691.
- Laurent, L.C., Ulitsky, I., Slavin, I., Tran, H., Schork, A., Morey, R., Lynch, C., Harness, J.V., Lee, S., Barrero, M.J., *et al.* (2011). Dynamic changes in the copy number of pluripotency and cell proliferation genes in human ESCs and iPSCs during reprogramming and time in culture. *Cell stem cell* *8*, 106-118.
- Lazarus, H.M., Haynesworth, S.E., Gerson, S.L., Rosenthal, N.S., and Caplan, A.I. (1995). Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone Marrow Transplant* *16*, 557-564.
- Lee, A.C., Fenster, B.E., Ito, H., Takeda, K., Bae, N.S., Hirai, T., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Howard, B.H., and Finkel, T. (1999). Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species. *The Journal of biological chemistry* *274*, 7936-7940.

- Lee, B.Y., Han, J.A., Im, J.S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E.C., Kleijer, W.J., DiMaio, D., and Hwang, E.S. (2006). Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging cell* 5, 187-195.
- Lefort, N., Feyeux, M., Bas, C., Feraud, O., Bennaceur-Griscelli, A., Tachdjian, G., Peschanski, M., and Perrier, A.L. (2008). Human embryonic stem cells reveal recurrent genomic instability at 20q11.21. *Nature biotechnology* 26, 1364-1366.
- Levine, R.L., Williams, J.A., Stadtman, E.R., and Shacter, E. (1994). Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 233, 346-357.
- Li, B., Reddy, S., and Comai, L. (2009). Sequence-specific processing of telomeric 3' overhangs by the Werner syndrome protein exonuclease activity. *Aging (Albany NY)* 1, 289-302.
- Li, H., Fan, X., Kovi, R.C., Jo, Y., Moquin, B., Konz, R., Stoicov, C., Kurt-Jones, E., Grossman, S.R., Lyle, S., *et al.* (2007). Spontaneous expression of embryonic factors and p53 point mutations in aged mesenchymal stem cells: a model of age-related tumorigenesis in mice. *Cancer research* 67, 10889-10898.
- Li, J., Zhou, K., Meng, X., Wu, Q., Li, S., Liu, Y., and Wang, J. (2008). Increased ROS generation and SOD activity in heteroplasmic tissues of transmitochondrial mice with A3243G mitochondrial DNA mutation. *Genet Mol Res* 7, 1054-1062.
- Li, N., Ragheb, K., Lawler, G., Sturgis, J., Rajwa, B., Melendez, J.A., and Robinson, J.P. (2003). Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *The Journal of biological chemistry* 278, 8516-8525.
- Li, T.S., Cheng, K., Malliaras, K., Matsushita, N., Sun, B., Marban, L., Zhang, Y., and Marban, E. (2011). Expansion of human cardiac stem cells in physiological oxygen improves cell production efficiency and potency for myocardial repair. *Cardiovascular research* 89, 157-165.
- Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.
- Liu, L., Blasco, M.A., and Keefe, D.L. (2002a). Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 3, 230-234.
- Liu, L., Trimarchi, J.R., Smith, P.J., and Keefe, D.L. (2002b). Mitochondrial dysfunction leads to telomere attrition and genomic instability. *Aging cell* 1, 40-46.
- Loo, D.T., Fuquay, J.I., Rawson, C.L., and Barnes, D.W. (1987). Extended culture of mouse embryo cells without senescence: inhibition by serum. *Science* 236, 200-202.
- Lou, H., Li, S., Yang, Y., Kang, L., Zhang, X., Jin, W., Wu, B., Jin, L., and Xu, S. (2011). A map of copy number variations in Chinese populations. *PLoS one* 6, e27341.
- Lu, T., and Finkel, T. (2008). Free radicals and senescence. *Experimental cell research* 314, 1918-1922.
- Luk, J.M., Wang, P.P., Lee, C.K., Wang, J.H., and Fan, S.T. (2005). Hepatic potential of bone marrow stromal cells: development of in vitro co-culture and intra-portal transplantation models. *J Immunol Methods* 305, 39-47.
- Lum, J.J., Bui, T., Gruber, M., Gordan, J.D., DeBerardinis, R.J., Covelto, K.L., Simon, M.C., and Thompson, C.B. (2007). The transcription factor HIF-1alpha plays a critical role in the growth factor-dependent regulation of both aerobic and anaerobic glycolysis. *Genes & development* 21, 1037-1049.
- Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W.C., and Masutomi, K. (2009). An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature* 461, 230-235.

- Mailand, N., Falck, J., Lukas, C., Syljuasen, R.G., Welcker, M., Bartek, J., and Lukas, J. (2000). Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* *288*, 1425-1429.
- Makarov, V.L., Hirose, Y., and Langmore, J.P. (1997). Long G tails at both ends of human chromosomes suggest a C strand degradation mechanism for telomere shortening. *Cell* *88*, 657-666.
- Mallette, F.A., Gaumont-Leclerc, M.F., and Ferbeyre, G. (2007). The DNA damage signaling pathway is a critical mediator of oncogene-induced senescence. *Genes & development* *21*, 43-48.
- Mannello, F., and Tonti, G.A. (2007). Concise review: no breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer, or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum, or enriched plasma; serum-free, serum replacement nonconditioned medium, or ad hoc formula? All that glitters is not gold! *Stem Cells* *25*, 1603-1609.
- Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., and Simon, M.C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell metabolism* *1*, 393-399.
- Marnett, L.J., Weller, P.E., Markey, C.M., Alward, A., and Dix, T.A. (1985). Transformations of unsaturated fatty acid hydroperoxides. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res* *15*, 143-146.
- Marshman, E., Booth, C., and Potten, C.S. (2002). The intestinal epithelial stem cell. *Bioessays* *24*, 91-98.
- Martens, U.M., Chavez, E.A., Poon, S.S., Schmoor, C., and Lansdorpe, P.M. (2000). Accumulation of short telomeres in human fibroblasts prior to replicative senescence. *Experimental cell research* *256*, 291-299.
- Martinez, P., and Blasco, M.A. (2011). Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins. *Nature reviews Cancer* *11*, 161-176.
- Massard, C., Zermati, Y., Pauleau, A.L., Larochette, N., Metivier, D., Sabatier, L., Kroemer, G., and Soria, J.C. (2006). hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* *25*, 4505-4514.
- Masutomi, K., Possemato, R., Wong, J.M., Currier, J.L., Tothova, Z., Manola, J.B., Ganesan, S., Lansdorpe, P.M., Collins, K., and Hahn, W.C. (2005). The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 8222-8227.
- Mathon, N.F., Malcolm, D.S., Harrisingh, M.C., Cheng, L., and Lloyd, A.C. (2001). Lack of replicative senescence in normal rodent glia. *Science* *291*, 872-875.
- Matsumura, T. (1980). Multinucleation and polyploidization of aging human cells in culture. *Adv Exp Med Biol* *129*, 31-38.
- Mayshar, Y., Ben-David, U., Lavon, N., Biancotti, J.C., Yakir, B., Clark, A.T., Plath, K., Lowry, W.E., and Benvenisty, N. (2010). Identification and classification of chromosomal aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Cell stem cell* *7*, 521-531.
- McClintock, B. (1939). The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *25*, 405-416.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in Zea Mays. *Genetics* *26*, 234-282.
- Meyerson, M., Counter, C.M., Eaton, E.N., Ellisen, L.W., Steiner, P., Caddle, S.D., Ziaugra, L., Beijersbergen, R.L., Davidoff, M.J., Liu, Q., *et al.* (1997). hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell* *90*, 785-795.

- Miao, Z., Jin, J., Chen, L., Zhu, J., Huang, W., Zhao, J., Qian, H., and Zhang, X. (2006). Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol Int* 30, 681-687.
- Milyavsky, M., Shats, I., Erez, N., Tang, X., Senderovich, S., Meerson, A., Tabach, Y., Goldfinger, N., Ginsberg, D., Harris, C.C., *et al.* (2003). Prolonged culture of telomerase-immortalized human fibroblasts leads to a premalignant phenotype. *Cancer research* 63, 7147-7157.
- Min, J.H., Yang, H., Ivan, M., Gertler, F., Kaelin, W.G., Jr., and Pavletich, N.P. (2002). Structure of an HIF-1 α -pVHL complex: hydroxyproline recognition in signaling. *Science* 296, 1886-1889.
- Miura, M., Miura, Y., Padilla-Nash, H.M., Molinolo, A.A., Fu, B., Patel, V., Seo, B.M., Sonoyama, W., Zheng, J.J., Baker, C.C., *et al.* (2006). Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells* 24, 1095-1103.
- Mohyeldin, A., Garzon-Muvdi, T., and Quinones-Hinojosa, A. (2010). Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche. *Cell stem cell* 7, 150-161.
- Moiseeva, O., Bourdeau, V., Roux, A., Deschenes-Simard, X., and Ferbeyre, G. (2009). Mitochondrial dysfunction contributes to oncogene-induced senescence. *Mol Cell Biol* 29, 4495-4507.
- Morales, C.P., Holt, S.E., Ouellette, M., Kaur, K.J., Yan, Y., Wilson, K.S., White, M.A., Wright, W.E., and Shay, J.W. (1999). Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet* 21, 115-118.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A., and Van Remmen, H. (2007). Trends in oxidative aging theories. *Free Radic Biol Med* 43, 477-503.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J* 417, 1-13.
- Nakahara, H., Dennis, J.E., Bruder, S.P., Haynesworth, S.E., Lennon, D.P., and Caplan, A.I. (1991). In vitro differentiation of bone and hypertrophic cartilage from periosteal-derived cells. *Experimental cell research* 195, 492-503.
- Narva, E., Autio, R., Rahkonen, N., Kong, L., Harrison, N., Kitsberg, D., Borghese, L., Itskovitz-Eldor, J., Rasool, O., Dvorak, P., *et al.* (2010). High-resolution DNA analysis of human embryonic stem cell lines reveals culture-induced copy number changes and loss of heterozygosity. *Nature biotechnology* 28, 371-377.
- Nasmyth, K. (2002). Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297, 559-565.
- Nelson, J., Bagnato, A., Battistini, B., and Nisen, P. (2003). The endothelin axis: emerging role in cancer. *Nature reviews Cancer* 3, 110-116.
- Nielsen, P.E. (2001). Targeting double stranded DNA with peptide nucleic acid (PNA). *Current medicinal chemistry* 8, 545-550.
- Noble, J.R., Zhong, Z.H., Neumann, A.A., Melki, J.R., Clark, S.J., and Reddel, R.R. (2004). Alterations in the p16(INK4a) and p53 tumor suppressor genes of hTERT-immortalized human fibroblasts. *Oncogene* 23, 3116-3121.
- Nobori, T., Miura, K., Wu, D.J., Lois, A., Takabayashi, K., and Carson, D.A. (1994). Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368, 753-756.

- Nowak, M.A., Komarova, N.L., Sengupta, A., Jallepalli, P.V., Shih le, M., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2002). The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 16226-16231.
- O'Sullivan, R.J., and Karlseder, J. (2010). Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nature reviews Molecular cell biology* 11, 171-181.
- Obe, G., Pfeiffer, P., Savage, J.R., Johannes, C., Goedecke, W., Jeppesen, P., Natarajan, A.T., Martinez-Lopez, W., Folle, G.A., and Drets, M.E. (2002). Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504, 17-36.
- Oberringer, M., Lothschutz, D., Jennewein, M., Koschnick, M., Mutschler, W., and Hanselmann, R.G. (1999). Centrosome multiplication accompanies a transient clustering of polyploid cells during tissue repair. *Mol Cell Biol Res Commun* 2, 190-196.
- Ogami, M., Ikura, Y., Ohsawa, M., Matsuo, T., Kayo, S., Yoshimi, N., Hai, E., Shirai, N., Ehara, S., Komatsu, R., *et al.* (2004). Telomere shortening in human coronary artery diseases. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 546-550.
- Ogryzko, V.V., Hirai, T.H., Russanova, V.R., Barbie, D.A., and Howard, B.H. (1996). Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol Cell Biol* 16, 5210-5218.
- Ohki, R., Tsurimoto, T., and Ishikawa, F. (2001). In vitro reconstitution of the end replication problem. *Mol Cell Biol* 21, 5753-5766.
- Ohtani, N., Mann, D.J., and Hara, E. (2009). Cellular senescence: its role in tumor suppression and aging. *Cancer Sci* 100, 792-797.
- Oikawa, S., Tada-Oikawa, S., and Kawanishi, S. (2001). Site-specific DNA damage at the GGG sequence by UVA involves acceleration of telomere shortening. *Biochemistry* 40, 4763-4768.
- Olovnikov, A.M. (1971). [Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides]. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201, 1496-1499.
- Ott, M., Gogvadze, V., Orrenius, S., and Zhivotovsky, B. (2007). Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 12, 913-922.
- Owen, M. (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.
- Owen, M., and Friedenstein, A.J. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp* 136, 42-60.
- Packer, L., and Fuehr, K. (1977). Low oxygen concentration extends the lifespan of cultured human diploid cells. *Nature* 267, 423-425.
- Panchision, D.M. (2009). The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease. *Journal of cellular physiology* 220, 562-568.
- Panosian, L.A., Porter, V.R., Valenzuela, H.F., Zhu, X., Reback, E., Masterman, D., Cummings, J.L., and Effros, R.B. (2003). Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging* 24, 77-84.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism* 3, 187-197.

- Papandreou, I., Powell, A., Lim, A.L., and Denko, N. (2005). Cellular reaction to hypoxia: sensing and responding to an adverse environment. *Mutat Res* 569, 87-100.
- Parrinello, S., Samper, E., Krtolica, A., Goldstein, J., Melov, S., and Campisi, J. (2003). Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5, 741-747.
- Passos, J.F., Saretzki, G., Ahmed, S., Nelson, G., Richter, T., Peters, H., Wappler, I., Birket, M.J., Harold, G., Schaeuble, K., *et al.* (2007a). Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence. *PLoS biology* 5, e110.
- Passos, J.F., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (2007b). DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic acids research* 35, 7505-7513.
- Passos, J.F., and von Zglinicki, T. (2005). Mitochondria, telomeres and cell senescence. *Exp Gerontol* 40, 466-472.
- Peng, J., Mao, X.O., Stevenson, F.F., Hsu, M., and Andersen, J.K. (2004). The herbicide paraquat induces dopaminergic nigral apoptosis through sustained activation of the JNK pathway. *The Journal of biological chemistry* 279, 32626-32632.
- Persons, D.L., Robinson, R.A., Hsu, P.H., Seelig, S.A., Borell, T.J., Hartmann, L.C., and Jenkins, R.B. (1996). Chromosome-specific aneusomy in carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 2, 883-888.
- Petersen, S., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Preferential accumulation of single-stranded regions in telomeres of human fibroblasts. *Experimental cell research* 239, 152-160.
- Peterson, S.E., Westra, J.W., Rehen, S.K., Young, H., Bushman, D.M., Paczkowski, C.M., Yung, Y.C., Lynch, C.L., Tran, H.T., Nickey, K.S., *et al.* (2011). Normal human pluripotent stem cell lines exhibit pervasive mosaic aneuploidy. *PLoS one* 6, e23018.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.
- Phinney, D.G., and Prockop, D.J. (2007). Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells* 25, 2896-2902.
- Piersma, A.H., Ploemacher, R.E., and Brockbank, K.G. (1983). Transplantation of bone marrow fibroblastoid stromal cells in mice via the intravenous route. *Br J Haematol* 54, 285-290.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Pollack, J.R., Perou, C.M., Alizadeh, A.A., Eisen, M.B., Pergamenschikov, A., Williams, C.F., Jeffrey, S.S., Botstein, D., and Brown, P.O. (1999). Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat Genet* 23, 41-46.
- Potten, C.S., and Loeffler, M. (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-1020.
- Poulios, E., Trougakos, I.P., Chondrogianni, N., and Gonos, E.S. (2007). Exposure of human diploid fibroblasts to hypoxia extends proliferative life span. *Ann NY Acad Sci* 1119, 9-19.
- Powers, S.K., and Lennon, S.L. (1999). Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. *Proc Nutr Soc* 58, 1025-1033.

- Prockop, D.J. (1997). Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 276, 71-74.
- Puglisi, M.A., Giuliani, L., and Fierabracci, A. (2008). Identification and characterization of a novel expandable adult stem/progenitor cell population in the human exocrine pancreas. *J Endocrinol Invest* 31, 563-572.
- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., *et al.* (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *J Cell Biol* 157, 851-864.
- Ramirez, R.D., Morales, C.P., Herbert, B.S., Rohde, J.M., Passons, C., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2001). Putative telomere-independent mechanisms of replicative aging reflect inadequate growth conditions. *Genes & development* 15, 398-403.
- Ravid, K., Lu, J., Zimmet, J.M., and Jones, M.R. (2002). Roads to polyploidy: the megakaryocyte example. *Journal of cellular physiology* 190, 7-20.
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K.R., Feuk, L., Perry, G.H., Andrews, T.D., Fiegler, H., Shapero, M.H., Carson, A.R., Chen, W., *et al.* (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 444, 444-454.
- Ressler, S., Bartkova, J., Niederegger, H., Bartek, J., Scharffetter-Kochanek, K., Jansen-Durr, P., and Wlaschek, M. (2006). p16INK4A is a robust in vivo biomarker of cellular aging in human skin. *Aging cell* 5, 379-389.
- Richter, T., and von Zglinicki, T. (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol* 42, 1039-1042.
- Rieger, R., Michaelis, A., and Green, M.M. (1976). *Glossary of genetics and cytogenetics : classical and molecular*, 4th completely rev. edn (Berlin ; New York: Springer-Verlag).
- Robles, S.J., and Adami, G.R. (1998). Agents that cause DNA double strand breaks lead to p16INK4a enrichment and the premature senescence of normal fibroblasts. *Oncogene* 16, 1113-1123.
- Rochette, P.J., and Brash, D.E. (2010). Human telomeres are hypersensitive to UV-induced DNA Damage and refractory to repair. *PLoS genetics* 6, e1000926.
- Rodesch, F., Simon, P., Donner, C., and Jauniaux, E. (1992). Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol* 80, 283-285.
- Rubio, M.A., Kim, S.H., and Campisi, J. (2002). Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *The Journal of biological chemistry* 277, 28609-28617.
- Sabatini, F., Petecchia, L., Tavian, M., Jodon de Villeroche, V., Rossi, G.A., and Brouty-Boye, D. (2005). Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. *Lab Invest* 85, 962-971.
- Sahin, E., Colla, S., Liesa, M., Moslehi, J., Muller, F.L., Guo, M., Cooper, M., Kotton, D., Fabian, A.J., Walkey, C., *et al.* (2011). Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise. *Nature* 470, 359-365.
- Saito, H., Hammond, A.T., and Moses, R.E. (1995). The effect of low oxygen tension on the in vitro-replicative life span of human diploid fibroblast cells and their transformed derivatives. *Experimental cell research* 217, 272-279.

- Saksela, E., and Moorhead, P.S. (1963). Aneuploidy in the Degenerative Phase of Serial Cultivation of Human Cell Strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 50, 390-395.
- Salem, H.K., and Thiemermann, C. (2010). Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status. *Stem Cells* 28, 585-596.
- Santos, J.H., Meyer, J.N., Skovvaga, M., Annab, L.A., and Van Houten, B. (2004). Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging cell* 3, 399-411.
- Santos, J.H., Meyer, J.N., and Van Houten, B. (2006). Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Hum Mol Genet* 15, 1757-1768.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283, 1488-1493.
- Sareen, D., McMillan, E., Ebert, A.D., Shelley, B.C., Johnson, J.A., Meisner, L.F., and Svendsen, C.N. (2009). Chromosome 7 and 19 trisomy in cultured human neural progenitor cells. *PLoS one* 4, e7630.
- Saretzki, G., Murphy, M.P., and von Zglinicki, T. (2003). MitoQ counteracts telomere shortening and elongates lifespan of fibroblasts under mild oxidative stress. *Aging cell* 2, 141-143.
- Sarugaser, R., Lickorish, D., Baksh, D., Hosseini, M.M., and Davies, J.E. (2005). Human umbilical cord perivascular (HUCPV) cells: a source of mesenchymal progenitors. *Stem Cells* 23, 220-229.
- Scadden, D.T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441, 1075-1079.
- Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 343-354.
- Schultz, L.B., Chehab, N.H., Malikzay, A., and Halazonetis, T.D. (2000). p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 151, 1381-1390.
- Schulz, V.P., Zakian, V.A., Ogburn, C.E., McKay, J., Jarzbowicz, A.A., Edland, S.D., and Martin, G.M. (1996). Accelerated loss of telomeric repeats may not explain accelerated replicative decline of Werner syndrome cells. *Hum Genet* 97, 750-754.
- Seagroves, T.N., Ryan, H.E., Lu, H., Wouters, B.G., Knapp, M., Thibault, P., Laderoute, K., and Johnson, R.S. (2001). Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21, 3436-3444.
- Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2000). A new look at the origin, function, and "stem-cell" status of muscle satellite cells. *Dev Biol* 218, 115-124.
- Serakinci, N., Guldborg, P., Burns, J.S., Abdallah, B., Schroder, H., Jensen, T., and Kassem, M. (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23, 5095-5098.
- Sermeus, A., and Michiels, C. (2011). Reciprocal influence of the p53 and the hypoxic pathways. *Cell death & disease* 2, e164.
- Serra, V., von Zglinicki, T., Lorenz, M., and Saretzki, G. (2003). Extracellular superoxide dismutase is a major antioxidant in human fibroblasts and slows telomere shortening. *The Journal of biological chemistry* 278, 6824-6830.
- Serrano, M. (2007). Cancer regression by senescence. *N Engl J Med* 356, 1996-1997.

- Serrano, M., and Blasco, M.A. (2001). Putting the stress on senescence. *Curr Opin Cell Biol* 13, 748-753.
- Serrano, M., Hannon, G.J., and Beach, D. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 366, 704-707.
- Serrano, M., Lee, H., Chin, L., Cordon-Cardo, C., Beach, D., and DePinho, R.A. (1996). Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 85, 27-37.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593-602.
- Sfeir, A.J., Chai, W., Shay, J.W., and Wright, W.E. (2005). Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Mol Cell* 18, 131-138.
- Sharma, N.K., Reyes, A., Green, P., Caron, M.J., Bonini, M.G., Gordon, D.M., Holt, I.J., and Santos, J.H. (2011). Human telomerase acts as a hTR-independent reverse transcriptase in mitochondria. *Nucleic acids research*.
- Shay, J.W., and Wright, W.E. (2007). Tissue culture as a hostile environment: identifying conditions for breast cancer progression studies. *Cancer cell* 12, 100-101.
- Sherr, C.J., and DePinho, R.A. (2000). Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102, 407-410.
- Shi, S., and Gronthos, S. (2003). Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res* 18, 696-704.
- Shigenaga, M.K., Hagen, T.M., and Ames, B.N. (1994). Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 10771-10778.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature reviews Cancer* 3, 155-168.
- Sies, H. (1997). Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 82, 291-295.
- Siminovitch, L., McCulloch, E.A., and Till, J.E. (1963). The Distribution of Colony-Forming Cells among Spleen Colonies. *Journal of cellular physiology* 62, 327-336.
- Simmons, P.J., and Torok-Storb, B. (1991). Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood* 78, 55-62.
- Simon, M.C., and Keith, B. (2008). The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nature reviews Molecular cell biology* 9, 285-296.
- Sitte, N., Saretzki, G., and von Zglinicki, T. (1998). Accelerated telomere shortening in fibroblasts after extended periods of confluency. *Free Radic Biol Med* 24, 885-893.
- Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2002). Different telomere damage signaling pathways in human and mouse cells. *EMBO J* 21, 4338-4348.
- Smolenski, R.T., Schrader, J., de Groot, H., and Deussen, A. (1991). Oxygen partial pressure and free intracellular adenosine of isolated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 260, C708-714.
- Sotiropoulou, P.A., Perez, S.A., Salagianni, M., Baxevanis, C.N., and Papamichail, M. (2006). Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 462-471.

- Sparmann, A., and van Lohuizen, M. (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nature reviews Cancer* 6, 846-856.
- Spits, C., Mateizel, I., Geens, M., Mertzaniidou, A., Staessen, C., Vandesselde, Y., Van der Elst, J., Liebaers, I., and Sermon, K. (2008). Recurrent chromosomal abnormalities in human embryonic stem cells. *Nature biotechnology* 26, 1361-1363.
- Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J., and Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* 277, 44784-44790.
- Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science* 257, 1220-1224.
- Staniek, K., and Nohl, H. (2000). Are mitochondria a permanent source of reactive oxygen species? *Biochim Biophys Acta* 1460, 268-275.
- Stenderup, K., Justesen, J., Clausen, C., and Kassem, M. (2003). Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 33, 919-926.
- Storchova, Z., and Pellman, D. (2004). From polyploidy to aneuploidy, genome instability and cancer. *Nature reviews Molecular cell biology* 5, 45-54.
- Strain, A.J., and Crosby, H.A. (2000). Hepatic stem cells. *Gut* 46, 743-745.
- Stumpe, T., and Schrader, J. (1997). Phosphorylation potential, adenosine formation, and critical PO₂ in stimulated rat cardiomyocytes. *Am J Physiol* 273, H756-766.
- Sun, P., Yoshizuka, N., New, L., Moser, B.A., Li, Y., Liao, R., Xie, C., Chen, J., Deng, Q., Yamout, M., *et al.* (2007). PRAK is essential for ras-induced senescence and tumor suppression. *Cell* 128, 295-308.
- Takahashi, A., Ohtani, N., Yamakoshi, K., Iida, S., Tahara, H., Nakayama, K., Nakayama, K.I., Ide, T., Saya, H., and Hara, E. (2006). Mitogenic signalling and the p16INK4a-Rb pathway cooperate to enforce irreversible cellular senescence. *Nat Cell Biol* 8, 1291-1297.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takai, H., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (2003). DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr Biol* 13, 1549-1556.
- Takubo, K., Goda, N., Yamada, W., Iriuchishima, H., Ikeda, E., Kubota, Y., Shima, H., Johnson, R.S., Hirao, A., Suematsu, M., *et al.* (2010). Regulation of the HIF-1 α level is essential for hematopoietic stem cells. *Cell stem cell* 7, 391-402.
- Tam, W.L., Ang, Y.S., and Lim, B. (2007). The molecular basis of ageing in stem cells. *Mech Ageing Dev* 128, 137-148.
- Tang, D.G., Tokumoto, Y.M., Apperly, J.A., Lloyd, A.C., and Raff, M.C. (2001). Lack of replicative senescence in cultured rat oligodendrocyte precursor cells. *Science* 291, 868-871.
- Tarte, K., Gaillard, J., Lataillade, J.J., Fouillard, L., Becker, M., Mossafa, H., Tchirkov, A., Rouard, H., Henry, C., Splingard, M., *et al.* (2010). Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood* 115, 1549-1553.
- Taylor, M.V. (2002). Muscle differentiation: how two cells become one. *Curr Biol* 12, R224-228.

- Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordonez, A., Corral-Escariz, M., Soro, I., Lopez-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., *et al.* (2011). Induction of the Mitochondrial NDUFA4L2 Protein by HIF-1alpha Decreases Oxygen Consumption by Inhibiting Complex I Activity. *Cell metabolism* 14, 768-779.
- Till, J.E., and Mc, C.E. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 14, 213-222.
- Toma, C., Pittenger, M.F., Cahill, K.S., Byrne, B.J., and Kessler, P.D. (2002). Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* 105, 93-98.
- Torsvik, A., Rosland, G.V., Svendsen, A., Molven, A., Immervoll, H., McCormack, E., Lonning, P.E., Primon, M., Sobala, E., Tonn, J.C., *et al.* (2010). Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer research* 70, 6393-6396.
- Toussaint, O., Medrano, E.E., and von Zglinicki, T. (2000). Cellular and molecular mechanisms of stress-induced premature senescence (SIPS) of human diploid fibroblasts and melanocytes. *Exp Gerontol* 35, 927-945.
- Toussaint, O., Remacle, J., Dierick, J.F., Pascal, T., Fripiat, C., Zdanov, S., Magalhaes, J.P., Royer, V., and Chainiaux, F. (2002). From the Hayflick mosaic to the mosaics of ageing. Role of stress-induced premature senescence in human ageing. *Int J Biochem Cell Biol* 34, 1415-1429.
- Toussaint, O., Weemaels, G., Debacq-Chainiaux, F., Scharffetter-Kochanek, K., and Wlaschek, M. (2011). Artefactual effects of oxygen on cell culture models of cellular senescence and stem cell biology. *Journal of cellular physiology* 226, 315-321.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Turrens, J.F., and Boveris, A. (1980). Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191, 421-427.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., and Crapo, J.D. (1982). Hyperoxia increases H₂O₂ release by lung mitochondria and microsomes. *Arch Biochem Biophys* 217, 411-421.
- Tusher, V.G., Tibshirani, R., and Chu, G. (2001). Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5116-5121.
- Valdes, A.M., Andrew, T., Gardner, J.P., Kimura, M., Oelsner, E., Cherkas, L.F., Aviv, A., and Spector, T.D. (2005). Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366, 662-664.
- van Steensel, B., Smogorzewska, A., and de Lange, T. (1998). TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92, 401-413.
- Vanneste, E., Voet, T., Le Caignec, C., Ampe, M., Konings, P., Melotte, C., Debrock, S., Amyere, M., Vikkula, M., Schuit, F., *et al.* (2009). Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med* 15, 577-583.
- Vaupel, P., Kallinowski, F., and Okunieff, P. (1989). Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research* 49, 6449-6465.
- Vaziri, H., and Benchimol, S. (1998). Reconstitution of telomerase activity in normal human cells leads to elongation of telomeres and extended replicative life span. *Curr Biol* 8, 279-282.

- Vaziri, H., Dragowska, W., Allsopp, R.C., Thomas, T.E., Harley, C.B., and Lansdorp, P.M. (1994). Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 9857-9860.
- Vaziri, H., Schachter, F., Uchida, I., Wei, L., Zhu, X., Effros, R., Cohen, D., and Harley, C.B. (1993). Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52, 661-667.
- Vignery, A. (2000). Osteoclasts and giant cells: macrophage-macrophage fusion mechanism. *Int J Exp Pathol* 81, 291-304.
- Vliegen, H.W., Eulderink, F., Brusckhe, A.V., van der Laarse, A., and Cornelisse, C.J. (1995). Polyploidy of myocyte nuclei in pressure overloaded human hearts: a flow cytometric study in left and right ventricular myocardium. *Am J Cardiovasc Pathol* 5, 27-31.
- von Zglinicki, T. (2002). Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 27, 339-344.
- von Zglinicki, T., Burkle, A., and Kirkwood, T.B. (2001). Stress, DNA damage and ageing -- an integrative approach. *Exp Gerontol* 36, 1049-1062.
- von Zglinicki, T., Petrie, J., and Kirkwood, T.B. (2003). Telomere-driven replicative senescence is a stress response. *Nature biotechnology* 21, 229-230.
- von Zglinicki, T., Pilger, R., and Sitte, N. (2000). Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 28, 64-74.
- von Zglinicki, T., Saretzki, G., Docke, W., and Lotze, C. (1995). Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Experimental cell research* 220, 186-193.
- Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Wagner, W., Bork, S., Horn, P., Kronic, D., Walenda, T., Diehlmann, A., Benes, V., Blake, J., Huber, F.X., Eckstein, V., *et al.* (2009). Aging and replicative senescence have related effects on human stem and progenitor cells. *PLoS one* 4, e5846.
- Wagner, W., Horn, P., Castoldi, M., Diehlmann, A., Bork, S., Saffrich, R., Benes, V., Blake, J., Pfister, S., Eckstein, V., *et al.* (2008). Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. *PLoS one* 3, e2213.
- Wagner, W., Wein, F., Seckinger, A., Frankhauser, M., Wirkner, U., Krause, U., Blake, J., Schwager, C., Eckstein, V., Ansorge, W., *et al.* (2005). Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* 33, 1402-1416.
- Wang, E. (1995). Senescent human fibroblasts resist programmed cell death, and failure to suppress bcl2 is involved. *Cancer research* 55, 2284-2292.
- Wang, W., Chen, J.X., Liao, R., Deng, Q., Zhou, J.J., Huang, S., and Sun, P. (2002). Sequential activation of the MEK-extracellular signal-regulated kinase and MKK3/6-p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates oncogenic ras-induced premature senescence. *Mol Cell Biol* 22, 3389-3403.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269-270.
- Ward, I.M., and Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *The Journal of biological chemistry* 276, 47759-47762.
- Weissman, I.L. (2000). Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell* 100, 157-168.

- Wheaton, K., and Riabowol, K. (2004). Protein kinase C delta blocks immediate-early gene expression in senescent cells by inactivating serum response factor. *Mol Cell Biol* 24, 7298-7311.
- Widmann, T.A., Willmann, B., Pfreundschuh, M., and Beelen, D.W. (2005). Influence of telomere length on short-term recovery after allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 33, 1257-1261.
- Wikström, M., Krab, K., and Saraste, M. (1981). *Cytochrome oxidase : a synthesis* (London ; New York: Academic Press).
- Williams, J.T., Southerland, S.S., Souza, J., Calcutt, A.F., and Cartledge, R.G. (1999). Cells isolated from adult human skeletal muscle capable of differentiating into multiple mesodermal phenotypes. *Am Surg* 65, 22-26.
- Wirth, E., 3rd, Lebkowski, J.S., and Lebacqz, K. (2011). Response to Frederic Bretzner et al. "Target populations for first-in-human embryonic stem cell research in spinal cord injury". *Cell stem cell* 8, 476-478.
- Wiseman, H., and Halliwell, B. (1996). Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 (Pt 1), 17-29.
- Wong, S.H., Knight, J.A., Hopfer, S.M., Zaharia, O., Leach, C.N., Jr., and Sunderman, F.W., Jr. (1987). Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 33, 214-220.
- Woo, R.A., and Poon, R.Y. (2004). Activated oncogenes promote and cooperate with chromosomal instability for neoplastic transformation. *Genes & development* 18, 1317-1330.
- Woodbury, D., Schwarz, E.J., Prockop, D.J., and Black, I.B. (2000). Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61, 364-370.
- Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., and Shay, J.W. (1996). Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18, 173-179.
- Wright, W.E., and Shay, J.W. (2002). Historical claims and current interpretations of replicative aging. *Nature biotechnology* 20, 682-688.
- Wright, W.E., and Shay, J.W. (2006). Inexpensive low-oxygen incubators. *Nat Protoc* 1, 2088-2090.
- Wu, X., Bishopric, N.H., Discher, D.J., Murphy, B.J., and Webster, K.A. (1996). Physical and functional sensitivity of zinc finger transcription factors to redox change. *Mol Cell Biol* 16, 1035-1046.
- Yakes, F.M., and Van Houten, B. (1997). Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 514-519.
- Yang, J., Zhang, L., Erbel, P.J., Gardner, K.H., Ding, K., Garcia, J.A., and Bruick, R.K. (2005). Functions of the Per/ARNT/Sim domains of the hypoxia-inducible factor. *The Journal of biological chemistry* 280, 36047-36054.
- Yang, S., Delgado, R., King, S.R., Woffendin, C., Barker, C.S., Yang, Z.Y., Xu, L., Nolan, G.P., and Nabel, G.J. (1999). Generation of retroviral vector for clinical studies using transient transfection. *Hum Gene Ther* 10, 123-132.
- Yang, X., Yu, K., Hao, Y., Li, D.M., Stewart, R., Insogna, K.L., and Xu, T. (2004). LATS1 tumour suppressor affects cytokinesis by inhibiting LIMK1. *Nat Cell Biol* 6, 609-617.

- Yen, B.L., Huang, H.I., Chien, C.C., Jui, H.Y., Ko, B.S., Yao, M., Shun, C.T., Yen, M.L., Lee, M.C., and Chen, Y.C. (2005). Isolation of multipotent cells from human term placenta. *Stem Cells* 23, 3-9.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yurov, Y.B., Iourov, I.Y., Monakhov, V.V., Soloviev, I.V., Vostrikov, V.M., and Vorsanova, S.G. (2005). The variation of aneuploidy frequency in the developing and adult human brain revealed by an interphase FISH study. *J Histochem Cytochem* 53, 385-390.
- Zannettino, A.C., Paton, S., Arthur, A., Khor, F., Itescu, S., Gimble, J.M., and Gronthos, S. (2008). Multipotential human adipose-derived stromal stem cells exhibit a perivascular phenotype in vitro and in vivo. *Journal of cellular physiology* 214, 413-421.
- Zhang, Y., Wang, B., Zhang, W.J., Zhou, G., Cao, Y., and Liu, W. (2010). Enhanced proliferation capacity of porcine tenocytes in low O₂ tension culture. *Biotechnology letters* 32, 181-187.
- Zhu, J., Woods, D., McMahon, M., and Bishop, J.M. (1998). Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes & development* 12, 2997-3007.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D.A., Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P., and Hedrick, M.H. (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.
- Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.
- Zunino, R., Li, Q., Rose, S.D., Romero-Benitez, M.M., Lejen, T., Brandan, N.C., and Trifaro, J.M. (2001). Expresión of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation, maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis. *Blood* 98, 2210-2219.
- Zvaifler, N.J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C.J., Moss, J., Burger, J.A., and Maini, R.N. (2000). Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis Res* 2, 477-488.
- Zwartouw, H.T., and Westwood, J.C. (1958). Factors affecting growth and glycolysis in tissue culture. *Br J Exp Pathol* 39, 529-539.
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Stockl, P., Hutter, E., Eigenbrodt, E., and Jansen-Durr, P. (2003). Metabolic analysis of senescent human fibroblasts reveals a role for AMP in cellular senescence. *Biochem J* 376, 403-411.

ANEXOS

ANEXO I

La experimentación realizada en este trabajo, ha dado lugar al desarrollo de una patente que se encuadra en el campo de la biología celular y genética y se refiere a un método para la identificación de células madre mesenquimales humanas senescentes durante el crecimiento celular *in vitro*.

PATENTE - INVENCIÓN

Título: Biomarcadores de senescencia de cultivos de células madre mesenquimales como controles de calidad

Número: P200930540

Fecha de Prioridad: 30-07-2009

Titulares: CNIC

Inventores: Enrique Samper, Juan Camilo Estrada, Antonio Bernad

Códigos UNESCO: 2403 2407 2409 2415 2411

Códigos CNAE: 24.4 73.1.0

Información detallada

Oficina de transferencia de Resultados de Investigación - OTRI

CNIC

Otri@cnic.es

ANEXO II

Artículo publicado como resultado del proyecto de Tesis Doctoral

- **Juan C. Estrada**, Pedro Lopez-Romero, Alberto Benguría, Ana Dopazo, Carmen Albo, Lucrecia Carrera-Quintanar, Enrique Roche, Ester Perales Clemente, José Enriquez Dominguez, Antonio Bernad and Enrique Samper. Culture of human adult stem cells at 3% O₂ improves growth and genetic stability by activating glycolysis. *Cell Death and Diff.* 2011 Dec 2.

Artículos publicados durante el periodo de experimentación

- Enrique Samper, Lucia Morgado, **Juan C. Estrada**, Antonio Bernad, Alan Hubbard, Susana Cadenas, Simon Melov. Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress and glycolysis in murine lymphomas. *Free Radical Biology and Medicine.* 2009 Feb 1; 46(3): 387-96. Epub 2008 Oct 30.
- Daniel Lucas, Beatriz Escudero, José Manuel Ligos, José C. Segovia, **Juan C. Estrada**, Gloria Terrados, Luis Blanco, Enrique Samper and Antonio Bernad. Altered lymphohematopoiesis in mice lacking DNA polymerase mu is due to inefficient double strand break repair. *PLoS Genetics.* Impact factor: 9.532. 2009 Feb;5(2):e1000389. Epub 2009 Feb 20.

Culture of human mesenchymal stem cells at low oxygen tension improves growth and genetic stability by activating glycolysis

JC Estrada¹, C Albo¹, A Benguría², A Dopazo², P López-Romero³, L Carrera-Quintana⁴, E Roche⁴, EP Clemente¹, JA Enríquez^{1,5}, A Bernad^{1,6} and E Samper^{1,6}

Expansion of human stem cells before cell therapy is typically performed at 20% O₂. Growth in these pro-oxidative conditions can lead to oxidative stress and genetic instability. Here, we demonstrate that culture of human mesenchymal stem cells at lower, physiological O₂ concentrations significantly increases lifespan, limiting oxidative stress, DNA damage, telomere shortening and chromosomal aberrations. Our gene expression and bioenergetic data strongly suggest that growth at reduced oxygen tensions favors a natural metabolic state of increased glycolysis and reduced oxidative phosphorylation. We propose that this balance is disturbed at 20% O₂, resulting in abnormally increased levels of oxidative stress. These observations indicate that bioenergetic pathways are intertwined with the control of lifespan and decisively influence the genetic stability of human primary stem cells. We conclude that stem cells for human therapy should be grown under low oxygen conditions to increase biosafety.

Cell Death and Differentiation advance online publication, 2 December 2011; doi:10.1038/cdd.2011.172

Human mesenchymal stem cells (hMSC) are being evaluated for the treatment of a large variety of pathologies, including traumatic lesions and cardiovascular and autoimmune diseases.^{1,2} Although hMSC can be obtained from several tissues, they are scarce and their quantity and quality depends on a patient's clinical history, age, gender and genetic background. Most cell therapy protocols use 10–50 million hMSC per treatment, requiring expansion of extracted stem cells *ex vivo* for about 8 weeks before implantation. This expansion is typically performed under 'standard' non-physiological culture conditions, which among other factors expose cells to 20% O₂, roughly 10 times the oxygen concentration encountered in their natural niches.^{3,4}

Previous studies have shown that exposure of mammalian cells to 20% O₂ concentrations induces DNA damage, thereby contributing decisively to cell senescence and loss of viability.^{5–7} Conversely, culture of human stem cells over a physiological range of oxygen tensions (1–5%) improves cell growth, alters differentiation processes and extends lifespan.⁸ Low oxygen tensions have also been shown to reduce the levels of double-strand breaks (DSB) and chromosomal abnormalities in several types of stem cells.^{9,10} This evidence suggests that the poorly defined 'cell culture stress' can be a cause of genetic instability and therefore constitute a biological risk for cell therapy protocols. In agreement with

this notion, we have found that short-term growth of hMSC at 20% O₂ significantly increases oxidative stress and DNA damage markers, DSB, chromosomal aberrations, aneuploidy and telomere shortening rates compared with cells grown at 3% O₂. Despite these clear correlations, the mechanisms underlying the generation of genetic instability at high O₂ tension are mostly unknown.

Mammalian cells have developed oxygen-sensing mechanisms to maintain cell and tissue homeostasis (reviewed in Giaccia *et al.*¹¹). When oxygen levels fall below a certain threshold, a gene expression program is initiated by the transcription factor hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 signaling is a pivotal link between oxygen availability in the cell and key processes such as energy metabolism, angiogenesis, cell proliferation and viability (reviewed in Schofield and Ratcliffe¹²). Activation of HIF-1a increases the levels of glycolytic enzymes when oxygen is too limiting to support oxidative phosphorylation (OXPHOS); thereby ensuring energy demands are met under hypoxic conditions.^{13,14}

To elucidate the mechanisms by which oxygen levels, and exogenous oxidative stress affect the genetic stability of hMSC, we carried out detailed cytogenetic analysis, together with gene expression and bioenergetics studies, in sister cultures grown at 'physiological' 3% O₂ and 'standard' 20% O₂ conditions. Our data show that growth at physiological O₂

¹Department of Regenerative Cardiology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain; ²Department of Epidemiology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain; ³Genomics Unit, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain; ⁴Unidad de bioquímica y terapia celular, Instituto de Biotecnología, Universidad Miguel Hernández, Av. de la Universidad s/n, E-03202 Elche, Spain and ⁵Departamento de Bioquímica, Universidad de Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, E-50009 Zaragoza, Spain

*Corresponding author: E Samper, Department of Regenerative Cardiology, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain. Tel: +34 91 453 1274; Fax: +34 91 453 1240; E-mail: esamper@cnic.es

⁶These authors share senior authorship.

Keywords: stem cells; MSC; oxidative stress; hypoxia; glycolysis; aneuploidy

Abbreviations: ECAR, extra cellular acidification rate; FDR, false discovery rate; OCR, oxygen consumption rate; OXPHOS, oxidative phosphorylation; TRAP, telomere repeat amplification protocol

Received 07.4.11; revised 12.9.11; accepted 20.10.11; Edited by R De Maria

levels is associated with a clear transcriptional activation in HIF-1 α target genes that results of increased glycolytic function and inhibition of oxygen consumption. Our results suggest that cells exposed to non-physiological oxygen levels activate a cellular response in which oxygen consumption by OXPHOS is increased and glycolysis decreased. We propose that this adaptive metabolic switch in 20% O₂ contributes to the generation of genetic instability by increasing the production of ROS, possibly compromising the biosafety and viability of long-term cultures of stem cells.

Results

Growth of hMSC at 20% O₂ reduces lifespan, increases oxidative stress and the rate of telomere shortening. A set of four hMSC lines was acquired from a commercial source. To confirm the cell type and purity of these lines, we detected the expression of the following specific surface markers by flow cytometry: CD29, CD44, CD90, CD105, CD11b, HLA DR, CD19 and CD45 (Supplementary Figure S1a). Differentiation capacity was confirmed in osteogenic and adipogenic differentiation assays (Supplementary Figure S1b). DNA fingerprinting with nine single-nucleotide polymorphisms at early (p2) and late (p15) passages showed no evidence of cross-contamination at either oxygen concentration (data not shown).

To determine if hMSC growth dynamics are influenced by oxygen tension, we established individual adipose tissue-derived cultures from four adult female donors (aged 35–41 years) and compared their growth rates at 20% O₂ versus 3% O₂ over 25 passages. hMSC were sourced from donors of the same gender and similar age in order limit sources of variability such as hormonal changes or telomere length status. Cell lines grown at 3% O₂ completed 35.48 \pm 0.96 population doublings (PDs), whereas the corresponding cultures grown at 20% O₂ completed only 28.68 \pm 1.3 PD (Figure 1a). This difference is statistically significant ($P=0.002$) and was apparent even at early passages. For example, by passage 5 hMSC grown at 3% O₂ completed 16.73 \pm 1.22 PD, compared with 10.98 \pm 0.86 PD for cells grown at 20% O₂ ($P=0.010$). These results indicate that at 3% O₂ we can theoretically obtain $> 1 \times 10^9$ cells in five passages, whereas at 20% O₂ we only obtain 2×10^7 cells. Both cell yields arose from an estimated starting cell population of 1×10^4 hMSC. Despite the higher growth rate at 3% O₂, our results indicate that hMSC did not overcome senescence at either oxygen concentration (Figure 1a).

To test whether the improved growth rate at low oxygen tension correlated with lower levels of reactive oxygen species (ROS), we stained early, middle and late passage hMSC with dihydroethidine (DHE), a fluorescent marker for superoxide anion (O₂⁻). hMSC grown at 20% O₂ accumulated more superoxide anions than cells grown at 3% O₂ (Figure 1b). In addition, these differences in ROS levels increased with passage number. The increased production of ROS at 20% O₂ was confirmed by analysis of two surrogate markers: the levels of protein oxidation (carbonyl groups) and the mutagenic lipid peroxidation product malondialdehyde (MDA). Levels of carbonyls and MDA in hMSC grown at 20% O₂

were 29% ($P=0.016$) and 107% ($P=0.036$) higher, respectively, than in parallel cultures grown at 3% O₂ (Figure 1c).

To determine the contribution of telomere shortening to hMSC senescence, we analyzed interphase hMSC by quantitative fluorescence *in situ* hybridization (Q-FISH), using peptide-nucleic acid (PNA) telomeric probes¹⁵ (Figure 2a). In cells grown at 20% O₂, the average telomere length at passage 2 was 8.43 \pm 1.28 kb, decreasing to 3.76 \pm 0.7 kb at passage 15; in contrast, cells grown over the same passages at 3% O₂ showed a smaller decline in telomere length, from 8.21 \pm 1.1 kb to 5.04 \pm 0.95 kb, despite having completed 4–5 more PDs. Thus, cells grown at 20% O₂ appear to exhaust their telomeric DNA faster than cells grown at 3% O₂. The rates of telomere shortening were 378 \pm 46 bp per cell division at 3% O₂ versus 470 \pm 61 bp at 20% O₂ ($P=0.016$) (Figure 2b).

As telomere length is strongly influenced by telomerase activity, we performed Q-PCR-based telomere repeat amplification protocol (TRAP) assays.¹⁶ Telomerase activity in four hMSC cultures grown at 20% O₂ was similar to that of human primary fibroblast cultures (Supplementary Figures S2a and b), consistent with their limited proliferative capacity and their senescence. Telomerase activity in hMSC was not affected by the O₂ concentration (Supplementary Figures S2c and d), therefore indicating that the increased rate of telomere shortening at high oxygen tension is likely to result from increased oxidative damage and DSB under these conditions.^{17,18}

Growth of hMSC at 20% O₂ increases DSB generation and chromosomal instability. Oxidative stress has been previously shown to cause DNA damage in mammalian fibroblasts.⁶ To determine if culture-derived oxidative stress is sufficient to induce DNA damage in hMSC, we performed immunofluorescence against 53BP1, a well-characterized marker of DSB.¹⁹ Of hMSC grown at 3% O₂, 44.68 \pm 6.9% contained DSB foci, compared with 63.31 \pm 7.3% of cells grown at 20% O₂ (Figures 2c and e). Moreover, hMSC grown at 3% O₂ contained 0.69 \pm 0.11 foci per cell, whereas cells grown at 20% O₂ had 1.37 \pm 0.4 foci per cell (Figures 2d and e). The number of cells with at least one DSB was significantly higher at the 20% O₂ condition ($P=0.013$), indicating that culture at 20% O₂ causes an excess of DNA breaks in human stem cells (Figure 2c).

To confirm these results, we carried out detailed cytogenetic analysis of chromosomal breaks and fusions and dicentric chromosomes, all indicative of DSB. For this, we stained metaphases with telomeric and centromeric probes to clearly define the aberrations. Cells grown at 3% O₂ had 2-fold fewer chromosomal fusions, 1.5-fold fewer chromatid breaks and a significantly 2.6-fold lower level of dicentric chromosomes ($P=0.049$) (Figures 2f and g). Together these results indicate that hMSC grown at 20% O₂ have an excess of DNA damage and of unstable chromosomal aberrations, compared with cells grown at a more physiological oxygen tension (Figures 2c–g).

Oxidative stress increases aneuploidy in hMSC. Our cytogenetic analysis suggested that culture at 20% O₂ induces aneuploidy. Aneuploidy is a central characteristic of tumor cells and is associated with the partial loss of homeostasis and control of gene expression. The association

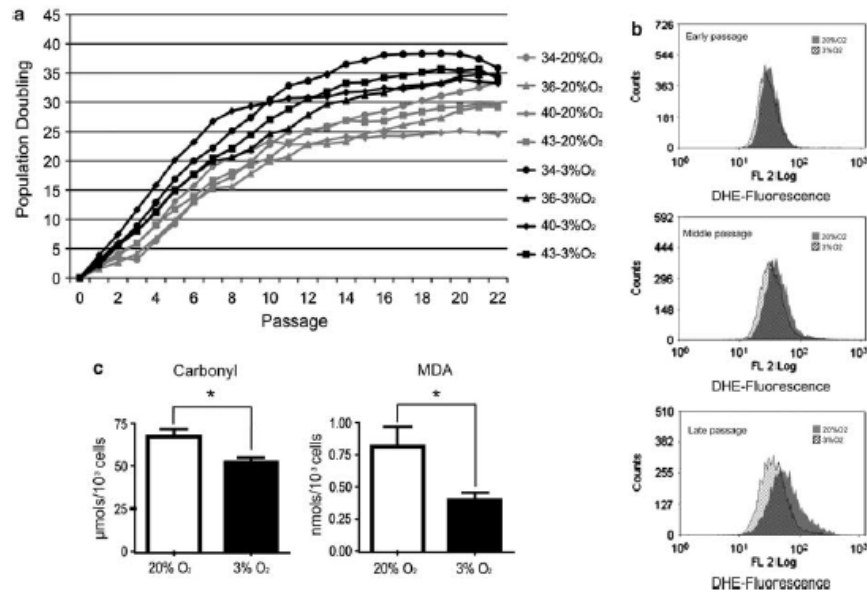


Figure 1 Effects of physiological oxygen concentration on growth and oxidative stress levels in hMSCs. (a) Growth curves of four independent hMSC primary cell lines (isolates 34, 36, 40 and 43) cultured at 3% O₂ (black lines) and 20% O₂ (gray lines). Growth of hMSC at 3% O₂ was significantly higher from passage 2 onward; at both O₂ concentrations, senescence was reached at about passage 15. (b) Flow cytometry detection of superoxide (DHE-derived fluorescence) in hMSC cultured at 3% O₂ (hatched black histogram) and 20% O₂ (gray histogram) at early (passage < 5), middle (passages 5–10) and late passage (passage > 10). For a given time in culture, superoxide levels were higher in cells grown under 'standard' (20% O₂) conditions, and ROS appear to increase with passage at both oxygen concentrations. Representative histograms from one cell line are shown ($n=4$). (c) Levels of protein carbonyls and MDA in hMSC lines grown at 20% O₂ (white bars) and at 3% O₂ (black bars). Culture at 3% O₂ results in significantly lower levels of these oxidative stress-derived products ($P<0.05$). Experiments were performed in triplicate with the four independent lines. Data are means \pm S.E.M.

between aging and an increased number of aneuploid cells has been known for decades,²⁰ however, previous studies did not examine the association between culture conditions (passage and oxygen tension) and aneuploidy in mesenchymal stem cells.

To examine the effect of O₂ concentration on aneuploidy, we analyzed interphase hMSC between passages 2 and 15 by FISH, using centromeric probes for chromosomes 8, 11 and 17 (Figures 3a and b). These chromosomes harbor important oncogenes and tumor suppressors (for example, c-myc in chr 8, CCND1 or ATM in chr 11, and p53 in chr 17), and aneuploidy in any chromosome of this set is considered an early event in primary breast cancer.^{21,22} Analysis of aneuploidy in these chromosomes might therefore provide a tool for evaluating genetic instability in hMSC, thus ensuring culture biosafety. More than 100 cells per cell line and O₂ condition were analyzed at interphase, because at any given time most cells are at this cell cycle stage and it is therefore more representative of the general condition of the cell population than the limited number of metaphase cells usually examined in aneuploidy studies.^{23,24} Surprisingly, even at early passages (p2–p5), about 15–24% of cells cultured at 20% O₂ showed aneuploidy for any of these three chromosomes. Two trends were immediately apparent. First, at both

oxygen concentrations there is a clear tendency toward increased aneuploidy with passage, reaching as high as 35% by passage 15 (Figure 3a). Second, the incidence of aneuploidy was significantly lower in cells grown at 3% O₂ from passages 2–10; for example, at passage 5 aneuploidy affected $16.43 \pm 0.37\%$ of cells grown at 3% O₂ compared with $24.25 \pm 0.42\%$ of cells grown at 20% O₂ ($P=0.016$). This trend is revealed by plotting the aneuploidy level against PD (Figure 3b). No significant differences in aneuploidy were detected between the analyzed chromosomes (data not shown).

To confirm these results, we evaluated aneuploidy by metaphase chromosomal analysis of four cell lines cultured at both O₂ concentrations at the same PD (18 ± 2), corresponding to passages (p5–p8). These experiments indicated that 54.2% of metaphases from the hMSC grown at 3% O₂ ($n=120$) had 46 chromosomes. In contrast, only 30% of cells grown at 20% O₂ were diploid ($n=106$) (Figure 3c). The difference in aneuploidy between conditions was highly statistically significant ($P<0.001$). In general, our results suggest that long-term exposure to oxidative stress induced by 'standard' cell culture conditions clearly promotes aneuploidy.

Owing to the relatively high levels of aneuploidy observed in hMSC, we set out to determine if this was a more general phenomenon. Human fibroblasts and bone marrow hMSC

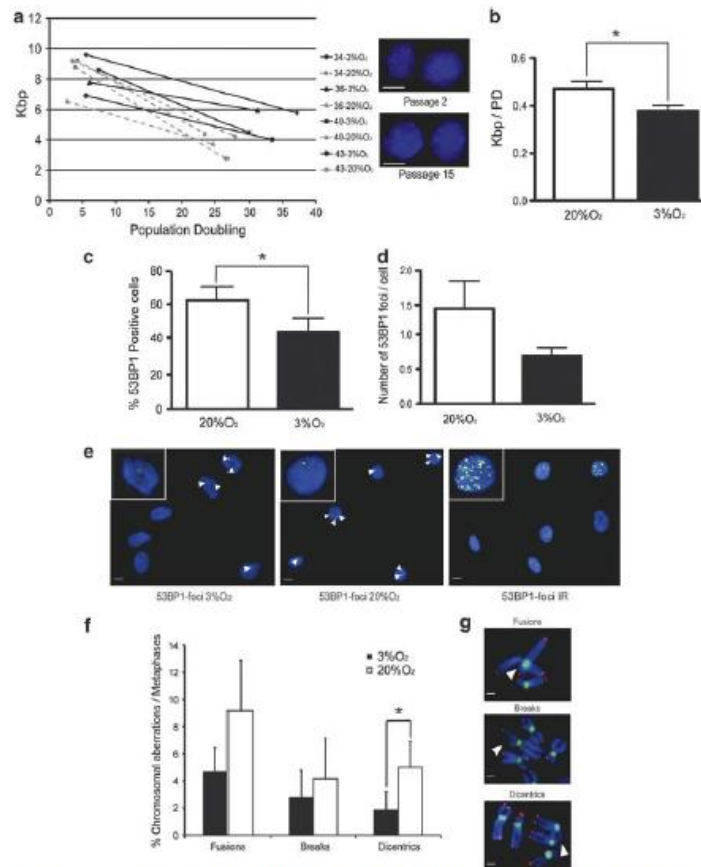


Figure 2 Supra-physiological oxygen tension increases DSBs and chromosomal aberrations in hMSCs. (a) Plot of telomere length against PD in interphase hMSC. Telomere length was measured by Q-FISH at passages 2 and 15. Thin dotted and solid lines represent telomere shortening in hMSC grown at 20% O₂ and 3% O₂, respectively. Color insets show representative images of cells at passage 2 and passage 15 hybridized with the telomeric probe (red). Scale bars, 10 μm. (b) Quantification of telomere length reduction as kbp per PD. The quantification shows a significant reduction of telomere shortening at 3% O₂ (*P=0.016). Telomere fluorescence was converted to kbp by comparison with fibroblast lines expressed known amounts of TIN2 and TIN2-13. (c) Quantification of 53BP1-positive cells grown at 3% O₂ and 20% O₂. A significant reduction was appreciated at 3% O₂ (*P=0.013). (d) Quantification of 53BP1 foci per nucleus, showing the trend in the reduction of DSB per cell in cultures grown at 3% O₂; in all cases the cells were grown for 18 ± 2 PD (e) Examples of cells grown at 3% O₂ and 20% O₂ stained with 53BP1 (yellow) to mark DSB. Irradiated cells (10 Gy) are shown as a positive control; negative controls show no signal at this same time exposure. Nuclei are counterstained with DAPI (blue). The white arrows mark individual foci. Insets in the upper left corner show a magnification of representative nuclei from each condition. Scale bars, 10 μm. (f) Quantification of structural chromosomal aberrations in metaphase cells from hMSC grown at 3% O₂ (black bars) and 20% O₂ (white bars); 3% O₂ reduced the incidence of chromosomal abnormalities, including a significant reduction in dicentric chromosomes (*P=0.049). (g) Examples of chromosomal aberrations in cells processed for FISH with centromeric (green) and telomeric (red) PNA probes. Scale bars, 1 μm. Experiments were performed in triplicate with the four independent lines. Data are means ± S.E.M.

grown at 20% O₂ (passage 10) presented levels of aneuploidy ranging from 12 to 18%, in line with our previous results.^{23,25} Analysis of aneuploidy in cultures of these cells grown for an additional 4–10 passages at 3% O₂ and 20% O₂ confirmed that growth at 3% O₂ reduces the levels of aneuploidy in other cell types of mesenchymal origin (Figure 3d). These results strongly suggest that growth of mesenchymal cells at 20% O₂

for 5–10 passages promotes aneuploidy, and we therefore propose that ROS are a principal cause of aneuploidy in hMSC.

To validate this hypothesis, we treated hMSC grown at 3% O₂ either twice a week with the superoxide generator paraquat (PQ; 40 μM) or with a single treatment of the peroxide generator H₂O₂ (100 μM). Treatment with PQ produced

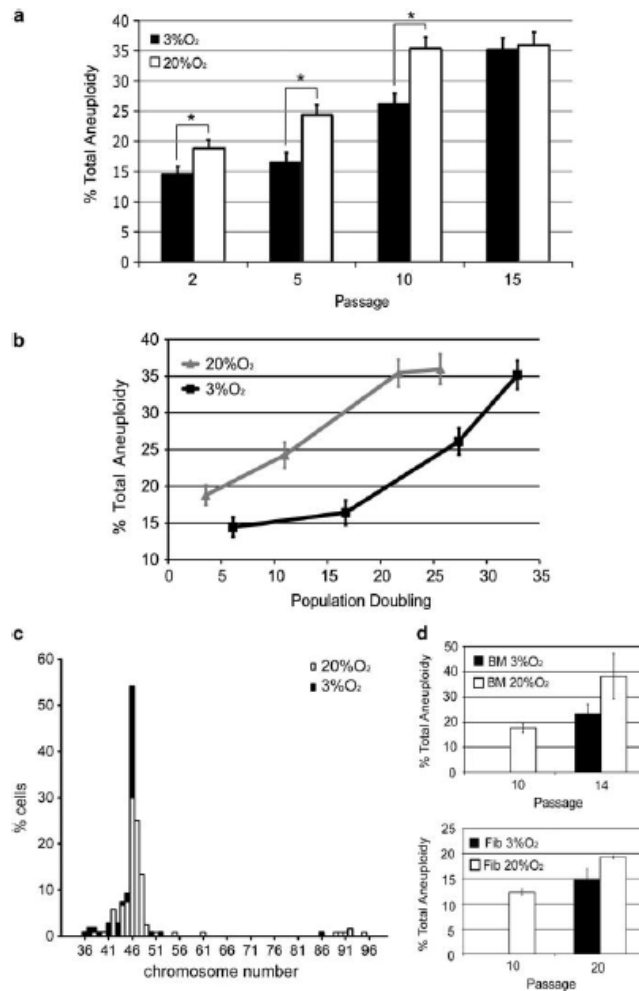


Figure 3 Long-term exposure to supra-physiological oxygen tension promotes aneuploidy in telomerase-negative hMSCs. (a) Mean aneuploidy (%) scored in 100–200 nuclei per hMSC cell line at 3% O₂ (black bars) and 20% O₂ (white bars). Aneuploidy was detected by FISH with centromeric probes for chromosomes 8, 11 and 17. Growth at 3% O₂ significantly reduced the incidence of aneuploidy during passages 2–10 (**P* < 0.049). (b) Aneuploidy levels plotted against PD; hMSC grown at low oxygen are significantly more stable per cell division. Experiments were performed in triplicate with the four independent lines. Data are means ± S.E.M. (c) Frequency histogram of chromosome counts from hMSC expanded for 18 ± 2 PD (*n* = 106–120). White bars represent metaphases from cells grown at 20% O₂; black bars represent metaphases from cells grown at 3% O₂. Chromosome numbers are as indicated. (d) Average levels of aneuploidy of two human fibroblast cell lines (passages 10 and 20) and two human BM-MSC lines (passages 10 and 14) at 20% and 3% O₂. Aneuploidy was assessed by interphase FISH using Centromere Evaluation Probe (CEP) probes for chromosomes 8, 11 and 17

a 2.7-fold reduction in cell lifespan and a 3-fold increase in aneuploidy (Figures 4a, b and e). Treatment with H₂O₂ similarly led to a pronounced decrease in cell growth and to a threefold increase in aneuploidy (Figures 4c–e). These results suggest that both chemical and culture-induced sources of exogenous oxidative stress can cause senescence and

aneuploidy in stem cells. At 20% O₂, cells exposed to PQ (40 μM) were able to progress for only three passages, and after two passages had reached the same level of aneuploidy seen in 3% O₂ cultures after five passages, indicating that higher O₂ concentration enhances the toxicity of exogenous ROS generators (Supplementary Figures 3a and b).

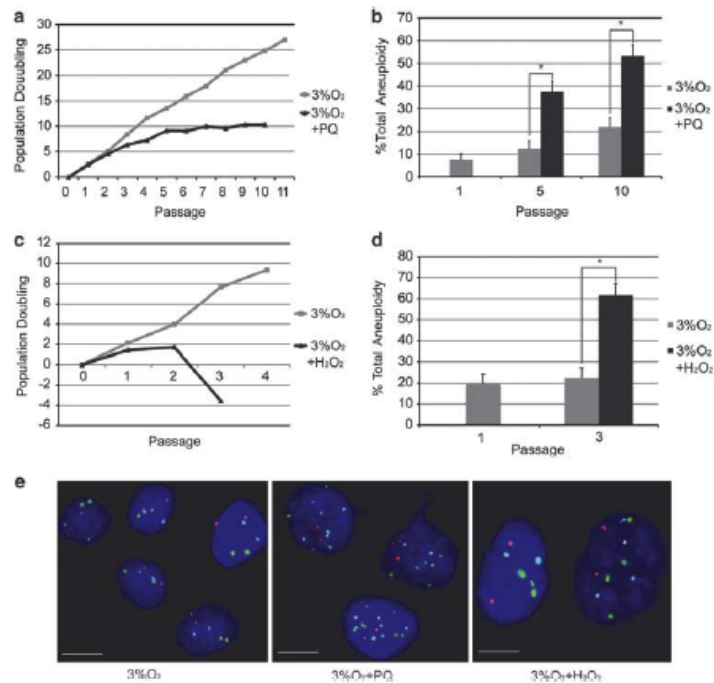


Figure 4 Exogenous sources of ROS cause growth defects and genetic instability in hMSCs. (a) Growth dynamics of an hMSC line cultured at 3% O₂ with (black) and without (gray) treatment with 40 μM PQ as a source of ROS, showing a decrease in growth after PQ treatment. (b) Aneuploidy levels in control and PQ-treated cells. PQ treatment significantly increased aneuploidy at passages 5 (**P*<0.050) and 10 (**P*<0.050). (c) Growth dynamics of an hMSC line grown at 3% O₂ with (black) or without (gray) treatment with hydrogen peroxide (H₂O₂, 100 μM) as a source of ROS, showing decreased growth and cell death after H₂O₂ treatment. (d) Aneuploidy levels in control and H₂O₂-treated cells. H₂O₂ treatment significantly increased aneuploidy at passage 3 (**P*<0.050). (e) Representative FISH images of cells grown at 3% O₂: left, controls; middle, PQ treated; right, H₂O₂ treated. Scale bars, 10 μm. Cells were hybridized with Centromere Evaluation Probe (CEP) probes for chromosomes 8 (red signal), 11 (green) and 17 (light blue). In the aneuploidy experiments, the fraction of aneuploid cells was calculated for each condition, and data were analyzed with Fisher's exact test for two binomials

Culture of hMSC at 20% O₂ significantly increases oxygen consumption and decreases glycolytic metabolism. To further investigate the underlying mechanisms by which culture of hMSC at 20% O₂ reduces lifespan and increases genetic instability, we profiled gene expression at 3% O₂ and 20% O₂ in four hMSC primary lines. Microarray analysis identified 822 genes whose expression was significantly different between the two conditions at a statistical significance *q*-value < 0.050 (Supplementary Table S1). Assessment of biological function by gene ontology analysis indicated that 42 gene ontology (GO) biological processes were significantly altered (*P* < 0.050) (Tables 1a and b). Within these processes, only 3 genes were downregulated and 12 were upregulated in cells grown at 3% O₂, indicating a shift toward glycolytic metabolism (Supplementary Table S2 and Table 2). The most significant alterations (*P* < 0.005) are linked to glucose metabolism, glycolysis, hexose, alcohol and carbohydrate catabolism (Tables 1a and b). Surprisingly, of the 42 altered GO-terms only one is related to cell survival, cell cycle or cell maintenance (GO:0008634; 'negative

regulation of survival gene product expression'). This GO category includes the proapoptotic genes *BNIP3*, *HRK* and *BNIP3L* (Supplementary Table S2), which are significantly altered in the gene expression pattern. *BNIP3* and *BNIP3L* are upregulated 2.3-fold (*q*-value < 0.001) and 1.6-fold (*q*-value = 0.006) at 3% O₂, respectively. The expression of *HRK* is downregulated 0.5-fold (*q*-value = 0.010) (Supplementary Table S1).

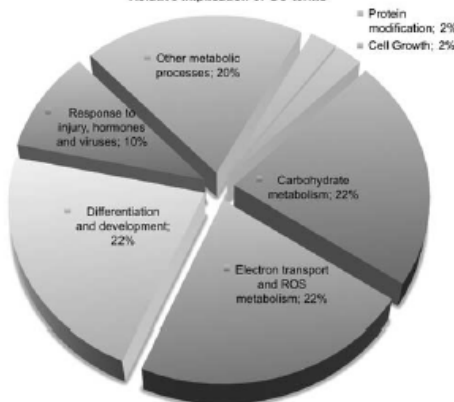
One of the best-characterized mechanisms of glycolysis upregulation is the hypoxia response through activation of HIF-1.²⁶ Our gene expression data showed that 12 HIF-1 target genes¹² are significantly upregulated in the hMSC cultures at 3% O₂, by 1.2–2.3-fold (Table 2), suggesting robust HIF-1 activation. To verify the gene expression results, we performed Taqman RT-PCR analysis and detected a significant (*P* < 0.050) 1.5–8-fold upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (*pdk1*); HIF-3, alpha subunit; phosphoglycerate kinase 1 (*pgk1*); 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (*pfkfb3*); 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4

Table 1 Simplified gene ontology analysis

GO ID	GO terms	P-value	Relative category
GO:0006006	Glucose metabolic process	0.001	1
GO:0006096	Glycolysis	0.001	1
GO:0019320	Hexose catabolic process	0.001	1
GO:0046164	Alcohol catabolic process	0.001	1
GO:0016052	Carbohydrate catabolic process	0.003	1
GO:0006469	Protein amino acid phosphorylation	0.008	6
GO:0008544	Epidermis development	0.008	5
GO:0051114	Oxidation reduction	0.008	2
GO:0006796	Phosphate metabolic process	0.011	6
GO:0011502	Cartilage condensation	0.011	5
GO:0015711	Organic anion transport	0.011	2
GO:0051289	Protein homotrimerization	0.011	7
GO:0005975	Carbohydrate metabolic process	0.014	1
GO:0001866	Response to hypoxia	0.019	3
GO:0006454	Protein modification process	0.021	7
GO:0006003	Fructose 2,6-bisphosphate metabolic process	0.022	1
GO:0006536	Glutamate metabolic process	0.022	1
GO:0006677	Glycosylceramide metabolic process	0.022	6
GO:0015721	Bile acid and bile salt transport	0.022	6
GO:0018986	Axon transport of mitochondrion	0.022	2
GO:0021680	Cerebellar Purkinje cell layer development	0.022	5
GO:0022904	Respiratory electron transport chain	0.022	2
GO:0032964	Oxygen homeostasis	0.022	2
GO:0032469	Endoplasmic reticulum calcium ion homeostasis	0.022	6
GO:0042559	Plastin and derivative biosynthetic process	0.022	6
GO:0042640	Anagen	0.022	5
GO:0045059	Positive thymic T-cell selection	0.022	5
GO:0046902	Regulation of mitochondrial membrane permeability	0.022	2
GO:0048978	Response to axon injury	0.022	4
GO:0050112	Ventricular cardiac muscle cell differentiation	0.022	5
GO:0006739	NADP metabolic process	0.025	2
GO:0008634	Negative regulation of survival gene product expression	0.025	8
GO:0019079	Viral genome replication	0.025	4
GO:0022037	Metencephalon development	0.025	5
GO:0045058	T-cell selection	0.025	5
GO:0050931	Pigment cell differentiation	0.025	5
GO:0051186	Cofactor metabolic process	0.032	6
GO:0006081	Cellular aldehyde metabolic process	0.045	1
GO:0006809	Nitric oxide biosynthetic process	0.045	2
GO:0046456	Icosanoid biosynthetic process	0.046	6
GO:0051607	Defense response to virus	0.046	4
GO:0009725	Response to hormone stimulus	0.05	4

Relative category	Name	%
1	Carbohydrate metabolism	21.42
2	Electron transport and ROS metabolism	21.42
3	Differentiation and development	21.42
4	Other metabolic processes	19.04
5	Response to injury, hormones and viruses	9.52
6	Protein modification	2.38
7	Cell growth	2.38

Relative implication of GO terms



(a) Gene ontology (GO) terms for gene expression changes implicated in biological processes in hMSC ($n=4$) grown at 20% O_2 versus 3% O_2 . Terms are listed in order of statistical significance ($P < 0.050$) and the GO terms are linked to relative categories. (b) Pie chart showing relative implication of GO terms altered in cells grown at 3% O_2 versus 20% O_2

Table 2 Expression changes in genes related to carbohydrate metabolic processes and HIF-1 targets

Symbol	Name	Fold change	FDR BH (†)	FDR q-value (‡)
<i>Carbohydrate metabolism</i>				
PFKFB4	6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4	2.786	0.001	0.001
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	2.178	0.002	0.001
ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate	2.359	0.004	0.002
PFKFB3	6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3	2.286	0.004	0.002
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	2.764	0.004	0.002
ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	2.186	0.009	0.004
TP1	Triosephosphate isomerase 1	1.689	0.011	0.005
ALDH5A1	Aldehyde dehydrogenase 5 family, member A1	0.627	0.013	0.006
LDHA	Lactate dehydrogenase A	1.562	0.019	0.009
IGF2	Insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	3.396	0.025	0.012
NUDT5	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 5	0.671	0.026	0.012
ENO3	Enolase 3 (beta, muscle)	1.412	0.027	0.012
PGD	Phosphogluconate dehydrogenase	0.749	0.047	0.021
GAPDH7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-like 7	1.328	0.062	0.028
<i>HIF targets</i>				
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	3.441	0.001	0.001
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3	2.297	0.001	0.001
PGK1	Phosphoglycerate kinase 1	2.178	0.002	0.001
SLC2A1	Solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	2.764	0.004	0.002
EGLN1	Egl nine homolog 1 (<i>C. elegans</i>)	1.837	0.006	0.003
PLOD1	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	1.849	0.009	0.004
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	0.566	0.011	0.005
PLOD2	Procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	1.974	0.019	0.009
LDHA	Lactate dehydrogenase A	1.562	0.019	0.009
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1.656	0.021	0.010
ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 1	0.696	0.023	0.010
ADRA2C	Adrenergic, alpha-2C-, receptor	0.562	0.027	0.012
TFR2	Transferrin receptor 2	1.290	0.029	0.013
CA9	Carbonic anhydrase IX	2.169	0.040	0.018
SERPINE1	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1	1.753	0.053	0.024

Gene expression data for hMSC ($n=4$) grown at 3% O_2 versus 20% O_2 , showing differentially expressed genes involved in carbohydrate metabolism and in HIF-1 induction. These genes are included in GO categories with P -value < 0.050 , and are listed in order of statistical significance (q -value < 0.050)

(*pfkfb4*); aldolase C; fructose-bisphosphate (*aldoc*); triosephosphate isomerase 1 (*tpi1*); solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (*Slc2a1*); lactate dehydrogenase A (*ldha*); and insulin-like growth factor 2 (*igf2*) (Figure 5a). In summary, the gene expression, gene ontology and qRT-PCR analyses indicate that in cultures at 3% O_2 there is a strong upregulation of carbohydrate metabolism, particularly of glycolytic genes, that is, probably mediated through HIF-1 activation.

To evaluate how the transcriptional upregulation of glycolysis genes at 3% O_2 impacts cellular metabolism, we monitored mitochondrial oxygen consumption rate (OCR) and extra cellular acidification rate (ECAR) in three hMSC lines in both oxygen conditions, using Seahorse non-invasive technology. The basal OCR/ECAR ratios were significantly higher in hMSC cells grown at 20% O_2 (2200 pMoles/MPH) than at 3% O_2 (1000 pMoles/MPH) ($P < 0.050$) (Figures 5b and c). Addition of DNP, a mitochondrial uncoupling agent, showed that maximum respiratory capacity was also significantly higher in hMSC grown at 20% O_2 (Figure 5b). Addition of oligomycin to inhibit F_0/F_1 ATPase (complex V) revealed similar differences between culture at 20% O_2 and 3% O_2 (Figure 5b). These data indicate that growth at higher O_2 tension promotes increased oxygen consumption and an associated drop in medium acidification. To verify that growth in 20% O_2 decreases glycolysis, we analyzed lactic acid

concentration. These experiments showed that hMSC grown at 3% O_2 contained a twofold higher concentration of lactate ($P < 0.050$) (Figure 5d).

Discussion

Many ongoing clinical trials use hMSC after culture expansion at 20% O_2 . This growth protocol is an inheritance from traditional cell culture methods established decades ago for transformed cells with very different bioenergetic characteristics.²⁷ Accumulating evidence suggests that culture of mammalian cells at 20% O_2 promotes DNA damage and senescence,⁵⁻⁷ and recent data suggests that long-term culture under these conditions leads to the appearance of chromosomal aberrations.²⁸ Given the paramount importance of biosafety in cell therapy, we set out to investigate the relationships between oxygen tension, metabolism and genetic stability in hMSC expanded *in vitro*. In this study, we show that expansion of adipose tissue-derived hMSC at 3% O_2 significantly increases their growth rate, in line with previous findings.⁹ Despite this faster growth, we observed no evidence of spontaneous immortalization, suggesting that, at least during 25 passages, hMSC cultured at 3% O_2 do not activate mechanisms that can overcome senescence.

In the absence of compensatory mechanisms, human cell senescence is intimately related to critical telomere

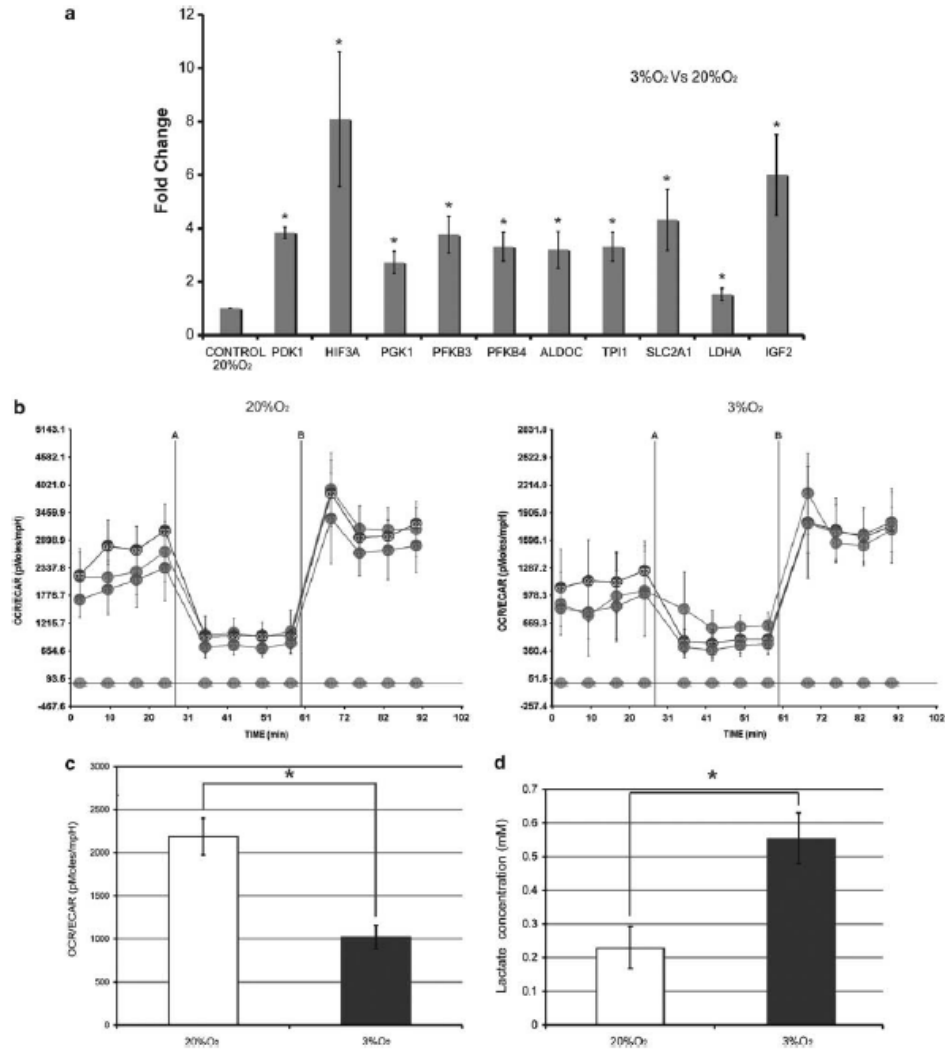


Figure 5 Culture of hMSC at physiological oxygen tension increases glycolytic activity and reduces oxygen consumption. (a) RT-PCR analysis (Taqman) of pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1 (pdk1); hif3a; phosphoglycerate kinase 1 (pgk1); 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (pfkfb3); 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 4, (pfkfb4); aldolase C, fructose-bisphosphate (aldoc); triosephosphate isomerase 1 (tp11); solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1 (slc2a1); lactate dehydrogenase A (ldha); and insulin-like growth factor 2 (igf2). Expression is presented relative to the level in cells grown at 20% O₂. Experiments were performed in triplicate with the four independent lines. Data are means ± S.E.M. In all cases, the data were statistically significant (**P* < 0.050). (b) OCR/ECAR curves for three hMSC lines exposed to 3% O₂ and 20% O₂. Curves were generated using a FX96 Flux Analyzer and Seahorse technology (see Materials and Methods section). The first four points on the graphs indicate the basal OCR/ECAR ratio (expressed in pmoles/μmph); the green line indicates background correction of the blank. Oligomycin was added at time point A and the mitochondrial uncoupler at time point B. (c) Average OCR/ECAR ratios (pmoles/μmph) for three hMSC lines grown at 3% O₂ and 20% O₂ (**P* < 0.050). Bars represent means ± S.E.M; experiments were performed with eight replicates for each time point. (d) Intracellular lactate concentration in hMSC grown at 3% O₂ and 20% O₂. Cells cultured at 3% O₂ contained more lactate than cells cultured at 20% O₂ (**P* < 0.050). Experiments were performed in triplicate with the four independent lines. Data are means ± S.E.M. The color reproduction of this figure is available at the *Cell Death and Differentiation* journal online

shortening. Previous reports indicated that telomere shortening can be accelerated by growth under hyperoxic conditions, which generates oxidative stress.^{17,19,29} In our experiments, culture at low O₂ reduced the rate of telomere shortening per cell division by 24%, indicating that the increased lifespan might reflect better maintenance of telomere length. This increased lifespan is probably independent of telomerase activity because in hMSC this activity was low and insensitive to changing O₂ concentration. These observations suggest that growth at 3% O₂ leads to decreased telomere erosion by protecting cells from oxidative stress.

The enhanced growth of hMSC observed at 3% O₂ correlated with decreased levels of mutagenic oxidative stress, with an accompanying decrease in 53BP1 foci and structural chromosomal aberrations. The fact that the levels of aneuploidy continuously accumulated with increasing passage, reaching a maximum of 35% in passage 15, and were lower in cells cultured at 'physiological' oxygen tension strongly suggests that oxidative stress can induce genetic instability. In addition, we demonstrate that several cell types (hMSC from adipose tissue and bone marrow stroma, and skin fibroblasts) present higher levels of aneuploidy when cultured at 20% O₂ rather than 3% O₂, indicating that induction of aneuploidy by high O₂ concentration might be a common phenomenon. Notably, significant differences in aneuploidy were not detected between the chromosomes analyzed, suggesting that aneuploidy at early-mid passages is a random process. A relationship between oxidative stress and aneuploidy is supported by the finding that acute exposure to PQ or H₂O₂, known inducers of ROS, significantly reduced cell growth and increased aneuploidy about threefold. The difference in the effect of PQ treatment on aneuploidy and growth reduction in cultures at 20% O₂ and 3% O₂ indicates that the effects of ROS on genetic instability might be a cumulative process.

Gene expression profiling and gene ontology analysis in cells grown at the two oxygen tensions showed that growth at 3% O₂ causes significant transcriptional upregulation of 12 glycolytic and carbohydrate metabolism genes. The fact that many of these genes are also HIF-1 targets strongly suggests that culture at 3% O₂ maintains relatively high levels of HIF-1 compared with 'standard' growth conditions. Our analysis of respiration and glycolysis confirms that these gene expression patterns translate into bioenergetic changes; at 3% O₂ the OCR/ECAR ratio is significantly lower than at 20% O₂, and lactate levels are higher, providing compelling evidence that glycolysis is upregulated under these conditions. Surprisingly, higher growth at 3% O₂ was reflected in only one GO category related to cell growth, survival and apoptosis. This included the genes *BNIP3* and *BNIP3L*, whose expression has also been associated with hypoxia and HIF-1 α expression.³⁰ Our results thus strongly suggest that the main response to 3% O₂ is the transcriptional and biochemical activation of bioenergetic genes. However, we cannot exclude the possibility that growth at 3% O₂ might affect the profile of secreted chemokines and cytokines, influencing cell growth and senescence through autocrine or paracrine effects.³¹

These metabolic changes may provide an additional mechanism for lifespan extension, because increased expression of glycolytic enzymes (PGM, PGK1 and GPI)

has been shown to favor immortal growth of mouse embryonic fibroblasts.³² The gene expression data, the lower OCR/ECAR ratio and the diminished ROS levels suggest that hMSC grown at 3% O₂ have a bioenergetic balance that is less dependent on OXPHOS. This notion is consistent with previous studies that showed that HIF-1 decreases OXPHOS system activity (the principal endogenous inducer of ROS) by downregulating mitochondrial ATP production and oxygen consumption.¹⁵

Our findings indicate that growth of hMSC at physiological oxygen tension helps maintain the bioenergetic balance between OXPHOS and glycolysis that is disturbed at 20% O₂. We propose that the reduction of mitochondrial respiration at 3% O₂ decreases ROS levels, thereby decreasing the incidence of DSB and limiting telomere erosion and aneuploidy. These results indicate a plausible link between bioenergetic pathways, the control of genomic stability and the lifespan of human primary stem cells in culture. Measures to reduce oxidative stress in clinical stem cell expansion procedures, either by culture at lower O₂ concentrations or other interventions that decrease ROS levels, will enhance their growth, viability and biosafety.

Materials and Methods

Cell and culture conditions. Four independent lines of hMSCs (listed 34, 36, 40 and 43), isolated from adipose tissue of female donors aged 35–41 years, were acquired from Inbiobank Stem Cell Bank (www.inbiobank.org). hMSC were cultured ($1-2 \times 10^3$ cells/cm²) in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma), glutamine (2 mM), penicillin 100 U/ml and streptomycin 1000 U/ml. Media were changed twice a week and cells were passaged once a week. For acute exposures to chemical oxidative stress, subconfluent cultures (70%) were exposed to 40 μ M PQ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) every 3 days for 10 weeks, or to a single dose of 100 μ M H₂O₂ (Forest SA, Barcelona, Spain) and were monitored during 4 weeks. Long-term cell growth was monitored by counting cell number with a hemocytometer. Cumulative PD was calculated with the formula $PD = \{ \log(N/N_0) - 1 \} / \log 2$ (n : passage; N : cell number).

Cell differentiation assays. hMSC were seeded at 2×10^4 cells/cm² in expansion medium, and after 24-h medium was replaced with the corresponding induction medium. Osteogenic medium contained expansion medium supplemented with 10 mM β -glycerolphosphate, 0.1 μ M dexamethasone and 0.2 mM ascorbic acid. Adipogenic medium contained expansion medium supplemented with 0.01 μ M dexamethasone, 0.5 mM IBMX (β -isobutyl-1-methyl xanthine) and 60 μ M indomethacin. In all cases, induction medium was replaced every 3–4 days and on day 21 cells were processed for staining analysis. For osteogenic assays, cells were fixed with 70% ethanol (1 h, 4 °C) and stained with 40 mM Alizarin Red, pH 4.1 (15 min, RT). Cells cultured in adipogenic medium were fixed with 10% formalin (30 min, RT) and stained with 2% Oil Red (15 min, RT).

Cell characterization by surface marker staining. hMSC at early passage were collected by trypsin treatment and resuspended in PBS at 1.0×10^5 cells/ml. The cells were blocked for 20 min with 1% (v/v) human serum (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Subsequently, the cells were incubated with surface marker-specific antibodies and isotype-matched controls in the dark at 4 °C for 30 min. Surface marker antibodies used were CD29 mlgG2a-PE, CD90 mlgG1-FITC, CD19 mlgG1-RTC, CD45 mlgG1-FITC, CD44 mlgG2b-PE (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD105 mlgG1-FITC, CD11b mlgG1-PE, HLADR mlgG3-FITC (AbD Serotec, Oxford, UK) and their specific isotype-matched controls mlgG2a-PE, mlgG2b-PE, mlgG1-RTC, mlgG1-PE, mlgG3-RTC (BD Biosciences). The cells were washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry in a BD FACSCanto flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using Summit v4.3 software (Dako Inc., Carpinteria, CA, USA).

Aneuploidy analysis. Cells were incubated with 10 μ g/ml cobemid for 4 h at 37 °C, and then treated with 0.56% KO for 15 min at 37 °C and fixed in

metanoacetic acid (3:1). Cell suspensions were dropped onto clean slides and air-dried for 24 h. Centromere Evaluation Probe for chromosomes 8, 11 and 17, from the Breast Aneuploidy Multi-Color Probe kit (Abbott Laboratories, Libertyville, IL, USA), were applied (in 3 μ l) to the cells according to the manufacturer's instructions. At least 100 cells per line were analyzed for each time-point and oxygen concentration. For chromosome analysis, metaphase cells were dropped onto clean wet slides, aged overnight and stained with DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole) in Vectashield H-1200 mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Chromosome counts were performed on at least 100 metaphases per oxygen concentration. Fluorescence images were acquired with a Nikon 90i microscope (Nikon Instruments, Melville, NY, USA) fitted with a 100 \times planfluor 1.3 NA objective, appropriate filters, and an Hg Intensilight fluorescence unit. Digital images were acquired with Cytovision Genus software (Genetix, Boston, MA, USA) coupled to a JAI monochrome CCD cooled camera (Kushima City, Miyazaki, Japan).

Telomere length quantification by Q-FISH. Q-FISH was carried out using a Cy3-labeled LL(CCCCTAA)₃ PNA telomeric probe (Eurogentec, Liège, Belgium) as described³³ with the following modifications. After hybridization, slides were washed three times with PBS-0.1% Tween for 10 min at 60 °C and dehydrated through an ethanol series (70, 90 and 100%; 5 min each). Slides were then counterstained and mounted in Vectashield H-1200 mounting medium. Digital images were acquired as described above. Telomere signals were captured with the same exposure time in all samples. Telomere length (in kb) was extrapolated from the fluorescence of hTert-immortalized 82-6 fibroblasts expressing either TIN2 or TIN2-13 proteins with known and stable telomere lengths (3.4 and 8.4 kb, respectively; see Rubio *et al.*³⁴), kindly provided by Dr. Judith Campisi. Telomere signals from at least 20–30 nuclei per group were quantified using TFL-Telo (version 2) (Vancouver, BC, Canada), kindly provided by Dr. Peter Lansdorp (British Columbia Cancer Centre, Vancouver). All images were captured and analyzed in parallel on the same day by an experimenter blinded to the treatment groups.

Chromosomal aberrations. FISH was carried out as described above, using a Cy3-labeled LL(CCCCTAA)₃ PNA telomeric probe and a FITC-labeled LL(ATTCGTGGAAACGGGA) PNA alpha satellite probe (Eurogentec). Structural chromosomal aberrations were detected by superimposing telomere and centromere images on the DAPI stained chromosomes in imageJ program supported by National Institutes of Health Image (Bethesda, MD, USA). At least 20 metaphases of each cell line and condition were analyzed. Chromosomal aberrations were identified as follows: chromatid or chromosomal breakages; gaps in one or two chromatids whose corresponding centromere was identified; chromosomal fusions: two chromosomes joined without telomere signals at the fusion point with one centromeric signal; dicentric: chromosomal fusions between two chromosomes joined without telomere signals at the fusion point with two centromeric signals. The percentage of each type of aberration in each cell line and condition was used for statistical analysis.

TRAP assay. Telomerase assays were performed on 5000 hMSC as described,¹⁸ with the following modifications. In all, 2 μ l of the extension reaction was added to 23 μ l PCR reaction mix containing 1 \times PCR Master Mix power SYBR Green, 5 mM EGTA, 4 ng μ l Oligo ACX and 2 ng μ l Oligo TS. PCR was carried out over 40 cycles of 94 °C for 10 min; 94 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. PCR products were quantified with an ABI PRISM 7900 quantitative PCR apparatus (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyzed with SDS v2.3 software (Applied Biosystems).

Transduction with hTert lentiviral vector. Primary hMSC at passage 5 in 20% O₂ were infected with lentivirus (pRRL-SIN18) encoding the human telomerase reverse transcriptase catalytic subunit (hTert), as described.³⁴ The hTert lentivirus was a generous gift from Dr. Judith Campisi (Buck Institute for Age Research, Novato, CA, USA).

Immunohistochemistry. DNA damage was evaluated by immunofluorescence staining for 53BP1. For this, sham-treated or -irradiated cells (10 Gy Gamma irradiation) were fixed in acetone at 4 °C for 10 min, permeabilized in 0.5% Tx-100, blocked in 10% horse serum, and stained overnight with a 1:500 dilution of IgM-mouse antibody against 53BP1 (clone 05725, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) in 1% horse serum in PBS-1% Tween; 1% horse serum in PBS-1% Tween was used as a negative control. Stain was developed with an Alexa 546-conjugated goat antibody, and nuclei were counterstained with DAPI. Quantification of positive cells for 53BP1 foci was performed by fluorescence microscopy at \times 40 magnification.

At least 100 nuclei were imaged for each cell line and culture condition in randomly selected fields using Cytovision Genus software (Newcastle Upon Tyne, UK).

Flow cytometry detection of ROS. Early passage (p5) hMSC cultures were washed in PBS, trypsinized and incubated in phenol-red-free, reduced-serum OptiMEM medium containing 5 μ M DHE (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) for 30 min in the dark. ROS were detected by flow cytometry in a BDFACS Canto flow cytometer (BD Biosciences), and data were analyzed using Summit v4.3 software (Dako Inc.).

Microarray gene expression profiling

Sample labeling and microarray hybridization. The One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) was used to amplify and label RNA. Briefly, 400 ng of total RNA was reverse transcribed using T7 promoter primer and MMLV-RT. cDNA was then converted to aRNA using T7 RNA polymerase, which simultaneously amplifies target material and incorporates cyanine 3-labeled CTP. Cy3-labeled aRNA (1.65 μ g) was hybridized to a Whole Human Genome Microarray 4 \times 44K (G4112F, Agilent Technologies) for 17 h at 65 °C in 1 \times GEX Hybridization Buffer HI-RPM in a hybridization oven (G2545A, Agilent Technologies) set to 10 r.p.m. Arrays were washed according to the manufacturer's instructions, fixed by centrifugation, and scanned at 5 mm resolution on an Agilent DNA Microarray Scanner (G2565BA, Agilent Technologies), with the default settings for 4 \times 44K format one-color arrays. Scanned images were analyzed with Feature Extraction software (Agilent Technologies).

Data processing. Data were read into R and processed using the *Agi4x44PreProcess* Bioconductor package as follows. *Agi4x44PreProcess* options were set to use the *MeanSignal* and the *BGMedianSignal* as foreground and background signals, respectively. Data were then background corrected by the *half*, which produces a positive background-corrected signal by subtracting the background signal from the foreground signal, assigning intensities below 0.5 to 0.5 to produce positive corrected intensities. Data were normalized between arrays by the *quantile* method.³⁵ A constant value of 50 was added to the intensities before the log transformation in order to reduce the signal variability for genes expressed at low intensity. The AFE image analysis software attaches to each feature a set of flags that identify different quantification properties of the signal. *Agi4x44PreProcess* uses these flags to filter out features that (1) are controls (2) are out of the dynamic range of the scanner and (3) are outliers. To keep features within the dynamic range three independent levels of filtering can be performed to ensure that (1) the signal is distinguishable from the background, (2) the signal is found and (3) the signal is not saturated. In each filtering step, we required that more than the 75% of the replicates of each feature in at least one experimental condition had a quantification flag denoting that the signal was within the dynamic range. In addition, for each replicated feature across the whole set of samples, we filtered out those probes for which > 25% of the replicates in at least one experimental condition were flagged to indicate the presence of outliers. After the completion of all pre-processing steps, there were 26 670 (T20 versus T3 data set) features available for the statistical analysis. Finally, *Agi4x44PreProcess* maps each Agilent probe identifier to its corresponding accession number, gene symbol, gene description and GO identifiers (The Gene Ontology Consortium) using the Bioconductor annotation *hgug4112a.db*.

Statistical analysis. Differential expression analysis was done using the linear modeling features implemented in the Bioconductor *limma* package, which incorporates empirical Bayes methods³⁶ to obtain moderated statistics. To estimate differential expression between the different experimental conditions in the two data sets (T20 versus T3 and P21 versus P2), the following linear model was fitted to each gene:

$$y_j = \tau_i + e_j$$

where y_j is the observation of the i th treatment for individual j , τ_i is the effect of the i th treatment and e_j is the experimental error, assumed to be normally distributed with 0 mean and variance σ_e^2 . Genes differentially expressed in the two oxygen concentrations were identified by testing the null hypothesis (no differences in signal) for each gene τ_i .

To reduce the number of genes used for multiple testing correction without missing relevant information, genes that showed either constant expression between samples (IQR < 0.50) or a low expression signal (\log_2 expression < 5 in all samples) were removed using a nonspecific filter in the Bioconductor *genefilter* function. As the *eBayes* function estimates the average variability of genes on the microarray, this nonspecific filtering was done after the *eBayes* correction. Multiple comparisons of genes were then taken into account by controlling for false

discovery rate, which was estimated in terms of the q -value statistic³⁷ using the Bioconductor q -value package.

To integrate significant expression profiles into functional categories we performed a GO-based statistical analysis using the hyperGTest function of the GStats package.³⁸ hyperGTest computes hypergeometric P -values to test for over-representation and under-representation of each GO term in a given subset of genes compared with its distribution in a defined universe of genes. The universe included all genes with an above-background signal and that had a known GO term in the corresponding database. Duplicated genes were removed before GO analysis.

TaqMan assays. hMSC RNA was extracted with TRIzol by standard methods. The RT reaction was carried out with the SuperScript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). In all, 10 ng of cDNA per reaction was added to 10 μ l of 2 \times PCR Master Mix (Applied Biosystems). TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems) were used for all mRNA quantifications.

Detection of protein carbonyls and MDA. Carbonyl derivatives in hMSC were measured by an adaptation of the method of Levine.³⁹ Cell suspensions were mixed with 30% (v/v) trichloroacetic acid. Protein precipitates were resuspended in 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and incubated for 60 min at 37 °C. Samples were then precipitated with 20% trichloroacetic acid, and centrifuged for 10 min at 1000 \times g at 4 °C. The precipitate was washed twice with ethanol-ethyl acetate (50% v/v) to remove free DNPH, and resuspended in 6 M guanidine, 2 mM phosphate buffer, and pH 2.3. Samples were incubated for 40 min at 37 °C and centrifuged for 5 min at 3000 \times g at 4 °C. The levels of protein carbonyls, expressed as μ moles/10⁶ cells, were calculated from the absorbance of supernatants at 360 nm. MDA was detected by HPLC as described by Wong et al.,⁴⁰ and results expressed as nmols/10⁶ cells.

OCR and ECAR measurement. The XF96 Flux analyzer and Prep Station (Seahorse Bioscience XF96 Instrument, North Billerica, MA, USA) were used according to the manufacturer's instructions. Briefly, hMSC were seeded in XF96 cell culture plates at 2500 cells per well at 20% O₂ or 3% O₂ and cultured for 48 h. The XF96 sensor cartridges were hydrated overnight with 200 μ l of Seahorse Bioscience XF96 Calibrant at pH 7.4 and stored at 37 °C without CO₂ for 24 h. The culture medium was replaced with serum-free high glucose DMEM supplemented with glutamine and penicillin and lacking bicarbonate (pH 7.4). Cells were then incubated for 15 min at 37 °C without CO₂ and measurements were performed. Drugs (1 μ M oligomycin and 130 μ M 2,4-dinitrophenol) were added according to the supplier's technical specifications.

Lactate measurement. Cellular lactate was measured with the Lactate Colorimetric Assay Kit (Abcam, Cambridge, MA, USA). Lactate concentration was expressed relative to cell number.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We are indebted to Dr. Judith Campisi (Buck Institute for Age Research) for providing the telomere length control cells and the hTet lentiviral vector, to Jose Manuel Ligos and the Cytometry Unit (CNIC) for advice on FACS analysis, Antonio Diaz-Juan and Kenneth McCreath for critical reading of the paper, Marta Ramón (CNIC) for secretarial assistance and Simon Bartlett (CNIC) for editorial support. This work was supported by grants to AB from the Ministry of Science and Innovation (SAF 2008-02099; PLE2009-0147 and PSE-010000-2009-3), the Comunidad Autónoma de Madrid (P-BIO-0306-2006) and the Red de Terapia Celular del Instituto de Salud Carlos III (TerCel); to ES from the Fundación Mutua Madrileña, the Ministry of Education (Ramon y Cajal program), and the Ministry of Health (RS PI071023) to JAE from the Ministry of Science and Innovation (SAF 2009-08007 and CSD2007-00020). JCE is currently a predoctoral fellow funded by TerCel. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro-CNIC Foundation.

- Siegl G, Schaefer R, Dazzi F. The immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Transplantation* 2009; **87** (9 Suppl): S45-S49.
- Miyahara Y, Nagaya N, Katsuki M, Yanagawa B, Tanaka K, Hao H et al. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 2006; **12**: 459-465.

- Vaupel P, Okunieff P, Neutinger LJ. Blood flow, tissue oxygenation, pH distribution, and energy metabolism of murine mammary adenocarcinomas during growth. *Adv Exp Med Biol* 1988; **248**: 835-845.
- Fischer B, Bavister BD. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil* 1993; **99**: 673-679.
- Pantello S, Samper E, Kralica A, Goldstein J, Meib S, Campisi J. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 2003; **5**: 741-747.
- Chen Q, Fischer A, Reagan JD, Yan LJ, Ames BN. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 4337-4341.
- Buatti RA, Rubio M, Dolle ME, Campisi J, Vig J. Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture. *Aging Cell* 2003; **2**: 287-294.
- Fehler C, Brunsauer R, Laschober G, Unterluggauer H, Reilinger S, Kloss F et al. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesendrymal stem cells and prolongs their lifespan. *Aging Cell* 2007; **6**: 745-757.
- Li TS, Marban E. Physiological levels of reactive oxygen species are required to maintain genomic stability in stem cells. *Stem Cells* 2010; **28**: 1178-1185.
- Forsyth NR, Musib A, Vezzoni P, Simpson AH, Noble BS, McWhir J. Physiologic oxygen enhances human embryonic stem cell clonal recovery and reduces chromosomal abnormalities. *Cloning Stem Cells* 2006; **8**: 16-23.
- Giacca AJ, Simon MC, Johnson R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev* 2004; **18**: 2183-2194.
- Schlotfeld CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; **5**: 343-354.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006; **3**: 187-197.
- Kim JW, Tcheryshov I, Semenza GL, Dang CV. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 2006; **3**: 177-185.
- Lansford PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Drsgowska V, Little MT, Diks RW et al. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 1996; **5**: 685-691.
- Herbert BS, Hochlander AE, Wright WE, Shay JW. Nonspecific detection of telomerase activity using the telomeric repeat amplification protocol. *Nat Protoc* 2008; **1**: 1583-1590.
- von Zglinicki T, Pilger R, Site N. Accumulation of single-strand breaks is the major cause of telomere shortening in human fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 2000; **28**: 64-74.
- von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci* 2002; **27**: 339-344.
- Schultz LB, Chehab NH, Malikzay A, Halazonetis TD. p53 binding protein 1 (53BP1) is an early participant in the cellular response to DNA double-strand breaks. *J Cell Biol* 2000; **151**: 1361-1390.
- Epstein CJ. Cell size, nuclear content, and the development of polyploidy in the Mammalian liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 1967; **57**: 327-334.
- Ishikawa D, Hashimoto N, Hoehima M, Yamaguchi T, Sawaki K, Nakamura Y et al. Analysis of numerical aberrations of specific chromosomes by fluorescent *in situ* hybridization as a diagnostic tool in breast cancer. *Cancer* 1996; **77**: 2064-2069.
- Peterson DL, Robinson RA, Hsu PH, Seelig SA, Borel TJ, Hartmann LC et al. Chromosome-specific aneuploidy in carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res* 1998; **2**: 883-888.
- Mukherjee AB, Costello C. Aneuploidy analysis in fibroblasts of human premature aging syndromes by FISH during *in vitro* cellular aging. *Mech Ageing Dev* 1998; **103**: 209-222.
- Mukherjee AB, Alejandro J, Payne S, Thomas S. Age-related aneuploidy analysis of human blood cells: *in vivo* fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Mech Ageing Dev* 1998; **90**: 145-156.
- Geigl JB, Langer S, Barwich S, Pfeleghaar K, Laderer G, Speicher MR. Analysis of gene expression patterns and chromosomal changes associated with aging. *Cancer Res* 2004; **64**: 8550-8557.
- Giacca A, Sim BG, Johnson RS. HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2003; **2**: 803-811.
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 1956; **124**: 269-270.
- Baker DE, Harrison NJ, Melby E, Smith K, Moore HD, Shaw PJ et al. Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. *Nat Biotechnol* 2007; **25**: 207-215.
- von Zglinicki T, Saretzki G, Docke W, Lotze C. Mild hypoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts: a model for senescence? *Exp Cell Res* 1995; **220**: 186-193.
- Brück RK. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 9082-9087.
- Coppe JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Munoz DP, Goldstein J et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol* 2008; **6**: 2853-2868.
- Kondoh H, Lionart ME, Gil J, Wang J, Dagan P, Peters G et al. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res* 2005; **65**: 177-185.
- Samper E, Flores JM, Blasco MA. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in Tert-/- mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2001; **2**: 800-807.
- Rubio MA, Kim SH, Campisi J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length. Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *J Biol Chem* 2002; **277**: 28609-28617.

35. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* 2003; 19: 185–193.
36. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3.
37. Storey JD, Tibshirani R. Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9440–9445.
38. Falcon S, Gentleman R. Using GOstats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics* 2007; 23: 257–258.
39. Levine RL, Williams JA, Stadman ER, Shacter E. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346–357.
40. Wong SH, Knight JA, Hopfer SM, Zaharia O, Leach Jr CN, Sundeman Jr FW. Lipoperoxides in plasma as measured by liquid-chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct. *Clin Chem* 1987; 33 (2 Part 1): 214–220.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/odd>)



Original Contribution

Increase in mitochondrial biogenesis, oxidative stress, and glycolysis in murine lymphomas

Enrique Samper^{a,b,*}, Lucia Morgado^b, Juan C. Estrada^b, Antonio Bernad^b, Alan Hubbard^{a,c}, Susana Cadenas^b, Simon Melov^a^a The Buck Institute for Age Research, Novato, CA 94945, USA^b Regenerative Cardiology Department, Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Melchor Fernández Almagro 3, E-28029 Madrid, Spain^c Division of Environmental Health Sciences, University of California at Berkeley, Berkeley, CA 94720, USA

ARTICLE INFO

Article history:
 Received 25 April 2008
 Revised 5 September 2008
 Accepted 13 October 2008
 Available online 30 October 2008

Keywords:
 Mitochondria
 Reactive oxygen species
 Glycolysis
 Lymphoma
 p53
 c-myc
 Free radicals

ABSTRACT

Lymphomas adapt to their environment by undergoing a complex series of biochemical changes that are currently not well understood. To better define these changes, we examined the gene expression and gene ontology profiles of thymic lymphomas from a commonly used model of carcinogenesis, the $p53^{-/-}$ mouse. These tumors show a highly significant upregulation of mitochondrial biogenesis, mitochondrial protein translation, mtDNA copy number, reactive oxygen species, antioxidant defenses, proton transport, ATP synthesis, hypoxia response, and glycolysis, indicating a fundamental change in the bioenergetic profile of the transformed T cell. Our results suggest that T cell tumorigenesis involves a simultaneous upregulation of mitochondrial biogenesis, mitochondrial respiration, and glycolytic activity. These processes would allow cells to adapt to the stressful tumor environment by facilitating energy production and thereby promote tumor growth. Understanding these adaptations is likely to result in improved therapeutic strategies for this tumor type.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The P53 tumor-suppressor protein has many essential functions in cell cycle regulation, DNA damage and repair, cell death, glycolysis, senescence, and genetic maintenance [1,2]. P53 is central to tumor prevention, a fact highlighted by the observation that at least 50% of all human tumors bear mutations in p53 or in a regulatory protein within its pathway [1,3].

In mice, loss of p53 leads predominantly to the development of aggressive, genomically unstable lymphomas [4–6]. Interestingly, mutations in p53 are a well-established unfavorable prognostic factor for malignant human adult lymphomas [7]. Although the pathology of lymphomas in $p53^{-/-}$ mice is well documented, the genetic and biochemical factors that synergize with the lack of p53 to produce such tumors are poorly understood. Lymphomas from $p53^{-/-}$ mice accumulate clonal chromosomal aberrations, such as amplifications and translocations in specific chromosomes [6]. This implies that further genetic changes, in addition to the original mutation (p53 deletion), are involved in T cell lymphoma progression.

A common genomic alteration in mouse models of lymphomagenesis is amplification of chromosome 15 [8–11]. It follows that crucial genes in these chromosomes drive the tumorigenic process.

Several reports have demonstrated that the pleiotropic proto-oncogene *c-myc*, located on mouse chromosome 15 and the syntenic human chromosome 8, is amplified and overexpressed in lymphomas [12–17].

c-MYC is upregulated in many human cancers (reviewed in [18]), and this activation, in combination with the functional loss of p53, is among the most frequently recorded genetic lesions in human neoplasia [19]. Although it is widely accepted that *c-MYC* drives tumorigenesis by promoting proliferation, genome instability, and self-renewal, there are other key pathways influenced by *c-MYC* that may be essential for tumor development and maintenance [20]. Recently, it has been reported that *c-MYC* can upregulate mitochondrial biogenesis and mitochondrial respiration in cancer cells [21,22].

Mitochondria are essential organelles and key integrators of metabolism. Mitochondria also play vital roles in cell death, senescence, and cell signaling pathways and hence critically influence cell fate decisions [23–26]. Mammalian mitochondria contain their own 16-kb chromosome, which encodes 13 polypeptides, 12S and 16S rDNAs, and 22 tRNAs required for mitochondrial function [27]. As a trade-off for ATP production, mitochondria consume most of the cellular oxygen and produce the majority of reactive oxygen species (ROS) [28,29]. ROS have been implicated in the etiology of carcinogenesis via oxidative damage to cell macromolecules and through modulation of mitogenic signaling pathways [30]. Mitochondrial dysfunction is implicated in a range of age-related diseases, such as

* Corresponding author. Fax: +34 91 453 12 40.
 E-mail address: esamper@cnic.es (E. Samper).

several neurodegenerative, cardiovascular, and muscular diseases, and in diabetes [23,31,32]. How mitochondrial functions are associated with cancer is a fundamental and complex issue in biomedicine that is not fully understood [33,34].

Cancer cells must adapt to and modify their environment to survive. It is well documented that solid tumors induce a program of adaptive responses to enable them to thrive in hypoxic environments by changing their metabolism, including upregulating glycolysis and releasing angiogenic factors [35–37]. The transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) is a principal component of the hypoxia response in cancer cells [38], where it regulates angiogenesis and glycolytic gene expression and inhibits mitochondrial respiration through the upregulation of PDK1 [39,40].

The $p53^{-/-}$ mouse is one of the most widely used models of lymphomagenesis [4,5]. These mice die predominantly of precursor T cell lymphomas that show high penetrance, low latency, and high levels of genetic instability. The $p53^{-/-}$ mouse is therefore an interesting model for in-depth study of lymphomagenesis, malignization, and metastasis.

To identify the genetic and biochemical adaptations that control the metabolism of these tumors, we carried out whole-genome gene expression profiling on $p53^{-/-}$ thymic lymphomas in comparison with wild-type thymic control tissue. Using this approach, we identified 1090 genes that are differentially expressed at statistically significant levels. Novel algorithms applied to gene ontology (GO) analysis show that several pathways involved in ATPase-coupled proton transport and mitochondrial bioenergetics are significantly overrepresented in the tumor gene expression data. Our results demonstrate that these tumors show high levels of oxidative stress, increased mitochondrial mass and mtDNA content, increased mitochondrial respiration, and overexpression of genes involved in glycolysis and mitochondrial electron transport. These alterations are correlated with increased expression of c-MYC. Our data strongly suggest that these lymphomas mount a compensatory response *in vivo* that facilitates tumor survival through the simultaneous genetic upregulation of mitochondrial bioenergetic pathways and glycolysis.

Materials and methods

Mice

All procedures were carried out in accordance with the approved animal care protocols at the Buck Institute. C57BL/6J $Trp53^{-/-}$ mice (Stock No. 002101) were acquired from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). The $Trp53$ alleles were genotyped with primers IMR13, IMR14, IMR336, and IMR337, as recommended by The Jackson Laboratory. $p53^{-/-}$ mice were monitored three times a week and were killed when they became ill. At necropsy, lymphoma samples were used for RNA, DNA, and protein isolation and histopathological analysis. Small pieces of lymphoma tissue and wild-type thymus gland were disaggregated through a 70- μ m filter (Falcon, Becton–Dickinson) to obtain cell suspensions for FACS analysis, cell-line derivation, and cryogenic storage. Lymphoma cells were cultured in RPMI complete medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), antibiotics, antimycotics, glutamine, and sodium pyruvate (all from Cellgro).

Measurement of oxygen consumption

Oxygen consumption was determined by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k; Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Thymocytes from wild-type mice and tumor cells (BK4 and BY5 cell lines) were counted and resuspended in Hanks' balanced salt solution plus 25 mM Hepes at 2×10^7 cells/ml. The measurements were taken at 37°C. The instrumental background flux was calculated as a linear function of O_2 concentration and the experimental data were corrected for the whole range of O_2 concentrations using DatLab

software (Oroboros Instruments). The O_2 concentration at air saturation at 37°C and local barometric pressure (92.6 kPa) for the culture medium (Hanks' balanced salt solution) was 175.7 μ M (O_2 solubility factor 0.92). Oligomycin (160 ng/ml) was added to inhibit ATP synthesis; rotenone (1 μ M) and myxothiazol (2 μ M) were used to determine non-mitochondrial oxygen consumption; the uncoupler FCCP (0.25 μ M for thymocytes and 0.5 μ M for tumors) was added to study maximal activity of the electron transport chain.

Flow cytometry analysis of ROS

Thymocyte suspensions from wild-type mice or from $p53^{-/-}$ tumors were plated in complete medium at 10^6 cells/ml. After 24 h, cells were incubated for 1 h in complete RPMI medium containing 2 μ M dihydroethidine, 2 μ M CM-H₂DCFDA, or 0.1 μ M MitoTracker green (Molecular Probes). After the cells were washed in PBS with 1% BSA, cellular levels of ROS and mitochondria were determined by flow cytometry in a Becton–Dickinson LSR cytometer, and data were analyzed using the WinMDI version 2.8 software package.

Western blot

Lysates of primary tumors and control thymuses in RIPA buffer (1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.2, 1 mM EGTA, and protease inhibitors (Mini-complete; Roche)) were analyzed by Western blot using the following antibodies: monoclonal mouse anti-rabbit glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (RDI-TRK5G4-6C5; Research Diagnostics), anti- β -actin (clone AC-15; Sigma), anti-nitrotyrosine (487923; Calbiochem), anti-HSP70 (AB6535; Ab Biochem), anti-porin (VDAC; A31855), mouse monoclonal anti-COX Va and Vb (A21363 and A21349, respectively; Molecular Probes), and anti-c-MYC (ab17356; Abcam).

Immunofluorescence

Paraffin sections (5 μ m) from thymic lymphomas and control tissue were deparaffinized and incubated in sodium citrate, pH 6.0, for antigen retrieval. The sections were incubated with 1:250 anti-porin antibody (A31855; Molecular Probes), washed, mounted in Vectashield H-1200 (Vector Labs), and processed for immunofluorescence by standard methods. Immunofluorescence images were acquired with a Nikon 90i fluorescence microscope fitted with a 60 \times objective and appropriate filters and analyzed with the ImageJ software package.

Analysis of mtDNA copy number by real-time PCR

DNA from frozen tumor and control thymic tissue was extracted with phenol:chloroform and quantified by Nanodrop. For each PCR, total DNA (100 ng) was added to the Power Sybr Mix (Applied Biosystems) with each primer at 400 nM: sense, 13597 5'-CCCAGC-TACTACCATCATTCAGT-3', and antisense, 13688 5'-GATGTTTGGA-GATTGGTTGATG T-3' [41]. Mitochondrial DNA content was normalized to the copy number of the nuclear gene *Jag2*. *Jag2* PCR was performed with the following primers: sense, 5'-TGGTCCACTGAGAGTTGCTG-3', and antisense, 5'-TACTGAGCTAGCCCAGGAT-3'. Relative mitochondrial DNA content was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method in an ABI Prism 7000 PCR apparatus (Perkin–Elmer). DNA melting curves were performed to ensure that a single PCR product was amplified.

Tumor cytogenetics and cell cycle profile

Metaphases were prepared by mincing extracted lymphoma tissue and incubating the tumor cell suspension in RPMI medium containing 10% FCS, antibiotics, and 0.1 μ g/ml colcemid for 2 h. The mitotically arrested cells were treated with 0.56% KCl for 30 min, fixed in

Table 1Gene expression ontologies for mitochondrial bioenergetics in mouse *p53*^{-/-} thymic lymphomas

GO ID	T/C ratio	BH-adjusted p value	GO term
GO:0008553	1.16	0.001161006	Hydrogen-exporting ATPase activity
GO:0019867	1.15	0.001236526	Mitochondrial outer membrane
GO:0015986	1.22	0.001469855	ATP synthesis-coupled proton transport
GO:0016469	1.22	0.001615088	Proton-transporting two-sector ATPase complex
GO:0015078	1.15	0.00206569	Hydrogen ion transporter activity
GO:0015992	1.12	0.002256386	Proton transport

Gene ontology results from significantly overrepresented gene categories (terms) in thymic lymphomas from *p53*^{-/-} mice. Only GO processes with an estimated FDR p value of < 5%, adjusted for multiple testing based on the Benjamini–Hochberg method (BH), were considered for analysis. T/C ratio refers to the GO expression ratio between tumors (n=9) and control thymuses (n=5).

Table 2Mitochondrial gene expression results in *p53*^{-/-} thymic lymphomas

Gene	Gene name	T/C	FDR	Function
<i>Upregulated</i>				
NM_172264	Choline dehydrogenase	4.73	0.002	Alcohol metabolism
NM_007506	ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 1	1.66	0.002	ATP generation
NM_138597	ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F1 complex, O subunit	3.15	0.001	ATP generation
NM_026468	ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c (subunit 9), isoform 2	3.47	0.001	ATP generation
NM_027862	ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	2.02	0.002	ATP generation
NM_025983	ATP synthase, H ⁺ -transporting, mitochondrial F1 complex, c subunit	1.56	0.002	ATP generation
NM_013898	Translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog a (yeast)	2.66	0.000	Chaperone, mitochondrial import
NM_178639	Sideroflexin 5	2.30	0.002	Citrate transport
XM_128696	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1α, subcomplex 11	1.74	0.003	Electron transport
NM_025551	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1α, subcomplex 12	3.34	0.000	Electron transport
NM_007747	Cytochrome c oxidase, subunit Va	2.32	0.003	Electron transport
NM_025628	Cytochrome c oxidase, subunit Vb polypeptide 1	1.71	0.005	Electron transport
NM_009942	Cytochrome c oxidase, subunit Vb	3.11	0.000	Electron transport
NM_007748	Cytochrome c oxidase, subunit Va, polypeptide 1	3.38	0.000	Electron transport
XM_485640	COX18 cytochrome c oxidase assembly homolog (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	3.06	0.000	Electron transport
NM_023172	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1β, subcomplex 9	3.84	0.000	Electron transport
NM_153064	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2	2.46	0.000	Electron transport
NM_026703	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1α, subcomplex 8	2.47	0.001	Electron transport
NM_025567	Cytochrome c-1	3.12	0.002	Electron transport
NM_010911	Nitrogen fixation gene 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	1.91	0.003	Fe-S cluster generation
NM_025650	Ubiquinol-cytochrome c reductase (6.4-kDa) subunit	2.53	0.003	Fe-S cluster generation
NM_011695	Voltage-dependent anion channel 2	2.52	0.001	Mitochondrial import/export
NM_007931	Endonuclease G	2.55	0.003	mtDNA replication
NM_016895	Adenylate kinase 2	2.22	0.004	Nucleotide metabolism
NM_007573	Complement component 1, q subcomponent binding protein	5.06	0.000	Nucleus-mitochondrion interactions
NM_133668	Solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 3	2.75	0.001	Phosphate transport
NM_013604	Metaxin 1	1.84	0.001	Protein transport
NM_025434	Mitochondrial ribosomal protein S28	1.86	0.003	Translation
NM_024227	Mitochondrial ribosomal protein L28	2.02	0.001	Translation
NM_024174	Mitochondrial ribosomal protein S23	1.51	0.002	Translation
NM_025537	Ts translation elongation factor, mitochondrial	2.15	0.001	Translation
NM_053159	Mitochondrial ribosomal protein L3	2.15	0.001	Translation
NM_138591	G elongation factor 1	2.71	0.002	Translation
NM_025553	Mitochondrial ribosomal protein L11	2.40	0.002	Translation
NM_026498	Mitochondrial ribosomal protein S11	1.82	0.002	Translation
NM_025544	Mitochondrial ribosomal protein S15	2.30	0.002	Translation
<i>Downregulated</i>				
NM_172961	4-Aminobutyrate aminotransferase	0.17	0.000	Amino acid metabolism
NM_008293	Hydroxysteroid dehydrogenase-1, δ<5>-3-β	0.60	0.005	Biosynthesis of hormonal steroids
NM_007751	Cytochrome c oxidase, subunit VIIb	0.03	0.000	Electron transport
NM_010887	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4	0.52	0.004	Electron transport
NM_007381	Acetyl-coenzyme A dehydrogenase, long chain	0.38	0.002	Fatty acid metabolism
NM_019946	Mitochondrial glutathione S-transferase 1	0.40	0.003	Glutathione metabolism
NM_023644	Methylcrotonoyl-coenzyme A carboxylase 1 (α)	0.36	0.000	Leucine metabolism
NM_145567	3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	0.32	0.002	Lipid transport and metabolism
NM_026405	RAB32, member RAS oncogene family	0.17	0.002	Mitochondrial fission and signaling
NM_133201	Mitofusin 2	0.62	0.005	Mitochondrial fusion and apoptosis
NM_008441	Kinesin family member 1B	0.25	0.000	Mitochondrial transport
NM_021028	Thymidine kinase 2, mitochondrial	0.37	0.000	Nucleotide metabolism
NM_007621	Carbonyl reductase 2	0.02	0.000	Oxidative stress
NM_173733	Sulfite oxidase	0.28	0.001	Oxidoreductase and sulfur metabolism
NM_009463	Uncoupling protein 1 (mitochondrial, proton carrier)	0.01	0.000	Uncoupling

Gene expression results for mitochondrial proteins in the thymic tumors. Only gene expression differences with an estimated FDR p value of < 5%, adjusted for multiple testing based on the Benjamini–Hochberg method, were considered for analysis. T/C refers to the gene expression ratio between thymic lymphomas (n=9) and control thymuses (n=5).

methanol:acetic acid 3:1, and dropped onto clean microscope slides. Metaphases were hybridized with a Cy3-labeled chromosome 15 painting probe (Cambio, Ltd) as recommended by the manufacturer or stained with DAPI for chromosome number evaluation. At least 20 metaphases were analyzed per tumor. Fluorescence images were acquired with a Zeiss Axioplan2 microscope equipped with a 63× planapo objective.

Cell cycle profile

Approximately 1×10^6 methanol:acetic acid-fixed tumor and control (bone marrow) cells were incubated with 10 μM propidium iodide and 10 μM RNase A for 1 h at 37°C and analyzed by flow cytometry using a Becton–Dickinson LSR cytometer and the CellQuest software package.

Gene expression, gene ontology, and statistical analysis

See the supplementary methods for a description of these procedures.

Results

Characterization of gene expression in mouse thymic lymphomas

To better understand the genetic and biochemical changes that take place during lymphomagenesis, we compared the gene expression profiles of nine independent *p53*^{-/-} thymic tumors with wild-type thymuses from 3-month-old mice. To establish which gene expression changes were statistically significant, we selected all genes with an estimated false discovery rate (FDR adjusted *p* value) below 5%, based on the Benjamini–Hochberg method [42].

Expression data from thymic lymphomas indicated that, compared with control thymic cell populations, 623 transcripts were significantly downregulated and 465 upregulated (Table S1). Thymic lymphomas thus present a highly altered and complex transcriptional profile, with 1090 differentially expressed genes. Many of these genes are involved in diverse but interconnected pathways, including hypoxia responses, glycolysis, oxidative phosphorylation, mitochondrial metabolism, oxidative stress responses, and DNA replication and repair (Table S1).

To determine which pathways were over- or underrepresented significantly, we applied a novel statistical approach to GO analysis (see supplementary methods). GO results indicated significant differences for 61 biological processes (Table S2). Of the 33 over-represented GO categories, 6 are implicated in mitochondrial proton transport and ATP production (Table 1).

Mitochondrial processes are upregulated in thymic lymphomas

Given this finding, and the fact that mitochondria are key integrators of energy metabolism, we reanalyzed the data to investigate whether thymic lymphomas present significant differences in mitochondrial gene expression. This analysis showed that 36 mitochondrial genes are significantly upregulated and 15 significantly downregulated (Table 2). Among the upregulated genes are five subunits of ATP synthase (1.5- to 4.73-fold), 11 proteins involved in electron transport (1.7- to 3.8-fold), and 8 involved in mitochondrial protein translation (1.5- to 2.7-fold) (Table 2). In addition to these genes, the expression profile shows a significant 2.3-fold upregulation of citrate synthase (*p* = 0.001) (Table S1), a commonly used marker for intact mitochondria.

To confirm the expression data, five wild-type and tumor samples were analyzed by Western blot for complex IV subunits Va and Vb, nuclear components of the COX complex, and porin, a major

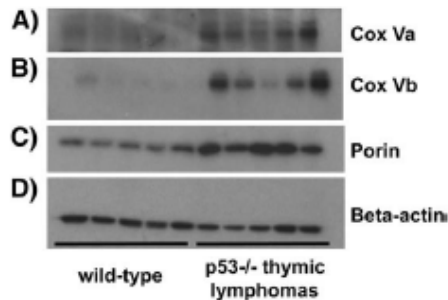


Fig. 1. Western blot of the mitochondrial proteins (A and B) cytochrome c oxidase subunits Va and Vb and (C) porin (VDAC), demonstrating a significant increase in mitochondrial proteins in *p53*^{-/-} thymic lymphomas (*n* = 5) versus wild-type thymic tissue (*n* = 5). (D) β -Actin was used as a loading control.

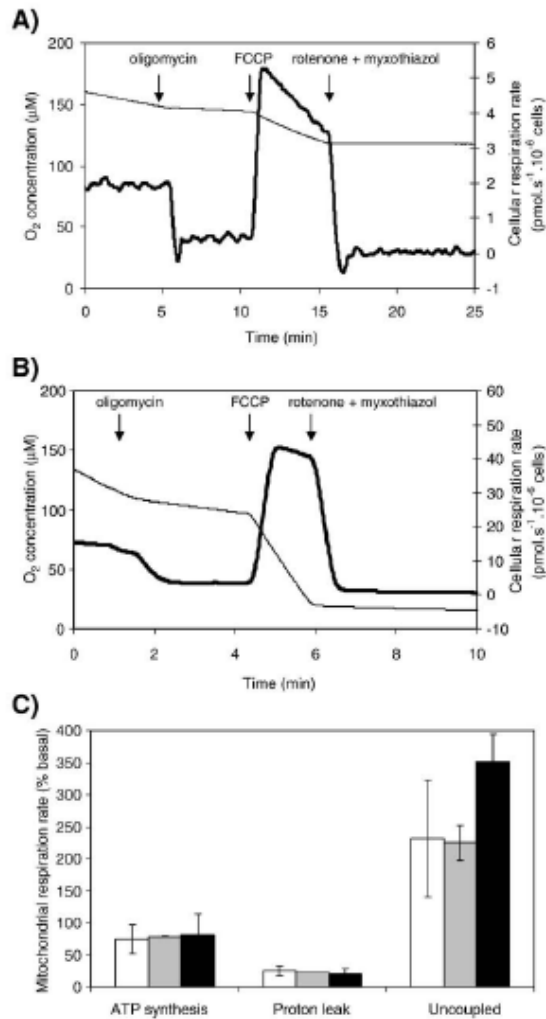


Fig. 2. Oxygen consumption and cellular respiration rates in (A) thymocytes and (B) tumor cells. Representative traces of oxygen concentration (thin line) and cellular respiration (thick line) of thymocytes and tumor cells measured by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k). Arrows indicate the time of addition of oligomycin (160 ng/ml), FCCP (0.25 μ M for thymocytes and 0.5 μ M for tumors), and rotenone (1 μ M) plus myxothiazol (2 μ M). (C) Mitochondrial respiration rates calculated from (A) and (B). White bars, thymocytes; gray bars, BK4 tumor cells; black bars, BY5 tumor cells. Non-mitochondrial oxygen consumption was measured after the addition of rotenone plus myxothiazol and was subtracted from the cellular respiration rates. Mitochondrial respiration rates are expressed as a percentage of basal respiration. Respiration driving ATP synthesis was calculated as the mitochondrial rate sensitive to oligomycin and respiration driving proton leak as the mitochondrial rate insensitive to oligomycin. Uncoupled mitochondrial respiration was calculated after the addition of FCCP. Data are means \pm SD (*n* = 2–4). There were no significant differences between thymocytes and tumor cells for any of the data in (C).

mitochondrial protein involved in mitochondrial import/export. The gene expression profile had indicated that mRNAs encoding these proteins are upregulated 2.3- to 3.1-fold. The Western blots confirmed that the expression of mitochondrial proteins is strongly induced in the thymic lymphomas (Fig 1), as well as in a set of B and T human lymphomas (Supplementary Fig. 1). These data thus indicate a pronounced upregulation of several important mitochondrial proteins

in thymic lymphomas, suggesting a significant modification of mitochondrial metabolism.

Mitochondrial respiration is greatly increased in thymic lymphomas

The increased mitochondrial gene expression in the thymic tumors indicates that there may be an increase in mitochondrial respiration. To study mitochondrial function, oxygen consumption and cellular respiration rates were determined by high-resolution respirometry (Fig. 2). Basal oxygen consumption in tumor cells was around eightfold higher than in thymocytes (compare Figs. 2A and 2B). Oxygen consumption was inhibited when oligomycin was added to prevent ATP synthesis, stimulated when oxidative phosphorylation was uncoupled by addition of FCCP, and almost completely inhibited when the electron transport chain was blocked with rotenone (which inhibits complex I) plus myxothiazol (which inhibits complex III). Oligomycin inhibits mitochondrial ATP synthesis, therefore respiration that is sensitive to oligomycin is due to ATP synthesis, whereas respiration that is insensitive to oligomycin is due to proton leak pathways through the mitochondrial inner membrane. There was no significant difference between the proportion of respiration to drive ATP synthesis and proton leak in thymocytes or tumor cells. In the presence of FCCP respiration represents the maximal capacity of substrate oxidation under the experimental conditions. The concentration of FCCP necessary to obtain maximal respiration in tumor cells was twice that in thymocytes. The maximal capacity of the BY5 tumor cells was higher than that of thymocytes or BK4 tumor cells but this difference was not statistically significant. The residual rate in the presence of rotenone plus myxothiazol represents the non-mitochondrial oxygen consumption. It was determined as $3.87 \pm 3.43\%$ of the basal respiration rate in tumor cells and $3.63 \pm 2.37\%$ in thymocytes and was subtracted from the oxygen consumption rates to assess mitochondrial respiration.

Glycolytic and hypoxia-induced genes are overexpressed in thymic lymphomas

Glycolytic energy production is a hallmark of solid tumors [37,43] and is known to be upregulated in hypoxic tumor cells because of the lack of oxygen for oxidative phosphorylation [35]. The gene expression analysis showed that several critical glycolytic genes are transcriptionally upregulated in thymic lymphomas. For example, muscle phosphofructokinase, a key glycolysis regulator, was significantly overexpressed (3.8-fold), as were aldolase 1, phosphoglycerate kinase, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (2.5-, 3.9-, and 2.3-fold, respectively; Table S1). Western blot of thymic lymphoma samples confirmed GAPDH protein overexpression of about 2-fold ($p < 0.01$; Figs. 3A and 3B). Thus several glycolytic enzymes are significantly upregulated in $p53^{-/-}$ thymic lymphomas.

One of the best characterized mechanisms of glycolysis upregulation is the hypoxia response through activation of HIF-1 [38]. Several HIF-1 targets are significantly upregulated in the thymic tumors, by 2.5- to 8-fold (Table S3). These include EGL nine homolog 3 (*Caenorhabditis elegans*), heme oxygenase (decycling) 1, transferrin receptor, and pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 3 [38,39]. These data strongly suggest that HIF-1 is activated in thymic lymphoma, which could, in part, explain the activation of glycolytic enzymes.

Thymic lymphoma cells undergo endogenous oxidative stress and activate mitochondrial biogenesis

Because the gene expression profiling and GO analysis clearly uncovered alterations in genes involved in mitochondrial bioenergetics and oxidative stress (Tables 1 and 2), we tested the hypothesis that $p53$ -deficient thymic lymphomas were subject to endogenous

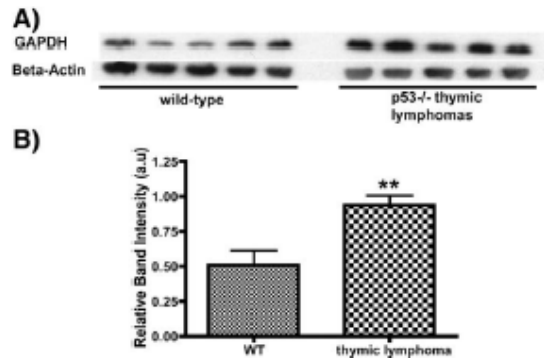


Fig. 3. (A) Western blot of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in wild-type thymuses ($n=5$) and $p53^{-/-}$ thymic lymphomas ($n=5$), showing increased GAPDH levels in tumor samples. β -Actin was used as a loading control. (B) Quantification of the relative levels of GAPDH from (A). ** $p < 0.01$.

oxidative stress. For this, we measured ROS levels in control thymocytes and $p53$ -deficient lymphomas by flow cytometry, using the peroxide marker dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) and the superoxide marker dihydroethidine (DHE). Compared with controls, tumor thymocytes showed a three- to fourfold increase in DCFDA and DHE fluorescence (Figs. 4A and 4B), indicating that the lymphoma thymocytes are in a state of chronic oxidative stress, in agreement with previous reports [44–46].

Concurrent with the high ROS levels, mRNAs for several enzymes involved in oxidative stress detoxification were significantly increased in the tumors, including peroxiredoxin 4, peroxiredoxin 6, peroxiredoxin 6-like, and glutathione peroxidase 1 (Table S1). These data support the hypothesis that high endogenous ROS concentrations elicit a compensatory response by upregulating the expression of antioxidant proteins.

Most ROS are generated during mitochondrial electron transport [29]. Our findings that mitochondrial protein content, gene expression, and respiration are significantly increased in the thymic tumors (Table 1 and Figs. 1, 2B, and 2C) strongly suggest that mitochondrial biogenesis is enhanced. To assess this possibility we used the mitochondrial dye MitoTracker green in flow cytometry studies of lymphoma and normal thymic lymphocytes. MitoTracker green fluorescence was higher in tumor lymphocytes (Fig. 4C), indicating upregulation of mitochondrial content. These results were validated by estimating mitochondrial porin levels by Western blot and *in situ* immunofluorescence (Figs. 1 and 5, respectively).

To further confirm that lymphomas contain increased mitochondrial content we measured mtDNA copy number, as a surrogate marker of mitochondria, by real-time quantitative PCR of a 117-bp mtDNA fragment [41]. Input genomic DNA was normalized by amplification of the Jagged-2 gene on chromosome 14. Our results indicate a significant ($p=0.0011$) difference between the ΔC_t values that corresponds to a 2.3-fold increase in mitochondrial DNA content in these tumor samples (Fig. 6), in agreement with the Western, immunofluorescence, and gene expression results. Collectively, these results show that mitochondrial biogenesis is potently activated in $p53^{-/-}$ thymic lymphomas.

Thymic lymphomas are highly aneuploid and show amplification of chromosome 15 and overexpression of c-MYC

Previous studies had indicated that murine $p53^{-/-}$ thymic lymphomas are commonly aneuploid [6,47,48]. To test if the tumors studied here are indeed aneuploid we prepared metaphase spreads

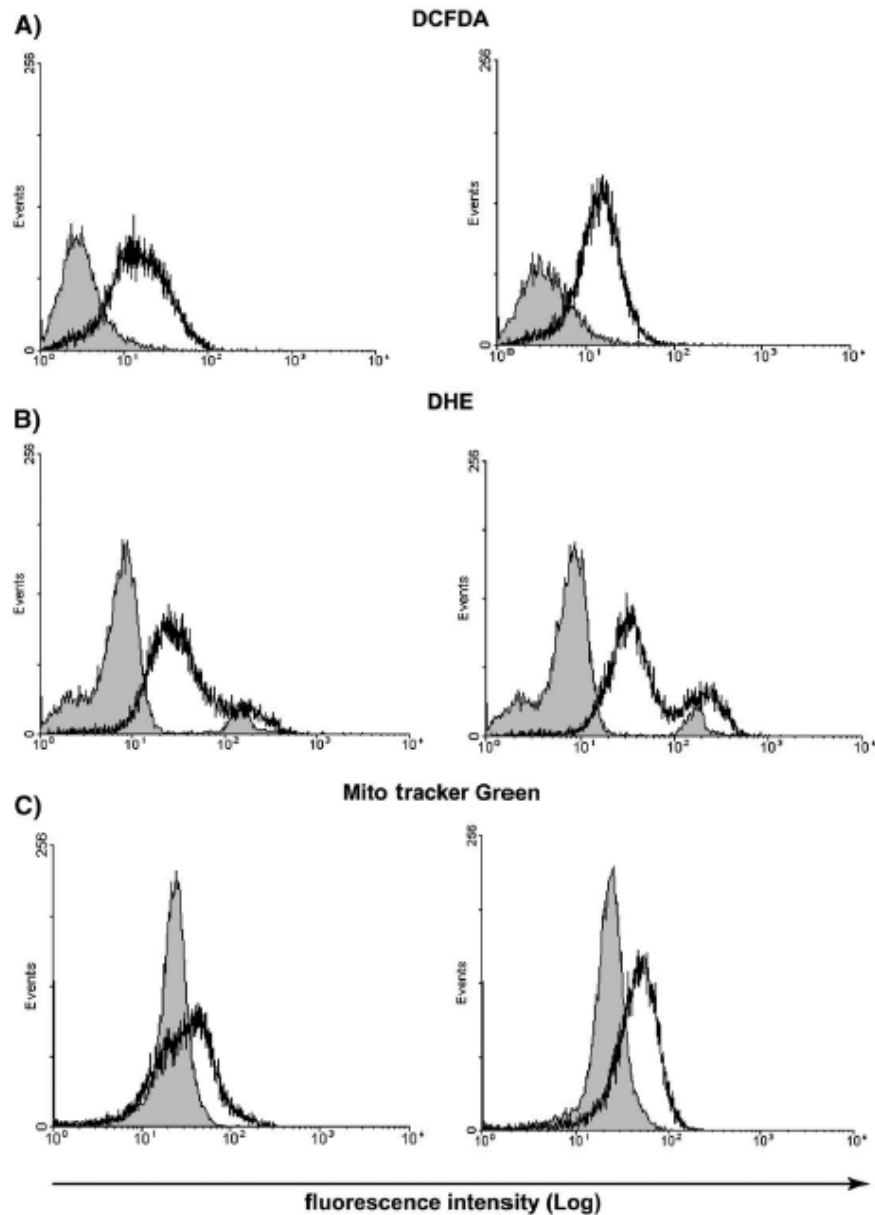


Fig. 4. Representative flow cytometry charts of thymocytes from $p53^{-/-}$ thymic lymphomas and wild-type nontumor tissue, showing (A) an increase in peroxides, as measured by the fluorescence of oxidized DCFDA; (B) an increase in superoxide, as measured by the fluorescence of oxidized DHE products; and (C) an increase in thymocyte mitochondrial content, as measured by the fluorescence of MitoTracker green. Two representative experiments are shown of $n=4$ (A and B) or $n=3$ (C) thymic tumors examined. White histograms depict fluorescence of tumor thymocytes; gray histograms depict fluorescence of wild-type thymocytes.

directly from the tumor tissue and analyzed chromosome number by DAPI staining (Supplementary Fig. 2). Our results indicate that 10/11 tumors have a median chromosomal number >40 and have a significant (sixfold, $p < 0.05$) increase in the intracellular chromosomal number variation (Supplementary Fig. 2) compared to primary hematopoietic cells.

Several experimental models of murine lymphomagenesis show amplification of chromosome 15, suggesting that genes in this chromosome directly or indirectly drive tumorigenesis [8–11,13,16]. We assayed chromosome 15 copy number in $p53^{-/-}$ thymic lymphomas by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and found that chromosome 15 is frequently triploid in these tumors (Fig. 7A).

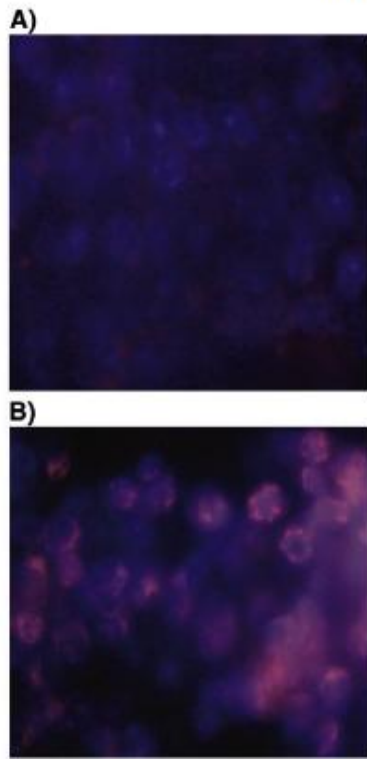


Fig. 5. Photomicrographs showing representative immunofluorescence staining of porin in paraffin sections of tissue from (A) wild-type thymus and (B) $p53^{-/-}$ thymic lymphomas. Porin is used as an index of mitochondrial content. Nuclei are stained with DAPI (blue) and porin is stained red.

The proto-oncogenic transcription factor c-MYC is located on mouse chromosome 15 and human chromosome 8 and is frequently amplified in mouse and human lymphomas [8–11,13,17,49,50]. Thus, c-MYC is a likely candidate for driving lymphomagenesis in cooperation with the lack of p53. Western blot analysis confirmed that thymic lymphomas upregulate c-MYC (Fig. 7B), in accordance with previous reports [6,9].

Discussion

Precursor T cell lymphoma is a consistent feature of the $p53^{-/-}$ mouse model. The transcriptional and biochemical characteristics that allow these tumors to thrive despite the aggressive tumor micro-environment are not well defined. Here, we have used gene expression profiling, GO analysis, and biochemical approaches to show that mitochondrial biogenesis, mitochondrial respiration, and glycolysis are increased simultaneously in $p53$ -deficient thymic lymphomas to allow their survival, development, and progression.

Energy generation is fundamental for tumor cell survival. Solid tumors are usually oxygen deprived, and their bioenergetic metabolism is consequently believed to depend on glycolysis [43]. Evidence for overexpression of glycolytic genes in cancer cells continues to accumulate [51–54]. Our analysis shows that the bioenergetic gene expression profile is highly altered in $p53$ -deficient thymic tumors and that these tumors show robust induction of key glycolytic enzymes (Fig. 3, Table S1).

Upregulation of glycolysis in hypoxic tumors is thought to be mediated by activation of HIF-1. Consistent with previous findings, our data show significant upregulation of HIF-1 targets in T cell lymphomas (Table S3) and support a model in which upregulation of glycolytic genes is mediated, in part, through the hypoxic response [38]. A pivotal role in the induction of glycolytic enzymes has also been demonstrated recently for c-MYC [55], and its overexpression in thymic lymphomas reported here suggests that c-MYC may contribute to the upregulation of glycolytic enzymes in these tumors. HIF-1 and c-MYC can act synergistically to promote lymphomagenesis, and this may be related to a cooperative upregulation of glycolytic genes [56,57].

However, our results also indicate that, in addition to glycolysis, thymic lymphomas activate mitochondrial biogenesis. These tumors exhibit increased expression of several genes involved in ATPase-coupled proton transport and ATP synthesis. Among these are the cytochrome c oxidase (COX) subunits Va and Vb. COX is the terminal enzyme complex of the electron transport chain and oxidizes cytochrome c to generate ATP. Increased expression of COX Vb is thought to decrease apoptosis by sequestering cytochrome c in the mitochondria, thus decreasing the activation of caspase-3 and caspase-9 [58].

Importantly, we report that the respiration rate of thymic tumors was around eightfold that of control thymocytes, in agreement with the increase in mitochondrial content (Figs. 1, 4C, and 5) and gene expression data (Tables 1 and 2). Furthermore, we observed no significant functional differences between mitochondria within thymocytes and tumors, indicating that these tumor mitochondria are functionally competent. The percentage of respiration used for ATP synthesis is the coupling efficiency, and the value obtained in thymocytes and tumors (~80%) is similar to values found in a range of other cell types [59].

Upregulation of mitochondrial content and respiration rates could seem to be in conflict with the HIF-1 data, because HIF-1 has recently been shown to downregulate mitochondrial ATP production and oxygen consumption by inducing pyruvate dehydrogenase kinase 1, which phosphorylates and inhibits pyruvate dehydrogenase, leading to reduced levels of acetyl-CoA [39,40]. Thus our finding that mitochondrial biogenesis and oxygen consumption are activated simultaneously with significant activation of HIF-1 targets and

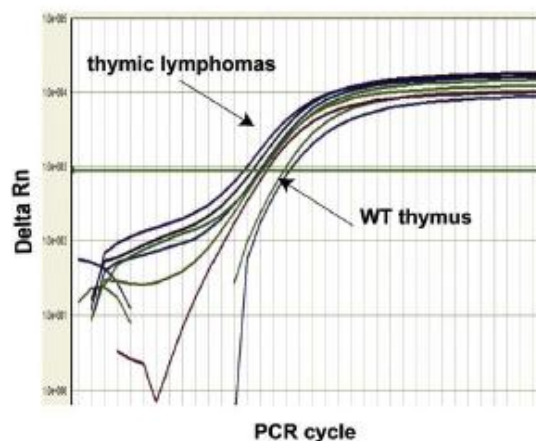


Fig. 6. Real-time PCR amplification curves for mitochondrial DNA from thymocytes from two wild-type animals and six $p53^{-/-}$ thymic tumors. The amplification curves for wild-type thymocytes are displaced to the right, which corresponds to a higher C_t value, indicating fewer copies of mtDNA than in the tumor thymocytes.

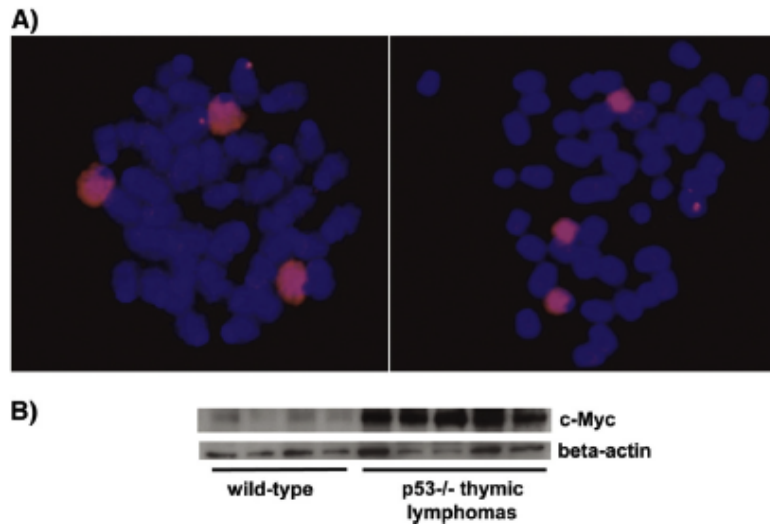


Fig. 7. (A) FISH of metaphase spreads from two independent thymic lymphomas hybridized with a Cy-3-labeled whole chromosome 15 painting probe (red signal) and counterstained with DAPI (blue), demonstrating frequent triploidy of chromosome 15 in these tumors. (B) Western blot of c-MYC in wild-type thymuses ($n=4$) and $p53^{-/-}$ thymic lymphomas ($n=3$), showing significantly elevated c-MYC expression in tumors. β -Actin was used as a loading control.

glycolytic genes suggests that these two major biochemical pathways are not always mutually exclusive.

Increased mitochondrial biogenesis in both mouse and human lymphomas is also evidenced by the upregulation of porin (Figs. 1 and 5 and Supplementary Fig. 1), increased mitochondrial mass, and increased mtDNA content. Increased mtDNA correlates with the significant upregulation of endonuclease G and heme oxygenase-1 (HO-1) transcripts in lymphomas (Table 2). Endonuclease G is reported to generate the RNA primers required for mitochondrial DNA replication by DNA polymerase γ [60], and HO-1 expression is needed for maintenance of mitochondrial biogenesis upon exposure to doxorubicin [61].

The upregulation of mitochondrial biogenesis may be an additional survival strategy for this type of tumor [62]. However, surprisingly, the gene expression profile does not show a significant increase in any of the known genes that activate mitochondrial biogenesis directly, such as TFAM, PGC-1 α , PPARs, NRF-1, or NRF-2 (reviewed in [36]). Intriguingly, our results (Table S1) indicate a significant decrease in the expression of the proline-rich nuclear receptor coactivator 1, a PGC-1 related protein involved in the activation of NRF-1 and in mitochondrial biogenesis [63,64]. Hence, this study suggests that there may be other key factors involved in the upregulation of mitochondrial biogenesis in thymic lymphomas. One clear candidate is c-MYC, which is commonly overexpressed in human and murine lymphomas [6,9] and has been linked to mitochondrial biogenesis [21,22,40,65].

The biogenesis of mitochondria depends on the coordinated expression of nuclear and mitochondrial genomes. It is therefore not surprising that c-MYC could play a central role, because its target gene network is estimated to comprise about 15% of all protein-coding genes [18]. The overexpression of c-MYC has been shown to increase proliferation, ROS production, and genetic instability [20,21,65]. In addition, through its actions on mitochondrial content and glycolysis, c-MYC may provide the mechanisms by which tumors meet their energy requirements. This may explain the common upregulation of c-MYC in lymphomas and the synergism between the p53 mutations and the c-MYC overexpression/amplification in a variety of tumors [16,19,20,66,67].

Although the GO analysis demonstrated upregulation of several mitochondrial components, others were downregulated. One of the significantly downregulated mitochondrial genes is uncoupling protein 1 (UCP-1), which has recently been reported in normal thymocytes [68,69] (Table 2). UCP-1 plays a crucial role in maintaining the proton leak across the mitochondrial inner membrane, resulting in adaptive thermogenesis in brown fat [70]. In addition to thermogenesis, UCP-1 may prevent mitochondrial oxidative stress by limiting the mitochondrial membrane potential [71]; however, these effects may be cell and context dependent [72]. Reduced UCP-1 mRNA levels may favor a higher rate of ROS production consistent with our results. However, the observed decreased UCP-1 mRNA levels do not result in a significant change in proton leak in the tumor cells (Fig. 2C), which suggests that thymic lymphoma cells increase mitochondrial respiration through a significant increase in mitochondrial content per cell rather than an increase in mitochondrial coupling.

Our results indicate that the increased levels of ROS in the lymphomas may be a consequence of increased mitochondrial number and/or mitochondrial dysfunction. ROS production may be selected for in the tumor cells: our working hypothesis is that the oxidative stress plays a positive role in lymphomagenesis, by contributing to mitogenic signaling, genetic variation, chromosomal instability, and tumor evolution rate [44,73,74]. We also propose that the notable increase in mitochondrial content and respiration, together with enhanced glycolytic gene transcription, is selected to provide the bioenergetic resources and apoptosis protection needed for tumor growth. We also propose that the upregulation of c-MYC may be an important mediator in both the activation of glycolysis and the mitochondrial biogenesis that results in increased ATP production in this tumor type. Agents that selectively interfere with these pathways, such as mitochondrial polymerase inhibitors, for example, could improve the effectiveness of current treatments for T cell lymphomas. Indeed, small-molecule CDK1 inhibitors have been successfully used recently for the treatment of c-MYC-dependent tumors in murine models [75] and have been proposed for the treatment of human malignancies that overexpress c-MYC.

Acknowledgments

We are indebted to Krysta Felkey (Buck Institute) for gene expression arrays, Scott Kogan (UCSF) for assessment of tumors, Surita Banwait (Buck Institute) for H and E sections, Nicole Nagulko (Buck Institute) for help with the mouse colony, David Nicholls (Buck Institute) for advice and reagents for mitochondrial assays, Keyvan Niazi (Buck Institute) for help with flow cytometry, and Simon Bartlett (CNIC, Spain) for editorial support and Christopher Benz, Judy Campisi (Buck Institute), and Antonio Diaz (CNIC) for critiques. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs and the Pro-CNIC Foundation. The authors acknowledge support from National Institutes of Health AG18679 (S.M.), the Ellison Medical Foundation (S.M.), and an EMBO postdoctoral fellowship (E.S.). This work was supported by a Ramón y Cajal contract from the Spanish Ministry of Education (E.S. and S.C.) and grants from the Ministry of Health (PIFS07/1023 (E.S.) and 06/0701 (S.C.)) and the Fundación Mutua Madrileña (E.S.).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.036.

References

- Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**:323–331; 1992.
- Vousden, K.H.; Lu, X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* **2**:594–604; 2002.
- Hollstein, M.; Sidransky, D.; Vogelstein, B.; Harris, C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* **253**:49–53; 1991.
- Donehower, L.A.; Harvey, M.; Slagle, B.L.; McArthur, M.J.; Montgomery, J.C., C.A.; Butel, J.S.; Bradley, A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* **356**:215–221; 1992.
- Jacks, T.; Remington, L.; Williams, B.O.; Schmitt, E.M.; Halachmi, S.; Bronson, R.T.; Weinberg, R.A. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* **4**:1–7; 1994.
- Venkatachalam, S.; Shi, Y.P.; Jones, S.N.; Vogel, H.; Bradley, A.; Pinkel, D.; Donehower, L.A. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO J.* **17**:4657–4667; 1998.
- Hoshida, Y.; Hongyu, T.; Xu, J.X.; Sasaki, T.; Tomita, Y.; Nomura, T.; Aozasa, K. TP53 gene mutation, an unfavorable prognostic factor for malignant lymphomas in autoimmune diseases. *Oncology* **69**:175–183; 2005.
- Graham, M.; Adams, J.M.; Cory, S. Murine T lymphomas with retroviral inserts in the chromosomal 15 locus for plasmacytoma variant translocations. *Nature* **314**:740–743; 1985.
- Bain, G.; Engel, I.; Robanus-Maandag, E.C.; te Riele, H.P.; Volland, J.R.; Sharp, L.L.; Chun, J.; Huey, R.; Pinkel, D.; Murte, C. E2A deficiency leads to abnormalities in alpha-beta T-cell development and to rapid development of T-cell lymphomas. *Mol. Cell Biol.* **17**:4782–4791; 1997.
- Spira, J.; Wiener, F.; Ohno, S.; Klein, G. Is trisomy cause or consequence of murine T cell leukemia development? Studies on Robertsonian translocation mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**:6619–6621; 1979.
- Uno, M.; Wirschubsky, Z.; Babonis, M.; Wiener, F.; Sumegi, J.; Klein, G. The role of chromosome 15 in murine leukemogenesis. II. Relationship between tumorigenicity and the dosage of lymphoma vs. normal-parent-derived chromosomes 15 in somatic cell hybrids. *Int. J. Cancer* **40**:540–549; 1987.
- Boxer, L.M.; Dang, C.V. Translocations involving c-myc and c-myc function. *Oncogene* **20**:5595–5610; 2001.
- Trichlis, P.N.; Strauss, P.G.; Kozak, C.A. Cellular DNA region involved in induction of thymic lymphomas (Mtv-2) maps to mouse chromosome 15. *Mol. Cell Biol.* **4**:997–1000; 1984.
- Gelmann, E.P.; Psalidopoulos, M.C.; Pappas, T.S.; Dalla-Favera, R. Identification of reciprocal translocation sites within the c-myc oncogene and immunoglobulin mu locus in a Burkitt lymphoma. *Nature* **306**:799–803; 1983.
- Altalo, K.; Ramsay, G.; Bishop, J.M.; Pfeifer, S.O.; Colby, W.W.; Levinson, A.D. Identification of nuclear proteins encoded by viral and cellular myc oncogenes. *Nature* **306**:274–277; 1983.
- Zhu, C.; Mills, K.D.; Ferguson, D.O.; Lee, C.; Manis, J.; Heming, J.; Gao, Y.; Morton, C.C.; Alt, F.W. Unrepaired DNA breaks in p53-deficient cells lead to oncogenic gene amplification subsequent to translocations. *Cell* **109**:811–821; 2002.
- Ramiro, A.R.; Jankovic, M.; Eisenreich, T.; Difilippantonio, S.; Chen-Kiang, S.; Muramatsu, M.; Honjo, T.; Nussenzweig, A.; Nussenzweig, M.C. A/D is required for c-myc/IGH chromosome translocations in vivo. *Cell* **118**:431–438; 2004.
- Chang, T.C.; Yu, D.; Lee, Y.S.; Wentzel, E.A.; Arking, D.E.; West, K.M.; Dang, C.V.; Thomas-Tikhonenko, A.; Mendell, J.T. Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat. Genet.* **40**:43–50; 2008.
- Blyth, K.; Terry, A.; O'Hara, M.; Baxter, E.W.; Campbell, M.; Stewart, M.; Donehower, L.A.; Orions, D.E.; Neil, J.C.; Cameron, E.R. Synergy between a human c-myc transgene and p53 null genotype in murine thymic lymphomas: contrasting effects of homozygous and heterozygous p53 loss. *Oncogene* **10**:1717–1723; 1995.
- Vafa, O.; Wade, M.; Kern, S.; Beeche, M.; Pandita, T.K.; Hampton, G.M.; Wahl, G.M. c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability. *Mol. Cell Biol.* **22**:1031–1044; 2002.
- Li, F.; Wang, Y.; Zeller, K.L.; Potter, J.J.; Wonsley, D.R.; O'Donnell, K.A.; Kim, J.W.; Yustein, J.T.; Lee, L.A.; Dang, C.V. Myc stimulates nuclear encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell Biol.* **25**:6225–6234; 2005.
- Wonsley, D.R.; Zeller, K.L.; Dang, C.V. The c-Myc target gene PRDX3 is required for mitochondrial homeostasis and neoplastic transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**:6649–6654; 2002.
- Wallace, D.C.; Brown, M.D.; Melov, S.; Graham, R.; Lott, M. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *BioFactors* **7**:187–190; 1998.
- Cadenas, E.; Davies, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic. Biol. Med.* **29**:222–230; 2000.
- Nicholls, D.G.; Budd, S.L. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol. Rev.* **80**:315–360; 2000.
- Kroemer, G.; Zamzami, N.; Susin, S.A. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today* **18**:44–51; 1997.
- Clayton, D.A. Structure and function of the mitochondrial genome. *J. Inher. Metab. Dis.* **15**:439–447; 1992.
- Boveris, A. Determination of the production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. *Methods Enzymol.* **105**:429–435; 1984.
- Hansford, R.G.; Hogue, R.A.; Miklazene, V. Dependence of H₂O₂ formation by rat heart mitochondria on substrate availability and donor age. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29**:89–95; 1997.
- Hussain, S.P.; Hofseth, L.J.; Harris, C.C. Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3**:276–285; 2003.
- DiMauro, S.; Bonilla, E.; Davidson, M.; Hirano, M.; Schon, E.A. Mitochondria in neuromuscular disorders. *Biochim. Biophys. Acta* **1366**:199–210; 1998.
- Shapira, A.H. Mitochondrial disorders. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **3**:457–465; 1993.
- Perry, M.E.; Dang, C.V.; Hockenbery, D.; Moll, U. Highlights of the National Cancer Institute Workshop on mitochondrial function and cancer. *Cancer Res.* **64**:7640–7644; 2004.
- Eng, C.; Kuru, M.; Fernandez, M.J.; Aaltonen, L.A. A role for mitochondrial enzymes in inherited neoplasia and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **3**:193–202; 2003.
- Giacca, A.J.; Simon, M.C.; Johnson, R. The biology of hypoxia: the role of oxygen sensing in development, normal function, and disease. *Genes Dev.* **18**:2183–2194; 2004.
- Ryan, M.T.; Hoogenraad, N.J. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.* **76**:701–722; 2007.
- Hanahan, D.; Weinberg, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell* **100**:57–70; 2000.
- Semenza, G.L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**:721–732; 2003.
- Kim, J.W.; Tchernyshyov, I.; Semenza, G.L.; Dang, C.V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* **3**:177–185; 2006.
- Zhang, H.; Gao, P.; Paluda, R.; Kumar, G.; Krishnamachary, B.; Zeller, K.L.; Dang, C.V.; Semenza, G.L. HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* **11**:407–420; 2007.
- Santos, J.H.; Mandavilli, B.S.; Van Houten, B. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. *Methods Mol. Biol.* **197**:159–176; 2002.
- Hochberg, Y.; Benjamini, Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Stat. Med.* **9**:811–818; 1990.
- Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**:309–314; 1956.
- Cerimel, F.; Battle, T.; Lynch, R.; Frank, D.A.; Murad, E.; Cohen, C.; Macaron, N.; Sixbey, J.; Smith, K.; Watnick, R.S.; Eliopoulos, A.; Shehata, R.; Arbisser, J.L. Reactive oxygen signaling and MAPK activation distinguish Epstein-Barr virus (EBV)-positive versus EBV-negative Burkitt's lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**:175–179; 2005.
- Schubert, R.; Erker, L.; Batlow, C.; Yakushiji, H.; Larson, D.; Russo, A.; Mitchell, J.B.; Wynshaw-Boris, A. Cancer chemoprevention by the antioxidant tempol in Atm-deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* **13**:1793–1802; 2004.
- Suzuki, G.; Shimada, Y.; Hayashi, T.; Akashi, M.; Hirama, T.; Karunoki, Y. An association between oxidative stress and radiation-induced lymphomagenesis. *Radiat. Res.* **161**:642–647; 2004.
- Shao, C.; Deng, L.; Henegariu, O.; Liang, L.; Skambrook, P.J.; Tischfield, J.A. Chromosome instability contributes to loss of heterozygosity in mice lacking p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**:7405–7410; 2000.
- Liao, M.J.; Zhang, X.X.; Hill, R.; Gao, J.; Qumsiyeh, M.B.; Nichols, W.; Van Dyke, T. No requirement for V(D)J recombination in p53-deficient thymic lymphoma. *Mol. Cell Biol.* **18**:3495–3501; 1998.
- Difilippantonio, M.J.; Petersen, S.; Chen, H.T.; Johnson, R.; Jasin, M.; Kanaar, R.; Ried, T.; Nussenzweig, A. Evidence for replicative repair of DNA double-strand breaks leading to oncogenic translocation and gene amplification. *J. Exp. Med.* **196**:469–480; 2002.
- Popescu, N.C.; Zimonjic, D.B. Chromosome-mediated alterations of the MYC gene in human cancer. *J. Cell. Mol. Med.* **6**:151–159; 2002.
- Daniel, N.N.; Grimm, C.F.; Scorrano, L.; Zhang, C.Y.; Krauss, S.; Ronger, A.M.; Dutta, S.R.; Greenberg, M.E.; Licklider, L.J.; Lowell, B.B.; Gygi, S.P.; Korsmeyer, S.J.

- BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis. *Nature* **424**:952–956; 2003.
- [52] Kondoh, H.; Leonart, M. E.; Gil, J.; Wang, J.; Degan, P.; Peters, G.; Martinez, D.; Carnero, A.; Beach, D. Glycolytic enzymes can modulate cellular life span. *Cancer Res.* **65**:177–185; 2005.
- [53] Macip, S.; Igarashi, M.; Berggren, P.; Yu, J.; Lee, S. W.; Aaronson, S. A. Influence of induced reactive oxygen species in p53-mediated cell fate decisions. *Mol. Cell. Biol.* **23**:8576–8585; 2003.
- [54] Sablina, A. A.; Budanov, A. V.; Ilyinskaya, G. V.; Agapova, L. S.; Kravchenko, J. E.; Chumakov, P. M. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* **11**:1306–1313; 2005.
- [55] Kim, J. W.; Zeller, K. L.; Wang, Y.; Jegga, A. G.; Aronow, B. J.; O'Donnell, K. A.; Dang, C. V. Evaluation of myc E-box phylogenetic footprints in glycolytic genes by chromatin immunoprecipitation assays. *Mol. Cell. Biol.* **24**:5923–5936; 2004.
- [56] Huang, L. E. Carrot and stick: HIF- α engages c-Myc in hypoxic adaptation. *Cell Death Differ.* **15** (4):672–677; 2008.
- [57] Kim, J. W.; Gao, P.; Liu, Y. C.; Semenza, G. L.; Dang, C. V. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-Myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* **27**:7381–7393; 2007.
- [58] Wu, H.; Rao, G. N.; Dai, B.; Singh, P. Autocrine gastrins in colon cancer cells up-regulate cytochrome c oxidase Vb and down-regulate efflux of cytochrome c and activation of caspase-3. *J. Biol. Chem.* **275**:32491–32498; 2000.
- [59] Brand, M. D. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem. Soc. Trans.* **33**:897–904; 2005.
- [60] Cote, J.; Ruiz-Carrillo, A. Primers for mitochondrial DNA replication generated by endonuclease G. *Science* **261**:765–769; 1993.
- [61] Suliman, H. B.; Carraway, M. S.; Ali, A. S.; Reynolds, C. M.; Welty-Wolf, K. E.; Piantadosi, C. A. The CO/HO system reverses inhibition of mitochondrial biogenesis and prevents murine doxorubicin cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* **117**:3730–3741; 2007.
- [62] Jo, S. H.; Yang, C.; Miao, Q.; Marzec, M.; Wasik, M. A.; Lu, P.; Wang, Y. L. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes lymphocyte survival through its actions on cellular metabolic activities. *J. Immunol.* **177**:3737–3745; 2006.
- [63] Goffart, S.; Wiesner, R. J. Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp. Physiol.* **88**:33–40; 2003.
- [64] Scapulla, R. C. Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* **1576**:1–14; 2002.
- [65] Dang, C. V.; Li, F.; Lee, L. A. Could MYC induction of mitochondrial biogenesis be linked to ROS production and genomic instability? *Cell Cycle* **4**:1465–1466; 2005.
- [66] Fukasawa, K.; Wiener, F.; Vande Woude, G. F.; Mai, S. Genomic instability and apoptosis are frequent in p53 deficient young mice. *Oncogene* **15**:1295–1302; 1997.
- [67] McCormack, S. J.; Weaver, Z.; Deming, S.; Natarajan, G.; Torri, J.; Johnson, M. D.; Iyanage, M.; Ried, T.; Dickson, R. B. Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16**:2755–2766; 1998.
- [68] Adams, A. E.; Harrahan, O.; Nolan, D. N.; Voorheis, H. P.; Fallon, P.; Porter, R. K. Images of mitochondrial UCP 1 in mouse thymocytes using confocal microscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**:115–117; 2008.
- [69] Carroll, A. M.; Haines, L. R.; Pearson, T. W.; Fallon, P. G.; Walsh, C. M.; Brennan, C. M.; Breen, E. P.; Porter, R. K. Identification of a functioning mitochondrial uncoupling protein 1 in thymus. *J. Biol. Chem.* **280**:15534–15543; 2005.
- [70] Nicholls, D. G.; Ferguson, S. J. *Bioenergetics 2*, 3rd ed. Academic Press, London; 1992.
- [71] Echtay, K. S.; Roussel, D.; St-Pierre, J.; Jekabsons, M. B.; Cadenas, S.; Stuart, J. A.; Harper, J. A.; Roeback, S. J.; Morrison, A.; Pickering, S.; Clapham, J. C.; Brand, M. D. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins. *Nature* **415**:96–99; 2002.
- [72] Johnson-Cadwell, L. I.; Jekabsons, M. B.; Wang, A.; Polster, B. M.; Nicholls, D. G. 'Mild uncoupling' does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress. *J. Neurochem.* **101** (6):1619–1631; 2007.
- [73] Feig, D. J.; Reid, T. M.; Loeb, L. A. Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* **54**:1890s–1894s; 1994.
- [74] Limoli, C. L.; Giedzinski, E.; Morgan, W. F.; Swartz, S. G.; Jones, G. D.; Hyun, W. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res.* **63**:3107–3111; 2003.
- [75] Goga, A.; Yang, D.; Tward, A. D.; Morgan, D. O.; Bishop, J. M. Inhibition of CDK1 as a potential therapy for tumors over-expressing MYC. *Nat. Med.* **13**:820–827; 2007.

Altered Hematopoiesis in Mice Lacking DNA Polymerase μ Is Due to Inefficient Double-Strand Break Repair

Daniel Lucas^{1‡}, Beatriz Escudero², José Manuel Ligos², Jose Carlos Segovia³, Juan Camilo Estrada², Gloria Terrados⁴, Luis Blanco⁴, Enrique Samper^{1,2†}, Antonio Bernad^{1,2†*}

1 Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain, **2** Departamento de Cardiología Regenerativa, Unidad de Celómica, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III, Madrid, Spain, **3** Hematopoiesis and Gene Therapy Division, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales, y Tecnológicas, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Madrid, Spain, **4** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

Abstract

Polymerase mu (Pol μ) is an error-prone, DNA-directed DNA polymerase that participates in non-homologous end-joining (NHEJ) repair. *In vivo*, Pol μ deficiency results in impaired V κ -J κ recombination and altered somatic hypermutation and centroblast development. In Pol $\mu^{-/-}$ mice, hematopoietic development was defective in several peripheral and bone marrow (BM) cell populations, with about a 40% decrease in BM cell number that affected several hematopoietic lineages. Hematopoietic progenitors were reduced both in number and in expansion potential. The observed phenotype correlates with a reduced efficiency in DNA double-strand break (DSB) repair in hematopoietic tissue. Whole-body γ -irradiation revealed that Pol μ also plays a role in DSB repair in non-hematopoietic tissues. Our results show that Pol μ function is required for physiological hematopoietic development with an important role in maintaining early progenitor cell homeostasis and genetic stability in hematopoietic and non-hematopoietic tissues.

Citation: Lucas D, Escudero B, Ligos JM, Segovia JC, Estrada JC, et al. (2009) Altered Hematopoiesis in Mice Lacking DNA Polymerase μ Is Due to Inefficient Double-Strand Break Repair. *PLoS Genet* 5(2): e1000389. doi:10.1371/journal.pgen.1000389

Editor: Dale A. Ramsden, University of North Carolina at Chapel Hill, United States of America

Received: March 14, 2008; **Accepted:** January 21, 2009; **Published:** February 20, 2009

Copyright: © 2009 Lucas et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the Spanish Plan Nacional de Salud y Farmacia/CICYT (SAF2001-2262 and SAF2005-08064-C04-01), Comunidad Autónoma de Madrid (P-BIO-0306-2006) and Red de Terapia Celular del Instituto de Salud Carlos III (TeiCeI) to AB, and Fundación Mutua Madrileña, the Ramon y Cajal program of the Ministry of Education, and the Ministry of Health (FIS P1071023) to ES. DL is currently a Fundación Ramon Areces Fellow and BE is fellow of the Instituto de Salud Carlos III. DL, GT and ES were supported by the Spanish Ministry of Science and Technology. The Department of Immunology and Oncology was founded and is supported by the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) and by Pfizer. The CNIC is supported by the Spanish Ministry of Science and Innovation and the Pro-CNIC Foundation.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: abemad@cnic.es

† These authors are joint senior authors on this work.

‡ Current address: Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, New York, United States of America

Introduction

In higher eukaryotes, DNA double strand breaks (DSB) are repaired through two main pathways: homologous recombination [1] and non-homologous end-joining (NHEJ) (reviewed [2–4]). Although NHEJ predominates during the G0/G1 and early S phases of the cell cycle [5,6], both mechanisms can act in coordination [7–9].

Polymerase mu (Pol μ) is an error-prone DNA-directed DNA polymerase belonging to the PolX family, with a high amino acid similarity to TdT [10–13] and, like TdT, Pol μ has terminal transferase activity [11]. Unlike TdT, Pol μ is expressed in many tissues (liver, kidney, lung, brain, testis), although it is especially abundant in lymphohematopoietic organs [11,14]. Pol μ interacts with components of the NHEJ repair pathway (Ku 70/80) and is up-regulated after the induction of DSB by γ -irradiation, a known clastogen [15]. Double immunostaining for Pol μ and phosphorylated γ -H2AX, a modified histone found at DSB sites, shows that Pol μ is recruited to these sites [15]. *In vitro*, Pol μ participates in specific NHEJ reactions that require DNA polymerase activity [15–17].

Analysis of a Pol μ knockout mouse model has identified a specialized function for this enzyme during V(D)J recombination [18]. Specifically, Pol μ is required for correct recombination of the immunoglobulin κ light chain during B cell development, and its deficiency results in shorter, non-productive V κ -J κ junctions and hence lymphocyte cell death at the transition from PreB to Immature B cell stage [18]. Because V(D)J recombination is essentially a modified end-joining reaction (reviewed in [19]), the participation of Pol μ in this process demonstrates its requirement for at least a subset of NHEJ reactions *in vivo*. This role of Pol μ has also been demonstrated *in vitro* [16].

The expression pattern of Pol μ [11,14] suggests that it might participate in NHEJ in other tissues, especially in non-B cell hematopoietic populations. In recent years it has been demonstrated that several DNA repair pathways play a clear role in the maintenance of the hematopoietic system and of hematopoietic stem cell (HSC) number and function during aging [20,21]. For example, in Ercc1-deficient mice hematopoiesis is impaired and bone marrow cellularity and hematopoietic progenitor cell (HPC) numbers are reduced [22]; in mice deficient in Brca2, the

Author Summary

Double-strand breaks (DSB) in DNA are a highly deleterious type of genetic damage, potentially causing genomic rearrangements or cell death if unrepaired. DSB can be triggered by environmental factors (such as electromagnetic radiation or clastogenic chemicals) or normal cell metabolism. The main mechanism of DSB repair in mammals is thought to be the non-homologous end-joining (NHEJ) pathway. Our article describes how DNA polymerase mu (Pol μ), a recently identified component of the NHEJ machinery, is required for hematopoiesis—the process that generates and maintains the correct balance of the millions of blood cells needed to sustain life and defend against infection. Hematopoietic stem cells (HSC) divide asymmetrically, yielding another HSC and a progenitor cell. These progenitors proliferate and differentiate, their progeny eventually generating mature blood cells. In mice in which Pol μ is genetically eliminated, we found that hematopoietic progenitors proliferate slowly and are functionally impaired. The incidence of DSB in hematopoietic cells from these mice is increased, suggesting that reduced DNA repair may be the cause of the hematopoietic defects. DNA damage was also increased in tissues unrelated to hematopoiesis, including liver, kidney, lung, and mouse embryonic fibroblasts. Thus, these results demonstrate that Pol μ plays an important role in general DSB repair in many cell lineages.

reconstitution capacity of HSC and progenitor cells is reduced [23]. Hypomorphic Rad50 mutant mice have growth defects and are predisposed to cancer and progressive HSC failure [24]. Irradiated Parp $^{-/-}$ mice are myelosuppressed, display extensive hemorrhaging and show altered extramedullary hematopoiesis during the recovery phase [25]. Mice deficient either in XPD (from the nucleotide excision repair pathway) or Ku80 (NHEJ) show reduced HPC numbers in bone marrow. Although the numbers of HSC in these mice is unaltered, HSC reconstitution potential during aging is reduced [21]. A similar phenotype is observed in another mouse model of NHEJ deficiency (Lig4 Y288C mice; [20]), and together these reports strongly suggest that HSC accumulate mutations during aging that impair their function and highlight the role of the different repair pathways in maintaining hematopoietic homeostasis [20,21].

We have investigated the role of Pol μ in hematopoiesis and general DNA repair. Pol μ $^{-/-}$ mice have reduced numbers of most peripheral blood populations and show impaired hematopoiesis as a result of the reduced numbers of hematopoietic progenitors. Pol μ $^{-/-}$ hematopoietic and non-hematopoietic cells accumulate DSB, both spontaneously and after γ -irradiation, indicating a role for Pol μ in general DSB repair.

Materials and Methods

Mice

The generation of Pol μ $^{-/-}$ mice has been described previously [14]. Mutant and wildtype (wt) mice were bred in our specific pathogen-free facilities and were routinely screened for pathogens. Most experiments were carried out with animals in the mixed original (129/Balb/c) background. Where indicated, experiments were carried out in the C57BL/6 background. B6.SJL mice were purchased from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), and housed at the CIEMAT animal facility. All experiments were performed according to Spanish and European regulations for the use and treatment of experimental animals, with the approval of

the Centro Nacional de Biotecnología (CNB) and the Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) animal ethics committees.

Bone Marrow and Spleen Cell Suspensions

Femurs and tibias were removed from mice, and bone marrow was extracted by complete flushing with PBS under sterile conditions. Spleens were retrieved and disaggregated in sterile PBS. In each case, tissue extracts were incubated in 0.85% NH $_4$ Cl to lyse erythrocytes. Cells were counted with a hemocytometer and used in subsequent assays.

Hematological, Histological, Flow Cytometry, and Cell Cycle Analyses

Blood was collected in a capillary tube from the retro-orbital sinus and transferred to EDTA-coated tubes. For hematology, 25 μ l were analyzed in an MS9 machine (Kemia, Madrid, Spain). For flow cytometry (FCM), whole blood was incubated with the corresponding antibodies, fixed, and erythrocytes lysed with OptiLyse C (Immunotech). Cells were analyzed in a Cytomics FC 500 cytometer (Beckman Coulter). Bone marrow cells were stained with antibodies in ice-cold PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA. Antibodies used were anti-CD19-PE, -CD19-SPRD, -CD3-FITC, -CD4-SPRD, -CD8-PE, -CD11b (Mac1)-PE, -Gr1-FITC, -B220-FITC, -B220-PE, -IgM-PE, -Ter119-PE, -CD41-FITC, (BD-Pharmingen). Cell cycle status was monitored by estimating total cell DNA content in a flow cytometer after staining 70% methanol fixed cells with 10 μ g/ml propidium iodide and 10 μ g/ml RNase A.

For bone marrow progenitor analysis, bone marrow cells were extracted from femurs and tibias, counted, and stained in ice-cold PBS, 0.5% BSA plus 2 mM EDTA. Except for samples for detection of CMPs, GMPs and MEPs, samples were blocked with FcBlock (anti-CD16/CD32, BD Pharmingen). Samples were stained with the following antibodies: biotin-conjugated lineage antibody cocktail (anti-CD3e, -CD11b, -B220, -Ly6G/Ly6C and -TER-119), anti-CD117 (c-kit) (FITC or PE), anti-CD16/32-FITC, anti-CD135-PE, anti-Sca1-PE-Cy7 (all from BD Pharmingen); anti-CD127-Biotin, anti-CD127-PE (eBiosciences); anti-CD34-PE-Cy5 (Biolegend), and Streptavidin-Pacific Blue (Invitrogen). To exclude dead cells Hoechst 33582 was added to every sample. All samples were acquired with a BDFASCanto II cytometer (BDBiosciences). At least 1 million cells were acquired for each sample. Data were analyzed with FlowJo software (Tree Star, Inc.) and fluorescent-minus-one controls were used to define gates [26].

For histology, femurs or tibias were formalin-fixed, decalcified and paraffin-embedded. Sections (5 μ m) were hematoxylin-eosin stained. Photographs were acquired with a Leica DM RB microscope fitted with a DP 70 digital camera (Olympus) and linked to DP controller software (Olympus).

Splenocyte Culture and Irradiation

Splenocytes from wt or Pol μ $^{-/-}$ animals were cultured in RPMI 1640 medium (Biowhitaker) supplemented with 10% FCS, non-essential amino-acids, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 10 U/mL penicillin/estreptomycin, 10 μ g/ml LPS (Sigma) and 10 ng/ml IL-4 (Preprotek Inc.). After 72 hours, cultures were gamma irradiated at 8 Gy. Cells were collected after 1, 3 and 6 hours; cell were collected by centrifugation and processed for protein extraction.

Proliferation Assays

To evaluate proliferation during stimulation with SCF and IL-3, bone marrow cells (10^6) were seeded in Iscove's modified Dulbecco

medium (IMDM) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco-BRL), 10% conditioned medium from IL-3-producing WEHI-3B cells, and 50 ng/ml human SCF (Stem Cell Technologies). For long-term bone marrow cultures (LTBMC), whole bone marrow suspensions were seeded in Methocult 5300 (Stem Cell Technologies) with 10^{-6} M hydrocortisone (Sigma), and incubated (33°C, 5% CO₂) for 1–4 weeks as indicated, with a weekly culture medium change.

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 10 mM HEPES, 1 mM sodium pyruvate, non-essential amino acids, and 50 μ g/ml gentamycin (all from BioWhittaker). Cell cultures were maintained at 37°C, 95% humidity and 5% CO₂.

For MEF growth assays, embryos were minced with a razor blade and incubated in 0.25% trypsin, 0.1% EDTA for 30 min at 37°C. The cell suspension was plated in DMEM, 10% FCS containing antibiotics. Confluent cultures were split and passage cultures plated at 1×10^6 cells on 10-cm tissue culture plates (Falcon). Cells were trypsin passaged every 3–4 days. Cumulative cell growth was calculated with the formula $PD = \log(n_f - n_i) / \log 2$, where PD is population doubling and n_i and n_f are the initial and final number of cells.

Clonogenic Assays

Cells were cultured in the appropriate differentiation medium: Methocult M3630 for PreB colonies; M3534 for CFU-G+M colonies; and M3231 with 10% WEHI-3B-conditioned medium, SCF (50 ng/ml) and erythropoietin (6 U/ml) for BFU-E colonies (all from Stem Cell Technologies). Colonies were counted 7 days after seeding. When indicated, colony area was measured by analysis of photomicrographs with ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Competitive Repopulation Assay

Bone marrow mononuclear cells (BMNC) were recovered from male wt or Pol $\mu^{-/-}$ C57BL/6 mice (which express the CD45.2 surface antigen in hematopoietic cells) as described above. Cells were prepared from four animals per genotype. The Pol $\mu^{-/-}$ or wt cells (2×10^6) were mixed with 2×10^6 competitor bone marrow mononuclear cells from female B6.SJL mice (which express the CD45.1 surface antigen in hematopoietic cells). The mix was injected into the tail veins of female previously irradiated B6.SJL recipients (see below). Repopulation was monitored over 4 months post-transplant by FCM to detect the percentage of CD45.1⁺ and CD45.2⁺ cells in peripheral blood. Four months post-transplant, animals were sacrificed and the relative population of CD45.1⁺ and CD45.2⁺ cells was analyzed in all hematopoietic organs. In parallel, the number of male cells was assessed by Y-chromosome FISH [27]- and Y chromosome-specific PCR [28].

The number of repopulating units (RU) was determined as described [29]. Briefly, number of donor RU = (percentage of donor cells \times number of competitor RU) / (100-percent of donor cells). We have assumed that 1×10^5 competitor cells contain 1 RU.

Comet Assay

Comet assays were performed with the Cometassay kit (Trevigen). Comet images were obtained for at least 50 cells per condition and analyzed with TriTek CometScore (<http://www.tritekcorp.com>).

DNA Damage Assays

For γ -irradiation survival assays of myeloid clonogenic forming units (CFU-C), bone marrow cells were seeded as for clonogenic

assays and immediately irradiated (0–8 Gy) in a Cesium Mark1 irradiator (Shepherd Associates). The number of surviving CFU-C colonies was scored 7 days post-irradiation. For γ -irradiation survival assays with MEF, 3×10^2 cells were seeded in 10 cm² culture plates (Corning Inc.) and irradiated (0–8 Gy) after 24 hours; Crystal Violet stained colonies were counted after 7 days.

Whole-Body γ -Irradiation

To evaluate differential sensitivity to irradiation, mice were exposed to γ -irradiation (4–10 Gy, single dose) and closely monitored throughout the experimentation period. Animals were killed at the first appearance of signs of poor health. Recipients of bone marrow transplants were pre-irradiated with a total dose of 10.2 Gy (two doses of 5.1 Gy, 3 h apart). For *in vivo* DNA damage experiments, mice were irradiated with a single dose of 5Gy and killed after 1, 3 or 6 hours. All irradiations were carried out in a Cesium Mark1 irradiator (Shepherd Associates).

Immunofluorescence Microscopy

Cell suspensions were deposited on superfrost slides (Menzel-Glaser) for 5 min. Adhered cells were fixed in 4% paraformaldehyde (20 min, 4°C), washed three times in PBS containing 0.1% Tween (PBST) and blocked (1 h) in PBST/10% BSA. Preparations were incubated overnight with anti-phosphorylated γ -H2AX antibody (Upstate) in PBST/1% BSA. After washing with PBST and staining with secondary antibody (40 min), preparations were washed and mounted, with DAPI, in VectaShield mounting medium (Vector).

Confocal images were acquired on a Fluoview FV1000 Olympus microscope using Fluoview version 1.4 acquisition software. TIFF images were analyzed with Image J. Spleen and bone marrow populations were scored for the number of γ -H2AX positive cells and the number of γ -H2AX foci per nuclei.

Chromosome Instability Analysis

Nine-month-old wt or Pol $\mu^{-/-}$ mice were irradiated (5 Gy) and bone marrow cell suspensions prepared after a 6 h recovery period, to allow time for *in vivo* DNA repair. Cells (2×10^6 /ml) were cultured in Myelocult 5300 medium (Stem Cell) supplemented with 20% FCS, 10% WEHI cell-conditioned medium (IL-3) and antibiotics. Metaphase spreads were prepared four days after irradiation.

For telomere *in situ* hybridization (Tel-FISH), metaphase cells were hybridized with a telomeric Cy3- or FITC-labeled PNA-(CCCTAA)_n probe (Applied Biosystems) essentially as described [30], except that post-hybridization washes (3 \times 10 min) were performed in PBST at 50°C. FISH images were captured with a Nikon 80I microscope fitted with a 100 \times 1.3 NA planfluor objective and an Olympus DP digital camera. Between 40 and 80 metaphase spreads were scored for chromosomal aberrations (chromosome and chromatid breaks, dicentric, rings and Robertsonian-like chromosomes: see examples in Figure S5).

Western Blot and Histone Extraction

For non-histone proteins, extracts were prepared with RIPA lysis buffer (150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0). Acidic extraction of histones was carried out as follows. Tissue or pelleted cells were mechanically disaggregated in 0.25 M HCl, incubated at 4°C with agitation for 14 h, centrifuged (13000 rpm, 10 min, 4°C), and further incubated for 4 h in 8 volumes of acetone. After centrifugation (5000 rpm, 5 min), pellets were washed with acetone and dried in a SpeedVac.

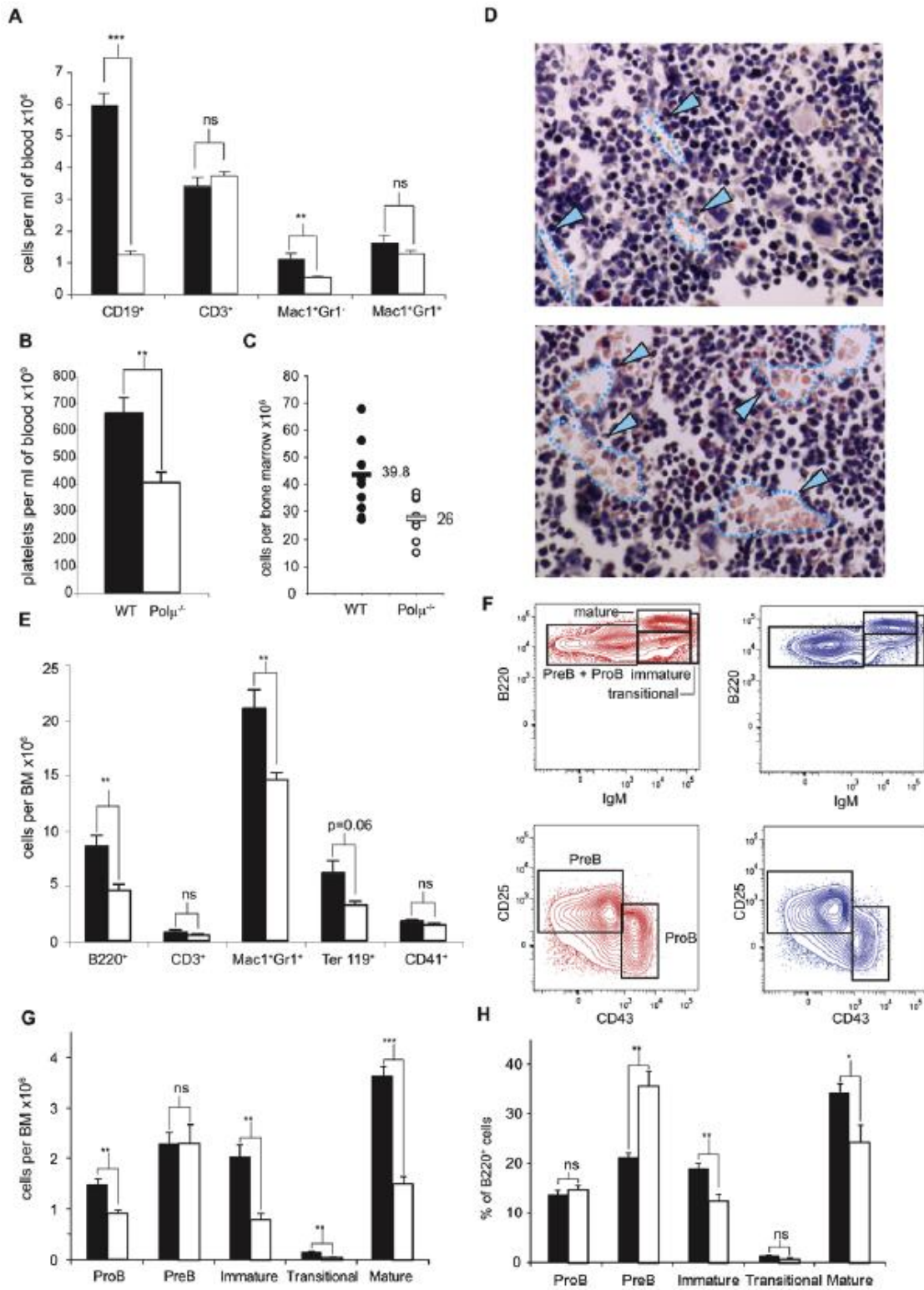


Figure 1. Blood and bone marrow cell profiles are altered and bone marrow cell numbers reduced in Polμ^{-/-} mice. A. Blood cell populations in wildtype (WT; n=6–12; solid bars) and Polμ^{-/-} mice (n=7–13; open bars). CD19, B lymphocytes; CD3, T lymphocytes; Mac1⁺Gr1⁻, monocytes; and Mac1⁺Gr1⁺, neutrophils. B. Representative experiment showing platelet numbers in WT (solid bar; n=6) and Polμ^{-/-} mice (open bar; n=16). C. Representative experiment showing distribution of bone marrow (BM) populations (two femurs per mouse) in WT (closed circles; n=4–7) and Polμ^{-/-} mice (open circles; n=4–8). D. Histological sections of Polμ^{-/-} and WT BM; endothelial sinusoids are delineated by a dashed line (blue) and marked by blue arrowheads. E. BM cell population analysis by flow cytometry (WT, solid bars; n=7; Polμ^{-/-}, open bars; n=8), showing B220 (B cell) and CD3 (T cell), Mac1Gr1 (myelomonocytic), Ter119 (erythroid), and CD41 (megakaryocytic) lineages. F. Representative flow cytometry plots of B cell differentiation analysis in the bone marrow of WT (red plots) or Polμ^{-/-} (blue plots) C57BL/6 mice. PreB+ProB cells were further analyzed according to CD25 and CD43 expression to distinguish between PreB and ProB cells. G. Cell number per bone marrow (2 tibias, 2 femur) of the B cell subsets analyzed in F; n=8. H. Frequency (percentage of total B cell population) of the B cell subsets analyzed in F; n=8. Results are pooled data from two independent experiments. Data are means±SEM. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g001

Extracts were incubated in 0.25 M HCl for 2 hours at 4°C and centrifuged at 13000 rpm prior to quantification and loading on SDS-PAGE gels. After transfer to PDVF membranes, blots were probed with the following antibodies: mouse monoclonal anti-p21 (Santa Cruz Biotechnology, sc-6246, 1:1000), mouse monoclonal anti-beta actin (Abcam, ab8226-100, 1:5000), rabbit polyclonal anti-H2AX-P (Upstate, 07-164, 1:1000) and rabbit polyclonal anti-H3 (Abcam, ab8226-100, 1:5000).

ROS Measurement

Wt or Polμ^{-/-} bone marrow cells were irradiated at 4 or 8 Gy. Cells (1×10⁵) were incubated (1 h) with 5 μM DCFDA (Molecular probes) in reduced-serum OPTIMEM (Gibco) and analyzed by FCM. DCFDA fluorescence was analyzed by measuring the mean Fl-1 fluorescence intensity of at least 10000 cells from three animals.

Statistical Analysis

Unless indicated all analyses were by Student's t test. *:p<0.05; **:p<0.01; ***:p<0.001.

Results

Polμ is widely expressed, but is especially abundant in lymphohematopoietic tissues and cells [11,14]. Polμ is known to participate in DSB repair reactions *in vitro* [15–17], but the only *in vivo* role assigned so far is in V_κJ_κ recombination during B cell development [18]. To investigate whether Polμ has a function in other hematopoietic lineages, we first studied peripheral blood (PB) cell populations in Polμ^{-/-} mice. Concurring with the reduction in B cell numbers associated with abnormal V_κJ_κ recombination, [18], the B cell count in Polμ^{-/-} mice was 4.9-fold (p<0.001) lower than in wt controls (Figure 1A; CD19⁺ cells). Monocyte numbers were also reduced (2.2-fold, p<0.01, Figure 1A; Mac1⁺Gr1⁻ cells), as were neutrophil numbers, though here the difference was not statistically significant (p<0.09, Figure 1A; Mac1⁺Gr1⁺ cells). The only cell type analyzed that was apparently unaffected was the T cell lineage (CD3⁺ cells). Hematological analysis revealed moderate thrombocytopenia, with 403×10⁹ platelets/ml in Polμ^{-/-} mice, compared with 663×10⁹ platelets/ml in wt counterparts (p<0.01, Figure 1B); this was associated with increased bleeding times (Figure S1) Thus peripheral blood populations other than B lymphocytes are altered in Polμ^{-/-} mice. To assess whether the defective blood population profile originated in bone marrow (BM), we compared BM cell numbers between wt and Polμ^{-/-} mice. Our results show that BM cellularity was 1.5-fold lower in Polμ^{-/-} mice (p<0.001, Figure 1C). Immunohistochemistry confirmed that Polμ^{-/-} BM contained fewer cells than wt BM, as shown by the dilated endothelial bone marrow sinusoids (Figure 1D). Therefore the most likely cause of the thrombocytopenia and reduced myeloid cell numbers in peripheral blood in Polμ^{-/-} mice is a defect in BM hematopoiesis.

To investigate the function of Polμ during hematopoiesis, we analyzed wt and Polμ^{-/-} (C57BL/6) BM cells by flow cytometry (FCM). The B lymphoid and myeloid compartments were significantly reduced in Polμ^{-/-} BM (p<0.05), and there was a more moderate reduction in erythroid cell numbers (Figure 1E). To determine whether the reduction in B cell numbers was exclusively due to the previously described V_κJ_κ defect [18], we used FCM to analyze B cell development in the bone marrow of Polμ^{-/-} or wt C57BL/6 mice (see Figure 1F for representative plots and gating strategies). With the exception of PreB cells (B220⁺IgM⁻CD43⁻CD25⁺ cells), all BM B cell populations were significantly reduced in Polμ^{-/-} BM. PreB cell frequency was increased in Polμ^{-/-} BM (Figure 1H), indicating an accumulation at the PreB stage, probably due to a blockade at the PreB-to-immature (IgM⁺) cell transition. Similar results were obtained with Polμ^{-/-} animals in the mixed background (not shown). These results suggest that low B cell numbers in Polμ^{-/-} mice are not only the result of deficient V_κJ_κ recombination but also reflect altered hematopoiesis prior the specific defect during V_κJ_κ recombination described previously [18], suggesting that Polμ deficiency affects most hematopoietic lineages in bone marrow.

Hematopoiesis is a clonal process in which immature progenitors give rise to more committed progenitors. We therefore used colony forming unit (CFU) assays to determine total progenitor numbers in wt and Polμ^{-/-} BM (Figure 2A–D). The numbers of PreB and myeloid progenitors (CFU-PreB and CFU-C) in Polμ^{-/-} mice were 2.2- and 1.3-fold lower than in wt (p<0.001, Figure 2A,B). Megakaryocytic and erythroid progenitors (CFU-Mk and BFU-E) were also affected, though to a lesser extent (Figure 2C,D). Importantly, whereas granulomonocyte and monocyte progenitors (CFU-GM and CFU-M) were reduced in Polμ^{-/-} BM (correlating with the peripheral blood monocyte deficiency), granulocyte progenitors (CFU-G) were not, thus explaining the absence of neutropenia (Figure 1A). These results show that Polμ deficient mice have lowered numbers of committed progenitors and suggest that lack of Polμ differentially affects lineage-specific progenitors.

To examine this in more depth, we next quantified hematopoietic lineage precursors by FCM. The populations measured were common lymphoid progenitors (CLP) [31], defined as Lin⁻IL7R⁻Sca1⁺c-kit⁺ cells, (Figure 2E); common myeloid progenitors (CMP), myelomonocytic progenitors (GMP) and megakaryocyte/erythroid progenitors (MEP) [32] (Figure 2F); hematopoietic stem cells were defined as Flt3⁻ cells after gating on Lineage⁻c-kit⁺Sca1⁺ [33] (Figure 2G). Although FCM analysis revealed that the frequency of these populations was little altered in Polμ^{-/-} mice (Table S1), myeloid progenitors and stem cells were less abundant in the BM of Polμ^{-/-} mice and some populations were more severely affected (Figure 2E–G); for example, HSC numbers were 39% lower in Polμ^{-/-} BM (p<0.01). We then analyzed engraftment potential of Polμ^{-/-} HSC in a competitive repopulation study [29]. In this experiment

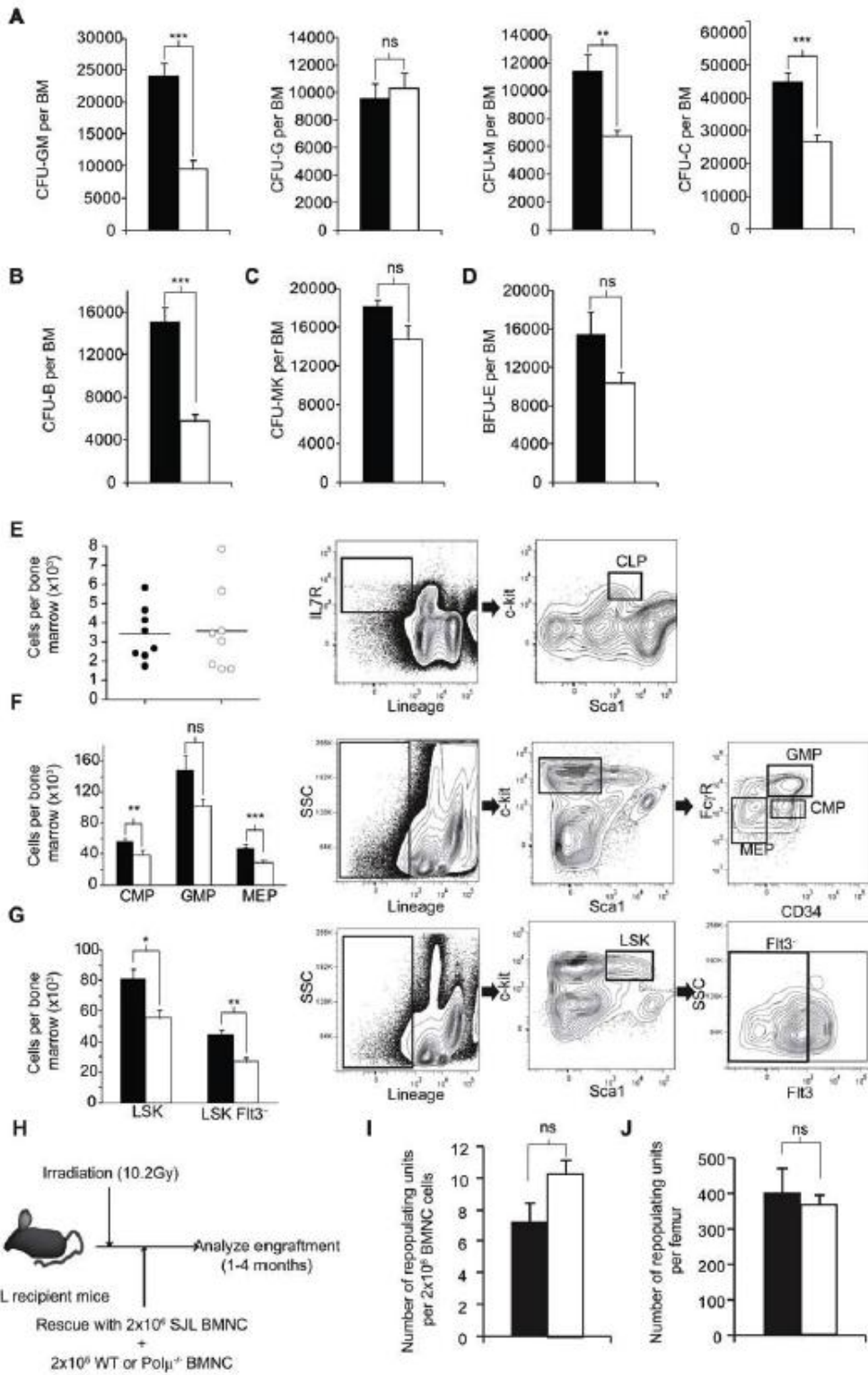


Figure 2. Hematopoietic progenitor and stem cell numbers are reduced in Polμ^{-/-} mice. A. Number of myeloid progenitors (colony forming units) per bone marrow determined in clonogenic assays in WT (solid bars, n=9–11) and Polμ^{-/-} (open bars, n=9–11) mice. CFU-GM (granulomonocytic cells), CFU-G (granulocytes), CFU-M (monocytes) and CFU-C (sum of CFU-GM, CFU-G and CFU-M cells). B. Number of CFU-PreB progenitors. C. Megakaryocyte colony-forming units (CFU-Mk). D. Number of erythroid burst-forming units (BFU-E). BFU-E were scored only if hemoglobin was evident within the colony. E. Flow cytometric determination of CLP (common lymphoid progenitors) in bone marrow of WT (closed circles, n=8) or Polμ^{-/-} (open circles, n=8) C57BL/6 mice (left panel). F. Flow cytometric determination of bone marrow CMP (common myeloid progenitors), myelomonocytic progenitors (GMP) and megakaryocyte/erythroid progenitors (MEP) from WT (solid bar, n=8) and Polμ^{-/-} (open bar, n=8) C57BL/6 mice (left panel). G. Flow cytometric determination of HSC in the bone marrow of the same mice analyzed in F; WT (solid bar, n=8) and Polμ^{-/-} (open bar, n=8) C57BL/6 mice (left panel). Gating strategies for the analysis in E–G are indicated in the plots to the right. H. Experimental design for the competitive bone marrow transplantation assay. I. Frequency of competing repopulating units (RU) in the bone marrow of C57BL/6 wild-type (n=4) or Polμ^{-/-} mice (n=4). J. Number of competing repopulating units (RU) per bone marrow of the mice analyzed in I. Data are means±SEM. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g002

2×10⁶ BMNC (bone marrow nucleated cells) from male wt or Polμ^{-/-} C57BL/6 mice were mixed with 2×10⁶ competing cells from female B6.SJL mice (1:1), and the mixed population transplanted into lethally irradiated female B6.SJL recipients (see Figure 2H for experimental design). The percentage of donor and competitor cells was determined 16 weeks later and used to calculate the number of repopulating units (RU) in the donor BM. No differences were detected in either the frequency of (Figure 2I) or absolute (Figure 2J) RU numbers between wt and Polμ^{-/-} bone marrow. These results indicate that although Polμ deficiency reduces the numbers of most hematopoietic progenitors and stem cell populations the defect can be rescued (at least partially), by transplantation into a healthy stroma (Figure 2I). Additionally, clonogenic analysis detected very few progenitors in Polμ^{-/-} spleen (Figure S2), indicating that Polμ^{-/-} mice do not compensate for the BM deficit with extramedullary hematopoiesis.

The low progenitor numbers in Polμ^{-/-} mice could result either from impaired differentiation or from defective progenitor proliferation or self renewal capacity. To investigate this, we examined the proliferation of Polμ^{-/-} hematopoietic stem and progenitor cells *in vitro*. In clonogenic differentiation assays, colonies of Polμ^{-/-} progenitors were significantly smaller (50% smaller for CFU-C, p<0.05; 60% smaller for CFU-PreB, p<0.05) and contained fewer cells than wt colonies, indicating defective self-renewal or proliferative capacity (Figure 3A). This was confirmed by growing BMNC in conditions that promote myeloid progenitor expansion (see methods). After 4 days, wt BMNC cultures contained 2.3-fold more myeloid progenitors (p<0.001) and 2.8-fold more erythroid progenitors (p<0.01) than Polμ^{-/-} cultures (Figure 3B). We then assayed BMNC in long-term bone marrow cell cultures (LTBMNC, see methods). Two weeks after initiation, Polμ^{-/-} cultures contained 35% fewer cells than wt (p<0.01, Figure 3C). Cell cycle analysis revealed an increased incidence of cell death in Polμ^{-/-} cultures (Figure S3). Together with the bone marrow reconstitution experiments, these results suggest that Polμ^{-/-} bone marrow stromal cells fail to efficiently support hematopoiesis and that Polμ^{-/-} hematopoietic progenitor numbers do not expand *in vitro* as efficiently as WT progenitors.

One possible cause of reduced Polμ^{-/-} hematopoietic precursors numbers is impaired DSB repair. To test this, we stained nucleated cells from bone marrow and spleen for phosphorylated γ-H2AX, a marker of DNA double strand breaks [34]. Compared with wt, Polμ^{-/-} bone marrow had a significantly higher number of DSB per nucleus (3.8 fold, p<0.05; Figure 4 A,B); in Polμ^{-/-} spleen cells (mostly non-proliferating) a smaller increase was observed that did not reach significance (Figure 4A). This suggests that Polμ is required for DSB repair in cycling cells. We confirmed the higher DSB incidence in Polμ^{-/-} bone marrow cells by comet assay, which revealed significantly longer comet tails in Polμ^{-/-} BM cells (p<0.001; Figure 4C,D).

Mouse embryonic fibroblasts (MEF) derived from mice deficient in NHEJ proteins show a highly reduced proliferative capacity compared to wt controls [35–37]. To assess the roles of Polμ in DNA repair and proliferation in other tissues, we analyzed wt and Polμ^{-/-} MEF. Consistent with the proposed role of Polμ in NHEJ, our results show that Polμ^{-/-} MEF showed reduced growth after long-term culture and they enter senescence prematurely (Figure 4E). In addition, primary Polμ^{-/-} MEF were genomically unstable compared with wt MEF. In particular, Polμ^{-/-} MEF showed a 4-fold increase in chromosomal aberrations, with a striking 16-fold increase in the level of radial configurations and a 4.5-fold increase in chromosomal breaks, signatures of deficient DNA repair and increased radiosensitivity (Table 1 and Figure 4F; see Figure S5 for examples of chromosome aberrations). These results demonstrate that lack of Polμ results in DSB accumulation in bone marrow and probably in connective tissue. This suggests that proliferation deficiency by Polμ^{-/-} cells is due to accumulation of unrepaired DSB or a general delay in DSB repair, which may lead to cell cycle arrest and cell death [38].

To test this *in vivo*, we irradiated Polμ^{-/-} and wt mice (9 Gy) and analyzed survival over time. Fifteen days post-irradiation all Polμ^{-/-} mice were dead, compared with only 40% of wt mice (p<0.001 Log rank test; Figure 5A). Most Polμ^{-/-} mice died between days 9 and 11 (Figure 5A), and hematologic analysis revealed extreme neutropenia (not shown), indicating hematopoietic failure. The impact of Polμ deficiency on the response to irradiation damage is also illustrated by the higher radiosensitivity of Polμ^{-/-} progenitors (Figure 5B; p<0.01). Bone marrow cells from wt and Polμ^{-/-} mice showed G2 accumulation after irradiation (5Gy), suggesting that the G2/M cell cycle checkpoint is functional in Polμ^{-/-} cells (Figure S4A). Western blot detected increased p21 accumulation in irradiated Polμ^{-/-} splenocytes and even in non-irradiated cells (Figure S4B), suggesting activation of the G1 cell cycle checkpoint. Irradiation of Polμ^{-/-} MEF (2–8 Gy) significantly reduced survival compared with similarly treated wt MEF (2 to 123-fold; p<0.05, Figure 5C). Histological analysis of irradiated mice showed vacuolar degeneration in liver (where we detect intense γ-H2AX accumulation after irradiation; Figure S4C), hemorrhage and congestion in the lung, tubular degeneration in kidney, and tubular atrophy in testis (Figure 5D). An alternative explanation for increased tissue damage in irradiated Polμ^{-/-} mice might be increased production of reactive oxygen species (ROS). We therefore measured intracellular ROS levels in irradiated bone marrow cells (4 and 8 Gy) by staining with DCFDA (Di-chloro-fluorescein diacetate: a marker of intracellular peroxides). ROS accumulation was unaffected by Polμ^{-/-} deficiency (Figure 5E), indicating that ROS production does not contribute to the radiosensitivity of Polμ^{-/-} animals or cells. These data thus show that the requirement for Polμ in DNA repair

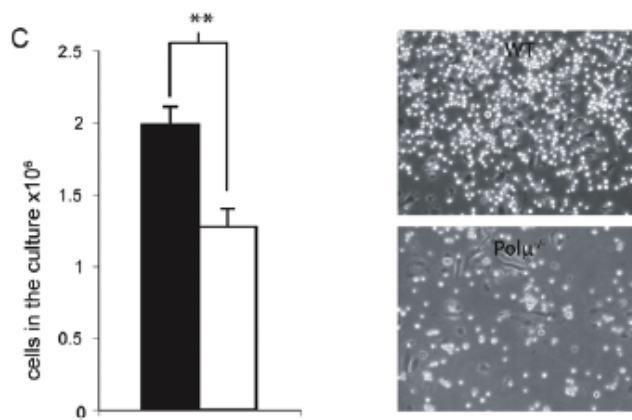
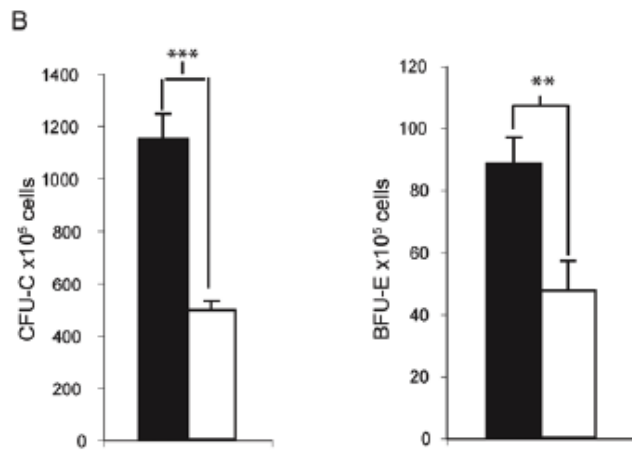
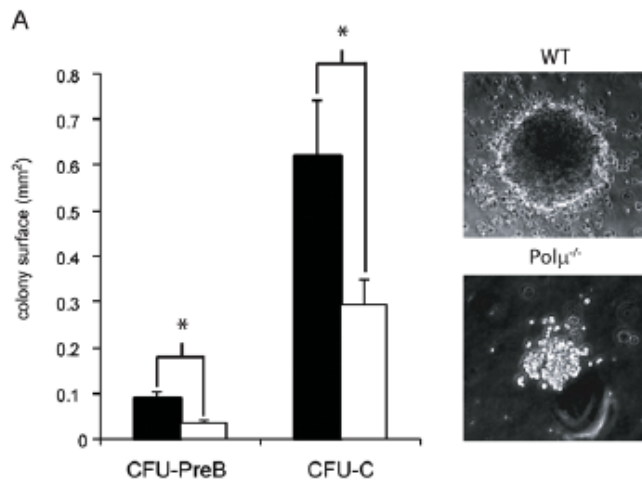


Figure 3. Polμ deficiency reduces the proliferation potential of hematopoietic progenitors. A. Left panel: estimated size (planar surface) of CFU-PreB and CFU-C colonies derived from WT BM (solid bar) and Polμ^{-/-} BM (open bar). Right panel: Micrographs of representative CFU-PreB colonies derived from WT and Polμ^{-/-} BM, showing the reduced colony size of Polμ^{-/-} colonies. B. Numbers of myeloid (left) and erythroid (right) progenitors recovered after 4 days expansion of WT BM (solid bars, *n* = 7) and Polμ^{-/-} BM (open bars, *n* = 7) in IL3 and SCF supplemented medium. C. Left: Absolute cell numbers, per culture, recovered after a 2 week expansion of WT (solid, *n* = 5) and Polμ^{-/-} (open, *n* = 4) long-term bone marrow cell cultures (LTBMC). Right: representative micrographs of stroma generated in WT and Polμ^{-/-} LTBMC (3 weeks). Data are means ± SEM. *: *p* < 0.05; **: *p* < 0.01; ***: *p* < 0.001. doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g003

extends to tissues outside the hematopoietic compartment (Figure 5C,D).

To examine the effect of Polμ deficiency on DNA repair in the hematopoietic system more closely, we analyzed the frequency of phosphorylated γ-H2AX foci in bone marrow and spleen after whole animal γ-irradiation (5Gy). In both genotypes 91% of all BM cells were γ-H2AX⁺, showing that these cells are more susceptible to γ-irradiation. In contrast, the proportion of phospho-γ-H2AX positive cells in Polμ^{-/-} splenocytes (95%) was significantly higher than in wt cells (27%; *p* < 0.001). Further, the number of γ-H2AX foci per cell was significantly increased in Polμ^{-/-} cells compared with wt (1.7-fold for BM cells and 4.8-fold for splenocytes, *p* < 0.001; Figure 6A–B). Changes in γ-H2AX phosphorylation were confirmed by western blot of γ-irradiated (8 Gy) spleen B cells; as predicted, Polμ^{-/-} cells show higher amounts of phospho-γ-H2AX, and these levels are sustained for longer (Figure 6C). We confirmed reduced DSB repair in Polμ^{-/-} BM cells by comet assay. Before cell extraction, irradiated mice (5Gy) were left to recover for 3 hours to allow *in vivo* DNA repair (see Methods). BM cells from these mice were separated by single cell electrophoresis under alkaline conditions, to measure the relative levels of DNA breaks; comet tail moment was 2-fold higher in Polμ^{-/-} cells compared with wt cells (*p* < 0.001; Figure 6D), indicating reduced DNA repair in Polμ^{-/-} cells.

The effect of the impaired DNA repair on genetic stability was investigated by telomere-directed fluorescent *in situ* hybridization (Tel-FISH) and DAPI staining of control or irradiated (5Gy) wt and Polμ^{-/-} BM metaphase cells. Figure 6E shows representative results from irradiated cells. These experiments detected a higher level of genomic instability in Polμ^{-/-} cells both before and after irradiation. Non-irradiated Polμ^{-/-} samples demonstrated only a 0.5-fold increase in chromosome breaks compared with controls (32.6 vs. 22 breaks per 100 cells). After irradiation, the total number of aberrations was 3-fold higher in Polμ^{-/-} cells (1101 vs. 364 per 100 cells in Polμ^{-/-} and wt; (*p* < 0.0003). Compared with wt, chromosome breaks in irradiated Polμ^{-/-} cells were increased 2.7 fold (*p* < 0.0014), radial configurations 4.8 fold (*p* < 0.05), and end-to-end fusions (dicentric, Robertsonian-like fusions and rings) 3.5 fold (*p* < 0.0003) (Figure 6F, Table 1). Supplemental Figure 5 shows example images of the chromosomal alterations analyzed. These results confirm that Polμ is required for DSB repair *in vivo* in hematopoietic and non-hematopoietic systems, particularly in response to genotoxic stress.

Discussion

Polμ is a gap filling, error-prone DNA polymerase that, in association with the NHEJ core machinery, promotes microhomology use during DSB repair [17,39]. Polμ deficiency does not affect mouse development or generate a severe phenotype in adults [14]. This is probably because its function can be replaced or compensated, at least in part, by other DNA polymerase activities [14,17]. The most prominent phenotype reported to date in Polμ^{-/-} mice is partial impairment of immunoglobulin V_HJ_H recombination [18], associated with alterations in the peripheral B

cell compartment [18]. Polμ^{-/-} mice are nonetheless able to mount an almost normal humoral immune response [14,40].

Here we show that Polμ is required for DSB repair *in vivo* and that this defect confers radiosensitivity, promotes genetic instability and leads to deficient hematopoiesis. Polμ deficiency alters many peripheral blood cell populations, affecting not only the B cell compartment [14], but also the myeloid lineages (Figure 1A). Polμ^{-/-} bone marrow showed a severe reduction (~40%) in total bone marrow cell numbers (Figure 1C, D). This reduction affects all hematopoietic lineages as demonstrated by flow cytometry (Figure 1). Interestingly, B cell development is affected prior V_HJ_H recombination (Figure 1F–H). All committed hematopoietic progenitors were reduced in Polμ^{-/-} BM; the hematopoietic defect was traced back to the hematopoietic stem cell, since FCM revealed a reduction in the number of HSC (Figure 2G). Interestingly, transplant of Polμ^{-/-} bone marrow (together with competitor WT cells) into irradiated recipients rescued (at least partially) the hematopoietic defect, suggesting that Polμ^{-/-} stroma does not completely support hematopoiesis, alternatively, the co-transplantation of hematopoietic wt cells might provide factors that support the development of Polμ^{-/-} HSC. Polμ^{-/-} progenitors do not expand *in vivo* as efficiently as WT controls, suggesting that lack of Polμ results in cell death or reduced proliferation. Taken together these results suggest that hematopoietic cells in the bone marrow of Polμ^{-/-} mice are reduced due to a combination of extrinsic (defective bone marrow stroma) and intrinsic (reduced DNA repair and expansion potential) factors.

We demonstrate that hematopoietic Polμ^{-/-} cells contain more DSB than their wt counterparts, as shown by the increase in the basal level of phospho-γ-H2AX positive cells and comet assay results (Figure 4A–D) and increased basal chromosomal breakage (Table 1). The reduced DSB repair capacity of hematopoietic Polμ^{-/-} cells is more evident after genotoxic insult, demonstrating increased genomic instability (Figure 6; Table 1). Our results also show that Polμ is required for DNA repair in other tissues; including connective tissue (MEF) (Table 1 and Figure 4E–F), liver and kidney (Figure 5B). Lack of Polμ results in radiation-induced cell death at doses that are non-lethal for wt mice (Figure 5A). However, immunohistochemistry failed to demonstrate any gross tissue or organ damage outside the hematopoietic system in non-irradiated Polμ^{-/-} mice (not shown). This suggests that Polμ deficiency may be compensated for or tolerated in organs in which progenitor cell proliferation is slower than in the hematopoietic system or in MEF. Alternatively, it may indicate that - in some tissues - Polμ function is only required under stress conditions (for example, irradiation), which require faster repair. This is further supported by the fact that although most hematopoietic lineages are reduced in Polμ^{-/-} BM, different subsets are affected to different extents. For example although CFU-GM and CFU-M progenitors are reduced in Polμ^{-/-} BM, CFU-G progenitors are not. Another example is the reduction of the HSC population by 39% (*p* < 0.001), while the CLP is unaffected. Whether the less-affected cell types have less DNA damage or use different DNA repair mechanisms remains to be investigated.

To our knowledge this is the first report to show increased radiosensitivity in Polμ deficient mice and cells. A previous study

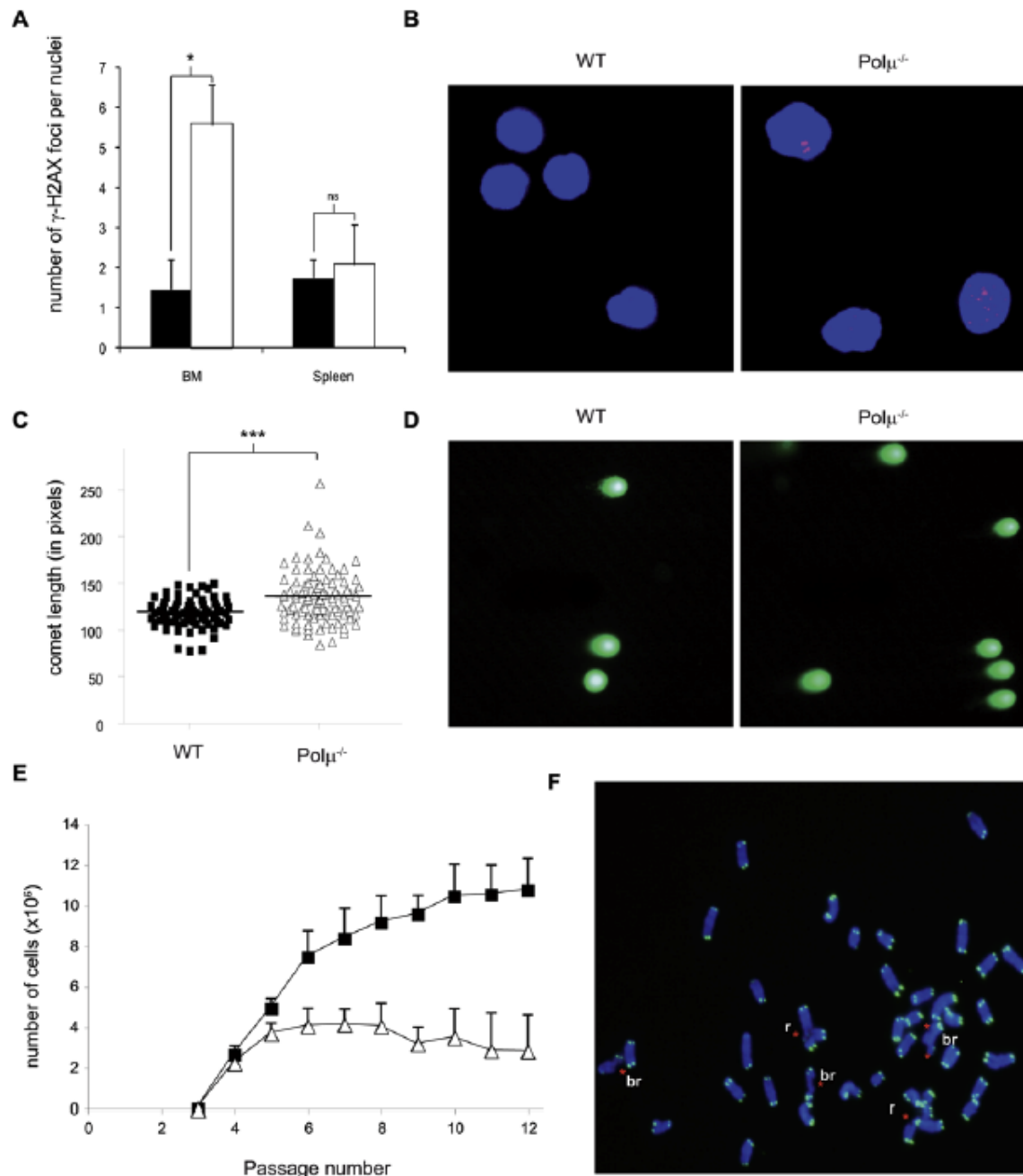


Figure 4. DSB repair is impaired in Pol $\mu^{-/-}$ mice. A. Numbers of γ -H2AX foci staining per nuclei in WT (solid bar) or Pol $\mu^{-/-}$ (open bar) BM and spleen cells. B. Representative confocal images showing γ -H2AX foci (Red, Cy3) in WT and Pol $\mu^{-/-}$ BM cells (blue staining, DAPI). C. Dot plots showing the comet length of WT (dosed squares) and Pol $\mu^{-/-}$ (open triangles) bone marrow cells. The comet assay was performed in neutral conditions (1 \times TBE) to assess the relative levels of DNA double strand breakage (DSB). D. Representative fluorescence images of comet assay gels from C. E. Reduced proliferation capacity and premature senescence of cultured Pol $\mu^{-/-}$ MEF. The 3T3 growth assays show the cumulative increase cell number versus passage in primary (passage 3 at the start of the experiment) WT (closed squares) and Pol $\mu^{-/-}$ (open triangles) cells. Note that WT MEF enter senescence around division 10, but Pol $\mu^{-/-}$ MEF stop proliferating by division 4. F. Representative image of a Pol $\mu^{-/-}$ MEF metaphase spread stained by TEL-FISH. The telomeres are stained with a FITC-labeled (Green) PNA probe and chromosomes are counterstained with DAPI (blue). Asterisks indicate specific chromosomal defects: br (break), r (radial configuration). All data are means \pm SEM. *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001. doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g004

Table 1. Quantification of chromosomal aberrations analyzed by Telomere FISH in WT and Polμ^{-/-} BM cells and MEF.

Genotype (IR Gy)	# of meta. analyzed	Robert. type fusions (N)	Dicentrics (N)	Rings (N)	Radials (N)	Breaks (N)	Total aberr. (N)
WT BM (0 Gy)	50	1 (2)	0 (0)	1 (2)	0 (0)	11 (22)	13 (26)
Polμ ^{-/-} BM (0 Gy)	49	1 (2)	0 (0)	1 (2)	0 (0)	16 (32,6)	18 (36,7)
WT BM (5 Gy)	64	6 (9,4)	37 (57,8)	1 (1,6)	2 (3,1)	187 (292,2)	233 (364,1)
Polμ ^{-/-} BM (5 Gy)	65	6 (9,2)	169 (260)	10 (15,4)	10 (15,4)	521 (801,5)	716 (1101)
WT MEF (0 Gy)	87	2 (2,3)	1 (1,1)	1 (1,1)	0 (0)	42 (48,3)	46 (52,9)
Polμ ^{-/-} MEF (0 Gy)	65	3 (4,6)	1 (1,5)	2 (3,1)	16 (24,6)	144 (221,5)	166 (255,4)
WT MEF (5Gy)	48	5 (10,4)	14 (29,2)	5 (10,4)	5 (10,4)	344 (716,7)	373 (777,1)
Polμ ^{-/-} MEF (5 Gy)	42	9 (21,4)	35 (83,3)	7 (16,7)	10 (23,8)	401 (954,8)	462 (1100)

After irradiation, mice were maintained for 6 h to allow *in vivo* DNA repair. Metaphase spreads of BM cells were prepared 4 days post irradiation. Metaphase spreads of primary (passage 6) MEF were prepared 72 h post irradiation. Data in parentheses (N) are the number of aberrations observed per 100 cells analyzed.
doi:10.1371/journal.pgen.1000389.t001

reported a relative lack of radiosensitivity in Polμ^{-/-} MEF [18]. This contrasts with our data, which strongly suggest that Polμ is necessary for the repair of double strand breaks. Polμ-deficient MEF showed reduced growth curves and increased basal and radiation-induced levels of chromosomal aberrations; phenotypes similar to those previously reported for Ku80^{-/-} and LigIV^{-/-} MEF [30,35,36,37,41–45]. Apart from the different genetic background of the two Polμ^{-/-} mouse models, there are other possible explanations for this discrepancy. First, the gene targeting strategy is different between the two Polμ^{-/-} mouse models. In our model, exons 2 to 4 are deleted, which eliminates the BRCT domain and completely abrogates protein expression in Western blot analysis [14]. In the knockout generated by Bertocci and coworkers, exons 6 to 11 are deleted, eliminating the core of the polymerase activity. Although these mice do not express full-length Polμ mRNA, no information is provided regarding protein expression [18,40]. This is important, since a truncated Polμ BRCT domain with biological activity may be expressed in this mouse model. An alternative explanation is that the two studies use different experimental procedures to detect radiosensitivity. We γ-irradiated MEF cultures plated at clonogenic dilutions (300 cells in 10 cm² dishes, see Methods) and calculated survival by scoring colonies. In contrast, [18] performed cell survival assays at much higher cell densities and used X-rays as the agent of DNA damage; survival was assessed by trypan blue exclusion. Differences in the sensitivities of these approaches might account for the differences observed in MEF survival in the two models.

The role of DNA repair in hematopoietic homeostasis has become increasingly clear in recent years [20–23]. Knockout models of many DNA repair enzymes are characterized by either reduced stem cell function or alterations in specific hematopoietic populations. Moreover, since stem cells are protected from apoptosis [20,21], probably because of their quiescent state [46], deficiency in DNA repair enzymes allows mutations to accumulate in these cells. Conversely, more committed progenitors, which cycle more rapidly, would be more sensitive to cell cycle arrest or apoptosis, thus explaining the observed reduction in the numbers of progenitor cells in Polμ-deficient mice. Thus the survival of HSC comes at the price of accumulated mutations; two recent reports show that mice deficient in DNA repair maintain expanded stem cell pools, but that these pools have a reduced differentiation potential during aging [20,21].

Polμ deficiency, as reported for other NHEJ factors such as Ku80 [21] and Ligase IV [20], targets the hematopoietic system and HSC. There are, however, striking differences in the

phenotypes observed in Ku80 and LigaseIV mice and Polμ^{-/-} mice. In the first two cases, HSC were unaffected in younger mice but were progressively exhausted during aging. Polμ unlike Ku80 or Ligase IV only participates in a small number of NHEJ reactions that require an error-prone DNA polymerase to generate or promote microhomology pairing between the DNA ends of the DSB [15–17] and Polμ^{-/-} mouse has reduced HSC numbers in the bone marrow. These suggest that different components of the NHEJ system will have different roles in hematopoiesis or that some of the DSB generated in hematopoietic cells require Polμ for their complete and efficient repair, and cannot be repaired by compensatory mechanisms with sufficient speed or efficiency to prevent cell death or premature senescence. Additionally, the whole body irradiation experiments presented here show that DSB-repair defects and cell death in Polμ^{-/-} mice are not restricted to the hematopoietic system but are widespread, demonstrating a role for Polμ in DSB repair in other tissues. Our results thus show that Polμ is required for genomic stability and DNA repair, through its participation in DSB repair in hematopoietic stem and progenitor cells as well as in non-hematopoietic cells.

Supporting Information

Figure S1 Increased bleeding in Polμ^{-/-} mice. Bleeding time (in seconds) of Polμ^{-/-} (open circles) and WT (solid circles) mice in a coagulation assay.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s001 (0.25 MB EPS)

Figure S2 Polμ^{-/-} mice do not show enhanced extramedullary hematopoiesis. Total spleen progenitors (PreB: CFU-PreB, GM: CFU-GM; G: CFU-G; M: CFU-M; see legend to Figure 2 for details) in Polμ^{-/-} (open bars) and WT mice (solid bars).

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s002 (0.22 MB EPS)

Figure S3 Increased cell death in Polμ^{-/-} cultures. Flow cytometry analysis of cell cycle distribution in long term bone marrow cultures derived from Polμ^{-/-} (open bars) and WT mice (solid bars), 4 days after culture initiation.

Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s003 (0.76 MB EPS)

Figure S4 Cell-cycle arrest in Polμ^{-/-} cells after γ-irradiation. A. Cell-cycle profile of WT and Polμ^{-/-} bone marrow cells in non-irradiated and irradiated (5Gy) animals. Upon irradiation both strains show an accumulation of cells in the G2/M cell-cycle stage (R5 gate), suggesting that the G2/M cell-cycle checkpoint is functional. B. Western blot of non-irradiated (NI) and irradiated

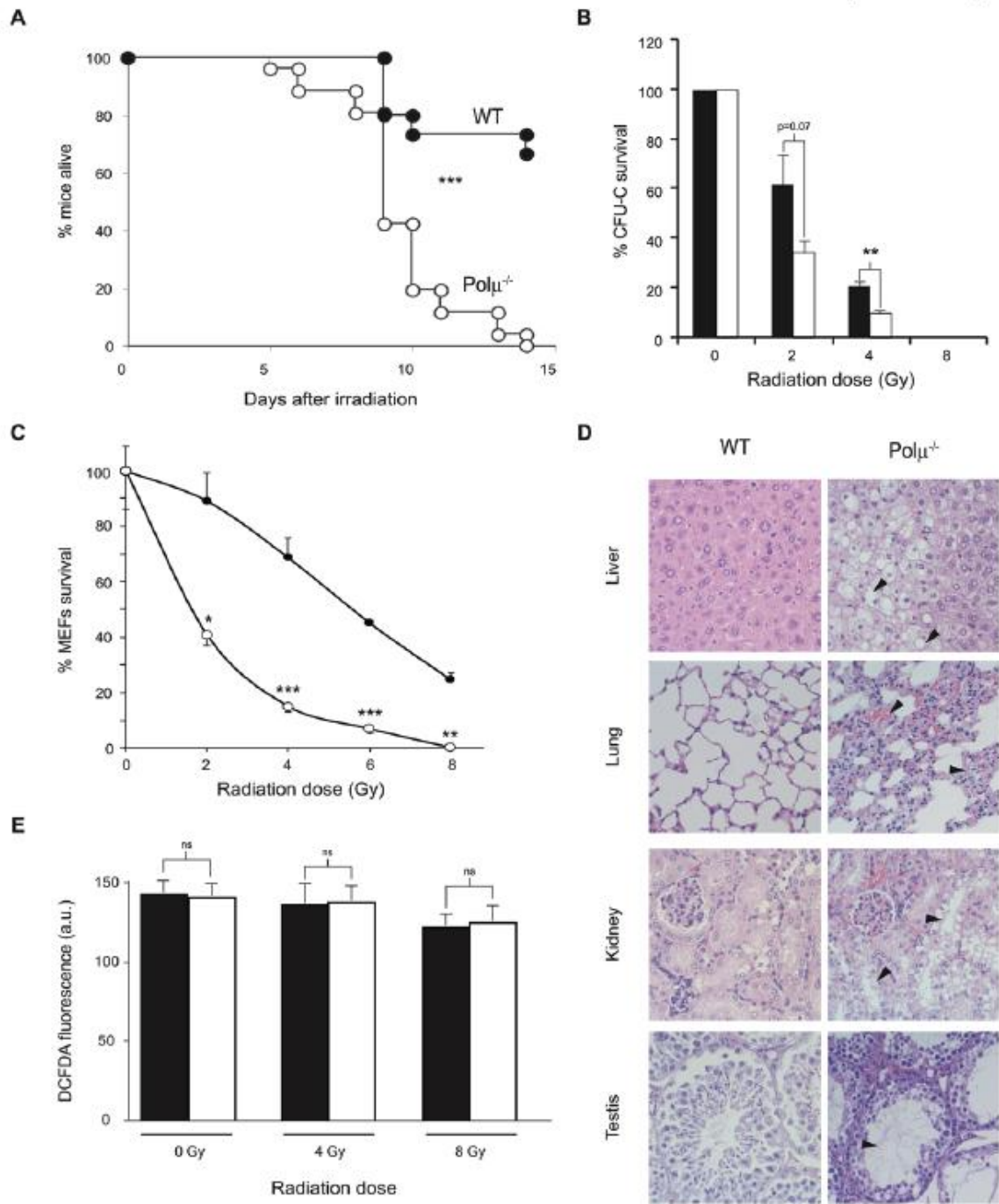


Figure 5. Polμ^{-/-} mice show increased radiosensitivity. A. Survival of Polμ^{-/-} (open circles) and WT mice (closed circles) after whole-body γ-irradiation (9 Gy); n = 15. B. Percentage survival by γ-irradiated WT (solid bars) and Polμ^{-/-} (open bars) bone marrow CFU-C progenitors; n = 4 mice analyzed in duplicate assays. C. Percentage survival by γ-irradiated WT (closed circles) and Polμ^{-/-} (open circles) mouse embryonic fibroblasts (MEF); The figure shows one experiment with each point assayed in quadruplicate. D. Photomicrographs of formalin-fixed, paraffin-embedded, hematoxylin-eosin-stained sections of liver, lung, kidney and testis from irradiated WT and Polμ^{-/-} mice. Note extensive damage (arrowheads) in Polμ^{-/-} tissues: vacuolar degeneration (liver); inflammation and hemorrhaging (lung) and tubular degeneration (kidney and testis). E. Flow cytometry ROS measurements by DCFDA fluorescence in irradiated and mock-irradiated WT (solid bars) and Polμ^{-/-} bone marrow cells (open bars); n = 3. There was no significant difference in ROS levels between WT and Polμ^{-/-} cells under basal conditions or upon irradiation. All data are means ± SEM. *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001. doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g005

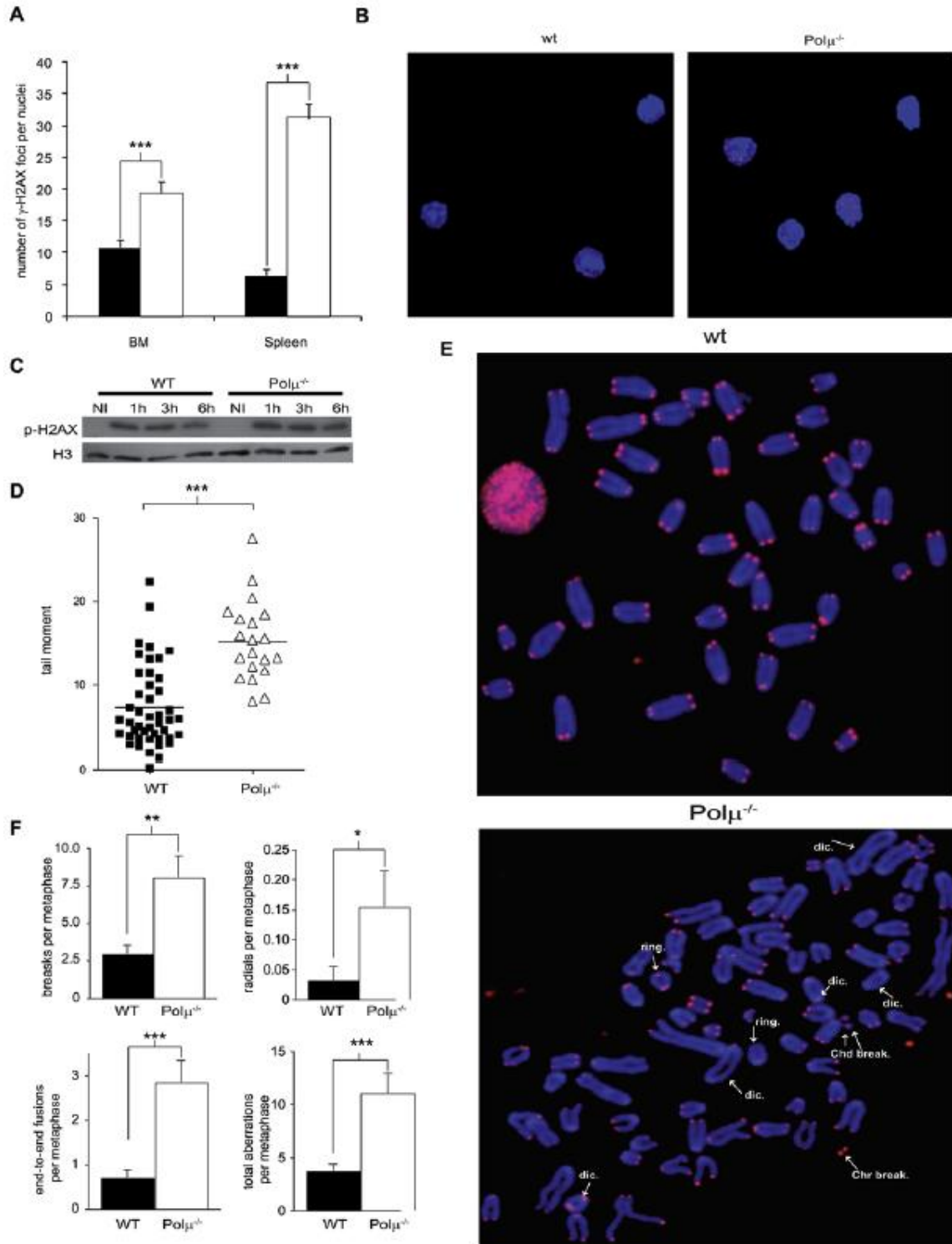


Figure 6. Polμ^{-/-} hematopoietic progenitor cells have a reduced capacity for DSB repair. A. Number of γ-H2AX foci per nucleus in bone marrow and spleen cells from WT (solid bars) and Polμ^{-/-} (open bars) γ-irradiated mice (5Gy); staining was performed 1 hour post-irradiation. B. Representative confocal images showing γ-H2AX foci (Red, Cy3; blue, DAPI) in WT and Polμ^{-/-} bone marrow cells treated as in A. C. Western blot showing amounts of phosphorylated γ-H2AX protein in LPS stimulated wt and Polμ^{-/-} splenocytes after γ-irradiation (8 Gy), and analyzed at different periods (1 h, 3 h, and 6 h) post-irradiation; NI; non-irradiated controls. Histone H3 was used as a loading control. D. Dot plot showing DNA comet tail moment of WT (closed squares) and Polμ^{-/-} (open triangles) bone marrow cells retrieved from irradiated mice (5Gy) after 3 hours of *in vivo* DNA repair. Tail moment was significantly increased in Polμ^{-/-} cells. E. Representative images of irradiated WT and Polμ^{-/-} bone marrow metaphase cells analyzed by telomere FISH 96 hours after irradiation. Telomeres were hybridized with a Cy-3 labeled PNA Probe (Red) and chromosomes counterstained with DAPI (blue). Arrows indicate structural chromosomal aberrations: Chd and Chr = chromatid and chromosome breaks, respectively; dic. = dicentric chromosomes. F. Number of breaks, radial configurations, end-to-end-fusions, and total aberrations per metaphase in bone marrow cells from WT (closed bars) and Polμ^{-/-} (open bars) irradiated mice. The mice were γ-irradiated (5Gy) and maintained (6 h) to allow *in vivo* DNA repair; BM-cell chromosomal aberrations were detected 4 days post irradiation. All data are means ± SEM. *: p < 0.05; **: p < 0.01; ***: p < 0.001.
doi:10.1371/journal.pgen.1000389.g006

(8Gy) wt and Polμ^{-/-} splenocytes collected at different times post irradiation (1 h, 3 h, 6 h). The figure reveals an intense accumulation of p21 in the Polμ^{-/-} cells, suggesting that the G1 cell-cycle checkpoint is functional. Beta-actin was used for normalization and as a loading control. C. Western blot of phosphorylated γ-H2AX content in liver from irradiated (5Gy) wt or Polμ^{-/-} animals. Accumulation of phosphorylated H2AX is evident in the Polμ^{-/-} livers. Histone H3 was used as a loading control.
Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s004 (1.32 MB EPS)

Figure S5 Examples of chromosomal aberrations detected by Telomere FISH (TEL-FISH) in Polμ^{-/-} bone marrow cells after irradiation. The panels show selected Polμ^{-/-} metaphase chromosomes hybridized to a Cy-3 PNA telomeric probe (Red) and counterstained with DAPI (blue). Since telomeres mark the natural ends of the chromosomes, TEL-FISH significantly improves the resolution of the cytogenetic analysis. Asterisks indicate the sites of individual aberrations. The bottom panel

shows an undamaged chromosome, with four telomeres capping each chromatid end.
Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s005 (1.47 MB EPS)

Table S1 Frequency of hematopoietic progenitor and stem cells in Polμ^{-/-} bone marrow.
Found at: doi:10.1371/journal.pgen.1000389.s006 (0.01 MB PDF)

Acknowledgments

We thank Teresa de la Cueva (DIO.CNB) for excellent technical assistance with animal handling and Israel Ormán (CIEMAT) for helping with the competitive bone marrow transplantation analysis. We also thank Marta Ramón for secretarial assistance and Simon Bartlett for editorial support.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DL JCS LB ES AB. Performed the experiments: DL BE JML JCS JCE GT ES. Analyzed the data: DL BE JML JCS GT ES. Contributed reagents/materials/analysis tools: JML JCS LB ES AB. Wrote the paper: DL LB AB.

References

- Wyman C, Ristic D, Kanaar R (2004) Homologous recombination-mediated double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 3: 827–833.
- Lieber MR, Ma Y, Pannicke U, Schwarz K (2003) Mechanism and regulation of human non-homologous DNA end-joining. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 712–720.
- van Gent DC, Hoijmakers JH, Kanaar R (2001) Chromosomal stability and the DNA double-strand break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196–206.
- Weterings E, van Gent DC (2004) The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA Repair (Amst)* 3: 1425–1435.
- Kruger I, Rothkamm K, Lohrich M (2004) Enhanced fidelity for rejoining radiation-induced DNA double-strand breaks in the G2 phase of Chinese hamster ovary cells. *Nucleic Acids Res* 32: 2677–2684.
- Takata M, Sasaki MS, Sonoda E, Morrison C, Hashimoto M, et al. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *Embo J* 17: 5497–5508.
- Allen C, Hallbrook J, Nickoloff JA (2005) Interactive competition between homologous recombination and non-homologous end joining. *Mol Cancer Res* 1: 913–920.
- Kim JS, Krasieva TB, Kurumizaka H, Chen DJ, Taylor AM, et al. (2005) Independent and sequential recruitment of NHEJ and HR factors to DNA damage sites in mammalian cells. *J Cell Biol* 170: 341–347.
- Lee GS, Neiditch MB, Sahas SS, Roth DB (2004) RAG proteins shepherd double-strand breaks to a specific pathway, suppressing error-prone repair, but RAG nicking initiates homologous recombination. *Cell* 117: 171–184.
- Aoufouchi S, Ratter E, Dahan A, Fali A, Bertocci B, et al. (2000) Two novel human and mouse DNA polymerases of the polX family. *Nucleic Acids Res* 28: 3684–3693.
- Dominguez O, Ruiz JF, Lain de Lera T, Garcia-Diaz M, Gonzalez MA, et al. (2000) DNA polymerase mu (Pol mu), homologous to TdT, could act as a DNA mutator in eukaryotic cells. *Embo J* 19: 1731–1742.
- Ruiz JF, Dominguez O, Lain de Lera T, Garcia-Diaz M, Bernad A, et al. (2001) DNA polymerase mu, a candidate hypermutase? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 99–109.
- Ruiz JF, Juarez R, Garcia-Diaz M, Terrados G, Fcher AJ, et al. (2003) Lack of sugar discrimination by human Pol mu requires a single glycine residue. *Nucleic Acids Res* 31: 4441–4449.
- Lucas D, Lain de Lera T, Gonzalez MA, Ruiz JF, Dominguez O, et al. (2005) Polymerase mu is up-regulated during the T cell-dependent immune response and its deficiency alters developmental dynamics of spleen centroblasts. *Eur J Immunol* 35: 1601–1611.
- Mahajan KN, Nick McElhinny SA, Mitchell BS, Ramaden DA (2002) Association of DNA polymerase mu (pol mu) with Ku and ligase IV: role for pol mu in end-joining double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 22: 5194–5202.
- Capp JP, Boudsocq F, Bernard AG, Lopez BS, Cazaux C, et al. (2007) Involvement of DNA polymerase mu in the repair of a specific subset of DNA double-strand breaks in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 35: 3551–3560.
- Nick McElhinny SA, Havener JM, Garcia-Diaz M, Juarez R, Bebenek K, et al. (2005) A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining. *Mol Cell* 19: 357–366.
- Bertocci B, De Smet A, Berek C, Weill JC, Reynaud CA (2003) Immunoglobulin kappa light chain gene rearrangement is impaired in mice deficient for DNA polymerase mu. *Immunity* 19: 203–211.
- Soulas-Sprauel P, Rivera-Munoz P, Malivert L, Le Guyader G, Abramowski V, et al. (2007) V(D)J and immunoglobulin class switch recombinations: a paradigm to study the regulation of DNA end-joining. *Oncogene* 26: 7780–7791.
- Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambie T, et al. (2007) DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447: 686–690.
- Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoijmakers J, et al. (2007) Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447: 725–729.
- Prasher JM, Lalai AS, Heijmans-Antonissen C, Ploemacher RE, Hoijmakers JH, et al. (2005) Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient *Ercc1-/-* mice. *Embo J* 24: 861–871.
- Navarro S, Meza NW, Quintana-Bustamante O, Casado JA, Jacome A, et al. (2006) Hematopoietic dysfunction in a mouse model for Fanconi anemia group D1. *Mol Ther* 14: 525–535.
- Bender CF, Sikos MI, Sullivan R, Huye LE, Le Beau MM, et al. (2002) Cancer predisposition and hematopoietic failure in *Rad50(S/S)* mice. *Genes Dev* 16: 2257–2251.
- Masutani M, Nozaki T, Nakamoto K, Nakagawa H, Suzuki H, et al. (2000) The response of Parp knockout mice against DNA damaging agents. *Mutat Res* 462: 159–166.
- Roederer M (2001) Spectral compensation for flow cytometry: visualization artifacts, limitations, and caveats. *Cytometry* 45: 194–205.

27. Samper E, Fernandez P, Eguia R, Martin-Rivera I, Bernad A, et al. (2002) Long-term repopulating ability of telomerase-deficient murine hematopoietic stem cells. *Blood* 99: 2767–2775.
28. Sah VP, Attardi LD, Mulligan GJ, Williams BO, Bronson RT, et al. (1995) A subset of p53-deficient embryos exhibit exencephaly. *Nat Genet* 10: 175–180.
29. Harrison DE, Jordan CT, Zhong RK, Auste CM (1993) Primitive hemopoietic stem cells: direct assay of most productive populations by competitive repopulation with simple binomial, correlation and covariance calculations. *Exp Hematol* 21: 206–219.
30. Samper E, Flores JM, Blasco MA (2001) Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2: 800–807.
31. Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661–672.
32. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193–197.
33. Christensen JL, Weissman IL (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14541–14546.
34. Pilch DR, Seddnikova OA, Redon C, Celeste A, Nusenzweig A, et al. (2003) Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol* 81: 123–129.
35. Espejel S, Blasco MA (2002) Identification of telomere-dependent “senescence-like” arrest in mouse embryonic fibroblasts. *Exp Cell Res* 276: 242–248.
36. Gao Y, Ferguson DO, Xie W, Manis JP, Sekiguchi J, et al. (2000) Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* 404: 897–900.
37. Vogel H, Lim DS, Karsenty G, Finegold M, Hasty P (1999) Deletion of Ku86 causes early onset of senescence in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10770–10775.
38. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998) DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem* 273: 5858–5868.
39. Ma Y, Lu H, Tippin B, Goodman MF, Shimazaki N, et al. (2004) A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol Cell* 16: 701–713.
40. Bertocci B, De Smet A, Flatter E, Dahan A, Bories JC, et al. (2002) Cutting edge: DNA polymerases mu and lambda are dispensable for Ig gene hypermutation. *J Immunol* 168: 3702–3706.
41. d’Adda di Fagnana F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorf PM, et al. (2001) Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 11: 1192–1196.
42. Ferguson MK, Landreneau RJ, Hazelrigg SR, Altorki NK, Naunheim KS, et al. (2000) Long-term outcome after resection for bronchial carcinoid tumors. *Eur J Cardiothorac Surg* 18: 156–161.
43. Hsu HI, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, et al. (2000) Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes Dev* 14: 2807–2812.
44. Karanjawala ZE, Grawunder U, Hsieh CL, Lieber MR (1999) The nonhomologous DNA end joining pathway is important for chromosome stability in primary fibroblasts. *Curr Biol* 9: 1501–1504.
45. Parrinello S, Samper E, Krolica A, Goldstein J, Melov S, et al. (2003) Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat Cell Biol* 5: 741–747.
46. Rossi DJ, Seita J, Czechowicz A, Bhattacharya D, Bryder D, et al. (2007) Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle* 6: 2371–2376.