



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Efectos epigenéticos inducidos por estrés oxidativo en fibroblastos
embrionicos de ratón**

T E S I S

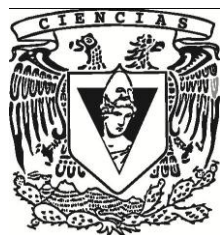
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Georgina Peñalosa Ruiz

2010





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de Datos del Jurado

1. DATOS DEL ALUMNO	
Apellido Paterno	Peñalosa
Apellido Materno	Ruiz
Nombre	Georgina
Teléfono	55570221
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Número de cuenta	405101173
2. DATOS DEL TUTOR	
Grado	Doctor
Nombre(s)	Luis Fernando
Apellido Paterno	Covarrubias
Apellido Materno	Robles
3. DATOS DEL SINODAL 1	
Grado	Doctor
Nombre(s)	Jean-Louis
Apellido Paterno	Charli
Apellido Materno	Casalonga
4. DATOS DEL SINODAL 2	
Grado	Doctor
Nombre(s)	Miguel Ángel
Apellido Paterno	Palomino
Apellido Materno	Garibay
5. DATOS DEL SINODAL 3	
Grado	Doctora
Nombre(s)	Leonor
Apellido Paterno	Pérez
Apellido Materno	Martínez
6. DATOS DEL SINODAL 4	
Grado	Doctor
Nombre(s)	José Manuel
Apellido Paterno	Baizabal
Apellido Materno	Carballo
7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO	
Título	Efectos epigenéticos inducidos por estrés oxidativo en fibroblastos embrionicos de ratón
Número de páginas	60
Año	2010

ÍNDICE

ABREVIACIONES.....	3
RESUMEN.....	4
INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES	
1. EPIGENÉTICA.....	5
1.1. Generalidades	
1.2. Correlación entre los tipos de modificaciones epigenéticas y la actividad transcripcional	
2. CÉLULAS TRONCALES.....	10
2.1 Células ES	
3. GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DURANTE EL DESARROLLO.....	13
3.1. Las características epigenéticas de las células pluripotentes.	
3.2. El caso particular del desarrollo de la línea germinal	
4. REPROGRAMACIÓN NUCLEAR Y PLURIPOTENCIA.....	16
4.1. Reprogramación por transferencia nuclear	
4.2. Reprogramación nuclear por fusión celular y reprogramación por extractos celulares	
4.3. Reprogramación por factores de transcripción definidos	
5. PANORAMA GENERAL DE LA REGULACIÓN DEL ESTADO PLURIPOTENTE.....	21
6. ESTRÉS OXIDATIVO Y EPIGENÉTICA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVOS.....	28
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL.....	29
METODOLOGÍA	
1. CULTIVO CELULAR.....	30
1.1. Cultivo de células ES	
1.1.1. <i>Preparación de fibroblastos alimentadores</i>	
1.1.2. <i>Cultivo de células ES sobre fibroblastos alimentadores</i>	
1.2. Cultivo de MEFs	

2. EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIZOL. OBTENCIÓN DE cDNA.....	31
2.1. Extracción de RNA de cultivos celulares	
2.2. Obtención de cDNA	
3. RT-PCR.....	32
3.1. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación por RT-PCR	
3.2. RT-PCR 30ciclos	
3.3. RT-PCR 30-35-40 ciclos	
4. ENSAYO DE SUPERVIVENCIA ANTE EL TRATAMIENTO CON H₂O₂ EN MEFs.....	34
5. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEFs.....	35
 RESULTADOS	
 1. ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA RT-PCR.....	38
2. ENSAYO DE SUPERVIVENCIA DEL TRATAMIENTO CON H ₂ O ₂ EN MEFs LUEGO DE 24 HORAS.....	38
3. INDUCCIÓN DE CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN MEFs A TRAVÉS DE UN PULSO DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	39
3.1. Búsqueda de cambios en la expresión de genes por RT-PCR	
 DISCUSIÓN.....	45
 CONCLUSIONES.....	50
 REFERENCIAS.....	52
 ANEXOS.....	55
a) Extracción de RNA de cultivos celulares con TRizol ^{MR}	
b) Curvas de supervivencia con H ₂ O ₂	
c) Información de los genes analizados según la base de datos Swiss-Prot	

ABREVIACIONES

- **H2A:** Histona H2A
- **H2B:** Histona H2B
- **H3:** Histona H3
- **H4:** Histona H4
- **H3K4:** Histona H3 lisina 4
- **H3K36:** Histona H3 lisina 36
- **H3K79:** Histona H3 lisina 79
- Células **ES:** células troncales embrionicas, del inglés *Embryonic Stem cells*
- **PcG:** el grupo de proteínas Polycomb, del inglés *Polycomb Group*,
- **PRC1 y PRC2:** Del inglés *Polycomb Repressive Complex 1 y 2*
- **hES:** del inglés *human Embryonic Stem cells*
- **Trx:** proteínas del grupo Tritórax
- **CGP:** Células **G**erminales **P**rimordiales
- **MEFs:** fibroblastos embrionicos de ratón, por las siglas en inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*
- **ERO:** Especies Reactivas de **O**xígeno
- Células **iPS:** células pluripotentes inducidas, del inglés *induced Pluripotent Stem cells*
- **AVP:** Ácido Valproico
- **NPC:** precursores neurales, del inglés *Neural Precursor Cells*
- **ERO:** Especies Reactivas de **O**xígeno
- **HIF:** Del inglés **H**ypoxia **I**nducible **F**actor
- **LIF:** siglas en inglés para el factor de crecimiento **L**eukemia **I**nhibiting **F**actor
- **HRE:** elementos de respuesta a hipoxia, de las siglas en inglés *Hypoxia Responsive Elements*
- **MCI:** masa celular interna del blastocisto

RESUMEN

En este trabajo se analizó si el estrés oxidativo, inducido por H_2O_2 , es capaz de modificar el cambio en la expresión de genes específicos en células embrionarias de ratón (MEFs). Los genes que se analizaron se asocian a pluripotencia celular, o bien a diferenciación. Su expresión está definida por marcas epigenéticas, específicamente metilación de histonas (H3K4 y H3K27). Después de la inducción de estrés oxidativo en células MEFs se analizó si había cambios epigenéticos asociados al estrés oxidativo, esto se detectó de manera indirecta buscando cambios en la expresión de los genes mencionados por medio de RT-PCR. No se encontró que hubiera ningún cambio en la expresión de los genes analizados, mas no se descarta la posibilidad de que el estrés oxidativo pudiera generar cambios epigenéticos, dado que la técnica empleada para determinar estos cambios no fue la más adecuada.

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

1. EPIGENÉTICA

1.1. Generalidades

El término epigenética hace referencia a las modificaciones que sufre la cromatina, sin afectarse la secuencia de DNA⁴. Un rasgo epigenético es un fenotipo que se hereda de manera estable y es consecuencia de cambios en un cromosoma sin que hayan alteraciones en la secuencia nucleotídica. Las marcas epigenéticas pueden ser de distintos tipos; se puede modificar directamente el DNA por la adición de grupos metilo (sólo en algunos eucariontes), puede cambiar la composición de las proteínas que regulan la transcripción, o bien pueden modificarse proteínas que interaccionan con el DNA, en especial las histonas. Estas modificaciones en conjunto, determinan si una región del DNA es transcripcionalmente activa o inactiva.

La actividad transcripcional diferencial se debe a las interacciones que se producen entre el DNA y las histonas. El DNA tiene carga neta negativa, y esto le permite asociarse con las histonas, que tienen una carga neta positiva. Si la interacción entre el DNA y las histonas es muy fuerte, la cromatina es compacta y prácticamente inaccesible a la RNA polimerasa, por lo que es transcripcionalmente inactiva, Esta configuración del DNA y las histonas se conoce como heterocromatina. Por el contrario, si la interacción entre el DNA y las histonas es débil, tendremos una configuración denominada eucromatina, la cual es laxa y facilita el acceso de la RNA polimerasa para empezar así la transcripción. En el genoma eucarionte existen grandes regiones de heterocromatina, y en algunos casos el silenciamiento es permanente⁴. Tal es el caso del cromosoma X, de los retrotransposones, los pseudogenes y las secuencias altamente repetitivas en el genoma. Todas estas secuencias necesitan permanecer silenciadas por un conjunto de modificaciones

epigenéticas, pues su expresión aberrante puede causar alteraciones en la expresión génica y mutaciones.

El DNA en mamíferos se metila en el carbono 5 de citosinas (5me-C) que anteceden a una guanina (dinucleótidos CpG). Algunos promotores se encuentran enriquecidos con dinucleótidos CpG; a estas regiones se les llama islas CpG y son los blancos de las DNA-metil transferasas. La impronta genética (*imprinting*), está asociada a la metilación diferencial ya sea del alelo materno o bien del paterno de algunos genes, lo cual define su expresión. Si la impronta ocurre de manera aberrante se manifiestan una variedad de síndromes, dependiendo del alelo afectado. Las evidencias sugieren que la función de la metilación del DNA es la represión transcripcional, a través de dos mecanismos principales. El primero consiste en la interferencia que causa la metilación del DNA en los sitios de reconocimiento de factores transcripcionales. El segundo modo de represión se basa en el principio contrario, que los sitios CpG metilados pueden atraer proteínas represoras o conjuntos de proteínas represoras y remodeladores de cromatina, cuya consecuencia es el silenciamiento de la región en cuestión⁵.

Las histonas pueden sufrir diversos tipos de modificaciones post-traduccionales, que alteran su afinidad por el DNA o bien la interacción con otros factores transcripcionales. Este tipo de modificaciones se llevan a cabo mediante reacciones enzimáticas reversibles. Entre las más importantes se encuentran las metilaciones, que generan las metiltransferasas de histonas, las acetilaciones catalizadas por las acetiltransferasas, las ubiquitinaciones y las fosforilaciones, estas últimas catalizadas por diversas cinasas. Estas modificaciones ocurren siempre en el extremo amino terminal, llamado “cola” de histona. Algunos residuos de aminoácidos en esta región, se modifican con mayor frecuencia (Figura 1).

Existen tres modelos, no mutuamente excluyentes, que intentan explicar cómo es que las modificaciones post-traduccionales en las histonas afectan a la cromatina en cuanto a su

actividad transcripcional. El primer modelo propone que estas modificaciones afectan la configuración de la cromatina. El segundo modelo sugiere que las modificaciones de histonas inhiben la unión de un factor transcripcional a su blanco en la cromatina. El tercer modelo propone que la modificación promueve la unión de un factor a la cromatina⁵. Si tomamos en cuenta el primer modelo, la acetilación de las lisinas, por ejemplo, neutraliza la carga positiva de la cola de histonas, reduciendo su fuerza de unión al DNA cargado negativamente, de esta manera se hacen más accesibles los sitios de unión al DNA. Por otro lado, apoyando el tercer modelo, el bromodominio que tienen muchas proteínas de unión a cromatina, se une específicamente a lisinas acetiladas. De hecho, muchas acetiltransferasas de histonas tienen este dominio, y cuando son parte de complejos de remodelación de cromatina, promueven la unión a ésta⁵. Existen numerosas evidencias de la correlación entre la acetilación de las histonas y la activación transcripcional. Por ejemplo, las regiones en las que la cromatina se encuentra activa, tienden a tener una conformación abierta y por lo tanto, son accesibles a enzimas como la DNasa, que pueden digerir el DNA. Basándose en este principio, un grupo encontró una correlación muy alta entre la sensibilidad a DNasa y la acetilación de histonas en regiones genes de globinas que se encuentran transcripcionalmente activos en eritrocitos embrionarios⁶. Otro trabajo en cambio, demuestra que en regiones silenciadas en *Saccharomyces* hay un nivel bajísimo de acetilación de histonas⁷.

La metilación de las histonas es más complicada que la acetilación, pues puede ocurrir en lisinas o argininas. Además, las consecuencias transcripcionales de la metilación pueden ser positivas o negativas, dependiendo de la posición del residuo en la histona. También influye el estado de metilación de los residuos: las lisinas pueden estar mono, di o trimetiladas, mientras que las argininas pueden estar mono o dimetiladas. Existen por lo menos 24 sitios identificados que están sujetos a metilación, en las histonas H2A, H2B, H3 y H4, así que las combinaciones posibles de metilación de los nucleosomas es muy grande. De las lisinas metiladas se han caracterizado bien seis: cinco en H3 (K4, K9, K27, K36 y K79) y uno en H4(K20). La metilación de H3K4, H3K36 y H3K79 en general se ha asociado a la

activación de la transcripción, mientras que en H3K9 y en H3K27 se asocian a represión transcripcional⁵.



Figura 1. Las colas de las distintas histonas con diferentes modificaciones covalentes en residuos específicos. Las marcas que están en rojo representan fosforilaciones, las que están en amarillo representan las acetilaciones, en verde se representan las metilaciones y las estrellas en azul indican ubiquitinación.

1.2. Correlación entre los tipos de modificaciones epigenéticas y la actividad transcripcional

En general, se ha visto que en las regiones donde se encuentra trimetilación de la lisina4 en la histona 3 (H3K4me3), hay actividad transcripcional, mientras que la trimetilación de lisina 27 en la misma histona (H3K27me3), correlaciona con represión transcripcional^{8,9}. H4K20me3, H3K9me3 y H3K27me3 están relacionadas con la formación de heterocromatina y con represión transcripcional (Figura 2). Sin embargo, H3K9 y H4K20 monometiladas se encuentran enriquecidas en genes activos⁸ (Figura 2). Siendo H3K4me3 y H3K27me3 marcas epigenéticas funcionalmente opuestas, normalmente se encuentran en dominios diferentes del DNA; sin embargo pueden coexistir en algunos promotores y otros elementos regulatorios⁸⁻¹⁰.

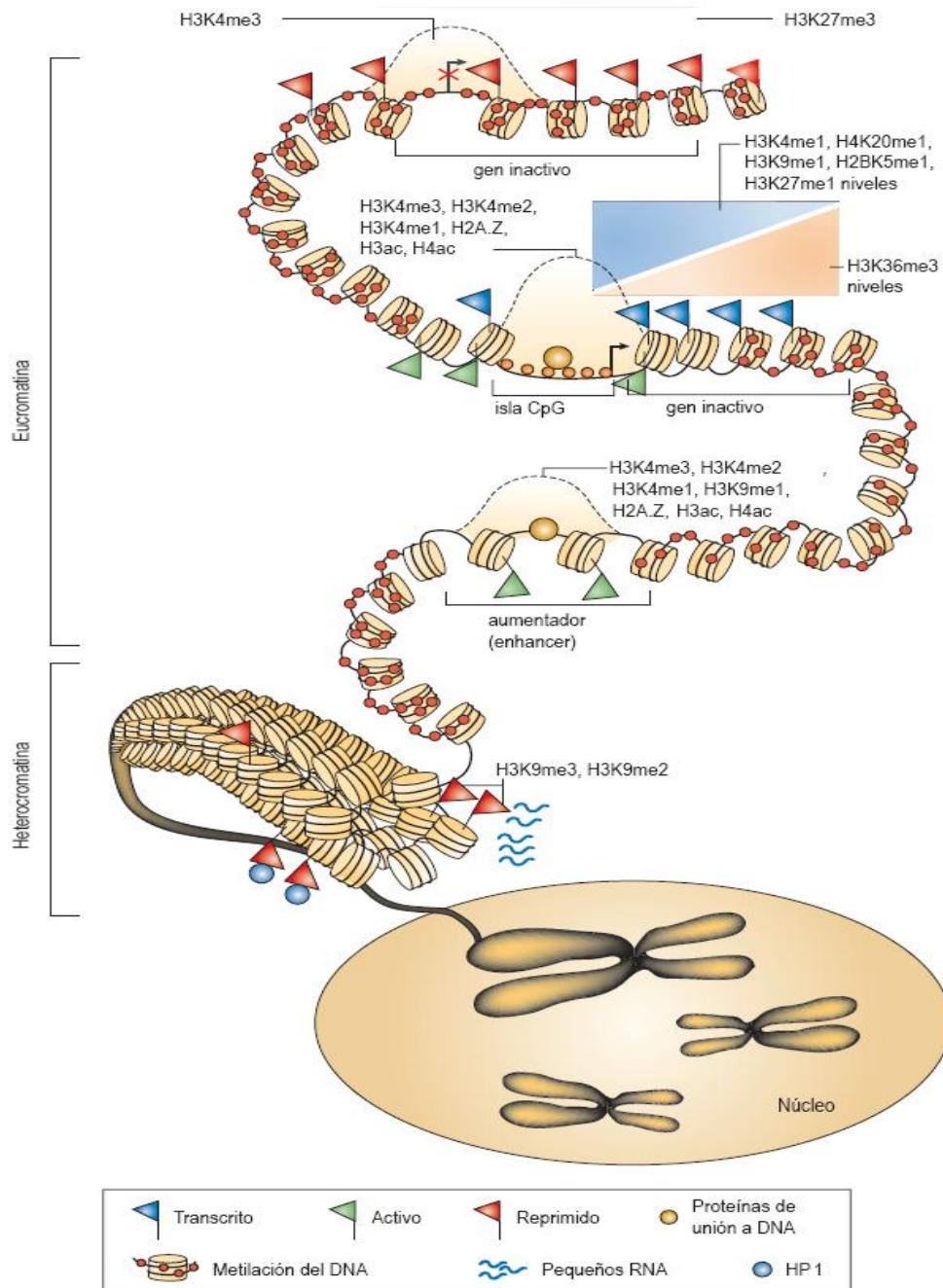


Figura 2. Representación del conjunto de marcas epigenéticas que puede tener la cromatina. Las modificaciones epigenéticas forman regiones en la cromatina donde es transcripcionalmente activa (euromatina) y regiones donde es inactiva (heterocromatina). Las marcas en las histonas pueden reclutar otros complejos de remodelación de cromatina, tales como enzimas que modifican a las histonas y al DNA, así como proteínas de heterocromatina (HP1) y otras proteínas que se unen al DNA. Figura modificada de Schones & Zhao, 2008 ⁸.

A estas regiones donde coexisten ambas marcas se les llama dominios bivalentes, y son muy característicos de las células troncales embrionarias (ES)^{9,10}. Estas propiedades se discuten más adelante. Parece ser que algunos aumentadores o *enhancers* en humanos también tienen marcas epigenéticas distintivas. Se ha encontrado que muchas de estas regiones reguladoras están enriquecidas con H3K9me1 y poca H3K4me3, mientras que en otros se puede ver que hay gran cantidad de H3K4me3^{8,11,12}. Un dato muy interesante es que las islas de acetilación, que son regiones con varios grupos de histonas acetiladas, son excelentes candidatas a estar asociadas a *enhancers*⁸. En promotores se ha detectado enriquecimiento con H2BK5me1, H3K9me1, H3K27me1, H4K20me1, mientras que en regiones transcritas hay altos niveles de H3K36me3 (Figura 2)⁸. Esto nos habla de que la búsqueda de marcas epigenéticas es una herramienta poderosa para detectar regiones regulatorias, así como regiones con o sin actividad transcripcional.

Se han mencionado algunas de las marcas epigenéticas más relevantes para este trabajo, pero existen muchas más, incluso ha surgido de manera reciente el término de epigenoma para referirse al conjunto global de estas marcas en un genoma, bajo condiciones particulares. Las modificaciones epigenéticas, provocan variaciones en la estabilidad del nucleosoma, afectando directamente las interacciones entre el DNA, las histonas, la RNA polimerasa y factores transcripcionales. Todo esto en sumatoria confiere la gran plasticidad transcripcional necesaria para cada célula, así como la sorprendente variedad celular presente en un mismo organismo.

2. CÉLULAS TRONCALES

Las células troncales son células que tienen la capacidad de auto-renovarse y de dar lugar a uno o más tipos celulares especializados. Durante el desarrollo embrionario, a partir de las células troncales se originan todos los tejidos y órganos, mientras que en el adulto, se encargan de mantener estas estructuras. Se pueden clasificar de acuerdo a la plasticidad o potencial que tienen para formar determinados tipos de células especializadas. Las células

totipotentes pueden dar lugar a los tipos celulares de un organismo completo; el cigoto es totipotencial porque tiene la capacidad de formar el embrión y los tejidos extraembrionarios¹³. Con un potencial más restringido, las células troncales pluripotentes de murinos pueden dar lugar a todos los tejidos embrionarios y fetales de las tres capas germinales, mas no a los tejidos extraembrionarios¹³. En esta clasificación se encuentran las células troncales embriónicas, o células ES, como les llamaremos de aquí en adelante. Las células multipotentes tienen la capacidad de dar lugar a diferentes tipos celulares dentro de un linaje celular dado. En esta clasificación se encuentran la mayoría de las células troncales en el adulto, como las del intestino, la epidermis, las del sistema hematopoyético y las del sistema nervioso¹³. Finalmente, las células unipotentes sólo generan un tipo celular, como las células troncales espermatogénicas¹³.

2.1. Células ES

La capacidad de renovación de las células troncales las hace uno de los centros de atención más importantes en la investigación médica, debido al potencial que tienen para utilizarse tanto para el tratamiento de enfermedades degenerativas, como para reemplazar tejidos que han sido dañados por otra causa. Dado que en el adulto la capacidad de diferenciación de las células troncales es limitada, una de las fuentes que pudieran ser más valiosas para los propósitos mencionados son las células ES. Estas células se derivan de la masa celular interna del blastocisto, pueden mantenerse en un cultivo sin diferenciar y también pueden ser genéticamente manipuladas *in vitro*. Pueden incluso ser microinyectadas de nuevo en blastocistos, y pueden colonizar todos los tejidos del embrión, formando quimeras. Aunque comparten un gran número de similitudes con las células de la masa celular interna, las células ES de ratón son diferentes a las células embrionarias del epiblasto. Por ejemplo, necesitan de la señalización de la vía Lf/ gp 130/Stat3 para auto-renovarse, mientras que los ratones con mutaciones en esta vía se desarrollan normalmente. Las células ES pueden diferenciarse *in vitro* hacia un gran número de linajes celulares, pues su cromatina se caracteriza por tener una plasticidad

hiperdinámica. Su estado pluripotente depende principalmente de la transcripción e interacción de los factores transcripcionales Oct4, Nanog y Sox2. La diferenciación de estas células está acompañada del silenciamiento de genes de pluripotencia, como los que se han mencionado, que permanecen silenciados en las células somáticas⁵. Sin embargo las limitaciones éticas que impone trabajar con embriones humanos, han orillado a la búsqueda de estrategias alternativas que permitan revertir la diferenciación de células somáticas y volverlas pluripotentes, precursores multipotentes, o bien convertirlas a otro tipo celular diferenciado (transdiferenciación).

En cultivo, las células ES forman agregados y crecen en forma de colonia. Se pueden cultivar sobre células alimentadoras (*feeders*), que consisten de una capa de fibroblastos mitóticamente inactivos que producen LIF. En ausencia de células alimentadoras, las células ES se pueden cultivar en una caja con gelatina, que sirve como superficie de adhesión, suplementando el medio de cultivo con LIF. Las colonias tienen una morfología peculiar. Se observan abultadas, con contornos bien definidos y refringentes.

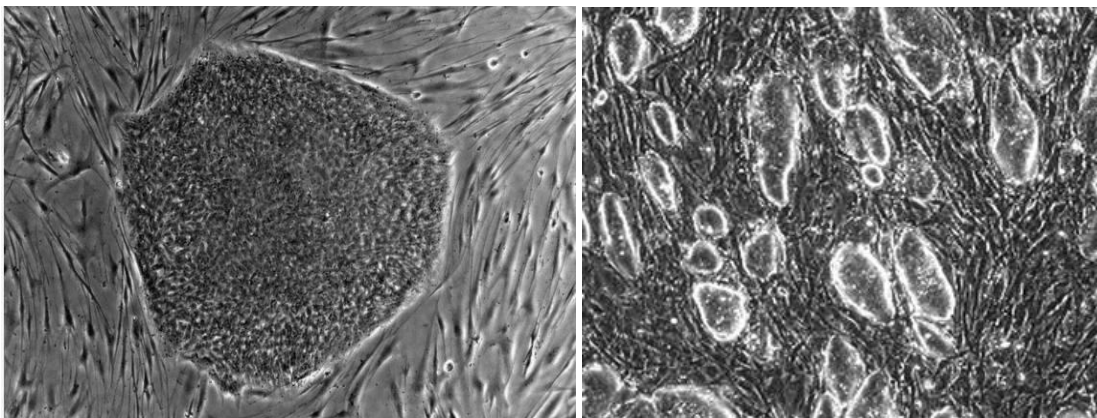


Figura 3. Izquierda: Colonia de células ES humanas cultivadas sobre células alimentadoras (*feeders*). Derecha: Cultivo de varias colonias de células ES de ratón sobre células alimentadoras. Las colonias de ES se ven grandes, abultadas y con un contorno refringente. Los fibroblastos son las células que se ven alargadas en monocapa. Fuente: <http://www.thetechherald.com/article.php/200909/3078/Breakthrough-made-in-non-embryonic-stem-cell-research>

3. GENERALIDADES DE LA REGULACIÓN EPIGENÉTICA DURANTE EL DESARROLLO

Aun teniendo exactamente el mismo material genético en un mismo organismo, las neuronas, los miocitos, las células epiteliales, etc. constituyen tejidos y órganos complejos, por lo que tienen una alta especialización que se debe a diferencias en la expresión de genes y a interacciones intercelulares. Las diferencias en los programas de expresión genética, que resultan en el desarrollo de diferentes órganos y tejidos, ocurren sin cambios en la secuencia del DNA ¹⁴. Dichas diferencias se asocian, en gran parte, a factores epigenéticos que modulan la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario. La plasticidad de la cromatina permite que se vayan moldeando las diferentes células y tejidos, conforme avanza la diferenciación; y dependiendo del tipo celular, se expresan algunos genes y se silencian otros.

3.1. Las características epigenéticas de las células pluripotentes.

En la etapa de blastocisto en los mamíferos, el embrión está compuesto por la masa celular interna y el trofoblasto. De la masa celular interna deriva el epiblasto, que da lugar al embrión *per se*, mientras que el trofoblasto da origen a los tejidos extraembrionarios. Del epiblasto se pueden derivar células troncales pluripotentes. Sin embargo, la mayoría de las células ES, han derivado de la masa celular interna del blastocisto.

Los rasgos epigenéticos de las células ES son muy peculiares; en ellas se encuentran inhibidos los genes de diferenciación, como los genes de las familias *Hox*, *Pax*, *Dlx*, etc. Esta represión la llevan a cabo las proteínas del grupo Polycomb (PcG), que inducen la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27 (H3K27me3) ¹⁵. El grupo de proteínas PcG está compuesto por dos complejos: PRC1 y PRC2, y cada uno está conformado por diferentes proteínas. Se ha encontrado que en células ES murinas, los dos complejos traslapan en un conjunto de 512 genes blanco, co-ocupando sus promotores ¹⁵. En este trabajo encontraron también que los mismos 512 genes, están enriquecidos con la marca

H3K27me3, cerca del sitio de inicio de la transcripción. El análisis de identidad reveló que estaban altamente representados genes que controlan el desarrollo como aquellos asociados a: organogénesis, morfogénesis, especificación de patrones, neurogénesis, diferenciación celular, compromiso del destino celular. Es preciso mencionar que los blancos de PcG en las células hES (humanas) son muy similares a los de las células ES de ratón¹⁶. En resumen, la evidencia indica que el complejo Polycomb está encargado de reprimir genes de diferenciación en células ES. Como antagonistas de Polycomb se encuentran las proteínas del grupo Trithorax (Trx), que catalizan la modificación H3K4me3, que se asocia a la activación transcripcional. Los promotores de genes de mantenimiento (*housekeeping*), replicación y metabolismo se encuentran enriquecidos con la marca H3K4me3 en las células ES. Lo interesante es el hallazgo de que algunos promotores en las células ES tienen ambas marcas (H3K4me3 y H3K27me3), por lo que se les llama promotores o dominios “bivalentes”⁹. La identidad de los genes con promotores bivalentes, se asoció también con factores de transcripción clave para el desarrollo, morfógenos, moléculas de superficie, microRNAs de linajes específicos y una variedad de factores esenciales para el desarrollo embrionario. Se propone que este estado bivalente sirve para tener a los genes clave del desarrollo listos para la pronta activación o represión, requerida durante el proceso de diferenciación⁹. Así es que estas marcas, junto con las proteínas de PcG y Trx actúan en conjunto para regular finamente tanto el mantenimiento de la pluripotencia, como el proceso de diferenciación hacia los diferentes linajes embrionarios.

En la etapa final del desarrollo, cuando las células están terminando de diferenciarse, se deben silenciar de manera permanente los genes asociados a la pluripotencia, mediante marcas de represión en las histonas y metilación del DNA en las regiones promotoras¹⁴. La activación inapropiada de estos genes en células adultas puede resultar en cáncer¹⁴. Del mismo modo, deben silenciarse los transposones y secuencias repetitivas, pues de lo contrario pueden producirse mutaciones por transposición. La metilación del DNA es estable en células somáticas, tanto en el desarrollo como en la vida adulta¹⁷

3.2. El caso particular del desarrollo de la línea germinal

El desarrollo de la línea germinal en mamíferos tiene una regulación epigenética muy interesante y única. Las células germinales primordiales (CGP) necesitan suprimir el programa somático mediante cambios globales en las marcas de represión mientras las células migran a la cresta genital. En seguida una breve cronología de lo que sucede en ratón, que se resume en la figura 4¹⁷:

-En el día E7.25, las marcas de represión transcripcional son similares a las de las células somáticas.

-En el día E7.5 la marca H3K9me2 empieza a borrarse

-En el día E8.0 empieza a borrarse la metilación del DNA.

-Día E8.75 el nivel de metilación del DNA es mucho menor que en las células somáticas

-Entre el día E7.5 y el E8.25 las CGP están libres de cromatina represiva

-Entre el día E8.25 y el E9.5 las CGP muestran un aumento significativo de H3K9me3

-Ya en la cresta genital, entre el día E10.5 y el E12.5 se desmetila el DNA en los *loci* con impronta, se desmetila también el DNA de otras regiones del genoma en un evento rápido¹⁷.

-Los *loci* de impronta paterna se restablecen entre el día E14.5 y el neonato¹⁷.

-La impronta genética en la línea germinal femenina se restablece después del nacimiento y termina cuando ha concluido el crecimiento del ovocito. La inactivación del cromosoma X en los gametos femeninos se da al mismo tiempo que el evento anterior¹⁷.

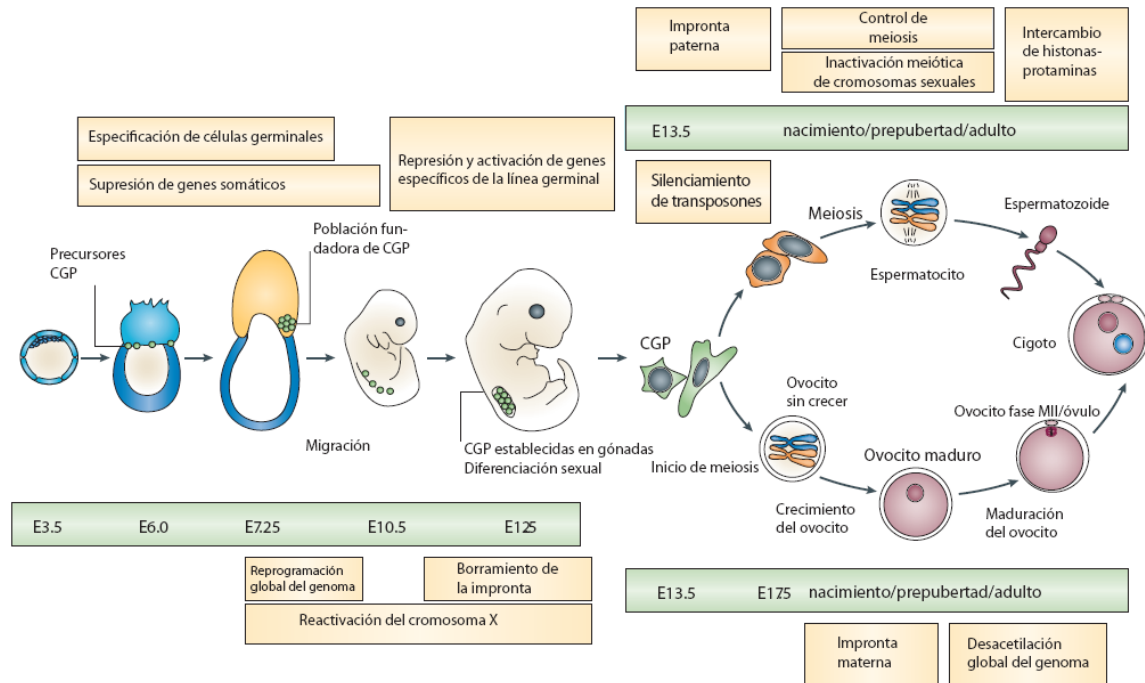


Figura 4. Cronología de los cambios epigenéticos que ocurren durante el desarrollo de la línea germinal, durante la vida embrionaria y adulta. Figura modificada de Sasaki & Matsui, 2008¹⁷.

4. REPROGRAMACIÓN NUCLEAR Y PLURIPOTENCIA

El proceso de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario es unidireccional; es decir, bajo condiciones normales no ocurre en sentido inverso. La reprogramación nuclear es el proceso en el que, bajo ciertas condiciones, las células revierten su estado de diferenciación. La reprogramación nuclear fue inicialmente descrita en anfibios; la primera evidencia experimental de este proceso la dieron Briggs y King, al trasplantar el núcleo de una blastómera de *Rana pipiens* en un ovocito enucleado, dando por resultado renacuajos normales¹⁸.

En condiciones naturales, hasta donde sabemos, sólo hay dos procesos que podrían considerarse como reprogramación nuclear: el primero, cuando las CGP migran hacia la cresta genital y reprograman su genoma para diferenciarse del linaje somático (Figura 4)¹⁷. El segundo proceso se da cuando el gameto femenino y el masculino, apenas se

fusionan para formar el cigoto, donde borran por completo las marcas del linaje germinal, programando su genoma para adquirir la totipotencialidad del cigoto ¹⁷.

4.1. Reprogramación por transferencia nuclear

Con algunas variantes, este proceso consiste en aislar e inyectar el núcleo de una célula somática a un óvulo o a un ovocito, a los que previamente se les extrae el núcleo (enucleados) (Figura 5 A).

A partir del hallazgo de Briggs y King, se hicieron experimentos similares en otros laboratorios. El grupo de Gurdon y otros trasplantaron núcleos de células del epitelio intestinal de *Xenopus sp.*, células completamente diferenciadas, en ovocitos sin núcleo; obtuvieron renacuajos machos y hembras perfectamente normales ^{19,20}. De estos experimentos se concluyó que el proceso de diferenciación no involucra cambios permanentes en el DNA.

En el primer experimento de este tipo en mamíferos, se trasplantó en un óvulo enucleado, un núcleo de célula en cultivo mamario de oveja adulta, ³ y se han hecho diversos experimentos relacionados con éste. La reprogramación por este procedimiento está lejos de ser perfecta, pues se han reportado una gran variedad de anomalías en los clones que llegan a nacer, entre éstas, la expresión aberrante de genes de la célula donadora, así como muerte prematura ²¹. La frecuencia con la que se puede obtener un adulto normal, a partir del trasplante de un núcleo de una célula adulta especializada, es del 1 al 2%, comparado con el 30% partiendo de un núcleo embrionario: la clonación a partir de células completamente diferenciadas es ineficiente ²². Además, la expresión aberrante de genes somáticos es un indicador de que la reprogramación es incompleta, lo cual puede explicarse por la persistencia de una memoria epigenética de las células donadoras del núcleo. Por ejemplo, embriones obtenidos a partir de la transferencia nuclear de células musculares, continúan expresando fuertemente genes musculares en

células neurales u otras células no musculares. Se cree que este fenómeno puede relacionarse con la incorporación de la variante de la histona H3.3 del óvulo en la cromatina del núcleo trasplantado, preservándose así la memoria de la expresión genética previa³. Otras observaciones también demuestran que la reprogramación por transferencia nuclear es incompleta. Una de ellas se hizo con un reportero Oct4-GFP para ver la activación de este *locus* en blastocistos clonados; se observó que solo un número limitado de células expresaban este gen²³. Existen otros trabajos en embriones clonados que sugieren la reactivación incompleta de genes relacionados con *Oct4* como *Pramel4,5,6 y 7*, *Ndp53l1*, *Dppa1,2,3,4 y 5*²⁴. Anormalidades a nivel epigenético incluyen la hipermetilación de la histona 3 lisina 9 (H3K9), asociada a una hipermetilación generalizada del DNA en embriones de preimplantación clonados²⁵.

4.2. Reprogramación nuclear por fusión celular y reprogramación por extractos celulares

La reprogramación nuclear por fusión consiste en fusionar una célula somática con células ES (Figura 5 B). En este caso, el fenotipo de las células ES es dominante, ya que las células fusionadas son híbridos tetraploides con características muy similares a las células ES parentales²². La activación de genes de pluripotencia (como *Oct4*), que están silenciados en las células somáticas, así como la reactivación del cromosoma X, silenciado en la línea somática, son evidencias de reprogramación en los híbridos²⁶. Las células pluripotentes tienen la capacidad intrínseca de reprogramar epigenéticamente los genomas somáticos después de la fusión celular. Sin embargo, la bajísima eficiencia para recuperar colonias híbridas, además del problema que representa la poliploidía, han dejado a este método de reprogramación prácticamente en el pasado.

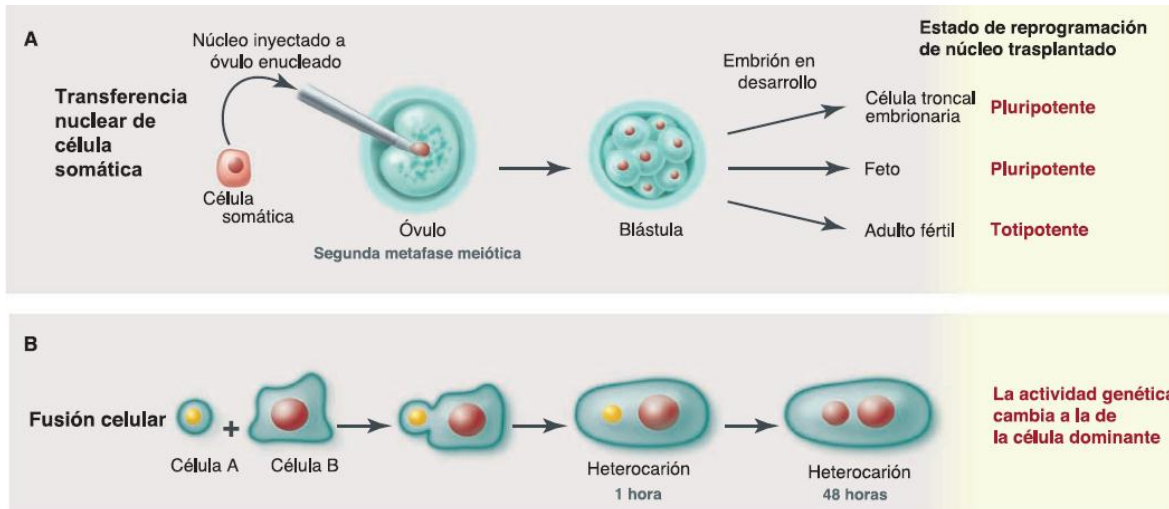


Figura 5. Dos metodologías para reprogramar. Transferecia nuclear de una célula somática (A) y fusión celular (B). Tomado y modificado de Gurdon & Melton, 2008³

La reprogramación nuclear por extractos celulares, consiste en permeabilizar transitoriamente células somáticas con sustancias como la digitonina e incubar estas células permeabilizadas con extractos de otras células, por ejemplo células pluripotentes³, como las células ES, que se obtienen por centrifugación²⁷. Se ha observado que las células permeabilizadas pierden expresión de marcadores somáticos del linaje del que provienen. Además, hasta por 48 horas las células modificadas adquieren marcadores de pluripotencia como Oct4, Nanog y Sox2, debido a modificaciones epigenéticas que sufren los promotores de estos genes²⁸.

4.3. Reprogramación por factores de transcripción definidos

En 2006 el grupo de Yamanaka marcó un parte aguas en la investigación en el campo de la medicina regenerativa, las células troncales y la reprogramación nuclear. A partir de este trabajo, el avance en estas áreas marcha a pasos agigantados.

El trabajo de Yamanaka y colegas demostró que a partir de la expresión de cuatro factores transcripcionales (Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc) en MEF, se pueden obtener células con

características pluripotentes, a las que llamaron células pluripotentes inducidas (iPS)²⁹. Estas primeras iPS eran parecidas, mas no iguales a las células ES, posiblemente debido a una reprogramación parcial. Prueba de ello es que, a diferencia de las células ES, estas primeras células iPS fueron incapaces de formar quimeras cuando fueron reimplantadas en un blastocisto. Poco tiempo después, se publicaron trabajos con protocolos muy similares donde se obtuvieron iPS con características muy similares a las de las células ES, incluyendo su capacidad para formar quimeras³⁰⁻³². Estas iPS también mostraron patrones epigenéticos muy parecidos a los de las células ES³⁰⁻³². Distintos trabajos probaron que las células iPS pueden contribuir a la formación de ratones quiméricos, formar parte de la línea germinal e incluso generar ratones completos¹³.

Poco tiempo después, se logró la obtención de células iPS de humanos. En uno de los trabajos se utilizó el mismo grupo de genes³³ y en otro se utilizaron dos genes iguales (*Oct4*, *Sox2*) y dos genes diferentes: *Nanog* y *Lin28*³⁴. A la fecha, se han podido derivar exitosamente células iPS de distintos tejidos adultos de ratón y de humano, y de las tres capas germinales embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo¹³. A partir del famoso trabajo de Yamanaka se ha visto que los caminos moleculares para la reprogramación pueden ser distintos. El sustento de ello, es que se ha logrado la reprogramación a través de diferentes combinaciones de genes que los propuestos originalmente por Yamanaka; algunos de los 4 originales se pueden sustituir por otros³⁴, y también se puede prescindir tanto de *c-Myc*³⁵, como de *Klf4*³⁶. Sorprendentemente, se ha logrado obtener iPS a partir de fibroblastos humanos con la sola inducción de *Oct4* y *Sox2*³⁷ y las células troncales neurales se han reprogramado solo con *Oct4*.

Dentro del contexto de este trabajo de tesis, fueron de particular importancia los hallazgos de que algunos compuestos pueden contribuir al proceso de reprogramación³⁶⁻³⁸. Por ejemplo, Huangfu y colegas encontraron que el ácido valpróico (AVP), que es un inhibidor de desacetilasas de histonas, puede sustituir a *c-Myc* y a *Klf4*. El AVP, así como inhibidores de DNA metil transferasas (en menor proporción), aumentan

considerablemente la eficiencia de reprogramación^{38 37}. En otro trabajo con ratones, que se basa en el hecho de que la vía *Wnt/β-catenina* está íntimamente relacionada con el circuito de genes que controlan la pluripotencia, Marson *et.al.* demostraron que estimular con *Wnt3a* soluble en el medio de cultivo, es suficiente para sustituir a *c-Myc* y obtener iPS con los otros tres factores originales³⁹.

Otro trabajo importante, que refuerza la idea de que las moléculas pequeñas pueden mediar la reprogramación, es el de Shi *et.al.*⁴⁰. Ellos obtienen iPS a partir de precursores neurales (NPC), tanto de embrión, como de adulto. Observan que BIX, un inhibidor de la metiltransferasa de histonas G9a, aumenta la eficiencia de reprogramación, cuando los NPC adultos son transducidos sólo con *Oct4* y *Klf4*. Aún más interesante es, que al transducir NPC fetales con *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* seguido del tratamiento con BIX, obtienen con éxito células iPS, prescindiendo de *Oct4*; lo cual no ocurre en ausencia de BIX. La explicación es que la metil transferasa de histonas G9 es la responsable de la metilación, y por ende, silenciamiento del promotor de *Oct4*.

5. PANORAMA GENERAL DE LA REGULACIÓN DEL ESTADO PLURIPOTENTE

El estado pluripotente está regulado por un conjunto de genes maestros, que son el centro principal de una compleja red que aún no se termina de descifrar. Los genes maestros interaccionan entre sí, se auto-regulan, y forman complejos con remodeladores de la cromatina para mantener el estado pluripotente y la auto-renovación de las células.

El factor transcripcional más importante que regula esta red es el factor con homeodominio POU, *Oct4*. La falta de éste en embriones tempranos resulta en la inhabilidad para desarrollar la masa celular interna. La supresión de *Oct4* en células ES conlleva a su diferenciación hacia el linaje de trofoblasto. El mismo fenómeno sucede con la pérdida de función del factor *Sox2*. *Nanog* en el embrión es indispensable para la formación del epiblasto y, su ausencia en células ES provoca la diferenciación hacia el

linaje del endodermo primitivo. Sox2 y Oct4 forman un heterodímero y así regulan la actividad transcripcional de muchos genes específicos de células ES, incluyendo a *Nanog*. A su vez, Oct4 y Sox2 se autorregulan y se regulan recíprocamente (Figura 6). Oct4, Sox2 y Nanog pueden funcionar en distintas vías y operar de manera interdependiente para coordinar el estado pluripotente de las células ES ⁴¹.

Oct4 y Nanog comparten una gran cantidad de genes blanco. Nanog co-ocupa casi la mitad de los genes que ocupa Oct4 en ratón. Oct4 y Nanog regulan genes para la auto-renovación y también funcionan como represores de diferenciación. Los genes *Esrrb*, *Rif1* y *Zic3* parecen ser importantes, pues en su ausencia las células ES adquieren una morfología aplanada, parecida a fibroblastos ⁴¹. En un estudio con RNAi se ha determinado que *Nanog*, *Oct4*, *Sox2*, *Tbx3*, *Esrrb*, *Tcl1*, *Dppa4*, *Rif1*, *Sall4* son los genes más importantes para el estado pluripotente. *Esrrb*, *Rif1* y *Sall4* son blancos de Oct4, Nanog y Sox2 ⁴²; mientras que Nanog y Sall4 interaccionan y co-regulan a *Oct4*, *Sox2* y a ellos mismos ⁴¹.

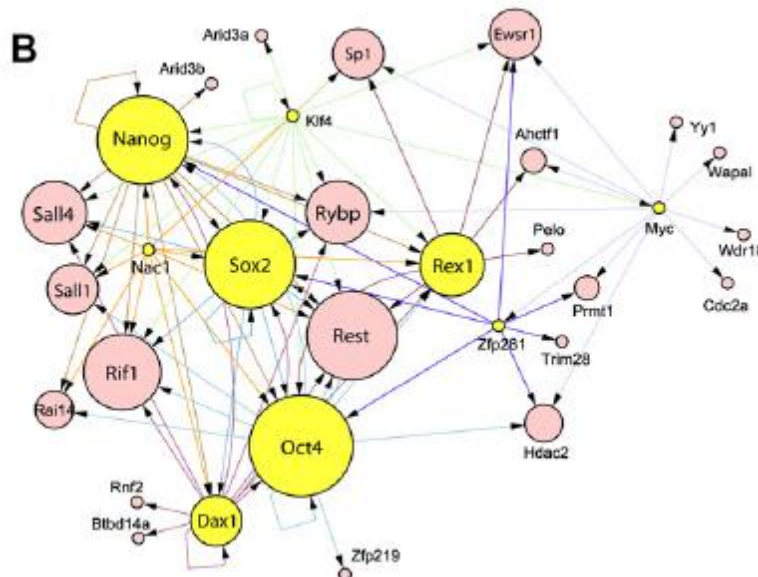


Figura 6: Red de interacciones de múltiples factores importantes en la pluripotencia, según Kim et.al. 2008 ². El tamaño de los círculos indica el grado de co-ocupación del factor transcripcional en diferentes promotores. Por ejemplo, Oct4, Nanog, Sox2 y Rest co-ocupan, junto con otros factores transcripcionales, una gran cantidad de promotores, es decir, casi nunca se encuentran solos en un promotor. Las cabezas de flecha indican la dirección de la regulación.

Existe una conexión entre los factores transcripcionales mencionados y los sistemas de modificación de la cromatina. Por ejemplo, Oct4 regula positivamente la expresión de dos desmetilasas de histonas de la familia JmjC, *Jmjd1a* y *Jmjd2c*. *Jmj1a* regula positivamente la expresión de *Tcl1*, que regula la auto-renovación, mientras que *Jmjd2c* regula la expresión de *Nanog*, desmetilando H3K9me2 de los promotores. La marca H3K9me2 en *Nanog* permite el reclutamiento de las proteínas represoras HP1 y Trim28. Oct4 y Nanog se unen también a otros remodeladores de cromatina como *Myst2*, una acetil-transferasa de histonas y *Ehmt1*, metil-transferasa de histonas^{41,42}.

Por otro lado, algunos genes silenciados en células ES, en regiones regulatorias tienen unido a Phc-1 (miembro de PcG) y también tienen unido a Oct4 y sus co-reguladores. Una posibilidad es que éstos podrían ayudar a reclutar a las proteínas Polycomb a sus blancos⁴³.

6. ESTRÉS OXIDATIVO Y EPIGENÉTICA DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO

Las concentraciones crecientes de O₂ en la célula influyen la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido O₂^{•-} y peróxido de hidrógeno H₂O₂. La presión parcial de O₂ en los tejidos durante el desarrollo es proporcional a la distancia de una fuente de esta molécula, creándose así una distribución heterogénea de O₂ en el embrión. El estado *redox* de los tejidos embrionarios se ve afectado por la producción de ERO, debido al metabolismo del oxígeno; y los cambios en el estado de oxidación afectan la actividad de muchas proteínas y enzimas. Estas diferencias afectan la transcripción durante el desarrollo¹.

La manera en que estas condiciones embrionarias pueden asociarse con los mecanismos epigenéticos que controlan el desarrollo, es a través de los efectos del estado *redox* en enzimas y moléculas relacionadas con la remodelación de la cromatina. Una de estas

moléculas es la enzima MAT (metionina-adenosil-transferasa), que cataliza la adición de metionina a la adenosina, para producir S-adenosil-metionina (SAM), molécula donadora de grupos metilo en la metilación de histonas y DNA. El estado *redox* influye en la actividad de MAT. Por ejemplo, se ha observado que la relación de glutatión reducido:oxidado (GSH/GSS) correlaciona con cambios en su actividad: cuando esta relación es alta (estado reducido), la enzima está en su nivel máximo de actividad. Si se altera su actividad por cambios en el estado *redox*, se alteran los niveles de SAM y por lo tanto, esto podría afectar los niveles de metilación, tanto del DNA, como de las histonas ¹.

Además, potencialmente existen dos mecanismos que podrían traducir los cambios en concentraciones de O₂ en cambios en la expresión génica: las enzimas que modifican a las histonas y la familia de factores de transcripción inducibles por hipoxia, HIF (hipoxia inducible factor). Muchos genes son blanco de regulación por esta familia de factores transcripcionales. Su estabilidad y activación está regulada negativamente por la hidroxilación de residuos de prolina y asparagina específicos. Por un lado, la enzima PHD (hidroxilasa de prolina) cataliza la hidroxilación de los residuos de prolina; una vez modificado HIF, es blanco de degradación proteosómica, pues es reconocido y modificado por la ubiquitín-ligasa VHL. Por otro lado, la proteína HIF es regulada negativamente por la asparaginil-hidroxilasa, FIH (factor-inhibiting HIF). La hidroxilación en residuos de Asn en HIF, le impide interactuar con su coactivador, P300, e imposibilita a HIF para transcribir a sus genes blanco. Es de particular importancia mencionar que, la actividad tanto de PHD, como de FIH, depende de sus cofactores: α-cetoglutarato, Fe²⁺, ascorbato y O₂ (ver Figura 8). A concentraciones bajas de O₂, HIF se libera de la regulación negativa que imponen estas dos enzimas, pues no son capaces de hidroxilar HIF y éste no se degrada, pudiendo interactuar con sus blancos. Así es que, la actividad transcripcional mediada por HIF, es inversamente proporcional a la concentración de O₂ ¹ (Figura 7). Es interesante mencionar que algunas células troncales ocupan nichos hipóxicos, mientras que otras ocupan nichos bien oxigenados. De hecho, uno de los blancos del factor HIF2-α es *Oct4*, gen al que regula positivamente en condiciones de hipoxia⁴⁴.

Por otro lado, la familia de desmetilasas de histonas JmjC (Jumonji) utiliza los mismos cofactores que FIH y PHD para hidroxilar directamente mono, di o trimetil lisinas en las histonas (Figura 8). La hidroxilación libera formaldehído y resulta en la desmetilación de las lisinas. De manera similar, la desmetilasa de lisinas LSD1 (lysine-specific demethylase 1), que reprime la transcripción desmetilando la H3K4, utiliza FAD^+ como cofactor y O_2 como aceptor de electrones, para reducir la lisina metilada, dando como resultado lisina desmetilada, formaldehído y H_2O_2 (Figura 7). Así ambas desmetilasas requieren de oxígeno, cuya concentración afectaría su actividad.

Las sirtuinas son otro ejemplo de cómo el estado *redox* puede influenciar la regulación epigenética. Las sirtuinas son desacetilasas de proteínas dependientes de NAD^+ . Cuando los niveles de NAD^+ son altos, las sirtuinas pueden más fácilmente reprimir la transcripción, a través de la desacetilación de histonas. El desarrollo del músculo ejemplifica bien su actividad. La diferenciación de las células musculares se acompaña de una disminución en la relación de NAD^+/NADH . Dado que los niveles de NAD^+ son bajos, las sirtuinas pierden actividad, lo cual se traduce en hiperacetilación de las histonas, promoviéndose así la expresión de genes músculo específicos⁴⁵.

Con toda esta información, esperaríamos que en los tejidos y células con bajas concentraciones de oxígeno, HIF fuera libre de unirse a sus elementos de respuesta en una gran variedad de genes, incluyendo *Oct4*. En estas condiciones, de poca oxigenación, también tendríamos bajos niveles de NAD^+/NADH , por lo que la actividad de desacetilasa de histonas de algunas sirtuinas, se vería disminuida. Por el contrario, en altas concentraciones de O_2 , esperaríamos que la actividad de las desmetilasas de histonas fuera mayor, y HIF estaría reprimido por la actividad de PHD y FIH; de igual manera, la actividad desacetilasa de algunas sirtuinas se favorecería en esta condición.

La distribución diferencial de O_2 en tejidos y células del embrión, que genera distintos niveles de ERO y diferencias en el estado de oxido-reducción, podría producir cambios epigenéticos a través de la modulación de modificadores de la cromatina y de la disponibilidad de cofactores, dependientes del estado *redox*.

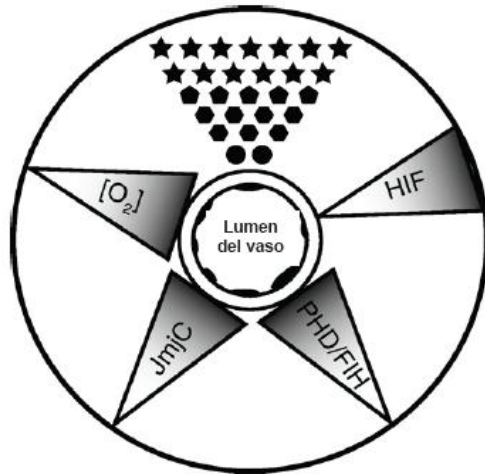


Figura 7. Representación de cómo el gradiente de oxígeno $[O_2]$ influye el fenotipo de las células que se están diferenciando (representadas por los polígonos arriba), cambiando la actividad de los mecanismos sensores de oxígeno que controlan la expresión de genes. La concentración de O_2 es menor mientras más lejos se encuentran las células de la fuente de O_2 , que es el vaso. La actividad de las desmetilasas de histonas JmjC, así como la de PHD/FIH, aumenta con la concentración de O_2 . Lo contrario pasa con la señalización por HIF. Figura tomada y modificada de Hitchler, M.J. & Domann (2007)¹.

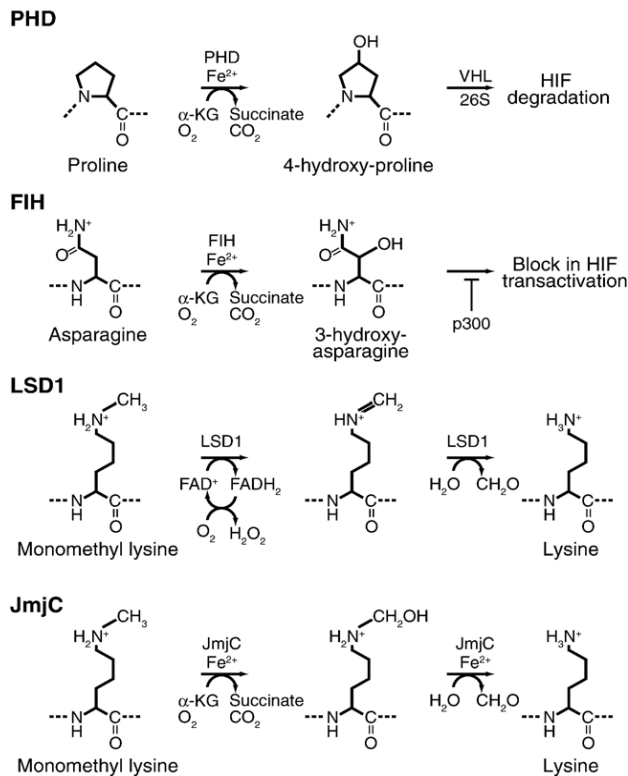


Figura 8. Reacciones catalizadas por las enzimas PHD, FIH (que regulan a HIF) y las desmetilasas de histonas JmjC y LSD1. Figura tomada y modificada de Hitchler, M.J. & Domann (2007)¹.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como ya se ha discutido en este trabajo, las especies reactivas de oxígeno, productos naturales del metabolismo celular, participan en importantes vías de señalización durante el desarrollo y regulan indirectamente la actividad de diversos factores y enzimas. Lo anterior, como consecuencia de la alteración del estado *redox* en las células. Diversos elementos implicados en la modificación de la cromatina son sensibles a los cambios en el estado de oxido-reducción de la célula, y su actividad puede verse afectada por estas fluctuaciones. Es por esto, que en este trabajo se planteó que el estrés oxidativo (a través de la especie reactiva H_2O_2) podría ser una herramienta para inducir modificaciones epigenéticas en MEFs, dejando a la cromatina más inestable y permisiva a la activación transcripcional de genes asociados al estado pluripotente.

HIPÓTESIS

El estrés oxidativo provoca inestabilidad en la cromatina, haciéndola más permisiva a la activación de genes asociados con pluripotencia celular.

OBJETIVO

Evaluar si un pulso de estrés oxidativo inducido por H_2O_2 puede producir cambios epigenéticos en MEFs.

OBJETIVO PARTICULAR

Identificar la existencia de cambios epigenéticos de manera indirecta a través de la búsqueda de modificaciones en la expresión de genes específicos, utilizando RT-PCR como herramienta.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

1. Se escogieron diez genes cuya expresión está determinada por marcas epigenéticas en sus promotores respectivos: trimetilación de H3K4 y H3K27. La mitad de ellos se expresa más en células ES que en MEFs y la otra mitad tiene una mayor expresión en MEFs.
2. Se cultivaron células ES y MEFs. Se extrajo el RNA para obtener cDNA a partir de aquél. Con este cDNA se estandarizaron las condiciones para RT-PCR de cada uno de los diez genes referidos en el inciso anterior. La expresión de los diez genes en estos dos tipos celulares se utilizó como control, como punto de comparación para buscar cambios en la expresión después de la inducción del estrés oxidativo en los MEFs.
3. Se determinaron dos concentraciones de H₂O₂, una alta y una baja. Para ello se hizo un ensayo de viabilidad en MEFs tratados con diferentes concentraciones de H₂O₂. Se escogió una concentración alta, en la que hubiera supervivencia de por lo menos el 50% de las células. Se consideró como concentración baja aquella en la que sobrevivieron alrededor del 70% de las células.
4. Se sembraron varias cajas de MEFs hasta subconfluencia. Se dio un pulso de estrés oxidativo a estas células, con las dos concentraciones de H₂O₂ que se determinaron anteriormente. 24 horas después de este tratamiento, los MEFs se resembraron en medio de células ES. Se extrajo el RNA después de dos y cuatro días de cultivo en este medio. Se obtuvo cDNA a partir de este RNA.
5. Finalmente, con este cDNA obtenido se buscaron cambios en la expresión de los diez genes que se escogieron, comparando con la expresión de MEFs sin tratar y de células ES.

METODOLOGÍA

1. CULTIVO CELULAR

1.1. Cultivo de células ES

1.1.1. Preparación de fibroblastos alimentadores

Las células ES se pueden cultivar sobre una monocapa de fibroblastos. Para preparar esta monocapa, se utilizaron fibroblastos de ratón de la línea STO, que se cultivaron en cajas de 10 cm (Corning), cambiando el medio cada tercer día. El medio de cultivo para estas células contiene: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (FBS, Gibco, USA), GPS 1X (Glutamax 200mM, GIBCO/Penicilina 3mg mL⁻¹/Estreptomicina 5mg mL⁻¹ Sigma). Las células se subcultivaron y se expandieron en cajas de 10 cm (Corning) con 10 mL de medio; al llegar a subconfluencia fueron inactivadas mitóticamente, con mitomicina C (Roche) a una concentración final de 10µg mL⁻¹. Se incubaron con la droga durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se lavaron con PBS1X dos veces, se levantaron con tripsina 0.25% (Gibco) y se subcultivaron en cajas previamente gelatinizadas (gelatina de porcino 0.1%, Sigma, USA) a una densidad de 1X10⁶ células para cajas de 6cm, y 3x10⁶ células en cajas de 10cm. Se dejaron por lo menos 15 horas en incubación para que se formara bien la monocapa y las células se adhirieran a la caja.

1.1.2. Cultivo de células ES sobre fibroblastos alimentadores

Se utilizaron células ES de ratón de la línea AB2.2. Antes de sembrar las células ES se cambió el medio de los fibroblastos alimentadores por medio M15. Este medio está

compuesto de DMEM, 15% de suero fetal bovino inactivado (FBS), aminoácidos no esenciales 1X, GPS (Glutamax-Penicilina-Estreptomicina) 1X (Todos de Gibco, USA) y 0.55mM de 2-β-Mercaptoetanol (Sigma). Se sembraron 1×10^6 células ES por caja de 6cm con fibroblastos alimentadores. El medio se cambió diariamente. Cuando llegaron a semiconfluencia, las células se levantaron con tripsina 0.25% (Gibco) para ser subcultivadas de nuevo en cajas con fibroblastos alimentadores.

1.2. Cultivo de MEFs

El cultivo primario de MEFs se obtuvo a partir de embriones de ratón de 13.5 d.p.c., de la cepa C-129. Para todos los experimentos, se utilizaron las células dentro de los primeros cinco pases. Se cultivaron en un medio compuesto por DMEM, 10% de FBS inactivado, aminoácidos no esenciales 1X (Todos Gibco), GPS 1X y 100μM de β-Mercaptoetanol. El medio fue cambiado cada tercer día.

2. EXTRACCIÓN DE RNA CON TRIzol. OBTENCIÓN DE cDNA.

2.1. Extracción de RNA de cultivos celulares.

Las extracciones de RNA tanto de MEFs como de células ES + fibroblastos se hicieron a partir de cultivos en cajas de 6cm, con los protocolos de cultivo anteriormente mencionados. Para extraer el RNA previamente se lavaron las células con PBS 1X frío. Se levantaron mecánicamente con una pala estéril. Se utilizaron 750mL de TRIzol (Invitrogen, USA) por cada caja de 6cm. Una vez obtenido el RNA, se cuantificó por espectrofotometría y se corrió en un gel de agarosa en TBE al 3% para corroborar su integridad. El RNA se trató con DNasa libre de RNasa (Roche). A partir de este RNA tratado se hizo un PCR a 40 ciclos para el gen TH (tirosina-hidroxilasa), con el propósito de detectar si aún había DNA genómico (ver ANEXOS).

2.2. Obtención de cDNA

Por cada reacción de 25µL de transcripción reversa se utilizó 1µg de RNA. La reacción se hizo con el kit AMV Cloned Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA). Para verificar que la reacción se había llevado a cabo correctamente, se hizo PCR a 30 ciclos para el gen constitutivo HPRT (hypoxantine-guanine phosphoribosyltransferase) que participa en el metabolismo de purinas, cuyo producto en mRNA es fácilmente distinguible del producto genómico. El producto del mRNA es de ~250pb y el producto del DNA genómico se encuentra cerca de 400pb. Así es que nosotros buscamos un producto de 250pb en el gel de agarosa para saber que se había llevado a cabo correctamente la transcripción reversa.

3. RT-PCR

3.1. Oligonucleótidos utilizados para amplificación por RT-PCR

Para analizar por RT-PCR los cambios en la expresión se escogieron ciertos genes con base en el artículo de Maherali ³². En éste, se analizan patrones epigenéticos (H3K4me3 y H3K27me3) en promotores específicos y su relación con los niveles de expresión génica en células ES, células iPS y MEF. Ellos encuentran que la diferencia en la expresión de ciertos genes entre células pluripotentes (células ES y células iPS) y MEFS correlaciona con ciertos patrones de metilación en las histonas (H3K4me3 y H3K27me3), por lo cual concluyen que estas marcas epigenéticas definen la expresión de tales genes. Se escogieron 10 de los genes analizados en el trabajo citado, de los cuales cinco son marcadores de células ES y de pluripotencia: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *ERas* y *Cripto*. Los otros cinco tienen una mayor expresión relativa en MEFs que en ES, y son los siguientes: *Trib2*, *Fgf7*, *Hoxd10*, *Arid5b* y *Rassf1*.

Los oligonucleótidos se mandaron sintetizar tal como están descritos en el trabajo de Maherali, *et.al.*³², no se cambió nada en el diseño. Con la ayuda de las bases de datos del NCBI y con el programa GCK (Gene Construction Kit), se analizó que los oligonucleótidos no hibridaran en otros genes además del blanco. También se analizó que se pudiera distinguir del producto de PCR a partir de DNA genómico y el producto de PCR del mRNA a partir del cDNA. En un diseño ideal de los oligonucleótidos, los productos del DNA genómico son mucho más grandes que los del cDNA, pues aunque la unión de de los cebadores se da en las mismas regiones homólogas, en el DNA genómico estas regiones están separadas por intrones. El único de estos genes que no tiene intrones es *Sox2*, por lo que el producto de PCR amplificado a partir del mRNA (cDNA) es del mismo tamaño que el del DNA genómico. A continuación se describen las secuencias de los pares de oligonucleótidos que se utilizaron para cada gen, en dirección 5' a 3'.

GEN	Secuencia del oligonucleótido sentido	Secuencia del oligonucleótido antisentido
Cripto	ATGGACGCAACTGTGAACATGATGTTTCGCA	CTTTGAGGTCCTGGTCCATCACGTGACCAT
ERas	ACTGCCCTCATCAGACTGCTACT	CACTGCCTTGACTCGGGTAGCTG
Nanog	CAGGTGTTTGAGGGTAGCTC	CGGTTCATCATGGTACAGTC
Oct4	GCTATCTACTGTGTGTCCAGTC	AGAGAAGGATGTGGTTCGAG
Sox2	TAGAGCTAGACTCCGGGCGATGA	TTGCCTTAAACAAGACCACGAAA
Trib2	ATCTGCACAGCGGAGAGG	CGTGATTTGGTTGATGTTGC
Fgf7	CCATGAACAAGGAAGGGAAA	TCCGCTGTGTGTCCATTTAG
Arid5b	CAACAGTGGGCTCAACTTCA	GGGGGTAAGTACTGAGCACAATC
Rassf1	GGACTACAATGGCCAGATCAA	GGAAGGCACTGAAACAGGAC
Hoxd10	CTGAGGTTTCCGTGTCCAGT	TTCTGCCACTCTTTGCAGTG

3.2. RT-PCR 30 ciclos

Para todos los genes analizados primero se establecieron las condiciones del RT-PCR; para ello se hicieron gradientes de T_m (proviene de *melting temperature*). La T_m es la

temperatura a la que el 50% de los oligonucleótidos y su complemento se encuentran en dúplex. Las reacciones se hicieron en 50 μ L, con 3 μ L de cDNA con una concentración final de 2mM de MgCl₂, utilizando el kit de la enzima Platinum *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen).

Del cDNA obtenido después de los tratamientos con H₂O₂, se hicieron algunos RT-PCRs a 30 ciclos para los siguientes genes: *Hprt* (control), *Arid5b*, *Hoxd10*, *Trib2* y *Fgf7*. Como control negativo se hizo la reacción de PCR sin ningún DNA molde. La reacción se hizo igual que como se describe en el párrafo anterior. Las imágenes se obtuvieron con el transiluminador Eagle-Eye.

3.3. RT-PCR 30-35-40 ciclos

Para todas las muestras obtenidas después de los tratamientos con H₂O₂ se hicieron PCRs a 30, 35 y 40 ciclos. Para cada muestra, la reacción de PCR se hizo en 65 μ L, con 4 μ L de cDNA y 2mM de MgCl₂, utilizando la enzima mencionada; de esta misma reacción se obtuvieron las muestras para los 30, 35 y 40 ciclos (~20 μ L cada una). Como controles negativos para cada PCR, se utilizaron las siguientes tres condiciones: (1) la reacción sin templado (agua) para descartar alguna contaminación con ácidos nucleicos; (2) DNA genómico para descartar que los oligonucleótidos amplifican indistintamente el DNA genómico del cDNA; (3) y cDNA de hígado adulto, para ver que la expresión de los genes que analizamos era específica. Como marco de referencia para comparar si había cambio en expresión de los genes analizados, se utilizó el cDNA de células ES + fibroblastos y el cDNA de MEFs, que no fueron sometidos a ningún tratamiento.

4. ENSAYO DE SUPERVIVENCIA ANTE EL TRATAMIENTO CON H₂O₂ EN MEFs

El estrés oxidativo se indujo con H₂O₂(Sigma-Aldrich,30%v/v). Para determinar las concentraciones adecuadas, se hicieron ensayos de supervivencia de los MEFs, después de haberlos sometido al tratamiento con distintas concentraciones de H₂O₂. Los ensayos se

realizaron con ~400 000 células en cajas de 6cm, por triplicado para cada concentración de H₂O₂. Las células fueron tratadas con concentraciones de peróxido desde 0.1μM hasta 0.7mM, durante 24 horas, sin cambiar el medio durante este tiempo. Posteriormente las células fueron levantadas con tripsina 0.25% y se determinó el porcentaje de células vivas y muertas, mediante la tinción con azul de tripano 10% (en PBS1X).

Se descartaron todas las concentraciones de H₂O₂ en las que el porcentaje de muerte fue mayor al 50%.

5. INDUCCIÓN DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MEFs (Ver figura 9)

- a. Se utilizaron nueve platos de 6 cm de diámetro, con MEFs a una confluencia de alrededor de 90%; en este punto hay alrededor de 400 000 células en cada plato.
- b. Las cajas 1 y 2 fueron tratadas con 0.25μM de H₂O₂.
- c. Las cajas 3 y 4 fueron tratadas con 0.5μM de H₂O₂
- d. Las cajas 5 y 6 fueron el control negativo, por lo que sólo se les agregó agua destilada.
- e. Las cajas 7,8,9 fueron tratadas con 0.5μM de H₂O₂.
- f. 24 horas después las células se subcultivaron en el medio de células ES de la siguiente manera:
- g. Se levantaron las células de las cajas 1 y 2. Se sembraron dos cajas gelatinizadas a una densidad alta (1/4 parte de las células en cada una). Otras dos cajas fueron sembradas a una densidad menor(1/8 en cada caja) . Se cultivaron en medio M15, suplementado con 1000U/mL de LIF (Millipore). Se incubaron a 37°C.
NOTA: La razón de sembrar a mayor y menor densidad fue porque el RNA se extrajo a los 2 y a los 4 días respectivamente.
- h. Se siguió exactamente el mismo procedimiento anterior con las cajas 3 y 4.
- i. Después de levantar con tripsina 0.25% el contenido de la caja 7, la mitad del total se sembró, en una caja de 6cm previamente gelatinizada, en medio M15 con

1000U/mL de LIF. En otra caja se sembró $\frac{1}{4}$ del total, con las mismas condiciones. Ambas cajas también fueron tratadas con 1mM de ácido valproico (AVP) .

- j. El contenido de las cajas 8 y 9 se tripsinizó de igual manera que las anteriores. De aquí las células fueron sembradas en dos mitades, en cajas de 6cm, sobre células alimentadoras en medio M15.
- k. A las 48 horas se extrajo el RNA de todas las cajas sembradas a mayor densidad, a excepción de las que se sembraron sobre células alimentadoras. A las cajas restantes (las sembradas a menor densidad), se les cambió el medio, se les volvió a suplementar con LIF (excepto a las que estaban sobre células alimentadoras). Y a las cajas que habían sido tratadas con AVP también se les volvió a agregar la misma dosis del fármaco.
- l. A las 48 horas siguientes (96 horas totales), se extrajo el RNA de estas cajas restantes, a excepción de las que se sembraron sobre células alimentadoras. Estas células ni siquiera pudieron adherirse, y todas se murieron.

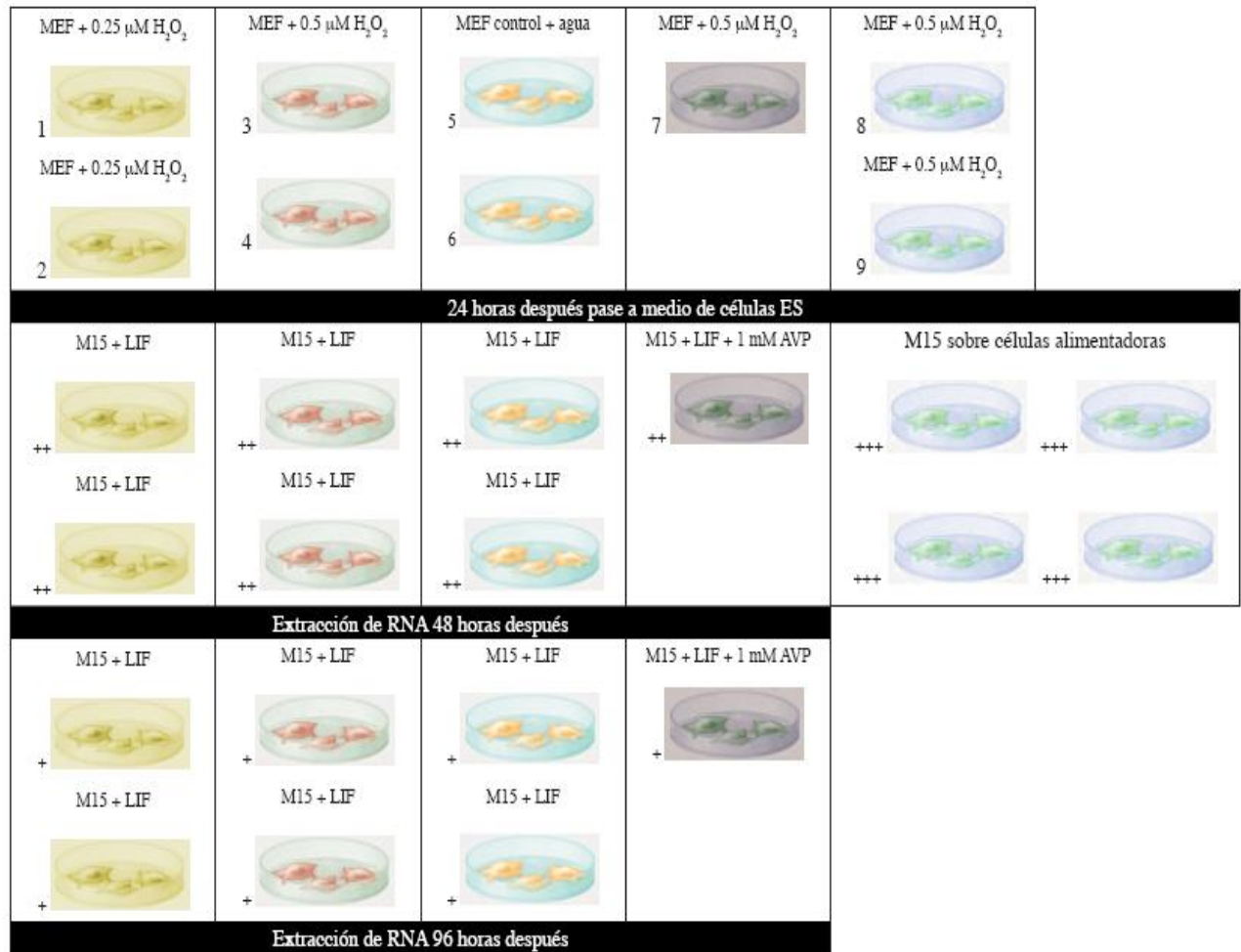


Figura 9. Diagrama que ilustra el protocolo para inducir estrés oxidativo en MEF con cultivo secuencial en medio de células ES (ver texto). Los colores corresponden a las distintas condiciones de partida, que se describen con detalle en el texto. Las células subcultivadas a partir de la misma condición, se muestran en el mismo color. En el panel superior aparecen numeradas las cajas de MEF que fueron sometidas a un pulso de estrés oxidativo durante 24 horas. Después de estas 24 horas, todos los MEF fueron sembrados en medio de células ES (M15) con las siguientes variaciones: de los MEF derivados de las cajas 1 a 7, el medio M15 fue suplementado con LIF; de los MEF provenientes de la caja 7, el medio fue suplementado con LIF y se trataron además con 1mM de AVP; los MEF provenientes de las cajas 8 y 9 fueron sembrados sobre fibroblastos alimentadoras, en medio M15.

+ Corresponde a las células sembradas a menor densidad
++Corresponde a las células sembradas a mayor densidad
+++Sembradas aún a mayor densidad

RESULTADOS

1. ESTANDARIZACIÓN DE CONDICIONES PARA RT-PCR

Para establecer la T_m ideal que debía utilizarse para cada par de oligonucleótidos se obtuvo el cDNA de células ES y de MEFs y se hicieron gradientes de T_m . A continuación se muestra la tabla que resume el resultado de este proceso. Se muestra el tamaño de los productos de PCR, así como la T_m que se estandarizó, haciendo gradientes a 30 ciclos.

Gen	T_m (°C)	Tamaño aproximado del producto
<i>Oct4</i>	60	400 pb
<i>Sox2</i>	63.2	300 pb
<i>Cripto</i>	65	180 pb
<i>ERas</i>	64.6	200 pb
<i>Nanog</i>	63.6	220 pb
<i>Fgf7</i>	61	130 pb
<i>Trib2</i>	60	100 pb
<i>Hoxd10</i>	57.8	110 pb
<i>Rassf1</i>	60.4	120 pb
<i>Arid5b</i>	60	100 pb

Tabla 1. T_m óptima y tamaño de los productos de PCR de los genes analizados a 30 ciclos.

2. ENSAYO DE SUPERVIVENCIA DEL TRATAMIENTO CON H_2O_2 EN MEFs LUEGO DE 24 HORAS

Se probaron diferentes concentraciones de H_2O_2 en células MEF, sembradas en cajas de 6cm de diámetro; variables como el número de células en el plato, así como el número de

pases, tuvieron un efecto, además de la concentración y el tiempo de tratamiento. Se observó que las células a partir del pase 5 empezaban a disminuir la tasa de división celular, sin importar si eran tratadas o no con peróxido, las células de pases posteriores al cinco, adquirirían una morfología extraña después de unos días en cultivo; el citoplasma se expandía y las células se veían muy grandes. Estandarizar el número de células también fue importante. Al hacer tratamientos en cajas donde las células estaban muy confluentes, el efecto del peróxido era imperceptible; en cambio, con la misma concentración de H_2O_2 en estado subconfluyente, se observó un efecto claro de muerte (datos no mostrados).

Después de ver el efecto del número de células y el número de pases, se decidió utilizar células de pase 1 a 4 preferentemente, aunque también se utilizaron de pase 5. Se determinó que el número de células para una caja de 6cm debía ser entre 400,000 y 450,000 células.

Las primeras concentraciones de H_2O_2 utilizadas fueron 0.1mM de, 0.3mM, 0.5mM y 0.7mM. A las 24 horas todas las células estaban muertas (datos no mostrados). Se disminuyó la concentración, empezando con 100 μ M, luego 50 μ M, 10 μ M y 1 μ M; de igual manera, todas las células murieron a las 24 horas (datos no mostrados).

En la siguiente prueba se inició con 1 μ M como la concentración más alta, luego 0.75 μ M, 0.5 μ M, 0.1 μ M. A las 24 horas lo que se observó es que en la concentración de 1 μ M se murieron todas las células, con 0.75 μ M se murieron alrededor del 95%. En la concentración de 0.5 μ M sobrevivieron aproximadamente la mitad de las células; a 0.25 μ M la muerte fue de 20% y a 0.1 μ M no se percibió ningún efecto del H_2O_2 .

3. INDUCCIÓN DE CAMBIOS EPIGENÉTICOS EN MEFs A TRAVÉS DE UN PULSO DE ESTRÉS OXIDATIVO

Una vez que se determinó que la concentración máxima de H_2O_2 que podía utilizarse era de $0.5\mu M$ (cuyo efecto de muerte es de alrededor del 50%), seguimos con el experimento que se explica con detalle en la metodología (Figura 9). El experimento se hizo dos veces, la primera vez no había células tratadas con AVP, siendo ésta la única diferencia. En la figura 10 se muestra el gel en donde se puede observar que el RNA que se extrajo del primer experimento (denotado con un * de aquí en adelante) está en buenas condiciones. Se alcanza a distinguir el RNA de las subunidades 28S y 18S del ribosoma, en proporciones 2:1. En el gel de la figura 12 se muestra el RNA del segundo experimento (denotado de aquí en adelante con **). Aunque la concentración es baja, también se observa que el RNA se encuentra en buenas condiciones.

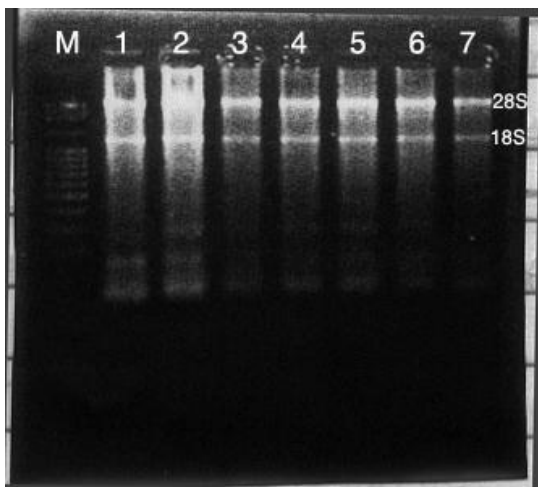


Figura 10. RNA MEF, PRIMER EXPERIMENTO (*). Los carriles marcados en el gel tienen las siguientes muestras: **M** marcador (Mass Ruler); **1** Control MEF sin tratar; **2** Control MEF, sin tratar 2 días en medio ES*; **3** Control MEF, sin tratar 4 días en medio ES*; **4** MEF tratados con $0.25\mu M$ de H_2O_2 , 2 días en medio ES*; **5** MEF tratados con $0.25\mu M$ de H_2O_2 , 4 días en medio ES*; **6** MEF tratados con $0.5\mu M$ de H_2O_2 , 2 días en medio ES*; **7** MEF tratados con $0.5\mu M$ de H_2O_2 , 4 días en medio ES*

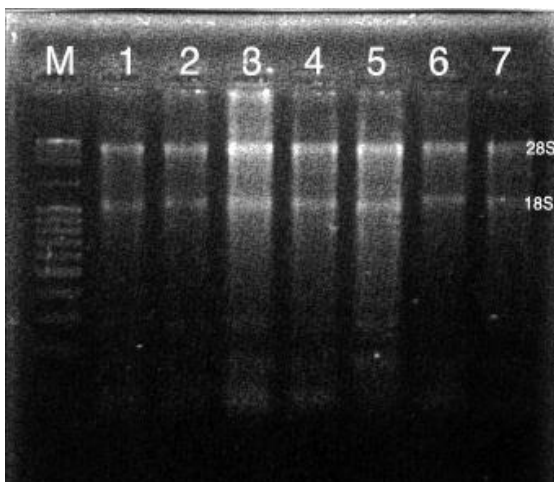


Figura 11. RNA MEF, SEGUNDO EXPERIMENTO ().** **M** marcador (Mass Ruler); **1** MEF tratados con $0.5\mu M$ H_2O_2 , 2 días en medio ES + AVP**; **2** Control MEF, sin tratar 2 días en medio ES**; **3** Control MEF, sin tratar 4 días en medio ES**; **4** MEF tratados con $0.25\mu M$ de H_2O_2 , 2 días en medio ES**; **5** MEF tratados con $0.25\mu M$ de H_2O_2 , 4 días en medio ES**; **6** MEF tratados con $0.5\mu M$ de H_2O_2 , 2 días en medio ES**; **7** MEF tratados con $0.5\mu M$ de H_2O_2 , 4 días en medio ES**

3.1. Búsqueda de cambios en la expresión de genes por RT-PCR

De cada muestra de RNA que se extrajo del experimento anterior, se obtuvo cDNA. Como una aproximación inicial, se hicieron solamente algunos PCRs a 30 ciclos. Esto se hizo para los genes *Arid5b*, *Hoxd10*, *Trib2* y *Fgf7* (Figura 12). Se esperaba que todos estos genes tuvieran una mayor expresión en MEFs que en células ES (referencias control); se esperaba también, que después de inducir cambios epigenéticos con estrés oxidativo en los MEFs, la expresión de estos genes disminuyera. La primera expectativa, es decir, que la expresión de estos genes fuera mayor en MEFs que en ES, al parecer sólo se cumple para *Arid5b* y para *Trib2*; al menos esto es lo que se alcanza a detectar.

La segunda expectativa tampoco se cumplió, pues no se percibió ningún cambio en la expresión de estos genes a 30 ciclos, bajo ninguna de las condiciones (Figura 12), por lo que se decidió hacer un gradiente de 30, 35 y 40 ciclos de PCR, con el fin de que se pudieran distinguir mejor las diferencias, si es que las había (Figura 13).

Al realizar los gradientes de ciclos para todos los genes, no se percibieron cambios. Lo que se esperaba era que, después del tratamiento, disminuyera la expresión de los genes *Arid5b*, *Trib2*, *Rassf1*, *Hoxd10* y *Fgf7*, en comparación con MEFs control, sin tratar. También se esperaba que apareciera expresión de marcadores de células ES: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog*, *ERas* y *Cripto*, y como referencia se utilizó el cDNA de células ES. En ninguno de los casos se observó que la expresión de los genes analizados en los MEFs cambiara después del tratamiento.

En casi todas las muestras se observa una amplificación de *Cripto*, *Nanog* y *Sox2*, que son genes marcadores de pluripotencia. Incluso se amplifican en el DNA genómico control, lo cual indica que lo que vemos no es necesariamente el producto del mRNA. Aunque una

explicación alternativa a este fenómeno podría ser que éstos son genes que sí se transcriben, pero sufren algún tipo de regulación post-transcripcional, que no permite la existencia de una proteína estable. En el caso de *Sox2*, que no tiene intrones, el producto de PCR a partir de DNA genómico y a partir de cDNA es del mismo tamaño, así que lo que se observa es quizás la amplificación de una mínima cantidad de DNA genómico que pudo haber quedado en las muestras, a pesar de que fueron tratadas con DNasa, pues esta técnica es muy sensible. Además, pudiera ser que la cantidad de DNA o RNA fuera mínima en estas tres muestras, pero que la eficiencia de amplificación fuera muy alta, lo cual pudo haber generado un producto fácilmente detectable a partir de una cantidad mínima de ácidos nucleicos. La otra posible causa deriva del hecho de que, por arriba de 30 ciclos de PCR, hay una mayor probabilidad de tener productos inespecíficos. Por otro lado, el patrón de expresión para *Cripto* es extraño, pues sólo se amplificó en algunas muestras a 35 o 40 ciclos. La proliferación de fibroblastos es una de las funciones que se asocian a este gen, lo que quizás explique este patrón.

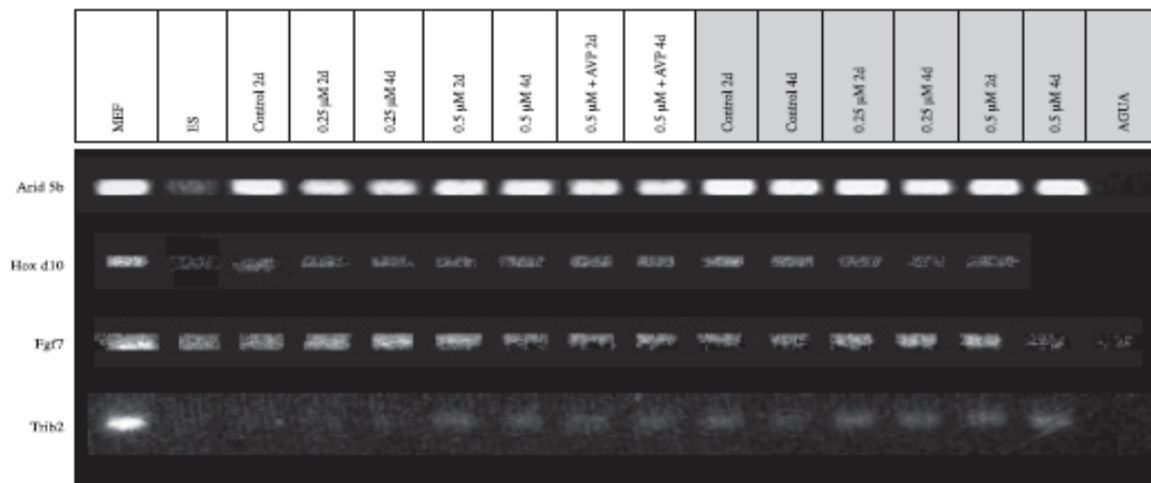


Figura 12. PCR de 30 ciclos para los genes Arid 5b, Hoxd10, Fgf7 y Trib2, en las diferentes condiciones en que se trató a los MEFs. Las muestras del primer experimento se muestran sombreadas de gris.

Figura 13. Resultados de análisis por PCR (30-35-40 ciclos) de los genes que se muestran en el eje de las “y”. En el eje “x” de la figura se muestran las diferentes condiciones de las células. Las primeras 14 columnas corresponden a los dos experimentos hechos para inducir los cambios epigenéticos con estrés oxidativo. Las últimas 5 columnas son los controles : cDNA de células ES, cDNA de MEF sin tratar, cDNA de HÍGADO de ratón adulto, DNA genómico y AGUA (no templado). 0.25µM 2d = pulso de 0.25µM H₂O₂, 2 días en medio M15+LIF; 0.25µM 4d = pulso de 0.25µM H₂O₂, 4 días en medio M15+LIF; 0.5µM 2d = pulso de 0.5µM H₂O₂, 2 días en medio M15+LIF; 0.5µM 4d = pulso de 0.25µM H₂O₂, 4 días en medio M15+LIF; Control 2d = Control sin tratamiento con H₂O₂, 2 días en M15+LIF; Control 4d = Control sin tratamiento con H₂O₂, 2 días en M15+LIF; 0.5µM 2d+ AVP 2d= pulso de 0.5µM H₂O₂, 2 días en medio M15+LIF con ácido valproico; 0.5µM 2d+ AVP 4d= pulso de 0.5µM de H₂O₂, 2 días en medio M15+LIF con ácido valproico. Las columnas sombreadas corresponden a la primera repetición del experimento, donde no se incluyeron los controles con ácido valproico.

DISCUSIÓN

Los resultados no se acercaron a lo que se esperaba y es necesario señalar dos errores experimentales importantes. El primero de ellos es que el RNA de las células ES fue extraído junto con el de los fibroblastos alimentadores (*feeders*). Este punto es relevante dado que, aun en una proporción mínima, el RNA de los fibroblastos *feeders* altera los patrones de expresión de las células ES. Es decir, el patrón de expresión observado para las células ES no es “limpio” sino que está contaminado con algo de expresión de los fibroblastos *feeders*.

El otro error es el diseño de algunos oligonucleótidos. La mayoría de los productos de RT-PCR se pudieron distinguir de los productos del DNA genómico por una diferencia notable en tamaño. Pero para los casos en los que esto no sucedió, lo ideal es asegurarse de que los oligonucleótidos diseñados para el RT-PCR permitan descartar la contaminación con DNA genómico. El diseño puede por ejemplo constar de un par de oligonucleótidos que se alineen, uno en la parte media de un exón y el otro dentro de otro exón contiguo, de manera que el tamaño del producto genómico será la suma del producto de los exones más el intrón que los separa.

Relación entre los niveles de oxígeno y la regulación de la expresión genética durante el desarrollo embrionario

Aunque la hipótesis no se cumplió, hay algunos trabajos que nos hacen aun pensar que el estrés oxidativo podría producir modificaciones epigenéticas. El papel que tiene el estrés oxidativo en la diferenciación durante el desarrollo embrionario es un fenómeno muy interesante y se relaciona con los niveles de oxígeno: el estado *redox* varía dependiendo tanto del estadio, como de la localización en el embrión. Durante la etapa de blastocisto, las concentraciones de oxígeno son bajas, después, en la gastrulación, aumentan; estos cambios en el estado *redox* influyen en el destino celular, ya sea para mantener a las células en un estado indiferenciado, o bien para promover la diferenciación^{44,46}. Se sabe bien que los gradientes de concentraciones de oxígeno contribuyen de manera importante a diversos procesos del desarrollo. Uno bien conocido es la morfogénesis cardiovascular, que se lleva a cabo bajo condiciones de hipoxia; en este contexto, es el factor transcripcional HIF, el que responde a estas condiciones, regulando la expresión de

genes durante el proceso. Otro ejemplo es la morfogénesis de los huesos, donde también participa HIF-1 α , detectando los cambios en gradientes de O₂. Otro ejemplo interesante: la reducción de los niveles de O₂ en células en cultivo del sistema nervioso central y periférico de ratas, promueve la diferenciación hacia neuronas con neurotransmisores específicos⁴⁴. Los niveles de oxígeno también son responsables del mantenimiento de células troncales. Los nichos en donde se encuentran los diferentes tipos de células troncales también están influenciados por concentraciones de O₂, en la mayoría de los casos, las bajas concentraciones de oxígeno les permite permanecer indiferenciadas, mientras que con otras células sucede lo contrario. En el caso de las células ES por ejemplo, la hipoxia es necesaria para mantener el estado pluripotente; de manera equiparable *in vivo*, en el blastocisto las concentraciones de O₂ también son bajas. En la médula ósea, donde existen diversas poblaciones tanto de progenitores, como de células troncales, y las variaciones en los niveles de O₂ influyen en la identidad de cada nicho. Las espermatogonias en cambio, están en un ambiente relativamente bien oxigenado⁴⁴.

La importancia de la transcripción mediada por HIF durante el desarrollo embrionario y la relación con las ERO

En el contexto de este trabajo, el hecho de que existan tantas familias de proteínas cuya actividad depende de cambios sutiles en las concentraciones de O₂, nos habla de la importancia que tiene el metabolismo del oxígeno y la producción de sus especies reactivas durante el desarrollo embrionario⁴⁴. La embriogénesis, fisiológicamente ocurre en un contexto hipóxico (3-5% de O₂). La familia de factores transcripcionales HIF es responsable de la adaptación celular y sistémica a la hipoxia en los mamíferos: regulan la expresión de al menos 180 genes del metabolismo, supervivencia celular, eritropoiesis, etc., a través de sus elementos de respuesta, HRE⁴⁷. Regulan vías de señalización tan importantes como *Notch* y *Wnt*. Pero aún más importante para nuestro trabajo es que HIF-2 α tiene como blanco al gen maestro de pluripotencia, *Oct4*, al que activa directamente en células ES, que como muchas células troncales dependen de un microambiente hipóxico para mantenerse indiferenciadas⁴⁷. Contrastantemente, las

células ES bajo condiciones no hipóxicas expresan HIF1- α en altos niveles, y cuando no tienen el gen *Hif1- α* pierden capacidad de proliferación⁴⁸, lo cual sugiere que este factor es importante para este proceso, y además, es una de muchas evidencias que muestran que la señalización por HIF no depende necesariamente de hipoxia. También deberíamos notar que los factores HIF1- α y HIF2- α pueden desencadenar respuestas totalmente diferentes en el mismo tipo celular, dependiendo del contexto en el que se encuentren.

Hay varias evidencias que relacionan a las especies reactivas de oxígeno y a la señalización por HIF. Una de ellas es tan simple como que los antioxidantes suprimen la respuesta hipóxica mediada por HIF; a partir de lo cual se podría inferir que las especies reactivas participan en esta respuesta⁴⁹. Existe un trabajo en el que se muestran dos evidencias más claras de esta relación; en la primera de ellas se demuestra que el tratamiento exógeno de células Hep3B con H₂O₂ (25 μ M), logra estabilizar HIF1- α tan bien o mejor que en condiciones de hipoxia. La otra evidencia es que estas mismas células fueron incubadas con la enzima glucosa oxidasa (que genera ERO), lo cual fue suficiente para estabilizar a HIF1- α y HIF2- α en condiciones de normoxia⁴⁹. Esto demuestra que la respuesta por HIF no depende necesariamente de una baja concentración de O₂, pues las ERO (de manera endógena o exógena) pueden estabilizar HIF aun en altas concentraciones de O₂. Otra evidencia indirecta al respecto es que los inhibidores de complejos mitocondriales, que son en parte responsables de la producción de ERO, suprimen la inducción hipóxica de HIF⁴⁹. En relación a este último punto, hay un trabajo en el que células nulas para el citocromo C, fueron tratadas con un análogo del H₂O₂ (TBP) y esto fue suficiente para estabilizar HIF1- α y HIF2- α , aun en ausencia de mitocondrias funcionales⁵⁰: es decir las especies reactivas, aunque provengan de una fuente exógena, son suficientes para estabilizar estos factores. Algunas evidencias sugieren que la oxidación del Fe³⁺ en el sitio catalítico de las enzimas PHD (hidroxilasas de prolina) podría jugar un papel en la señalización de HIF mediada por ERO⁴⁹; la oxidación mediada por ERO inhibiría a las PHD, lo cual impediría que HIF se hidroxilara y se degradara. Todas estas evidencias son muy importantes, dado que muchísimos genes son blanco de HIF, entre ellos, *Oct4*.

La regulación de Oct4

La regulación de *Oct4* tiene muchos matices. Primero hablaremos de la relación entre *Oct4* y el estado redox. Las proteínas con dominio POU, familia a la que pertenece *Oct4*, tienen una cisteína muy conservada en la posición 50. Esta cisteína es particularmente sensible a *redox* en el caso de *Oct4* y *Oct2* y los cambios en el estado redox pueden afectar la unión al DNA de estas proteínas ⁵¹. La tiorredoxina es una enzima capaz de restablecer la unión al DNA de reguladores transcripcionales, reduciendo cisteínas críticas. Consistente con la observación anterior, se publicó un trabajo en donde se encuentra que la tiorredoxina interacciona físicamente con las cisteínas oxidadas de dímeros de *Oct4*, forma transcripcionalmente activa de este factor; esta interacción restablece la unión de *Oct4* al DNA, reduciendo las cisteínas y aumentando su actividad transcripcional. La importancia de la regulación por redox de *Oct4*, a través de la tiorredoxina, queda manifiesta en los ratones nulos para *Trx*; las células de la masa celular interna del blastocisto de estos ratones son incapaces de proliferar en cultivo, y los embriones mueren inmediatamente después de la implantación en el útero ⁴⁶.

Por otro lado, en relación con *Oct4* y su regulación por estrés, recientemente se publicó un trabajo en donde se observa que la actividad transcripcional de *Oct1* y *Oct4* puede ser inducida por este mecanismo, en este caso, las pruebas se hicieron con estrés oxidativo (inducido con H_2O_2) y con radiación ionizante. Una de las observaciones interesantes es que *Oct4* responde a señales de estrés alterando su afinidad para la unión a sitios complejos (motivos de unión no consenso), *in vitro*. También es interesante que *Oct1* y *Oct4* regulen blancos comunes, entre ellos las histonas. Entre los blancos que tienen en común, se detectaron una variedad de genes cuyos promotores contienen secuencias no consenso de unión a estas dos proteínas, cuya unión es fuertemente inducida por estrés. La fosforilación de dos residuos de serina conservados regula la unión de *Oct1* a los sitios complejos, y hay residuos homólogos en *Oct4* parecen tener el mismo papel. Finalmente,

los autores discuten que la identidad de los blancos que las proteínas Oct, tienen funciones consistentes con un papel en la respuesta al estrés⁵².

Estrés oxidativo y modificaciones epigenéticas

El hecho de que no se haya observado ningún cambio en la expresión de los genes que se analizaron, no excluye la posibilidad de que el estrés oxidativo pueda generar modificaciones epigenéticas. Esta posibilidad parece quedar abierta por varias razones. Primera, dado que la expresión de los genes analizados depende en buena parte de mecanismos epigenéticos, esperábamos que las diferencias transcripcionales que pudiéramos observar después del tratamiento, se asociaran a estos mecanismos. Sin embargo, aunque con nuestra estrategia no hayamos detectado este tipo de cambios, éstos pudieron haberse generado en regiones regulatorias (donde ocurren frecuentemente) y aun pudieron no haber sido suficientes para producir una respuesta transcripcional observable en nuestro experimento. Otra posibilidad es que los patrones de expresión hayan cambiado en otros genes que no analizamos.

Por otro lado, el efecto del estrés oxidativo, cualquiera que haya sido, pudo haber ocurrido en solo en algunas subpoblaciones de células, y si el número de células afectadas fue muy bajo, los cambios pudieron haber sido invisibles por la técnica de RT-PCR. Esto es, si en la mayoría de las células no hubo ningún cambio, la expresión global detectada pudo haber enmascarado los cambios en la expresión de las pocas células hipotéticamente afectadas. Esto es mucho más drástico si lo que se espera es una disminución en la expresión, pues cuando se busca que aparezca un transcrito, la técnica es muy sensible para amplificar pocas moléculas. De hecho también existe la posibilidad de que los cambios provocados por el estrés oxidativo hubieran sido transitorios, de una duración muy breve, y quizás la toma de muestra de RNA fue muy tardía para detectar esos cambios transitorios.

Es probable que se hayan generado cambios en expresión de genes con el tratamiento que hicimos con H_2O_2 . La respuesta mediada por HIF, que pueden desencadenar las especies reactivas de oxígeno, pudo haber inducido cambios en la transcripción, como se ha discutido anteriormente. Entre la amplia variedad de genes blanco de los factores HIF se pudieron haber activado algunos remodeladores de cromatina, lo cual pudiera haber provocado cambios en ciertas regiones del DNA. Los cambios epigenéticos también pudieran haberse inducido por la alteración en el estado *redox* de algunas enzimas y proteínas asociadas a remodelación de cromatina, lo cual tampoco es una posibilidad remota, ya que, como se ha discutido a lo largo de este trabajo, muchas de estas proteínas detectan los cambios en las concentraciones de oxígeno y modulan su actividad de esta forma.

En defensa de estos argumentos, es importante mencionar que existe un trabajo en el que se induce estrés por hipoxia en MEFs y en células de hepatoma humanas; los resultados más notables de este experimento indican que hay una represión global de la síntesis de RNA total y de mRNA, además de haber cambios drásticos globales en los patrones de modificaciones en las histonas⁵³. Dado que la respuesta a hipoxia se puede inducir a través de las especies reactivas de oxígeno y que la hipoxia puede inducir cambios epigenéticos globales a nivel de histonas, como demuestran en este trabajo, queda la posibilidad abierta de que el estrés oxidativo pueda producir modificaciones epigenéticas.

CONCLUSIONES

- El modelo que utilizamos para inducir los cambios epigenéticos por estrés oxidativo pudiera ser útil, haciendo algunas modificaciones, pues la manipulación de las células es sencilla y el tratamiento con H_2O_2 también es muy simple.
- No tenemos ninguna evidencia directa de que el tratamiento que hicimos con H_2O_2 realmente haya provocado estrés oxidativo, pues nosotros no medimos ningún indicador de este fenómeno.

- No se detectaron cambios morfológicos, ni transcripcionales en los genes que se analizaron, después del tratamiento hecho en los MEFs, mas por varias razones ya discutidas, no se descarta la posibilidad de que los cambios hayan ocurrido a otro nivel y que por las condiciones del experimento, no lo pudimos detectar.

REFERENCIAS

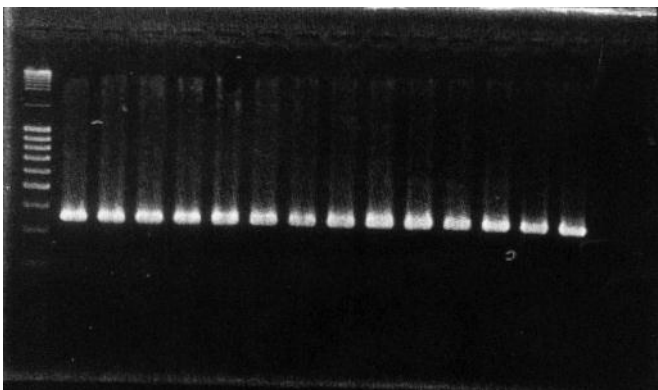
1. Hitchler, M.J. & Domann, F.E. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* **43**, 1023-36 (2007).
2. Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J. & Orkin, S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* **132**, 1049-61 (2008).
3. Gurdon, J.B. & Melton, D.A. Nuclear reprogramming in cells. *Science* **322**, 1811-5 (2008).
4. Campos, E.I. & Reinberg, D. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* **43**, 559-99 (2009).
5. Allis, C.D., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*, x, 502 p. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2007).
6. Hebbes, T.R., Clayton, A.L., Thorne, A.W. & Crane-Robinson, C. Core histone hyperacetylation co-maps with generalized DNase I sensitivity in the chicken beta-globin chromosomal domain. *EMBO J* **13**, 1823-30 (1994).
7. Braunstein, M., Rose, A.B., Holmes, S.G., Allis, C.D. & Broach, J.R. Transcriptional silencing in yeast is associated with reduced nucleosome acetylation. *Genes Dev* **7**, 592-604 (1993).
8. Schones, D.E. & Zhao, K. Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet* **9**, 179-91 (2008).
9. Mikkelsen, T.S. et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**, 553-60 (2007).
10. Bernstein, B.E. et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* **125**, 315-26 (2006).
11. Koch, C.M. et al. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* **17**, 691-707 (2007).
12. Heintzman, N.D. et al. Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* **39**, 311-8 (2007).
13. Hochedlinger, K. & Plath, K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* **136**, 509-23 (2009).
14. Reik, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**, 425-32 (2007).
15. Boyer, L.A. et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**, 349-53 (2006).
16. Lee, T.I. et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301-13 (2006).
17. Sasaki, H. & Matsui, Y. Epigenetic events in mammalian germ-cell development: reprogramming and beyond. *Nat Rev Genet* **9**, 129-40 (2008).
18. Briggs, R. & King, T.J. Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **38**, 455-63 (1952).
19. Gurdon, J.B., Elsdale, T.R. & Fischberg, M. Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature* **182**, 64-5 (1958).
20. Gurdon, J.B. & Uehlinger, V. "Fertile" intestine nuclei. *Nature* **210**, 1240-1 (1966).
21. Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* **441**, 1061-7 (2006).
22. Jaenisch, R. & Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **132**, 567-82 (2008).

23. Boiani, M. et al. Variable reprogramming of the pluripotent stem cell marker Oct4 in mouse clones: distinct developmental potentials in different culture environments. *Stem Cells* **23**, 1089-104 (2005).
24. Bortvin, A. et al. Incomplete reactivation of Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* **130**, 1673-80 (2003).
25. Dean, W. et al. Conservation of methylation reprogramming in mammalian development: aberrant reprogramming in cloned embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13734-8 (2001).
26. Do, J.T. & Scholer, H.R. Nuclei of embryonic stem cells reprogram somatic cells. *Stem Cells* **22**, 941-9 (2004).
27. Hansis, C., Barreto, G., Maltry, N. & Niehrs, C. Nuclear reprogramming of human somatic cells by xenopus egg extract requires BRG1. *Curr Biol* **14**, 1475-80 (2004).
28. Bru, T. et al. Rapid induction of pluripotency genes after exposure of human somatic cells to mouse ES cell extracts. *Exp Cell Res* **314**, 2634-42 (2008).
29. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-76 (2006).
30. Wernig, M. et al. In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature* **448**, 318-24 (2007).
31. Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* **448**, 313-7 (2007).
32. Maherali, N. et al. Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* **1**, 55-70 (2007).
33. Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **131**, 861-72 (2007).
34. Yu, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917-20 (2007).
35. Nakagawa, M. et al. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol* **26**, 101-6 (2008).
36. Lyssiotis, C.A. et al. Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8912-7 (2009).
37. Huangfu, D. et al. Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol* **26**, 1269-75 (2008).
38. Huangfu, D. et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol* **26**, 795-7 (2008).
39. Marson, A. et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* **3**, 132-5 (2008).
40. Shi, Y. et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic fibroblasts by Oct4 and Klf4 with small-molecule compounds. *Cell Stem Cell* **3**, 568-74 (2008).
41. Loh, Y.H., Ng, J.H. & Ng, H.H. Molecular framework underlying pluripotency. *Cell Cycle* **7**, 885-91 (2008).
42. Loh, Y.H. et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* **38**, 431-40 (2006).
43. Zhou, Q., Chipperfield, H., Melton, D.A. & Wong, W.H. A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16438-43 (2007).
44. Simon, M.C. & Keith, B. The role of oxygen availability in embryonic development and stem cell function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 285-96 (2008).
45. Fulco, M. et al. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell* **12**, 51-62 (2003).

46. Guo, Y. et al. Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells* **22**, 259-64 (2004).
47. Covello, K.L. et al. HIF-2alpha regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev* **20**, 557-70 (2006).
48. Iyer, N.V. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev* **12**, 149-62 (1998).
49. Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. Mitochondrial reactive oxygen species regulate hypoxic signaling. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 894-9 (2009).
50. Mansfield, K.D. et al. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF-alpha activation. *Cell Metab* **1**, 393-9 (2005).
51. Covarrubias, L., Hernandez-Garcia, D., Schnabel, D., Salas-Vidal, E. & Castro-Obregon, S. Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev Biol* **320**, 1-11 (2008).
52. Kang, J. et al. A general mechanism for transcription regulation by Oct1 and Oct4 in response to genotoxic and oxidative stress. *Genes Dev* **23**, 208-22 (2009).
53. Johnson, A.B., Denko, N. & Barton, M.C. Hypoxia induces a novel signature of chromatin modifications and global repression of transcription. *Mutat Res* **640**, 174-9 (2008).

Base de datos: UniProtKB/Swiss-Prot

ANEXOS



RT-PCR para HPRT para el cDNA obtenido a partir del RNA que se muestra en las figuras 10 y 11.



PCR a 40 ciclos para TH sobre el RNA que se muestra en las figuras 10 y 11. Este RNA fue utilizado para realizar todos los experimentos de la figura 12 y 13

a) Extracción de RNA de cultivos celulares con TRizol^{MR}

- a. Preparar previo a la extracción, SDS % con agua libre de RNasas y etanol 70% grado cultivo con agua libre de RNasas. Limpiar con estas soluciones la mesa de trabajo, las pipetas, cajas con puntas, etc. Es muy importante usar bata limpia, guantes nuevos, puntas nuevas o con filtro si es posible.
- b. Sacar la(s) caja(s) con las células de la incubadora. En la campana de flujo, aspirar el medio y lavar tres veces cada caja con 10mL de PBS 1X FRÍO, si es caja de 10cm de diámetro; si la caja es de 6cm de diámetro, se lava con 5mL cada vez.
- c. EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN: Retirar completamente el PBS de la primera caja. Para levantar las células del plato es de gran utilidad utilizar una espátula de

plástico nueva, estéril; se raspa la caja y las células se despegan. Luego, agregar 2mL de TRIzol por caja de 10cm; ó de 750µL-1000 µL por caja de 6cm. Pipetear hasta homogeneizar la suspensión. Si no se tiene una espátula, simplemente se agrega el TRIzol y pipeteando con fuerza es que se despegan las células. Separar la suspensión celular en alícuotas de 0.5mL y poner en tubos Eppendorff estériles de 1.5mL (previamente marcados). Mientras tanto las demás cajas se deben dejar en el PBS, sobre hielo. Se retira el PBS de la segunda caja, se repite el procedimiento y así hasta terminar con todas las cajas.

- d. Una vez terminando con todas las cajas, se incuban las muestras homogeneizadas durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- e. EN CAMPANA DE EXTRACCIÓN: Agregar al primer tubo 100 µL de cloroformo frío (se agregan 200 µL por cada 1 mL de TRIzol) y agitar vigorosamente (~10-15seg). Hacer tubo por tubo el mismo procedimiento. Al terminar con todos, incubar durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- f. Centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min.
- g. Se pueden distinguir tres fases: En la fase acuosa se encuentra el RNA, en la interfase se encuentra el DNA, proteínas, etc., y en la fase orgánica están los solventes. Nos interesa la fase acuosa en este caso, así que se pipetea con muchísimo cuidado de no tocar la interfase, de preferencia dejar 1mm de la fase acuosa para prevenir contaminación con productos de la interfase. Colocar individualmente en nuevos tubos Eppendorff de 1.5mL.
- h. Agregar a estos últimos tubos 500 µL de isopropanol frío. Agitar vigorosamente al momento de agregar el isopropanol. Dejar precipitando a temperatura ambiente, mínimo 10 minutos, pero puede dejarse incluso toda la noche.
- i. Centrifugar a 14 000 rpm a 4°C durante 15-30 minutos, 30 minutos si se espera poca cantidad de RNA.
- j. Decantar el sobrenadante con mucho cuidado de no perder la pastilla, e inmediatamente colocar sobre hielo. Agregar 1mL de etanol 75% con agua tratada con DEPC. Volver a centrifugar a 10 000 rpm por 10 min.

- k. Decantar el etanol y repetir el paso anterior. Abrir los tubos y dejar secar la pastilla, de preferencia dentro de una campana de flujo para prevenir contaminación. La pastilla no debe secarse demasiado porque después será difícil resuspender, pero es necesario que quede se evapore el etanol. También se pueden volver a centrifugar brevemente los tubos y pipetear el etanol restante.
- l. El mejor momento para resuspender en agua DEPC es cuando queda solo un pequeño menisco de solución. Se resuspende en un volumen adecuado, dependiendo del tamaño .de la pastilla para que no quede muy concentrado o muy diluido. Es recomendable hacer alícuotas de cada muestra.
- m. De preferencia cuantificar inmediatamente después.
- n. Si se va a utilizar el RNA dentro de las primeras 48 horas se puede guardar a -20°C . Si no se utiliza dentro de este tiempo es recomendable guardarlo de -30°C a -70°C .

b) Curvas de supervivencia con H_2O_2

Antes de empezar cualquier tratamiento con peróxido es muy importante asegurarse de cuál es la concentración real del *stock*, pues esta sustancia es muy reactiva y con el tiempo pierde actividad. Por eso también es importante, si es necesario diluir el peróxido, se tiene que hacer en el momento del tratamiento. Para medir la concentración de peróxido en el espectrofotómetro:

- a. Calibrar el espectrofotómetro para medir en una longitud de onda de 240nm (el peróxido absorbe en un rango de 200 a 400nm).
- b. Hacer en el momento una dilución $\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$, 1:1000 y poner en una celda de cuarzo para este volumen.
- c. Calcular la molaridad con la siguiente fórmula

$$[\text{M}] = (\text{Densidad óptica } 240\text{nm} \div 35.75\text{m}^{-1})(1000)$$

Esta fórmula se basa en el coeficiente de extinción molar

$\epsilon = \text{Densidad óptica} \div \text{concentración}$

Una vez habiendo calculado la concentración real del stock de peróxido, se hacen las diluciones correspondientes si es necesario para el tratamiento.

- a. Cambiar el medio antes del tratamiento con H₂O₂.
- b. Agregar la concentración deseada de H₂O₂ al medio e incubar a 37°C de nuevo.
- c. Después de que pasa el tiempo que hemos determinado para medir la viabilidad, se aspira el medio con una pipeta y se vacía en un tubo Falcon de 15mL (El contenido de las cajas con la misma concentración se puede manejar en el mismo tubo simultáneamente).
- d. Lavar una vez con PBS 1X.
- e. Agregar 0.5mL de tripsina 0.25% e incubar a 37°C por tres minutos.
- f. Inactivar la tripsina con el mismo medio que se removi6. Resuspender con la pipeta y centrifugar a 1300 rpm por 5 minutos.
- g. Aspirar cuidadosamente el medio.
- h. Resuspender la pastilla en 50 μ L de azul de tripano al 10%
- i. Colocar 10 μ L de esta suspensión en cada lado de la cámara de *Neubauer*. Contar el número de células muertas (se tiñen de azul) y vivas. Sacar el porcentaje de vivas vs. muertas.

c) Información de los genes analizados, según la base de datos Swiss-Prot

Cripto o *Tdgf1* (*Theratocarcinoma-derived growth factor*): es un factor de crecimiento que se utiliza como uno de los marcadores de pluripotencia. Su función según las bases de datos, podría ser la determinación de las células del epiblasto que después dan origen al mesodermo. Se expresa previo al inicio de la gastrulación y durante la gastrulación se

expresa en el mesodermo que se está formando. Después se expresa en bajos niveles en algunos órganos del adulto. Una de sus modificaciones post traduccionales son los puentes disulfuro, pues tiene un dominio EGF con 6 cisteínas; el estado redox puede regular la actividad de este factor de crecimiento.

En la base de datos UniProtKB/Swiss-Prot (número de acceso P51865) se tiene registrado que este factor de crecimiento está implicado en la proliferación de fibroblastos.

ERas (ES-cell expressed Ras): Este marcador de pluripotencia es una pequeña proteína con actividad de GTPasa, que da a las células ES las características de crecimiento similar a tumores.

Fgf7 (fibroblast growth factor 7): Es un factor de crecimiento que está activo en los keratinocitos y según las bases de datos parece ser el mayor efector parácrino de la proliferación celular epitelial.

Hoxd10 (Homeobox protein HOX-D10): Este factor de transcripción provee a las células de identidad posicional en el eje antero-posterior, durante el desarrollo embrionario.

Nanog (Homeobox protein NANOG): Es un regulador transcripcional implicado en la proliferación y autorrenovación de las células de la masa celular interna y de las células troncales embrionarias. Mantiene la pluripotencia de las células ES e impide su diferenciación.

Oct4 (Octamer binding transcription factor 3) ó Pou5f1 (POU domain, class5, transcription factor 1): Se expresa en células troncales totipotentes y pluripotentes en el embrión antes de la gastrulación. Ausente en tejidos adultos. Forma un complejo trimérico con *Sox2* en el DNA y controla la expresión de genes del desarrollo. Crítico para la embriogénesis temprana y para la pluripotencia de las células ES.

Rassf1 (Ras association domain-containing protein 1): Es un supresor de tumores. Se requiere para la apoptosis mediada por receptor. Inhibe la proliferación regulando negativamente la progresión del ciclo celular a nivel de la transición G1/S, regulando la acumulación de la ciclina D1. En algunos cánceres existe inactivación epigenética de *Rassf1*.

Trib2 (*Tribbles* homolog 2): Esta proteína pertenece a la superfamilia de las proteínas cinasas. Interacciona con MAPK cinasas y regula la activación de MAP cinasas, mas no tiene actividad cinasa.

Sox2: Otro marcador de pluripotencia que es crítico para la embriogénesis temprana y para el mantenimiento de la pluripotencia de las células ES. Como se ha mencionado interacciona con Oct4, regulando la expresión de genes del desarrollo.