

DEPARTAMENT OBSTETRÍCIA I GINECOLOGIA

IDENTIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y AISLAMIENTO  
DE CÉLULAS MADRE SOMÁTICAS DEL ENDOMETRIO  
MURINO Y HUMANO

IRENE CERVELLÓ ALCARAZ

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2009

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 18 de novembre de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Antonio Pellicer Martínez
- D. Xavier Matias-Guiu Guía
- D. Francisco Gaytán Luna
- D. Felipe Prosper Cardoso
- D. José Enrique O'Connor Blasco

Va ser dirigida per:

D. Carlos Simón Vallés

©Copyright: Servei de Publicacions  
Irene Cervelló Alcaraz

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7446-7

D.L.:V-1337-2009

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

# VNIVERSITAT ID VALÈNCIA

Facultad de Medicina y Odontología

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología



## Identificación, caracterización y aislamiento de las células madre somáticas del endometrio murino y humano.

Tesis doctoral presentada por:

Irene Cervelló Alcaraz

Valencia, 2008



**Facultad de Medicina y Odontología**

**Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología**



**Identificación, caracterización y  
aislamiento de las células madre  
somáticas del endometrio murino y  
humano.**

**Tesis doctoral presentada por:**

Irene Cervelló Alcaraz

Valencia, 2008





D. Carlos Simón Vallés, Catedrático en Ginecología, Doctor en Medicina y Cirugía y Profesor Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: *Identificación, caracterización y aislamiento de las células madre somáticas del endometrio murino y humano* ha sido realizado íntegramente por Dña. Irene Cervelló Alcaraz bajo mi dirección. Dicha memoria está concluida y reúne todos los requisitos para su presentación y defensa como TESIS DOCTORAL ante un tribunal.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firmo la presente certificación en Valencia a 18 de Junio de 2008.

Fdo. Carlos Simón Vallés



## **AGRADECIMIENTOS**

Desde estas líneas (que siempre me parecerán demasiado poco) me gustaría agradecer a todas y cada una de las personas que han hecho posible que esta tesis saliera adelante y que, por supuesto han estado a mi lado de una manera u otra a lo largo de estos años:

Al doctor Simón, mi director de tesis. Mi brújula a lo largo de estos años, mi aliento en cada una de las etapas. Gracias sobre todo por ser un compañero y amigo siempre. Gracias por confiar en mí desde el principio.

A los doctores Pellicer y Remohí por permitirme realizar esta tesis doctoral en las instalaciones del Instituto Valenciano de Infertilidad.

A todos aquellos miembros del IVI y Equipo IVI que, en mayor o menor medida, han ayudado a la elaboración de esta tesis proporcionando muestras o apoyo técnico. A las chicas del laboratorio de DPI por dejarnos su microscopio de fluorescencia en los inicios de este trabajo.

A mi fiel amiga Ana, por enseñarme a no borrar la sonrisa nunca. Por ser mi espejo tantas veces. Por ser mi hada madrina. Por que sigamos siendo amigas toda la vida.

A mi amiga Iruka por preocuparse por mí desde siempre. Por ser como una hermana.

Muchísimas gracias a las dos por estar ahí durante todos estos años.

A mis amigos de siempre, José, Nacho, María Granell, María Fernández, Rubén y Nieves, Chantal, Quino, Sonia, Elisa, Vicente, porque siempre habéis estado a mi lado aún sin entender lo que hacía.

A mis nuevos amigos Ramón y Sandra, y su familia, por nuestra bonita amistad. Por todo lo que nos queda por disfrutar.



A José Enrique O'Connor por su amabilidad y apoyo; y a las personas que trabajan con él, muy especialmente a Alicia y Domingo. Gracias por hacer más amenos tantos ratos en el Sorter, gracias porque siempre he encontrado complicidad en vosotros.

A los miembros del Hospital Universitario Dr. Peset, por facilitarme el acceso a las instalaciones y la recogida de muestras. Especialmente al Servicio de Ginecología y al de Anatomía Patológica. Muy especialmente a Patricia Cañete y Marien.

A mis compañeros del Príncipe Felipe, a todos ellos...Marcia, Eva, José, José Vicente, Sonia, Vero, Diana, Maria Eugenia. Pero sobre todo a mis princesas preferidas, Eva y Amparo. A Eva por su vitalidad contagiante y por todas esas pequeñas cosas que nos unen. A Amparo por su alegría constante y esa confianza que he encontrado en tí siempre. Por ser las dos de las mejores personas que conozco.

A Inma Noguera, veterinaria de la Facultad de Medicina, por su cercanía y ayuda con el manejo y cuidado de los animales. Gracias.

A mis compañeros de la Fundación IVI, Sebas y Alicia (mucho más que mis técnicos preferidos), a la nueva generación Patri, Paquillo y Támara, a mi querido Jaime, a mi nuevo colaborador Ismael, a Carmen, Isa, Marcos, Raúl, y muy especialmente a Paco, por esa gran dosis de imaginación y musicalidad que has aportado a mi vida profesional durante estos años. Gracias también a los que ya no estáis como Marco, Isabel (IVI Chile), Mónica, Fran, M<sup>a</sup> Carmen. Gracias a mis adorables vecinos de DGP, Mila, Alicia y muy especialmente a Julio.

A José Antonio, un pequeño gran hombre. Sin ti nada habría tenido sentido. Gran parte de este trabajo es tuya.

A Josón, un gran hombre pequeño. La palabra GRACIAS se queda pequeña. Querido amigo yo también te devuelvo la canica. Me llevo un gran amigo.

A Anita, mi amiga. Mi apoyo. Mi sosiego. Mi gran ejemplo. Siempre que he buscado una mirada cómplice, una sonrisa amiga siempre en ti la he encontrado. Gracias, solo por esto vale la pena todo.

A toda mi familia, la cercana y la lejana, la política y la heredada. Gracias.

A mi hermana Silvia, por estar ahí siempre. Por ser mi hermana mayor. Por ser tú misma. Porque te querré siempre.

A mi padre, por ser un ejemplo a seguir. Por inculcarme su amor por la medicina y la ciencia.

A mi madre, por tu ejemplo de trabajo y superación. Por tu apoyo incondicional siempre. Te quiero.

Y finalmente a los tres soles que iluminan mi vida:

A mi abu Sole, por dejarme verte envejecer, gracias.

A Héctor por entenderme, cuidarme y quererme con tantísimo amor desde hace diez años, gracias.

A mi enano Toto por nacer al mismo tiempo que esta tesis y por permitirme llevarla a cabo sin sentir en ningún momento que era demasiado trabajo, gracias.



El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en parte en los laboratorios de la Fundación IVI, así como en los laboratorios del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, y también en las dependencias del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia, gracias a la ayuda de una beca predoctoral para la realización de Tesis doctorales de la Fundación IVI-Valencia así como una ayuda Torres Quevedo concedida por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.



## Lista de Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico  
ADNc: cadena complementaria de ácido desoxirribonucleico  
ARN: ácido ribonucleico  
ARNm: ácido ribonucleico mensajero  
BMP: Proteína morfogénica del hueso/*Bone Morphogenetic Protein*  
C: citosina  
CFU: células formadoras de colonias/ *colony-forming cell*  
DEPC: dietil pirocarbonato  
FITC: isotiocionato de fluoresceína  
FSK: células fibroblásticas de prepucio/ *foreskin*  
G: guanina  
GAPDH: gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenada  
H3: histona H3  
HCl: ácido clorhídrico  
Células NK: *natural killer cells*  
Cepa NOD/SCID/ $\gamma$ c<sup>null</sup>: cepa de ratón inmunodeprimido  
PBS: *phosphate buffered saline* (tampón salino fosfato)  
PDGF-R $\beta$ : *epidermal growth factor receptor beta*  
PE: ficoeritrina  
PTEN: gen supresor de tumores  
p/v: peso/volumen  
SP: *side population*  
SSC: solución de hibridación acuosa  
Células TA: Células de amplificación transitoria/ *Transit Amplifying cells*  
TGF $\beta$ : *Transforming Growth Factor beta*  
TGF $\beta$  2-3: *Transforming Growth Factor beta 2-3*  
TRITC: *tetramethyl rhodamine iso-thiocyanate*  
v/v: volumen/volumen



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>5</b>
1. Células madre.....	7
1.1 Definición.....	7
1.2 Tipos y clasificación.....	7
1.2.1 Células madre embrionarias .....	8
1.2.2 Células madre germinales.....	9
1.2.3 Células madre de teratocarcinomas.....	10
1.2.4 Células madre somáticas .....	11
2. Células madre somáticas en el endometrio humano.....	18
2.1 El endometrio humano .....	18
2.2 El ciclo menstrual .....	20
2.3 Evidencias indirectas sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano.....	21
<b>II.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>27</b>
<b>III.- OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
1. Diseño experimental.....	37
1.1 Modelo animal.....	37
1.2 Modelo humano.....	37
2. Modelo Animal.....	38
2.1 Elaboración de un modelo animal .....	38
2.2 Caracterización inmunohistoquímica.....	41
2.2.1 Detección de las células que retienen BrdU en los tejidos candidatos por inmunohistoquímica .....	42
2.2.2 Doble inmunofluorescencia de los tejidos candidatos.....	43
2.2.3 Controles.....	44
2.2.4 Análisis de imagen.....	45
2.3 Caracterización a nivel de ácidos nucleicos .....	46
2.3.1 Aislamiento de ARN.....	46



2.3.2	Controles y tejidos problema.....	47
2.3.3	Retrotranscripción.....	48
2.3.4	Reacción en cadena de la polimerasa.....	48
3.	Modelo Humano.....	53
3.1	Pacientes y Tejidos.....	53
3.2	Aislamiento de la Side Population (SP).....	55
3.2.1	Obtención de células epiteliales y estromales aisladas del endometrio humano.....	55
3.2.2	Citometría de flujo.....	56
3.2.3	Viabilidad y pureza celular.....	60
3.2.4	Tinción con Hoechst.....	62
3.2.5	Aislamiento de las células SP.....	62
3.3	Caracterización de ácidos nucleicos de la SP.....	64
3.3.1	Aislamiento de ARN.....	64
3.3.2	Retrotranscripción.....	64
3.3.3	Reacción en cadena de la polimerasa.....	65
3.4	Detección de la Actividad Telomerasa.....	67
3.5	Caracterización fenotípica del endometrio humano.....	69
3.5.1	Fenotipado del endometrio con marcadores de células madre hematopoyéticas y mesenquimales.....	69
3.5.2	Fenotipado de la SP con marcadores de células madre hematopoyéticas y mesenquimales.....	71
3.6	Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	72
<b>V.-</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>75</b>
1.	Identificación, caracterización y co-localización de células madre somáticas en el endometrio murino.....	77
1.1	Localización de células que retienen BrdU en el endometrio murino.....	77
1.2	Co-localización de células BrdU+ con el marcador de indiferenciación c-KIT a nivel de proteína y de ARNm.....	79
1.3	Co-localización de células BrdU+ con el marcador de indiferenciación POU5F1 a nivel de proteína y de ARNm.....	83

2. Identificación, aislamiento y caracterización de candidatas a células madre somáticas en el endometrio humano .....	87
2.1 Viabilidad y pureza celular .....	87
2.2 Presencia y aislamiento de células SP en el endometrio humano .....	90
2.3 Análisis de correlación entre SP y la edad de la paciente ...	91
2.4 Presencia de células indiferenciadas en la región SP en el endometrio humano .....	92
2.5 Detección de la actividad telomerasa en células SP del endometrio humano .....	93
2.6 Origen de las células indiferenciadas del endometrio humano .....	95
<b>VI.- DISCUSIÓN.....</b>	<b>99</b>
<b>VII.- CONCLUSIONES.....</b>	<b>115</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>119</b>



# I. INTRODUCCIÓN



## I.- INTRODUCCIÓN

### 1.- CÉLULAS MADRE

En los últimos años la Medicina y la Biología han experimentado grandes avances. Uno de los más recientes se ha denominado Medicina Regenerativa (Robey, 2000) y está basado principalmente en el conocimiento y uso terapéutico de las células madre con la finalidad de regenerar tejidos u órganos dañados y, de este modo, poder tratar enfermedades crónico-degenerativas.

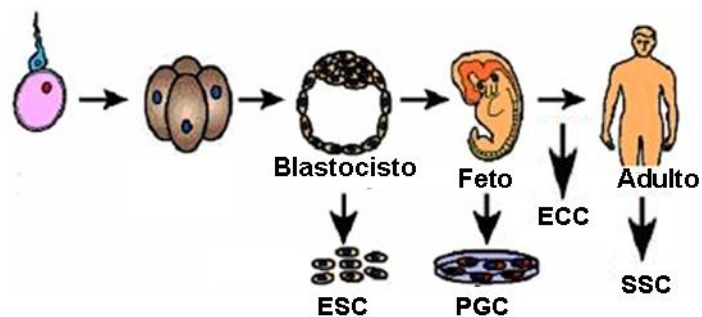
#### 1.1 Definición de célula madre.

Según Alberts y cols. 1994 *“una célula madre es toda aquella que no está totalmente diferenciada, tiene capacidad de división ilimitada y cuando se divide, cada célula puede permanecer como célula madre o puede iniciar una vía que conduce de forma irreversible a su diferenciación terminal”*.

#### 1.2 Tipos de células madre y clasificación.

A lo largo del desarrollo ontogénico, podemos identificar y aislar distintos tipos de células madre. Atendiendo a su origen, las células madre pueden dividirse en cuatro grupos, tal y como se muestra en la figura 1:

**Figura 1.** Desarrollo ontogénico y tipos de células madre, ESC=células madre embrionarias, PGC=células madre primordiales, ECC=células madre de teratocarcinomas, SSC=células madre somáticas.



### 1.2.1 Células madre embrionarias.

Las células madre embrionarias humanas, aisladas por primera vez en 1998 (Thomson y Marshall, 1998) proceden de la masa celular interna del embrión en estado de blastocisto, y poseen una elevada capacidad de auto-renovación e indiferenciación. Sin embargo, tienen problemas legales y éticos derivados de su origen. Debido a su procedencia, estas células se denominaron células madre embrionarias ó ESC, del inglés “*Embryonic stem cells*”.

Según Marshall y cols. (2001) y Smith (2001) las características que definen las ESC son las siguientes:

- Proceder de la masa celular interna de embriones en estado de blastocisto o mórula.
- Tener capacidad de división asimétrica ilimitada, y mantenerse indiferenciadas en las condiciones de cultivo *in vitro* adecuadas.
- Presentar cariotipo normal y que este permanezca estable.
- Ser capaces de diferenciarse a derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo, endodermo y también células germinales (gametos). Por lo tanto tener capacidad pluripotente, lo que las convierte en un tipo celular único.
- Cuando se transplantan durante el desarrollo embrionario murino, poseen la capacidad de integrarse en todos los tejidos fetales dando lugar a quimeras.
- Tener la capacidad para colonizar la línea germinal dando lugar a ovocitos y espermatozoides.
- Presentar expresión de marcadores de indiferenciación, entre ellos el factor de transcripción Oct-4, que regula gran número de genes y mantiene las células embrionarias en estado de proliferación e indiferenciación.
- Poder inducir su proliferación o diferenciación bajo condiciones *in vitro*.

### 1.2.2 Células madre germinales.

Se obtienen de la cresta gonadal de embriones humanos de 5-9 semanas de gestación y son las precursoras de los gametos. Las células madre germinales o "*primordial germ cells*" (PGC) tienen propiedades bioquímicas, morfológicas, inmunológicas y de desarrollo comunes a las células madre embrionarias ya que son pluripotentes y contribuyen a la formación de la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos dando lugar a animales quiméricos (Matsui y cols., 1992; Stewart y cols., 1994). Asimismo, pueden diferenciarse a cuerpos embrioides y formar teratomas *in vivo*. No obstante, existen diferencias a nivel del patrón de metilación de estos tipos celulares ya que la secuencia de ADN se mantiene inalterada pero su capacidad de expresión se ve modificada. Dichas diferencias podrían reflejar los cambios en el programa de desarrollo de las PGC *versus* las ESC. A pesar de ello, la existencia de este patrón de metilación génica no parece afectar a la capacidad de estas células para contribuir al desarrollo de la línea germinal en quimeras (Sato y cols., 2003).

Existe una gran variabilidad en la expresión de los genes sujetos a *imprinting* o mecanismo de regulación génica donde los genes pueden modificar su funcionamiento sin necesidad de un cambio en la secuencia del ADN en las líneas de células germinales primordiales, ya que en algunos de los descendientes de ratones quiméricos resultantes de la inyección de estas células, se puede ver que los genes de las PGC se transmiten de forma normal, mientras que en otros casos, los animales descendientes presentan anomalías a nivel de crecimiento y de la estructura ósea.

Aunque la mayor parte de los estudios se han realizado en ratón (Matsui y cols., 1992), cada vez existe un mayor interés en la obtención de PGC humanas (Shamblott y cols., 1998; 2001).



### 1.2.3 Células madre de teratocarcinomas.

Los teratocarcinomas son tumores que aparecen en las gónadas de algunas cepas de ratones consanguíneos o tras depositar derivados celulares del embrión bajo la cápsula suprarrenal de ratones inmunodeficientes (Anderson y cols., 1996). Estos tumores están constituidos por una amalgama de tejidos somáticos yuxtapuestos de manera desorganizada. Derivan de células germinales, son pluripotentes y por ello pueden dar lugar a los múltiples tipos celulares encontrados (Kleinsmith y Pierce, 1964; Stevens, 1984).

Las primeras líneas de células madre aisladas a partir de teratocarcinomas se obtuvieron en los años setenta (Kahan y Ephrussi., 1970; Jakob y cols., 1973; Gearhart y Mintz, 1974; Nicolas y cols., 1976).

Las células madre de los teratocarcinomas conservan su capacidad de diferenciación, produciendo derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo (Nicolas y cols., 1976). Sus características se recogen en la Tabla I.

CARACTERÍSTICAS	BIBLIOGRAFÍA
Capacidad de participar en el desarrollo embrionario dando lugar a quimeras.	Mintz y Illmensee, 1975.
Pérdida de la capacidad de diferenciación en cultivo.	Bernstine y cols., 1973.
Aparición de aberraciones cromosómicas.	Papaioannou y cols., 1975.
Diferenciación <i>in vitro</i> solo en condiciones especiales o empleando inductores químicos.	McBurney y cols., 1982; Nicolas y cols., 1975.
Para mantener el estado indiferenciado necesitan del cultivo sobre <i>feeders</i> .	Martin y Evans., 1974.

**Tabla I.** Propiedades de las células madre de teratocarcinomas embrionarios.

Además estas células madre conservan su capacidad de contribución al desarrollo embrionario y tras microinyectarlas en la masa celular interna de blastocistos de ratón, dan lugar a animales quiméricos viables y fértiles (Mintz y Illmensee, 1975). Sin embargo, las células madre de teratocarcinomas embrionarios no conservan la misma capacidad pluripotente de las células embrionarias tempranas y sufren cambios durante su transición *in vivo* al estado tumoral (Andrews, 2002).

#### **1.2.4 Células madre somáticas.**

En la mayoría de los tejidos de individuos adultos, existen pequeñas poblaciones de células indiferenciadas que poseen la capacidad de diferenciarse a tipos celulares maduros, dividiéndose a su vez para mantener el balance necesario de células progenitoras indiferenciadas (Fuchs y Segre, 2000). Dichas poblaciones de células madre se mantienen a lo largo de la vida del individuo y reciben el nombre de células madre somáticas.

La identificación y caracterización de estas células madre es uno de los mayores retos científicos que existen hoy en día debido al bajo número de células candidatas existentes en los tejidos residentes y a la falta de marcadores de superficie definitorios que permitan su aislamiento para su posterior estudio.

Las células madre somáticas, desempeñan un papel esencial en el organismo, no sólo por su contribución en la formación de órganos y tejidos, sino sobre todo, por encargarse del mantenimiento y renovación de los mismos durante todo el proceso del desarrollo ontogénico (Firulli y Olson, 1997; Orkin, 1998; Edlund y Jessell, 1999).

Estas células ya han sido descritas en multitud de tejidos. Aunque se pensaba que sólo generaban células características del tejido en el que residen o de otros con el mismo origen embrionario, algunos autores han descrito el fenómeno de transdiferenciación (Jiang y cols., 2002; Poulsom y cols., 2001; Mezey y cols., 2003). Dicho fenómeno consiste en que determinadas

poblaciones de células madre somáticas son capaces de dar lugar a células de otro tipo de tejido distinto del que proceden, en función del micro ambiente que las rodea, es decir, poseen una plasticidad mayor de la esperada (Reyes y Verfaillie, 2001).

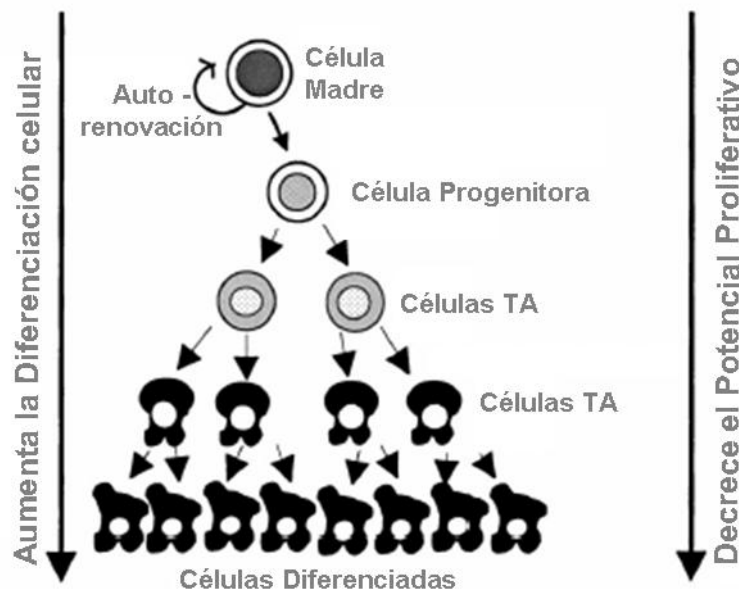
### ***Definiciones y conceptos.***

Las células madre somáticas son células indiferenciadas que se encuentran presentes en muchos órganos y tejidos adultos. Su singularidad, escasez y la falta tanto de características morfológicas distintivas como marcadores específicos hacen que su identificación y localización sean muy complejas en la mayoría de los tejidos estudiados. Gran parte de las células madre somáticas son definidas por sus propiedades funcionales, entre las cuales se incluye el alto potencial de proliferación, la importante capacidad reparadora y la capacidad para diferenciarse hacia las estirpes celulares de las que provienen e incluso hacia otras distintas (Weissman, 2002; Potten y Loeffler, 1990; Eckfeldt y cols., 2005).

La propiedad de auto-renovación de estas células madre o la capacidad de producir células hijas idénticas a sí mismas es esencial para mantener la reserva de células madre en los tejidos adultos. La división celular asimétrica es el mecanismo llevado a cabo por estas células somáticas para producir por un lado una célula hija idéntica a sí mismas y, por otro lado una célula hija diferenciada (figura 2). Al mismo tiempo las células madre también sufren divisiones simétricas desde las llamadas progenitoras, produciendo dos células hijas o dos células progenitoras de amplificación transitoria (*transit amplifying cells*, TA) (Gargett, 2006). A continuación vendría la diferenciación, que se define como el cambio en el fenotipo celular debido a la expresión de diferentes genes asociados normalmente con la función de la célula a partir de la cuál se dividieron.

Las células madre exhiben un amplio rango de potencial de diferenciación. Las células madre embrionarias son pluripotenciales y tienen capacidad de diferenciación a todos los tipos celulares provenientes de las tres

hojas embrionarias (ectodermo, endodermo y mesodermo). La capacidad de diferenciación de estas células se ve disminuida a medida que aumenta el desarrollo embrionario. Finalmente, entre la descendencia se encontrarán células madre multipotentes o células madre somáticas que se diferencian en un gran número de linajes celulares y producen los tipos celulares de los tejidos en los que se encuentran. Las células madre hematopoyéticas de médula ósea (encargadas de la formación de la sangre) son uno de los ejemplos más conocidos de este tipo celular somático y además son empleadas en aplicaciones clínicas desde hace tiempo.



**Figura 2.** Esquema de la jerarquía de la diferenciación de las células madre. Las células madre son capaces de auto-renovarse y de diferenciarse a células progenitoras comprometidas. Estas proliferan y dan lugar a células de amplificación transitoria, las cuales darán lugar finalmente a células diferenciadas y funcionales sin capacidad de proliferación.

Los estudios más recientes sugieren que el dogma de la diferenciación jerárquica de las células madre y de sus progenitoras sea cada día más flexible de lo que se ha expuesto anteriormente. Como ocurre en el caso del tejido

epidérmico; las células madre somáticas epidérmicas, las células TA de este tejido y las células diferenciadas de este tejido, los queratinocitos, tienen todos la capacidad de regenerar completamente la epidermis estratificada junto con la apropiada expresión de marcadores de diferenciación en el espacio y en el tiempo (Li y cols., 2004). Otro caso es el de las células madre hematopoyéticas, cuyas células madre somáticas y su progenie tienen capacidad de auto-renovación y diferenciación continua dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren y del micro ambiente que les rodee (Quesenberry y cols., 2005).

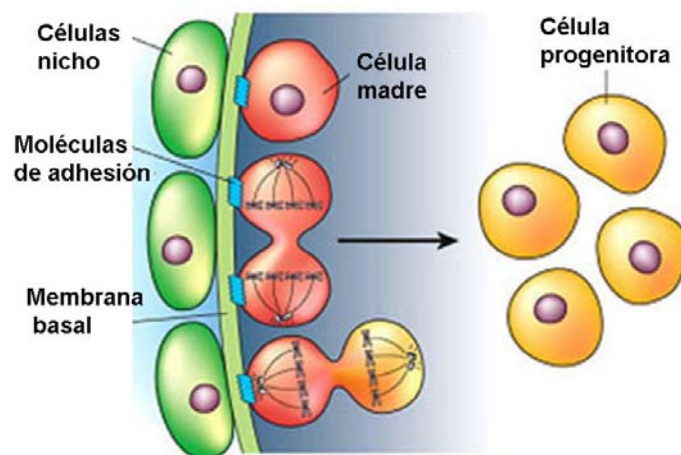
### **Concepto de nicho.**

En 1978 Schofield fue el primero en proponer que las células madre eran reguladas en función del micro ambiente fisiológico en el que se encontraban, a este lugar tan excepcional lo llamó nicho (Schofield, 1978). La mayoría de los trabajos actuales sobre los nichos de células madre somáticas han sido obtenidos a través de estudios en modelos animales, como en el caso de los testículos de *Caenorhabditis elegans* y de los ovarios de *Drosophila melanogaster*, donde la localización de cada célula ha sido minuciosamente estudiada (Ohlstein y cols., 2004). Lejos está la localización tan precisa en el caso de los mamíferos ya que se trata de organismos mucho más complejos. Aún así existen características comunes entre las particularidades del nicho de células madre en *Drosophila* y en los mamíferos adultos, entre las que se incluye la localización exacta de las células madre en estrecha relación con una o más células diferenciadas que se encuentran circundando la región candidata; y que junto a la matriz extracelular y a varias moléculas secretadas dan lugar a un micro ambiente adecuado para regular las funciones claves de las células madre somáticas. Las características moleculares existentes en este nicho micro ambiental afectan a las propiedades intrínsecas de las células madre somáticas residentes que regulan la proliferación y el destino celular (Eckfeldt y cols., 2005).

Los nichos tienen diferentes características en función de la composición celular, la estructura y la localización de las células madre en los diferentes

tejidos adultos. En la actualidad, se ha identificado y caracterizado el nicho de las células madre epidérmicas en la región bulbar del folículo piloso (Fuchs y cols., 2004), también se ha descrito este nicho en el intestino delgado situándose en este caso en las células epiteliales de las criptas glandulares (Booth y Potten, 2000). Las moléculas de adhesión junto con las células del nicho anclan a las células madre somáticas a sus alrededor durante los periodos de inactividad de estas células y, dirigen la división asimétrica de las células madre somáticas seguida de la proliferación y diferenciación de estas en el momento y lugar que se precise. Entre las moléculas de adhesión descritas que juegan un papel esencial en el nicho de las células madre se encuentran las cadherinas que median en las interacciones adhesivas entre el nicho y las células madre (figura 3), y las integrinas, las cuales interactúan con la matriz extracelular (Wilson y Trumpp, 2006).

**Figura 3.** Representación del nicho de células madre somáticas. Las células nicho dirigen vía señalización celular el futuro de las células madre somáticas a través del inicio y/o bloqueo de la diferenciación celular y de la regulación de los ciclos celulares.



Los nichos celulares mantienen a las células madre somáticas en un estado quiescente (en la fase de reposo del ciclo celular conocida como  $G_0$ ) a través de micro ambientes moleculares de señalización inhibitorios frente a la división y a la diferenciación celular, entre los cuales a menudo están implicados el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF $\beta$ ) y miembros de la familia de la proteína morfogenética del hueso BMP (Li y Xie, 2005).

Uno de los papeles más importante del nicho celular es detectar la necesidad del re-emplazamiento celular, y transmitir las señales hacia las

células residentes para que estas puedan alcanzar el destino celular final mediante la proliferación celular.

### ***Plasticidad de las células madre somáticas.***

Se define la plasticidad celular como la capacidad de una célula madre somática de un tejido específico para generar un tipo celular especializado diferente al de su origen embrionario. Por lo tanto, para evaluar la plasticidad en condiciones experimentales deben cumplirse criterios básicos que incluyen: la capacidad de auto-renovación, la diferenciación morfológica y funcional hacia tipos celulares de su origen embrionario y por lo menos a un tipo celular de diferente linaje. La mayoría de los estudios sobre plasticidad de las células madre se han realizado en ratones y en minoría en células humanas.

Uno de los trabajos que demuestra la plasticidad de las células madre somáticas fue publicado en 2002 (Jiang y cols., 2002) donde a través de experimentos con poblaciones clonales de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea de ratón y rata, se identificó una subpoblación denominada células progenitoras multipotentes adultas (*Multipotent Adult Progenitor Cells*, MAPCs), que no solo se diferenciaron a células mesenquimales, sino también a células con características morfológicas y marcadores celulares típicos de células neuronales, endoteliales y endodérmicas. También en humanos se han identificado MAPCs que poseen la capacidad de diferenciarse a células hepáticas (Reyes y Verfaillie, 2001). El problema de estos trabajos es que son difícilmente repetibles por otros autores.

La transdiferenciación es la conversión de células de un tejido o linaje a células de otro linaje diferente, con consecuente pérdida de los marcadores de ese tejido específico y de su función celular, y por otro lado también adquisición de funciones y marcadores del nuevo tipo celular, sin que en este caso intervenga la división celular (Horwitz, 2002). Esto implica reprogramación de la maquinaria de transcripción nuclear de la célula y representa una forma de metaplasia o de alteración de los genes claves en el desarrollo (Reynolds y Rietze, 2005). La transdiferenciación puede ocurrir con o sin la intervención de

división celular (Tosh y cols., 2002). Se ha propuesto que esta conversión celular que implica de-diferenciación y re-diferenciación de las células pueda suceder gracias a la reprogramación nuclear tanto a nivel genético como epigenético.

Diferentes experimentos demostraron inicialmente que células procedentes de la médula ósea pueden incorporarse en el tejido dañado a través del torrente sanguíneo y dar lugar a células del músculo esquelético, neuronas y glía, hepatocitos, células endoteliales, células del miocardio, células epiteliales del intestino, piel y pulmón; mientras que por otro lado también se ha demostrado que células neuronales producen células de la sangre y células musculares esqueléticas (Blau y cols., 2001).

Sin embargo, este concepto de transdiferenciación ha sido ampliamente discutido y rechazado en muchos estudios por considerarse que se trata de un fenómeno de fusión celular (Álvarez-Dolado y cols., 2003). Se ha demostrado la fusión de células transplantadas con las células del huésped receptor (Liu y Rao, 2003). Se trata de un fenómeno infrecuente y puede ocurrir entre células y tejidos donde la poliploidía es un fenómeno biológico normal, como en los osteoclastos, miotúbulos, hepatocitos y placenta. No obstante, la fusión celular puede ser mal interpretada como transdiferenciación (Goodell, 2003; Cossu, 2004).

Finalmente la transdiferenciación como mecanismo de plasticidad debe de seguir siendo analizada a través de las herramientas y pruebas experimentales realizadas con rigor científico incluyendo un adecuado diseño experimental y la exclusión de la posibilidad de fusión celular en estos ensayos.

### ***Papel en la homeostasis, reparación y regeneración.***

Las células madre procedentes de órganos y tejidos adultos juegan un papel clave en la homeostasis celular ya que promueven por un lado el reemplazamiento celular en los tejidos altamente regenerativos y por otro lado la pérdida celular por apoptosis (Li y Xie, 2005; Snyder y Loring, 2005). La función



de las células madre somáticas está finamente regulada para asegurar el equilibrio adecuado entre el re-emplazamiento celular y la provisión de un número suficiente de células maduras diferenciadas para el mantenimiento de la función de tejidos y órganos, sin dar lugar a la formación de tumores. El balance entre la auto-renovación y la diferenciación es necesario encontrándose regulado por las células madre del nicho.

Es indiscutible que las células madre no sólo residen y tienen función en tejidos con excepcional capacidad regenerativa como la médula ósea, el intestino y la epidermis, con una constante producción de células diferenciadas para su adecuado mantenimiento; sino también se ha demostrado su existencia en tejidos de bajo remplazamiento celular como el tejido neural, el páncreas, la próstata o el hígado. En estos tejidos, la función de las células madre somáticas es mantener la homeostasis celular a través de la reorganización del tejido debido a pérdida de células por apoptosis (Clarke y Smith, 2005). Tras un daño o desgaste, normalmente las células madre somáticas quiescentes entran nuevamente en el ciclo celular produciendo células denominadas células TA, las cuáles sufren ciclos de proliferación y expansión rápidos que permiten reparar la pérdida de tejido con reposición de células funcionales y totalmente diferenciadas. En algunos casos, como el hígado y el páncreas, células totalmente diferenciadas tienen la capacidad de revertir y posteriormente proliferar hacia un fenotipo celular que pueda tener el mismo efecto de renovación en su tejido de origen (Dor y Melton, 2004).

## **2. CELULAS MADRE SOMÁTICAS EN EL ENDOMETRIO HUMANO**

### **2.1 El endometrio humano.**

El endometrio humano es un tejido muy dinámico que sufre cambios cíclicos específicos en respuesta a las hormonas ováricas circulantes. Desde el punto de vista histológico, el endometrio se divide en dos capas: la basal y la funcional. La funcional responde a la progesterona y el estradiol descamándose durante la menstruación. La basal no responde a las hormonas esteroideas y

no sufre descamación, regenerando el endometrio a partir de ella. De manera global, el endometrio está compuesto por distintos tipos celulares, que incluyen epitelio luminal y glandular, estroma, endotelio y de forma transitoria, células del sistema inmune.

- **Epitelio:** está constituido por una capa de células secretoras, ciliadas y cilíndricas simples. Este epitelio es continuo y contiene aberturas glandulares que se extienden a través del estroma subyacente hasta el borde miometrial. El epitelio endometrial se conecta en posición distal con el epitelio secretor del endocervix y, en posición proximal, con el epitelio tubárico. De esta monocapa depende la implantación embrionaria, controlando el impacto del embrión sobre el estroma y los vasos endometriales y actuando como primer contacto entre el blastocisto y su lecho endometrial. Se descama durante la menstruación, salvo la parte basal, pudiendo regenerarse de nuevo en el siguiente ciclo menstrual y, así volver a actuar de lecho endometrial.

- **Estroma:** las células predominantes en el estroma son los fibroblastos, pero también se pueden identificar macrófagos, linfocitos y otros tipos de células residentes y migratorias. Parte de este estroma también se desprende durante la menstruación y del mismo modo es regenerado en el siguiente ciclo proporcionando de nuevo las condiciones adecuadas para la implantación embrionaria.

- **Endotelio y músculo liso vascular:** estas células también están expuestas a los estímulos cíclicos que sufre el endometrio. Una respuesta apropiada de este sistema vascular es necesaria para dar lugar a un endometrio receptivo que soporte el desarrollo embrionario.

- **Células del sistema inmune:** son células relevantes para la función reproductora, puesto que durante la implantación embrionaria existe una regulación de la respuesta inmune local. La población de células leucocitarias encontrada en un endometrio normal suele representar un 10-15% del estroma, incrementándose hasta un 20-25% en la fase secretora tardía y premenstrual

(Bulmer y Johnson, 1985). La mayor parte de la población la componen las células NK (*Natural Killer cells*) y los macrófagos.

### 2.2 El ciclo menstrual.

Durante el ciclo menstrual, el endometrio sufre una serie de cambios en respuesta a fluctuaciones en los niveles de las hormonas esteroideas procedentes del ovario. Estas hormonas ejercen su acción a través de mediadores locales producidos en las células del endometrio que a su vez actúan de manera paracrina sobre las células vecinas o sobre las propias células de manera autocrina (Giudice, 1994). Estos mediadores se pueden clasificar de manera general en factores de crecimiento, citoquinas y moléculas de adhesión.

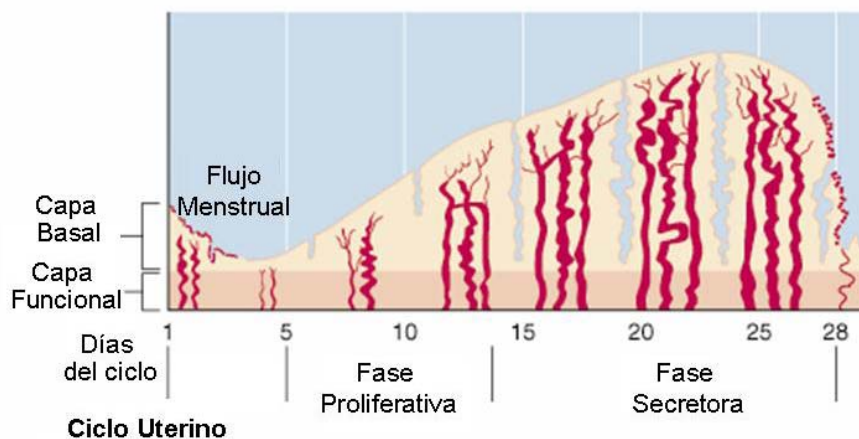
Teleológicamente, el objetivo del ciclo menstrual es preparar el endometrio para conseguir un embarazo con éxito. En él se pueden distinguir dos fases: la fase proliferativa y la fase secretora, separadas ambas por la ovulación.

**Fase proliferativa:** también llamada folicular, ya que es durante esta fase donde se desarrolla el folículo que contiene el ovocito. Se extiende desde el final de la menstruación hasta la ovulación, y en ella existe una secreción elevada de estrógenos. En esta fase todos los componentes del endometrio sufren una intensa proliferación; se hacen visibles muchas mitosis y aumenta el grosor endometrial desde 0,5 mm hasta unos 7 mm (McLennan y Rydell, 1965). Se produce una inducción de los receptores de progesterona, que permitirán a las células responder a esta hormona durante la segunda mitad del ciclo. Varios factores de crecimiento y citoquinas como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento de células vasculares endoteliales entre otros, favorecen esta rápida proliferación.

**Fase secretora:** comprendida desde el momento de la ovulación hasta la menstruación. También es conocida como fase lútea, puesto que se

desarrolla el cuerpo lúteo en el ovario. La concentración de progesterona aumenta debido a la secreción del cuerpo lúteo, y los estrógenos permanecen altos. La progesterona limita el efecto proliferativo de los estrógenos en el endometrio y favorece la diferenciación de los distintos componentes celulares, que incluye la secreción glandular de glucógeno, glicoproteínas y la decidualización del estroma. Además los vasos sanguíneos endometriales continúan su crecimiento, adquiriendo una apariencia tortuosa. Todos estos cambios están enfocados a la preparación del endometrio para la implantación del embrión.

En ausencia de fecundación, el cuerpo lúteo regresa y, por tanto, los niveles de hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) caen bruscamente, produciéndose la involución y descamación del endometrio, generando el flujo menstrual (figura 4).



**Figura 4.** Cambios ocurridos en el endometrio humano durante las distintas fases del ciclo menstrual.

### 2.3 Evidencias indirectas sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano.

El concepto de que la regeneración endometrial debe estar mediada por células madre somáticas localizadas en la capa basal del tejido endometrial fue

ya propuesto por primera vez hace 35 años (Prianishnikov, 1978). Estudios clásicos ya sugerían la posible existencia de células madre somáticas en el endometrio humano de manera indirecta.

Estudios cinéticos sobre proliferación celular endometrial muestran diferencias en esta proliferación entre las distintas zonas, que predicen un reemplazamiento ordenado de las células estromales y epiteliales en la capa funcional desde posibles células madre residentes en la capa basal cerca del límite miometrio-endometrio, y cuya progenie serían las células TA que proliferarían rápidamente y que podrían ser observadas en la capa funcional (Ferenczy y cols., 1979; Padykula y cols., 1989).

Recientemente, y basándose en las evidencias anteriormente citadas se usaron histonas fosforiladas (H3) como marcadores de proliferación celular en macacos sometidos a ciclos hormonales artificiales, se apreciaron diferencias entre el índice de proliferación de las glándulas endometriales situadas en la capa basal y las situadas en la capa funcional en las distintas etapas del ciclo menstrual (Brenner y cols., 2003).

### ***Patrones de metilación en glándulas endometriales.***

La cinética de las células epiteliales endometriales también ha sido estudiada a través del análisis de errores epigenéticos codificados en los patrones de metilación de glándulas individuales del endometrio humano (Kim y cols., 2005).

En un tejido de remodelación y recambio cíclico como es el caso del endometrio, un reemplazamiento tan continuo indica variantes epigenéticas heredables en las células madre que se producen en el ADN de la célula sin afectar a los genes, tales variantes (entre ellas las metilaciones) o mutaciones son perdidas durante el desprendimiento de esa capa. Por lo tanto, el número de divisiones de las células madre puede deducirse del número de errores somáticos acumulados dentro de las glándulas individuales. Los lugares de metilación del gen CSX (*cardiac-specific homeobox*), un gen silenciado del

endometrio humano, fueron examinados para asegurarse de que cualquier cambio en los patrones de metilación era debido a consecuencias no funcionales y por lo tanto podía asociarse a procesos aleatorios relacionados con la edad. El alcance de las metilaciones de las glándulas endometriales incrementa con la edad hasta la menopausia, después de la cual se mantienen prácticamente constantes, indicando que el número de errores epigenéticos es un reflejo de la actividad mitótica que pueden tener las células madre somáticas dentro de ese tejido. Los modelos matemáticos de los datos son más consistentes con el concepto de que una glándula individual contiene un nicho de células madre somáticas. Un nicho con número desconocido de células madre pero con larga vida más que una célula madre inmortal que se divide siempre de forma asimétrica. Parecería que las divisiones celulares simétricas y asimétricas ocurren de manera estocástica para mantener un número constante de células madre en el nicho de la glándula endometrial. Más evidencias indicaron que un reservorio de células madre somáticas permanece en el endometrio atrófico, ya que no hay reducción de la diversidad de glándulas endometriales después de la menopausia. Estos errores de replicación aleatorios que se acumulan a lo largo del tiempo proporcionan un registro en la historia de la replicación de las células madre endometriales, el cual podría ser usado para la investigación del posible papel de las células madre o progenitoras en desordenes proliferativos del endometrio.

### ***Evidencias desde observaciones clínicas.***

Otras evidencias indirectas sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano derivan del estudio con primates y de la práctica clínica, donde se ha demostrado que el endometrio se regenera por completo y se puede llevar a cabo un embarazo tras la eliminación quirúrgica de casi todo el tejido endometrial (Hartman, 1944; Wood y Rogers, 1993).

En otras situaciones clínicas, fracciones pequeñas de tejido endometrial son capaces de regenerar el endometrio completo tras ablación electroquirúrgica por menorragias, y además el embarazo en estas pacientes ha sido probado (Tressera y cols., 1999; Abbot y Garry, 2002).

En otros estudios clínicos las evidencias de la presencia de células madre somáticas en el endometrio vienen asociadas a la propensión de este tejido a sufrir calcificación/osificación (frecuentemente tras el embarazo) lo que se asocia frecuentemente con dolor e inflamación crónica, estas condiciones especiales en otros tejidos regenerativos son conocidas por ser originadas por células madre mesenquimales (Van Os y cols., 2004). En el endometrio encontramos células del músculo liso, hueso y cartílago. Las células madre mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse en células del músculo liso, hueso, grasa, y cartílago en condiciones *in vivo* e *in vitro* (Gronthos y cols., 2003). El conjunto de todas estas observaciones sugiere la hipótesis de que bajo determinadas circunstancias las células residentes en el endometrio o células mesenquimales multipotentes derivadas de la médula ósea puedan llevar a cabo una inapropiada diferenciación.

### ***Monoclonalidad de las glándulas endometriales***

Las glándulas endometriales parecen tener un origen monoclonal, es decir se han formado desde una única célula progenitora o célula madre. En más de la mitad de los cortes histológicos estudiados pertenecientes a muestras endometriales normales en fase proliferativa muy pocas glándulas presentaban la ausencia de la proteína PTEN debido a una mutación y/o delección en el gen PTEN (Mutter, 2000). Un factor clave en el desarrollo de la hiperplasia y del cáncer endometrial es la inactivación del gen supresor de tumores PTEN (*Phosphatase and tensin homolog*) por medio de delección o inactivación. Los estrógenos aumentan la producción glandular de la proteína PTEN, que se expresa constantemente durante la fase proliferativa pero que está ausente durante la fase secretora. En ausencia de PTEN, las células endometriales se vuelven más sensibles a la estimulación por estrógenos imprescindible para el desarrollo de hiperplasias y cáncer posterior. De hecho se ha comprobado que los clones de glándulas mutantes en PTEN (mujeres con glándulas nulas en este gen) en las muestras estudiadas persistían en la capa basal durante los ciclos menstruales y regeneraban sus respectivas glándulas con ausencia del gen PTEN en la capa funcional en los siguientes

ciclos. Las glándulas que no presentaban PTEN aumentaban concretamente en hiperplasias endometriales, un desorden de la proliferación epitelial.

En otro estudio diferente, la monoclonalidad de las glándulas fue también probada por la técnica de PCR (Tanaka y cols., 2003a). Estudios demostraron que glándulas adyacentes compartían clonalidad indicando que determinadas regiones bien delimitadas del endometrio derivaban de un mismo precursor celular, sugiriendo que determinadas glándulas comparten el origen desde una misma célula madre. Todo esto da lugar a cuestiones sobre la localización precisa de las candidatas a células madre somáticas epiteliales.





## **II. HIPÓTESIS**



## **II.- HIPOTÉISIS**

La hipótesis de partida para este trabajo de investigación ha sido que en el endometrio murino y humano debe existir una población de células madre somáticas responsables de su alta capacidad regenerativa.



# **III. OBJETIVOS**



### III.- OBJETIVOS

El objetivo general planteado en esta tesis doctoral es la identificación, localización y caracterización de la población de células madre somáticas presentes en el endometrio murino y humano.

Para ello, los objetivos específicos seguidos han sido los siguientes:

- Elaborar un modelo animal para la identificación de las células madre somáticas del endometrio.
- Caracterizar la población celular obtenida mediante marcadores de indiferenciación tanto a nivel proteico como a nivel de ARN mensajero.
- Demostrar la presencia de células madre somáticas en el endometrio humano por citometría de flujo.
- Aislar las poblaciones de células madre somáticas identificadas y estudiar el grado de indiferenciación mediante el estudio a nivel de ARN mensajero y su actividad telomerasa.
- Identificar el origen de las células madre somáticas aisladas desde el endometrio humano.





# **IV. MATERIALES y MÉTODOS**



## IV.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. -DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 1.1 Modelo animal.

El uso del modelo murino pretende poder desarrollar un método que consiste en la detección de células endometriales que retienen el marcaje de 5-Bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) para así poder identificar candidatas a células madre somática.

Tres días después del nacimiento de las crías se les administró 5-bromo-2'-desoxiuridina a las hembras (dos veces al día) y así durante tres días hasta el día 6 de vida de los animales. Las crías, salvo las sacrificadas en los periodos prematuros, siguieron con sus madres hasta el momento del destete (día 14) y se procedió a los sacrificios correspondientes en cada uno de los puntos establecidos a lo largo de la vida del animal. Los úteros extirpados fueron estudiados mediante:

- Localización de las células candidatas por inmunohistoquímica doble y simple.
- Análisis de la presencia de marcadores de indiferenciación por PCR y *nested-PCR*.
- Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

#### 1.2 Modelo Humano.

El método utilizado para este modelo consiste en el uso de la técnica del colorante vital Hoechst 33342. Este colorante vital permite identificar en una suspensión de células vivas a la población denominada *Side Population* (SP) mediante la citometría de flujo. Las células identificadas como SP son aquellas capaces de expulsar el colorante Hoechst al espacio extracelular. Diversos estudios han mostrado que se trata de células madre presentes en la mayoría de los tejidos estudiados y que se caracterizan por su gran plasticidad y un elevado potencial de regeneración. Actualmente, no se conocen marcadores

específicos para estas células y sólo pueden ser detectadas y aisladas mediante ensayos funcionales basados en citometría de flujo.

Tras la disgregación del tejido endometrial para obtener células aisladas de los dos principales tipos celulares presentes en el endometrio, epitelio y estroma, se procedió a la elaboración de diferentes técnicas de análisis:

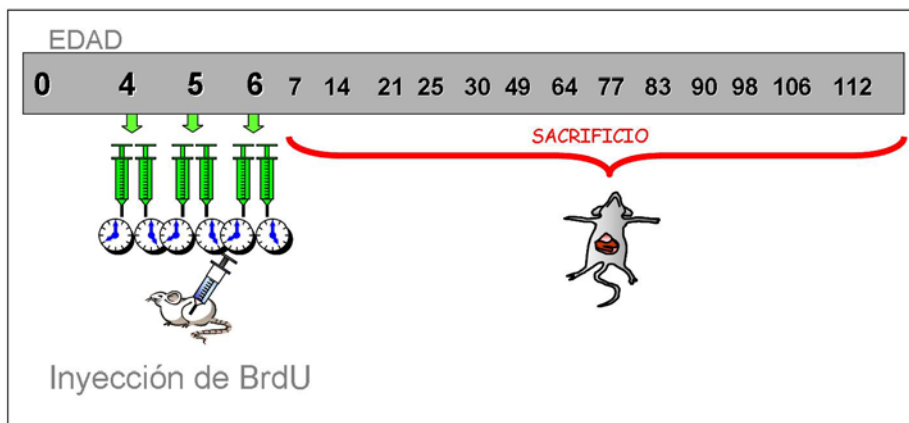
- Análisis y separación celular por citometría de flujo.
- Análisis de marcadores moleculares por PCR y *nested-PCR*.
- Inmunofenotipado de las suspensiones celulares.
- Análisis estadístico.
- Detección de la actividad telomerasa.

## **2. - MODELO ANIMAL**

### **2.1 Elaboración de un modelo animal.**

El modelo animal propuesto es el murino (*Mus musculus*), concretamente se trabajó con la descendencia de ratonas embarazadas de la cepa no consanguínea ICR [CD-1] (Harlan, Barcelona, España). Este modelo animal ha sido utilizado en numerosos ensayos biológicos y en experimentos en los que las consideraciones específicas de genotipo son de poca importancia. Los animales fueron mantenidos, tratados y sacrificados de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité Ético de Experimentación con Animales (CEEAA). La toma de muestras se realizó según la directiva 86/609/CEE del 14 de noviembre de 1986 y el RD 223/1988 del 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los controles y el mantenimiento de los ratones se llevaron a cabo en el animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia en condiciones adecuadas de estabulación, con alimentación y agua *ad libitum*.

Una vez seleccionada la cepa animal más acorde con el estudio se diseñó el modelo y el procedimiento experimental (ver figura 5). Esto se realizó gracias a la administración de una sustancia marcadora que se detecta a largo plazo y que permite la identificación de células que entran pocas veces en el ciclo de división celular. Al mismo tiempo se realizó la doble inmunolocalización con anticuerpos ya ampliamente descritos y que son característicos de células indiferenciadas (tanto de células madre embrionarias como del sistema hematopoyético).

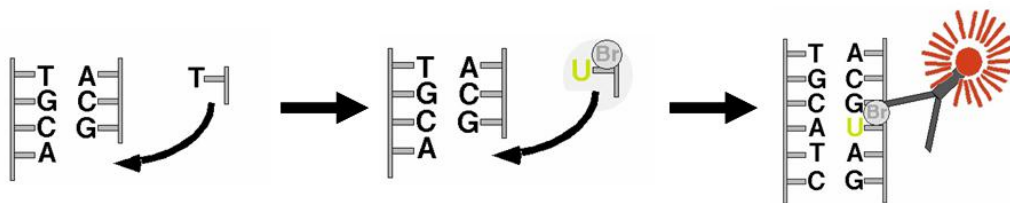


**Figura 5.** Diseño experimental del modelo animal usado. Tras el parto de las ratonas en los días 4, 5 y 6 de edad se suministró a los ratones neonatos BrdU a la dosis indicada. Finalmente los ratones fueron sacrificados en los diferentes puntos de estudio indicados entre los que corresponden el destete, madurez sexual y edad adulta.

Para ello se utilizó la técnica del marcaje con BrdU que se basa en la detección de células que retienen el 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU, Sigma-Aldrich, Madrid, España) (Taylor y cols., 2000) tras su inyección en ratones neonatos. El BrdU, es un análogo de la timidina que se incorpora al material genético durante la fase S del ciclo mitótico actuando como sustancia marcadora de nuevas células (figura 6), por lo tanto si se mantienen quiescentes podrán ser detectadas por la presencia de BrdU a lo largo de la vida del animal (Bickenbach , 1981; Cotsarelis y col., 1989; Braun y col., 2003). Al administrar BrdU a ratones neonatos, dónde todas sus células se están

dividiendo, se facilita que la molécula se incorpore correctamente en todas sus células. Podremos seguir el marcaje de estas células a lo largo del tiempo ya que este se irá perdiendo con las sucesivas divisiones celulares y quedarán marcadas aquellas que menos se hayan dividido.

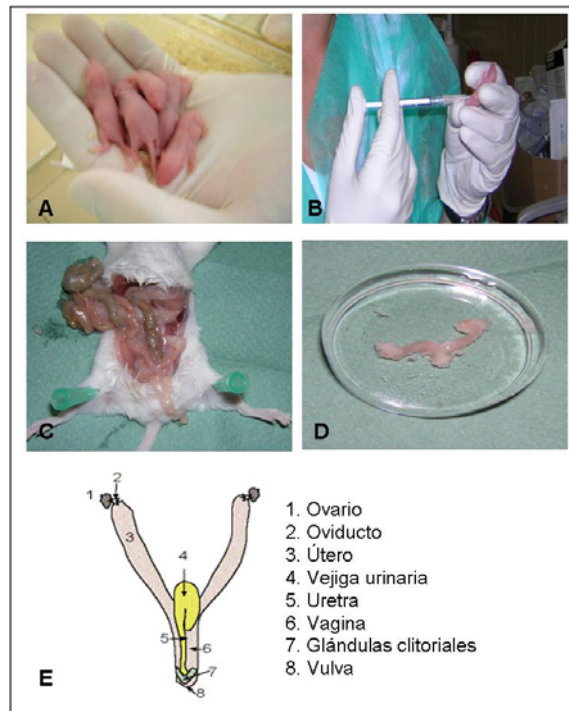
El método del BrdU ha sido ampliamente utilizado en muchos trabajos relacionados con la identificación de células madre somáticas. Esta molécula permite la detección de células que han tenido pocos ciclos de división siendo esta una de las principales características de las células madre en tejidos y órganos adultos. Se denominarán células con ciclos de división lenta a aquellas células que hayan retenido el marcaje después de 8-10 semanas tras la última dosis. Lo que revelará que pasado un periodo de tiempo tras la administración de la molécula estas células siguen teniendo la tinción característica del BrdU y esto es indicativo de que no han ocurrido las divisiones celulares propias en estos tejidos.



**Figura 6.** Incorporación del BrdU en la doble cadena de ADN.

Se suministró una dosis de 50 µg de BrdU /g de peso corporal a ratones neonatos hembras de 3 días de edad mediante inyecciones intraperitoneales durante tres días (a las 8 AM y 5 PM). Un grupo de animales control (n=13) fue sacrificado 24 horas después de la última inyección de BrdU para así poder testar la correcta incorporación de la sustancia suministrada. El número de animales del estudio fue de 48, al menos 3 ó 4 animales fueron sacrificados en cada momento temporal elegido y este experimento se realizó por duplicado.

Se realizaron por lo tanto sacrificios sucesivos mediante la técnica de dislocación cervical a los 7 días de vida (para comprobar la incorporación del BrdU), 14 días, 21 días (momento del destete), 35 días (madurez sexual), 49 días (adultos) y durante los días 64, 77, 83, 90, 98, 106 y 112 para poder así localizar la población de células quiescentes que retienen el BrdU en el endometrio a lo largo de la edad adulta (ver figura 7).



**Figura 7.** Inyección intraperitoneal a ratones neonatos de tres días de edad (A y B). Extracción de útero (C) y sacrificio de los ratones tras periodo de 64 días post-inyección de BrdU y apariencia del órgano tras la extracción (D). Anatomía del útero bicorne de ratones adultos (E).

## 2.2 Caracterización inmunohistoquímica.

Se utiliza esta técnica para visualizar el lugar donde se produce la reacción antígeno-anticuerpo y así poder localizar la posición exacta en el tejido dónde se encuentra la molécula a detectar.



### **2.2.1 Detección de las células que retienen BrdU en los tejidos candidatos por inmunohistoquímica.**

Tras el sacrificio de los animales los órganos extraídos fueron fijados en formol al 4% (v/v) durante 6-18 horas y posteriormente incluidos en parafina según protocolos ya establecidos. Se tomaron para este estudio los úteros extraídos de las ratonas tratadas con la sustancia marcadora procedentes de todos los días de sacrificio mencionados en el apartado anterior así como de ratonas no tratadas, hígado y colonias de células madre embrionarias como controles necesarios de esta técnica. De las muestras parafinadas se hicieron secciones de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  en microtomo, se montaron en porta-objetos cubiertos con *poli-Lys* (poli-lisina) y se incubaron toda la noche a 37°C para facilitar su adhesión al portaobjetos. El desparafinado se realizó calentando los cortes a 60°C durante 1 hora y posteriormente con 3 baños de xileno de 5 minutos cada uno, 3 baños de etanol absoluto de 3 minutos y una posterior rehidratación en alcoholes de concentración decreciente (95%, 85% y 70% (v/v), 3 minutos en cada uno de ellos) y agua para poder conformar la inmunohistoquímica. Los cortes fueron sometidos a un baño en tampón Citrato pH 6 a 95°C durante 20 minutos, para romper las redes de formol que se forman durante el proceso de fijado y que dificultan el reconocimiento posterior del antígeno por el anticuerpo.

Además se procedió a la desnaturalización del ADN ya que para poder detectar el BrdU es necesario tener el material genético en forma de cadena simple, de esta manera el anticuerpo reconocerá perfectamente el BrdU (pero no la timidina) en el ADN de simple cadena. Para ello se trataron los cortes con Formamida al 60% (v/v) en SSC 2X a 54°C y posteriormente con HCl 2N en PBS (*phosphate-buffered saline*, Sigma-Aldrich, Madrid, España) a 37°C durante 30 minutos. Después, se sometió a los tejidos a diversos lavados con PBS para posteriormente tratarlos con solución de bloqueo con leche desnatada al 5% (p/v) en PBS durante 30 minutos para evitar la adhesión inespecífica del anticuerpo al tejido.

Finalmente la reacción antígeno-anticuerpo se realizó usando el anticuerpo anti-BrdU conjugado con fluoresceína-5-isotiocianato, FITC (anti-BrdU con FITC, Becton-Dickinson). La solución de incubación del anticuerpo se llevó a concentración 5 µg/ ml de anticuerpo disuelto en PBS-leche 3% (p/v) en oscuridad (para evitar la pérdida de fluorescencia), en cámara húmeda a 37°C y durante toda la noche. Al día siguiente los cortes fueron lavados con PBS y las secciones se montaron con la contratinción de DAPI (diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol). El DAPI es un colorante fluorescente que pertenece al grupo de los colorantes del indol y se usa para tinción nuclear, dando lugar a fluorescencia azul en los núcleos.

La localización en el tejido endometrial de las células que retuvieron el marcaje BrdU se visualizó y fotografió usando un microscopio de fluorescencia unido a una cámara Olympus de 35mm (Olympus Provis AX70, Olympus, Optical España S.A.).

### **2.2.2 Doble inmunofluorescencia de los tejidos candidatos.**

Las dobles inmunohistoquímicas son técnicas que permiten la determinación de forma simultánea de dos antígenos diferentes. Para ello se incuba el tejido con una mezcla de anticuerpos específicos frente a los antígenos que se quieren examinar, los anticuerpos irán marcados con fluorocromos distintos para poder detectarse la doble localización. La combinación de marcadores fluorescentes seleccionada consistió en el uso de FITC que absorbe luz azul y emite fluorescencia verde manzana (correspondiente al BrdU conjugado con FITC); e isotiocianato de tetrametilrodamina que absorbe luz verde y emite fluorescencia roja anaranjada (anticuerpos secundarios conjugados con TRITC que reconocen los primarios frente a c-KIT y OCT-4). Para la localización de las proteínas c-KIT y OCT-4 se utilizó la inmunohistoquímica indirecta, que consiste en añadir un anticuerpo secundario que reconozca nuestro primario tras el marcaje con este de cada una de las secciones. Los secundarios escogidos iban combinados con marcadores fluorescentes apropiados para las técnicas de inmunofluorescencia siendo finalmente el marcaje obtenido: c-KIT+TRITC y OCT-4+TRITC.

El protocolo a seguir es tal y como se describe con detalle en el apartado 2.2.1, solo que a la hora de la incubación con el anticuerpo anti-BrdU conjugado con FITC se añade a la mezcla de incubación un segundo anticuerpo, ambos se dejan incubar conjuntamente durante toda la noche. Para ello se usó en las muestras la combinación de anti-BrdU con un segundo anticuerpo. En un caso usamos anti c-KIT hecho en cabra a concentración 0,2 µg/mL (Santa Cruz Biotechnology, anticuerpo policlonal) y en otro caso POU5F1 (OCT-4) a concentración 0,2 µg/mL (Chemicon Internacional, anticuerpo monoclonal). En el protocolo de incubación con OCT-4, al tratarse de un marcaje nuclear, a la solución de bloqueo se le añadió tritón X-100 al 0,1% (v/v) para permeabilizar las membranas y así facilitar el paso del anticuerpo y la unión al antígeno; esto no se realizó en el caso de c-KIT ya que se detecta presencia de proteína a nivel de membrana. Transcurridos los periodos de incubación y una vez ya se han unido los antígenos a los anticuerpos correspondientes, las secciones fueron tratadas durante 30 minutos con un anticuerpo secundario combinado con rodamina-TRITC (Sigma-Aldrich, Madrid, España) que se une de forma covalente a los anticuerpos c-KIT y OCT-4; esto nos permitirá la doble localización de las células en nuestras muestras.

La doble inmunolocalización, BrdU/c-KIT y BrdU/OCT-4, se visualizó y fotografió usando un microscopio de fluorescencia unido a una cámara Olympus de 35mm (Olympus Provis AX70, Olympus, Optical España S.A.).

### **2.2.3 Controles.**

En las técnicas de localización inmunohistoquímicas es necesario la existencia de controles tanto positivos como negativos. Estos nos permitirán reconocer que la reacción antígeno-anticuerpo ha tenido lugar y que no es fruto de reacciones de unión inespecífica ni de ruido de fondo debido a la parafina.

**- Control negativo de la técnica: *Úteros de ratonas sin tratar con BrdU.***

Nos sirve para comprobar que la elaboración del modelo animal haya sido

la correcta y que la administración e incorporación del BrdU se haya llevado a cabo tal y como se esperaba. Por lo tanto esperamos que en estas muestras no se identifiquen células que hayan retenido el BrdU y que consecuentemente no haya tinción inmunohistoquímica en las secciones analizadas.

- **Control positivo: Hígado murino.** Debido a que ya se han descrito células madre somáticas en este tejido, la localización de las células candidatas estará cercana a las regiones porta del hígado. Además este órgano será también el control positivo del marcaje con el anticuerpo c-KIT (Wang y cols., 2003; Fang y cols., 2003).

- **Control positivo del marcador de indiferenciación POU5F1 (OCT-4): colonias de células madre embrionarias** (Simón y cols., 2005). Se usarán para determinar la presencia de células que expresan este marcador en las colonias de células madre embrionarias ya que ha sido ampliamente descrita.

Los tejidos problema a analizar fueron todos los úteros extraídos a las ratonas tratadas con BrdU en los diferentes puntos examinados:

- **Días 7, 14, 21, 35, 49, 64, 77, 83, 90, 98, 106 y 112 de edad del ratón.**

#### **2.2.4 Análisis de imagen.**

El análisis de los datos procedentes de la inmunohistoquímica se realizó mediante un programa de análisis de imagen, pudiendo así obtener los porcentajes exactos de las células positivas y por lo tanto marcadas con BrdU y/o con los diferentes anticuerpos en cada uno de los cortes analizados.

Las secciones analizadas fueron contrateñidas tal y como se ha indicado en el apartado anterior con tinción nuclear de DAPI con el fin de visualizar todas las células presentes en los tejidos y poder así extrapolar los resultados

de las células positivas para cualquiera de los marcadores anteriormente citados. El conteo de las células se realizó usando el programa de imagen ImageJ. Se trata de un programa informático de procesamiento de imágenes basado en Java y que permite la cuantificación del marcaje de las células en los cortes histológicos analizados en cada una de las muestras.

Al menos 2000 células fueron contadas en cada una de las secciones a estudiar. Finalmente, la evaluación de la de tinción y por lo tanto los porcentajes correspondientes en cada uno de los puntos y tejidos a analizar se obtuvieron mediante el coeficiente entre las células positivas para el anticuerpo específico y el total de células visualizadas. Los datos se expresaron como medias con su desviación estándar.

### **2.3 Caracterización a nivel de ácidos nucleicos.**

El análisis de expresión de ácidos nucleicos se realizó mediante PCR semi-cuantitativa y *nested-PCR*.

#### **2.3.1 Aislamiento de ARN.**

Las muestras que fueron destinadas a la extracción de ARN fueron resuspendidas en Trizol™ (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante (protocolo de Chomczynski y Sacchi, 1987). Después del Trizol™ se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol™ utilizado en origen. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 25 minutos y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol™ utilizado al principio. Se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche y tras otra centrifugación a 13.000 rpm durante 25 minutos a 4°C se lavó el precipitado con etanol al 70% (v/v) en agua DEPC. Se volvió a centrifugar por última vez en las mismas condiciones y se resuspendió en 15 µL de agua-DEPC (agua tratada con dietilpirocarbonato para prevenir la contaminación de las muestras con ADNAsas y ARNAsas).

Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a la cuantificación en un *SmartSpect 3000 spectrophotometer* (Biorad, Barcelona, España)

### 2.3.2 Controles y tejidos problema.

Del mismo modo que en los ensayos de detección de proteínas los controles en estas técnicas son fundamentales ya que nos permiten conocer si la amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa es fruto de la presencia del ARN amplificado de la muestra problema o de artefactos derivados de la amplificación, los cebadores o contaminación por agentes externos. Los controles usados en esta técnica fueron los siguientes:

- **Hígados de ratón**, como ya se ha indicado en el apartado 2.2.3 se usaron como control positivo de la presencia de células que expresan *c-Kit*.
  
- **Músculo humano**, se usó como control negativo de la presencia de *c-Kit*. ya que los cebadores (Lassalle y cols., 1999) se han diseñado exclusivamente para el tejido de ratón y no deben identificar humano, además no hay descrita presencia de *c-Kit* en el músculo en ninguno de los casos.
  
- **Testículo de ratón**, se usó como control positivo del marcador de indiferenciación *Pou5f1*, tal como ha sido descrito (Goto y cols., 1999).
  
- **Fibroblastos de prepucio humano (foreskin, (FSK))**, fueron usadas como control negativo de *Pou5f1*.

Los tejidos problema que se analizaron mediante esta técnica fueron los mismos que se han citado anteriormente.

### **2.3.3 Retrotranscripción.**

Para evitar pérdidas de material genético de las muestras detalladas en el apartado anterior se procedió a retro-transcribir el ARN obtenido a ADN complementario (ADNc) para poder analizarlo por PCR. Para ello, se tomó 1 µg de ARN, y se utilizó el Kit de retrotranscripción *Advantage RT-for-PCR Kit* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU). A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL y se calentó a 70°C durante 2 minutos para desnaturalizar las cadenas de ARN y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Después de esos 2 minutos se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de dNTP mix (10mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de ARNasa, 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney- Murine Leucemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retro-transcripción. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C y al final 5 minutos a 94°C para detener la reacción y destruir la actividad ADNasa. El producto final fue diluido hasta un volumen total de 100 µL con agua-DEPC y almacenado a 4°C hasta su análisis por PCR.

### **2.3.4 Reacción en cadena de la polimerasa.**

La Reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction), es una técnica de biología molecular descrita en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo es obtener un gran número de copias de un fragmento de ADN concreto, partiendo de un mínimo; en teoría basta partir de una única copia de ese fragmento.

#### ***PCR semi-cuantitativa.***

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN diana. Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos a altas y bajas temperaturas alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada

fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

Para la realización de esta técnica es necesario el diseño de cebadores para la PCR, también denominados *primers*, que son oligonucleótidos sintéticos que hibridan con la región que se desea amplificar y propician el inicio de la reacción de elongación por la *Taq pol* (ADN polimerasa). Los cebadores suelen ser secuencias cortas, de entre seis y cuarenta nucleótidos, normalmente de 18 a 22, que son reconocidos por la polimerasa permitiendo iniciar la reacción. Deben estar situados enfrentados y a no mucha distancia entre ellos (no más de 4 kb). Delimitan la zona de ADN a amplificar.

La PCR semi-cuantitativa proceso tiene tres fases (figura 8):

**1. Desnaturalización.** En primer lugar, se desnaturaliza el ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, entre otras cosas, de la proporción de G+C (guanina-citosina) que tenga la hebra, como también del largo de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

**2. Unión del cebador.** A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para esto es necesario que la temperatura descienda (generalmente, a 55 °C, aunque se puede variar según sea el caso entre 45°C y 65°C). Estos cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

**3. Extensión de la cadena.** Por último actúa la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. Se



aumenta la temperatura hasta 72 °C (para la ADN Polimerasa), temperatura a la cual la *Taq pol* presenta su máximo de actividad, aumentando geoméricamente la cantidad de fragmentos de ADN amplificados en la reacción.

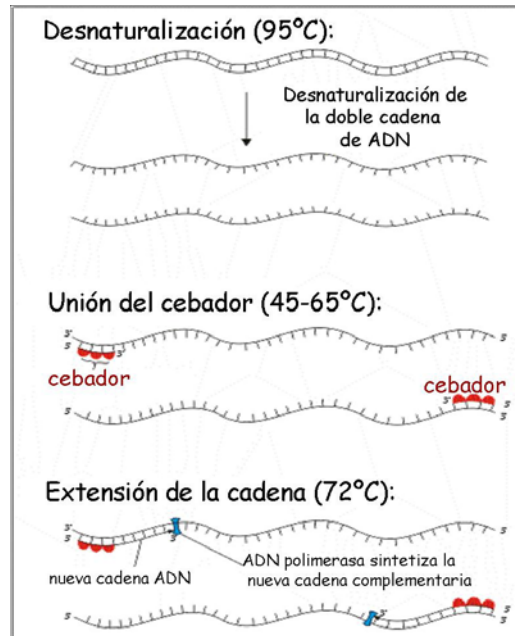


Figura 8. Fases de la PCR-semicuantitativa

Una vez completados todos los ciclos, se finaliza con dos pasos, uno de extensión de la cadena a la temperatura óptima de esta ADN polimerasa, normalmente 72°C, para finalizar enfriando la muestra a 4°C para su mantenimiento.

La técnica de PCR semi-cuantitativa se usa para determinar la presencia o ausencia de las secuencias buscadas. La PCR semi-cuantitativa fue conformada con 4µL del producto del paso de la retrotranscripción. A ese volumen de ADNc le fue añadido la mezcla de reacción que contenía 2,5 µL de tampón de reacción 10X (Bioline, Londres, Inglaterra), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> 50mM (Bioline), 15,5 µL de agua DEPC, 0,5 µL de mezcla de dNTPs (Sigma-Aldrich, Madrid, España), 0,5 µL de cebadores 5' y 3' a 20mM, 0,25 µL de *Taq pol* (Bioline) hasta llegar a un volumen final de 25 µL. Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Unoll (Biometra, Gottingen, Alemania). Como control negativo de la técnica en cada PCR se substituyó el

ADNc por agua bidestilada comprobando en estos casos que no existía amplificado alguno.

Las secuencias de los cebadores utilizados se diseñó mediante programas informáticos y los tamaños del fragmento que amplifica se muestran en la siguiente tabla.

Transcrito		Secuencia de primers 5'-3'	Tamaño (paresbases)
β-ACTINA	Extremo 5'	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	331 pb
	Extremo 3'	CGGTGAGGATCTTCATGAGGTA	
c-Kit	Extremo 5'	CTGGTGGTTCAGAGTTCATAGAC	389pb
	Extremo 3'	TCAACGACCTCCCGAAGGCACCA	

**Tabla II.** Cebadores usados para la PCR semi-cuantitativa en el modelo animal.

Para cada reacción de PCR se estandarizó 94°C 5 minutos para desnaturalización de ADN; 40 ciclos de 94°C 45 segundos, 61°C 45 segundos, 72°C 45 segundos y una extensión final a 72°C 5 minutos, para posteriormente ir a 4°C.

Los fragmentos de ADNc amplificados fueron separados mediante electroforesis durante 1 hora a 90 V en gel de agarosa al 2% (p/v), con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y finalmente fueron observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron recortadas del gel y purificadas con el kit *Pharmacia Elution Band Kit* (Amershan, Barcelona, España) para poder secuenciarlas y comprobar la correlación de dicho amplificado con la secuencia estudiada. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia, y en todos los casos se comprobó que los amplificados eran correctos.

### ***Nested-PCR.***

Esta técnica consta de dos reacciones de PCR sucesivas, con dos pares de cebadores distintos, de tal modo que los cebadores utilizados en la segunda ronda de PCR (interna o *nested-PCR*) flanqueen una región genómica dentro de la secuencia amplificada en la primera reacción en cadena (externa). El método de la *nested-PCR* (PCR interna o anidada) se utiliza sobre todo cuando se tienen pequeñas cantidades del ADN de interés o cuando se quieren evitar las amplificaciones inespecíficas que a veces se observan con la PCR clásica. Además, si el producto de la primera PCR es el resultado de una amplificación inespecífica, los segundos cebadores internos no reconocerán la secuencia complementaria, y por consiguiente no habrá amplificación.

La *nested-PCR* se realizó siguiendo el siguiente protocolo. Para cada muestra de la primera ronda de PCR fue conformada con 4  $\mu$ L del producto del paso de la retrotranscripción anterior. A ese volumen de ADNc le fue añadido la mezcla de reacción tal y como se indica en el apartado de la PCR semi-cuantitativa.

Para la segunda ronda de PCR se utilizaron 5  $\mu$ L del producto de la primera PCR y el volumen correspondiente de la mezcla de PCR para llevar a cabo la reacción. La segunda PCR se estandarizó a 94°C 5 minutos para la desnaturalización del ADN; 20 ciclos de 94°C 45 segundos, 62°C 45 segundos, 72°C 45 segundos y una extensión final a 72°C 5 minutos, para posteriormente ir a 4°C.

Las reacciones de *nested-PCR* fueron llevadas a cabo en un termociclador Unoll (Biometra, Gottingen, Alemania). Como control negativo de la técnica en cada *nested-PCR* se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

La secuencia de los cebadores utilizados y los tamaños de los amplificados se muestra en la siguiente tabla.

Transcrito		Secuencia de primers 5'-3'	Tamaño (paresbases)
Pou5f1 OCT-4	Extremo 5' Externo	AGGAAGCCGACAACAAT	419 pb
	Extremo 3' Externo	CCCTCAGGAAAAGGGACTGA	
Pou5f1 OCT-4	Extremo 5' Interno	GGAAGAGAAAAGCGAACTAGCA	321 pb
	Extremo 3' Interno	GGACTGAGTAGAGTGTGGTGA	

**Tabla III.** Cebadores usados para la *nested-PCR* en el modelo animal.

Los fragmentos de ADNc amplificados fueron separados mediante electroforesis durante aproximadamente 1 hora a 90 V en un gel de agarosa al 2% (p/v), con 0,5 µg/mL de bromuro de etidio y fueron observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron recortadas del gel y purificadas con el kit *Pharmacia Elution Band Kit* (Amershan, Barcelona, España) para poder secuenciarlas y comprobar la correlación de dicho amplificado con lo esperado. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia. En todos los casos se confirmó la secuencia esperada en los amplificados.

### 3.- MODELO HUMANO.

El modelo humano se llevó a cabo tras la aprobación del proyecto por parte del Comité Ético del Instituto Valenciano de Infertilidad, de la Facultad de Medicina de Valencia y del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia. Acorde con los objetivos del presente trabajo de investigación las muestras fueron obtenidas tras la explicación del proyecto y firma del consentimiento escrito por parte de las pacientes.

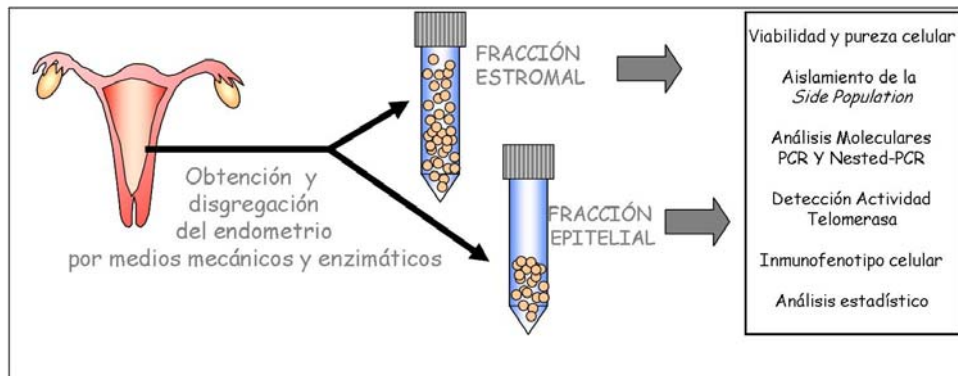
#### 3.1 Pacientes y Tejidos.

Desde el comienzo del estudio se han recogieron tanto biopsias endometriales de mujeres voluntarias, sanas y con fertilidad probada, con

ciclos menstruales normales de 27-30 días y con un índice de masa corporal entre 19-25 kg/m<sup>2</sup> en cualquier día del ciclo, así como úteros completos procedentes de histerectomías.

Se tuvo en cuenta el tiempo desde el último día de regla que se consideró día 1 para calcular en el día del ciclo en que se encontraba. Las biopsias se procesaron tal y como se explica en los apartados sucesivos para llevar a cabo la disgregación tisular y obtener una suspensión celular tomando una porción para anatomía patológica. La recolección del tejido se llevó a cabo inmediatamente tras la extracción del tejido u órgano y se procesaron las muestras en los siguientes 30 minutos.

Tras esto se procedió a la separación de las dos fracciones endometriales, epitelio y estroma, para analizar cada una de ellas por separado.



**Figura 9.** Diseño experimental del modelo humano usado en este apartado. Tras la disgregación enzimática de las muestras obtenidas, las fracciones celulares epiteliales y estromales fueron sometidas a diferentes técnicas moleculares y celulares para su análisis.

### 3.2 Aislamiento de la Side Population (SP).

#### 3.2.1 Obtención de células epiteliales y estromales aisladas del endometrio humano.

Todo el procedimiento celular se llevó a cabo en condiciones de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación por agentes externos. Por lo tanto se procedió a la recogida y procesamiento de la muestra con material adecuadamente esterilizado y en campana de flujo laminar con los pertinentes medios estériles (guantes, calzas, mascarilla, gorro) y en zonas de cultivo celular asépticas.

La disgregación mecánica se realizó con bisturís, limpiando de moco y sangre la muestra, y troceándola cuidadosamente hasta alcanzar fragmentos menores a 1mm. Tras la disgregación mecánica se llevó a cabo la disgregación enzimática con la enzima colagenasa tipo IA (Sigma-Aldrich, Madrid, España) diluida en solución tamponadora de *Hanks* (*Hanks balanced salt solution*, HBSS (Sigma-Aldrich, Madrid, España)) a concentración 2 mg/mL, y a continuación se dejó la muestra a 4°C durante 6-12 horas. La colagenasa hidroliza el colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos pequeños de tejidos y células aisladas. Transcurrido este tiempo y tras verificar visualmente que la muestra se había disgregado, no observando grandes fragmentos de tejido, se separaron las dos fracciones celulares en base a su coeficiente de sedimentación.

Las células disgregadas tras este primer paso y disueltas en un tubo de 14 mL se colocaron en posición vertical durante 10 minutos, tras esto se retiró el sobrenadante y se pasó este a un nuevo tubo, este procedimiento se realiza dos veces más. Las células de mayor tamaño sedimentan más rápido al fondo del tubo y se corresponden con glándulas y fragmentos epiteliales, fragmentos de glándulas, glándulas sin disgregar... Sin embargo las células estromales se encuentran en la fracción superior, el sobrenadante.

Las suspensiones celulares correspondientes al estroma se filtraron a través de filtros de 30  $\mu\text{m}$  de poro (Partec, Celltrics) y se resuspendieron en medio de cultivo *DMEM* (*Dulbecco's modified Eagle's medium* (Sigma-Aldrich, Madrid, España)) suplementado con suero bovino fetal (FBS (Gibco, Barcelona, España)) y con 10mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Madrid, España) para evitar cambios bruscos de pH que pudieran afectar a la viabilidad de las muestras (medio SP, Sales-Pardo y col., 2006). Por otro lado, las células de la fracción inferior fueron sometidas a una nueva disgregación con tripsina (Sigma-Aldrich, Madrid, España) durante 5 minutos y con agitación para disgregar al máximo los agregados y así poder llegar a célula única. Tras esto se realizaron 2 incubaciones de 15 minutos en *flasks* de 25  $\text{cm}^2$  (Falcon, Becton-Dickinson) y se retiró el sobrenadante. Finalmente las células fueron filtradas a través de filtros de 50  $\mu\text{m}$  de poro (Partec, Celltrics) y se resuspendieron en medio de cultivo SP, *DMEM* (*Dulbecco's modified Eagle's medium* (Sigma-Aldrich, Madrid, España)) suplementado con suero bovino fetal (FBS (Gibco, Barcelona, España)) y con 10mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Madrid, España).

### 3.2.2 Citometría de flujo.

La citometría de flujo (CMF) es una técnica de análisis celular multiparamétrico cuyo fundamento se basa en hacer pasar una suspensión de partículas (generalmente células) alineadas por delante de un haz de láser focalizado. Es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula. Estas medidas son realizadas mientras las células pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células por segundo, a través del aparato de medida en flujo laminar. Es esencial disponer de una suspensión de células o partículas individuales, de modo que la dificultad para obtenerla es un factor limitante para el empleo de la técnica. Y esto va en aumento si se desea trabajar con células vivas. Las células o partículas son marcadas por colorantes fluorescentes que son capaces de excitarse con una fuente luminosa de alta energía.

La citometría de flujo se utilizó para conocer la viabilidad celular (apartado 3.2.3), aislar las células de la *side population* (SP, ver apartado

3.2.5), conocer la pureza de la muestra (apartado 3.2.3), y fenotipar con diferentes marcadores tanto las suspensiones celulares de epitelio y estroma como las células SP aisladas desde estas fracciones celulares (apartados 3.5.1 y 3.5.2).

La suspensión celular convenientemente procesada y teñida, se inyecta en la cámara de flujo del citómetro que está hidrodinámicamente enfocada para que las células pasen individualmente, una detrás de otra, a través de un punto en que estas interaccionan físicamente con un haz de luz monocromática, la luz al incidir sobre las células produce una dispersión en todas las direcciones. La luz dispersada hacia adelante (llamada *forward scatter*, FS a 0 grados) está relacionada con el tamaño celular. La luz dispersada a 90 grados del eje del haz lumínico (*side scatter*, SS a 90 grados) está relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática.

La excitación de los fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior a la incidente. Esta luz es recogida a 90 grados, siendo dirigidas las longitudes de onda seleccionadas mediante espejos (dicróicos) y filtros de banda que fotomultiplican la señal. Si se dispone de múltiples fluorocromos, excitables con la fuente de luz única, pueden unirse a las células permitiendo, de este modo, medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros de una sola célula. Las señales eléctricas analógicas son convertidas en señales digitales y son procesadas por un ordenador, con el fin de generar histogramas correlacionados con los parámetros deseados y efectuar el análisis de los mismos.

### **Fluorescencia.**

El citómetro de flujo necesita un sistema combinado de:

- Fluidos, para introducir y restringir las células para análisis.
- Óptica, una fuente de excitación y un sistema colección para generar y recoger las señales luminosas. El sistema de excitación consiste en un láser, lentes y prismas para dirigir el rayo. El sistema de colección



consiste en espejos ópticos y filtros para encaminar determinadas longitudes de onda hacia detectores ópticos determinados.

- Electrónica, para convertir las señales ópticas en señales electrónicas proporcionales y digitalizarlas para análisis computacional.

Un fluorocromo es una molécula química que absorbe la luz a una determinada longitud de onda (energía) de excitación y emite a una longitud superior (menor energía). Interacciona con la luz de excitación procedente del láser. Se utiliza unido a anticuerpos específicos para antígenos de la célula. La cantidad de fluorescencia que emite una célula es proporcional a la cantidad de sitios de unión.

### ***Reactivos fluorescentes.***

Disponemos en la actualidad de diferentes marcadores de fluorescencia dependiendo de su unión a la célula.

- Marcadores fluorescentes de unión covalente: son fluorocromos que reaccionan y se usan para marcar proteínas, lípidos, o bien otras moléculas biológicas. Deben ser suficientemente selectivos y reactivos. Se emplean cromóforos con grupos isotiocianato, clorotrizinil, y ésteres de succinimida, por su capacidad de unión. El fluorocromo más empleado es la fluoresceína. Otros que se han descrito y empleado son: rodamina, *Texas red*, cianinas (láseres diodos), etc., pero el más famoso es la ficoeritrina (ficobiliproteína) por su gran absorción, rendimiento y fotoestabilidad; además se puede excitar a 488 nm pero emite más allá del espectro de la fluoresceína permitiendo el doble análisis con un solo láser. Actualmente se ha generalizado el estudio multiparamétrico de antígenos celulares con el empleo simultáneo de 3 y 4 anticuerpos conjugados cada uno con fluorocromos con diferente longitud de emisión (FITC; R-PE, PerCP, AFC, tándems de fluorocromos, etc).
- Marcadores fluorescentes de unión no covalente: son fluorocromos que debido a su especial composición molecular se unen a determinados componentes celulares. Entre ellos:

- Marcadores del contenido en ADN y ARN: Según el tipo son más o menos específicos para el ADN, ARN, o determinadas bases. Se emplean el Hoechst 33342 (Unión a A-T, vital), DAPI (A-T), DIPI (A-T), cromomicina A3 (Unión a G-C), olivomicina (G-C), mitramicina (G-C). El naranja de acridina se une al ADN y ARN pero tiene la particularidad de emitir en diferente longitud según al tipo de ácido nucleico al que está unido. De uso común es el Yoduro de Propidio (PI, unión intercalante) que se excita con un láser de 488 nm.
- Marcadores del potencial de membrana: son las cianinas y la rodamina 123. También marcan mitocondrias debido a la alta diferencia de potencial entre su membrana.
- Marcadores de membrana y lípidos, marcadores que diferencian compartimentos con distinto pH: poco usados en citometría de flujo.

### ***Realización de citometría de flujo.***

Se hace en 3 etapas independientes:

- Fase pre-citometría: preparación de los reactivos, preparación de las células, diseño del protocolo y coloración de las células con los reactivos fluorescentes.
- Fase de citometría de flujo: involucra el procesamiento de las células marcadas y la recolección de los datos para cada una de las medidas (parámetros) realizados en cada célula individual.
- Fase de análisis: análisis de los datos recolectados. La mezcla de células teñidas con diferentes fluorocromos es forzada a pasar a través de una aguja creando una delgada fila de líquido que contiene las células. A medida que cada célula pasa en frente del láser, desvía el rayo incidente y las moléculas teñidas unidas a la célula van a ser excitadas y emiten luz fluorescente. Tubos fotomultiplicadores detectan tanto la luz desviada y las emisiones fluorescentes, la información es digitalizada y procesada por el ordenador. Los resultados son presentados a manera de histogramas o "*dot-plots*".

### ***Ventajas de la citometría de flujo.***

Las ventajas de esta técnica son las siguientes:

- Análisis y cuantificación de un número estadísticamente significativo de células (desde 1.000 a más de 100.000 células).
- Múltiples marcajes de una sola célula.
- Análisis de alto número de partículas en corto tiempo (5.000 eventos /seg).
- Alta sensibilidad y objetividad.
- Medidas separadas de cada célula (no sólo el promedio).
- Medidas cuantitativas: discriminación de las células según la cantidad de marcador.
- Múltiples parámetros: define subpoblaciones complejas.
- Miles de células por segundo.

### **3.2.3 Viabilidad y pureza celular.**

Antes de llevar a cabo el protocolo de tinción con el colorante vital Hoechst y para obtener una buena caracterización celular, se realizó una lisis de eritrocitos con el fin de eliminar este tipo celular de las muestras. Las suspensiones celulares fueron tratadas con tampón de lisis de eritrocitos que contiene cloruro de amonio a pH 7,4 (1,5 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 100 mM  $\text{NaHCO}_3$ , 1mM EDTA) durante 5-10 minutos a temperatura ambiente. Rápidamente desaparece el color rojo intenso debido a la presencia de eritrocitos y la muestra toma un tono más rosado.

Se evaluó la viabilidad celular añadiendo a la muestra Yoduro de Propidio a concentración 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (PI, Sigma-Aldrich, Madrid, España). El PI es un fluorocromo que se intercala en los ácidos nucleicos incrementando sensiblemente su fluorescencia. La membrana de las células vivas no permite su paso al interior del citoplasma, de manera que únicamente teñirá las células que tengan dañada su membrana (muertas) y los núcleos aislados. En el análisis de citometría de las muestras teñidas con PI se deben seleccionar las

células que no emitan fluorescencia debida al PI y que posean las características adecuadas de FS y SS. Así pues en el análisis por citometría las células muertas quedarán excluidas debido a la presencia del yoduro de propidio.

La pureza de la suspensión celular obtenida se llevó a cabo mediante el uso de anticuerpos específicos frente a los componentes celulares mayoritarios en el endometrio humano. La presencia de células epiteliales y estromales se demostró mediante el uso de los anticuerpos CD9-FITC (identifica células epiteliales) y CD13-PE (identifica células estromales), y con la técnica de citometría de flujo (Cytomics FC500, Beckman-Coulter, CA, USA). La reacción antigénica se realiza con las células en suspensión. Tras el centrifugado a 580g, y tras el conteo celular en cámara de Neubauer (cámara de conteo celular adaptada al microscopio), se resuspenden las células en tampón de bloqueo ( $10^6$  células en 100  $\mu$ L) PBS-BSA 5% (p/v) durante 30 minutos para bloquear los sitios de unión inespecífica, se vuelven a centrifugar las células y después se añaden los anticuerpos conjugados con los fluorocromos arriba indicados correspondientes a ambas fracciones. Para la fracción epitelial se añaden 10  $\mu$ L CD9-FITC (Chemicon) por test ( $1 \cdot 10^6$  células) durante 1 hora a 4°C y para la fracción estromal se añade 10  $\mu$ L CD13-PE (Chemicon) por test ( $1 \cdot 10^6$  células) durante 1 hora a 4°C y en PBS-BSA 3% (p/v). Tras esto se centrifugan de nuevo las células y se resuspenden en PBS y se mantienen a 4°C hasta proceder al análisis inmunocitoquímico en el citómetro de flujo.

El análisis de las células teñidas con los correspondientes anticuerpos se realizó con filtros de banda de paso de 530/40 nm para el anticuerpo conjugado con FITC y de 580/30 nm para los conjugados con PE. Estas señales se recolectaron en escala logarítmica. Para discriminar las células muertas en este análisis se usó la presencia de yoduro de propidio para las teñidas con FITC y la 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para las teñidas con anticuerpos conjugados con PE. Este último funciona del mismo modo que el yoduro identificando las células muertas salvo que es detectado a través de filtros de banda de paso de 630/30 nm.

### 3.2.4 Tinción con Hoechst.

Después de la lisis de eritrocitos y tras comprobar la procedencia de las células disgregadas desde el tejido endometrial se procedió al contaje celular en una cámara de Neubauer, las células se resuspendieron en medio SP (DMEM, FBS y HEPES) a densidad de  $10^6$  células/mL. A continuación se procedió a la tinción celular añadiendo a las muestras Hoechst 33342 (Ho-33342 (Sigma- Aldrich, Madrid, España)) a concentración 5  $\mu$ g/ml e incubando en baño a 37°C en oscuridad durante 90-120 minutos y con agitación periódica. Una alícuota de cada una de las muestras correspondientes a ambas fracciones celulares y conteniendo al menos 5 mL fue teñida con Ho-33342 en combinación con Verapamil 100  $\mu$ M (Vp (Sigma-Aldrich, Madrid, España)); siendo este el control negativo de la técnica ya que este último reactivo bloquea los canales transportadores de membranas responsables de la expulsión del Ho-33342.

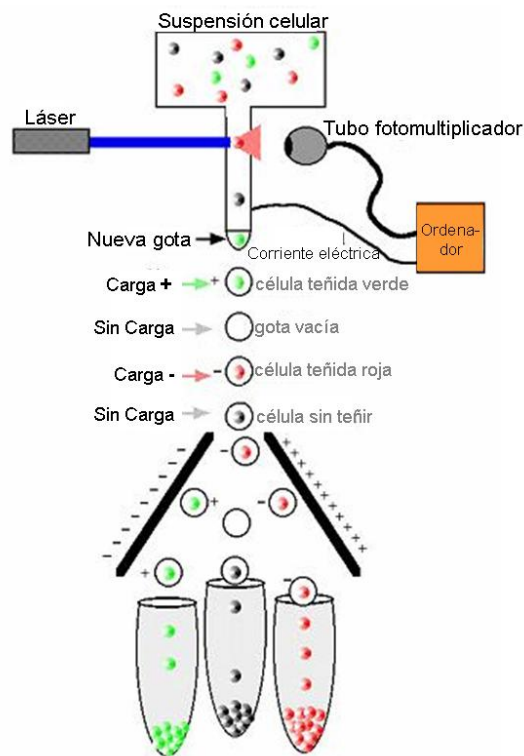
Tras el periodo de incubación y antes de analizar las muestras por el citómetro de flujo con capacidad de separación celular, las células se centrifugaron a 580g durante 8 minutos y se retiró el sobrenadante; el *pellet* se resuspendió en medio frío compuesto de HBSS/ 2% FBS/ 10mM HEPES hasta densidad celular de  $10^7$  células/mL de medio frío y se mantuvo la suspensión a 4°C hasta el análisis. Finalmente se añadió Yoduro de Propidio a concentración 5  $\mu$ g/mL para excluir las células muertas del análisis y se filtraron las muestras por los filtros anteriormente citados con tamaño de poro correspondiente a 30  $\mu$ m y 50  $\mu$ m (células estromales y epiteliales) para evitar agregados a la hora del análisis.

### 3.2.5 Aislamiento de las células SP.

Finalmente las células fueron analizadas y separadas en un MoFlo® (*Modular Flow cytometer*) con capacidad de separación celular. La excitación se llevó a cabo con el láser *Coherent Enterprise II* con dos picos de emisión, 488 nm y 351 nm, trabajando a 30mW. Las fluorescencias rojas y azules del Hoechst 33342 fueron detectadas a través de un filtro con paso de banda de

405/30 nm y 670/20 nm respectivamente, midiendo las señales en escala lineal. La fluorescencia del PI fue detectada en filtro con banda de paso de 613/20nm en escala logarítmica. Se creó un histograma biparamétrico donde se visualizan las fluorescencias azul y roja del Hoechst, y otro donde se representa la fluorescencia roja del IP frente al FSC (dispersión frontal), para descartar las células muertas del análisis (ver figura 10).

Las células seleccionadas para la separación celular se definieron en base a los histogramas anteriormente citados. Por un lado, las células vivas y baja fluorescencia del Hoechst (células de la Side Population, SP); y células vivas y fluorescencia alta del Hoechst (células de la Non SP, NSP).



**Figura 10.** Esquema de un citómetro con capacidad de separación celular. Las células se tiñen con los fluorocromos correspondientes y en base a esto se separan en tubos independientes.

### 3.3 Caracterización de ácidos nucleicos de la SP.

#### 3.3.1 Aislamiento de ARN.

Tras obtener las suspensiones celulares correspondientes a las regiones SP y NSP aisladas en el citómetro de flujo con capacidad de separación celular se centrifugaron las muestras a 580g durante 8 minutos y el *pellet* conteniendo estas células se resuspendió en Trizol™ (Invitrogen). Tras el Trizol™ se añadió 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol utilizado en origen. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos. Tras una centrifugación a 13.000 rpm durante 25 minutos y a 4°C se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le adicionó 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol utilizado en el paso previo. Se dejó precipitar a -20°C durante toda la noche y a tras otra centrifugación a 13.000 rpm durante 25 minutos a 4°C se lavó el precipitado en etanol al 70% (v/v) en agua DEPC. Se volvió a centrifugar por última vez en las mismas condiciones y se resuspendió en 15 µL de agua DEPC. Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a la cuantificación en un *SmartSpect 3000 spectrophotometer* (Biorad, Barcelona, España).

#### 3.3.2 Retrotranscripción.

Se tomó 1 µg de ARN, y se utilizó el *Advantage RT-for-PCR Kit* (Clontech, Palo Alto, CA, EEUU) para realizar la retrotranscripción. A cada muestra se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL y se calentó a 70°C durante 2 minutos para desnaturalizar las cadenas de ARN y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Después de esos 2 minutos se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de dNTP mix (10mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de ARNasa, 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney- Murine Leucemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retrotranscripción. Las muestras se incubaron durante 1 hora a 42°C y al final 5 minutos a 94°C para detener la reacción y destruir la actividad ADNasa. El

producto final fue diluido hasta un volumen total de 100  $\mu$ L con agua-DEPC y almacenado a 4°C hasta su análisis por PCR.

### 3.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa.

#### **PCR semi-cuantitativa.**

Esta técnica se realiza del mismo modo que se ha explicado en el apartado 2.3.4. Tras una primera etapa de desnaturalización, se lleva a cabo la unión de los cebadores y finalmente la extensión-amplificación de los fragmentos deseados. Como control negativo de la técnica en cada PCR se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

Los cebadores utilizados y el tamaño de los amplificados se muestran en la siguiente tabla.

Transcrito		Secuencia de primers 5'-3'	Tamaño (paresbases)
$\beta$ -ACTINA	Extremo 5'	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG	331 pb
	Extremo 3'	CGGTGAGGATCTTCATGAGGTA	

**Tabla IV.** Cebadores usados para la PCR semi-cuantitativa en el modelo humano.

Los fragmentos de ADNc amplificados fueron separados mediante electroforesis durante aproximadamente 1 hora a 90 V en un gel de agarosa al 2% (p/v), con 0,5  $\mu$ g/mL de bromuro de etidio fueron observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron recortadas del gel y purificadas con el kit *Pharmacia Elution Band Kit* (Amershan, Barcelona, España) para poder secuenciarlas y comprobar la correlación de dicho amplificado con lo esperado. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia.



***Nested-PCR.***

La *nested-PCR* o PCR anidada es una variante de la PCR convencional que comprende dos rondas de amplificación con distintos pares de iniciadores o cebadores en cada una, con el fin de incrementar la sensibilidad de detección. Primero se realiza una reacción con los iniciadores externos para amplificar una región de ADN mas extensa, que contiene el segmento diana. Después, con este producto de amplificación, se ejecuta una segunda PCR con los iniciadores internos para amplificar la región específica (ver tabla V). La técnica de *nested-PCR* se lleva a cabo del mismo modo que se ha explicado en el apartado anterior, en este caso es necesaria esta técnica para poder amplificar el fragmento deseado ya que partimos de un número bastante pequeño de células. Las células aisladas correspondientes a la SP son entre 2000-5000 células dependiendo de la muestra analizada.

Transcrito		Secuencia de primers 5'-3'	Tamaño (paresbases)
Pou5f1 OCT-4	Extremo 5' Externo	AGAAAGCGAACCAGTATCGA	302 pb
	Extremo 3' Externo	AGTACAGTGCAAGTGA	
Pou5f1 OCT-4	Extremo 5' Interno	AGTGAGAGGCAACCTGGAGA	200 pb
	Extremo 3' Interno	CTGAGAAAGGAGACCCAGCA	
c-KIT	Extremo 5' Externo	AAGCAGGAAGATCATGCAGA	315 pb
	Extremo 3' Externo	AGGATATTTCTGGCTGCCAA	
c-KIT	Extremo 5' Interno	TTCAAAGGAGTCTTCCTGCA	202 pb
	Extremo 3' Interno	CTGGTAAGAAAAGCTCAGCA	
BCRP1	Extremo 5' Externo	CAAGCAGGATAAGCCACTCA	310 pb
	Extremo 3' Externo	CAGCTCTGTTCTGGATTCCA	
BCRP1	Extremo 5' Interno	CATCAACTTTCCGGGGGTGA	172 pb
	Extremo 3' Interno	GTCCAGTACGACTGTGACA	

**Tabla V.** Cebadores usados para la *nested-PCR* en el modelo humano.

Los fragmentos de ADNc amplificados como producto de la *nested-PCR* fueron separados mediante electroforesis como se ha indicado anteriormente y observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron secuenciadas y se comprobó la correlación de dicho amplificado con lo esperado. La

secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia.

### 3.4 Detección de la Actividad Telomerasa.

La actividad telomerasa se analizó utilizando el TRAPEZE® *Telomerase Detection Kit* (Chemicon, Australia) y con tinción posterior con SYBR® *Green I* (Molecular probes, USA).

Se recogen mediante centrifugación de 1.200 rpm durante 5 minutos las células SP y NSP obtenidas a partir de la separación celular en el citómetro de flujo. Además se usa la línea de células madre embrionarias VAL-4 como control positivo de la actividad telomerasa. Para la obtención del extracto celular las muestras celulares se resuspenden inmediatamente en 20  $\mu$ L del tampón comercial de lisis CHAPS y se incubaba la suspensión en hielo durante 30 min. A continuación se centrifugan las muestras en microcentrífuga a 12.000 rpm durante 20 min a 4 °C y obtenemos el sobrenadante que es donde tenemos el extracto celular.

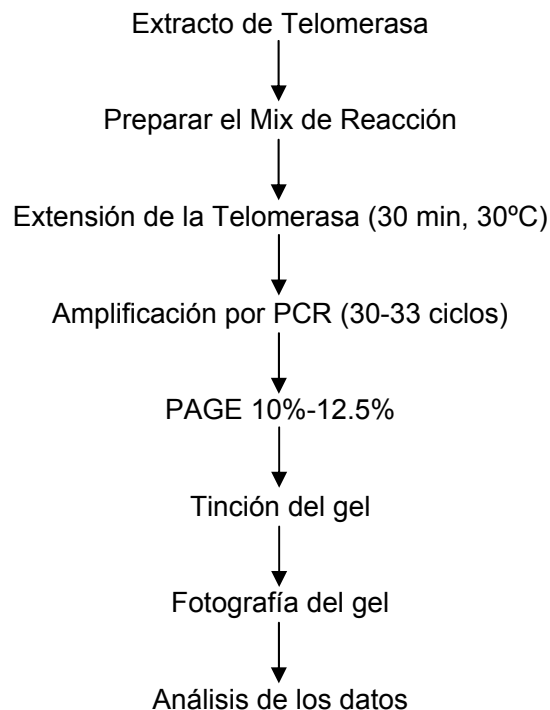
Para continuar con la detección de la actividad telomerasa, preparamos una mezcla de reacción de PCR que se compone de 5  $\mu$ L 10X TRAP de tampón de reacción, 1  $\mu$ L 50X de mezclas de dNTP, 1  $\mu$ L de cebador TS, 1  $\mu$ L mezcla de cebadores TRAP, 0,4  $\mu$ L Taq polimerasa (5 U/ $\mu$ L), 29,5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O bidestilada y 2  $\mu$ L de extracto celular (correspondiente a cada muestra). Y sometemos al extracto celular a reacción de PCR que consiste en 1 ciclo 30°C 30 min para la extensión de la telomerasa. Posteriormente se llevó a cabo la PCR clásica tal que 94°C/3'; 30-33 ciclos de 94°C/30"-59°C/30"-72°C/1' y un ciclo de 72°C 5'.

Tras esto se analizan las muestras en gel de acrilamida 15% (p/v) en condiciones no desnaturizantes y en TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA, pH entre 7-8,5) durante 90 minutos a 400 V.

La tinción del gel se realiza en un contenedor o bandeja de polipropileno y se añade suficiente solución de tinción (*SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain* diluido 10.000 veces en tampón TBE) para cubrir el gel completamente (50 ml-80 ml). Proteger la solución de tinción de la luz cubriéndolo con papel de aluminio o en oscuridad e incubar en la solución de 10-40 min a temperatura ambiente. En este protocolo de tinción los prelavados no son necesarios.

Finalmente se visualiza el gel en un transiluminador de UV a 300 nm y se fotografía con un lector de CCD (a la misma longitud de onda que el bromuro de etidio).

Como control negativo para cada muestra se trata con calor una alícuota incubando a 85 °C durante 10 min antes de realizar el ensayo de TRAP para inactivar la telomerasa. La telomerasa es una enzima sensible al calor por lo que puede ser evaluada por su resistencia al calor. En el siguiente esquema se muestra el protocolo de la detección de la actividad de la telomerasa:



En resumen, se cuantificó la concentración de proteína de cada extracto mediante el método Bradford usando el reactivo de BIORAD y tras realizar una PCR según las instrucciones del manual, con los productos de reacción se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturalizantes y tras ello se tiñó durante 30 minutos con bromuro de Etidio.

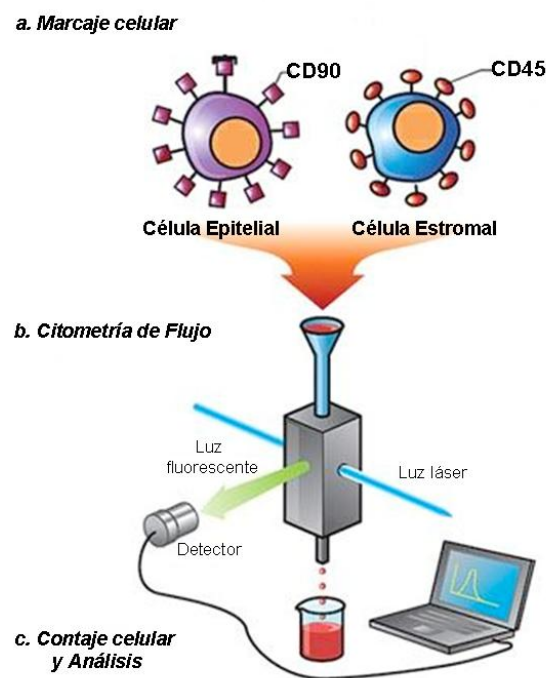
### **3.5 Caracterización fenotípica del endometrio humano.**

Para la realización de la caracterización fenotípica del endometrio humano tanto de la SP obtenida así como del endometrio humano completo se llevó a cabo una reacción antígeno-anticuerpo con las células vivas en suspensión. Los anticuerpos utilizados a lo largo de este apartado identifican marcadores de superficie celular. Y para llevar a cabo el inmunofenotipaje de las células usaremos técnicas de citometría de flujo ya descritas en el apartado 3.2.2.

#### **3.5.1 Fenotipado del endometrio con marcadores de células madre hematopoyéticas y mesenquimales**

Es el proceso para determinar marcadores expresados en la superficie celular. Esta detección se hace empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con un fluorocromo dirigidos al marcador que queremos evaluar. Para esto, es necesario aislar previamente las células a analizar. Tras la separación de la fracción epitelial y estromal del endometrio humano después de la digestión mecánica y enzimática, tal y como se ha indicado en el apartado 3.2.1, las células son mantenidas en tampón de bloqueo ( $10^6$  células en 100  $\mu$ L) PBS-BSA 5% (p/v) durante 30 minutos para bloquear los sitios de unión inespecífica, y se vuelven a centrifugar las células. Tras esto se resuspende la suspensión celular en solución de incubación de anticuerpo que se compone de PBS-BSA al 3% (p/v) y del anticuerpo correspondiente en cada uno de los casos a las concentraciones de trabajo establecidas tras la titulación de estos.

El análisis citométrico se llevó a cabo con una batería de anticuerpos ya ampliamente descritos en el área de las células madre hematopoyéticas y mesenquimales (ver figura 11). Se usaron CD34-PE y CD45-FITC para identificar el posible origen hematopoyético; CD90-PE y CD105-FITC para identificar el posible origen mesenquimal de las células analizadas. Además se analizó la presencia de BCRP-1, marcador característico de las células capaces de expulsar el colorante vital Hoechst (SP).



**Figura 11.** Representación gráfica del análisis citómico que se realiza para determinar el inmunofenotipo de las células epiteliales y estromales procedentes del endometrio humano.

Las concentraciones de trabajo determinadas tras la titulación de los anticuerpos correspondientes por cada test de análisis a cada uno de ellos son BCRP1-FITC (Chemicon MAB4155F, 15µL), CD90-PE (Chemicon CBL415P, 10µL), CD45-FITC (Chemicon MAB4205F, 15µL), CD34-PE (Chemicon CBL496P, 10µL) y CD105-FITC (Chemicon CBL418F, 10µL). Tras la

incubación de 60 minutos a 4°C, se centrifugó la muestra a 2.000 rpm durante 8 minutos y se resuspendió en PBS para llevarse a cabo el análisis en el citómetro de flujo.

El análisis del inmunofenotipo se llevó a cabo en un citómetro de flujo Cytomics FC500 MCL (Beckman-Coulter, Brea, CA) equipado con un láser de Argón (488 nm, 15 mW). Este instrumento está equipado con dos detectores de dispersión de luz, donde la dispersión frontal (FSC) es una medida proporcional al tamaño celular, y la lateral (SSC) es un indicador de la complejidad celular. De los 5 detectores de fluorescencia, se utilizaron el de 525 nm para los anticuerpos conjugados con FITC y el de 575 nm para los conjugados con PE. Con el fin de excluir las células muertas del análisis, las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) en el caso de los anticuerpos conjugados con FITC, o con 7-aminoactinomicina D (7-AAD) en los conjugados con PE. Para el PI se utilizó el detector de 625 nm y para el 7-AAD el de 675 nm. Las señales de FS y SS se recolectaron en escala lineal y para las de fluorescencia se utilizó la amplificación logarítmica.

### **3.5.2 Fenotipado de la SP con marcadores de células madre hematopoyéticas y mesenquimales.**

Tal y como se ha indicado en el apartado anterior el fenotipado es el proceso para determinar marcadores expresados en la superficie celular. En este caso también usamos las células epiteliales y estromales disgregadas desde el endometrio humano pero el inmunofenotipaje se realiza tras la incubación con Hoechst tal y como se ha indicado en el apartado 3.2.4. Transcurrido el periodo de incubación con Hoechst las células son tratadas del mismo modo que se indica en el apartado 3.5.1 e incubadas con los mismos anticuerpos. Tras esto las células son llevadas al citómetro de flujo para su análisis.

### 3.6 Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Las estadísticas descriptivas se obtuvieron a partir del análisis de los datos de los diferentes experimentos. Se calcularon, entre ellos la media y la desviación típica de la SP de las fracciones epiteliales y estromales.

Por otro lado, el porcentaje de SP presente en las fracciones estromales y epiteliales y la edad de la paciente se analizaron para comprobar si existía correlación lineal entre ambos. Este análisis se realizó mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Todos estos análisis fueron llevados a cabo mediante el uso de los programas informáticos siguientes: *Statistical Package for the Social Sciences for Windows, version 12.0* (SPSS, Chicago, EEUU) y el programa de estadística *MedCalc Software* (Ghent, Mariakerke, Bélgica). El nivel de significancia elegido *a priori* fue el de p-valor < 0,05.







# **V. RESULTADOS**

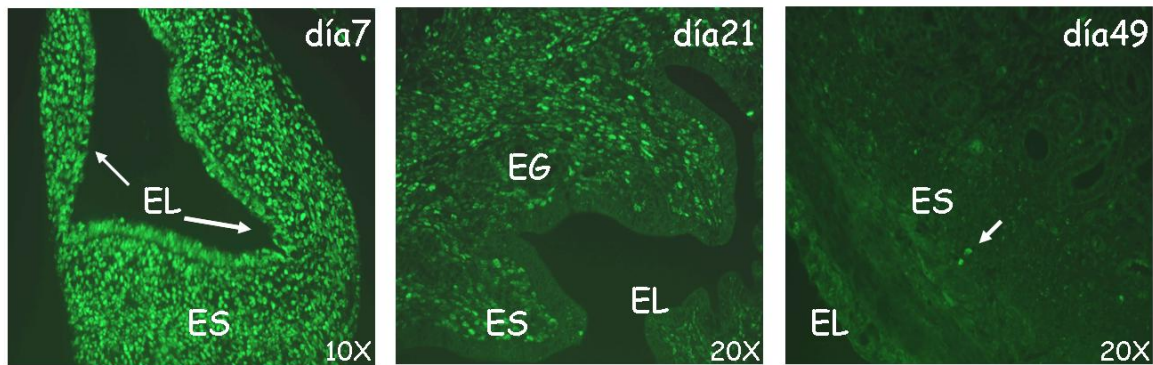


## V. - RESULTADOS

### 1. Identificación, caracterización y co-localización de las células madre somáticas en el endometrio murino.

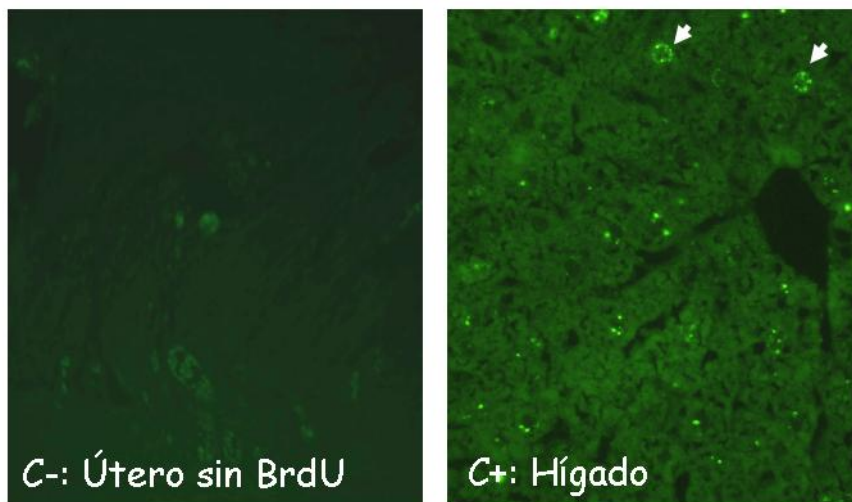
#### 1.1 Localización de células que retienen BrdU en el endometrio murino.

En el día 7 de vida de estos ratones, todas las células presentaban tinción de BrdU (figura 12). Así pues en los primeros días tras el marcaje todas las células aparecen de color verde, indicando que se han dividido y que han incorporado correctamente la sustancia marcadora. Apreciamos señal tanto en el epitelio como en el estroma del endometrio. El número de células que retenían el marcaje (LRC del inglés *label retaining cells*) disminuyó rápidamente en el endometrio murino durante el periodo pre-púber de estos animales (días 21 a 49). En el día 21 de vida, la zona epitelial perdía completamente la señal del BrdU y el número de células que retenían el BrdU decrecía notablemente en la región estromal (figura 10). A partir del día 21 post-tratamiento las células epiteliales perdieron totalmente la señal quedando exclusivamente marcadas las células estromales. Conforme crece el animal la señal va disminuyendo en todo el tejido analizado pero sigue presente en el estroma endometrial. El número de células marcadas decrece a lo largo de las siguientes semanas llegando finalmente a quedar marcadas solo aquellas que se hayan dividido muy poco o nada desde el inicio de la vida del animal y por lo tanto las candidatas a ser células progenitoras. En la edad adulta, desde el día 49 en adelante (días 54-64-68-77-84-90-98-106-112 y 118), sólo unas pocas células de la fracción estromal presentaban marcaje y estaban localizadas en la parte más profunda del endometrio. De este modo se pudieron identificar las células con ciclo de división lento en la edad adulta del animal, quedando estas restringidas a la parte estromal del endometrio murino.



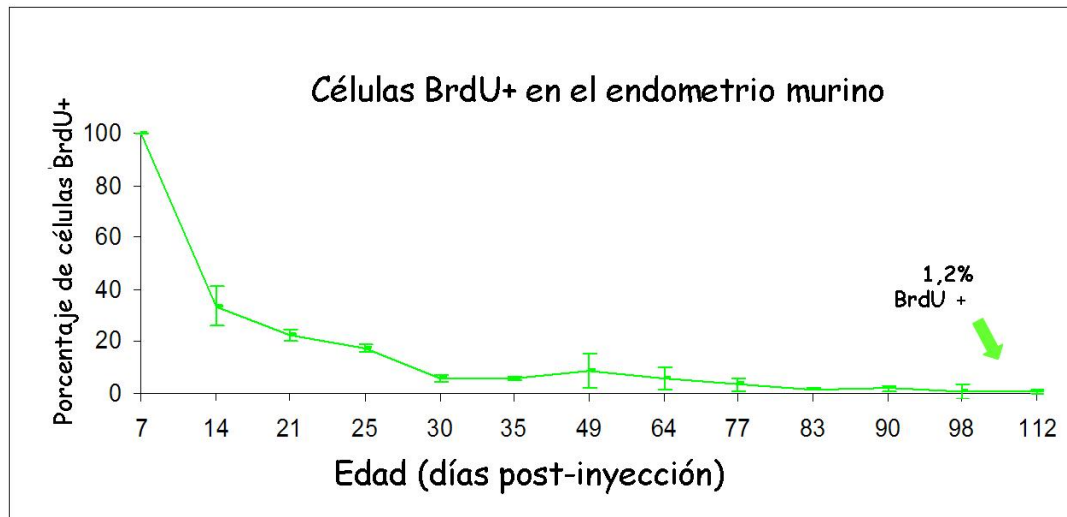
**Figura 12.** Células del endometrio murino que retienen el marcaje de BrdU a lo largo de la vida del animal. Imágenes correspondientes a los días 7, 21 y 49 post-inyección. EL: Epitelio Luminal, ES: Estroma y EG: Epitelio Glandular.

El hígado murino fue usado como control positivo para la tinción del BrdU, ya que las células madre somáticas en este órgano ya han sido descritas y correspondían con las células ovales de este tejido (Wang y col., 2003). Mientras tanto no se apreció señal en las secciones de tejido endometrial procedentes de ratonas sin tratar con BrdU (control negativo) (figura 13).



**Figura 13.** Controles usados en la detección de células que retuvieron el BrdU. C-: Es el control negativo de la técnica y se usaron úteros de ratonas sin tratar con BrdU. C+: Hígados de ratones tratados con BrdU dónde se identifica la señal en las células ovales de esos tejidos (flechas). Fotografías tomadas a 400X.

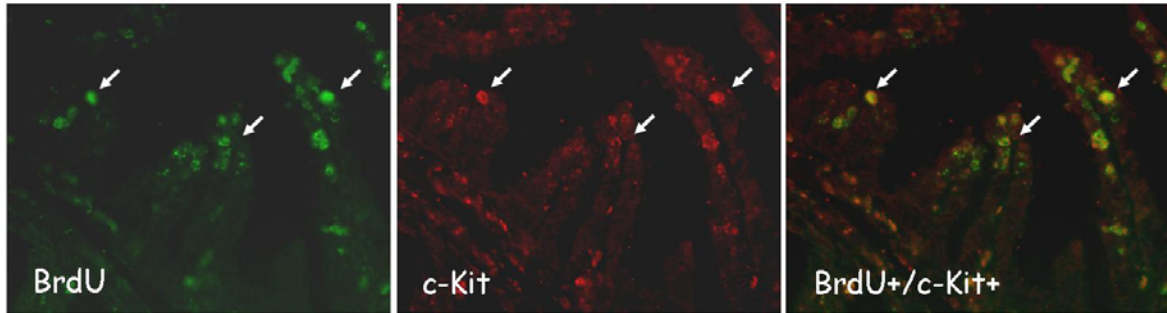
A lo largo de la vida del animal se puede observar una fuerte caída de la señal en las células que va desde  $34,0\pm 9,6\%$  en la edad pre-puberal a un  $8,6\pm 5,3\%$  en la edad adulta. El epitelio pierde completamente la tinción sobre la semana 3 de vida del animal; las células que retienen el marcaje en la zona estromal disminuyen bruscamente desde  $8,6\pm 5,3$  a  $1,2\pm 0,8\%$  entre el día 49 al día 112 (gráfico a).



**Gráfico a.** Descenso del porcentaje de células marcadas con BrdU con respecto a la edad del animal. En los últimos días analizados el porcentaje corresponde con 1,2% de células BrdU.

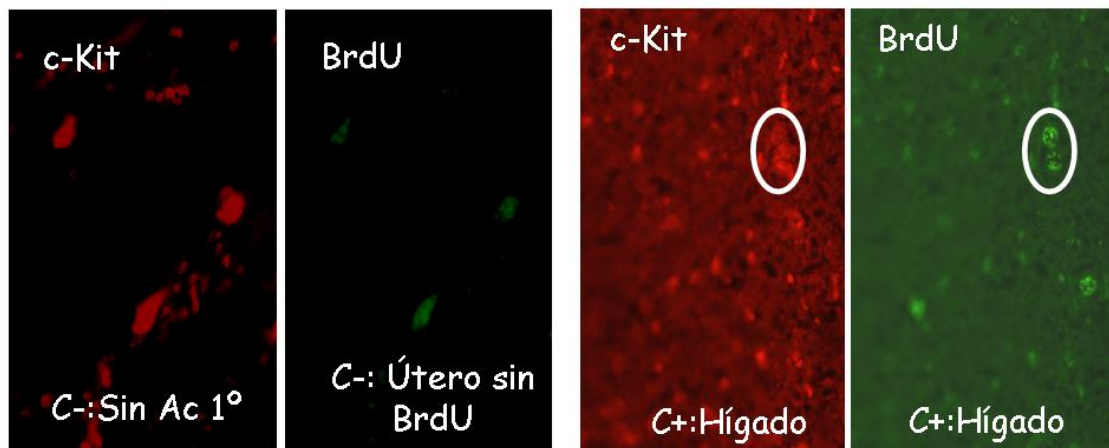
## 1.2 Co-localización de células BrdU+ con el marcador de indiferenciación c-KIT a nivel de proteína y de ARNm.

El receptor del stem cell factor c-KIT ha sido descrito en poblaciones de células madre hematopoyéticas en tejidos adultos y se expresa también en células multipotentes (Jackson y col., 2001). Las células BrdU positivas fueron identificadas por la presencia de tinción fluorescente verde en el núcleo y las células que expresaban c-KIT fueron identificadas por la presencia de señal roja fluorescente debida al TRITC en el citoplasma de estas. La co-localización de la señal de c-KIT/CD117 con BrdU demostró que este marcador de indiferenciación estaba presente en algunas de las células BrdU positivas situadas en la región basal del estroma endometrial (figura 14).



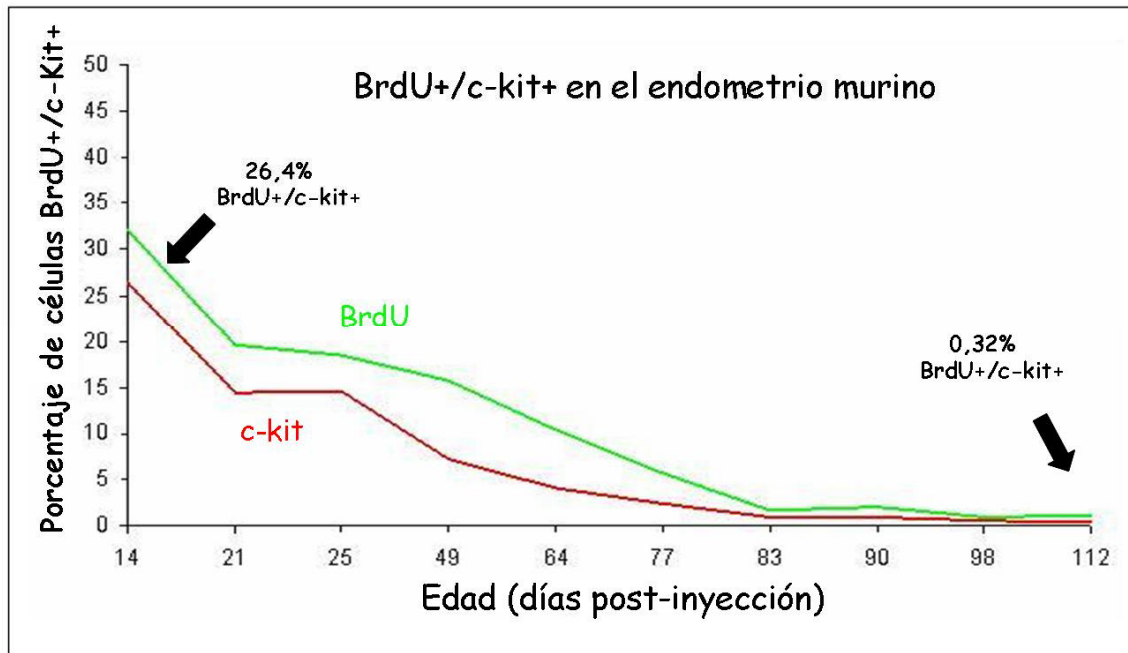
**Figura 14.** Células del estroma endometrial murino que retienen el marcaje de BrdU y que co-localizan con el marcador c-KIT en día 21 de vida del animal. La fluorescencia verde nuclear corresponde con BrdU y la roja citoplasmática con c-KIT. Fotografías tomadas a 400X.

El hígado fue también usado en este caso como control positivo de la señal de c-KIT, y el anticuerpo primario para este marcador fue omitido en el endometrio murino como control negativo (figura 15).



**Figura 15.** Controles usados en la detección de células que retuvieron el marcaje de BrdU y que co-localizaban con c-KIT. C-: Es el control negativo de la técnica y se usaron úteros de ratonas sin tratar con BrdU y omisión del anticuerpo primario en las secciones. C+: Hígados de ratones tratados con BrdU dónde se identifica la señal en las células ovales de esos tejidos (círculos) y co-localización con c-KIT. Fotografías tomadas a 400X.

Los porcentajes correspondientes a las células doblemente positivas (BrdU+/c-KIT+) se expresó como medias y error estándar en el gráfico b. Se apreció una disminución continua en las células doblemente positivas a lo largo de la vida del animal, llegando a  $0,3 \pm 0,4\%$  del total de las células BrdU positivas en los últimos días analizados (día 112).



**Gráfico b.** Porcentaje de células marcadas con BrdU y de las células positivas al marcador c-KIT con respecto a la edad del animal. Los porcentajes de co-localización para ambos marcadores disminuyeron notablemente a lo largo de la vida del animal llegando a representar el 0,32% de células BrdU+ y co-localizadas con c-KIT.

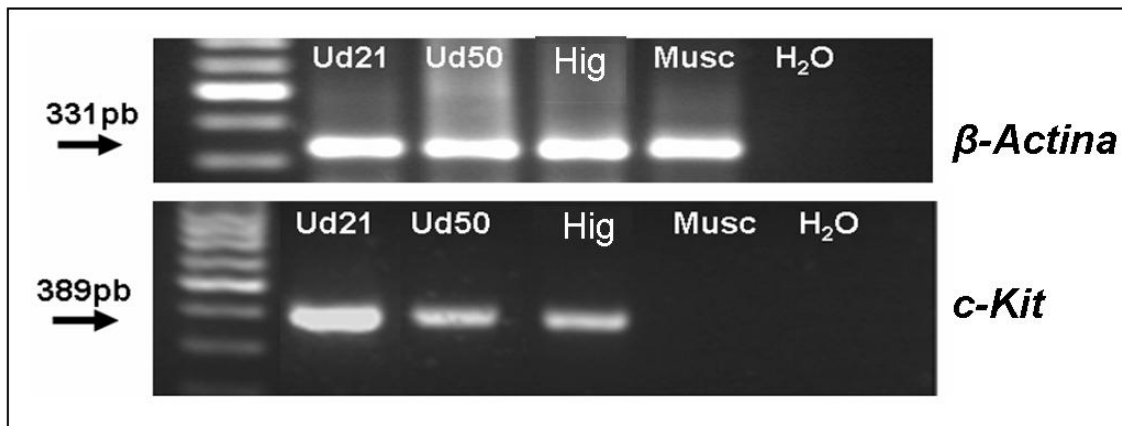
Finalmente los datos brutos correspondientes a las células marcadas con BrdU y co-localizadas con el marcador c-KIT son expresados como porcentajes a lo largo de estos ensayos de co-localización y se muestran en la tabla VI.



Edad en días	BrdU+	BrdU+/ c-Kit+
14	34±9,6%	26,4±7,9%
21	22,9 ±4,2%	14,4±2,3%
25	17 ±1,8%	14,6±3,5%
49	8,6± 5,3%	7,3±5,7%
64	5,3±3,7%	4,0±0,9%
77	3,0±2,0%	2,5±0,1%
83	1,7±0,6%	1,0±0,4%
90	2,2±1,5%	0,8±0,9%
98	3,4±2,3%	0,5±0,1%
112	1,7±0,8%	0,3±0,4%

**Tabla VI.** Porcentaje de las células marcadas con BrdU y de las células positivas al marcador c-KIT y al BrdU con respecto a la edad del animal. Los porcentajes de co-localización para ambos marcadores disminuyeron notablemente a lo largo de la vida del animal.

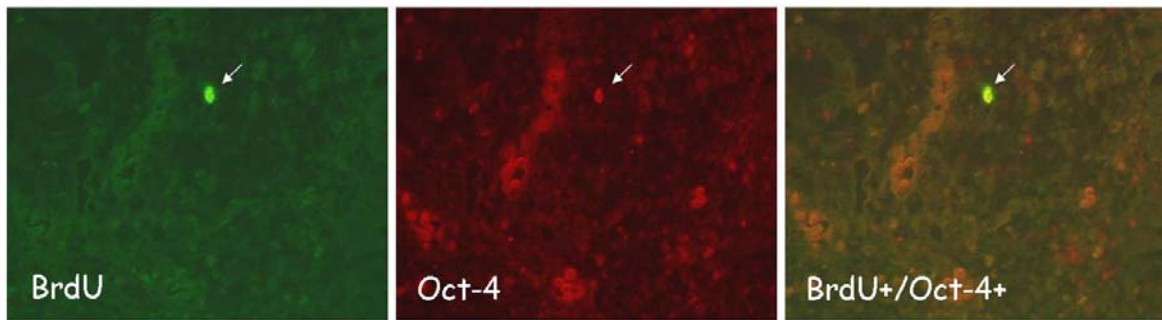
Los úteros fueron analizados por PCR en dos momentos de la vida del animal, correspondiendo con la pubertad (día 21) y la edad adulta (día 50). Antes de tratar las muestras con el marcador a analizar se realizó PCR del gen constitutivo  $\beta$ -actina para comprobar la presencia de ARNm en cada una de las muestras problema. Usando los cebadores que se indican en el apartado de Material y Métodos, la expresión de *c-Kit* fue detectada durante los periodos analizados en los endometrios murinos. El hígado se usó como control positivo de este marcador mientras que los controles negativos fueron músculo esquelético humano y agua bidestilada (figura 16). La identidad de los productos de la PCR se llevó a cabo por secuenciación.



**Figura 16.** Reacción en cadena de la polimerasa para los marcadores *c-Kit* y  $\beta$ -actina para las muestras correspondientes a endometrios murinos de los días 21 y 50. Ud 21: Úteros de ratón de día 21 de edad, Ud50: Úteros de ratón de día 50 de edad, Hig: Hígado de ratón, Musc: Músculo esquelético humano y H<sub>2</sub>O: Agua bidestilada.

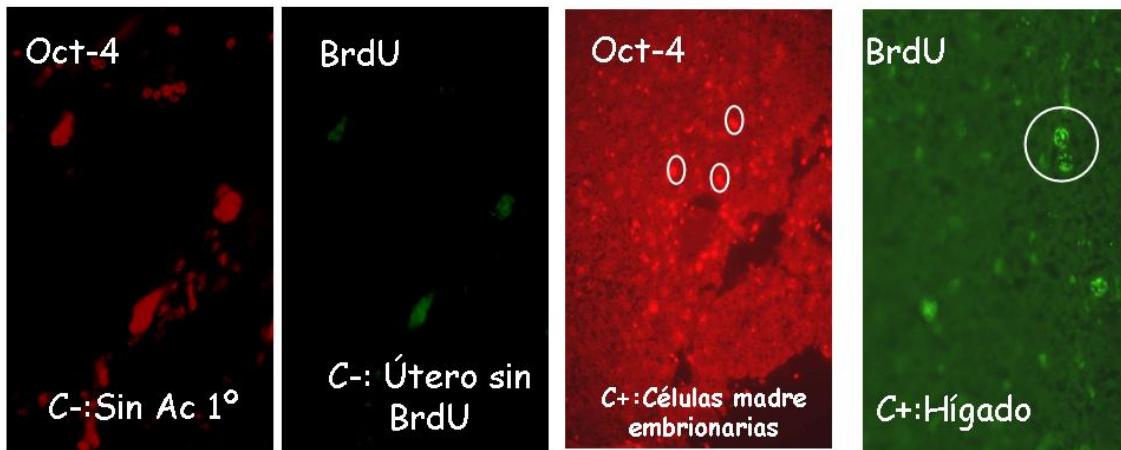
### 1.3 Co-localización de células BrdU+ con el marcador de indiferenciación POU5F1 a nivel de proteína y de ARNm.

El POU5F1 es un factor de transcripción nuclear típico de células indiferenciadas. Las células BrdU positivas fueron identificadas por la presencia de tinción fluorescente verde correspondiéndose con el FITC en el núcleo. Y las células positivas para POU5F1/OCT-4 fueron identificadas por presencia de señal roja fluorescente a nivel nuclear. La doble localización con BrdU se aprecia por la señal anaranjada debida a la superposición de los dos marcadores fluorescentes (figura 17).



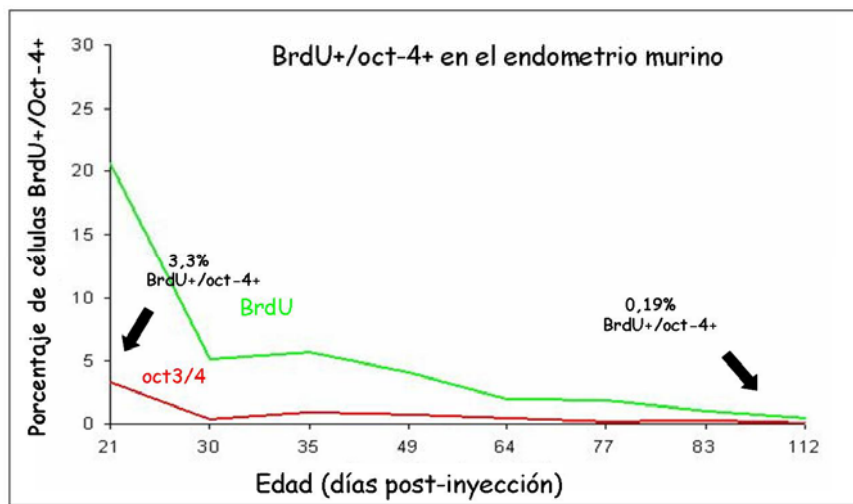
**Figura 17.** Células del estroma endometrial murino que retienen el marcaje de BrdU y que co-localizan con el marcador OCT-4 en día 49 de vida del animal. La fluorescencia verde nuclear corresponde con BrdU y la roja nuclear con OCT-4. Fotografías tomadas a 400X.

La línea de células madre embrionarias VAL-4 fue usada como control positivo y el endometrio murino en ausencia del anticuerpo primario fue usado como control negativo (figura 18).



**Figura 18.** Controles usados en la detección de células que retuvieron el marcaje de BrdU y que co-localizaban con OCT-4. C-: control negativo de la técnica, se usaron úteros de ratonas sin tratar con BrdU y omisión del anticuerpo primario en las secciones. C+ de OCT-4: Línea de células madre embrionarias. C+ de BrdU: Hígados de ratones tratados con BrdU dónde se identifica la señal en las células ovas de esos tejidos (círculos). Fotografías tomadas a 400X.

Este marcador de indiferenciación fue localizado en la región basal del estroma endometrial durante los diferentes días analizados, pero con porcentajes mucho menores en comparación con los obtenidos de las células c-KIT+/BrdU+. En el día 112 apreciamos un pequeño porcentaje de células positivas para OCT-4+/BrdU+ correspondiéndose con  $0,2 \pm 0,1\%$ .



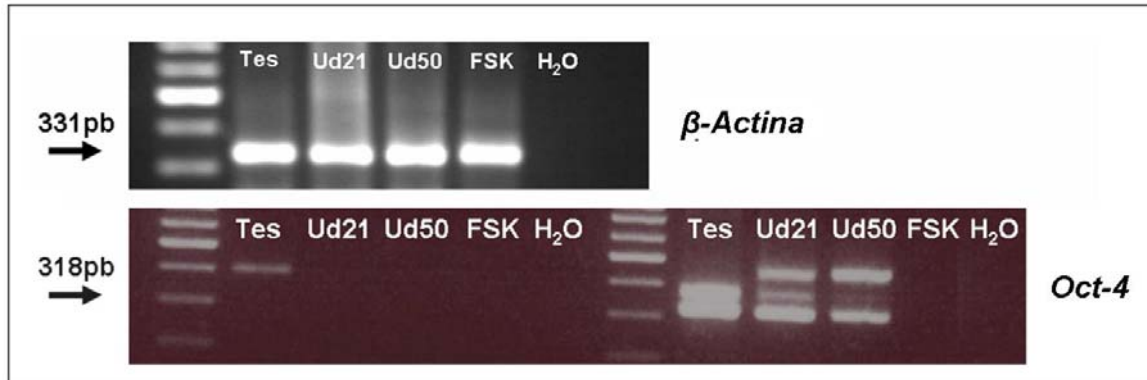
**Gráfico c.** Porcentaje de células marcadas con BrdU y de las células positivas para el marcador OCT-4 con respecto a la edad del animal. Los porcentajes de co-localización para ambos marcadores disminuyeron notablemente a lo largo de la vida del animal llegando a representar el 0,19% de células BrdU+ y co-localizadas con OCT-4.

Finalmente los datos brutos correspondientes al porcentaje de células marcadas con BrdU y co-localizadas con el marcador OCT-4 son expresados como porcentajes a lo largo de estos ensayos de co-localización y se muestran en la tabla VII.

Edad en días	BrdU+	BrdU+/ Oct-4
21	22,9±4,2%	3,3±2,4%
30	6,0±0,9%	0,4±0,3%
35	5,7±0,5%	0,9±0,3%
49	8,6±5,3%	0,7±0,5%
64	5,3±3,7%	0,5±0,1%
77	3,0±2,0%	0,2±0,2%
83	1,7±0,6%	0,3±0,1%
90	2,2±1,5%	0%
112	1,7±0,8%	0,2±0,1%

**Tabla VII.** Porcentaje de las células marcadas con BrdU y de las células positivas al marcador OCT-4 y al BrdU con respecto a la edad del animal. Los porcentajes de co-localización para ambos marcadores disminuyeron notablemente a lo largo de la vida del animal.

La *nested-PCR* reveló la presencia de *Pou5f1* a nivel de ARNm en los úteros murinos en los días 21 y 50. Antes de tratar las muestras con el marcador a analizar se realizó PCR del gen constitutivo  *$\beta$ -actina* para comprobar la presencia de ARNm en cada una de las muestras problema. Usando los cebadores que se indican en el apartado de Material y Métodos, la expresión de *Oct-4* fue detectada durante los periodos analizados en el endometrio murino. El testículo de ratón se usó como control positivo de este marcador mientras que no hubo expresión en células fibroblásticas procedentes del prepucio humano (FSK) o agua bidestilada (figura 19). Los productos de la PCR se secuenciaron para comprobar que realmente se correspondían con el amplificado deseado.



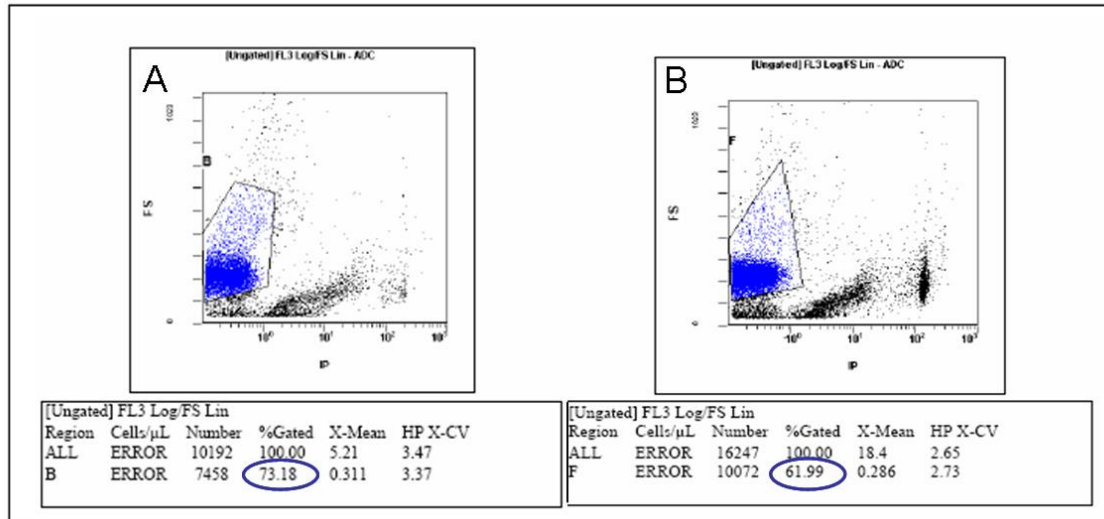
**Figura 19.** PCR y *nested-PCR* para los marcadores  $\beta$ -actina y Oct-4 para las muestras correspondientes a endometrios murinos de los días 21 y 50. Ud 21: Úteros de ratón de día 21 de edad, Ud50: Úteros de ratón de día 50 de edad, FSK: células fibroblásticas procedentes del prepucio humano, Tes: Testículo de ratón y H<sub>2</sub>O: Agua bidestilada.

## 2. Identificación, aislamiento y caracterización de candidatas a células madre somáticas en el endometrio humano.

### 2.1 Viabilidad y pureza celular.

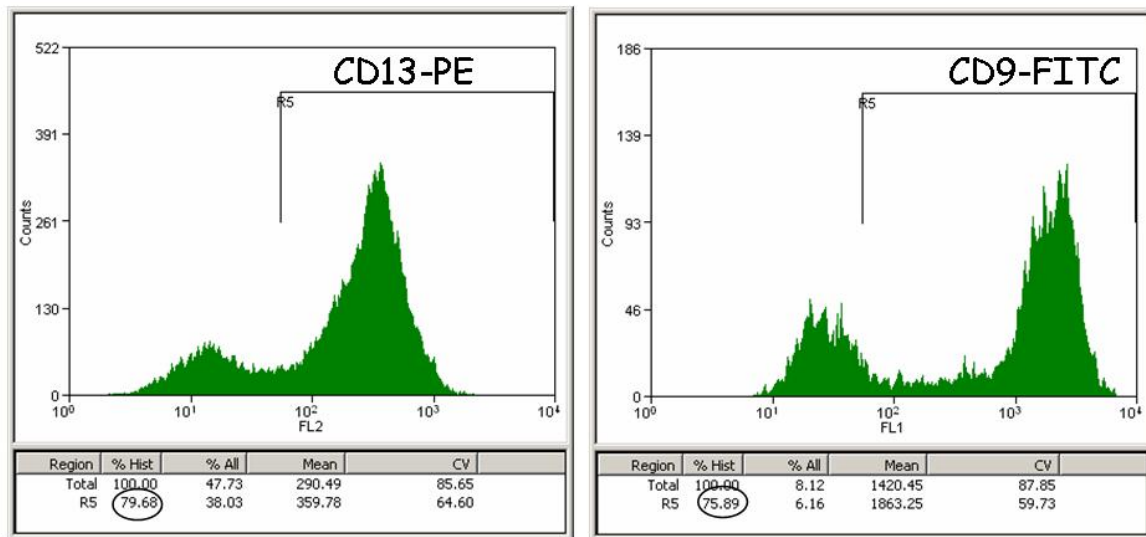
Tras la disgregación mecánica y enzimática de las muestras endometriales se procedió al análisis mediante citometría de flujo para conocer tanto la viabilidad celular así como la pureza de las muestras. La adición de yoduro de propidio a las suspensiones celulares permitió determinar el porcentaje de células vivas, que fue entre un 60-85%. La variabilidad en los resultados obtenidos es un dato que se correlaciona más con la heterogeneidad de las muestras (variabilidad inter-pacientes) que con los protocolos desarrollados. Al mismo tiempo se apreció que la viabilidad celular disminuía en torno a un 5-10% tras la incubación con el colorante vital Hoechst a 37°C lo que no ocurría tras la incubación con los diferentes anticuerpos a 4°C (figura 20). No obstante la viabilidad obtenida en todos los casos era lo suficientemente alta para realizar los estudios basados en la capacidad de

expulsión de un colorante vital descritos en el apartado de materiales y métodos.



**Figura 20.** Diagramas de viabilidad obtenidos por citometría de flujo que se basan en la fluorescencia roja emitida por las células que han incorporado el yoduro de propidio frente al tamaño de estas células. Se aprecian dos regiones en cada gráfica, la de la derecha correspondiente a fluorescencia alta y por lo tanto a incorporación de yoduro de propidio (células muertas). Y la región de la izquierda en cada gráfica, señalada mediante polígonos y que corresponde a las células que no emiten fluorescencia, que no capturan yoduro de propidio y que son las células vivas. En la gráfica A observamos la viabilidad de una muestra fresca tras la disgregación tisular, 73,18%, y en la gráfica B observamos la viabilidad de esa misma muestra tras la incubación de 90 minutos a 37°C del colorante vital Hoechst, siendo en este caso un 10% menor, 61,99%.

El análisis de la pureza de las suspensiones celulares, se llevó a cabo con el uso de anticuerpos específicos para cada una de las fracciones celulares descritas. Los marcadores CD9 y CD13 fueron usados como marcadores de superficie para identificar por separado las poblaciones de células epiteliales y estromales respectivamente en el endometrio humano (figura 21). El marcador CD9 es una glicoproteína de 24-27 kD expresada en la superficie celular del epitelio glandular a lo largo de todo el ciclo menstrual. Por otro lado el marcador CD13, conocido como aminopeptidasa N, se expresa en el estroma endometrial durante el ciclo menstrual (Kato y cols., 2007).



**Figura 21.** Marcaje de las células epiteliales y estromales provenientes del endometrio humano con sus respectivos anticuerpos específicos. Los datos obtenidos se señalan en la figura mediante círculos y corresponden a un 79,68% de células estromales positivas para el marcador CD13 y un 75,89% de células epiteliales positivas para el marcador CD9.

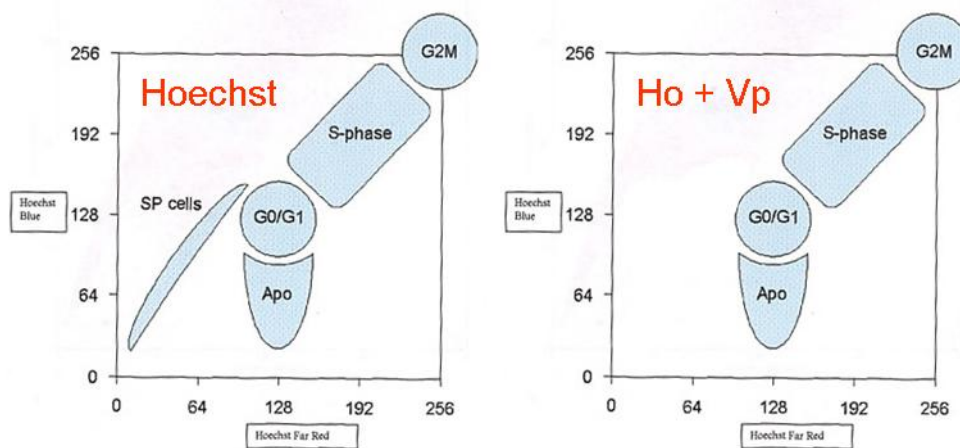
Diferenciaremos así las dos principales poblaciones celulares del endometrio humano. Los resultados obtenidos indicaron que las células de la fracción epitelial eran CD9 positivas en un porcentaje superior al 70%. Del mismo modo, las células del estroma humano eran CD13 positivas con un porcentaje mayor al 75% (figura 21 y tabla VIII).

Estos resultados avalan por un lado que las técnicas mecánicas y enzimáticas llevadas a cabo para la disgregación celular a partir de muestras endometriales humanas permiten realizar ensayos celulares de tipo vital ya que la viabilidad es suficientemente alta y por otro lado que las células a analizar y los métodos de separación celular son los propios para obtener células estromales y epiteliales desde el endometrio humano ya que la caracterización mediante inmunocitoquímica así lo ha demostrado.



## 2.2 Presencia y aislamiento de células SP en el endometrio humano.

Esta metodología se basa en la capacidad de expulsión del colorante vital que tienen determinadas poblaciones celulares, descrita en otros tejidos adultos para identificar la población de células madre somáticas. Se postula que las células indiferenciadas están enriquecidas en transportadores transmembrana del tipo *ABC transporters* y que son estos los responsables de la extrusión del Hoechst. En el diagrama digitalizado obtenido gracias al citómetro de flujo esta población se sitúa en una región lateral de ahí su nombre *Side Population*. El control negativo de la técnica se realiza mediante el uso de un bloqueador de los canales de membrana anteriormente citado denominado Verapamil (figura 22). Cuando la suspensión celular es incubada con Hoechst y Verapamil, la región lateral desaparece indicando esto que las células son incapaces de expulsar el colorante. Así pues se separaron desde suspensiones endometriales las poblaciones celulares correspondientes a la SP y a la Non-SP (NSP) para la realización de los análisis posteriores.

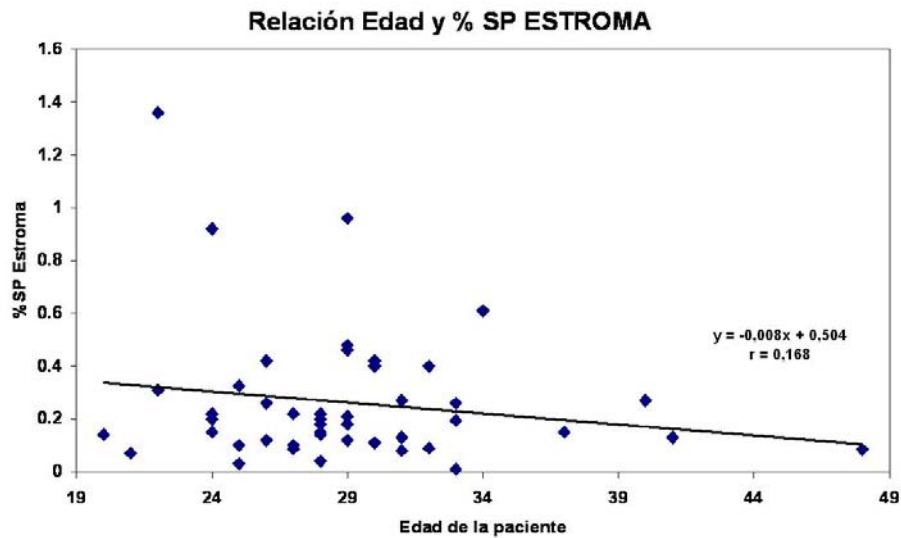


**Figura 22.** El verapamil inhibe los transportadores responsables de la expulsión del Hoechst desapareciendo la población capaz de expulsarlo (SP).

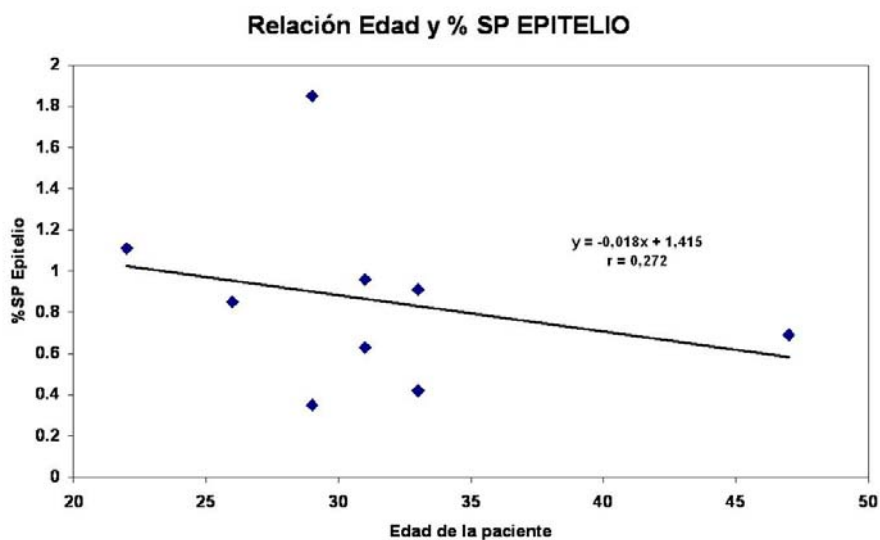
En un total de 53 muestras analizadas, la media de la SP de estroma fue de 0,33% con un rango entre 0,01%-1,36%. Por otro lado la media de SP de epitelio fue de un 1,00% con rango entre 0,35%-3,3% en un total de 14 muestras analizadas.

### 2.3 Análisis de Correlación entre SP y la edad de la paciente.

Una vez demostrada la presencia de células de la SP en las fracciones epiteliales y estromales del endometrio humano, tratamos de correlacionar los datos obtenidos con la edad de las pacientes (ver gráficas d y e).



**Gráfico d.** Estudio de la correlación lineal entre la edad de la paciente y el porcentaje de células que pertenecen a la *Side Population* en la fracción estromal del endometrio humano.



**Gráfico e.** Estudio de la correlación lineal entre la edad de la paciente y el porcentaje de células que pertenecen a la *Side Population* en la fracción epitelial del endometrio humano.

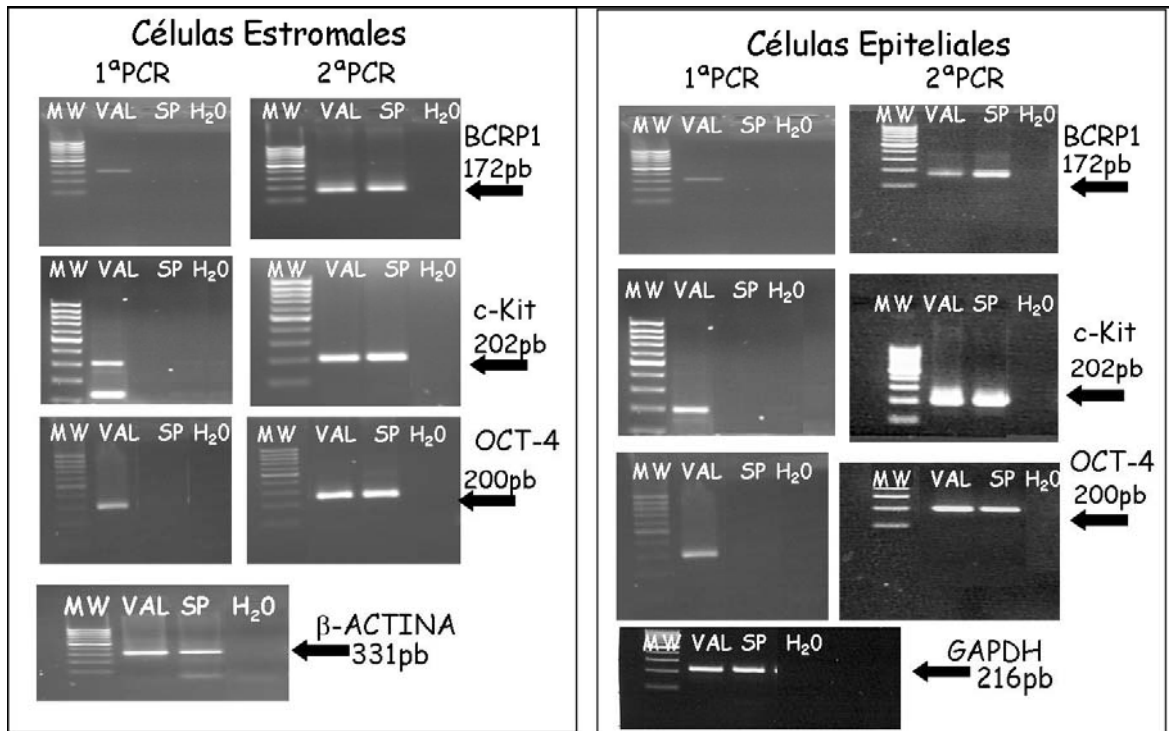
Los resultados permitieron concluir que no existe una correlación estadísticamente significativa entre el porcentaje de células SP del endometrio humano durante la vida reproductiva de la mujer.

#### **2.4 Presencia de células indiferenciadas en la región SP en el endometrio humano.**

Las suspensiones celulares obtenidas en los apartados anteriores referentes a la SP de las fracciones epiteliales y estromales se sometieron a PCR y *nested-PCR* para comprobar la existencia de marcadores típicos de indiferenciación.

Para ello se evaluó en las fracciones epiteliales y estromales la presencia de dos marcadores característicos de células madre como son *c-KIT* y *OCT-4*. *c-KIT* es un marcador típico de células madre hematopoyéticas y ha sido ampliamente descrito a lo largo de la literatura como marcador de indiferenciación del sistema hematopoyético. *OCT-4* es uno de los marcadores más destacados en las células madre embrionarias y pluripotentes. Además se comprobó la presencia de *BCRP-1* que sería el marcador responsable de la expulsión de Hoechst en las células aisladas. Antes de realizar este tipo de análisis se comprobó la integridad del ARNm por el uso de genes constitutivos en este caso *β-ACTINA* y *GAPDH*.

Los resultados obtenidos mostraron la presencia de *c-KIT*, *OCT-4* y *BCRP-1* en las suspensiones celulares aisladas así como en los diferentes controles positivos utilizados en esta técnica (figura 23). Tanto en las muestras correspondientes a estroma como a epitelio las técnicas semi-cuantitativas permitieron identificar la expresión de estos marcadores a nivel de ARNm.



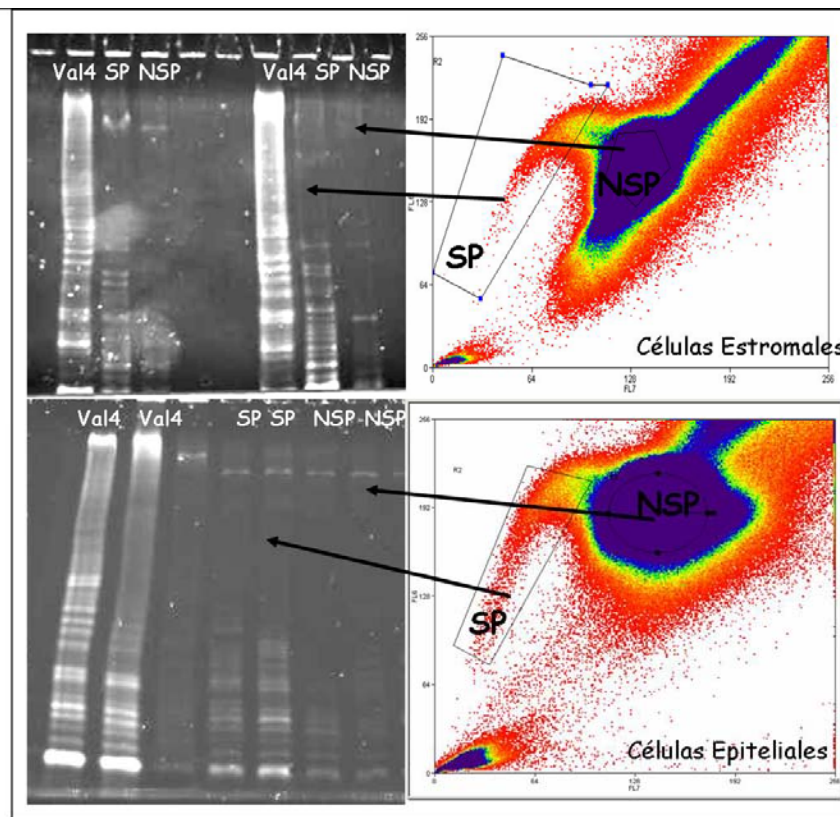
**Figura 23.** PCR y *nested-PCR* de las células estromales y epiteliales del endometrio humano aisladas por citometría de flujo y que corresponden con la SP. Análisis de los marcadores *BCRP-1*, *c-Kit* y *OCT-4*; así como de los genes constitutivos *GAPDH* y *b-ACTINA*. MW: marcador de pesos moleculares, VAL-4: Línea de células madre embrionarias, SP: Células estromales de la *Side Population* y H<sub>2</sub>O: agua bidestilada.

En el control positivo (línea de células madre embrionaria VAL-4) (Valbuena y cols., 2006) se detectó la presencia de estos marcadores. Del mismo modo, en los controles negativos así como cuando usamos agua bidestilada la expresión de estos marcadores fue nula.

## 2.5 Detección de la actividad telomerasa en células SP del endometrio humano.

La actividad telomerasa de la SP aislada se detectó tal y como se indica anteriormente. En este caso se trataron también las células de la región NSP y que por lo tanto no eran capaces de expulsar el Hoechst para conocer la relación comparativa entre ambas poblaciones celulares. Se utilizó la línea de

células madre embrionarias VAL-4 como control positivo de la actividad telomerasa.

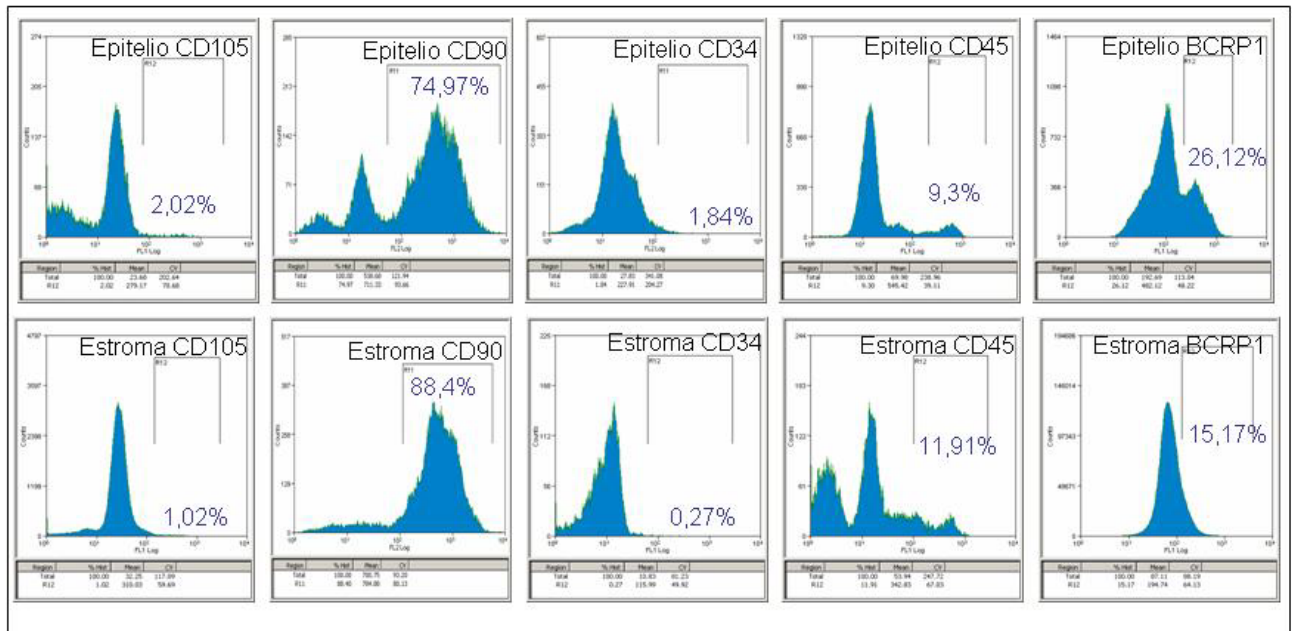


**Figura 24.** Detección de la Actividad Telomerasa en las células SP y NSP del epitelio y estroma del endometrio humano. VAL-4: Línea de células madre embrionarias, SP: Células de la *Side Population* y NSP: Células de la *Non Side Population*.

Los resultados obtenidos permitieron determinar que la actividad telomerasa de las células de la región SP tenían un perfil intermedio en las longitud de sus telomeros (indicativo de la cantidad de veces que se han dividido) entre células madre embrionarias y células adultas diferenciadas (región NSP). Demostrando este bandeo resultante que las células de la región SP se encontraban en un estado de indiferenciación más próximo a las células madre embrionarias que a las diferenciadas (NSP).

## 2.6 Origen de las células indiferenciadas del endometrio humano.

Para determinar el origen de las células madre somáticas aisladas mediante el método de Hoechst se procedió al fenotipado con marcadores de indiferenciación del linaje hematopoyético y mesenquimal, y también con el marcador característico del fenotipo de la SP (BCRP1) (figura 25).



**Figura 25.** Diagramas y resultados obtenidos mediante citometría de flujo de los diferentes marcadores usados en este apartado.

Para ello las muestras celulares fueron analizadas con los anticuerpos CD34, CD45, CD90 y CD105, así como BCRP1 tal y como se muestra en los resultados de la tabla VIII.

	Epitelio	SP Epitelio	Estroma	SP Estroma
CD9	+++		-	
CD13	-		+++	
CD34	-	-	-	-
CD45	-	-	+	-
CD90	+++	++	++++	+++
CD105	-	-	-	-
BCRP1	+	+	+	+

**Tabla VIII.** Fenotipado de las células SP del epitelio y estroma con diferentes marcadores y mediante técnicas de citometría de flujo. Los porcentajes obtenidos corresponden a medias tras diferentes análisis; los datos obtenidos tal que <10% se consideraron negativos; los obtenidos entre 10-25% fueron considerados positivos (+), entre 25-50% se indican como ++, los porcentajes >50% se indican como +++ y finalmente los >75% ++++.

Los resultados indicaron que el origen de las células indiferenciadas estromales y epiteliales del endometrio humano era mesenquimal ya que las poblaciones totales así como las correspondientes a la SP expresaban el marcaje de CD90, siendo este característico de la línea mesenquimal.







# **VI. DISCUSIÓN**



## VI.- DISCUSIÓN

El reconocimiento de las células madre somáticas en tejidos y órganos adultos es una tarea compleja pero relevante en el área de la Medicina Regenerativa. Diferentes estudios procedentes de diversos países están centrados en la búsqueda de estas células somáticas en casi todos los tejidos adultos existentes. En el área de la Medicina Reproductiva, la hipótesis de la existencia de células madre somáticas en el tejido endometrial ha sido planteada desde hace décadas y es en estos últimos años cuando más avances ha experimentado.

### ***Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano a partir de estudios funcionales.***

La clonogenicidad es la capacidad de una única célula para dar lugar a un crecimiento clonal cuando son cultivadas a densidades extremadamente bajas o en diluciones límite. Estos ensayos de formación de colonias han sido ampliamente utilizados para caracterizar células madre hematopoyéticas, y proporcionan un buen método para asegurar el potencial de formar clones de células adultas cuando son caracterizadas por primera vez como candidatas a células madre en cualquier tejido u órgano.

Estos ensayos se basan en la capacidad que tiene una célula para formar clones de sí misma (CFU, *colony-forming cell/unit*) y/o para auto-renovarse a través de divisiones durante la formación de colonias o en un trasplante. Además las células hijas tienen la misma capacidad de iniciar colonias a partir de diluciones límite. Las células madre somáticas deberían auto-renovarse múltiples veces y por lo tanto sufrir múltiples series de clonaciones. Estas técnicas identifican células madre somáticas, la diferencia está en la cantidad de veces que ellas pueden renovarse.

Los primeros estudios relativamente recientes demostrando que la capacidad regenerativa del endometrio humano esta mediada por células

madre somáticas se basaron en ensayos funcionales (Chan y col., 2004; Schwab y col., 2005; Gargett 2004). Usando suspensiones celulares purificadas procedentes de histerectomías se demostró que solo el  $0,22\pm 0,07\%$  de las células epiteliales endometriales formaban colonias individuales tras ser cultivadas 15 días a densidad clonal; mientras que el  $1,25\pm 0,18\%$  de las células estromales endometriales formaban colonias individuales (Chan y cols., 2004). Además estas células formaban dos tipos de colonias tanto en las fracciones epiteliales como estromales. Las colonias grandes con más de 4.000 células eran escasas, contenían células pequeñas que estaban densamente empaquetadas y presentaban alta contenido en núcleo-citoplasma indicando que probablemente eran candidatas a células madre somáticas. Las colonias más comunes eran las pequeñas y contenían células grandes con bajo contenido núcleo-citoplasma indicando que probablemente eran iniciadas por células más maduras, probablemente células TA.

### ***Estudios de diferenciación a partir de células endometriales.***

Wolff y cols. (2007) demostraron la existencia de células madre multipotentes en el endometrio humano gracias a la diferenciación *in vitro* a condrocitos. Por definición, las células madre son capaces de diferenciarse en múltiples tipos celulares así como auto-replicarse. Aunque evidentemente los tejidos endometriales parecen poseer células madre somáticas, el potencial de multipotencia de estas células aún no había sido demostrado. Para ello se aislaron células de la parte estromal del endometrio y se cultivaron hasta alcanzar un 70-90% de confluencia, se tripsinizaron las células y se transfirieron a tubos cónicos. Tras centrifugación el pellet obtenido fue cultivado en placas con medio de cultivo de condrocitos, en presencia de dexametasona, ácido ascórbico y TGF $\beta$ 2-3. Se mantuvieron en cultivo durante 3-21 días y finalmente se procedió a la identificación de los tipos celulares obtenidos. A través de inmunohistoquímica se detectó la presencia de marcadores expresados únicamente en el cartílago articular como el colágeno tipo II.

Un estudio publicado paralelamente aisló células del estroma humano que expresaban marcadores de células perivasculares y que tenían características de células madre mesenquimales, entre ellas la diferenciación a diferentes

tipos celulares (Schwab y col., 2007). Diferentes marcadores fueron utilizados individualmente o en combinación para aislar células madre mesenquimales de diferentes tejidos entre ellos CD146 y PDGF-R $\beta$  (cadena beta del receptor del *platelet-derived growth factor*). En este trabajo se hipotetiza que en el estroma endometrial humano podrían existir células madre mesenquimales responsables mensualmente de la regeneración del estroma y de la vasculatura endometrial. Para ello las células estromales que expresaban los marcadores CD146 y PDGF-R $\beta$  son aisladas por citometría de flujo y son sembradas en cultivo a densidad de 100 células/cm<sup>2</sup>. Los clones formados son seleccionados y re-sembrados para incrementar el número de células, bajo estas condiciones las células son mantenidas en medios de cultivo de inducción a diferenciación osteogénica, adipogénica y miogénica. Además las células estromales del endometrio que expresaban los citados marcadores fueron analizadas por citometría de flujo para conocer su fenotipo. Finalmente en este estudio se demostró que las células aisladas presentaban características de células madre mesenquimales ya que se diferenciaron a células procedentes del músculo, hueso y cartílago; y además presentaban marcadores típicos de mesenquimales como son CD29, CD73, CD44, CD90 y CD105.

### ***Estudios con marcadores de indiferenciación.***

En la actualidad no existen marcadores fenotípicos específicos de células madre somáticas, lo que supone un requisito para la identificación *in situ* de poblaciones de células madre en el tejido endometrial, aislar estas poblaciones puras de células madre para su caracterización y eventual uso en aplicaciones médicas basadas en terapia celular. Es importante destacar que la expresión de un marcador de célula madre somática no está necesariamente implicado en la actividad de estas células, es más, marcadores actuales conocidos de células madre somáticas son también expresados en células maduras (como por ejemplo el CD34 para hematopoyéticas y este mismo marcador para células maduras de endotelio).

En el endometrio humano, Cho y cols. (2004) estudiaron la expresión de diferentes marcadores de indiferenciación como c-KIT y CD34. El protooncogen c-KIT /CD117 codifica un receptor transmembrana tirosina kinasa cuyo ligando es el *stem cell factor*. Este puede tener un amplio rango de efectos sobre células germinales, melanocitos y células hematopoyéticas primitivas y se considera un marcador de células madre. Por su parte, CD34 está generalmente co-expresado con CD117 en células madre hematopoyéticas. En este estudio se demostró la presencia continuada de células madre somáticas en el endometrio humano desde el periodo fetal debido a la presencia de estos marcadores. Las células estaban localizadas principalmente en la región basal del estroma evitándose así la pérdida de estos tipos celulares durante la descamación cíclica que sufre este tejido debido a cambios hormonales.

En 2006, Matthai demostró la existencia de células OCT-4 positivas en el endometrio humano. El factor de transcripción OCT-4 es crucial para el mantenimiento de pluripotencialidad de las células y se conoce por su expresión en células madre embrionarias, germinales y en el embrión en diferentes estados. Este estudio fue el primero en demostrar la presencia de OCT-4 en el endometrio humano principalmente en la región estromal a través de inmunohistoquímica y ARNm.

### ***Estudios funcionales en ratones inmunodeprimidos.***

Los ratones inmunodeficientes tienen la capacidad de recibir trasplantes de células o tejidos de otras especies sin que se produzcan rechazos; posibilitando así el estudio *in vivo* de esos implantes. Los estudios funcionales consisten en la inyección de células humanas o fragmentos de tejidos lo que permite los estudios de caracterización necesarios de esos trasplantes.

El trabajo más reciente que demuestra la reconstrucción de tejido funcional procedente de endometrio humano en un modelo animal fue elaborado por Masuda y cols (2007). Estos autores demostraron la

regeneración del endometrio humano desde suspensiones de células endometriales inyectadas en la cápsula renal de ratones inmunodeprimidos (cepa NOD/SCID/ $\gamma C^{null}$ ). Además las estructuras endometriales formadas sufrían cambios hormono-dependientes, incluyendo proliferación del tejido endometrial, diferenciación y rotura del tejido endometrial como consecuencia de la menstruación. Estos resultados indican que las suspensiones celulares endometriales tienen importantes implicaciones en la reconstrucción del tejido endometrial funcional, la angiogénesis, y la formación de vasos quiméricos humano-ratón. El potencial de células disociadas endometriales para reconstituir el tejido endometrial conduce a la posibilidad de que células madre somáticas endometriales presentes en todo el tejido endometrial puedan participar en la regeneración fisiológica del endometrio.

### ***Nuestro trabajo.***

La tarea de buscar las células madre somáticas candidatas relacionadas con la proliferación y regeneración tisular no es nada sencilla. Esto se debe a que no existen marcadores específicos que puedan identificarlas. Por ello el análisis y la identificación de estas en un modelo murino constituyen la herramienta ideal para poder iniciar el estudio en el modelo humano.

El modelo animal ha permitido por un lado identificar la existencia de células madre somáticas en el endometrio murino, así como conocer su localización. Siendo además caracterizadas estas a nivel molecular mediante el uso de marcadores de indiferenciación. El modelo para la identificación de células madre somáticas se basa en el hecho de son células con ciclo de división lento, y que por lo tanto bajo la acción de una sustancia marcadora de ADN (BrdU) en el momento del nacimiento se pueden detectar aquellas que se dividen poco en momentos más tardíos de la vida del animal. A lo largo de nuestro estudio identificamos una población de células que retenían el marcaje en el endometrio murino y que estaba localizada en la capa basal del compartimento endometrial. Además estas mismas células, que ya contenían el marcaje en días tardíos de la vida del animal, expresaban marcadores de indiferenciación. Los porcentajes correspondientes a las células que retenían el



marcaje durante la vida adulta del ratón decrecían desde el día 49 hasta el día 112, siendo estos  $8,6\pm 5,3\%$  a  $1,7\pm 0,8\%$ , además las células estaban localizadas únicamente en el compartimento estromal. El epitelio perdía totalmente el marcaje de BrdU alrededor de la semana 3 de vida (Cervelló y cols 2007).

Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo fueron publicados simultáneamente con los de otro grupo australiano y siendo ambos consistentes con las publicaciones recientes sobre el tema tratado (Chan y cols., 2006).

Otro de los resultados importantes que nos facilitaron nuestros estudios es que el porcentaje de las células madre somáticas decrece con la edad. Este fenómeno ya ha sido demostrado en la piel (Yano y cols., 2005) e indica la extenuación de esta población durante la vida del animal, sugiriendo así que la división asimétrica está presente en las células madre somáticas endometriales. Como ya se ha observado en el apartado de resultados, las células que retenían el marcaje de BrdU también expresaban marcadores típicos de indiferenciación.

c-KIT (CD117) es un receptor de membrana del factor de células madre SCF (*stem cell factor*), se ha demostrado que la activación del c-KIT juega un papel crítico en diferentes funciones celulares, incluidas la proliferación, la diferenciación, y la adhesión. CD117 se identificó originalmente como un antígeno asociado a la leucemia mieloide aguda, identificándose también como un marcador de los mastocitos tisulares, células madre hematopoyéticas y células progenitoras en médula ósea humana normal. La mayoría de las células de médula ósea CD117-positivas (50-70%) coexpresan el CD34; entre ellas se incluyen las células progenitoras y sus precursoras de todos los linajes hematopoyéticos. Este marcador fue también descrito como marcador de indiferenciación en el endometrio humano (Cho y cols., 2004). La expresión de este marcador estuvo presente en las células que retenían el marcaje de BrdU. La expresión de c-KIT fue localizada en las células de la región basal del estroma y representaron un 0,32% de células doblemente marcadas en la edad

adulta. La expresión de este marcador fue también demostrada mediante técnicas moleculares.

El factor de transcripción POU5F1 (OCT-4) tiene un papel clave en las células madre embrionarias, ya que actúa como regulador de los genes que las mantienen en estado indiferenciado. No obstante, dicha proteína también se ha localizado en células madre somáticas. Así, han comprobado que OCT-4 es esencial para mantener la pluripotencialidad de las células embrionarias. Por lo tanto se le ha relacionado con el mantenimiento de pluripotencia en las células embrionarias y germinales y existe una estrecha relación entre la expresión del gen *OCT-4* y el grado de indiferenciación de las células. En este estudio se han co-localizado células OCT-4 positivas con células que retenían el marcaje de BrdU, indicándonos el alto grado de indiferenciación que tenían estas células en los tejidos endometriales murinos estudiados. La expresión de OCT-4 fue localizada únicamente en la capa basal del estroma y representaba un 0,12% de las células doblemente marcadas en día 112.

En el endometrio humano la forma de buscar esta población celular fue mediante la técnica de la *Side Population* (SP). Esta se detecta por la capacidad de las células para expulsar de su interior el fluorocromo Hoechst-33342, colorante permeable a la membrana plasmática que se utiliza para determinar el contenido de ADN de las células vivas. Es un colorante específico de ADN y tiene una unión preferente por las bases A-T. Las células madre somáticas presentan una expresión elevada de unos transportadores de membrana que protegen a las células de agentes citotóxicos (transportadores ABC: *ATP-binding cassette*) como el ABCG2/BCRP1 (*breast cancer-resistant protein 1*). Gracias a ello, al usar el fluorocromo Hoechst 33342 se identifica la población SP de baja fluorescencia, enriquecida en células madre. Para confirmar que la población de baja fluorescencia se corresponde con la SP, estas células se incuban con verapamil, inhibidor de algunos transportadores ABC, por lo que la población SP desaparece en presencia de verapamil.

Las muestras obtenidas desde el modelo humano fueron tratadas para su análisis por citometría de flujo. Se comprobó en este estudio por primera vez

la existencia de una población SP en el endometrio humano tanto en la fracción epitelial como en la fracción estromal. Las células correspondientes con la *Side Population* fueron aisladas en el citómetro de flujo tras comprobar tanto una adecuada pureza (estábamos estudiando células epiteliales y células estromales provenientes del endometrio humano) como una alta viabilidad de la suspensión celular. Los resultados de correlación entre los porcentajes de la SP de las fracciones epitelial/estromal y la edad de la mujer permitieron conocer que no existe correlación lineal entre ambas variables. Sin embargo en ambas fracciones se intuía una disminución no estadísticamente significativa. Todo esto nos sugiere que estamos identificando una población que permanece estable a lo largo de la edad reproductiva de la mujer.

Las muestras de SP obtenidas fueron analizadas mediante marcadores moleculares típicos de indiferenciación. Los diferentes análisis permitieron concluir que las células de la SP presentaban marcadores de indiferenciación como c-KIT y OCT-4. Los análisis de la telomerasa identificaron un patrón de actividad telomerasa intermedio para las células de la SP. Las células madre embrionarias analizadas presentaban un patrón de actividad telomerasa típico de células indiferenciadas sin embargo las células diferenciadas y que se correspondían con la NSP no presentaban ese patrón característico; deduciéndose el diferente grado de indiferenciación entre ambas poblaciones. Las células provenientes de la SP presentaban un patrón de actividad telomerasa intermedio al de ambas poblaciones descritas, esto indicaba el grado de indiferenciación intermedio de esta población.

Finalmente uno de los objetivos pendientes era la identificación mediante el inmunofenotipado del origen de estas células endometriales. Para ello se realizaron análisis con marcadores típicos de células madre hematopoyéticas y de células madre mesenquimales. La expresión de CD45 y CD34 indica un origen hematopoyético, sin embargo la expresión de CD90 y/o CD105 junto con la baja o nula expresión de CD34 y CD45 indica un origen mesenquimal. Tras el análisis citométrico, los resultados permitieron concluir que la mayoría de las células analizadas y que correspondían con la SP tenían el marcador de superficie CD90, indicando que estas tenían un origen mesenquimal.

***Perspectivas clínicas.***

La proliferación de tejido endometrial de forma anómala está asociada a un gran número de alteraciones ginecológicas. Es posible que las células madre somáticas endometriales jueguen un papel en la fisiopatología de determinadas enfermedades ginecológicas como la endometriosis y/o la adenomiosis (Gargett, 2004). Las variaciones en el número, función, regulación y localización de estas células madre somáticas epiteliales y/o estromales podrían ser las responsables de algunos de estos trastornos uterinos.

La endometriosis se define como el crecimiento ectópico del endometrio fuera de la cavidad uterina, se trata de una enfermedad ginecológica común y afecta al 10% de las mujeres. A pesar de que es una enfermedad común poco se sabe acerca de su patogénesis. La teoría sobre la etiología de la endometriosis proviene de que células endometriales viables son vertidas a la cavidad peritoneal a través de la menstruación retrograda que ocurre en el 90% de las mujeres (Giudice y Kao, 2004), sugiriendo que en algunas de ellas parte de este fluido es capaz de establecer implantes endometrióticos. Es bastante probable que en las mujeres que padecen endometriosis, las células madre somáticas endometriales jueguen un papel importante dando lugar a implantes endometrióticos (Gargett 2004). Esta hipótesis del posible origen de la enfermedad en las células madre somáticas endometriales se ve reforzada con los estudios que establecen la monoclonalidad de algunas lesiones endometrióticas y las evidencias de que la endometriosis puede derivar en carcinomas endometriales (Van Gorp y col., 2004). Además también se ha demostrado la presencia de células clonogénicas cultivadas a largo plazo procedentes de tejidos afectados con endometriosis (Tanaka y col., 2003b).

La adenomiosis es una patología en la que la capa basal endometrial invade el tejido miometrial, y afecta a un 1% de las mujeres. Normalmente se suele asociar con hiperplasia del músculo liso. Es posible que células madre somáticas endometriales o las células de su nicho se comporten de manera anómala en este tipo de patología. Estas células madre potenciales podrían tener el nicho orientado erróneamente lo que produciría que la progenie que

derive de él y que se vaya diferenciando a lo largo del tiempo se desplace hacia la capa miometrial en vez de hacia la capa endometrial funcional, produciéndose así zonas ricas en tejido endometrial situadas en regiones muy localizadas y profundas del miometrio.

Todo esto da lugar a un interés cada vez más creciente en investigadores, ginecólogos y oncólogos ya que sostiene el concepto de que los cánceres contengan un número de células con propiedades de células madre y que estas sean las responsables tanto del crecimiento como de la diseminación celular en este tipo de patologías. Existen además un gran número de similitudes entre las células madre somáticas en tejidos normales y las células madre cancerosas. Las células madre cancerosas tienen periodos de vida largos, enorme potencial proliferativo y capacidad de auto-renovación sugiriendo que sean capaces de expandir la población de células del cáncer, si bien también podrían permanecer en estado quiescente y proliferar en determinadas condiciones. Estas similitudes en la capacidad proliferativa también darían lugar a una progenie de células cancerosas con limitado potencial proliferativo como las que forman parte de la masa celular del cáncer (Reya y col., 2001). Algunas de las características de los carcinomas pueden ser explicadas a través de las células madre, entre ellas estaría el origen clonal y la heterogeneidad de los tumores, ya que muchos de ellos pueden estar asociados a células TA o a la progenie de las somáticas; otras características serían la posible influencia mesenquimal en el comportamiento del cáncer, la formación localizada de lesiones precancerosas y la plasticidad de las células tumorales (Miller y col., 2005). Sólo una pequeña proporción de los tumores contiene células madre cancerosas, los valores se sitúan entre un 0,02% y un 1% de estas células en los tumores. Las células madre cancerosas actúan como precursores celulares que producen gran proliferación, las células cancerosas más diferenciadas son eliminadas a través de la radio y quimioterapia. Las células madre cancerosas difieren de las somáticas de tejidos normales en que su proliferación no está controlada por las células vecinas que forman parte del nicho (Pardal y col., 2003). Es probable que las células madre cancerosas tengan su origen en células madre somáticas que han mutado a lo largo del tiempo permitiendo así que mantengan su alto

potencial proliferativo y su capacidad clonal. Por lo tanto las células madre cancerosas serían las células clave en los tumores implicadas en la iniciación, progresión, metástasis y recurrencia de tumores después del tratamiento. Este papel clave de las células madre cancerosas ha sido perfectamente descrito en la leucemia mieloide, el cáncer de mama y los glioblastomas (Pardal y col., 2003). Los genes implicados en los patrones de auto-renovación que regulan las células madre somáticas como *Wnt/βcatenin*, *sonic hedgehog* y *PTEN* (gen supresor de tumores) han sido asociados con un amplio número de cánceres. La inestabilidad de los microsatélites o las mutaciones en los genes PTEN son bien conocidas por estar implicadas en la hiperplasia endometrial y el carcinoma endometrial pero si las células madre endometriales cancerosas también están implicadas es algo que aún sigue sin saberse. Aún así hoy en día se sabe que los patrones de señalización de la *Wnt/βcatenina* están implicados en el carcinoma endometrial y en el sarcoma estromal endometrial (Latta y col., 2002; Moreno-Bueno 2002). El carcinoma endometrial es la enfermedad más común del tracto genital femenino. En la actualidad no conocemos si las células madre cancerosas tiene un papel en los cánceres endometriales o en la hiperplasia endometrial pero esto sigue siendo una página abierta al futuro.

### ***Ingeniería de tejidos.***

Existe un gran interés en la posible aplicación tanto de células madre embrionarias como somáticas en la ingeniería tisular para restaurar las funciones de órganos y tejidos producidos por la edad o las enfermedades. Los avances médicos proporcionan un aumento en la longevidad de la población y esto necesita de una gran reparación de tejidos (Vats y col., 2005). El fracaso de implantes artificiales en los 10-15 años tras el trasplante y los problemas asociados con el uso de materiales sintéticos no degradables hacen que la terapia celular sea una de las herramientas más atractivas que existen hoy en día (Rahaman y col., 2005). Todo esto abre una nueva vía para el uso de materiales biológicos temporales como moldes que darían lugar a un soporte inicial y, células madre encargadas de promover la regeneración del tejido.

Esto es particularmente importante en la posibilidad de proveer tejido sostén en determinadas situaciones y, podría ser adaptado para la regeneración tisular del tracto reproductivo femenino. Como ejemplo claro tendríamos el caso del prolapso del suelo pélvico, que es frecuente en un 10% de las mujeres y que requiere intervención quirúrgica e incluso repetición de esta en un 30% de los casos (Delancey, 2005). El uso de moldes artificiales confeccionados con materiales biológicos es una de las alternativas a estas intervenciones quirúrgicas.







# **VII. CONCLUSIONES**



## VII. – CONCLUSIONES

Las conclusiones que hemos extraído de este trabajo han sido:

- Existe una población de células madre somáticas endometriales en el modelo murino.
- Esta población ha sido detectada por su baja capacidad de división (desde el momento del nacimiento del ratón hasta la edad adulta) y por ser positiva para marcadores de indiferenciación como c-KIT y OCT-4 a nivel de ARNm y proteína inmunoreactiva.
- Esta población se encuentra localizada en la capa basalis del estroma endometrial del ratón.
- En el modelo humano la identificación de estas células endometriales se ha realizado mediante la detección de la *Side Population* o células enriquecidas en transportadores ABC transmembrana.
- Estas células poseen marcadores de indiferenciación, c-KIT y OCT-4, y actividad telomerasa intermedia.
- Su fenotipado demostró un origen mesenquimal de las mismas, células CD90 positivas, en el endometrio humano.

En conclusión, hemos aislado y caracterizado las células madre somáticas presentes en el tejido endometrial murino y humano que podrían ser las responsables de su alta capacidad regenerativa. Ofrecemos así un nuevo punto de vista para el estudio de la endometriosis y el cáncer de endometrio.



# **VIII. BIBLIOGRAFIA**



**VIII. BIBLIOGRAFÍA:**

Abbot JA y Garry R. (2002) The surgical management of menorrhagia. *Hum Reprod Update* 8, 68-78.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, y Watson JD. (1994) *Molecular biology of the cell* (New York, Garland Publishing, Inc).

Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ y Alvarez-Buylla A. (2003) Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 30, 968-973.

Anderson GB, BonDurant RH, Goff L, Groff J, y Moyer AL. (1996) Development of bovine and porcine embryonic teratomas in athymic mice. *Anim Reprod Sci* 45, 231-240.

Andrews PW. (2002) From terotocarcinomas to embryonic stem cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 357, 405-407.

Berstine EG, Hooper ML, Grandchamp S, y Ephrussi B. (1973) Alkaline phosphatase activity in mouse teratoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 70, 3899-3903.

Bickenbach JR. (1981) Identification and behavior of label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res*. Aug;60 Spec No C:1611-20.

Blau HM, Brazelton TR y Weimann JM. (2001) The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell* 105,829–841.

Booth C y Potten CS. (2000) Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 105,1493–1499.



Braun KM, Niemann C, Jensen UB, Sundberg JP, Silva-Vargas V y Watt FM. (2003) Manipulation of stem cell proliferation and lineage commitment: visualisation of label-retaining cells in wholemounts of mouse epidermis. *Development*. Nov;130(21):5241-55.

Brenner RM, Slayden OD, Rodgers WH, Critchley HOD, Carroll R, Nie XJ y Mah K. (2003) Immunocytochemical assessment of mitotic activity with an antibody to phosphorylated histone H3 in the macaque and human endometrium. *Hum Reprod* 18,1185–1193.

Bulmer JN y Johnson PM. (1985) Immunohistological characterization of the decidual leukocytic infiltrate related to endometrial gland epithelium in early human pregnancy. *Immunology* 55, 35-44.

Cervelló I, Martínez-Conejero JA, Horcajadas JA, Pellicer A y Simón C. (2007) Identification, characterization and co-localization of label-retaining cell population in mouse endometrium with typical undifferentiated markers. *Hum Reprod*. Jan;22(1):45-51.

Chan RW, Schwab KE y Gargett CE. (2004) Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells. *Biol Reprod* 70,1738–1750.

Chan RW y Gargett CE (2006) Identification of label-retaining cells in Mouse endometrium. *Stem cells*, 24: 1529-1538.

Cho NH, Park YK, Kim YT, Yang H y Kim SK. (2004) Lifetime expression of stem cells markers in the uterine endometrium. *Fertil Steril* 81, 403-407.

Chomczynski P y Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. Apr;162(1):156-9.

Clarke RB y Smith GH. (2005) Stem cells and tissue homeostasis in mammary glands. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10,1–3.

Cossu G. (2004) Fusion of bone marrow-derived stem cells with striated muscle may not be sufficient to activate muscle genes. *J Clin Invest* 114, 1540-1543.

Cotsarelis G, Cheng SZ, Dong G, Sun TT y Lavker RM. (1989) Existence of slow-cycling limbal epithelial basal cells that can be preferentially stimulated to proliferate: implications on epithelial stem cells. *Cell*. Apr 21;57(2):201-9.

DeLancey JO. (2005) The hidden epidemic of pelvic floor dysfunction: achievable goals for improved prevention and treatment. *Am J Obstet Gynecol* 192(5):1488-95.

Dor Y y Melton DA (2004) How important are adult stem cells for tissue maintenance? *Cell Cycle* 3,1104–1106.

Eckfeldt CE, Mendenhall EM y Verfaillie CM (2005) The molecular repertoire of the 'almighty' stem cell. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6,726–737.

Edlund T y Jessell TM. (1999) Progression from extrinsic to intrinsic signalling in cell fate specification: a view from the nervous system. *Cell* 96, 211-224.

Fang CH, Zhang W, Zhu XY, Gong JQ y Zhang GQ. (2003) The expression of c-kit and proliferating cell nuclear antigen in oval cells of rats with hepatocellular carcinoma. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. Nov;2(4):537-44.

Ferenczy A, Bertrand G y Gelfand MM. (1979) Proliferation kinetics of human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 133,859–867.

Firulli AB y Olson EN. (1997) Modular regulation of muscle gene transcription: a mechanism for muscle cell diversity. *Trends Genet* 13, 364-369.

Fuchs E y Segre JA. (2000) Stem cells: a new lease on life. *Cell* 100, 143-155.

Fuchs E, Tumber T y Guasch G (2004) Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell* 116,769–778.

Gargett CE. (2004) Stem cells in gynaecology. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 44,380–386.

Gargett CE. (2006) Identification and characterisation of human endometrial stem/progenitor cells. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 46,250–253.

Gearhart JD y Mintz B. (1974) Contact-mediated myogenesis and increased acetylcholinesterase activity in primary cultures of mouse teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 71, 1734-1738.

Giudice LC. (1994) Growth factors and growth modulators in human uterine endometrium: their potential relevant to reproductive medicine. *Fertil Steril* 61, 1-17.

Giudice LC y Kao LC. (2004) Endometriosis. *Lancet* 364,1789–1799.

Goto T, Adjaye J, Rodeck CH y Monk M. (1999) Identification of genes expressed in human primordial germ cells at the time of entry of the female germ line into meiosis. *Mol Hum Reprod* 5: 851-860.

Goodell MA. (2003) Stem cell plasticity: befuddled by the muddle. *Curr Opin Hematol* 10, 208-213.

Gronthos S, Zannettino ACW, Hay SJ, Shi ST, Graves SE, Kortessidis A y Simmons PJ. (2003) Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J Cell Sci* 116,1827–1835.

Hartman C. (1944) Regeneration of monkey uterus after surgical removal of endometrium and accidental endometriosis. *West J Surg Obstet Gynecol* 52,87–102.

Horwitz E. (2002) Stem cell plasticity: a new image of the bone marrow stem cell. *Curr Opin Pediatr* 15, 32-37.

Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK y Goodell MA. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest.* Jun;107(11):1355-6.

Jakob H, Boon T, Gaillard J, Nicolas J y Jacob F. (1973) Teratocarcinoma of the mouse: isolation, culture and properties of pluripotential cells. *Ann Microbiol (Paris)* 124, 269-282.

Jiang Y, Vaessen B, Lenvik T, Blackstad M, Reyes M y Verfaillie C. (2002) Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle and brain. *Exp Hematol* 30, 896-904.

Kahan BW y Ephrussi B. (1970) Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst* 44, 1015-1036.

Kato K, Yoshimoto M, Kato K, Adachi S, Yamayoshi A, Arima T, Asanoma K, Kyo S, Nakahata T y Wake N. (2007) Characterization of side-population cells in human normal endometrium. *Hum Reprod.*22(5):1214-23.

Kim JY, Tavaré S y Shibata D. (2005) Counting human somatic cell replications: Methylation mirrors endometrial stem cell divisions. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (49),17739–17744.

Kleinsmith LJ y Pierce GB Jr. (1964) Multipotentiality of single embryonal carcinoma cells. *Cancer Res* 24, 1544-1551.

Lassalle B, Ziyyat A, Testart J, Finaz C y Lefèvre A. (1999) Flow cytometric method to isolate round spermatids from mouse testis. *Hum Reprod.* Feb;14(2):388-94.

Latta E y Chapman WB. (2002) PTEN mutations and evolving concepts in endometrial neoplasia. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14,59–65.

Li A, Pouliot N, Redvers R y Kaur P. (2004) Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J Clin Invest.*;113(3):390-400.

Li L y Xie T. (2005) Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21,605–631.

Liu Y y Rao MS. (2003) Transdifferentiation: fact or artefact. *J Cell Biochem* 88, 29-40.

Martin GR y Evans MJ. (1974) The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell* 2, 163-172.

Marshall VS, Waknitz MA y Thomson JA. (2001) Isolation and maintenance of primate embryonic stem cells. *Methods Mol Biol* 158, 11-18.

Masuda H, Maruyama T, Hiratsu E, Yamane J, Iwanami A, Nagashima T, Ono M, Miyoshi H, Okano HJ, Ito M, Tamaoki N, Nomura T, Okano H, Matsuzaki Y y Yoshimura Y. (2007) Noninvasive and real-time assessment of reconstructed functional human endometrium in NOD/SCID/gamma c(null) immunodeficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 6;104(6):1925-30.

Matsui Y, Zsebo K y Hogan BL. (1992) Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell* 70, 841-847.

Matthai C, Horvat R, Noe M, Nagele F, van Radjabi ATM, Huber J y Kolbus A. (2006) Oct-4 expression in human endometrium. *Mol Hum Reprod* 12,7–10.

McBurney MW, Jones-Villeneuve EM, Edwards MK y Anderson PJ. (1982) Control of muscle and neuronal differentiation in a cultured embryonal carcinoma cell line. *Nature* 299, 165-167.

McLennan CE y Rydell AH. (1965) Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet Gynecol* 26, 605-621.

Mezey E, Key S, Vogelsang G, Szalayova I, Lange GD y Crain B. (2003) Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 1364-1369.

Miller SJ, Lavker RM y Sun TT. (2005) Interpreting epithelial cancer biology in the context of stem cells: tumor properties and therapeutic implications. *Biochim Biophys Acta* 1756,25–52.

Mintz B y Illmensee K. (1975) Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 3585-3589.

Moreno-Bueno G, Hardisson D, Sanchez C, Sarrio D, Cassia R, Garcia-Rostan G, Prat J, Guo M, Herman JG, Matias-Guiu X y cols. (2002) Abnormalities of the APC/beta-catenin pathway in endometrial cancer. *Oncogene* 21,7981–7990.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G y Erlich H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51 Pt 1:263-73.

Mutter GL. (2000) Histopathology of genetically defined endometrial precancers. *Int J Gynecol Pathol* 19,301–309.

Nicolas JF, Avner P, Gaillard J, Guenet JL, Jakob H y Jacob F. (1976) Cell lines derived from teratocarcinomas. *Cancer Res* 36, 4224-4231.

Nicolas JF, Dubois P, Jakob H, Gaillard J y Jacob F. (1975) Mouse teratocarcinoma: differentiation in cultures of a multipotential primitive cell line. *Ann Microbiol (Paris)* 126, 3-22.

Ohlstein B, Kai T, Decotto E y Spradling A. (2004) The stem cell niche: theme and variations. *Curr Opin Cell Biol* 16,693–699.

Orkin SH. (1998) Embryonic stem cells and transgenic mice in the study of hematopoiesis. *Int J Dev Biol* 42, 927-934.

Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, Rapaport SI, McCracken JA, King NW Jr, Longcope C y Kaiserman-Abramof IR. (1989) The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod* 40,681–690.

Papaioannou VE, McBurney MW, Gardner RL y Evans MJ. (1975) Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nat Genet* 24, 49-52.

Pardal R, Clarke MF y Morrison SJ. (2003) Applying the principles of stemcell biology to cancer. *Nat Rev Cancer* 3,895–902.

Potten CS y Loeffler M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110,1001–1020.

Poulsom R, Forbes SJ, Hoidalva-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnarasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T y cols. (2001) Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195, 229-235.

Prianishnikov VA. (1978) On the concept of stem cell and a model of functional-morphological structure of the endometrium. *Contraception* 18,213–223.

Quesenberry PJ, Dooner G, Colvin G y Abedi M. (2005) Stem cell biology and the plasticity polemic. *Exp Hematol* 33,389–394.

Rahaman MN y Mao JJ. (2005) Stem cell-based composite tissue constructs for regenerative medicine. *Biotechnol Bioeng*;91(3):261-84.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF y Weissman IL. (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414,105–111.

Reyes M y Verfaillie CM. (2001) Characterization of multipotent adult progenitor cells, a subpopulation of mesenchymal stem cells. *Ann NY Acad Sci* 938, 231-233.

Reynolds BA y Rietze RL. (2005) Neural stem cells and neurospheres – reevaluating the relationship. *Nat Methods* 2, 333–336.

Robey PG. (2000) Stem cells near the century mark. *The journal of Clinical Investigation* 105, 1489-1491.

Sales-Pardo I, Avendaño A, Martínez-Muñoz V, García-Escarp M, Celis R, Whittle P, Barquinero J, Domingo JC, Marin P, Petriz J. (2006) Flow cytometry of the Side Population: tips & tricks. *Cell Oncol.* 28(1-2):37-53.

Sato S, Yoshimizu T, Sato E y Matsui Y. (2003) Erasure of methylation imprinting of *Igf2r* during Mouse primordial germ-cell development. *Mol Reprod Dev* 65, 41-50.

Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4,7–25.

Schwab KE, Chan RW y Gargett CE. (2005) Putative stem cell activity of human endometrial epithelial and stromal cells during the menstrual cycle. *Fertil Steril* 84,1124–1130.

Schwab KE y Gargett CE. (2007) Co-expression of two perivascular cell markers isolates mesenchymal stem-like cells from human endometrium. *Hum Reprod.* Nov;22(11):2903-11.

Shamblott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, Blumenthal PD, Huggins GR y Gearhart JD. (1998) Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13726-13731.



Shamblott MJ, Axelman J, Littlefield JW, Blumenthal P, Huggins GR, Cui Y, Cheng L y Gearhart JD. (2001) Human embryonic germ cells derivatives express a broad range of developmentally distinct markers and proliferate extensively in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 113-118.

Simón C, Escobedo C, Valbuena D, Genbacev O, Galan A, Krtolica A, Asensi A, Sánchez E, Esplugues J, Fisher S, Pellicer A. (2005) First derivation in Spain of human embryonic stem cell lines: use of long-term cryopreserved embryos and animal-free conditions. *Fertil Steril*. Jan;83(1):246-9.

Smith AG. (2001) Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17, 435-462.

Snyder EY y Loring JF. (2005) A role for stem cell biology in the physiological and pathological aspects of aging. *J Am Geriatr Soc* 53,S287–S291.

Stevens LC. (1984) Spontaneous and experimentally induced testicular teratomas in mice. *Cell Differ* 15, 69-74.

Stewart CL, Gadi I y Bhatt H. (1994) Stem cells from primordial germ cells can reenter the germ line. *Dev Biol* 161, 626-628.

Tanaka M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Nakamura M, Maida Y, Okabe M y Inoue M (2003a) Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. *Am J Pathol* 163,295–301.

Tanaka T, Nakajima S y Umesaki N (2003b) Cellular heterogeneity in longterm surviving cells isolated from eutopic endometrial, ovarian endometrioma and adenomyosis tissues. *Oncol Rep* 10,1155–1160.

Taylor G, Lehrer MS, Jensen PJ, Sun TT, Lavker RM. (2000) Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell*. Aug 18;102(4):451-61.

Thomson JA y Marshall VS. (1998) Primate embryonic stem cells. *Curr Top Dev Biol* 38, 133-165.

Tosh D y Snack JM. (2002) How cells change their phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 187-194.

Tresserra F, Grases P, Ubeda A, Pascual MA, Grases PJ y Labastida R. (1999) Morphological changes in hysterectomies after endometrial ablation. *Hum Reprod* 14,1473–1477.

Valbuena D, Galán A, Sánchez E, Poo ME, Gómez E, Sánchez-Luengo S, Melguizo D, García A, Ruiz V, Moreno R, Pellicer A, Simón C. (2006) Derivation and characterization of three new Spanish human embryonic stem cell lines (VAL -3 -4 -5) on human feeder and in serum-free conditions. *Reprod Biomed Online*. Dec;13(6):875-86.

Van Gorp T, Amant F, Neven P y Vergote I. (2004) Endometriosis and the development of malignant tumours of the pelvis. A review of literature. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 18,349–371.

Van Os R, Kamminga LM y de Haan G. (2004).Stem cell assays: something old, something new, something borrowed. *Stem Cells*.;22(7):1181-90.

Vats A, Bielby RC, Tolley NS, Nerem R y Polak JM. ( 2005) Stem cells.*Lancet* 366(9485):592-602.

Wang X, Foster M, Al-Dhalimy M, Lagasse E, Finegold M, Grompe M. (2003) The origin and liver repopulating capacity of murine oval cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 30;100 Suppl 1:11881-8.

Weissman IL. (2002) Stem cells - scientific, medical, and political issues. *N Engl J Med* 346,1576–1579.

Wilson A y Trumpp A (2006) Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 6,93–106.

Wolff EF, Wolff AB, Du H y Taylor HS. (2007) Demonstration of multipotent stem cells in the adult human endometrium by in vitro chondrogenesis. *Reprod Sci.*;14(6):524-33.

Wood C y Rogers PAW. (1993) Pregnancy after planned partial endometrial resection. *Aust NZ J Obstet Gynaecol* 33,316–318.

Yano S, Ito Y, Fujimoto M, Hamazaki TS, Tamaki K, Okochi H. (2005) Characterization and localization of side population cells in mouse skin. *Stem Cells*. Jun-Jul;23(6):834-41.

*f*undación  
**FIVI**