



Facultad de Veterinaria  
Universidad Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

REX1, pluripotencia y diferenciación celular en  
células troncales embrionarias

*REX1, pluripotency and cell differentiation in embryonic  
stem cells*

## **Autor**

PABLO PALAU IRISARRI

## **Directores**

PEDRO MUNIESA LORDA

MARIA CLIMENT AROZ

LUIS VICENTE HERRERA MARCOS

*Facultad de Veterinaria*

2016

# ÍNDICE

<b>I. ABREVIATURAS</b>	<b>2</b>
<b>II. RESUMEN/ABSTRACT</b>	<b>3</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>II.1 - CÉLULAS ES</b>	<b>4</b>
<b>II.2- CÉLULAS iPS</b>	<b>5</b>
<b>II.3 - FACTORES DE PLURIPOTENCIA</b>	<b>6</b>
<b>II.4- MANTENIMIENTO IN VITRO DEL ESTADO DE PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS ES E iPS</b>	<b>7</b>
<b>II.5 - FACTOR TRANSCRIPCIONAL REX1</b>	<b>7</b>
<b>II.6 - ANTÍGENO CD9</b>	<b>8</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>10</b>
<b>IV.1 - MATERIAL BIOLÓGICO</b>	<b>10</b>
<b>IV.2 - MATERIAL INSTRUMENTAL Y REACTIVOS</b>	<b>12</b>
<b>IV.2.1 - EXTRACCIÓN RNA</b>	<b>12</b>
<b>IV.2.2 - PURIFICACIÓN RNA</b>	<b>12</b>
<b>IV.2.3 - RETROTRANSCRIPCIÓN RNA Y OBTENCIÓN cDNA</b>	<b>13</b>
<b>IV.2.4 - PCR CUANTITATIVA (qPCR)</b>	<b>13</b>
<b>IV.3 - MÉTODOS</b>	<b>13</b>
<b>IV.3.1 - EXTRACCIÓN RNA</b>	<b>13</b>
<b>IV.3.2 - PURIFICACIÓN RNA</b>	<b>15</b>
<b>IV.3.3 - RETROTRANSCRIPCIÓN RNA Y OBTENCIÓN cDNA</b>	<b>16</b>
<b>IV.3.4 - PCR CUANTITATIVA (qPCR)</b>	<b>17</b>
<b>IV.3.5 - ANÁLISIS MATEMÁTICO</b>	<b>18</b>
<b>IV.3.6 - ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b>	<b>19</b>
<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>20</b>
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>23</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS</b>	<b>26</b>
<b>IX. VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS</b>	<b>27</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>28</b>
<b>XI. ANEXOS</b>	<b>32</b>
<b>XI.1 - CONCENTRACIÓN Y PUREZAS DE LOS RNAs</b>	<b>32</b>
<b>XI.2 - PRIMERS qPCR</b>	<b>34</b>
<b>XI.3 - PROCEDIMIENTOS MATEMÁTICOS</b>	<b>35</b>

## ABREVIATURAS

2i:	Combinado de kinasas GSK3 (CHIR 99021) y ERK1/2 (PD032591).
BMP:	Proteína morfogenética del hueso.
CD9:	Antígeno CD9.
cDNA:	Ácido desoxirribonucleico complementario.
DEPC:	Dietilpirocarbonato.
ES-FCL:	Células ES del ratón transgénico FVB/n-Cyp3A4-Luc.
ES:	Células troncales embrionarias (EmbryonicStemCells).
TS:	Células troncales trofobásticas (Trophoblast Stem cells)
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa.
gDNA:	Ácido desoxirribonucleico genómico.
ICM:	Masa Celular Interna (Inner Cell Mass)
iPS:	Células pluripotentes inducidas (Induced Pluripotent Stem).
LIF:	Factor inhibidor de la leucemia.
MQ:	Agua purificada Milli-Q.
PCR:	Cadena en Reacción de la Polimerasa.
qPCR:	Cadena en Reacción de la Polimerasa Cuantitativa (Quantitative).
REX1:	Factor de transcripción (Reduced expression 1; ZFP42).
RNA:	Ácido ribonucleico.
TBE:	Tris Borato EDTA.
TRIS:	Tris(hidroximetil)aminometano.
Yy1:	Factor de transcripción Yin Yang1
Yy2:	Factor de transcripción Yin Yang2

## RESUMEN

Las células ES e iPS constituyen un reto y una oportunidad tanto en lo relativo al conocimiento de los mecanismos básicos del desarrollo (crecimiento, diferenciación celular, pluripotencia y reprogramación), como en la comprensión de la patogénesis, validación de dianas terapéuticas e innovación farmacológica, sin olvidar su potencial uso futuro en terapia celular, terapia génica y medicina regenerativa.

Hemos obtenido líneas celulares ES (ES-FCL) del ratón transgénico FVB/N-Tg(CYP3A4-luc)-Xen, que presenta expresión validada *in vivo* de un marcador exclusivo de hepatocitos funcionales en el órgano intacto, y detectable de manera eficaz mediante sistemas de imagen bioluminiscente de alta sensibilidad. Estas líneas celulares podrían constituir un modelo ideal en el que poder ensayar diferentes aspectos ligados al desarrollo de nuevas terapias celulares en patología hepática. En el presente trabajo se propone profundizar en la caracterización de dichas líneas celulares.

## ABSTRACT

ES and iPS cells are a challenge and an opportunity both in terms of knowledge of the basic mechanisms of development (growth, cell differentiation, pluripotency and reprogramming) and in the understanding of pathogenesis, validation of therapeutic targets and drug innovation, without forgetting its potential future use in cell therapy, gene therapy and regenerative medicine.

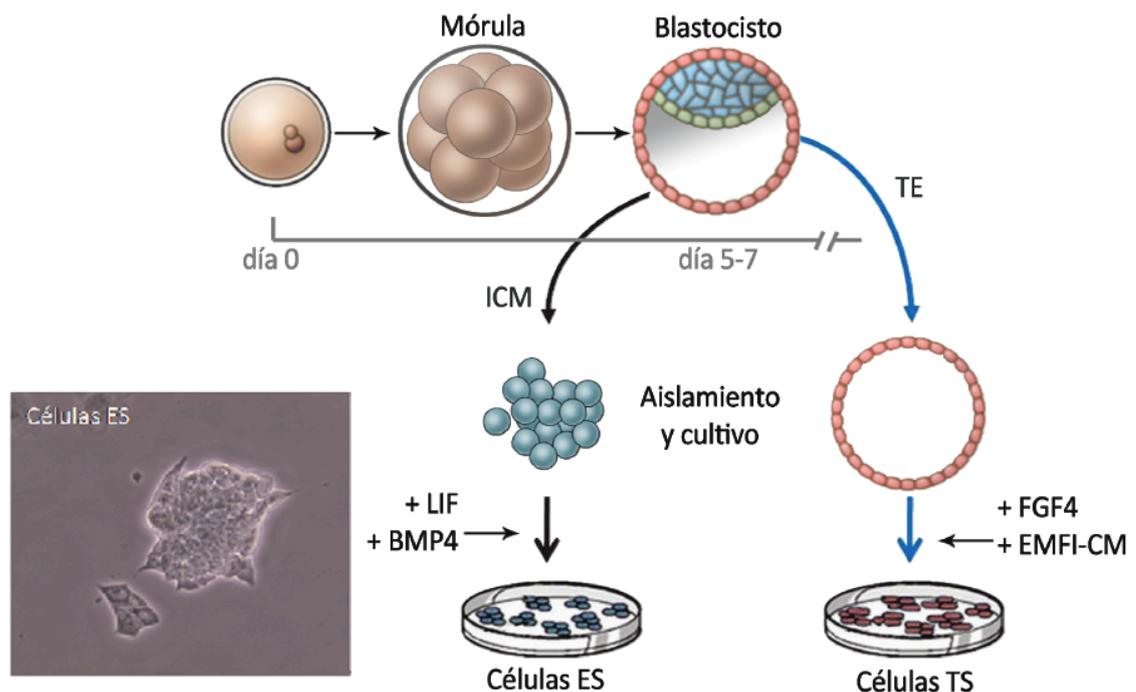
We have obtained ES cell lines (ES-FCL) from the transgenic mouse FVB/ N-Tg (CYP3A4-luc)-Xen, having a validated *in vivo* expression of an exclusive marker of functional hepatocytes in the intact organ, which is detectable effectively by high sensitivity image. These cell lines could be an ideal model in which to test different aspects related to the development of new cell therapies in liver pathology. In this project we propose to deepen the characterization of the above mentioned cell lines.

# INTRODUCCIÓN

El **trasplante de células** o terapia celular ha sido considerado como una posible alternativa al trasplante de órganos en determinadas patologías. En relación con la clínica del hígado hace más de 30 años que se realizó con éxito el primer trasplante de hepatocitos en rata (1), continuando en muchos otros modelos animales afectados de patología hepática (2). Algunas de las principales limitaciones técnicas encontradas son la baja tasa de células que consiguen incorporarse al parénquima hepático (5-10%), o la limitación en la fuente de obtención de estas células. La solución de estos problemas exige la búsqueda y comprensión del tipo celular idóneo para el trasplante celular en las distintas enfermedades hepáticas. La posibilidad de obtener material celular en abundancia y con una alta potencia de desarrollo, bien a partir de embriones tempranos como es el caso de las células ES, o mediante reprogramación de células somáticas adultas a células iPS y su posterior diferenciación al tipo celular deseado, abren todo un abanico de nuevas posibilidades, no solo en el campo de la medicina regenerativa sino también en el análisis causal patológico y en la búsqueda y ensayo de nuevos fármacos y terapias.

## Células ES

Las células troncales embrionarias (EmbryonicStemCells, ES Cells) fueron aisladas por primera vez en 1981 por Martin en California (3) y Evans y Kaufman en Cambridge (4). Estas células derivan de la masa celular interna (ICM) de blastocistos tempranos o del epiblasto de blastocistos tardíos, que formaría el propio embrión *in vivo* (5). Estas líneas celulares pueden ser mantenidas *in vitro* en un estado indiferenciado y conservar su capacidad de auto-renovarse indefinidamente sin transformación genética, pudiendo clonarse manteniendo su estadio de pluripotencia. Por pluripotencia se entiende la capacidad para contribuir a la formación de las 3 capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo), incluida la línea germinal. Esto puede demostrarse *in vitro* en respuesta a regímenes de diferenciación, o al introducir las células ES en un blastocisto produciendo embriones quiméricos (6), donde habrá células derivadas de la ICM del embrión y de las ES inyectadas por todo el organismo (7). Pero las células ES no contribuyen al tejido extraembrionario, marcando una distinción con las células totipotentes del embrión de 2-células capaces de dar lugar tanto a derivados de la ICM como del trofoectodermo (8) y la limitación de las células TS de las que únicamente se obtienen linajes trofoectodérmicos. (9).



**FIGURA 1.-** Células embrionarias troncales (ES) y troncales del trofoectodermo (TS) derivadas del blastocisto. ICM, masa celular interna; TE, trofoectodermo; LIF, factor inhibidor de la leucemia; BMP, factor morfogénico del hueso; FGF-4: factor de crecimiento del fibroblasto 4; EMFI.CM: medio condicionado por fibroblasto de embrión de ratón. Adaptado de Boyer et al, 2006

### Células iPS

La obtención de células madre pluripotentes inducidas (**iPS**) de fibroblastos de ratón (10) y su posterior derivación en humanos (10,11), ha abierto una nueva posibilidad de obtención de material celular con extraordinario potencial para ser utilizado como una posible herramienta terapéutica. Estas líneas celulares iPS derivadas de células somáticas, junto a las líneas celulares **ES** derivadas de embriones, representan un modelo excepcional para el análisis de mecanismos patológicos y el desarrollo de nuevas terapias. La demostración en ratón de su potencial genético (12) y la descripción de la obtención de iPS de enfermos de anemia de Fanconi y su posterior corrección genética y funcional (13), aseguran un futuro prometedor de estas células madre en terapia celular y génica.

La derivación de iPS de hepatocitos y otros tejidos de diverso origen (14, 15) desvela la posibilidad de que las iPS obtenidas tengan cierta “memoria epigenética”, una programación residual del tejido de origen. Esto se fundamenta en que se presentan diferencias sustanciales con las células ES respecto a la expresión génica, incluso su potencial teratogénico es diferente dependiendo de su origen (16). Sin embargo, todavía se desconoce si las iPS derivadas a partir de hepatocitos tienen un potencial superior de revertir al fenotipo hepatocítico que las obtenidas de células ES, y en qué medida varía ese potencial en cultivo con el paso del tiempo.

Dadas las similitudes del mantenimiento en cultivo de las células ES y las iPS, pueden aplicarse los mismos protocolos de diferenciación para ambas con el fin de obtener los tipos celulares deseados. Aunque la diferenciación hepática funcional de las células ES es complicada, se ha demostrado que la exposición secuencial a factores de crecimiento favorecen la obtención de hepatocitos funcionales tanto a partir de ES (17) como de iPS (18, 19). Es necesario estudiar los procedimientos de cultivo y diferenciación que permitan encontrar los métodos más fiables para alcanzar el estado de diferenciación más adecuado para la utilización posterior; así como los medios para la obtención y mantenimiento del cultivo con un estado de pluripotencia alta y homogénea.

### **Factores de pluripotencia**

Las células ES e iPS se caracterizan por presentar mecanismos moleculares comunes que permiten la auto-renovación e inhiben los genes que promueven la diferenciación, gracias a los factores de transcripción OCT4, NANOG y SOX2 (factores esenciales de la pluripotencia). OCT4 es esencial para la formación del blastocisto (20), derivando las células a trofoectodermo si esta reprimido, o a endodermo extraembrionario si está sobreexpuesto (21). Aunque NANOG no es esencial en el mantenimiento de las células pluripotentes (22), es necesario *in vivo* para el desarrollo de la ICM (23), y su función es regulada por OCT4 (24) y SOX2. Su sobreexpresión permite a las células la auto-renovación, aún en ausencia de señales de LIF y BMP. Aunque NANOG no pueda actuar independientemente de la señal de LIF, la contribución de ambas vías provee la máxima eficiencia de auto-renovación. SOX2 también es necesario durante el periodo preimplantacional del embrión, ya que al eliminarla en ratones knock-down, se ve afectado el ectodermo (25). Estos factores poseen “super-enhancers” (SEs) que permiten su autoestimulación y la estabilización transcripcional de los genes que controlan la pluripotencia, y estos a su vez actúan a través de factores y genes también controlados por SEs (26, 27).

## Mantenimiento *in vitro* del estado de pluripotencia de células ES e iPS

El mantenimiento de las células ES *in vitro* depende tanto de señales extracelulares recibidas (LIF y otros, como BMP4 o proteína morfogenética del hueso), como de la represión de las rutas de diferenciación activadas por FGF, la cual converge en la vía de kinasas ERK1/2. Estas señales actúan sobre los factores de pluripotencia (OSN), que se estimulan unos a otros y reprimen genes asociados a la diferenciación celular (28, 29). Los factores OCT4 y SOX2 tienen una expresión uniforme en todas las células pluripotentes de una misma línea de células ES, contrastando con otros con expresión más heterogénea como **Rex1** (30), NANOG, Stella, Esrrb, Pecam1 y Zscan4 (8).

Recientes investigaciones han señalado la utilidad de compuestos químicos que actuando sobre las dianas clave han permitido establecer medios mucho más definidos para la obtención y mantenimiento de ambas clases de células madres. El uso del combinado conocido como **2i/LIF** que contiene inhibidores de las kinasas GSK3 (CHIR 99021) y ERK1/2 (PD032591), más Factor Inhibidor de la Leucemia (LIF), ha demostrado que permite obtener líneas celulares ES con mayor eficacia y mantener el cultivo en estado de pluripotencia más homogéneo (31).

El combinado 2i se ha mostrado de extrema utilidad en la derivación de células pluripotentes en estirpes de ratón y en otras especies aparentemente refractarias a la derivación, como la rata, además de facilitar la creación de células iPS (28, 32, 33, 34). Su actuación consiste en el bloqueo de la diferenciación promovida por Fgf4, que se produce al impedir la estimulación de la vía de señalización Mek-Erk y la actividad represora endógena realizada por Tcf3, dependiente de la activación de la vía de señalización por Wnt (35, 36). Se ha sugerido que el cultivo en 2i podría recrear el ambiente de la ICM de blastocisto tardío donde se reducen los niveles del receptor de Fgf (37).

### Factor transcripcional REX1

REX1 (del inglés Reduced expression 1) o ZFP42 (del inglés Zinc finger protein 42) es un factor de transcripción presente únicamente en mamíferos placentarios. Es un conocido marcador de pluripotencia (38, 39), tanto de ratón (31) como de humano (40). Fue identificada por el grupo de Gudas en 1989 gracias a la disminución de su expresión tras la diferenciación

con ácido retinoico de células madres pluripotentes de carcinoma F9 (41). Más tarde se determinó su papel crítico en el mantenimiento del estado de pluripotencia, como elemento clave en la reactivación del cromosoma X paterno (42). Trabajos previos del grupo han demostrado que Rex1 se expresa durante el desarrollo preimplantacional (43), y está presente en las líneas celulares embrionarias ES y TS, obtenidas en la fase de blastocisto, contribuyendo al mantenimiento de la pluripotencia y proliferación in vitro de las líneas celulares ES (44). Sin embargo todavía se desconoce cual es la función específica realizada por Rex1 durante el desarrollo preimplantacional y el mantenimiento de la pluripotencia.

### **Antígeno CD9**

El análisis ya realizado mediante ChIPseq de la asociación a cromatina de REX1 en células ES (pendiente de publicación), han puesto de manifiesto su unión a un conjunto de dianas génicas, entre las que se encuentra *Cd9*. El antígeno CD9 es una glucoproteína de 24 a 27 kD expresada en la superficie de varias células, como linfocitos B en desarrollo, trombocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos y en las neuronas y células neurogliales en el sistema nervioso periférico. Pertenece a la superfamilia de proteínas transmembrana TM4SF (45). Entre sus tareas hay una amplia gama de funciones, como la activación y agregación plaquetaria, la adhesión y migración celular, o la metástasis tumoral (46), así como un importante papel en la fusión de los mioblastos y protección frente a la apoptosis de los miotubos (45). CD9 también está implicado en la implantación y desarrollo embrionario, es el receptor específico de PSG17 (PregnancySpecific Glycoprotein-17), siendo esenciales para el éxito del embarazo al estimular la secreción de citoquinas antiinflamatorias (47). Por este motivo se encuentra altamente expresada en las células madre embrionarias tanto de humana como de ratón, razón por la cual se utiliza como marcador de superficie para caracterizar las células ES (48). La expresión de *Cd9* en estas células es crítica en el mantenimiento del estado indiferenciado y en la supervivencia de las células ES (49), por lo que también será usada en este trabajo como marcador de la pluripotencia complementario a *Rex1*.

# JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Fruto del trabajo previo del grupo, utilizando el cóctel 2i/LIF, se obtuvieron 14 líneas celulares ES (ES-FCL) del ratón transgénico FVB/N-Tg(CYP3A4-luc)-Xen, que presenta expresión de luciferasa validada *in vivo* como marcador exclusivo de hepatocitos funcionales en el órgano intacto, y detectable de manera eficaz mediante sistemas de imagen bioluminiscente de alta sensibilidad (50; Berraondo et al., en preparación).

Por otro lado, el análisis realizado mediante ChIPseq de la asociación a cromatina de REX1 como factor asociado a la pluripotencia en células ES (pendiente de publicación) ha puesto de manifiesto su unión a un conjunto de dianas génicas, entre las que figura *Cd9*, gen que puede tener una gran importancia en las interacciones celulares durante el desarrollo preimplantacional y durante la implantación.

En el presente estudio, verificando la expresión de *Rex1* y de uno sus genes diana como es *Cd9*, pretendemos validar estas nuevas líneas celulares ES para ser utilizadas en el análisis funcional de la proteína REX1. Además se tratará de confirmar el potencial de diferenciación hepática de dichas líneas celulares ES-FCL, para su posible uso como herramienta de trabajo en el desarrollo de nuevas terapias celulares en patología hepática y su ensayo preclínico en el ratón.

Nuestros objetivos específicos son:

- 1- Determinar la expresión de **Rex1 y Cd9** como **marcadores de pluripotencia** en las líneas celulares ES-FCL (**Experimento 1**);
- 2- Comprobar la expresión de **marcadores hepáticos (ApoA1, ApoA4 y ApoE)** en la diferenciación *in vitro* de líneas celulares ES-FCL (**Experimento 2**).

# MATERIAL Y MÉTODOS

## Material biológico

De las 14 líneas celulares ES (ES-FCL) del ratón transgénico FVB/N-Tg(CYP3A4-luc)-Xen, se utilizaron las líneas FCL3.2 y FCL3.3 para el análisis de expresión de Rex1 y Cd9. De cada una de ellas se contaba con tres placas (cultivos realizados previamente por A. Berraondo y P. Muniesa), que se han mantenido en condiciones diferentes: una de ellas con medio de cultivo para ES con LIF y 2i sobre gelatina y fibroblastos, a otra se le mantenía sin fibroblastos, y la tercera placa se cultivó sobre fibroblastos pero el medio de cultivo para ES solo tenía como inhibidor el LIF.

De estos cultivos se tomaron las muestras para el **Experimento 1**:

- Medio con LIF y 2i sobre gelatina y fibroblastos, muestras:

**3.2:** ES.3.2 TRIZOL 2i+MEFs

**3.3:** ES.3.3 TRIZOL 2i+MEFs

- Medio sobre fibroblastos sin 2i, muestras:

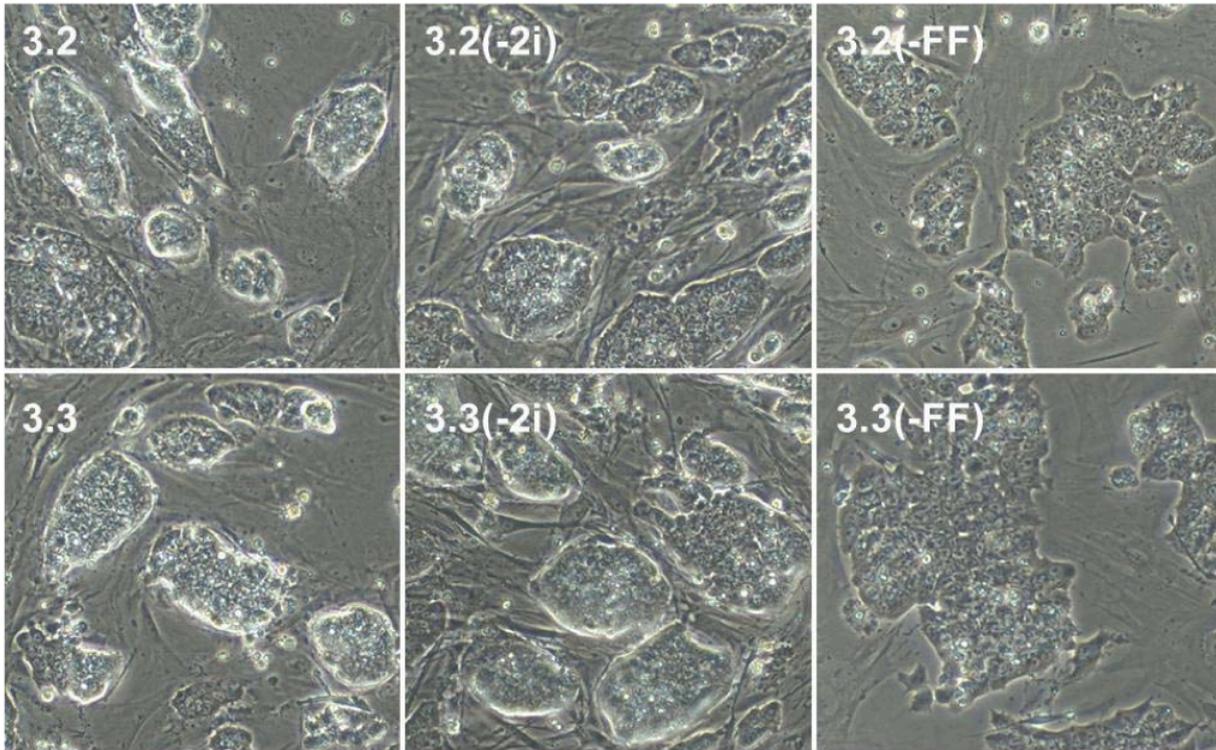
**3.2(-2i):** ES.3.2 TRIZOL MEFs

**3.3(-2i):** ES.3.3 TRIZOL MEFs

- Medio sin fibroblastos, con 2i y LIF, muestras:

**3.2(-FF):** ES.3.2 TRIZOL 2i

**3.3(-FF):** ES.3.3 TRIZOL 2i



**FIGURA 2:** *Ensayo comparativo de cultivo de las líneas 3.2 y 3.3 en medio ES-L2i, sin 2i (-2i) y sin MEFs(-FF). Adaptado de Berrando, Memoria de trabajo fin de máster, 2001).*

Para el ensayo de diferenciación a hepatocitos funcionales, se utilizaron cultivos previos de células ES de las líneas ES-FCL 2.2 y 3.3 (realizados por A. Berraondo y P. Muniesa). Mediante la formación de cuerpos embrioides en suspensión y posterior diferenciación por adhesión al sustrato, pudieron detectarse pequeños focos de bioluminiscencia emitida por posibles hepatocitos diferenciados en cultivo *in vitro*. Para ello se usó un equipo IVIS-Lumina de Xenogen de captura de bioluminiscencia (realizado por E. Romanos de la Unidad de Valoración Funcional del CIBA), lo que permitió seleccionar las zonas de los cultivos donde se tomaron muestras para su posterior estudio de diferenciación en el **Experimento 2:**

- De las zonas de las placas 3.3 y 2.2 con activación de la bioluminiscencia se obtuvieron las siguientes muestras celulares:

**FCL 3.3:** FCL 3.3

**FCL 2.2:** FCL 2.2

- De zonas donde no se encontró señal lumínica se extrajo también material celular, que servirían como control:

**N-FCL 3.3:** NO LUC FCL 3.3.

**N-FCL2.2:** NO LUC FCL 2.2

## **Material Instrumental y Reactivos**

### **Extracción RNA**

- Agua destilada y desionizada: Agua milli-Q (MQ) cuya resistividad sea superior a 18 MΩ en un recipiente limpio de RNAsas.
- Agua tratada con dietilpírocarbonato (agua DEPC). Por cada litro de agua destilada y desionizada se le añadió 0,5 ml de DEPC. Se agitó vigorosamente hasta solubilizar bien el DEPC. Se dejó actuar más de 12h para posteriormente eliminarlo mediante autoclavado durante 1 hora a 1 atm. Previo a cada uso, se ha autoclavado durante 20 min a 1 atm.
- Solución descontaminante de DEPC al 0,05%.
- SDS al 10%. Se humectaron 100 g de sodio dodecil sulfato en 700 ml de agua tratada a 60 °C durante una noche, el día posterior se completó el volumen a 1000 ml.
- TE: 10 mM Tris-HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA. Se tomó 10 ml de Tris/HCl 1 M pH 8,0 para RNA y 2 ml del EDTA 0,5 M, Posteriormente se completó a 1 l con agua tratada.. Previo a cada uso durante 20 min a 1 atm.
- Cloroformo. (Sigma®).
- Isopropanol. (Sigma®).
- Etanol al 75%:
- Reactivo de extracción: Tri-reagent®. (AMBION®).
- TBE. Se disolvieron 10,8 g de TRIS base en 800 ml de agua tratada. Se añadió 40 ml de 0,5 M EDTA pH 8,0. Posteriormente se disolvió 5,5 g de ácido bórico y se completó el volumen a 1 l con agua tratada. Posteriormente se autoclavó.
- Bromuro de etidio. (SIGMA®).
- Gel de agarosa de RNA al 1% en TBE: 0,5 g de agarosa en 50 ml de tampón TBE, al que se añadió bromuro de etidio al 0,5 µg /ml.
- Tampón de carga de RNA.: Azul de bromofenol al 0,25%; xileno cianol al 0,25%, EDTA 1 mM y glicerol al 50% en agua tratada
- Nanodrop™1000.

### **Purificación RNA**

- TURBO Dnase (2 unidades/µl) (120 µl).
- 10x TURBO DNase Buffer (600 µl).
- DNaseInactivationReagent (600 µl).
- Nuclease-FreeWater, o agua DEPC (1,75 ml).
- Termociclador (S1000™ ThermalCycler, BIO-RAD®).

- Nanodrop™1000.

### **Retrotranscripción RNA y obtención del cDNA**

- RandomHexamer Primer (0,2 µg/µl)
- 1 µldNTPMix (10 mM cada uno).
- M-MuLV Reverse Transcriptase (20 U/µl).
- RiboLockRNaseInhibitor (20 U/µl).
- Agua destilada estéril.
- 5x Reaction Buffer (250 nMTris-HCl( Ph 8,3), 250 Mm KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>).
- Termociclador ( S1000™ ThermalCycler, BIO-RAD®)

### **PCR cuantitativa (qPCR)**

- Kit de SYBR®Green (SYBR®Green, AppliedBiosystems™).
- Cebadores o *Primers* específicos para los genes a estudiar.
- Placas de tubos de 200 µl aptos para uso RT-PCR.
- Tapas de tubos optical caps.
- Real Time PCR system, StepOneplus™.

## **Métodos**

### **Extracción de RNA**

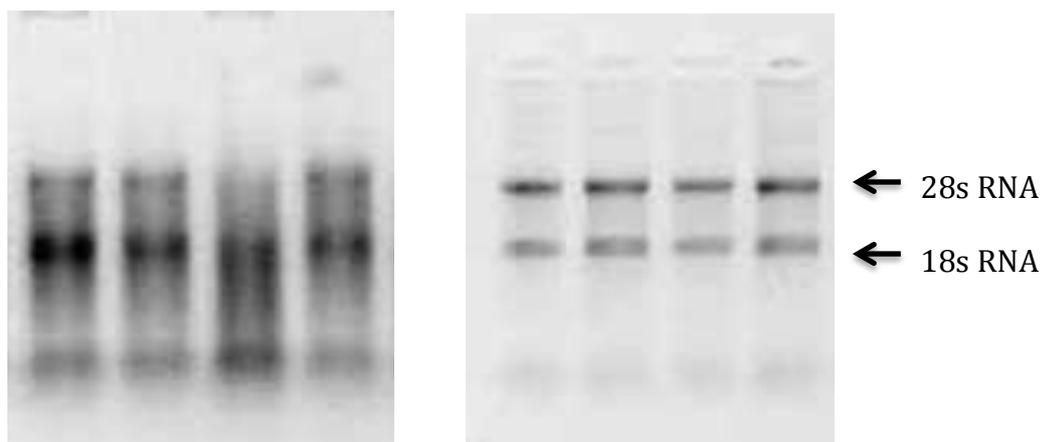
La manipulación de RNA es un trabajo extremadamente sensible, ya que las RNAsas están presentes en el ambiente, sobretodo en nuestra piel. Para realizar este trabajo debemos tener extremo cuidado, usar material exclusivo para trabajo con RNA y limpiar todo el material que vayamos a usar con una solución de descontaminación de RNAsas: RNaseZap. Se realiza la extracción mediante dos protocolos diferentes.

El método de extracción usado en el **Experimento 1** se basa en el método de extracción fenólica y precipitación con isopropanol, con el protocolo puesto a punto por M. Sánchez y J. Schoorlemmer. Se partió de las muestras conservadas en trizol a -80 °C. Se mezclaron 100 µl de trizol con 20 µl de cloroformo, generando tres fases tras una incubación de 3 minutos a temperatura ambiente y una centrifugación de 12 krpm 15 minutos a 4 °C. El RNA se localiza en la fase superior acuosa, la interfase contiene el gDNA y la fase fenólica los restos celulares y proteínas. Para precipitar los ácidos nucleicos de la fase superior acuosa, se

separa con cuidado de no arrastrar la interfase, y se le añade 60  $\mu$ l de isopropanol y 1,5  $\mu$ l de glucógeno (20  $\mu$ g/ $\mu$ l), que actúa como co-precipitante facilitando la visualización del precipitado. El pellet se lavó con EtOH al 75%, se resuspendió en MQ libre de RNasas y se incubó 5 minutos a 37 °C para conseguir una correcta homogenización. El procedimiento continua en el apartado *Purificación de RNA*, hasta la medición de su concentración y pureza final en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific)* (resultados en Anexo, *Tabla 1*).

En las muestras con concentración y pureza insuficiente (**3.3** y **3.2**), se repitió el procedimiento de extracción. Como se vio poco pellet en el último paso de la extracción después del lavado con 500  $\mu$ l EtOH 75%, se sospechó que se desprendió parte de la muestra en este último lavado y se almacenaron estas muestras como excedente. Al haber 500  $\mu$ l de muestra, se dividió en dos, resultando **3.2L** y **3.2L(2)** del lavado sobrante de **3.2**; y **3.3L** y **3.3L(2)** de **3.3**. Se volvió a aplicar el protocolo sobre estas muestras y a realizar las mismas mediciones en el *Nanodrop*. (Resultados en Anexo, *Tabla 2*). Como **3.2L** tiene concentración similar a la muestra original pero una mejor relación de bandas, se sustituyó la muestra original **3.2** por **3.2L**.

El método de extracción usado en el **Experimento 2** se basa en el mismo principio de extracción fenólica y precipitación con isopropanol, pero con diferente procedimiento. Partimos de las muestras en 1 ml de trizol y congeladas a -80 °C. Se añade 0,2 ml de cloroformo por muestra a fin de crear una bifase. Se centrifugan a 13000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se recoge la fase superior acuosa que es la que contiene el RNA (0,5 ml aproximadamente). Posteriormente se añade 0.5ml de isopropanol y se centrifuga en las mismas condiciones, precipitando el RNA. Se decanta el sobrenadante y se lava el pellet con 1ml de etanol al 75%. Tras volver a centrifugar para adherir el precipitado, decantamos el sobrenadante y dejamos secar el pellet con cuidado de que no se seque demasiado porque puede dar problemas de solubilización. Por último, se disuelve el pellet en 100  $\mu$ l de agua DEPC. Para medir la integridad de los RNAs obtenidos se procede a la electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Se mezclan 500ng de la muestra con 8  $\mu$ l de 1X TE y 1 $\mu$ l de azul de bromofenol y se cargan en el gel, sometiendo la electroforesis en a 90 voltios durante 25 minutos. Se visualiza el resultado en el transiluminador de UV, apreciando las bandas de RNA ribosómico 28S y 18S, donde la primera debería ser aproximadamente el doble de la segunda.



**FIGURA 3:** Ejemplo de electroforesis en gel de agarosa de RNA: **a)** RNA degradado. Se intuyen las bandas de RNA 28s y 18s, pero no de forma nítida. **b)** RNA íntegro. Se ven las dos bandas bien diferenciadas de RNA 28S y 18S, siendo la primera el doble de intensa que la segunda. (Imágenes cedidas por Luis Herrera, Departamento de Bioquímica).

Tras verificar que tienen una integridad aceptable, se midió en el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific) la concentración y pureza del RNA (Resultados en Anexo, Tabla 3).

### Purificación RNA

Este procedimiento persigue eliminar el DNA genómico presente en nuestra muestra de RNA mediante el tratamiento con una DNasa que posteriormente es inactivada y eliminada de la muestra junto a los cationes divalentes que podrían interferir en la PCR.

En el **Experimento 1** se utilizó un *Kit de Invitrogen* (ThermoScript RT-PCR) que contiene DNasas sin RNasas para eliminar cualquier posible contaminación con DNA genómico, junto a otros reactivos (DTT,  $MgCl_2$  y NaAc), y se incubó 15 minutos a 37 °C para dejar actuar a la enzima y los reactivos. Tras el tratamiento enzimático, se añadió 100  $\mu$ l de fenol y se centrifugó durante 5 minutos a 12 krpm a 4 °C, para desnaturalizar las posibles proteínas contaminantes. Separamos a un eppendorf limpio la fase acuosa donde se encuentra nuestro RNA. Para extraer la máxima cantidad posible de RNA se repitió el proceso de extracción, añadiendo agua MQ al fenol sobrante del paso anterior, y juntando la fase acuosa de este paso con la del anterior. Para volver a precipitar esta fase acuosa, se añadió 15  $\mu$ l de NaAc 3M, 450

ul de EtOH 100% y 1,5 ul de glucógeno (20  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) para incubarlo 10 minutos a temperatura ambiente y volver a centrifugarlo 8 min a 12krpm. El pellet resultante se lavó con 500  $\mu\text{l}$  EtOH al 75%, se resuspendió en MQ libre de RNAsas y se determinó su concentración y pureza en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific)* (Resultados en Anexo, Tabla 1).

En el **Experimento 2** se usó el *Kit Turbo DNA-Free Ambion AM1907*. Tras conocer la concentración de RNA, se procedió a purificar 5  $\mu\text{g}$  de RNA para cada muestra. A dicha muestra se le añadió 5  $\mu\text{l}$  de Buffer de Turbo DNA free kit + 1  $\mu\text{l}$  de enzima DNasa y se completó el volumen con agua DEPC hasta 45  $\mu\text{l}$ . Se incubaron las muestras durante 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se le añadió 5  $\mu\text{l}$  del inactivador durante 2 minutos. Finalmente se centrifugó 2 minutos a 11 krpm para precipitar el inactivador junto con las DNAsas, transfiriendo el sobrenadante a un tubo nuevo, con cuidado de no tomar el precipitado donde se encuentra el DNA, la DNasa y otros cationes divalentes como magnesio y calcio que podrían degradar el RNA en etapas posteriores. Si no hubiera contaminación, la concentración aproximada sería 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  ya que si se han añadido 5  $\mu\text{g}$ =5000 $\text{ng}$  en un volumen final de 50  $\mu\text{l}$  la dilución sería 5000/50=100 $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Se mide la concentración y pureza nuevamente en el espectrofotómetro *Nanodrop ND-1000 (ThermoScientific)* (Resultados en Anexo, Tabla 4). Las muestras con insuficiente concentración o calidad [N-FCL 2.2] fueron desechadas.

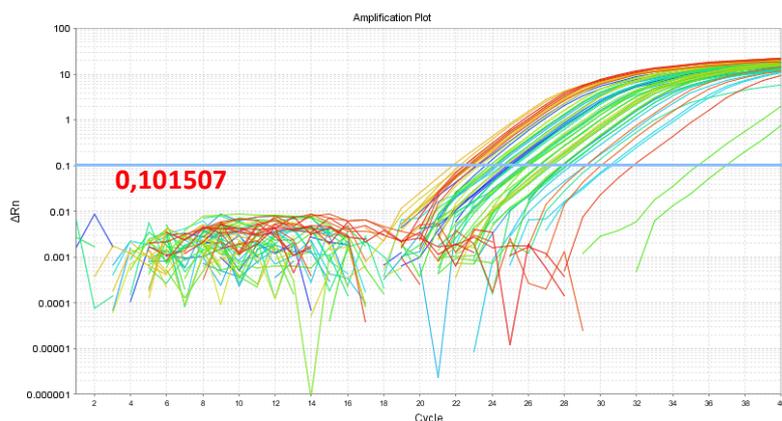
### Retrotranscripción del RNA y obtención del cDNA

En el **Experimento 1** se toman las concentraciones de RNA que se hicieron nada más extraer y limpiar, y se calcula el volumen que debemos extraer para tener 500 ng de RNA y el volumen de agua que debemos añadir para tener 5  $\mu\text{l}$  de volumen final. A estos 5  $\mu\text{l}$  le añadimos 2  $\mu\text{l}$  de Buffer, 0,5  $\mu\text{l}$  de PrimeScript RT EnzymeMix y 0,5  $\mu\text{l}$  de Random Hexameros, tras lo cual se activó la enzima a 25 °C 5 minutos y a 37 °C durante 60 minutos, inactivándola posteriormente con un choque de 85 °C durante 5 segundos. Se almacena el cDNA obtenido a 4 °C hasta su uso.

En el **Experimento 2**, partiendo de los resultados de la concentración del RNA limpio, se realizan los cálculos para retrotranscribir 500 ng de RNA de cada muestra en un volumen de 10  $\mu\text{l}$ . Luego se le añade 1  $\mu\text{l}$  de Random Hexameros Primers y se calentó a 65 °C durante 5 minutos en el termociclador. Posteriormente se le añadió a cada muestra 9  $\mu\text{l}$  de un cocktail formado por 4  $\mu\text{l}$  de Buffer 5x, 2  $\mu\text{l}$  de dNTPs, 1  $\mu\text{l}$  de Inhibidor de RNAsas y 2  $\mu\text{l}$  de la enzima retrotranscriptasa y se incubó y almacena a mismas condiciones que el primer procedimiento.

## PCR cuantitativa (qPCR)

El fundamento de la Reacción en Cadena de la Polimerasa es hacer copias de DNA de unas secuencias determinadas, a partir de unos *primers* específicos. Para amplificarlos se realizan una serie de ciclos de temperaturas que nos permiten repetir el proceso un número determinado de veces (normalmente 40 veces). En la qPCR la cantidad de DNA se mide después de cada ciclo mediante el uso de marcadores fluorescentes que se incorporan al producto de PCR. Para este trabajo se utilizó SYBRgreen, que es un agente intercalante que se introduce en la estructura secundaria de la doble hélice del DNA y se acopla energéticamente a los ácidos nucleicos que lo forman, de manera que se incrementa notablemente su tasa de emisión fluorescente. El incremento de la señal fluorescente es directamente proporcional al número de moléculas de producto de PCR (amplicones) generados en la fase exponencial de la reacción. En los primeros ciclos de la qPCR la fluorescencia permanece en niveles no detectables, similares al ruido de fondo o *background* hasta un momento determinado en el que se alcanza un acúmulo detectable de producto amplificado. La PCR cuantitativa, nos permite identificar los ciclos necesarios en los que se alcanza el Ct (CycleThreshold, ciclo umbral). Este valor se obtiene mediante una línea horizontal, que la determina el programa



**Figura 4.** qPCR, detalle del ciclo umbral o Ct. (Imagen cedida por Luis Herrera, Departamento de Bioquímica).

por encima del background de los 8 primeros ciclos para todas las muestras. El valor de Ct de cada muestra sirve para cuantificar ya que mide en la fase exponencial de la reacción cuando los reactivos no están limitados, doblando el número de moléculas presente con cada ciclo de amplificación.

Para la qPCR del **Experimento 1**, los genes de estudio serán *Rex1* y *Cd9*, al ser conocidos marcadores de pluripotencia, ya que el objetivo de este experimento es cuantificar su presencia para caracterizar el estado de pluripotencia de los cultivos de células ES. Se utilizó como gen normalizador de la expresión (gen de referencia o HouseKeeping) gliceraldehído-3-fosfato-deshidrogenasa (*GapdH*). De esa forma, fue posible comparar los niveles de expresión sin la necesidad de conocer su valor absoluto. Los primers específicos para esta qPCR se encuentran en el Anexo, Tabla 5. Las muestras tienen alta concentración (500ng/10ml), por lo

que primero se diluyen 4ml de muestra con 4ml de DEPC para tener 25µg/ml (excepto la muestra **3.2L** que ya se encuentra diluida a esa concentración). El programa de amplificación fue 50 °C, 2min>95 °C, 10 min>40 ciclos (95 °C, 15s>60 °C, 1min) >95 °C, 15s>60 °C, 20s>95 °C, 15s.

Para la qPCR del **Experimento 2**, los genes de estudio serán *ApoA1*, *ApoA4* y *ApoE* al ser factores presentes en el hepatocito maduro, ya que el objetivo de este experimento es comprobar su expresión para caracterizar la diferenciación de las células ES a hepatocitos. Se utilizo como gen normalizador de la expresión *GapdH*. Los primers específicos para esta qPCR se encuentran en el Anexo, Tabla 6. En este caso no hace falta diluir al tener menor concentración de muestras. Se coge 1µl de muestra y se le añade 0,25µl de cada primer ([5 uM]) (directo y reverso), 6,25µl de SYBR y 4,75µl de Agua DEPC. Se siguió el mismo programa de amplificación que en la primera qPCR.

### **Procedimiento matemático**

Este proceso tiene dos partes. La primera es evaluar los primers, tanto del gen que vamos a estudiar como del housekeeping (cuya expresión tiene que ser invariable en las condiciones del estudio). Para ver la capacidad de amplificación de nuestras muestras, haremos un pool de cada grupo con los cDNAs y sus respectivas diluciones decimales, desde cDNA sin diluir hasta la dilución 1/1000. Tanto del gen a estudiar como del gen control, representaremos dos rectas de calibrado en las que representaremos la media del valor Ct de cada dilución frente al logaritmo de la concentración de cDNA. Una vez representada la gráfica. Hay que observar la pendiente de la recta, cuyo valor óptimo es -3,32, por lo que si obtenemos pendientes con un error  $\pm 10\%$ , tendremos que volver a probarlo en otras condiciones. Además la pendiente de los dos genes tiene que ser parecida, ya que si es muy diferente no son comparables.

Lo siguiente que hay que ver es la dilución a utilizar para analizar las muestras. Esta técnica pierde precisión a partir de 32 ciclos, por lo que tenemos que emplear la dilución correspondiente a un valor Ct inferior a 32 ciclos para los genes de estudio.

La segunda parte del proceso es evaluar las muestras y hacer los cálculos matemáticos para compararlas. Como las muestras se hacen por duplicado, se tiene que hacer la media y la desviación estándar y comprobar que no ha habido problemas en ninguna muestra ni duplicado. Luego hay que comprobar que el gen control no cambia en las condiciones de estudio mediante un análisis estadístico entre grupos. A continuación, con la media de cada

gen y animal, se calcula el valor  $\Delta Ct$  ( $Ct$  gen de estudio -  $Ct$  gen housekeeping). El siguiente paso es normalizar los valores de  $\Delta Ct$ , para lo que calcularemos la media de este valor para el grupo control, y se restará a todas las muestras los valores  $\Delta Ct$  del grupo control, con lo que obtendremos  $\Delta\Delta Ct$ . Para representar los datos de forma que comparable, existen dos posibilidades, hacerlo utilizando la potencia ( $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) o el logaritmo ( $R = \text{Log}(\Delta\Delta Ct)$ ). (*Procedimientos matemáticos en Anexo, Experimento 1: Tabla 7, Experimento 2: Tabla 8*).

### **Análisis Estadístico**

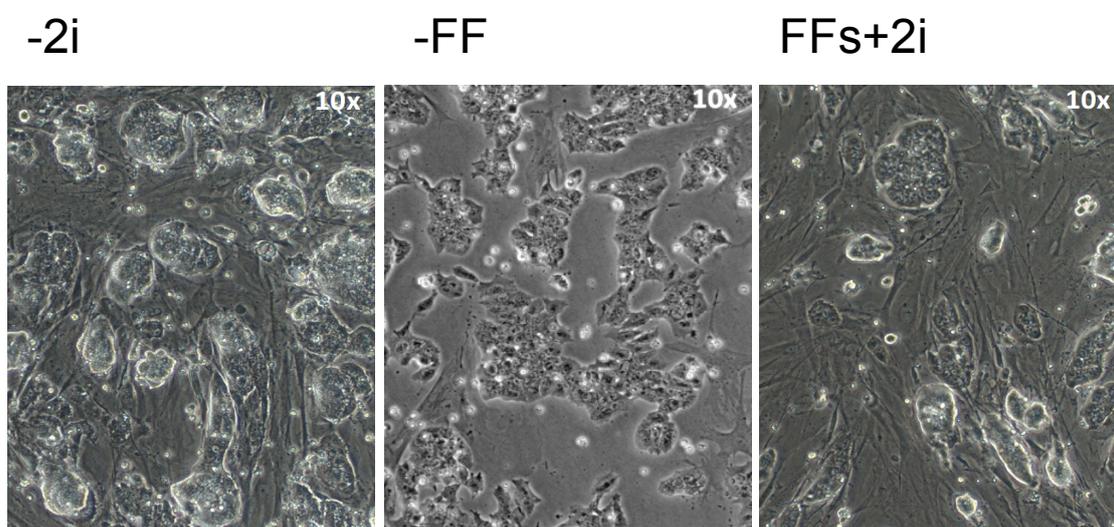
Todos los datos obtenidos se recogieron en una hoja de cálculo Microsoft Office Excel para su posterior análisis estadístico. El test Shapiro-Wilk se aplicó para analizar el tipo de distribución.

Tras analizar el tipo de distribución y los procedimientos matemáticos, los resultados obtenidos del **Experimento 1** se evaluaron por el test one way ANOVA de una cola en busca de diferencias significativas. Estos análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el programa GraphPad. Los resultados del **Experimento 2** no pudieron ser analizados por este programa al tener un número insuficiente de muestras.

## RESULTADOS

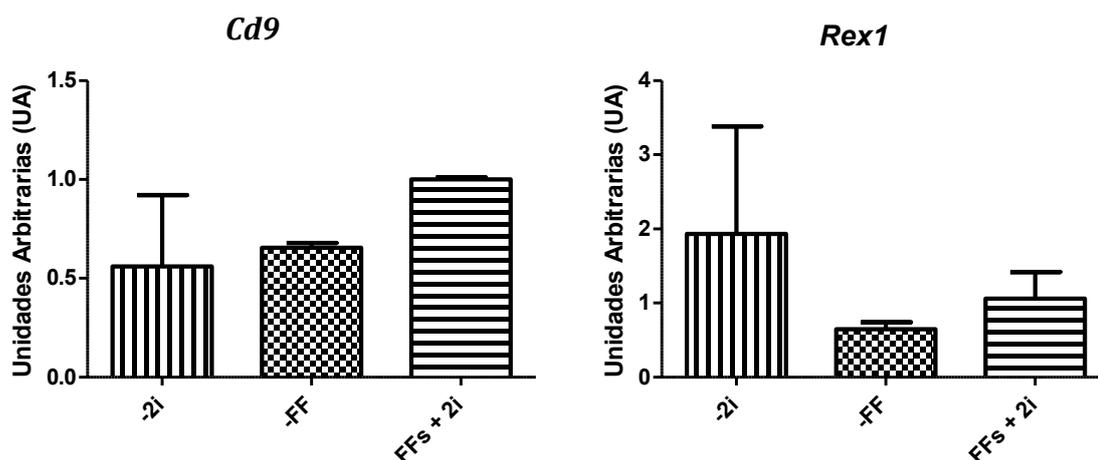
### Experimento 1:

En la **Figura 5** se muestra como ejemplo el crecimiento y aspecto del cultivo de la línea FCL3.3, en cada una de las condiciones ensayadas, a las 48 horas de la resiembra. En general se observó un mayor crecimiento en ausencia de 2i, aunque pudo observarse un cierto grado de diferenciación en las colonias. En medio completo con 2i y fibroblastos (FFs+2i) el crecimiento fue algo menor pero el aspecto de las colonias era compacto y sin apenas diferenciación. Por contra, en medio completo sin fibroblastos (-FF), las colonias presentaban un aspecto mucho más aplanado y menos compacto.



**Figura 5.** Aspecto de los cultivos de la línea FCL3.3 en medio completo sin 2i (-2i), en medio completo sin capa nutricia de fibroblastos embrionarios de ratón (-FF), o en medio completo sobre fibroblastos y en presencia de 2i (FFs+2i) (Berraondo et al. en preparación)

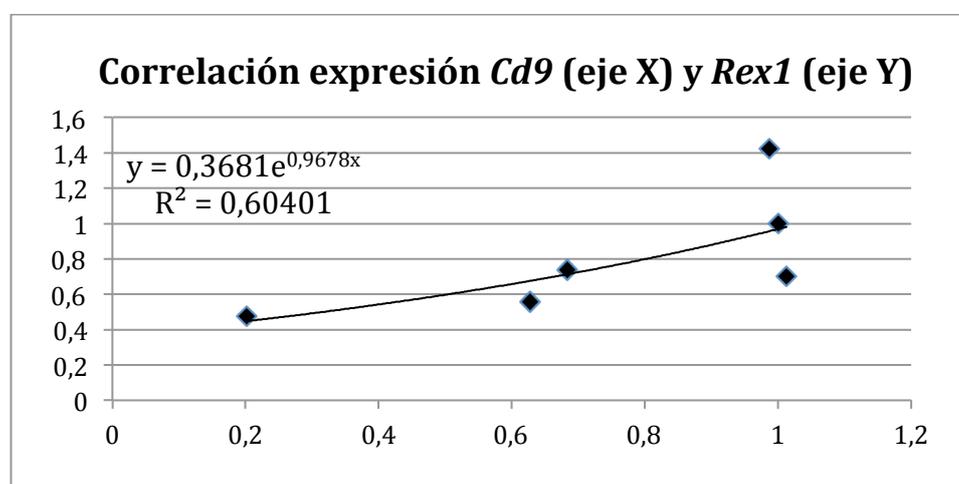
El análisis de la expresión de Rex1 y Cd9 en las tres condiciones en que se realizó y tras aplicar los procedimientos matemáticos expuestos en el apartado de *materiales y métodos* (*procedimientos en Anexo II, Tabla 7*) y el análisis estadístico con el test de *one way Anova de una cola*, se obtienen los siguientes resultados representados en la **Gráfica 1**.



**Gráfica 1.** Efecto del cultivo de la línea 3.3 sin 2i (-2i), sin fibroblastos embrionarios (-FF) o en medio completo sobre fibroblastos y en presencia de 2i (FFs+2i) en la expresión a nivel de mRNA de Cd9 y Rex1 normalizando con Gapdh y medido mediante qPCR. Resultados expresados como media  $\pm$  desviación estándar.

Aunque el reducido número de muestras no permite establecer diferencias significativas en la expresión de Rex1 y Cd9 en las diferentes condiciones ensayadas, nuestros resultados parecen mostrar una mayor variabilidad de los datos obtenidos en ausencia de 2i. También podría apreciarse una tendencia a expresar una menor cantidad de ambos, sobre todo Rex1, en ausencia de la capa nutricia de fibroblastos (-FFs).

En la **Gráfica 2** se observa como los resultados de la expresión de Rex1 y Cd9, aunque no es significativa su correlación, parece apreciarse una cierta tendencia de correlación positiva en su expresión que sería necesario confirmar con el análisis de un mayor número de muestras.



**Gráfica 2.** Correlación entre los resultados obtenidos en la qPCR de Cd9 y Rex1.

## Experimento 2

En este experimento se trató de verificar el potencial de diferenciación hepatocítica de las líneas FCL, las cuales poseen integrado el transgén Cyp3A4-luc, que producen bioluminiscencia in vivo al expresar la luciferasa en hepatocitos diferenciados. Aunque no es posible hacer el análisis estadístico por el reducido número de muestras (n=3), llevando a cabo los procedimientos matemáticos anteriormente explicados (*procedimientos en Anexo II, Tabla 8*), se obtienen los siguientes resultados, representados en la **Gráfica 3**.

	ApoA1	ApoA4	ApoE
<b>[FCL 2.2]</b>	0,30	6,93	0,14
<b>[FCL 3.3]</b>	2,28	592,30	24,94
<b>[N-FCL 3.3]</b>	1,00	1,00	1

**Gráfica 3.** Expresión de marcadores hepáticos a nivel de mRNA normalizando con GapdH. (Unidades Arbitrarias).

Puede observarse un incremento de la presencia de ApoA4 en ambas líneas celulares en las muestras tomadas de los puntos de placa en que se observó un incremento de luminiscencia debido a la expresión del transgén Cyp3A4-luc. En la línea FCL3.3 también se observó un cierto incremento de ApoA1 y ApoE, respecto de las zonas control que no presentaron luminiscencia (N-FCL 3.3).

## DISCUSIÓN

*Reduced expression-1 (Rex1)* y *Yin Yang2 (Yy2)* son factores de transcripción presentes únicamente en mamíferos placentarios, originados por retrotransposición de *Yin Yang1 (Yy1)*, gen altamente conservado en los metazoos (38). Los tres conservan una gran homología en el dominio de sus cuatro "dedos de zinc" de tipo Cis2-His2. Mientras Yy1 es un factor ubicuo, con posibilidad de actuar como activador o represor en función del contexto genómico y celular, *Rex1* constituye uno de los principales marcadores de pluripotencia en células troncales embrionarias. La información disponible sobre Yy2 es aún escasa y fragmentaria. Trabajo previo del grupo (28, 29, 43, 44), ha mostrado que ambos se expresan durante el desarrollo preimplantacional, están presentes en las líneas celulares embrionarias (ES y TS), obtenidas en la fase de blastocisto, y contribuyen al mantenimiento de la pluripotencia y proliferación *in vitro* de líneas celulares ES. También están presentes en células trofoblásticas gigantes en los márgenes del disco placentario, así como (YY2 en particular) en células germinales del testículo y en líneas celulares troncales espermatogoniales (spermatogonial stem cells, SSC).

Yy1 es de expresión ubicua y su eliminación en el ratón es letal en el periodo perimplantacional. Debe desempeñar alguna función básica en el desarrollo de los metazoos pluricelulares, que probablemente continúa haciendo en mamíferos. Se sabe que actúa como regulador de la transcripción, activando o silenciando en función del contexto, y su capacidad de reclutar complejos Polycomb a la cromatina (51). Desde que se identificó, despertó interés su aparente dependencia funcional del ciclo celular (52), y la influencia que podía tener en el cáncer (54). Y algo importante para nuestro trabajo ha sido la asignación de una interesante función del Yy1 en la regulación de genes con impronta (54, 55, 56) estableciendo marcas de H3K9me3 en regiones pericentroméricas de espermatoцитos primarios (57), o favoreciendo la metilación de dominios de control epigenético en genes concretos, como *Peg3*, durante la oogénesis (58). Kim y cols. (59), al describir el ratón carente de *Rex1*, observan cambios en la metilación de algunos genes sometidos a impronta, por lo que concluyen que la actividad de *Rex1* no es redundante y que incluso podría tener un papel en oposición a Yy1.

Resultados previos del grupo llevaron a proponer que REX1 podría desempeñar su principal función en el control genético de elementos retrovirales asociados al proceso de formación y función de la placenta, en los cuales ocurren de forma típica los fenómenos de impronta genética (28). Una de las claves de la regulación de todo el proceso se lleva a cabo durante el periodo preimplantacional. Éste es el único momento del ciclo vital, junto al que

ocurre durante el desarrollo del linaje germinal, en el que se producen importantes cambios epigenéticos que cursan con una desmetilación generalizada del ADN materno y paterno (60). En este periodo deberán realizarse, por un lado, la reprogramación del genoma junto con la preservación de las marcas epigenéticas heredadas de los progenitores con el fin de asegurar una dosificación génica compensada en las hembras, y por otro, organizar una defensa específica frente a la reactivación de elementos parásitos de origen retroviral, que habitualmente permanecen silenciados. En la masa celular interna, activando *Tsix*, *Rex1* garantiza la disponibilidad de ambos cromosomas X en la construcción de cada nuevo individuo hembra (42).

El análisis realizado mediante ChIPseq de la asociación a cromatina de REX1 en células ES (pendiente de publicación) ha puesto de manifiesto su unión a un conjunto de dianas génicas, entre las que figura *Cd9*. *Cd9* se expresa en el embrión inicial con un aumento de expresión a partir de 8 células coincidiendo con la compactación y presentando también expresión tanto en células ES como TS y en trofoblasto diferenciado (Climent et al. en preparación; Berraondo et al en preparación; NCBI GEO profiles data sets: GDS812, GDS813, GDS3948). *Cd9* podría desempeñar un papel relevante en la organización de los dominios de la membrana celular, fundamentales durante las interacciones necesarias en el desarrollo temprano, ya demostrado en la fecundación (61), y pendiente de analizar a partir de la compactación y durante el proceso de la implantación embrionaria, aunque se ha sugerido un papel inhibitorio en la implantación en el ratón (62). Se expresa en células pluripotentes tanto humanas como de ratón, y se asocia, como *Rex1*, al estado de pluripotencia naive, disminuyendo cuando se inicia la diferenciación (63, 64, 65).

Los resultados obtenidos en el **Experimento 1** permiten confirmar que *Rex1* y *Cd9* se expresan en las líneas FCL. Respecto de las diferencias en las condiciones de cultivo ensayadas, a pesar de las limitaciones impuestas por la baja cantidad de muestras disponibles, los resultados obtenidos sugieren que en medio completo con 2i y fibroblastos nutricios se obtienen niveles más altos, tanto de *Rex1* como de *Cd9*, que en ausencia de fibroblastos. Los fibroblastos aportan LIF y otros factores al cultivo, además de suponer un sustrato adecuado para su propagación y mantenimiento (66), por lo que es normal obtener niveles más bajos en ausencia de fibroblastos. Por otro lado el cultivo sin 2i presenta una mayor dispersión de resultados, coherente con los datos obtenidos por otros. Se sabe que el cultivo de células ES en presencia de suero fetal bovino y LIF produce un estado de pluripotencia morfológica y funcionalmente heterogéneo, mostrando fluctuaciones en la expresión de ciertos genes de

pluripotencia como Nanog, Dppa3 y Rex1 (22, 39). La presencia de 2i en el medio impide la diferenciación, obteniéndose cultivos con una mayor homogeneidad y consistencia en cuanto a la expresión de los genes de pluripotencia (32). Hemos comprobado que en estas condiciones la expresión de Rex1 y Cd9 presentan un comportamiento bastante similar, por lo que no puede descartarse que exista una correlación positiva entre las expresiones de ambos genes. Por todo ello, sería conveniente realizar nuevos ensayos en presencia de 2i y ausencia de suero fetal bovino, con el fin de confirmar si el estado de pluripotencia máximo y más homogéneo alcanzable cursa en paralelo a una mayor expresión de Rex1 y Cd9.

Un estudio reciente (M. Martinez et al , TFG Biotecnología 2016), ha analizado el estado de metilación del locus de *Cd9* al que se une REX1. Por vez primera se ha demostrado que la presencia o ausencia de *Rex1* provoca cambios de metilación en la zona de unión de Rex1 a un gen diana. Sorprendentemente, la ausencia de *Rex1* causa una disminución aparente de la metilación de dicho locus, mientras que trabajos previos en genes de expresión monoalélica paterna en la placenta como *Peg3*, o a una región compleja como la del locus *Gnas-Nespas*, apuntaban en dirección opuesta, provocando la ausencia de *Rex1* un aumento de la metilación (59). Cabe la posibilidad de que estos resultados pudieran deberse a la variación entre líneas celulares ES diferentes, por lo que sería de gran interés repetir el estudio en líneas celulares homogéneas con un mismo trasfondo genético con el fin de evaluar de forma precisa las consecuencias de la presencia o la ausencia de Rex1 en relación a la expresión de sus genes diana. El presente estudio permite validar las líneas FCL para realizar este tipo de ensayos en condiciones más controladas. Además, al disponer de líneas celulares de ambos sexos (XX y XY), permitirá extender el análisis a la región de control de reactivación del cromosoma X paterno, cuyo gen clave (*Tsix*) es una de las principales dianas obtenidas en nuestro estudio de inmunoprecipitación de cromatina con el anticuerpo anti-REX1.

Por otro lado, los resultados obtenidos en el **Experimento 2**, poniendo en evidencia la expresión incrementada de genes presentes en el hepatocito diferenciado, como son ApoA1, ApoA4 y ApoE, al menos en las muestras derivadas de la línea FCL3.3, demuestran el potencial de diferenciación en el linaje endodérmico. De este modo se confirma de nuevo su pluripotencia, ya establecida en ensayos previos realizados de formación de teratomas in vivo (Berraondo et al. en preparación), en los que pudieron observarse derivados de las tres hojas embrionarias. Pero añade la posibilidad de utilizar estas líneas celulares, gracias a la presencia del transgén *Cyp3A4-luc*, como una herramienta extraordinaria en el desarrollo y puesta a punto de metodologías de trasplante de hepatocitos y su ensayo preclínico en el ratón.

## CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos en el **Experimento 1**, permiten confirmar que Rex1 y Cd9 se expresan en las líneas ES-FCL en el estado indiferenciado.
2. El reducido número de muestras no permite establecer diferencias significativas en la expresión de Rex1 y Cd9 en las diferentes condiciones ensayadas, aunque nuestros resultados parecen mostrar una mayor variabilidad de los datos obtenidos en ausencia de 2i. También podría apreciarse una tendencia a expresar una menor cantidad de ambos genes (sobre todo *Rex1*) en ausencia de la capa nutricia de fibroblastos (-FFs).
3. Las líneas celulares ES-FCL permitirán evaluar las consecuencias de la presencia o la ausencia de Rex1 en relación a la expresión de sus genes diana en un trasfondo genético homogéneo
4. Las células ES-FCL, sometidas a un protocolo no dirigido de diferenciación *in vitro*, mediante la formación de cuerpos embrioides en suspensión y su posterior diferenciación en adhesión al sustrato, son capaces de expresar genes marcadores de hepatocitos como son ApoA1, ApoA4 y ApoE.
5. Las células ES-FCL, podrán servir como una herramienta celular de primer orden para el ensayo preclínico de nuevas estrategias terapéuticas de trasplante celular y medicina regenerativa en el ámbito de la patología hepática.

## CONCLUSIONS

1. The results of the study conducted in **Experiment 1**, confirms that Rex1 and CD9 are expressed in ES-FCL lines in the undifferentiated state.
2. The small number of samples does not show significant differences in the expression of CD9 and Rex1 in the different conditions tested. Although our results suggest to show a greater variability of the data obtained in the absence of 2i. Also, we can see a tendency of lower expresson of both genes (mainly in *Rex1*) in absence of the feeder layer of the fibroblasts (-FFs).
3. The cell lines ES-FCL will allow to evaluate the consequences of the presence or absence of Rex1 in relation to the expression of their target genes in a homogeneous genetic background.
4. ES-FCL cells, subjected to a non directed protocol of differentiation *in vitro*, by forming embryoid bodies in suspension and subsequent differentiation in adhesion to the substrate, are able to express genes that are hepatocyte markers such as ApoA1, ApoA4 and ApoE.
5. ES-FCL, cells may serve as a first-order cell tool for preclinical testing of new therapeutic strategies of cell transplantation and regenerative medicine in the field of liver disease.

# VALORACIÓN PERSONAL Y AGRADECIMIENTOS

La elección de este proyecto como trabajo de fin de grado responde al deseo personal de conocer *in situ* el campo de la investigación, beneficiándome de la experiencia en el trabajo de un grupo de renombre como es el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal. Combinando el trabajo de laboratorio con la revisión bibliográfica, he podido iniciar contacto con las dos caras complementarias de este mundo de la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Groth C.G. et al. (1977). Correction of hyperbilirubinemia in the glucuronyl-transferase-deficient rat by intraportal hepatocyte transplantation. *TransplantProc.*, 9, 313-316.
2. Weber A, Groyer-Picard MT, Franco D, Dagher I. (2009). Hepatocyte Transplantation in Animal Models. *Liver Transplantation*, 15(1):7-14.
3. Martin GR. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 78:7634-7638.
4. Evans MJ, Kaufman MH. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292: 154-156.
5. Brook FA, Gardner RL. (1997). The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94: 5709-5712.
6. M.Hemberger, W. Dean and W.Reik. (2009). Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol 10, no8, pp.526-537.
7. Chambers I, Smith A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, Sep 20;23(43):7150-60.
8. MacFarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, Bonanomi D et al. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, 487(7405):57-63. doi:10.1038/nature11244.
9. Tanaka S, Kunath T, Hadjantonakis AK, Nagy A, Rossant J. (1998). Promotion of trophoblast stem cell proliferation by FGF4. *Science*, Dec11;282(5396):2072-5.
10. Takahashi K. And Yamanaka S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-676.
11. 4Yu J. et al. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-1920.
12. Hanna J. et al. (2007). Treatment of sickle cell anemia mouse model with iPS cells generated from autologous skin. *Science*, 318, 1920-1923.
13. Raya A. et al. (2009). Disease-corrected haematopoietic progenitors from Fanconianaemia induced pluripotent stem cells. *Nature*, 460, 53-59.
14. Aoi T. et al. (2008). Generation of pluripotent stem cells from adult mouse liver and stomach cells. *Science*, 321, 699-702.
15. Stadtfeld M, Nagaya M, Utikal J, Weir G, Hochedlinger K. (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science*, 322(5903):945-949.
16. Miura K et al. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *NatureBiotechnology*, 27, 743-745.
17. Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Zhao D, Rivas-Carrillo JD, Lebkowski J, Tanaka N, Fox IJ, Kobayashi N. (2007). Differentiation of mouse embryonic stem cells to hepatocyte-like cells by co-culture with human liver non-parenchymal cell lines. *Nature Protocols*, 2(2):347-356.
18. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li JX, Battle MA, Duris C, North PE, Dalton S, Duncan SA. (2010). Highly Efficient Generation of Human Hepatocyte-Like Cells from Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology*, 51(1): 297-305.

19. Sullivan GJ, Hay DC, Park IH, Fletcher J, Hannoun Z, Payne CM, Dalgetty D, Black JR, Ross JA, Samuel K and others. (2010). Generation of Functional Human Hepatic Endoderm from Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Hepatology*, 51(1): 329-335.
20. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, Dec 2;123(5):917-29.
21. Niwa H., Miyazaki J., Smith AG. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* Apr;24(4):372-6.
22. Chambers, I. et al. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature* vol. no. 450, pp.1230-1234.
23. Silva, J. et al. (2009). Nanog is the Gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, vol. no. 138, pp. 722-737.
24. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, May 30;113(5):643-55.
25. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.*, 2003 Jan 1;17(1):126-40.
26. Whyte W.A. et al. (2013). Master Transcription Factors and Mediator Establish Super-Enhancers at Key Cell Identity Genes. *Cell*, 153: 307-319.
27. Hnisz D., et al. (2013). Super-Enhancers in the Control of Cell Identity and Disease. *Cell*, 155: 937-937.
28. J. Schoorlemmer, R. Pérez-Palacios, M. Climent, D.Guallar, and P.Muniesa. (2014). Regulation of Mouse Retroelement MuERV-L/MERVL Expression by REX1 and Epigenetic Control of Stem Cell Potency. *Front. Oncol.*, vol.4, no February, p.6.
29. Garcia-Tuñón I, Guallar D, Alonso-Martin S, Benito AA, Benítez-Lázaro A, Pérez-Palacios R, Muniesa P, Climent M, Sánchez M, Vidal M, Schoorlemmer J. (2011). Association of Rex-1 to target genes supports its interaction with Polycomb function. *Stem Cell Res.*, Jul;7(1):1-16. PMID: 21530438.
30. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.*, Oct 21;6(10):e253. doi: 10.1371/journal.pbio.0060253.
31. Ying QL, Wray J, Nichols J, Battle-Morera L, Doble B, et al. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453: 519-523.
32. Nichols J, Silva J, Roode M, Smith A (2009). Suppression of Erksignalling promotes ground state pluripotency in the mouse embryo. *Development*, Oct;136(19):3215-22. Doi: 10.1242/dev.038893.
33. Leitch HG, Blair K, Mansfield W, Ayetey H, Humphreys P, Nichols J, Surani MA, Smith A (2010). Embryonic germ cells from mice and rats exhibit properties consistent with a generic pluripotent ground state. *Development*. Jul;137(14):2279-87. Doi: 10.1242/dev.050427.
34. Czechanski A, Byers C, Greenstein I, Schrode N, Donahue LR, Hadjantonakis AK, Reinholdt LG (2014). Derivation and characterization of mouse embryonic stem cells from permissive and non-permissive strains. *Nat Protoc.* Mar;9(3):559-74. doi: 10.1038/nprot.2014.030.

35. Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, Smith A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.*, 2011 Jun 19;13(7):838-45. doi: 10.1038/ncb2267.
36. Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaillekh M, Wray J, Meloche S, Smith A. (2007). FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, Aug, 134(16):2895-902.
37. Guo, G., Huss, M., Tong, G.Q., Wang, C., Li Sun, L., Clarke, N.D., and Robson, P. (2010). Resolution of cell fate decisions revealed by single-cell gene expression analysis from zygote to blastocyst. *Dev. Cell.*, 18, 675.685.
38. J.Do Kim, C. Faulk, and J.Kim. (2007). Retroposition and evolution of the DNA-binding motifs of YY1, YY2 and REX1. *Nucleic Acids Res.*, vol 35, no.10, pp. 3442-3452.
39. Tooyoka Y. et al. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development*, 135, 909-918.
40. Chan E.M. et al. (2009). Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *NatureBiotech.* Doi., 10.1038/nbt.1580.
41. E. Ben-Shushan, J.R. Thompson, L.J. Gudas, and Y. Bergman. (1998). Rex-1, a gene encoding a transcription factor expressed in the early embryo, is regulated via Oct-3/4 and Oct-6 binding to an octamer site and a novel protein, Rox-1, binding to an adjacent site. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 18, no. 4, pp. 1866-1878.
42. Navarro P, Oldfield A, Legoupi J, Festuccia N, Dubois A, Attia M, Schoorlemmer J, Rougeulle C, Chambers I, Avner P. (2010). Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature*. 2010 Nov 18;468(7322):457-60. PMID: 21085182.
43. Climent M, Alonso-Martin S. Pérez-Palacios R, Guallar D, Benito A, Larraga A, Fernández-Juan M, Sanz M, de Diego A, Seisedos MT, Muniesa P, Schoorlemmer J. (2013). Functional analysis of Rex1 during preimplantation development. *Stem Cells Dev.*, 22, 459-472. PMID: 22897771.
44. Guallar D, Pérez-Palacios R, Climent M, Martínez-Abadía I, Larraga A, Fernández-Juan M, Vallejo C, Muniesa P, Schoorlemmer J. (2012). Expression of endogenous retroviruses is negatively regulated by the pluripotency marker Rex1/Zfp42. *Nucleic Acids Research*, Vol. 40, (No. 18) 8993.9007. PMID: 22844087.
45. I.Tachibana and M. E. Hemler. (1999). Role of the Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Proteins CD9 and CD81 in Muscle Cell Fusion and Myotube Maintenance. *Cell* vol. 146, no. 4, pp. 893-904.
46. L. Humnert and M. Chevrette. (2011). CD9 (CD9 molecule). *Atlas Genet. Cytogenet. Oncol. Haematol.*, vol. 112, no 7, pp. 630-632.
47. R. Waterhoyse, C. Ha, and G. S. Dveksler.(2002). Murine CD9 is the receptor for pregnancy-specific glycoprotein 17. *J. Exp. Med.*, vol. 195, no. 2, pp 277-282.
48. H. Akutsu, T. Miura, M. Machida, J. IchiBirumachi, A. Hamada, M. Yamada, S. Sullivan, K. Mikado, and A. Umezawa.(2009). Maintenance of pluripotency and self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of traspanin CD9. *Differentiation*, vol. 78, no. 2-3, pp.137-142.

49. T.N. Oka M, Tagoku K, Russell TL, Nakano Y, Hamazaki T, Meyer EM, Yokota T. (2002). CD9 is associated with leukemia inhibitory factor-mediated maintenance of embryonic stem cells. *Mol. Biol. Cell.*, vol. 13, no. 4, pp 1274-1281.
50. Zhang W, Purchio AF, Chen K, Wu J, Lu L, Coffee R, Contag PR, and West DB (2003). A transgenic mouse model with a luciferase reporter for studying in vivo transcriptional regulation of the human CYP3A4 gene. *Drug Metab Dispos* 31:1054–1064
51. Shi, W., H. Wang, et al. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J. Biol. Chem.*, 281(33): 23319-23325.
52. Rizkallah R., Hurt, M.M. et al. (2009). Regulation of the transcription factor YY1 in mitosis through phosphorylation of its DNA-binding domain. *Mol. Biol. Cell.*, 20:4766–4776.
53. Gordon S., Akopyan G., et al. (2006). Transcription factor YY1: structure, function, and therapeutic implications in cancer biology. *Oncogene*, 25:1125–1142.
54. Kim, J., A. Kollhoff, et al. (2003). Methylation-sensitive binding of transcription factor YY1 to an insulator sequence within the paternally expressed imprinted gene, Peg3. *Hum Mol Genet.*, 12(3): 233-245.
55. Kim, J., A. Hinz, et al. (2006). Identification of clustered YY1 binding sites in imprinting control regions. *Genome Res.*, 16(7): 901-911.
56. Kim, J. D., A. K. Hinz, et al. (2007). YY1 as a controlling factor for the Peg3 and Gnas imprinted domains. *Genomics*, 89(2): 262-269.
57. Wu, S., Hu, Y.C. and Shi, Y. (2009). Loss of YY1 impacts the heterochromatic state and meiotic double strand breaks during mouse spermatogenesis. *Mol. Cell. Biol.*, 29: 6245–6256.
58. Kim, J.D., Kang, K., et al. (2009). YY1's role in DNA methylation of Peg3 and Xist. *Nucleic Acids Res.*, 37: 5656–5664.
59. Kim, J. D., H. Kim, et al. (2011). Rex1/Zfp42 as an epigenetic regulator for genomic imprinting. *Hum. Mol. Genet.* 20(7): 1353-1362.
60. Reik, W., W. Dean, et al. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293(5532): 1089-1093.
61. Miyado, K.; Yamada, G.; Yamada, S.; Hasuwa, H.; Nakamura, Y.; Ryu, F.; Suzuki, K.; Kosai, K.; Inoue, K.; Ogura, A.; et al. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*, 287, 321–324.
62. Liu, WM et al (2006). Tetraspanin CD9 regulates invasion during mouse embryo implantation. *Journal of Molecular Endocrinology*, 36, 121–130.
63. Oka, M., Kenichi Tagoku, Thomas L. Russell, Yuka Nakano, Takashi Hamazaki, Edwin M. Meyer, Takashi Yokota, and Naohiro Terada. (2002). CD9 Is Associated with Leukemia Inhibitory Factor mediated Maintenance of Embryonic Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell* Vol. 13, 1274–1281.
64. Kolle, Ho, Zhou et al. (2009). Identification of Human Embryonic Stem Cell Surface Markers by Combined Membrane-Polysome Translation State Array Analysis and Immuno transcriptional Profiling. *Stem Cells*, 27:2446–2456.
65. Gafni, O. et al. (2013). Derivation of novel human ground state naïve pluripotent stem cells. *Nature*, 504(7479):282-6.
66. Smith AG. (1991). Culture and differentiation of embryonic stem cells. *Journal of Tissue Culture Methods* 13: 89–94.

# ANEXO

## Concentraciones y pureza de los RNAs

Mediciones de las concentraciones y purezas del RNA del **Experimento 1** y **Experimento 2** en los pasos *Extracción de RNA* y *Purificación de RNA*. La pureza está delimitada por el ratio de absorbancia 260/280. La absorbancia de 260 es a la que se lee el RNA, y a 280 otras proteínas contaminantes de la muestra. Los ratios aceptables para esta técnica son desde 1,7 a 2,0. Cualquier muestra por encima de 2,0 se considera 2,0. Todas las mediciones se hicieron por duplicado, medias en negro.

### Experimento 1

Muestra	µg/µl	260/280
<b>3.3(-2i)</b>	181,67, 185,31 <b>183,49</b>	1,74, 1,74 <b>1,74</b>
<b>3.2(-2i)</b>	628,98, 619,80 <b>624,39</b>	2,14, 2,16 <b>2,15</b>
<b>3.3(-FF)</b>	453,75, 587,63 <b>520,69</b>	2,06, 2,04 <b>2,05</b>
<b>3.2(-FF)</b>	142,65, 146,69 <b>144,67</b>	2,08, 2,07 <b>2,08</b>
<b>3.3</b>	142,65, 146,69 <b>144,67</b>	1,47, 1,52 <b>1,49</b>
<b>3.2</b>	57,79, 60,14 <b>58,96</b>	1,42, 1,45 <b>1,44</b>

*TABLA 1: Resultados del Nanodrop en concentración y relación de absorbancias de las muestras de RNA purificado. Muestras desechadas en rojo.*

Muestra	µg/µl	260/280
<b>3.2L</b>	50,19, 51,08 <b>50,64</b>	2,11, 2,04 <b>2,08</b>
<b>3.2L(2)</b>	34,97, 37,22 <b>36,09</b>	2,14, 2,06 <b>2,10</b>
<b>3.3L</b>	28,78, 22,10 <b>25,44</b>	1,67, 1,60 <b>2,64</b>
<b>3.3L(2)</b>	18,11, 18,78 <b>18,45</b>	1,71, 1,67 <b>1,69</b>

*TABLA 2: Resultados del Nanodrop en concentración y relación de absorbancias de las muestras de RNA purificado. Muestras desechadas en rojo.*

## Experimento 2

Muestra	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280
[FCL 3.3]	338,42, 340,47 <b>339,44</b>	2,04, 2,05 <b>2,05</b>
[FCL 2.2]	1128,44, 1161,65 <b>1145,05</b>	2,36, 2,36 <b>2,36</b>
[N-FCL 3.3]	311,9, 303,82 <b>307,86</b>	2,32, 2,32 <b>2,32</b>
[N-FCL2.2]	118,35, 120,1 <b>119,23</b>	2,48, 2,49 <b>2,49</b>

**TABLA 3:** Resultados del Nanodrop en concentración y relación de absorbancias de las muestras de RNA previo a la purificación.

Muestra	$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280
[FCL 3.3]	107,38, 104,89 <b>106,135</b>	2,01, 2,01 <b>2,01</b>
[FCL 2.2]	116,62, 116,89 <b>116,75</b>	2,24, 2,23 <b>2,24</b>
[N-FCL 3.3]	100,42, 101,18 <b>100,8</b>	2,17, 2,22 <b>2,20</b>
<b>[N-FCL 2.2]</b>	90,81, 92,45 <b>91,63</b>	2,34, 2,33 <b>2,34</b>

**TABLA 4:** Resultados del Nanodrop en concentración y relación de absorbancias de las muestras de RNA purificado. Muestras desechadas en rojo .

## Primers qPCR

### Experimento 1

<b>Rex1 (NM_009556) - amplicon: 250pb</b>	
<b>Forward</b>	5' AAGCCGTATCAGTGACGTTCTGAAGGCT
<b>Reverse</b>	5' ATGCGTGTATCCCCAGTGCCTCTGTCAT
<b>Gapdh (NM_008084) - amplicon: 175pb</b>	
<b>Forward</b>	5' CATACCAGGAAATGAGCTTG
<b>Reverse</b>	5' ATGACATCAAGAAGGTGGTG
<b>Cd9 (NM_007657) - amplicon: 120pb</b>	
<b>Forward</b>	5' TACCATGCCGGTCAAAGGAGG
<b>Reverse</b>	5' GAGTCGAATCGGAGCCATAGTC

**TABLA 5:** Primers de cada gen con su referencia en Pubmed, tamaño amplicon, y su secuencia usados para la qPCR del experimento 1.

### Experimento 2

<b>ApoA1 (NM_009692.4) -amplicon: 59pb</b>	
<b>Forward</b>	5' GCTGAACCTGAATCTCTCTGGAA
<b>Reverse</b>	5' ACTAACGGTTGAACCCAGAGTGTC
<b>ApoE (NM_009696.4) -amplicon: 82pb</b>	
<b>Forward</b>	5' AGGAACAGACCCAGCAAATACG
<b>Reverse</b>	5' TCTTCCACTATTGGCTCGAACC
<b>ApoA4 (NM_007468.2) -amplicon: 81pb</b>	
<b>Forward</b>	5' CCAGCTAAGCAACAATGCCA
<b>Reverse</b>	5' TAGCATCCCCAAGTTTGTCTTG

**TABLA 6:** Primers de cada gen con su referencia en Pubmed, tamaño amplicon y su secuencia usados para la qPCR del experimento 1.

## Procedimientos Matemáticos

### Experimento 1

	Ct			Act	
	GAPDH	CD9	REX1	CD9	REX1
<b>3.2(-2i)</b>	20,5	22,3	22,3	1,8	1,8
<b>3.3(-2i)</b>	20,1	24,1	24,7	4,0	4,6
<b>3.2(-FF)</b>	18,1	20,5	22,5	2,4	4,4
<b>3.3(-FF)</b>	18,0	20,2	21,9	2,3	4,0
<b>MEFs + 2i 3.2</b>	22,7	24,4	26,7	1,7	4,1
<b>MEFs + 2i 3.3</b>	19,0	20,7	22,0	1,7	3,0
				1,7	3,5

	AAct		Potencia	
	CD9	REX1	CD9	REX1
<b>3.2(-2i)</b>	0,1	-1,8	0,9	3,4
<b>3.3(-2i)</b>	2,3	1,1	0,2	0,5
<b>3.2(-FF)</b>	0,7	0,8	0,6	0,6
<b>3.3(-FF)</b>	0,5	0,4	0,7	0,7
<b>MEFs + 2i 3.2</b>	0,0	0,5	1,0	0,7
<b>MEFs + 2i 3.3</b>	0,0	-0,5	1,0	1,4
			1,0	1,0

**TABLA 7.** Procedimientos Matemáticos del Experimento 1.

### Experimento 2

	Ct				Act		
	GAPDH	ApoA1	Apo A4	ApoE	ApoA1	Apo A4	ApoE
<b>[FCL 2.2]</b>	23,61	27,80	35,09	34,89	4,19	11,48	3,577
<b>[FCL 3.3]</b>	34,94	36,19	40,00	24,734	1,25	5,06	-3,846
<b>[N-FCL 3.3]</b>	25,73	28,17	40,00	32,142	2,44	14,27	0,795

	AAct			Potencia		
	ApoA1	Apo A4	ApoE	ApoA1	ApoA4	ApoE
<b>[FCL 2.2]</b>	1,75	-2,79	2,782	0,30	6,93	0,14
<b>[FCL 3.3]</b>	-1,19	-9,21	-4,641	2,28	592,30	24,94
<b>[N-FCL 3.3]</b>	0,00	0,00	0	1,00	1,00	1

**TABLA 8.** Procedimientos Matemáticos del Experimento 2.