
Póster

Relación entre muerte celular y mantenimiento de la pluripotencialidad de células mES en protocolos de diferenciación con óxido nítrico



Presa Torre N, Salguero Aranda C, Beltrán Povea A, Tapia Limonchi R, Hitos Prados AB, Díaz Contreras I, Tejedo Huamán JR, Bedoya Bergua FJ

Departamento de Terapia Celular y Medicina Regenerativa. Centro Andaluz de Biología Molecular y Medicina Regenerativa (CABIMER). Universidad Pablo de Olavide, CIBERDEM, RED-TERCEL, Sevilla, España.

Palabras clave: apoptosis; caspasas; diferenciación; óxido nítrico; células mES.

RESUMEN

En este proyecto se pretende estudiar la relación entre la muerte celular y la diferenciación durante el desarrollo usando como modelo experimental células madre embrionarias de ratón (mESC). Se ha descrito que las altas concentraciones de DETA-NO (500uM) provocan la diferenciación de estas mESC hacia endodermo (Mora-Castilla et al., 2010), pero en estos protocolos no todas consiguen sobrevivir y un alto porcentaje de células muere. Es por ello que se quiere analizar la relación entre ambos eventos. Se estudiará, por un lado, si el bloqueo de la apoptosis con inhibidores de caspasas tiene efectos sobre la diferenciación; y por otro lado si es probable que exista una liberación de moléculas al medio por parte de las células apoptóticas que contribuya a la pérdida de la pluripotencialidad de sus vecinas.

Para ello se ha analizado el mantenimiento del estado pluripotente en dos tipos de ensayos. Por un lado se ha estudiado el efecto de inhibidores de caspasas en tratamientos con DETA-NO en dos líneas de mESC (D3 y R1/E), y por otro lado se ha evaluado el efecto del reciclaje de medios de cultivo en la línea celular D3. Para medir el mantenimiento de la pluripotencialidad se han empleado distintas técnicas de biología molecular (extracción de RNA, PCR, qPCR, Western Blotting...) y técnicas de microscopía. Con ello se han buscado diferencias de expresión de los marcadores de pluripotencia (Nanog y Oct4) y marcadores de endodermo (Pdx1, Cxcr4), mesodermo (Brachyury) y ectodermo (Zic1).

Se ha demostrado que el uso de inhibidores de caspasas en tratamientos con DETA-NO bloquea la regulación a la baja de Nanog, tanto en niveles de RNAm como de proteína, y disminuye la expresión de los marcadores de diferenciación. Por otro lado, el uso de medios de cultivo reciclados procedentes de tratamientos anteriores con y sin DETA-NO, suplementados y con el factor inhibidor de la diferenciación LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) estimula la diferenciación de las células.

Los resultados obtenidos apuntan a que podría existir una relación entre la muerte celular y la diferenciación, ya que al inhibir la muerte por apoptosis se favorece el mantenimiento del estado pluripotente. Además, el uso de medios reciclados ayuda a la diferenciación de las células incluso en presencia de LIF. Por ello se cree que células apoptóticas podrían estar secretando sustancias al medio que las células vecinas estarían utilizando como señales para diferenciarse.

BIBLIOGRAFIA

Mora-Castilla S, Tejedo JR, Hmadcha A, Cahuana GM, Martín F, Soria B, Bedoya FJ. Cell Death Differ. 2010 Jun;17(6):1025-33. Epub 2010 Jan 15.