

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular**



**INDUCCIÓN DE LA MEIOSIS**

**EN CÉLULAS GERMINALES**

**OBTENIDAS *IN VITRO* A PARTIR DE**

**CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS**

**MEDIANTE EXPRESIÓN ECTÓPICA DE LAS**

**PROTEÍNAS DE UNIÓN AL RNA DAZL Y VASA**

**Tesis doctoral**

Jose Vicente Medrano Plaza

Valencia, 2012





**Prof. Carlos Antonio Simón Vallés**, Catedrático de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia y Director Científico del Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) y del Centro de Investigaciones Príncipe Felipe (CIPF).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: ***“INDUCCIÓN DE LA MEIOSIS EN CÉLULAS GERMINALES OBTENIDAS IN VITRO A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS MEDIANTE EXPRESIÓN ECTÓPICA DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN AL RNA DAZL Y VASA”*** ha sido realizado íntegramente por D. Jose Vicente Medrano Plaza 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 6 de Octubre de 2011.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Vallés



## **AGRADECIMIENTOS**

Siempre he pensado que un hombre nunca debe olvidar quién es y de dónde viene, y que para poder recordarlo ha de saber ser agradecido con aquellos que han sido de alguna manera su guía y le han ayudado a levantarse tras cada caída.

Con estas (intentaré) breves palabras no pretendo hacer una lista completa de todos y cada uno de los que de alguna manera habéis influido en los derroteros de esta tesis, ya que sois muchos aquellos a los que me gustaría dedicaros unas líneas de agradecimiento. Así, aunque sé que nunca tendré palabras suficientes para agradecer a todas y cada una de las personas que me habéis ayudado de alguna manera a escribir esta etapa de la historia de mi vida, me gustaría, al menos, intentar dedicar las primeras líneas de esta tesis para agradecer a aquellos que me han apoyado y han estado a mi lado durante estos años, y sin los cuales no habría sido posible su elaboración.

Querría empezar por mi director de tesis, el profesor Carlos Simón, el cual ha sido y es para mí un ejemplo a seguir. Muchas gracias por haberme dado la oportunidad de realizar esta aventura, guiándome y aconsejándome en los momentos más difíciles. Gracias por haber sido mi ejemplo, mi director, mi compañero y sobre todo mi amigo estos años.

Debo continuar mencionando a aquellos que más directamente me han apoyado en el día a día, trabajando codo con codo durante estos años: mis compañeros de laboratorio.

A mi panita Cristóbal, por ser un fiel amigo y una de las mejores personas que he tenido el placer de conocer en mi vida. Gracias por haber sido mi gran apoyo durante estos años y haber estado siempre a mi lado.

A Anabel, quien ha estado en todo momento a mi lado en la primerísima línea de la batalla, y a la que por supuesto le debo gran parte del mérito de los resultados que se presentan en esta tesis. Nunca podré terminar de agradecerte tu ayuda en los momentos más difíciles y todo lo que me has enseñado.

A María Eugenia, la cual ha sido como mi segunda madre en todo momento. Las palabras que le pueda dedicar aquí nunca serán suficientes para demostrarle mi agradecimiento y mi amistad. Gracias, sin ti mi vida seguiría encontrándose descoordinada.

A Marcia, mi Marcinha, a quien aprecio como una hermana y en cierto modo ha sido mi compañera de viaje en esta aventura.

Al resto de mis compañeros: Evita, Ana, Diana, Vero, Eva, Amparo Galán, María, Jaime, Sonia, Aymara, Claudia, Irene y Amparo Faus. Muchas gracias por haberos convertido en mi familia durante

estos años y haber estado ahí en los buenos y no tan buenos momentos.

También gracias a los compañeros que han estado y ya no están, de los cuales no he obtenido más que apoyo y amistad. Gracias a Antonio, Manuel, Roberto, Silvia, Laura, Emily, Massa, Ismael y Esther. Muchas gracias y os deseo suerte en todo lo que os propongáis.

I'd also like to thank all my friends in Stanford University for the help and friendship they gave me during my stay in California, and very especially to professor Renee Reijo for giving the chance to join her amazing lab and open new horizons in my scientific career. Thanks to Alfredo, Cyril, Jun, Ninuo, Patrick, Sarita, Nam, Sohyun, Antonia, Erica, Masae, Shown, Sonya, Jens, Prachi, Smruti, Akshi, Blake, Mela, Vittorio, James and Jenny. I miss you guys and I'm sure that our lives will cross over again in the future... Thank you so much!!!

A todas las personas del IVI, Fundación IVI, CIPF, IVIOMICS y Máster, especialmente a mi gran amigo Damián, que indirectamente me han ayudado en la elaboración de esta tesis con su apoyo moral y que me sería imposible de agradecer en tan solo estas líneas.

A mis biolocos Iván, Pati, Rob, Javi, Paju, David, Belén, María y Elena por haber confiado siempre en mi y haber sido mis compañeros y amigos todos estos años.

Gracias también a mis “iGemeros de la vieja guardia” Alberto, Arnau, Gus, Carl, Emilio, Cate, Edo, Cris y Diana por haber compartido conmigo esos primeros pasos que dimos juntos en este complicado mundo científico y haberme enriquecido con nuevas formas de pensar y ver las cosas que nunca antes habría imaginado.

No quiero olvidar a mis amigos de siempre Fran, Migue, Gele, Marta, Ele y Brian. Gracias por estar ahí desde siempre y demostrarme día a día lo que significa la amistad verdadera a pesar del tiempo y la distancia.

Gracias a toda mi familia y a la de Desi, y muy especialmente a mis padres y a mi abuelo por haber sido siempre un modelo de honradez y esfuerzo, por demostrarme que en la vida se puede conseguir cualquier cosa si de verdad la deseas. Gracias también a mi hermana por hacerme sentir cada día más orgulloso de tener el privilegio de ser su hermano.



Finalmente, deseo dedicarle esta tesis a Desi, mi mejor amiga, mi pareja, mi compañera, mi confidente y la persona más importante en mi vida. Gracias por haber estado siempre ahí y haberme hecho sonreír cuando más cuesta arriba se han puesto las cosas. Gracias por hacerme ser mejor persona. Sólo tú eres mi faro cuando llega la oscuridad.



El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en los laboratorios del Banco Nacional de Líneas de Células Madre Embrionarias del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) en Valencia, así como en los laboratorios del Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine en la Universidad de Stanford en California (USA), gracias a la ayuda de una beca predoctoral de formación en investigación del Instituto de Salud Carlos III (FI007/00011).



## LISTA DE ABREVIATURAS

**ACTC1:** Actin, alpha, cardiac muscle 1 (Actina alfa del músculo cardíaco 1).

**AMH:** Anti-Mullerian Hormone (Hormona anti-Mulleriana).

**ANOVA:** ANalysis Of VAriance (Análisis de la varianza).

**ATP:** Adenosil Tri-Phosphate (Adenosil tri-fosfato).

**BCA:** BiCinchoninic Acid (Ácido bicinchrónico).

**bFGF:** basic Fibroblast Growth Factor (Factor básico de crecimiento de fibroblastos).

**BLIMP1/PRDM1:** B Lymphocyte Maturation Protein 1/PR DoMain zinc finger protein 1 (Proteína 1 de maduración de linfocitos B/Proteína 1 con dominio dedo de Zinc PR).

**BMP:** Bone Morphogenetic Protein (Proteína morfogénica de hueso).

**BSA:** Bovine Serum Albumine (Albúmina sérica bovina).

**CAPS:** N-Cyclohexyl-3-AminoPropaneSulfonic acid (Ácido N-ciclohexil-3-aminopropanosulfónico).

**cDNA:** complementary DNA (DNA complementario).

**Céls.:** Células.

**CENPA:** CENtromere Protein A  
(Proteína centromérica A).

**CF:** Contraste de Fases.

**Chr:** Chromosome  
(Cromosoma).

**CpG:** Cytosine-phosphate-  
Guanine (Dinucleótido  
Citosina-fosfato-Guanina).

**Ct:** Cycle threshold (Ciclo  
umbral).

**Cy5:** Cyanine 5 (Cianina 5).

**CYP26B1:** CYtochrome P450  
26B1 (Citocromo P450 26B1).

**DAPI:** 4',6-DiAmidino-2-  
PhenylIndole (4',6-Diamidino-  
2-fenil indol diclorhidrato).

**DAZ:** Deleted in AZoospermia  
(Delecionado en  
azoospermia).

**DAZL:** Deleted in AZoospermia  
Like (Relacionado con  
delecionado en azoospermia).

**DDX4:** DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp)  
box polypeptide 4 (Polipéptido  
4 del complejo DEAD (Asp-Gly-  
Ala-Asp)).

**DMC1:** Dosage supressor of  
MCK1 homologue (Supresor  
de dosis del homólogo de  
MCK1).

**DMEM:** Dulbecco's Modified  
Essential Medium (Medio  
esencial modificado de  
Dulbecco).

**DMR:** Differentially  
Methylated Region (Región  
diferencialmente metilada).

**DNA:** DesoxiriboNucleic Acid  
(Ácido desoxi-ribonucleico).

**DNMT:** DNA Metil-  
Transferasa.

**DPPA3:** Developmental PluriPotency Associated 3 (Asociado al desarrollo de pluripotencia 3).

**EB:** Embryoid body (Cuerpo embriode).

**EDTA:**  
EthyleneDiamineTetraacetic Acid (Ácido etilendiaminotetraacético).

**EF1 $\alpha$ :** Elongation Factor 1  $\alpha$  (Factor de elongación 1  $\alpha$ ).

**FACS:** Fluorescence Activated Cell Sorter (Separación celular mediante fluorescencia emitida).

**FISH:** Fluorescent *In Situ* Hybridization (Hibridación *in situ* del DNA fluorescente).

**FITC:** Fluorescein IsoThioCyanate (Fluoresceína isotiocianato).

**FSH:** Follicle Stimulating Hormone (Hormona folículo estimulante).

**GAPDH:** GlycerAldehyde 3-Phosphate DeHydrogenase (Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa).

**GATA6:** GATA binding protein 6 (Proteína 6 de unión a GATA).

**GCNA1:** Germ Cell Nuclear Antigen 1 (Antígeno nuclear de células germinales 1).

**GCNF:** Germ Cell Nuclear Factor (Factor nuclear de células germinales).

**GDF:** Growth Differentiation Factor (Factor de crecimiento de diferenciación).

**GFP:** Green Fluorescent Protein (Proteína verde fluorescente).

**H2AX:** Histone 2A factor X  
(Factor X de la histona 2A).

**hESC:** human Embryonic Stem  
Cell (Célula madre  
embrionaria humana).

**HRP:** HorseRadish Peroxidase  
(Peroxidasa de rábano).

**ICM:** Inner Cell Mass (Masa  
celular interna).

**ICSI:** Intra-Cellular Sperm  
Injection (Inyección intra-  
citoplasmática de  
espermatozoides).

**iDAZL:** induced DAZL  
(Expresión ectópica de DAZL).

**IFITM1:** InterFeron Induced  
TransMembrane protein 1  
(Proteína transmembrana 1  
inducida por interferon).

**Ig:** Inmunoglobulina.

**iPSC:** induced Pluripotent  
Stem Cell (Célula madre de  
pluripotencia inducida).

**iVASA:** induced VASA  
(Expresión ectópica de VASA).

**IVI:** Instituto Valenciano de  
Infertilidad.

**KLF4:** Kruppel-Like Factor 4  
(Similar a factor 4 de Kruppel).

**KOSR:** KnockOut Serum  
Replacer (Suero de reemplazo  
knockout).

**KRT7:** KeRaTin 7 (Keratina 7).

**MA:** Maturation Arrest  
(Arresto en la maduración).

**MEF:** Mouse Embryonic  
Fibroblast (Fibroblasto  
embrionario de ratón).

**mESC:** mouse Embryonic Stem  
Cell (Célula madre  
embrionaria de ratón).



**miRNA:** micro-RNA.

**MLH:** MutL Homolog  
(Homólogo de MutL).

**mRNA:** messenger RNA (RNA mensajero).

**MSUC:** Meiotic Silencing of Unpaired Chromatin  
(Silenciamiento meiótico de la cromatina no emparejada).

**Mvh:** Mouse Vasa homolog  
(Homólogo de VASA en ratón).

**NCAM1:** Neural Cell Adhesion Molecule 1 (Molécula 1 de adhesión de células neurales).

**NEAA:** Non-Essential AminoAcids (Aminoácidos no esenciales).

**OC:** Obstructive Control  
(Control obstructivo).

**OCT4/POU5F1:** Octamer 4/  
POU class 5 homeobox 1  
(Octámero 4/ Homeobox 1 clase POU5).

**OLC:** Oocyte Like Cell (Célula similar a ovocito).

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**ORF:** Open Reading Frame  
(Pauta abierta de lectura).

**PBS:** Phosphate Buffered Saline (Tampón fosfato salino).

**PCR:** Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa).

**PE:** PhycoErytrin (Ficoeritrina).

**PFA:** Para-FormAldehido.

**PGC:** Primordial Germ Cell  
(Célula germinal primordial).

**PI:** Propidium Iodide (Ioduro de propídio).

**PI3K:** Phosphatidyl Inositol 3 Kinase (Fosfatidil inositol kinasa 3).

**piRNA:** Piwi-RNA.

**Piwi:** P-element induced wimpy testis (Elemento P inducido en testículos wimpy).

**PIWIL:** P-element induced wimpy testis Like (Similar a elemento P inducido en testículos wimpy).

**Prm1:** Protamin 1 (Protamina 1).

**PVDF:** PolyVinylidene Fluoride (Polifluoruro de vinilideno).

**qPCR:** quantitative PCR (PCR cuantitativa).

**RA:** Retinoic Acid (Ácido retinoico).

**REC8:** Meiotic RECombination protein 8 (Proteína 8 de recombinación meiótica).

**RECA:** RECombination protein A (Proteína A de recombinación).

**RIPA:** RadioImmunoPrecipitation Assay buffer (tampón para radio-inmunoprecipitación).

**RNA:** RiboNucleic Acid (Ácido ribonucleico).

**RPL19:** Ribosomal Protein L19 (Proteína ribosomal L19).

**RT:** Retro-Transcripción.

**SBF:** Suero Bovino Fetal.

**SCO:** Sertoli Cell Only Syndrome (Síndrome de sólo células de Sertoli).

**SCP:** Synaptonemal Complex Protein (Proteína del complejo sinaptonémico).

**SDS-PAGE:** Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico).

**SEM:** Standard Error of the Mean (Error estándar de la media).

**SMC1B:** Structural Maintenance of Chromosomes 1B (Mantenimiento estructural de cromosomas 1B).

**SOX:** SRY-bOX (Complejo SRY).

**SPO11:** SPOrulation protein 11 (Proteína de esporulación 11).

**SPZ:** SPermatoZoa (Espermatozoide).

**SRY:** Sex-determining Region Y (Región determinante del sexo Y).

**SSC:** Saline-Sodium Citrate (Citrato sódico salino).

**SSEA-1:** Stage Specific Embryonic Antigen 1 (Antígeno embrionario estadio específico 1).

**STAG3:** STromal AntiGen 3 (Antígeno estroma 3).

**STRA8:** Stimulated by Retinoic Acid 8 (Estimulado por ácido retinoico).

**SYCE:** SYnaptonemal Central Elements (Elementos centrales del complejo sinaptonémico).

**Taq:** *Thermus aquaticus*.

**TBS:** Tris Buffered Saline (Tampón Tris salino).

**Tm:** melting Temperature  
(Temperatura de fusión).

**UTR:** UnTranslated Region  
(Región no traducida).

**ZP4:** Zona Pellucida 4.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>I.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>7</b>
1.- Desarrollo de la línea germinal <i>in vivo</i> en mamíferos .....	9
1.1.- Establecimiento, migración y colonización de las células germinales primordiales .....	9
1.2.- Determinación del sexo, meiosis y maduración gamética.....	13
1.3.- Modificaciones epigenéticas .....	19
2.- Células madre pluripotentes como fuente para la obtención de gametos <i>in vitro</i> .....	23
2.1- Células madre embrionarias humanas (hESCs) y células madre de pluripotencia inducida (iPSCs).....	24
2.2.- Estudios previos sobre obtención de células germinales <i>in vitro</i> .....	26
2.2.1.- Obtención de células germinales a partir de células madre embrionarias de ratón (mESCs).....	27
2.2.2.- Obtención de células germinales a partir de células madre embrionarias humanas (hESCs).....	30

3.- La meiosis: El principal obstáculo para la obtención de células germinales funcionales <i>in vitro</i> .....	31
3.1.- Regulación molecular de la meiosis .....	33
3.2.- Regulación de la meiosis mediante proteínas de unión al RNA.....	36
<b>II.- HIPÓTESIS .....</b>	<b>41</b>
<b>III.- OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
1.- Procesamiento de biopsias testiculares humanas para su estudio.....	51
1.1.- Obtención de muestras testiculares humanas .....	51
1.2.- Procesamiento de muestras para su análisis molecular e histológico .....	52
2.- Diferenciación de células germinales <i>in vitro</i> a partir de líneas pluripotentes de células madre humanas .....	53
2.1.- Cultivo celular de hESCs e iPSCs .....	53
2.2.- Modelo de diferenciación mediante co-cultivo .....	55
2.2.1.- Co-cultivo indirecto .....	55

2.2.2.- Co-cultivo directo .....	56
2.3.- Manipulación genética de proteínas de unión al RNA. ....	57
2.3.1.- Construcción y empaquetamiento de vectores lentivirales.....	57
2.3.2.- Transducción vírica y diferenciación .....	60
3.- Técnicas analíticas.....	61
3.1.- Análisis molecular de expresión genética .....	61
3.1.1.- Extracción de RNA y retro-transcripción. ....	61
3.1.2.- Análisis cualitativo mediante RT-PCR .....	62
3.1.3.- Análisis cuantitativo mediante RT-qPCR y microfluídos .....	64
3.2.- Análisis de expresión a nivel proteico .....	66
3.2.1.- Western blot.....	66
3.2.2.- Inmunocitoquímica.....	67
3.3.- Citometría de flujo.....	70
3.3.1.- Marcaje inmunocitoquímico de células para citometría de flujo .....	70
3.3.2.- Separación celular por contenido de DNA .....	71

3.4.- Análisis de ploidía celular mediante FISH.....	71
3.5.- Análisis epigenético mediante secuenciación por bisulfito .....	72
3.6.- Análisis estadístico.....	74
<b>V.- RESULTADOS .....</b>	<b>75</b>
1.- Análisis comparativo de los marcadores germinales c-KIT, SSEA-1 y VASA en biopsias testiculares de pacientes con azoospermias secretoras y obstructivas .....	77
1.1.- Análisis molecular de expresión .....	80
1.2.- Análisis inmunohistoquímico.....	82
1.3.- Análisis mediante citometría de flujo.....	85
2.- Sobreexpresión ectópica de las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA para la inducción de la maduración meiótica de células germinales inmaduras obtenidas <i>in vitro</i> a partir de células madre pluripotentes humanas.....	88
2.1.- Las iPSCs son una fuente alternativa equiparable a las hESCs para la obtención de células germinales <i>in vitro</i> .....	92
2.2.- Perfil de expresión de las células VASA positivas obtenidas mediante diferenciación espontánea <i>in vitro</i> .....	98



2.3.- La expresión ectópica de VASA induce la progresión meiótica en las células germinales obtenidas mediante diferenciación espontánea <i>in vitro</i> .....	101
2.4.- La sobreexpresión combinada de DAZL y VASA no tiene un efecto sinérgico en la maduración gamética.....	111
2.5.- La expresión ectópica de VASA recapitula algunos aspectos de la reprogramación epigenética de la línea germinal en el <i>locus</i> improntado <i>H19</i> .....	119
<b>VI.- DISCUSIÓN</b> .....	<b>123</b>
1.- Establecimiento de un modelo de expresión de los marcadores germinales c-KIT, VASA y SSEA-1 con aplicaciones diagnósticas.....	125
2.- Las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA inducen la maduración meiótica de células germinales inmaduras obtenidas <i>in vitro</i> a partir de células madre pluripotentes humanas.....	130
<b>VII.- CONCLUSIONES</b> .....	<b>141</b>
<b>VIII.- BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>145</b>
<b>IX. ANEXOS</b> .....	<b>171</b>

1.- Anexo I: Modelo de consentimiento informado para la obtención de muestras de biopsia testicular.....	173
2.- Anexo II: Publicaciones científicas derivadas de la presente tesis doctoral.....	178
2.1.- Revistas internacionales .....	178
2.2.- Capítulos de libro .....	179
2.3.- Congresos .....	180

# I

# INTRODUCCIÓN

*“La ignorancia genera confianza más frecuentemente que el conocimiento. Son aquellos que saben poco, y no esos que saben más, quienes tan positivamente afirman que este o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.”*

Charles Darwin (1809-1882) Biólogo británico.



## **1.- DESARROLLO DE LA LÍNEA GERMINAL *IN VIVO* EN MAMÍFEROS.**

En contraposición con la llamada línea somática, la línea germinal está formada por las células encargadas de transmitir la información genética a la siguiente generación. Las células germinales poseen una serie de características especiales que les confieren la capacidad exclusiva de reducir su carga cromosómica a la mitad mediante un proceso denominado meiosis. Los mamíferos, como animales diploides con reproducción sexual, necesitan que sus células germinales realicen este proceso de haploidización con el fin de que al unirse los gametos de cada sexo en el momento de la fecundación vuelvan a generar un individuo diploide normal.

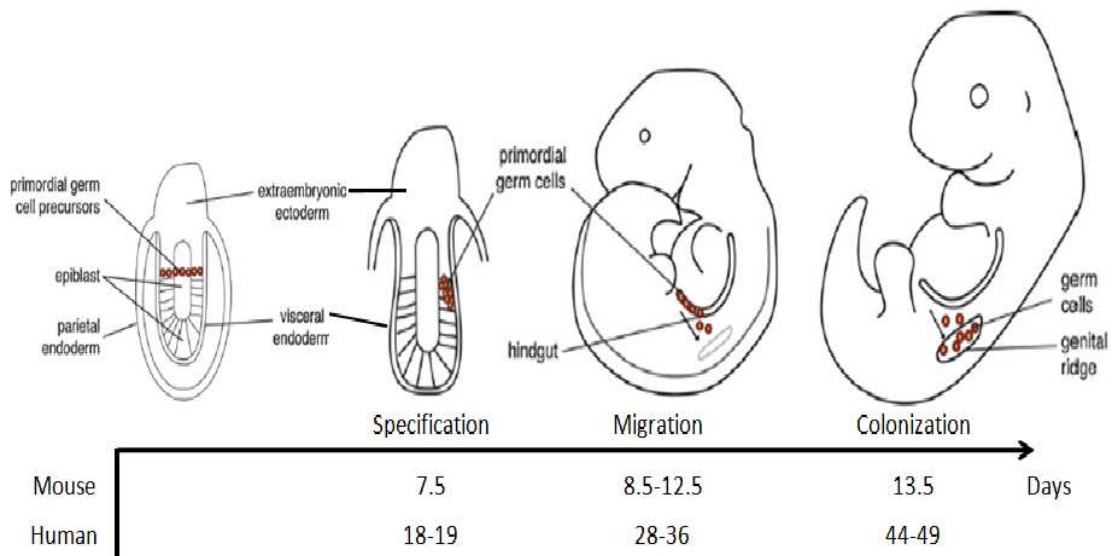
### **1.1.- Establecimiento, migración y colonización de las células germinales primordiales.**

En el ser humano, y en los mamíferos en general, la línea germinal proviene de una pequeña población de células pluripotentes que se segrega del resto de células del embrión durante los primeros estadios de la embriogénesis y conforma lo que se denominan las células germinales primordiales (del inglés Primordial Germ Cells, PGCs). Las PGCs son, por tanto, las primeras

células germinales inmaduras, con un alto grado de pluripotencialidad.

La primera población de PGCs en embriones humanos se localiza extra-embriónariamente en el saco vitelino alrededor de las semanas 2 y 3 del desarrollo embrionario (Fig. 1). En ratón, las PGCs se originan en el epiblasto proximal a partir de una pequeña población de células localizada en la base del alantoides en el día E7.5 de desarrollo embrionario (Ginsburg et al, 1990), en respuesta a la señalización por medio de los factores BMP4 y BMP8 (del inglés Bone Morphogenetic Proteins) procedentes del ectodermo extra-embriónico adyacente (Fujiwara et al, 2001; Lawson et al, 1999; Saitou et al, 2002; Ying et al, 2000; Ying et al, 2001). En respuesta a esta inducción, estas células comienzan a expresar *BLIMP1* (también conocido como *PRDM1* por PR Domain zinc finger protein 1), el cual es un factor de transcripción encargado de silenciar su programa somático y así activar su destino germinal (Ohinata et al, 2005; Vincent et al, 2005). Al mismo tiempo, estas PGCs empiezan a expresar los genes *FRAGILIS* (también conocido como *IFITM1*, por InterFeron Induced TransMembrane protein 1) y *STELLA* (también conocido como *DPPA3* por Developmental PluriPotency Associated 3), los cuales se encargan de determinar su carácter germinal (Lange et al, 2003; Saitou et al, 2002). Además, las PGCs son la única población celular derivada del epiblasto que retiene la expresión de marcadores de pluripotencia como *OCT4* (también conocido como

*POU5F1* por POU class 5 homeobox 1), *NANOG*, y la actividad fosfatasa alcalina tras el proceso de gastrulación (Ginsburg et al, 1990; Mitsui et al, 2003; Pesce et al, 1998; Scholer et al, 1990a).



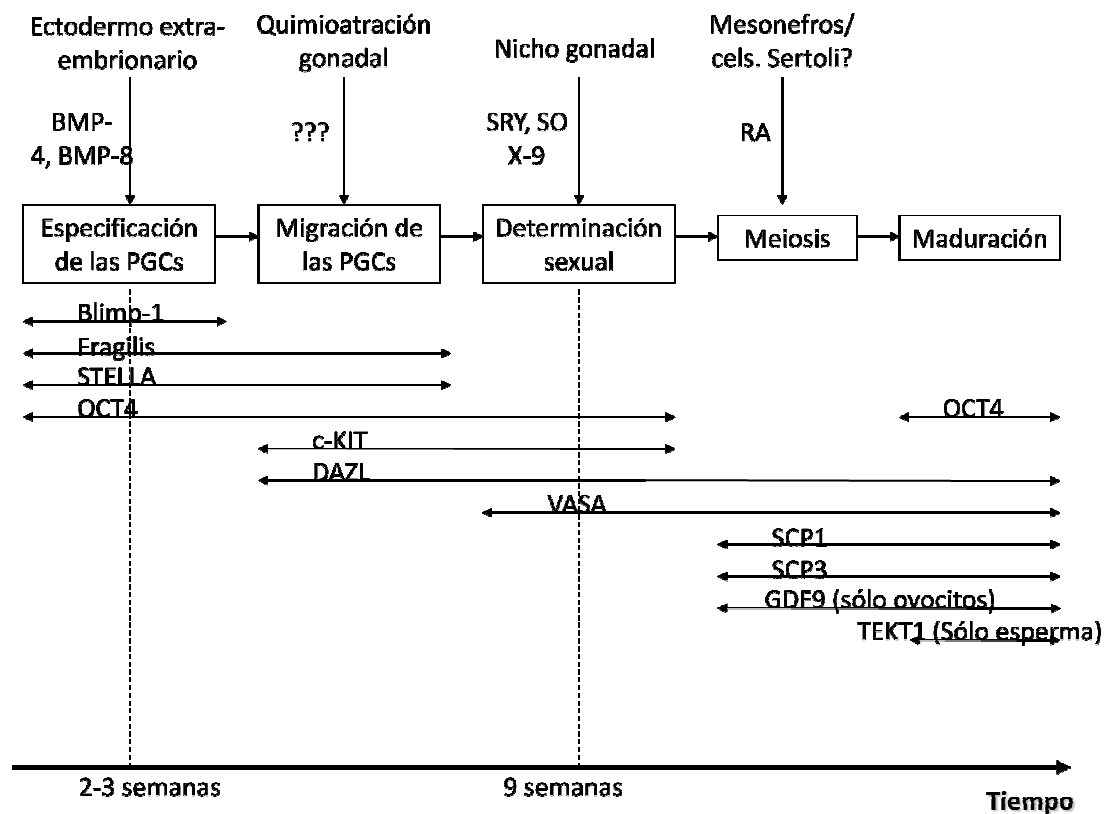
**Figura 1.** Representación esquemática de los procesos de especificación, migración y colonización de las PGCs durante el desarrollo embrionario de mamíferos. Figura modificada a partir de la original en Ewen & Koopman, 2010.

Tras su formación extra-embriónica en el saco vitelino del epiblasto proximal, las PGCs comienzan a dividirse activamente mientras migran a través del endodermo subyacente (que originará el intestino grueso) hacia las crestas gonadales en formación (Clark & Eddy, 1975; Godin et al, 1990; Gomperts et al, 1994; Lawson & Hage, 1994; Molyneaux et al, 2001). Esta migración tiene lugar entre las semanas 4 y 6 del desarrollo embrionario humano (Fujimoto et al, 1977; Goto et al, 1999), mientras que en ratón ocurre entre los días E8.5 y E12.5 (Wylie et al, 1986). Durante esta fase migratoria, las

PGCs expresan altos niveles del receptor de membrana c-KIT, el cual parece estar implicado en su migración y supervivencia (Matsui et al, 1990) mediante la activación de cascadas de señalización cuyo efector intermediario suele ser el PI3K (del inglés Phosphatidyl Inositol 3 Kinase).

Tras su migración a lo largo del embrión, las PGCs colonizan las crestas gonadales en formación, lo cual induce un profundo cambio en su programa de expresión genética y epigenética. En este momento, las PGCs pasan a llamarse gonocitos y adquieren una morfología redondeada cuya principal característica es un reducido ratio citoplasma:núcleo (Donovan et al, 1986). Además de estos cambios morfológicos, los gonocitos inician la expresión de diversos genes cruciales para su maduración. Entre estos genes, los más destacables codifican diversas proteínas de unión al RNA altamente conservadas en la línea germinal de los metazoos a lo largo de la evolución como *DAZL* (del inglés Deleted in Azoospermia Like) y *VASA* (codificado por el gen *DDX4*). *DAZL* parece ser esencial para la formación, supervivencia y maduración de las células germinales, ya que su ablación o silenciamiento se traduce en la ausencia total de línea germinal en ambos sexos de ratón (Saunders et al, 2003), mientras la función de *VASA* como helicasa RNA ATP-dependiente también parece ser esencial para la supervivencia y maduración de la línea germinal en todos los metazoos (Castrillon et al, 2000a; Noce et al, 2001; Tanaka et al, 2000b) (Fig. 2).



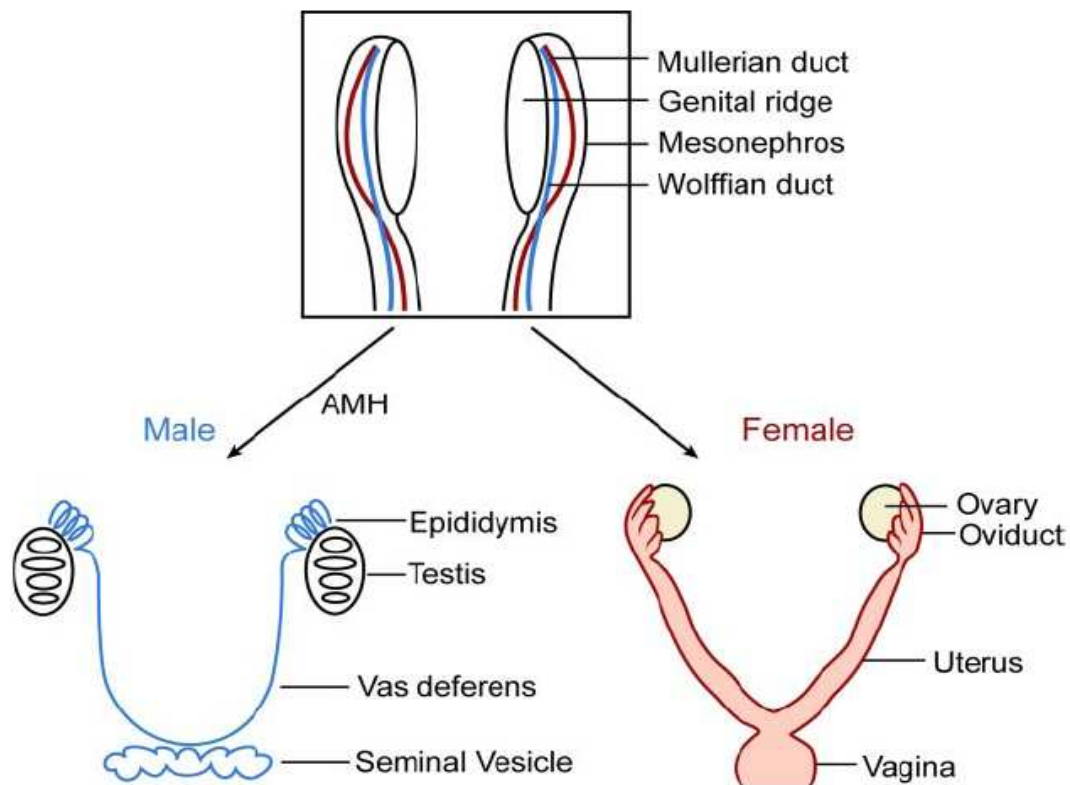


**Figura 2.** Representación esquemática de las etapas del desarrollo de la línea germinal humana *in vivo*. Cada estadio del desarrollo está indicado dentro de un recuadro. Los tejidos/células inductores con sus moléculas de señalización se indican sobre cada estadio, y los marcadores moleculares específicos de cada uno debajo.

## 1.2.- Determinación del sexo, meiosis y maduración gamética.

La determinación sexual de las células germinales que han colonizado las crestas gonadales depende del nicho gonadal más que de su dotación cromosómica (Byskov, 1986). En ausencia de la expresión del gen *SRY* por parte de las células de soporte del nicho gonadal bipotencial, el programa por defecto de las células

germinales es el de formar oogonias o células germinales femeninas. Es, por tanto, la expresión del gen *SRY* por parte de las células XY la señal determinante para la diferenciación sexual masculina de la gónada y, por tanto, la diferenciación de los gonocitos a espermatogonias. Entre otras dianas, *SRY* activa la expresión de *SOX9* (del inglés *SRY*-box 9), el cual induce la diferenciación de las células de Sertoli y la conversión de la cresta gonadal asexual en testículos, así como la inducción de conducto secretor y glándulas seminales, mediante la proliferación de los conductos de Wolff y la degeneración de los de Muller en respuesta a la hormona anti-Mulleriana (AMH, del inglés Anti-Mullerian Hormone) secretada por las células de Sertoli (Burgoyne, 1988; Koopman et al, 1990; McLaren, 1988; Sinclair et al, 1990) (Fig. 3).



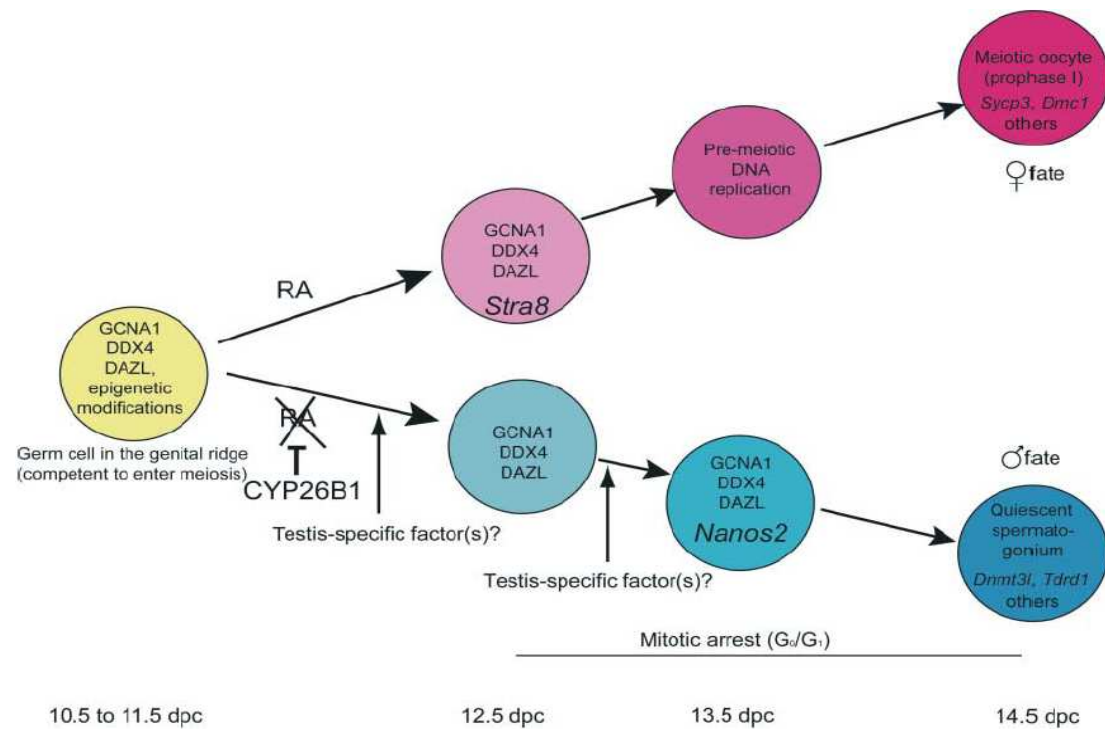
**Figura 3.** Diferenciación sexual del sistema urogenital. En la gónada bipotencial están presentes tanto los conductos de Wolff como los de Muller. En machos, la AMH secretada por las células de Sertoli induce la degeneración de los conductos de Muller y la proliferación de los de Wolff, que formaran el epidídimo, vasos deferentes y vesícula seminal bajo el control de los andrógenos secretados por las células de Leydig. En hembras degeneran los conductos de Wolff mientras que los de Muller dan lugar a las trompas, útero y parte superior de la vagina. Figura extraída de Wilhelm et al, 2007.

La meiosis es una característica específica de la línea germinal. Durante este proceso, las células meióticas sufren una replicación del DNA que es seguida de dos divisiones consecutivas para generar cuatro células hijas con la mitad de la carga genética. Además de la reducción cromosómica, la meiosis permite también la creación de nuevas variantes cromosómicas mediante la formación del complejo sinaptonémico en el que los cromosomas homólogos se alinean y se

produce el intercambio de secuencias en un proceso denominado recombinación cromosómica. En la formación de este complejo están implicadas diversas proteínas estructurales entre las que habría que destacar Scp1, 2 y 3 (del inglés Synaptonemal Complex Protein) (Dobson et al, 1994; Heyting et al, 1988), y Dmc1 (del inglés Dosage supresor of MCK1 homologue) (Pittman et al, 1998; Yoshida et al, 1998). Asimismo, se ha sugerido que proteínas de unión al RNA como Dazl podrían estar implicadas en la regulación post-transcripcional de algunas de estas proteínas implicadas en meiosis, siendo por tanto necesarias para su iniciación (Reynolds et al, 2007). Además, el momento de entrada en la meiosis va precedido de un silenciamiento de los genes de pluripotencia como *OCT4* (Pesce et al, 1998; Scholer et al, 1990b).

La entrada en la meiosis por parte de las células germinales ocurre de forma diferente dependiendo de si la gónada es masculina o femenina. Mientras que en los machos de mamífero las células germinales se encuentran detenidas en G0 en estado quiescente hasta la llegada de la pubertad (Goto et al, 1999; McLaren, 1984), en las hembras la meiosis se inicia durante el desarrollo embrionario alrededor de la semana 12 en humanos y E13.5 en ratón, para detenerse en Profase I hasta su continuación con la pubertad (Gondos et al, 1986; Monk & McLaren, 1981). El ácido retinoico producido por el mesonefros adyacente a las gónadas actúa como señal inductora de la entrada en meiosis de las células germinales

mediante la activación de gen *STRA8* (del inglés *STimulated by Retinoic Acid 8*) (Bowles et al, 2006). La expresión de *CYP26B1*, el cual codifica para el Citocromo P450 que degrada el ácido retinoico por parte de la gónada bipotencial impide esta activación meiótica. Cuando se produce la determinación sexual tras la llegada de las células germinales a la gónada, la expresión de *CYP26B1* se ve disminuida en la gónada femenina, permitiendo por tanto la iniciación de la meiosis por inducción del ácido retinoico. Sin embargo, en la gónada masculina, la expresión de *Sry* mantiene la expresión de *CYP26B1* y por tanto impide la entrada de sus células germinales en meiosis. De esta manera, sólo cuando llega la pubertad y las células de Sertoli comienzan a expresar ácido retinoico estimuladas por sus cambios hormonales es cuando las células germinales masculinas salen de su estado quiescente y comienzan a dividirse y a iniciar la meiosis en respuesta a la activación de *STRA8* (Koubova et al, 2006) (Fig. 4).



**Figura 4.** Representación esquemática de los factores implicados en la maduración gamética masculina y femenina en respuesta al RA (ácido retinoico). Figura extraída de Bowles & Koopman, 2010.

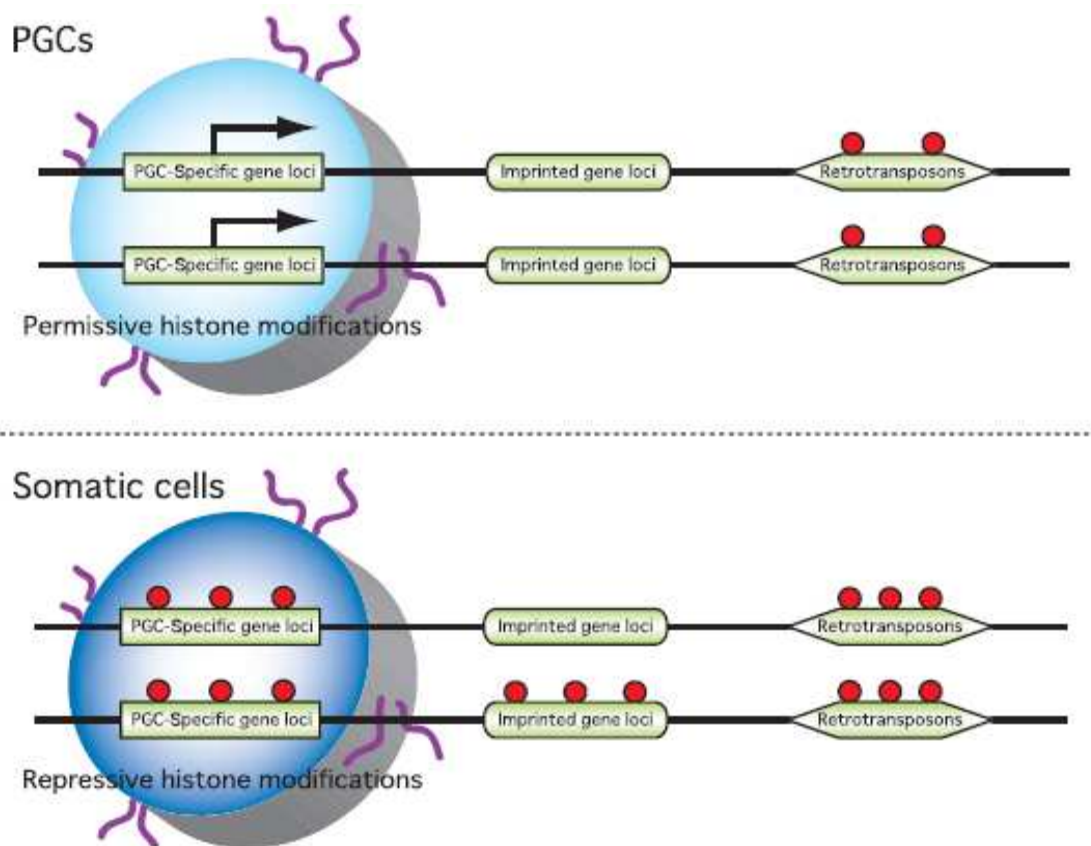
La maduración gamética masculina comprende un proceso denominado espermatogénesis, el cual se inicia sólo tras la pubertad. En este proceso, las células germinales o espermatogonias se dividen de forma asimétrica, se diferencian a espermatocitos I y entran en meiosis, originando espermatocitos II haploides que madurarán dando lugar a espermátidas y posteriormente a espermatozoides maduros en un proceso llamado espermiogénesis. Durante la espermiogénesis, las espermátidas reducirán su citoplasma y formarán el flagelo espermático, además de sufrir un proceso de reemplazo de las histonas por protaminas que ayudan a

que el DNA quede mucho más empaquetado (Bellve et al, 1977; Goto et al, 1999; McLaren, 1984). En lo que respecta a las hembras de mamífero, la maduración gamética se produce en oleadas que siguen los ciclos hormonales sexuales, de modo que en cada ciclo un grupo de oogonias detenidas en Profase I desde la etapa embrionaria son reclutadas para continuar su maduración folicular y continuar la meiosis hasta su ovulación nuevamente detenidas en Metafase II en el caso de los humanos. La finalización de la meiosis, por tanto, sólo se consigue en el momento de la fecundación (Goto et al, 1999; McLaren, 1995).

### **1.3.- Modificaciones epigenéticas.**

La epigenética consiste en una serie de modificaciones estructurales del DNA que determinan qué regiones se expresan o silencian sin alterar su secuencia. Estas modificaciones se realizan mediante diversos mecanismos como son la metilación, acetilación, fosforilación y ubiquitinación tanto en el DNA como en las histonas. De todos estos mecanismos, la metilación del DNA es el mejor estudiado. A consecuencia de estas modificaciones epigenéticas, existen genes improntados en los que se metila (silencia) el promotor de solo uno de los dos alelos que los comprenden, llamándose impronta materna o paterna según que alelo sea el que se metila (Fig. 5). La expresión mono-alélica de los genes

improntados ocurre de manera dependiente de tejido a lo largo del desarrollo embrionario y se cree que su función es la de modular su correcta formación mediante el control de los alelos maternos/paternos que es necesario que se expresen específicamente en cada tejido y en cada una de sus fases del desarrollo (Lyle, 1997; Miozzo & Simoni, 2002).



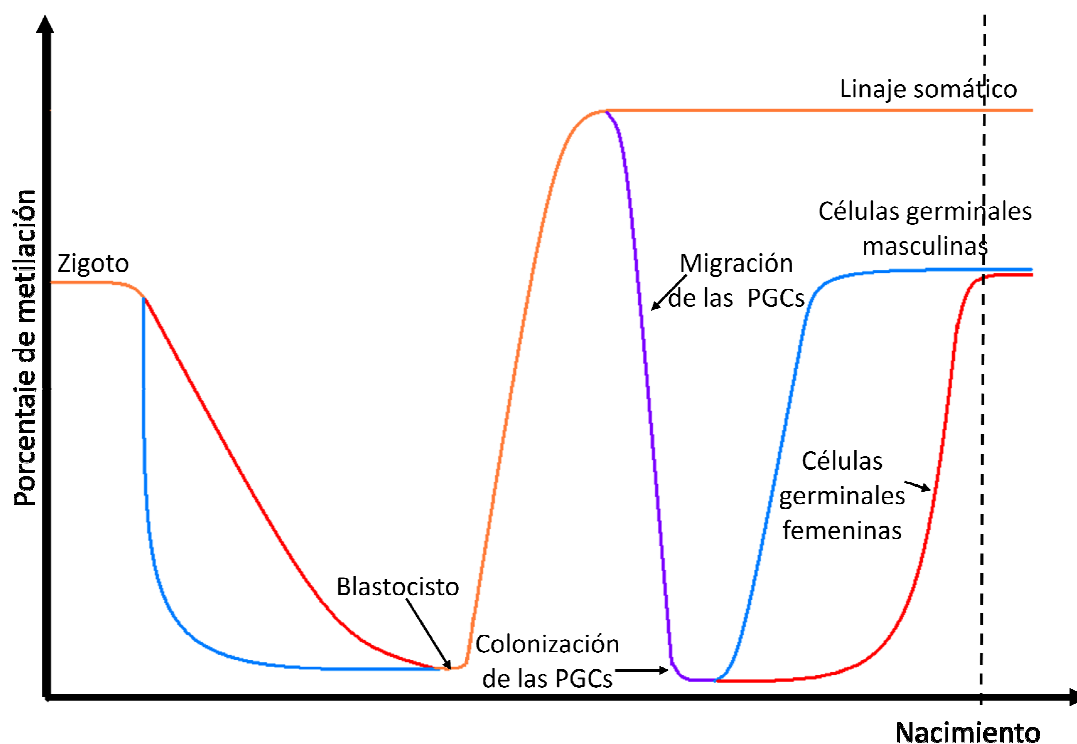
**Figura 5.** Representación esquemática del estado epigenético de los genes improntados en la línea somática/germinal. Mientras que en las células somáticas se mantiene la impronta parental específica de cada tejido, en la línea germinal se produce un borrado epigenético que permite que los gametos adquieran una nueva impronta específica de su sexo. Los círculos rojos indican metilación del DNA. Figura extraída de Mochizuki & Matsui, 2010.



Aunque los mecanismos epigenéticos son en general procesos poco conocidos, en lo referente a la metilación del DNA se sabe que diversas DNA Metil-Transferasas (DNMTs) están implicadas (Bestor, 2000). Estas DNMTs reconocen específicamente regiones promotoras del DNA ricas en G-C (islas CpG) llamadas DMR (del inglés Differentially Methylated Regions) y las modifican mediante la adición de grupos metilo a las Citosinas. Existen diversos tipos de DNMTs, siendo las más estudiadas la DNMT1, especializada en el mantenimiento de las marcas epigenéticas de la cadena madre de DNA en las hijas (Bestor et al, 1988), y las DNMT3a y DNMT3b, las cuales son las encargadas del establecimiento de nuevas marcas epigenéticas o metilación *de novo* (Okano et al, 1998).

Con el fin de que los gametos transmitan las marcas epigenéticas propias de su sexo a la descendencia, la línea germinal sufre un proceso único de reprogramación epigenética durante su desarrollo que no sufre la línea somática (Reik et al, 2001; Rideout et al, 2001; Surani, 2001). En el momento de la colonización de las crestas gonadales, las PGCs inician un proceso de borrado epigenético global en todo su genoma que elimina toda la metilación de las regiones improntadas del DNA. Se ha postulado que esta de-metilación es necesaria para que diversos genes específicos de la línea germinal post-migratoria que estaban silenciados se expresen, tal y como ocurre con VASA, DAZL o SCP3 (Maatouk & Resnick, 2003). La posterior re-metilación del genoma de los gonocitos ocurre de una

manera diferente dependiente del sexo gonadal. La metilación de los genes maternamente improntados en las células germinales femeninas ocurre tras el nacimiento, por lo que todas las oogonias se mantienen hipo-metiladas durante la gonadogénesis (Ueda et al, 2000), mientras que la re-metilación de los genes improntados en las células germinales masculinas ocurre inmediatamente tras la determinación sexual gonadal (Davis et al, 2000; Ueda et al, 2000) y, por tanto, antes de que se inicie la meiosis, a diferencia de su contraparte femenina (Fig. 6).



**Figura 6.** Representación esquemática de la reprogramación epigenética de la línea germinal *in vivo*. En rojo se indica el estado de metilación del genoma femenino y en azul el masculino, mientras que en violeta se indica el estado de metilación de las PGCs bipotenciales. El naranja indica el estado de metilación del linaje somático en ambos sexos.

## **2.- CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES COMO FUENTE PARA LA OBTENCIÓN DE GAMETOS *IN VITRO*.**

El nacimiento de la medicina regenerativa ha supuesto un importante rayo de esperanza para los millones de personas que sufren algún tipo de enfermedad crónico-degenerativa y pueden verse beneficiadas del uso de las células madre. Asimismo, debido a sus características, las células madre son una importantísima herramienta para el establecimiento de modelos de desarrollo *in vitro* que serían imposibles de estudiar *in vivo*. Éste es el caso del estudio del desarrollo de la línea germinal en humanos, el cual es complicado de abordar debido a las dificultades técnicas, además de las implicaciones éticas que tendría el acceso a embriones humanos en tan temprano estadio de desarrollo.

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 (Robey, 2000). Existen a su vez distintos tipos de células madre que se clasifican atendiendo a su origen y grado de indiferenciación, siendo las células madre embrionarias humanas (hESCs, del inglés human Embryonic Stem Cells) y las células madre de pluripotencia inducida (iPSCs, del inglés induced Pluripotent Stem

Cells) las que ofrecen un mayor abanico de posibilidades debido a su prematuro estadio de desarrollo y grado de pluripotencialidad.

## **2.1- Células madre embrionarias humanas y células madre de pluripotencia inducida.**

Las células madre embrionarias fueron derivadas por primera vez a partir de la masa celular interna (ICM, del inglés Inner Cell Mass) de blastocistos de ratón (Evans & Kaufman, 1981) y más tarde a partir de embriones humanos (Thomson et al, 1998). Se trata de células de morfología redondeada y con un reducido ratio citoplasma:núcleo que crecen formando colonias bajo determinadas condiciones de cultivo y que se caracterizan por ser pluripotentes (capaces de generar todos los tipos celulares del organismo tanto *in vitro* como *in vivo* mediante la formación de teratomas), así como de mantenerse indiferenciadas en cultivo manteniendo su identidad genética.

Estas características convierten a las hESCs en las perfectas candidatas para el establecimiento de modelos *in vitro* del desarrollo de diversos linajes celulares, además de otras aplicaciones como el *screening* de fármacos y el trasplante alógeno para reparar órganos dañados en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, el hecho de que para su derivación haya que destruir embriones humanos ha puesto en entredicho su utilización por

diversos grupos de nuestra sociedad. Además, existe la posibilidad de rechazo inmune en los pacientes en que se trasplanten. Es por ello que se han hecho grandes esfuerzos en la comunidad científica en la búsqueda de maneras alternativas de generar células con estas características sin la necesidad de destruir embriones humanos y que además pudieran ser autólogas a los pacientes que las recibirán para evitar su rechazo inmune.

Con el descubrimiento de la manera de generar células madre de pluripotencia inducida (iPSCs, del inglés induced Pluripotent Stem Cells) en 2006, el campo de la medicina regenerativa dio un salto de gigante. Mediante la sobreexpresión de tan solo los cuatro factores de transcripción esenciales para la pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC* en células adultas, el grupo de Yamanaka demostró que estas eran capaces de reprogramar su programa genético y epigenético hasta formar un tipo celular con las mismas características que las hESCs (Takahashi & Yamanaka, 2006).

La metodología empleada por el grupo de Yamanaka fue reproducida por grupos de todo el mundo y las iPSCs se empezaron a ver como las sustitutas ideales de las hESCs en el campo de la medicina regenerativa. Sin embargo, la necesidad de emplear virus para la expresión ectópica de los cuatro factores de transcripción convierte a las iPSCs en células no aptas para su trasplante en humanos, por lo que diversos grupos se hallan trabajando

arduamente en la forma de reprogramar células adultas a iPSCs sin el empleo de virus (Warren et al, 2010; Zhou et al, 2009).

De esta manera, y a pesar de los inconvenientes de cada tipo celular, tanto las hESCs como las iPSCs son la fuente biológica ideal para generar células y tejidos derivados de las tres capas embrionarias ectodermo, mesodermo y endodermo, así como de la línea germinal.

## **2.2.- Estudios previos sobre obtención de células germinales *in vitro*.**

Según los datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la infertilidad es un problema que afecta a un 14% de las parejas en edad reproductiva en Europa. Además, este porcentaje tiende a ser mayor con el tiempo debido sobre todo al retraso en el momento de la maternidad por las mujeres a causa del ritmo de vida de la sociedad occidental, lo cual conlleva un deterioro en la calidad ovocitaria (Ziebe et al, 2001). Relacionado con estos datos, aproximadamente el 32% de los ciclos de reproducción asistida que se realizaron en el año 2000 precisaron de la donación de gametos para llevarse a cabo (Adamson et al, 2006). Sin embargo, y a pesar de su éxito, la donación voluntaria de gametos no suple la demanda

actual en las clínicas de reproducción asistida, además de conllevar una serie de implicaciones éticas.

El estudio del desarrollo de la línea germinal en mamíferos, y concretamente en humanos, mediante el empleo de modelos *in vitro* de diferenciación a partir de células madre pluripotentes podría ayudarnos a conocer mejor los mecanismos detrás de su biología y en último término incluso llegar a generar gametos *in vitro* capaces de suplir la donación de ovocitos y espermatozoides en el campo de la medicina reproductiva. A continuación se resumen algunos de los trabajos realizados por distintos grupos al respecto.

### *2.2.1.- Obtención de células germinales a partir de células madre embrionarias de ratón (mESCs).*

El primer trabajo que demostró la capacidad de las ESCs para formar células germinales *in vitro* fue realizado con mESCs en 2003, causando un gran revuelo en la comunidad científica (Hubner et al, 2003). En este estudio, las líneas de mESC fueron marcadas con la expresión de una proteína verde fluorescente (GFP, del inglés Green Fluorescent Protein) bajo el control de un *enhancer* distal del promotor de OCT4 cuya expresión es específica sólo en las células germinales y posteriormente diferenciadas espontáneamente. Las células germinales GFP positivas fueron seleccionadas para seguir

con su diferenciación espontánea. Como resultado, los autores observaron la aparición de estructuras similares a folículos que contenían células parecidas a ovocitos (OLCs, del inglés Oocyte Like Cells) y que se activaron partenogénicamente para dar lugar a pseudo-blastocistos. Interesantemente, estas OLCs aparecieron en experimentos llevados a cabo tanto con líneas masculinas como femeninas, apoyando la hipótesis de que en ausencia de la expresión de *SRY* las células germinales de mamífero están programadas para formar gametos femeninos (Byskov, 1986).

En ese mismo año, otro grupo reportó la obtención de gametos masculinos a partir de mESCs. En este estudio, se transfectaron las mESCs con GFP bajo control del promotor del marcador germinal *Mvh* (del inglés Mouse vasa homolog) y se indujo la formación de agregados tridimensionales de mESCs con una línea M15 secretora de BMP4 para mimetizar la inducción del ectodermo extra-embrionario que sucede *in vivo*. Posteriormente se aislaron las células GFP positivas y se inyectaron en testículos de ratones, observando la formación de espermátidas GFP positivas procedentes de las células germinales inmaduras obtenidas *in vitro* (Toyooka et al, 2003).

En otro trabajo, se indujo a las mESCs la formación de estructuras tridimensionales EBs (cuerpos embrionarios, del inglés Embryoid Bodies) para luego aislar las células germinales inmaduras



SSEA1+/OCT4+. La meiosis de estas células fue inducida mediante su exposición a ácido retinoico y su estado epigenético correspondía con el esperado de células germinales inmaduras. Estas células germinales haploides fueron inyectadas en ovocitos de ratón mediante ICSI (del inglés Intra-Cytoplasmatic Sperm Injection) y dieron lugar a blastocistos, demostrándose por primera vez su funcionalidad (Geijsen et al, 2004).

Otros grupos reportaron la formación de células germinales más o menos inmaduras mediante diferentes técnicas de diferenciación *in vitro* a partir de mESCs (Bucay et al, 2009 ; Kerkis et al, 2007; Lacham-Kaplan et al, 2006; Qing et al, 2007). Sin embargo, el trabajo de más impacto hasta la fecha en el campo sigue siendo el realizado por el grupo de Nayernia (Nayernia et al, 2006). En este estudio se aislaron células germinales espontáneamente diferenciadas a partir de mESCs transfectadas con señales fluorescentes bajo el control de los promotores de *stra8* y *prm1*. Posteriormente, estas células aisladas fueron tratadas con ácido retinoico e inyectadas en ovocitos de ratón mediante ICSI. Fruto de este experimento se obtuvo por primera y única vez hasta la fecha descendencia a partir de células germinales obtenidas a partir de mESCs. Sin embargo, todas las crías murieron prematuramente, presumiblemente a consecuencia de diversas alteraciones epigenéticas causadas por el fallo de estas células germinales a la hora de restablecer su impronta genética.

### 2.2.2.- *Obtención de células germinales a partir de células madre embrionarias humanas (hESCs).*

La capacidad de obtener células germinales *in vitro* a partir de hESCs fue demostrada por primera vez en 2004 mediante la formación espontánea de EBs (Clark et al, 2004). Los autores observaron que las hESCs expresan varios marcadores tempranos típicos de PGCs como c-KIT o DAZL, pero no marcadores tardíos como VASA o SCP3, llegando a la conclusión de que las hESCs podrían ser poblaciones celulares heterogéneas en las que una parte de sus células están destinadas a formar células germinales espontáneamente. A pesar de que no se obtuvieron células meióticas, este trabajo supuso un gran avance desde el punto de vista de que realizó una completa caracterización de la expresión de diferentes marcadores a lo largo de las diferentes etapas de desarrollo de la línea germinal *in vitro*.

Siguiendo a este trabajo pionero, diversos grupos empezaron a publicar sus resultados acerca de la obtención de células germinales a partir de hESCs mediante diversas metodologías. Entre las diversas técnicas empleadas, se purificaron las células germinales obtenidas mediante diferenciación espontánea (Park et al, 2009 ; Tilgner et al, 2008) y se indujo su formación mediante modelos de co-cultivo (Bucay et al, 2009 ) y/o adición de factores de crecimiento (Kee et al, 2006). Sin embargo, con la excepción de los indicios de progresión

meiótica *in vitro* reportados hasta la fecha (Eguizabal et al, 2011), el desarrollo de estas células germinales obtenidas *in vitro* siempre se veía interrumpido antes de su entrada en meiosis.

### **3.- LA MEIOSIS: EL PRINCIPAL OBSTÁCULO PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS GERMINALES FUNCIONALES *IN VITRO*.**

La entrada de las células germinales en meiosis requiere que estas escapen de su programa somático. Sin embargo, la correcta ejecución de la meiosis *in vitro* es un reto desde el punto de vista de que *in vivo* ésta está íntimamente regulada por células somáticas como lo son las células de Sertoli y de la granulosa en un nicho que difícilmente es reproducible *in vitro*.

A pesar de que se ha demostrado la capacidad de obtener células germinales *in vitro* a partir de ESCs en el modelo murino, la correcta maduración meiótica de estas células ha supuesto un obstáculo difícil de superar. La primera voz de alarma al respecto surgió en 2006, cuando se presentó un estudio en el que se pusieron de manifiesto los problemas meióticos de las OLCs obtenidas a partir de mESCs (Novak et al, 2006). En este estudio, los autores detectaron la ausencia de diversas proteínas estructurales y reguladoras de la meiosis como SCP1, SCP2, REC8, STAG3 y SMC1B en las OLCs que

obtuvieron. En consecuencia, la disposición cromosómica de estas células no representaba la organización sináptica esperada de células supuestamente meióticas, sino que éstos se mostraban desorganizados, poniendo de manifiesto su disfuncionalidad meiótica.

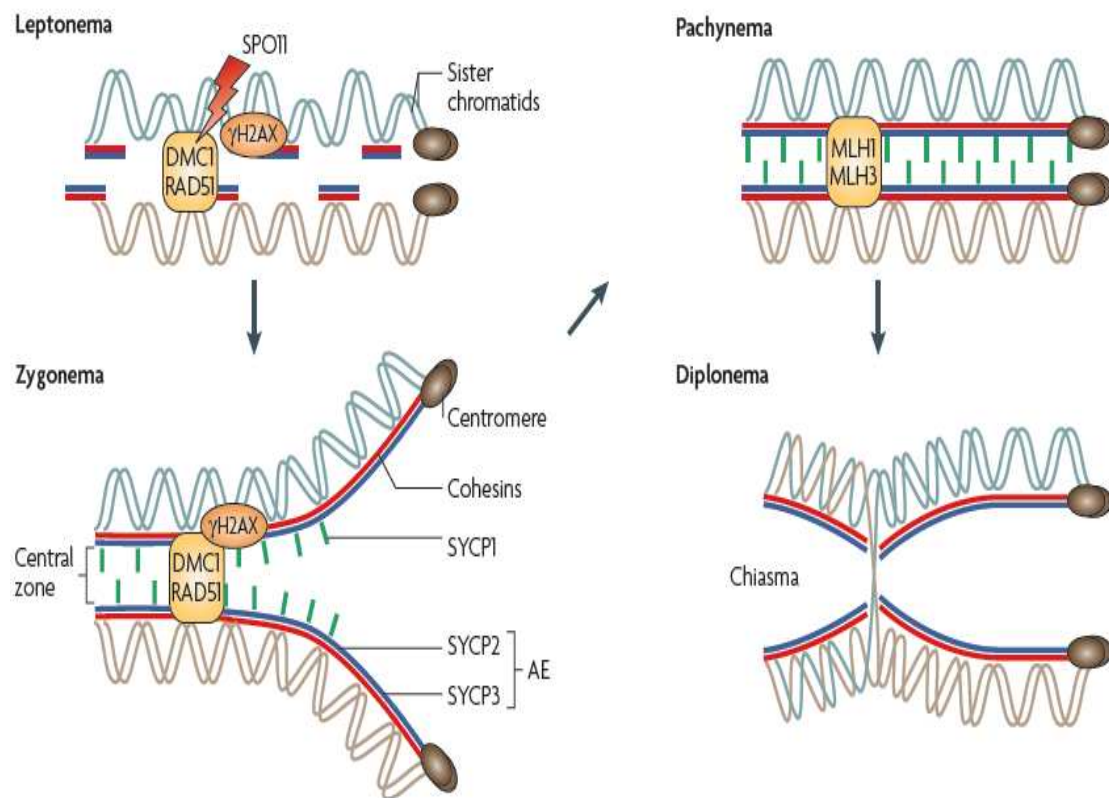
Ha sido recientemente cuando se ha publicado la progresión meiótica de células germinales obtenidas *in vitro* a partir de hESCs mediante la expresión ectópica de los miembros de la familia génica *DAZ*: *DAZ2*, *DAZL* y *BOULE* (Kee et al, 2009). Este trabajo supuso un gran revuelo debido a que fue el primero en demostrar la inducción de la meiosis *in vitro*, poniendo a la vez de manifiesto el papel de esta familia de proteínas de unión al RNA y sus posibles funciones como reguladores post-transcripcionales en la iniciación de la meiosis. Estos resultados fueron replicados y profundizados dos años después por nuestro grupo en colaboración con el de la doctora Reijo Pera, demostrándose la inducción meiótica en células germinales obtenidas a partir de iPSCs *in vitro* mediante la expresión ectópica de esta misma familia génica (Panula et al, 2011), así como mediante el hallazgo de cómo la sobreexpresión otra proteína de unión al RNA altamente conservada en la línea germinal de todos los metazoos como *VASA* también posee un importante papel en la maduración gamética de las células germinales obtenidas *in vitro* a partir de células madre pluripotentes humanas (Medrano et al, 2011).

### **3.1.- Regulación molecular de la meiosis.**

La meiosis de los mamíferos es un proceso que comprende varias fases bien definidas que comprenden una profase muy larga, seguida de dos divisiones consecutivas sin replicación del DNA para generar células haploides.

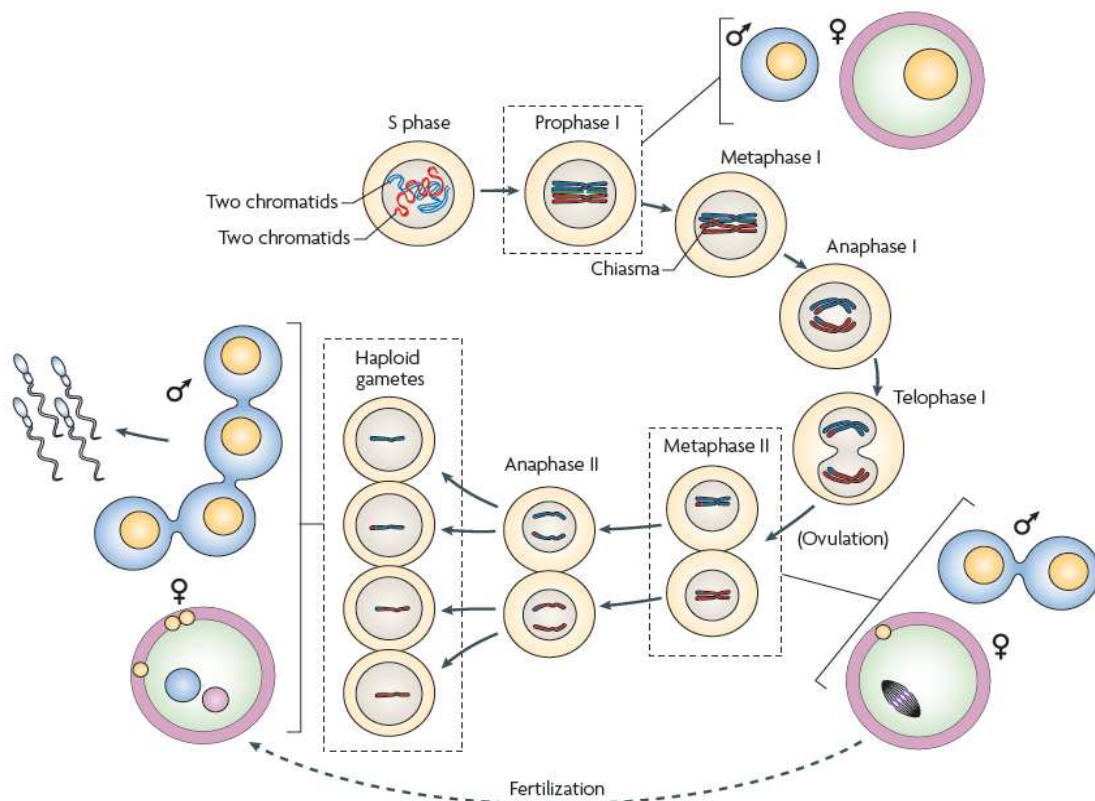
La meiosis siempre es precedida de una prolongada fase S en la que se produce la replicación del material genético. Subsecuentemente, en la profase I (Fig. 7), los cromosomas homólogos se emparejan y se dan procesos de rotura-reparación del DNA, que permiten la recombinación entre el material genético de las cuatro cromátidas implicadas. De esta manera, tras la profase I, se llega a la metafase mitótica I manteniendo unidos los cromosomas homólogos en estructuras llamadas quiasmas (Handel & Schimenti, 2010).

Por otra parte, las regiones cromosómicas que no forman sinapsis durante la profase I sufren un proceso llamado silenciamiento meiótico de la cromatina no emparejada (MSUC, del inglés Meiotic Silencing of Unpaired Chromatin). Este mecanismo se da en la inactivación de los cromosomas sexuales X e Y que se emparejan pero no forman sinapsis durante la meiosis masculina, originando lo que se conoce como el corpúsculo sexual y que es visible microscópicamente (Burgoyne et al, 2009).



**Figura 7.** Representación esquemática de las subfases de la profase I de la meiosis de mamíferos. Durante la primera subfase llamada leptotene, los cromosomas homólogos se emparejan mediante el ensamblaje del complejo sinaptonémico compuesto por las cohesinas REC8, STAG3 y SMC1B, y los llamados elementos axiales SCP3 y SCP2. En la siguiente subfase de zigotene, se producen roturas programadas de las hebras del DNA mediadas por la topoisomerasa SPO11 que son reconocidas por las la maquinaria de reparación del DNA. En este proceso, la fosforilación de H2AX para formar  $\gamma$ H2AX es necesaria para reclutar la unión al DNA de varias proteínas relacionadas con la recombinasa RECA entre las que destacan DMC1 y RAD51 que se encargan de reparar el DNA mediante recombinación homóloga. Además, los elementos axiales cambian su conformación pasando a ser elementos laterales mientras las hebras de DNA se abren. Las sinapsis cromosómicas se establecen durante el paquitene mediante la función estructural de SCP1 y los elementos centrales SYCE1 y SYCE2. Durante esta fase, las proteínas MLH1 y MLH3 se encargan de mediar la recombinación del DNA en regiones específicas del DNA. Figura extraída de Handel & Schimenti, 2010.

Posteriormente, se produce una primera división mitótica reduccional en la que se separan los cromosomas homólogos y una segunda mitosis en la que se separan las cromátidas hermanas para dar lugar a los gametos haploides. Ambas divisiones ocurren de manera distinta en machos y hembras de mamífero. Mientras que en machos las dos divisiones ocurren inmediatamente una detrás de la otra para dar lugar a cuatro células hijas haploides, en hembras las divisiones mitóticas se producen siguiendo los ciclos estrogénicos (Mitosis I), y la fecundación (Mitosis II), además de que cada meiosis da lugar a solo un ovocito funcional y dos cuerpos polares que degenerarán (Fig. 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la meiosis de mamíferos. Figura extraída de Handel & Schimenti, 2010.

### **3.2.- Regulación de la meiosis mediante proteínas de unión al RNA.**

Aunque se conoce que el ácido retinoico es la señal de activación para la iniciación de la meiosis de las células germinales (Bowles et al, 2006; Koubova et al, 2006), los mecanismos moleculares inductores de la entrada en meiosis de las células germinales en mamíferos son poco conocidos. A diferencia de lo que ocurre en levadura, donde se han identificado los genes reguladores de este proceso NDT80 y IME2 (Kassir et al, 2003), no se han encontrado en mamíferos factores ortólogos. Sin embargo, se ha propuesto que diversas proteínas de unión al RNA pueden actuar realizando esta función actuando como *checkpoints*.

La familia génica *DAZ* es una familia de proteínas de unión al RNA cuya expresión es específica y está altamente conservada a lo largo de la evolución de la línea germinal de todos los metazoos (Juliano & Wessel, 2010; Ruggiu et al, 1997; Xu et al, 2001). En humanos, esta familia génica está compuesta por los genes autosómicos *BOULE* y *DAZL*, y el *cluster* de genes *DAZ* localizado en el cromosoma Y. Evolutivamente, se piensa que *DAZL* y *DAZ* evolucionaron a partir de *BOULE*, el cual tiene su homólogo en invertebrados *Boule* (Xu et al, 2001). En ratón, *Daz* y *Boule* tienen una función reguladora en la espermatogénesis, mientras que la de *Dazl* está relacionada con la meiosis, ya que se ha visto que en ratones knockout para el gen *Dazl*,



sus células germinales inician un programa de apoptosis justo antes de iniciar la meiosis en ambos sexos (Ruggiu et al, 1997). De hecho, algunos grupos hablan de un proceso de “*licensing*” que ocurre tras la migración de las células germinales justo en el momento en que colonizan las crestas gonadales que se caracteriza por la expresión de *Dazl*, el cual actúa como un regulador para que se inicie su diferenciación sexual y su entrada en meiosis (Gill et al, 2011).

Por otra parte, VASA es otra proteína de unión al RNA también altamente conservada en la línea germinal de todos los metazoos, donde se localiza principalmente en su citoplasma y especialmente en una estructura peri-nuclear electrón-densa rica en RNAs llamada plasma germinal (Castrillon et al, 2000b; Fujiwara et al, 2001; Gruidl et al, 1996; Komiyama et al, 1994; Lasko & Ashburner, 1988). Su gen codificante en humanos, *DDX4*, es miembro de la familia génica DEAD-box y transcribe una proteína con actividad RNA-helicasa ATP dependiente que se expresa durante las etapas meióticas y peri-meióticas, iniciándose justo cuando las células germinales colonizan las crestas genitales y manteniéndose durante el resto de la gametogénesis en ambos sexos (Castrillon et al, 2000b). Originalmente fue descubierto en *Drosophila*, donde su silenciamiento demostró que era necesario para el ensamblaje del cuerpo polar (también llamado plasma germinal) y la correcta ovogénesis (Lasko & Ashburner, 1988). Por su parte, el fenotipo de los ratones *knockout* para el gen *Mvh* (del inglés Mouse vasa

homolog) es normal en hembras, mientras que los machos son totalmente infértiles (Tanaka et al, 2000a), demostrándose su funcionalidad en la gametogénesis.

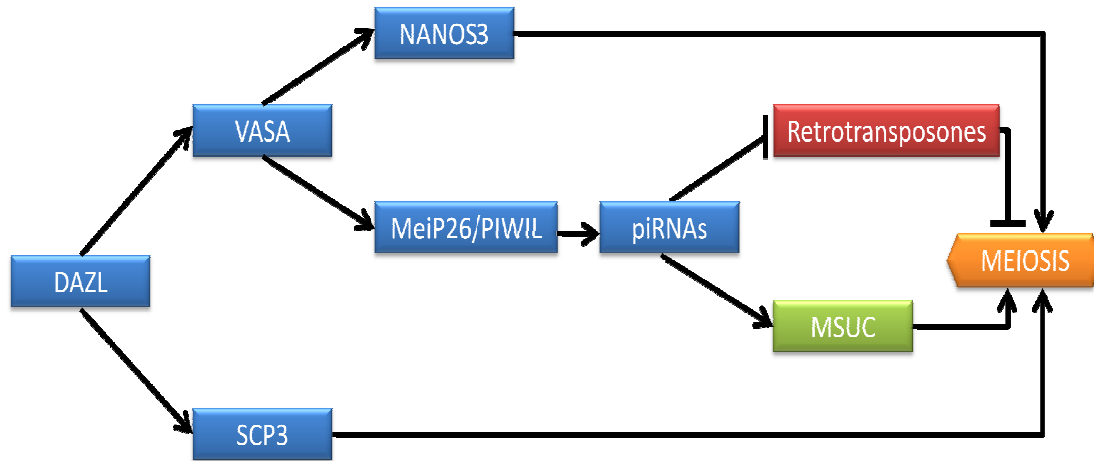
Aunque el mecanismo por el cual estas proteínas de unión al RNA son capaces de actuar en la inducción de la meiosis permanece incierto, algunos trabajos han sugerido que podrían actuar como chaperonas mediadoras del correcto plegamiento de diversos RNAs y reguladores post-transcripcionales de diversas proteínas encargadas de llevar a cabo la meiosis (Mohr et al, 2002). Un ejemplo de esta función es la regulación traduccional que se ha descrito de Dazl sobre Scp3 (Reynolds et al, 2007) y Vasa (Reynolds et al, 2005) en el modelo murino.

Por su parte, se ha descrito que Vasa tiene como diana el mRNA de otra importante proteína altamente conservada en la línea germinal de los metazoos como Nanos (Becalska & Gavis, 2009; Noce et al, 2001). Además, *Mei-P26*, una proteína cuya función es la de silenciar la acción de diversos miRNAs (micro-RNAs) interactuando con el miembro de la familia Argonaut, Ago1, para inducir la maduración de las células germinales, ha sido descrito como una de las posibles dianas de Vasa en *Drosophila* (Liu et al, 2009). De la misma forma que ocurre en *Drosophila*, los homólogos de la familia de miRNAs que interactúan con Argonaut, denominados piRNAs (Piwi-RNAs) en mamíferos, se localizan en el plasma germinal

junto a Vasa y se encargan del silenciamiento de retrotransposones mediante la regulación de la metilación *de novo* del DNA, lo cual es necesario durante la meiosis y la reprogramación epigenética que sufre la línea germinal para evitar aneuploidías. A su vez, estos piRNAs están regulados por los tres genes homólogos de *Piwi* en el ratón: *Miwi*, *Mili* y *Miwi2* (Peters & Meister, 2007). De esta manera, se ha reportado en ratón que una deficiencia en la regulación de estos piRNAs mediante el silenciamiento de sus proteínas de unión al RNA reguladoras Vasa y/o la familia génica Piwi, tienen como fenotipo común la inhibición de la meiosis debido a la elevada expresión de retrotransposones por una deficiente metilación *de novo* del DNA (Kuramochi-Miyagawa et al, 2010). Dado que es posible que estos piRNAs también actúen en el silenciamiento meiótico de la cromatina no emparejada (MSUC) que ocurre únicamente en el emparejamiento de los cromosomas X e Y durante la meiosis masculina (Burgoyne et al, 2009), puede que éstos no realicen correctamente su función debido a la carencia de regulación por parte de Vasa y, por tanto, la meiosis sea abortada solo en los machos en el caso del modelo de ratones knockout para *Vasa*.

En conclusión, basándonos en estas observaciones, queda patente que la maduración meiótica de la línea germinal de los metazoos y en concreto de los mamíferos podría ser un proceso regulado por diversas proteínas de unión al RNA altamente conservadas a lo largo de la evolución entre las que destacan DAZL y

VASA como dos componentes claves de este intrincado proceso (Fig. 9).



**Figura 9.** Modelo de regulación de la iniciación y progresión meiótica en mamíferos mediante proteínas de unión al RNA. Según el modelo que proponemos, DAZL actuaría como regulador traduccional de VASA y SCP3, el cual es necesario para la formación de los elementos axiales del complejo sinaptonémico (Reynolds et al, 2007; Reynolds et al, 2005). A su vez, VASA se encarga de regular post-transcripcionalmente a NANOS3 (Becalska & Gavis, 2009; Noce et al, 2001), el cual es necesario para la iniciación de la meiosis, y a MeiP26, el cual a su vez está implicado en la regulación de diversos piRNAs en *Drosophila* (Liu et al, 2009), del mismo modo que la familia PIWIL (PIWI-Like) en mamíferos regulan la función de los piRNAs encargados de silenciar los retrotransposones (Kuramochi-Miyagawa et al, 2010) y la activación del proceso de silenciamiento de la cromatina no emparejada (MSUC) (Burgoyne et al, 2009) durante la meiosis.

# II

# HIPÓTESIS

*“Para investigar la verdad es preciso dudar, en cuanto sea posible, de todas las cosas.”*

René Descartes (1596-1650) Filósofo y matemático francés.



## **HIPÓTESIS**

Basándonos en la información que tenemos hoy en día acerca del papel que tienen las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA en la regulación de la meiosis de las células germinales de mamífero, la hipótesis de esta tesis doctoral es que, mediante la expresión ectópica de dichas proteínas de unión al RNA, es posible inducir la progresión meiótica en las células germinales derivadas *in vitro* a partir de células madre pluripotentes humanas.





# III

## OBJETIVOS

*“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra.”*

Claude Bernard (1813-1878) Fisiólogo francés.



## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es el de demostrar la implicación de las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA en la progresión meiótica de las células germinales con el fin de establecer un modelo de diferenciación *in vitro* de células germinales post-meióticas a partir de células pluripotentes humanas.

Específicamente, los objetivos a conseguir han sido los siguientes:

- 1.- Estudio preliminar comparativo de la expresión de los marcadores germinales en biopsias testiculares humanas procedentes de pacientes con azoospermias secretoras y obstructivas.
- 2.- Establecimiento de un modelo de diferenciación de células germinales *in vitro* a partir de hiPSCs.
- 3.- Establecimiento de un modelo de marcaje de células madre pluripotentes humanas sometidas a diferenciación espontánea basado en la expresión de GFP bajo el control del promotor de VASA para el estudio del perfil de expresión de las células germinales VASA-GFP positivas obtenidas *in vitro*.

- 4.- Caracterización de los efectos fenotípicos de la expresión ectópica de VASA en células madre pluripotentes humanas y su influencia en el proceso de la diferenciación y maduración meiótica de las células germinales obtenidas *in vitro*.
  
- 5.- Análisis comparativo de la expresión ectópica combinada de DAZL y VASA en la formación y maduración de células germinales obtenidas *in vitro* a partir de células madre pluripotentes humanas.

# IV

# MATERIALES Y

# MÉTODOS

*“La ciencia no es sino una perversión de sí misma a menos que tenga como objetivo final el mejoramiento de la humanidad.”*

Nikola Tesla (1856-1943) Físico, matemático e ingeniero eléctrico croata.



## **1.- PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS TESTICULARES HUMANAS PARA SU ESTUDIO.**

### **1.1.- Obtención de muestras testiculares humanas.**

Para el estudio preliminar comparativo de la expresión de los marcadores germinales en biopsias testiculares humanas con fines diagnósticos, se obtuvieron un total de 23 muestras consistentes en pequeños fragmentos de tejido testicular compuesto por tubos seminíferos y tejido intersticial procedentes de pacientes azoospermicos tratados en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Una parte de las muestras fue destinada para su diagnóstico anatómo-patológico y el resto para nuestro estudio, previa donación por los pacientes mediante la firma del consentimiento informado, previamente aprobado por el comité ético de la clínica, según la legislación española vigente.

Las biopsias fueron clasificadas en cuatro grupos según su diagnóstico anatómo-patológico como se detalla a continuación:

- a) Azoospermias obstructivas control (OC, del inglés Obstructive Controls), (n=11), en las que la espermatogénesis es normal y la azoospermia es debida a problemas obstructivos de los conductos deferentes/epidídimo como por ejemplo vasectomías.

- b) Azoospermias secretoras con problemas de maduración espermática (MA, del inglés Maturation Arrest), (n=5).
- c) Azoospermias secretoras en pacientes mosaico de síndrome de solo células de Sertoli (SCO SPZ+, del inglés Sertoli Cell Only SPermatoZoa +), (n=3).
- d) Azoospermias secretoras en pacientes con síndrome de solo células de Sertoli (SCO SPZ-), (n=4).

En el caso de los grupos c y d, los pacientes con diagnóstico de síndrome de solo células de Sertoli fueron clasificados como mosaicos o no mosaicos basándonos en si se encontraron espermatozoides móviles o no en la biopsia a pesar de que el informe anatómo-patológico las diagnosticara como tales.

## **1.2.- Procesamiento de muestras para su análisis molecular e histológico.**

Aproximadamente 1-2 mg de tejido procedente de cada biopsia fueron transportados en hielo y procesados durante los 90 minutos posteriores a la cirugía. Para disgregar el tejido, éste se troceó mecánicamente con la ayuda de hojas de bisturí en pequeños fragmentos de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup>. Tras su disgregación mecánica, los fragmentos de tejido se lavaron dos veces en PBS



(Gibco Invitrogen) y se digirieron enzimáticamente con Colagenasa IA (1000 UI/mL) (Sigma Aldrich) durante 20 minutos a 37°C, seguido de una segunda incubación con TrypLE Select (Invitrogen) durante 10 minutos a 37°C. La suspensión celular resultante de esta disgregación fue filtrada a través de membranas de nylon con un tamaño de poro de 30 µm (Partec). Posteriormente, las células fueron contadas y divididas para ser analizadas mediante citometría de flujo, inmunocitoquímica y RT-qPCR.

Para su inclusión en parafina, las muestras de biopsia testicular fueron fijadas con PFA (paraformaldehído) 4% durante una noche a 4°C. Posteriormente, fueron lavadas con PBS durante 15 minutos a 4°C y deshidratadas durante otros 15 minutos a 4°C en etanol 50% y 70%, para finalmente ser incluidas mediante protocolos estándar.

## **2.- DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS GERMINALES *IN VITRO* A PARTIR DE LÍNEAS PLURIPOTENTES DE CÉLULAS MADRE HUMANAS.**

### **2.1.- Cultivo celular de hESCs e iPSCs.**

Las líneas de hESCs H9 (46,XX) y HSF1 (46,XY), además de las líneas de hiPSCs iHUF3 (46,XX), IMR90 (46, XX) y iHUF4 (46, XY), fueron mantenidas en estado indiferenciado sobre una capa de

células de soporte o *feeders* formada a base de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs, del inglés Mouse Embryonic Fibroblasts) previamente irradiados, en el medio de indiferenciación compuesto por DMEM/F12 suplementado con un 20% de KOSR (del inglés KnockOut Serum Replacement), 2 mM L-glutamina, 0.1 mM NEAA (del inglés non-essential amino acids), 10 ng/ml bFGF (del inglés basic Fibroblast Growth Factor) (Invitrogen) y 0.1 mM 2-mercaptoetanol (Milipore). Las líneas fueron expandidas cada 4-5 días mecánicamente cortando fragmentos de colonia con una pipeta de vidrio biselada o enzimáticamente tratándolas con 1 mg/mL de Colagenasa IV (Invitrogen). Para el cultivo en *feeder-free*, se plantaron las células sobre una matriz de Matrigel (BD Biosciences) diluida 1:100 con DMEM/F12 y se empleó medio de indiferenciación previamente condicionado por MEFs irradiados durante 24 horas.

Para inducir su diferenciación, las células se cultivaron en ausencia de bFGF con un medio de diferenciación rico en factores de crecimiento consistente en DMEM/F12 suplementado con 20% de suero bovino fetal (Hyclone), 2 mM L-glutamina, 0.1 mM NEAA y 0.1 mM 2-mercaptoetanol. En todos los experimentos, las líneas se encontraban en pases comprendidos entre el 15 y el 55.

A su vez, se emplearon dos métodos distintos de diferenciación celular según el modelo de estudio que usamos:

- **Diferenciación tridimensional en EBs:** Para inducir la agregación de las células indiferenciadas en EBs, las colonias fueron recogidas mecánicamente con la ayuda de asas de vidrio estiradas con forma de gancho y mantenidas en placas de cultivo tratadas para tener una baja tasa de adhesión celular (BD Biosciences) con medio de diferenciación en ausencia de bFGF.
- **Diferenciación en monocapa:** Para la diferenciación en monocapa, las colonias fueron plantadas en condiciones *feeder-free* con medio de diferenciación y en ausencia de bFGF.

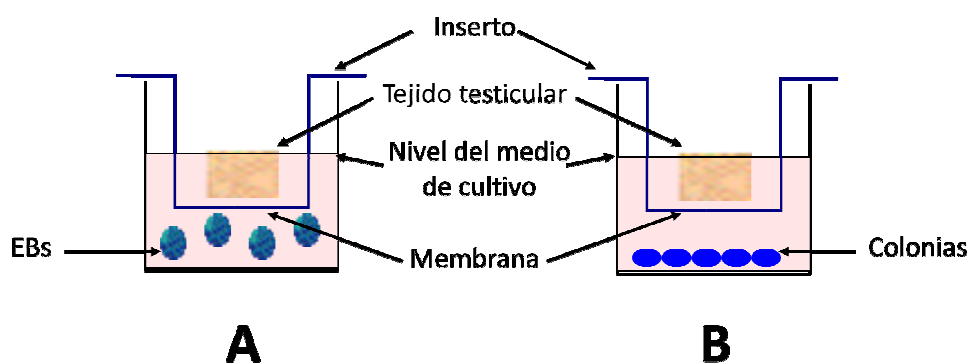
## **2.2.- Modelo de diferenciación mediante co-cultivo.**

La primera aproximación para la obtención de células germinales *in vitro* fue la creación de una serie de modelos de co-cultivo de las líneas hESC con el tejido testicular procedente de las biopsias testiculares humanas.

### **2.2.1.- Co-cultivo indirecto.**

El modelo de co-cultivo indirecto tiene como objetivo el cultivo simultáneo de las líneas pluripotentes y el tejido testicular, evitando

el contacto directo pero permitiendo el libre traspaso de factores solubles. Para ello, se colocaron los fragmentos de tejido testicular de pacientes con azoospermia obstructiva de  $1\text{mm}^3$  en la parte superior de una membrana micro-porosa de  $0.3\ \mu\text{m}$  de diámetro de poro que es la base de un pocillo llamado inserto (Milipore) y las colonias indiferenciadas/EBs en la parte inferior (Fig. 10).



**Figura 10.** Representación gráfica de los modelos de co-cultivo indirecto de células madre pluripotentes con tejido testicular humano. **(A)** Co-cultivo indirecto en suspensión con tejido testicular humano. **(B)** Co-cultivo indirecto de colonias de hESC en monocapa con tejido testicular humano.

### 2.2.2.- Co-cultivo directo.

El contacto directo célula-célula juega un papel importante en la señalización de diversas rutas de diferenciación celular, incluida la línea germinal, donde las células del nicho gonadal (células de Sertoli en el caso masculino o células de la granulosa en el caso femenino) controlan la maduración de las células germinales. En el modelo de co-cultivo directo se permite el contacto celular directo. Para ello, se

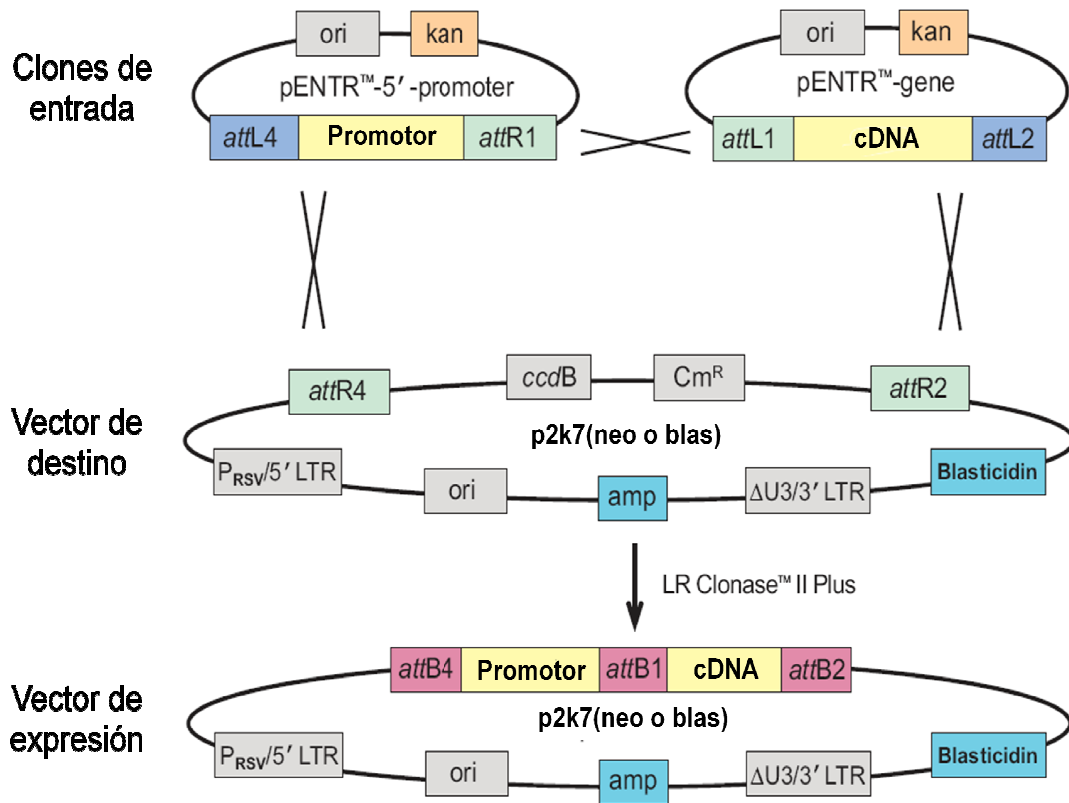
emplearon cultivos primarios de biopsias testiculares irradiados en fase 2-5 como *feeders* para las colonias hESC en ausencia de bFGF en medio de diferenciación.

### **2.3.- Manipulación genética de proteínas de unión al RNA.**

#### *2.3.1.- Construcción y empaquetamiento de vectores lentivirales.*

Para la construcción de los vectores de expresión de VASA y DAZL, se empleó el *backbone* lentiviral p2K7 con resistencia para Blasticidina mediante el empleo de la metodología de clonación *Gateway* (Invitrogen) (Fig. 11). Para ello, se aislaron las secuencias codificantes en pauta abierta de lectura (ORF, de inglés Open Reading Frame) de VASA (Número de acceso en GenBank NM\_024415.2) y DAZL (Número de acceso en GenBank NM\_001190811.1) mediante PCR a partir de cDNA retro-transcrito de mRNA de testículos humanos (Clontech). Posteriormente, los cDNAs de VASA y DAZL fueron clonados en vectores de entrada pENTR-D TOPO antes de clonarlos mediante reacción LR en el vector de destino p2K7 bajo el control del promotor constitutivo fuerte del *EF1 $\alpha$*  (del inglés Elongation Factor 1 $\alpha$ ), previamente clonado en un vector de entrada pENTR-5' TOPO (Fig. 12 A y B). La expresión de

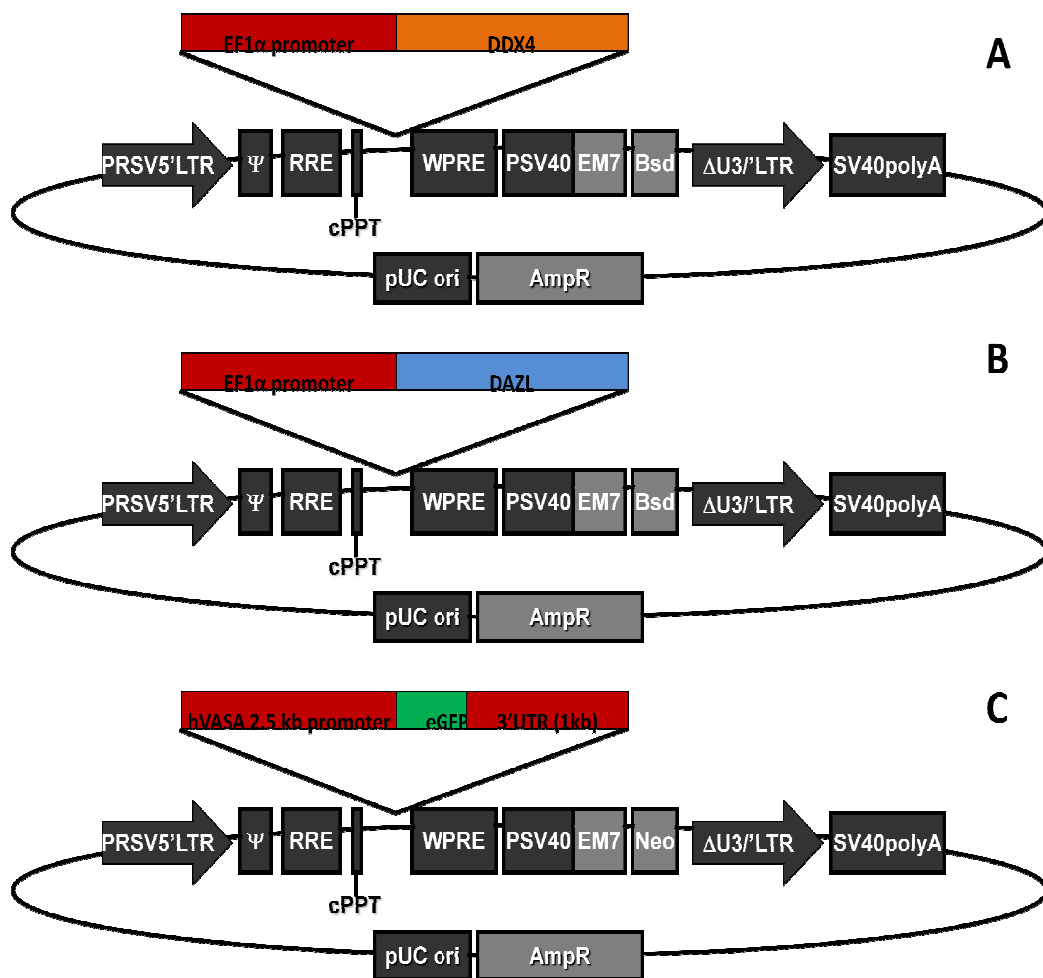
ambas proteínas fue confirmada posteriormente empleando anticuerpos específicos para VASA y DAZL (Abcam) mediante Western Blot.



**Figura 11.** Representación gráfica de la metodología de clonación Gateway.

Para la construcción del vector de marcaje VASA-GFP, se clonó también mediante el uso de la metodología Gateway (Invitrogen). Para ello, se clonó en el backbone lentiviral p2K7 con resistencia a Neomicina la secuencia codificante de la eGFP (del inglés enhanced

GFP) bajo el control del promotor de VASA contenido en la secuencia genómica aislada mediante PCR que comprende las 2.5 Kb en la región 5' del gen codificante de VASA en el genoma humano. Adicionalmente, se clonó también la secuencia 3'UTR (del inglés UnTranslated Region) de VASA como secuencia de reconocimiento para su traducción y para dar mayor estabilidad al mRNA (Fig. 12C).



**Figura 12.** Representación gráfica de los vectores lentivirales empleados en este trabajo. **(A)** Vector de expresión lentiviral iVASA. **(B)** Vector de expresión lentiviral iDAZL. **(C)** Vector de marcaje VASA-GFP.

Para el empaquetamiento de los tres constructos en partículas lentivirales se empleó la línea empaquetadora 293FT derivada de células renales embrionarias humanas. Para ello, se co-transfectaron en un volumen de 15 mL en Flasks de 175 cm<sup>2</sup> con las células empaquetadoras en un 80% de confluencia en presencia de 120 µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen) 10 µg de cada uno de los constructos, junto a 15 µg del vector pCMV-dR8.91 que expresa los genes de empaquetamiento *Gag*, *Pol* y *Rev*, y 10 µg del vector pMD.G que expresa la proteína G de la envoltura del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G), necesaria para pseudotipar las partículas virales y que sean capaces de infectar células humanas. Tras 72 horas, los sobrenadantes virales se recogieron, alicuotaron y almacenaron a -80°C.

### 2.3.2.- Transducción vírica y diferenciación.

Para la transducción de las líneas de células madre pluripotentes con los vectores de expresión iVASA y iDAZL, éstas fueron mantenidas hasta un 50% de confluencia en condiciones *feeder-free* y posteriormente expuestas a los sobrenadantes virales de cada uno de los constructos en una dilución 1:3 en presencia de 8 µg/mL de polibreno (Sigma Aldrich). Tras 6 horas, el medio fue nuevamente diluido 1:3 con medio condicionado de MEFs y las células fueron incubadas hasta el día siguiente en el que se sustituyeron los



sobrenadantes virales por medio condicionado fresco y se dejó a las células recuperarse un día más. Las células transducidas fueron seleccionadas mediante tratamiento con 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Blasticidina (Invitrogen) durante 3 días, tras los cuales se indujo su diferenciación en monocapa.

Para la transducción de las líneas con el vector VASA-GFP, la metodología fue la misma, pero la selección se realizó con 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Geneticina (Invitrogen) durante 7 días, tras los cuales las células se pasaron a MEFs durante un pase más para su recuperación antes de devolverlas a las condiciones *feeder-free* para inducir su diferenciación en monocapa.

### **3.- TÉCNICAS ANALÍTICAS.**

#### **3.1.- Análisis molecular de expresión genética.**

##### *3.1.1.- Extracción de RNA y retro-transcripción.*

La extracción de RNA en el caso de las muestras de tejido testicular se realizó mediante el uso de Tripure (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. Para el resto de muestras, se empleó el kit de columnas de afinidad Mini RNeasy Mini (Qiagen). Posteriormente, se cuantificó su cantidad y pureza con un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific).

En todos los casos, alrededor de 1 µg de RNA se empleó para su retro-transcripción a cDNA mediante RT-PCR empleando indistintamente la DNA-polimerasa RNA-dependiente M-MLV RT (del inglés Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) con poli-oligo dTs como cebadores (Clontech), o mediante el uso de cebadores aleatorios vía el sistema SuperScript III First-Strand (Invitrogen).

### *3.1.2.- Análisis cualitativo mediante RT-PCR.*

En todos los análisis mediante PCR, el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial del DNA a 94°C durante 5 minutos, seguida de 35 ciclos de amplificación consistentes en desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, *annealing* (unión al DNA de los cebadores) a 57-59°C durante 30 segundos, y elongación a 72°C durante 1 minuto. Tras los 35 ciclos de amplificación, se realizó una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Todas las reacciones se realizaron por duplicado empleando 25-50 ng de cDNA como DNA molde. Como control negativo se emplearon muestras procedentes de las reacciones de retro-transcripción que contenían agua en lugar de RNA y los genes *Housekeeping* GAPDH y el ribosomal RPL19 (Al-Bader & Al-Sarraf, 2005) fueron utilizados como controles internos de la reacción de PCR. Los resultados de las

reacciones de PCR fueron analizados cualitativamente en geles de agarosa al 1.5% y visualizados mediante transiluminador (Biorad), además de comprobada su especificidad mediante secuenciación.

Todos los cebadores empleados fueron diseñados mediante el software Primer3 (Genefisher) colocando cada uno de los dos cebadores para cada amplicón en diferentes exones para descartar posibles contaminaciones de DNA genómico y sintetizados comercialmente (Sigma Aldrich). Para la caracterización molecular de las biopsias testiculares humanas, los cebadores empleados fueron los siguientes: VASA F 5'-ATGGATGATGGACCTTCTCG-3', VASA R 5'-CCTCTGTTCCGTGTTGGATT-3' (Número de acceso en GenBank [NM\\_024415.2](#)); c-KIT F 5'-GTCTCCACCATCCATCCATC-3', y c-KIT R 5'-TTTCCGACAGCACTGACTTG-3' (Número de acceso en GenBank [NM\\_000222.2](#)). Por otra parte, en los experimentos de transducción vírica, se diseñaron un cebador reverse (anti-sentido) común en el primer exón de *VASA*, y dos cebadores forward (sentido) distintos que alinean específicamente, bien con la secuencia en la región 5' del codón de iniciación de la ORF en el primer exón del RNA de *VASA* para la detección de la expresión de *VASA* endógeno, o con la región 5' del codón de iniciación en el vector p2K7 para la detección de la expresión del *VASA* ectópico: VASA-ENDO F 5'-CACGTGCAGCCGTTTAAGT-3'; VASA-ECTOPIC F 5'-CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'; VASA R 5'-

TGATGATGAAGCTGGAGTCCT-3' (Número de acceso en GenBank NM\_024415.2).

### *3.1.3.- Análisis cuantitativo mediante RT-qPCR y microfluídos.*

La detección cuantitativa de la expresión de marcadores germinales en biopsias testiculares humanas mediante qPCR (del inglés quantitative PCR) se realizó en el sistema LightCycler 2.0 (Roche) mediante el uso de SYBR Green como fluoróforo de unión al DNA de doble cadena (Roche). Todas las reacciones se realizaron por triplicado empleando 25-50 ng de cDNA como DNA molde. Tras una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, las muestras se sometieron a 45 ciclos de amplificación consistentes en una desnaturalización de 95°C durante 10 segundos, un *annealing* a 59°C durante 6 segundos, y una extensión a 72°C durante 10 segundos. La especificidad de cada reacción fue comprobada mediante la T<sub>m</sub> o temperatura de *melting* (fusión) de cada amplicón, así como mediante secuenciación, y como controles negativos se emplearon muestras procedentes de las reacciones de retro-transcripción que contenían agua en lugar de RNA. La expresión relativa de cada gen analizado se normalizó respecto a GAPDH y RPL19 mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ . Las secuencias de los cebadores empleados son las

siguientes: VASA F 5'-ATGGATGATGGACCTTCTCG-3', VASA R 5'-CCTCTGTTCCGTGTTGGATT-3' (Número de acceso en GenBank [NM\\_024415.2](#)); c-KIT F 5'-GCAAATACACGTGCACCAAC-3', y c-KIT R 5'-GCACCCCTTGAGGGAATAAT-3' (Número de acceso en GenBank [NM\\_000222.2](#)).

Para el análisis mediante microflúidos en los experimentos de diferenciación *in vitro* de células germinales, previamente el cDNA fue pre-amplificado usando un mix 0.2X de sondas Taqman (Applied Biosystems) contra todos los genes a analizar como cebadores en una reacción consistente en 5 µL de tampón 2x (del kit CellsDirect One-Step qRT-PCR, Invitrogen), 2.5 µL del mix de sondas Taqman 0.2X, 1 µL de Platinum Taq-polimerasa (Invitrogen) y 1.5 µL cDNA. Las reacciones de pre-amplificación constaron de una desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos y 14 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 4 minutos cada uno. El cDNA pre-amplificado se diluyó 1:2 en tampón Tris-EDTA y fue empleado para el análisis de expresión genética en chips de 96.96 del sistema de microflúidos Biomark (Fluidigm). La expresión de cada gen analizado fue determinada por triplicado y calculada en base a la media geométrica de múltiples genes control (Vandesompele et al, 2002) mediante el software Qbase Plus (Biogazelle).

## **3.2.- Análisis de expresión a nivel proteico.**

### *3.2.1.- Western blot.*

Para la extracción proteica, las células fueron recogidas y lisadas en tampón RIPA (Sigma Aldrich) suplementado con 1X de inhibidores de proteasas (Complete Mini, Roche). Tras esto, las muestras se mantuvieron 20 minutos en hielo y fueron centrifugadas durante 20 minutos a 16000 g a 4°C.

Tras la extracción proteica, los sobrenadantes fueron almacenados a -80°C o empleados directamente para medir su concentración proteica mediante un ensayo colorimétrico BCA (del inglés BiCinchoninic Acid) (Thermo Scientific). 20 µg de cada muestra fueron desnaturalizados con tampón Laemmli 6X a 95°C durante 5 min y cargados en un gel al 10% SDS-PAGE. Los geles fueron sometidos a 150 V durante 70 minutos y posteriormente transferidos a una membrana PVDF durante 1 hora a 100 V en tampón CAPS (10 mM CAPS, 10% etanol, pH 11). Las membranas fueron bloqueadas en una solución de 5% de leche desnatada en TBS-T (TBS con 0.1% Tween20) durante 1 hora a temperatura ambiente y después incubadas durante la noche a 4°C con los anticuerpos primarios 1:1,000 para VASA y DAZL y 1:10,000 para GAPDH (Abcam). Tras esto, las membranas fueron lavadas en TBS-T y posteriormente incubadas con anticuerpos secundarios conjugados

con HRP (del inglés HorseRadish Peroxidase) (Calbiochem) en una dilución 1:10,000 en una solución al 5% de leche desnatada en TBS-T. Las membranas fueron finalmente reveladas mediante incubación con el sustrato de la peroxidasa Supersignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific) en placas fotográficas.

### *3.2.2.- Inmunocitoquímica.*

**Inmunohistoquímica de secciones de parafina.** Secciones de 5  $\mu\text{m}$  de los bloques de parafina con muestras de tejido testicular fueron cortadas y montadas sobre portaobjetos (Fisher Scientific) para su análisis inmunohistoquímico. Las muestras fueron desparafinadas y posteriormente re-hidratadas mediante baños decrecientes de alcoholes. Para la exposición de antígenos, se incubaron las secciones de tejido en tampón citrato 0.01M (pH 6) durante 15 minutos a 95°C. Posteriormente, las secciones fueron bloqueadas con 10% BSA (del inglés Bovine Serum Albumine) (Sigma Aldrich) en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y subsecuentemente con los anticuerpos primarios contra VASA (R&D Systems) en una dilución 1:100, c-KIT-PE (R&D Systems) y SSEA-1-FITC (BD Biosciences) en una dilución 1:50 en cámara húmeda durante la noche a 4°C. En el caso del marcaje para VASA, adicionalmente las muestras fueron lavadas y subsecuentemente incubadas con un anticuerpo secundario unido al fluoróforo en una

dilución 1:500 (Jackson ImmunoResearch Laboratory). Finalmente, se montaron los cubres con medio de montaje ProLong Gold antifade reagent con DAPI (Invitrogen) y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia con un modelo Olympus IX81 (Olympus).

**Inmunocitoquímica de células fijadas.** En el caso de células procedentes del FACS (del inglés Fluorescence Activated Cell Sorter) fueron depositadas en portaobjetos mediante adaptadores Cytospin (Thermo Scientific) centrifugando durante 3 minutos a 800 rpm. Alternativamente, las células fueron crecidas en "*Chamber Slides*" (Thermo Scientific) para mantener su morfología en cultivo durante el análisis inmunocitoquímico. En ambos casos, se fijaron las células con PFA 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente y se permeabilizaron con 1% Triton X-100 (Sigma Aldrich), seguido de lavados de PBS-T (0.1% Tween-20 en PBS). Posteriormente, se bloquearon las muestras con una solución de suero de cabra al 4% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y se incubaron con los anticuerpos primarios contra acrosina, DAZL o VASA (Abcam) en una dilución 1:300 en 1% suero de cabra en PBS a 4°C durante la noche. Tras esto, las muestras fueron lavadas en PBS-T y subsecuentemente incubadas con los anticuerpos secundarios marcados con distintos fluoróforos (Invitrogen) en una dilución 1:1,000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se montaron los cubres con medio de montaje ProLong Gold antifade



reagent con DAPI (Invitrogen) y se examinaron mediante microscopía de fluorescencia.

**Inmunocitoquímica sobre extensiones nucleares.** Las células fueron resuspendidas en tampón hipotónico (30 mM Tris (Sigma Aldrich), 50 mM Sacarosa (Sigma Aldrich), 17 mM ácido cítrico (Sigma Aldrich), 5 mM EDTA (Invitrogen), 2 tabletas de Complete Mini (Roche); pH 8.2) e incubadas durante 30 minutos en hielo para expandir sus núcleos. Posteriormente, fueron depositadas en portaobjetos mediante Cytospin (Thermo Scientific) tal y como se ha descrito anteriormente. Tras lavarse con PBS, las muestras fueron permeabilizadas con 0.04% photoflo (Kodak) y bloqueadas contra uniones inespecíficas durante 1 hora con una solución de bloqueo consistente en 4% suero de cabra, 1% BSA en PBS-T. Se incubaron conjuntamente durante 3 horas a temperatura ambiente un anticuerpo primario policlonal producido en conejo anti-SCP3 (Novus Biologicals) en una dilución 1:1,000, y un anticuerpo policlonal producido en ratón anti-CENPA (del inglés CENtromere Protein A) (Milipore) en una dilución 1:500. Tras la incubación, las muestras fueron lavadas con PBS-T y posteriormente incubadas con anticuerpos secundarios conjugados producidos en cabra contra conejo Alexa 594 y contra ratón Alexa 488 (Invitrogen) en una dilución 1:1,000 durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se montaron los cubres con el medio de montaje ProLong Gold antifade reagent con DAPI (Invitrogen).

### **3.3.- Citometría de flujo.**

#### *3.3.1.- Marcaje inmunocitoquímico de células para citometría de flujo.*

Las suspensiones unicelulares obtenidas tras procesar las muestras de biopsia testicular fueron fijadas en PFA 1% durante 20 minutos a 4°C y lavadas con 1% BSA en PBS. Para el análisis inmunocitoquímico de marcadores de superficie, las células fueron incubadas en 100 µL de una solución 1% BSA en PBS que contenía los anticuerpos conjugados contra C-KIT-PE (1:50) (R&D Systems) y SSEA-1-FITC (1:50) (BD Biosciences) en hielo durante 30 minutos. Para el marcaje intracelular de VASA, las células fueron permeabilizadas en 250 µL de tampón con saponina Perm/Wash 1X (BD Biosciences) y posteriormente marcadas con el anticuerpo policlonal contra VASA producido en cabra (R&D Systems) en una dilución 1:100 en el mismo tampón durante 45 minutos en hielo. Como anticuerpo secundario se utilizó uno contra las cadenas pesadas de las Ig G (Inmunoglobulinas G) de cabra producido en conejo y unido al fluoróforo Cy5 (Jackson ImmunoResearch Laboratory) en una dilución 1:500. Finalmente, se utilizó un citómetro modelo Cytomics FC500 (Beckman-Coulter) y el software FlowJo v7.6.1 (Tree Star Inc.) para el análisis de datos.

### 3.3.2.- Separación celular por contenido de DNA.

Para la separación celular según su contenido de DNA mediante FACS, las células fueron tripsinizadas y filtradas a través de membranas de nylon con un tamaño de poro de 30  $\mu\text{m}$  para a continuación ser fijadas con etanol al 70% durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ser fijadas, fueron lavadas con PBS y subsecuentemente incubadas en una solución de tinción del DNA compuesta por 0.2 mg/mL RNasa A (Sigma Aldrich) y 0.02 mg/mL Ioduro de Propídio (PI, del inglés Propidium Iodide) (Invitrogen) en tampón Perm/Wash (BD Biosciences) durante 30 minutos a 37°C antes de ser procesadas en un FACS Aria II (BD Biosciences).

### 3.4.- Análisis de ploidía celular mediante FISH.

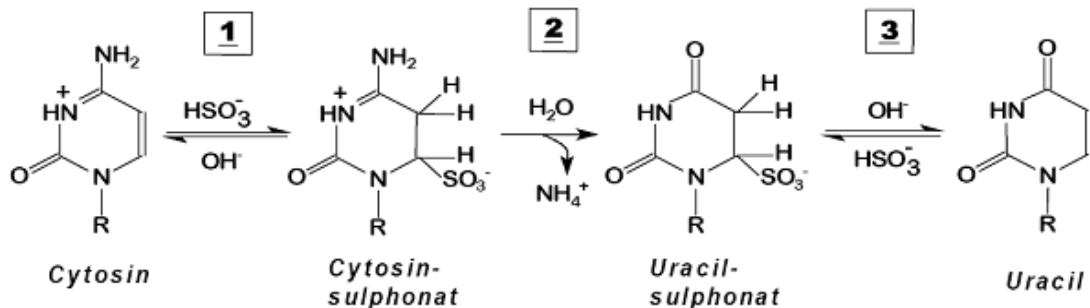
Las poblaciones celulares separadas mediante FACS fueron recolectadas en portaobjetos mediante Cytospin como se ha descrito anteriormente. Las células en los portaobjetos fueron fijadas con Carnoy (1 parte de ácido acético por cada 3 partes de metanol) durante 5 minutos y secadas al aire. Para la eliminación del ruido de fondo que podría causar el citoplasma celular, las muestras fueron tratadas con 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  pepsina en 0.01N HCl durante 5 minutos a 37°C antes de ser lavadas con PBS y deshidratadas en baños de etanol al 70%, 80% y 100% a -20°C. Para la hibridación *in situ*, se

usaron sondas centroméricas fluorescentes (Vysis) contra los cromosomas 16 (verde) y 18 (rojo) que se desnaturalizaron conjuntamente sobre las muestras a 85°C durante 10 minutos y se dejaron hibridar durante 24 horas a 37°C en oscuridad. Tras la hibridación, las muestras fueron desnaturalizadas en baños de 50% formamida en tampón 2X SSC (del inglés Saline-Sodium Citrate) a 43°C y posteriormente en tampón 2X SSC a 43°C durante 5 minutos cada uno. Finalmente, se montaron los cubres con el medio de montaje ProLong Gold antifade reagent con DAPI (Invitrogen) y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia.

### **3.5.- Análisis epigenético mediante secuenciación por bisulfito.**

El DNA genómico de las células fue extraído siguiendo las instrucciones del fabricante del kit QIAamp DNA Mini (Qiagen) y aproximadamente 100 ng de DNA genómico extraído fueron modificados con sales de bisulfito, las cuales convierten las Citosinas no metiladas del DNA en Uracilos (Fig. 13), mediante el kit Epiect Bisulfite (Qiagen) según las instrucciones del fabricante. Un µL del DNA modificado por bisulfito fue sometido a PCR con cebadores específicos para el promotor del gen maternamente improntado *H19* (Park et al, 2009 ). El mix de PCR consistió en 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM

dNTPs, 10 pmol de cada cebador, y 1 unidad de polimerasa Platinum Taq (Invitrogen), mientras que el programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 minutos, seguida de 45 ciclos de 94°C, 30 segundos; 58°C, 30 segundos; y 72°C, 30 segundos. La secuencia de los cebadores empleados es la que sigue: hH19F 5'-TGTATAGTATATGGGTATTTTTGGAGGTTT-3', hH19R 5'-TCCTATAAATATCCTATTCCCAAATAACC-3'.



**Figura 13.** Representación gráfica de la conversión química de las Citosinas no metiladas del DNA genómico en Uracilos mediante la exposición de éste a sales de bisulfito. Este proceso consta de los tres pasos 1: Sulfatación; 2: des-aminación hidrolítica y 3: des-sulfatación alcalina. Todo el proceso ocurre en condiciones ácidas y sólo se da en las Citosinas libres, ya que en las metiladas el grupo metilo las protege del ataque nucleofílico del bisulfito.

Los productos resultantes de las reacciones de PCR fueron aislados de un gel de agarosa al 1% mediante el kit Qiaquick gel extraction (Qiagen) y clonados en vectores TOPO-TA (Invitrogen). Al menos 20 clones por muestra fueron secuenciados mediante el uso del ABI BigDye v3.1 en el sistema ABI PRISM 3730xl (Applied Biosystems) de secuenciación de DNA por capilares. Las secuencias

resultantes fueron alineadas mediante el software Geneious (Biomatters) y el análisis de metilación de las islas CpG se realizó mediante el software by BiQ Analyzer (Max Planck Institut Informatik).

### **3.6.- Análisis estadístico.**

En el análisis estadístico de la expresión de marcadores germinales en muestras de biopsia testicular se empleó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar los grupos. Cuando las diferencias inter-grupos fueron significativas, se aplicó el test de Mann-Whitney para encontrar diferencias significativas para cada uno de los parámetros estudiados entre grupos. Por su parte, en el análisis estadístico de la expresión génica de los diferentes marcadores germinales en las células sometidas a diferenciación *in vitro* se empleó el ANOVA de un factor y el test t de Student. En todos los casos, para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el software Statistical Package for Social Sciences v17.0 (SPSS Inc.) y se consideraron significativas las diferencias con un p-valor < 0.05.

**V**

# **RESULTADOS**

*“El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.”*

Albert Einstein (1879-1955) Científico alemán nacionalizado estadounidense.





## **1.- ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS MARCADORES GERMINALES c-KIT, SSEA-1 Y VASA EN BIOPSIAS TESTICULARES DE PACIENTES CON AZOOSPERMIAS SECRETORAS Y OBSTRUCTIVAS.**

En la primera etapa de la realización de esta tesis doctoral fue necesaria la puesta a punto de diversas técnicas para las que se utilizaron biopsias testiculares humanas como controles positivos de los diversos marcadores germinales que posteriormente se usarían en la diferenciación in vitro de células germinales a partir de líneas de células madre pluripotentes humanas. Sin embargo, a medida que se empezaron a tener resultados de este estudio piloto, se empezaron a ver posibilidades diagnósticas basadas en el análisis cuantitativo de expresión de algunos de los marcadores analizados en los distintos grupos de biopsias testiculares que obtuvimos. De este modo, lo que en un principio iba a ser la simple validación de varios anticuerpos, sondas y cebadores diseñados para detectar la expresión de marcadores germinales en biopsias testiculares, derivó en un análisis comparativo de los marcadores germinales c-KIT, SSEA-1 y VASA en biopsias testiculares de pacientes con azoospermias secretoras y obstructivas. Los resultados de este estudio fueron publicados en Mayo de 2010 y a continuación se presentan sus principales hallazgos (Medrano et al, 2010).

En este estudio, la expresión de los marcadores germinales c-KIT y VASA fue determinada cuantitativamente a nivel molecular mediante RT-PCR y RT-qPCR, además de mediante citometría de flujo en conjunto con SSEA-1 en biopsias testiculares procedentes de pacientes sometidos a tratamientos de reproducción asistida en el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI). Las 23 biopsias que se emplearon en este estudio fueron clasificadas en grupos según su diagnóstico anatómo-patológico como se describe en la sección de MATERIALES Y MÉTODOS en a) Azoospermias obstructivas control (OC), (n=11); b) Azoospermias secretoras con problemas de maduración espermática (MA), (n=5); c) Azoospermias secretoras en pacientes mosaico de síndrome de solo células de Sertoli (SCO SPZ+), (n=3); y d) Azoospermias secretoras en pacientes con síndrome de solo células de Sertoli (SCO SPZ-), (n=4).

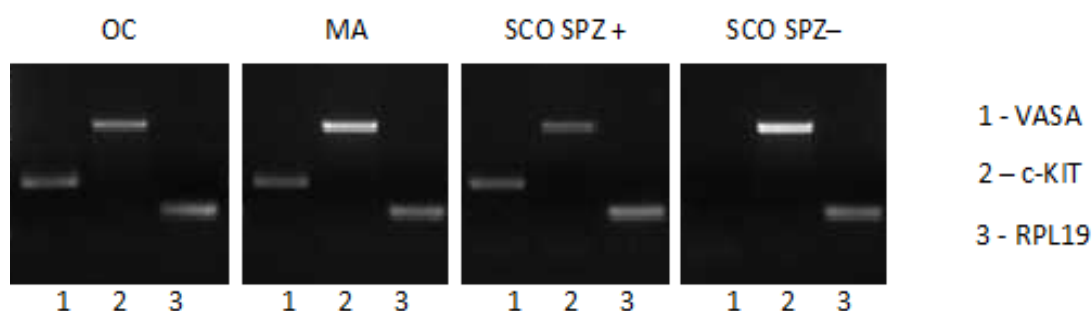
Los datos epidemiológicos de los pacientes involucrados en este estudio se pueden observar en la Tabla I:

GRUPO	EDAD	FSH	TESTOSTERONA	PROLACTINA
Valores de referencia	35 – 44 años	4-13 ng/ml	3-10.6 ng/ml	1.6-18.7 ng/ml
Controles obstructivos (OC) (n=11)	42.63 +/- 1.56	4.58 +/- 0.46	4.57 +/- 0.14	10.27 +/- 2.34
Arresto de maduración (MA) (n=5)	38.20 +/- 1.81	14.45 +/- 0.48	5.75 +/- 0.88	10.4 +/- 0.55
SCO mosaicos (SCO SPZ+) (n=3)	38.00 +/- 2.25	30.50 +/- 2.43	3.36 +/- 0.35	15.20 +/- 1.25
SCO no mosaicos (SCO SPZ-) (n=4)	35.67 +/- 0.44	28.23 +/- 3.55	3.25 +/- 0.45	8.57 +/- 0.08

**Tabla 1.** Datos epidemiológicos de los pacientes involucrados en este estudio. Los valores considerados normales para FSH son 4-13 ng/mL; para Testosterona son 3-10.6 ng/mL; y para Prolactina son 1.6-18.7 ng/mL. Los datos están presentados como la media +/- SEM.

### 1.1.- Análisis molecular de expresión.

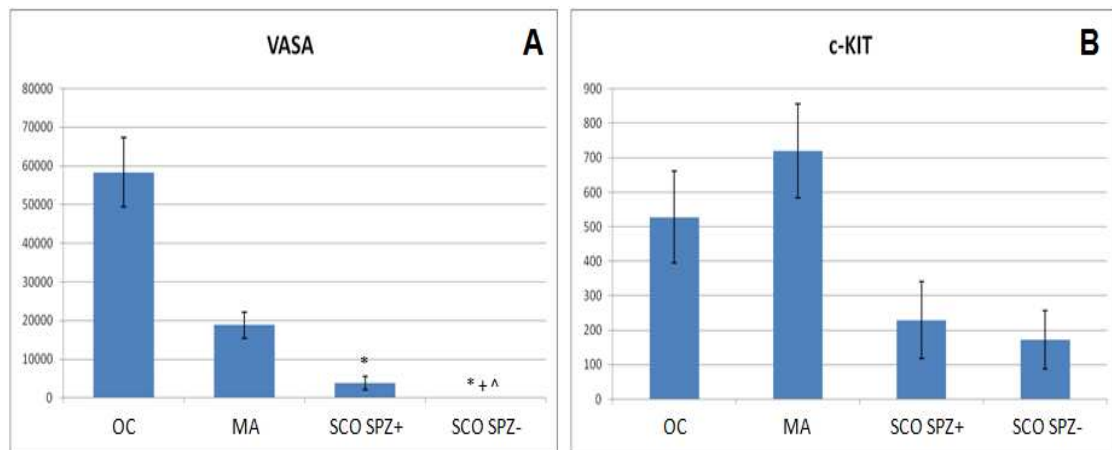
En un primer análisis cualitativo mediante RT-PCR, la intensidad de las bandas de los productos de VASA y c-KIT resultó ser claramente diferente entre grupos, indicando diferencias en el nivel de expresión. Además, no se encontró expresión de VASA en el grupo SCO SPZ-, debido a la total ausencia de células germinales en esas muestras (Fig. 14).



**Figura 14.** Visualización de las bandas correspondientes a los productos de PCR de VASA, c-KIT y RPL19 en un gel de agarosa al 1%.

En el posterior análisis cuantitativo mediante RT-qPCR se observó una expresión significativamente menor de VASA en los grupos SCO SPZ+ ( $3874.78 \pm 1752.63$ ) y SCO SPZ- ( $5.89 \pm 1.61$ ) comparado con los controles obstructivos ( $58324.84 \pm 8937.86$ ) ( $p=0.016$  y  $p=0.004$ , respectivamente), indicativo de una menor contribución de la línea germinal a la población celular componente de la muestra (Fig. 15A). Es destacable que el grupo MA solo mostró valores significativamente mayores de expresión de VASA ( $18851.40 \pm$

3346.92) cuando se comparó con las muestras del grupo SCO SPZ- ( $p=0.014$ ), pero no al compararlo con el grupo SCO SPZ+, lo cual puede ser a consecuencia de que en las zonas de los túbulos seminíferos en las que los SCO mosaicos mantienen la espermatogénesis la expresión de VASA llega a niveles comparables a los observados en los pacientes MA. Además, el grupo SCO SPZ+ mostró valores de expresión relativa de VASA significativamente superiores al grupo SCO SPZ- ( $p=0.034$ ), demostrándose la utilidad de VASA como marcador cuantitativo capaz de discernir entre SCO mosaicos y no mosaicos. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la expresión de VASA entre los grupos OC y MA, así como en la expresión de c-KIT (Fig. 15B).

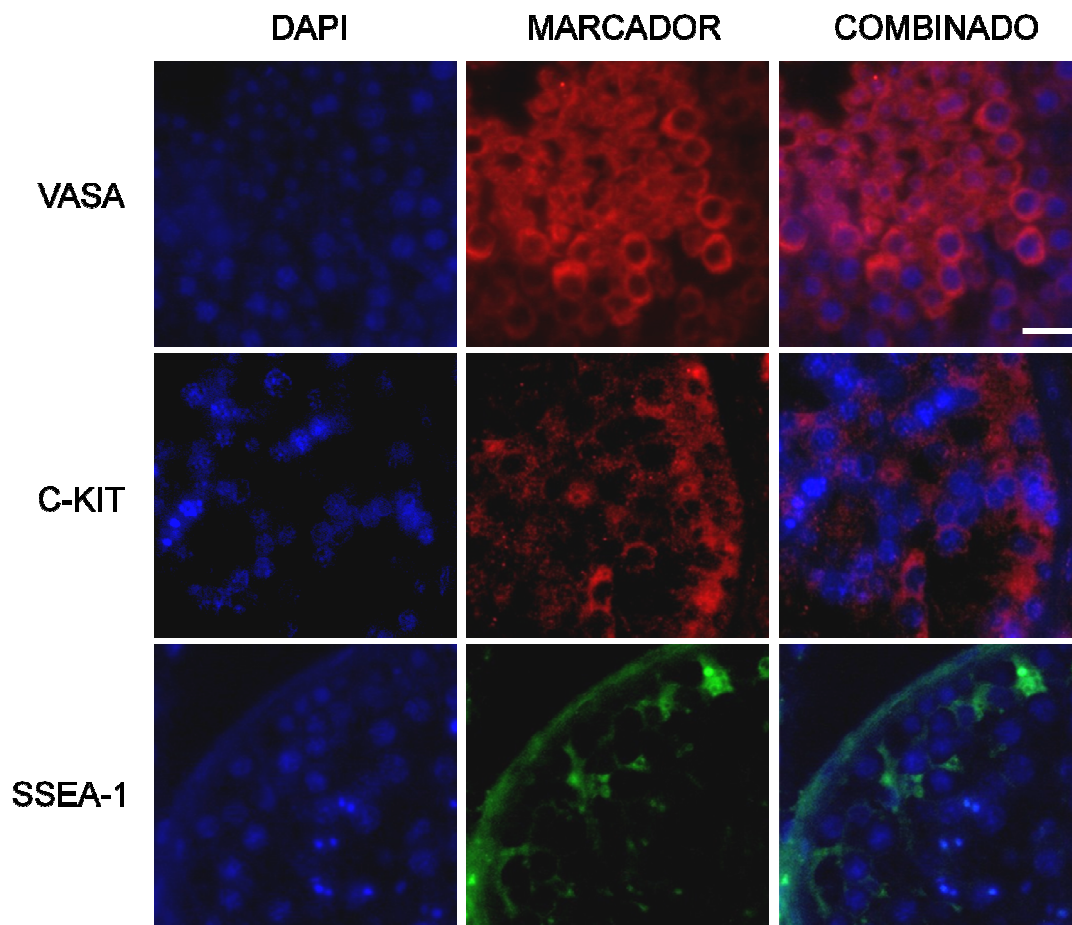


**Figura 15.** Expresión relativa de **(A)** VASA y **(B)** c-KIT en los cuatro grupos de biopsias testiculares. Las diferencias significativas con respecto al grupo de controles obstructivos (OC) están indicadas mediante el símbolo “\*”; las diferencias significativas con respecto al grupo de arresto de maduración (MA) están indicadas mediante el símbolo “+”; y las diferencias significativas con respecto al grupo SCO SPZ+ están indicadas mediante el símbolo “^”. La expresión relativa de cada marcador fue normalizada con respecto al gen ribosomal RPL19 mediante el método  $2^{-\Delta Ct}$ . Los datos están presentados como la media +/- SEM.

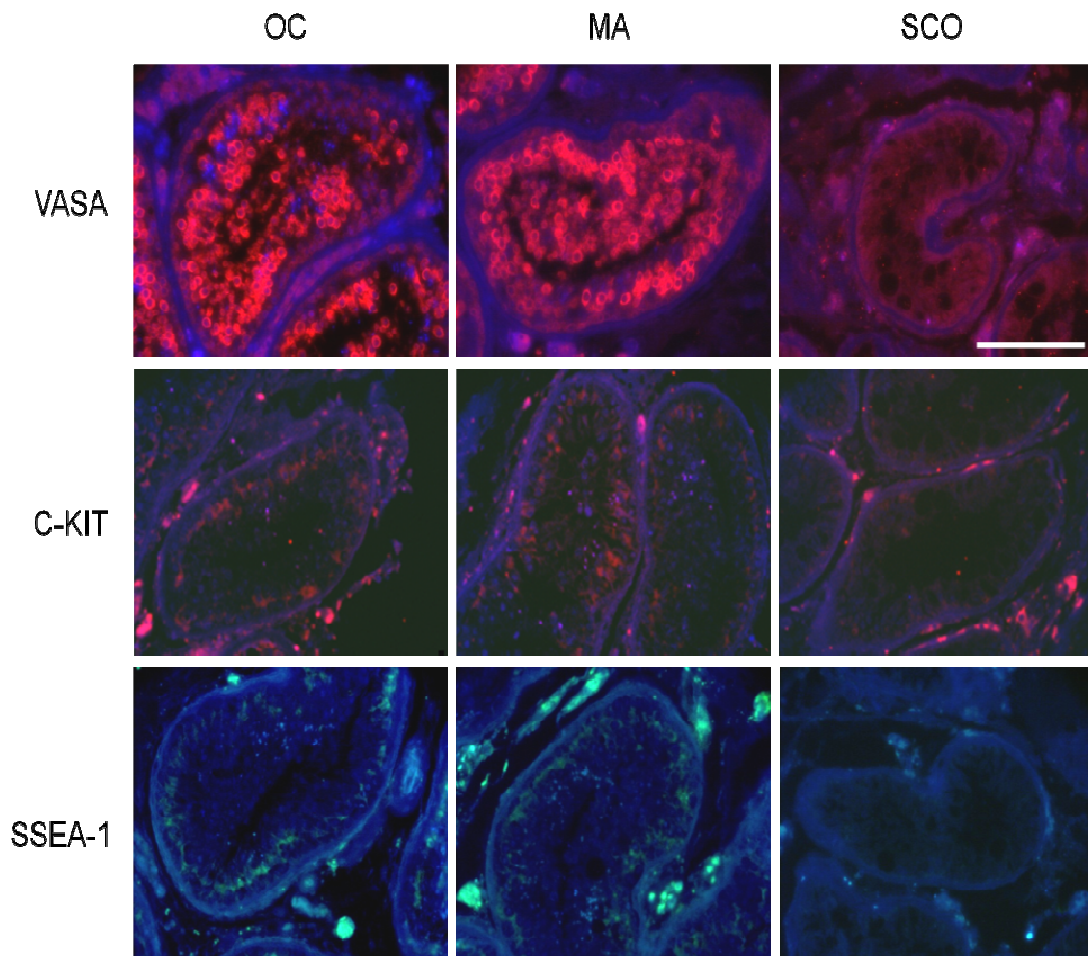
## **1.2.- Análisis inmunohistoquímico.**

Mediante técnicas inmunohistoquímicas se detectó la expresión de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 en muestras representativas de cada uno de los grupos de patologías (Fig. 16). En estas muestras, la expresión de VASA se localizó específicamente en el citoplasma de todas las células germinales dentro de los túbulos seminíferos, mientras c-KIT presentó un marcaje de membrana en las espermatogonias comprendidas en estadios de maduración I-III. Por su parte, solo se observó expresión de SSEA-1 en la superficie de las espermatogonias más inmaduras dentro de los túbulos seminíferos.

Posteriormente se procedió al análisis de la expresión de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 en muestras representativas de cada uno de los grupos de patologías (Fig. 17). De esta manera, se observó como VASA y SSEA-1 no se expresaban a nivel de proteína en las muestras de SCO, mientras que c-KIT solo se expresaba en las células de Leydig en el espacio intersticial de los túbulos seminíferos. Por su parte, no se observaron diferencias significativas de expresión de los tres marcadores en muestras obstructivas control y MA.



**Figura 16.** Marcaje inmunohistoquímico de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 en muestras de biopsias testiculares obstructivas control (OC). VASA se expresa específicamente en el citoplasma de todas las células germinales de los túbulos seminíferos, siendo por tanto un marcador indicativo de la aportación total de la línea germinal al conjunto de células que componen el testículo. Por su parte, la expresión de c-KIT se da solo en las espermatogonias I-III, siendo por tanto marcador de estadios pre-meióticos. Finalmente, la expresión de SSEA-1 queda restringida a la población de espermatogonias más inmaduras del túbulo seminífero. Las barras de escala representan una distancia de 10  $\mu$ m.

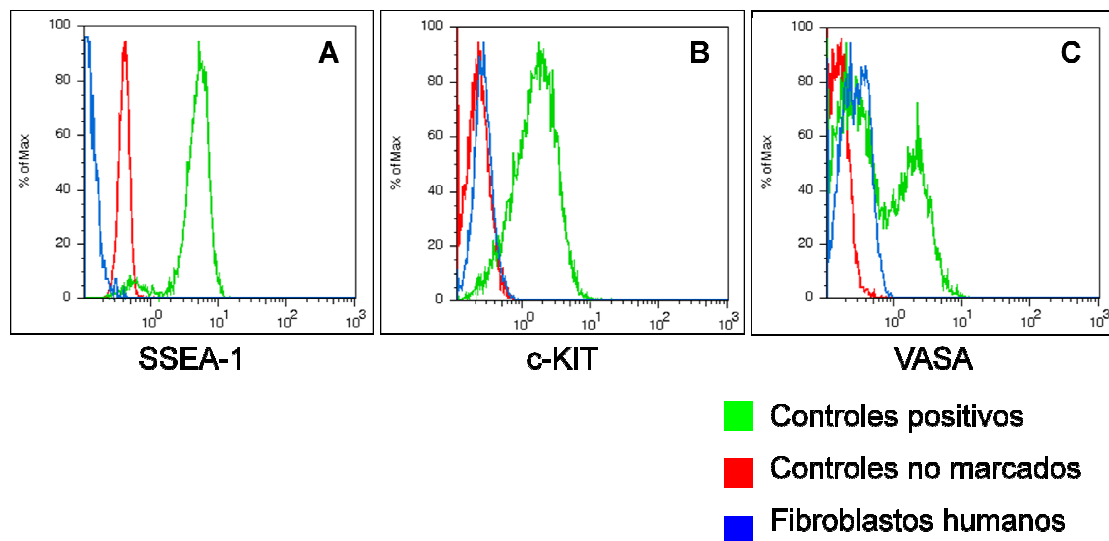


**Figura 17.** Marcaje inmunohistoquímico de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 en muestras de biopsias testiculares obstructivas control (OC), con arresto en la maduración espermática (MA) y con síndrome de sólo células de Sertoli (SCO). Debido a la total ausencia de espermatogénesis, VASA y SSEA-1 no se expresaban a nivel de proteína en las muestras de SCO, mientras que c-KIT solo se expresaba en las células de Leydig en el espacio intersticial de los túbulos seminíferos. No se observaron diferencias significativas de expresión de los tres marcadores en muestras MA con respecto a lo observado en las OC. Las barras de escala representan una distancia de 100  $\mu$ m.



### 1.3.- Análisis mediante citometría de flujo.

Para la validación de la inmuno-especificidad de los anticuerpos empleados, se usaron la línea celular MALME-3M (control positivo para c-KIT), granulocitos de sangre periférica (control positivo para SSEA-1) y células germinales procedentes de la biopsia testicular de pacientes fértiles sometidos a vasectomía (control positivo para VASA). Como controles negativos se usaron en todos los casos células de cultivos primarios de fibroblastos procedentes de prepucio humano (*foreskin*) (Fig. 18).

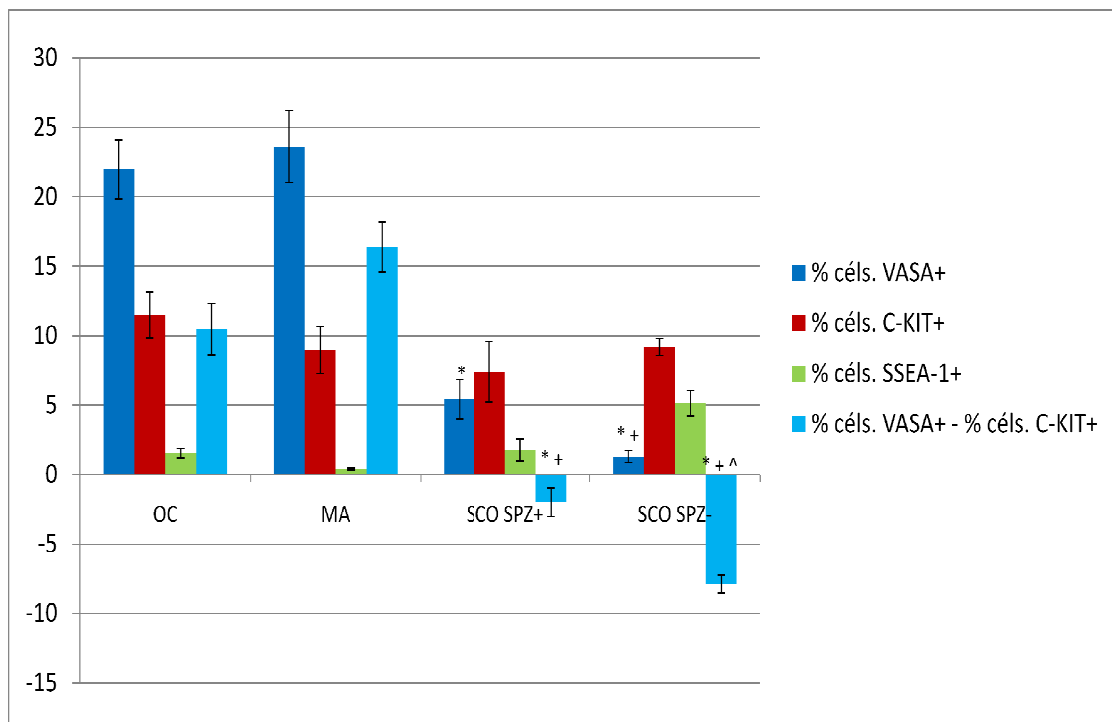


**Figura 18.** Histogramas de la validación de los anticuerpos empleados por citometría de flujo. **(A)** Para SSEA-1, se emplearon como controles positivos granulocitos de sangre periférica; **(B)** Para c-KIT, los controles positivos fueron células MALME-3M; **(C)** Para VASA, se emplearon como controles positivos biopsias obstructivas control. En todos los casos, se usaron como controles negativos fibroblastos humanos y los mismos controles positivos sin marcar con los anticuerpos.

El análisis mediante citometría de flujo también reveló diferencias significativas entre los grupos de muestras en lo referente al porcentaje de células VASA+. Mediante el test de Mann-Whitney se concluyó que el porcentaje de células VASA+ era estadísticamente menor en las muestras SCO SPZ+ (5.41 +/- 1.44) y SCO SPZ- (1.29 +/- 0.43) que en las muestras control OC (21.96 +/- 2.14) ( $p=0.039$  y  $p=0.004$ , respectivamente). A su vez, reforzando los datos vistos mediante RT-qPCR, el porcentaje de células VASA+ en el grupo MA (23.62 +/- 2.60) resultó ser significativamente superior comparándolo con el grupo SCO SPZ- ( $p=0.014$ ), pero no con el grupo SCO SPZ+. Sin embargo, en contraposición a lo visto en RT-qPCR, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células VASA+ al comparar los dos grupos SCO. Por otra parte, los porcentajes de células positivas para SSEA-1, c-KIT y dobles positivas para ambos, resultaron ser similares entre grupos.

Para analizar si habían diferencias significativas en el porcentaje de células meióticas y post-meióticas entre las distintas patologías con las que trabajamos, se creó un nuevo parámetro artificial que las representara que llamamos VASA-KIT mediante la sustracción del porcentaje de células c-KIT+ al porcentaje de células VASA+. Mediante la aplicación de este parámetro a los resultados, se detectaron valores significativamente superiores en las muestras OC (10.46 +/- 1.85) que en las SCO SPZ+ (-2.00 +/- 1.01) y SCO SPZ- (-7.88 +/- 0.66) ( $p=0.035$  y  $p=0.019$ , respectivamente). Valores

significativamente mayores de VASA-KIT fueron también observados en las muestras MA (16.37 +/- 1.79) al compararlas con ambos grupos SCO ( $p=0.034$  y  $p=0.021$ , respectivamente). Interesantemente, mediante la aplicación de este parámetro se encontraron valores representativos de las células meióticas y post-meióticas que han superado la fase de espermatogonia en la espermatogénesis significativamente mayores en el grupo SCO SPZ+ que en el SCO SPZ- ( $p=0.034$ ) (Fig. 19).



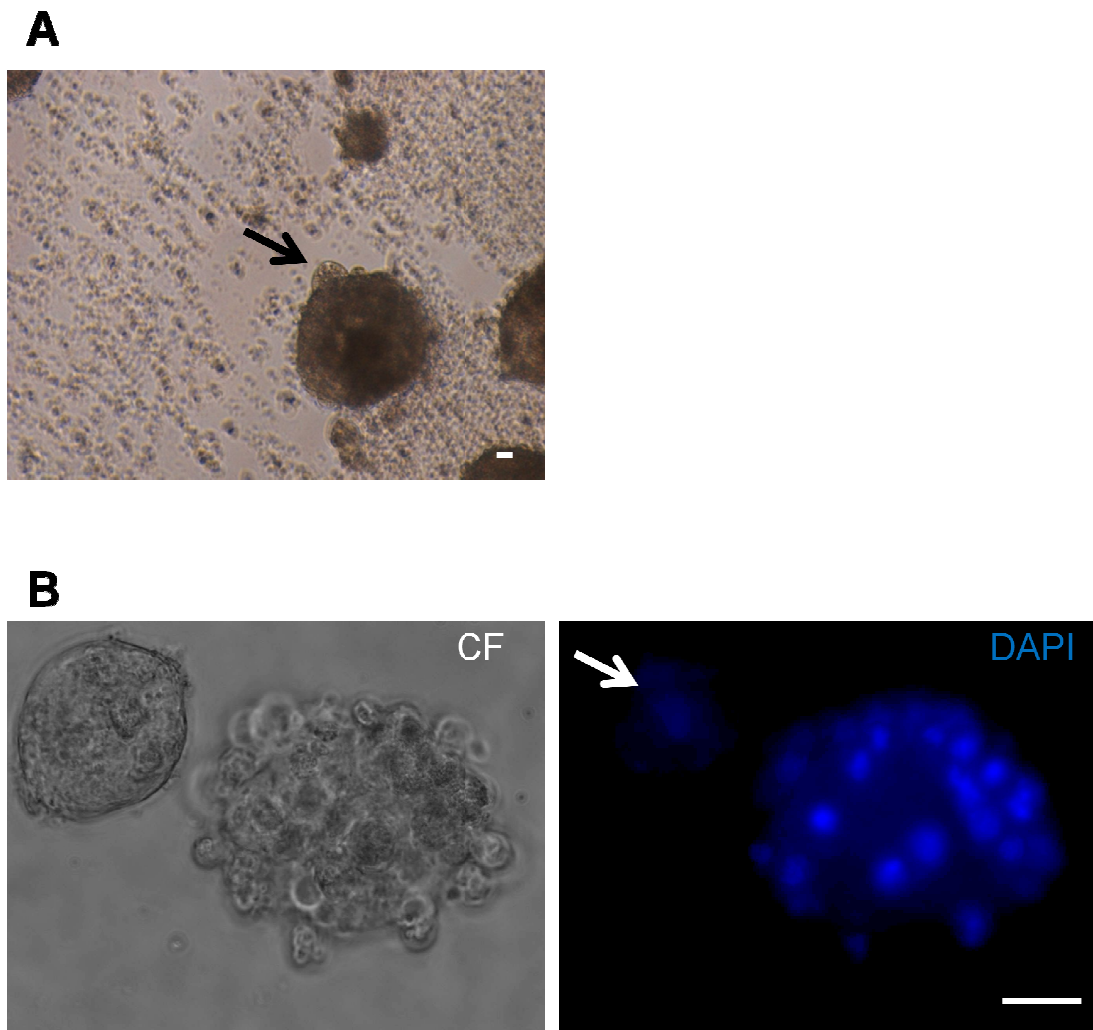
**Figura 19.** Porcentaje de las células positivas para VASA, c-KIT, SSEA-1 y el parámetro VASA-KIT encontradas en el análisis por citometría de flujo de los distintos grupos de patologías de biopsias testiculares. Las diferencias significativas con respecto al grupo de controles obstructivos (OC) están indicadas mediante el símbolo “\*”; las diferencias significativas con respecto al grupo de arresto de maduración (MA) están indicadas mediante el símbolo “+”; y las diferencias significativas con respecto al grupo SCO SPZ+ están indicadas mediante el símbolo “^”. Los datos están presentados como la media +/- SEM.

## **2.- SOBREEXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN AL RNA DAZL Y VASA PARA LA INDUCCIÓN DE LA MADURACIÓN MEIÓTICA DE CÉLULAS GERMINALES INMADURAS OBTENIDAS *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS.**

Tras finalizar el estudio preliminar comparativo de marcadores germinales en biopsias testiculares humanas y analizar la importancia de algunos marcadores como VASA en la maduración de la línea germinal, se procedió a la ejecución del principal objetivo del proyecto de establecer un modelo de diferenciación *in vitro* de células germinales post-meióticas a partir de células pluripotentes humanas.

En base a algunos trabajos previamente publicados donde se demostraba que el co-cultivo con células de la granulosa (Qing et al, 2007), células secretoras de BMP4 (Toyooka et al, 2003), o incluso el empleo de medio condicionado por cultivos primarios de testículo (Lacham-Kaplan et al, 2006) o líquido folicular (Dyce et al, 2006) propiciaba los factores necesarios para inducir la formación de células germinales a partir de células madre pluripotentes *in vitro*, se procedió a una primera aproximación para la obtención de células germinales *in vitro* fue mediante co-cultivo de la líneas hESC con el tejido testicular procedente de las biopsias testiculares humanas.

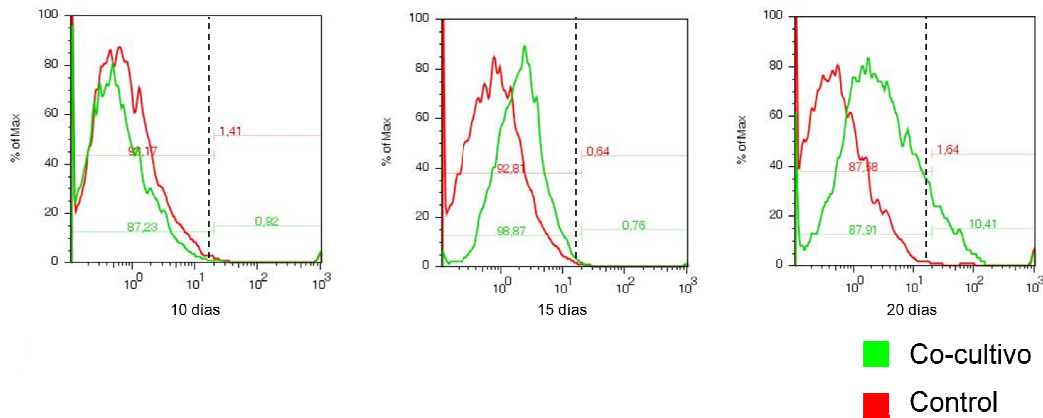
Sin embargo, a pesar de probar diferentes aproximaciones mediante co-cultivo indirecto en suspensión (EBs) y monocapa, así como co-cultivo directo, los resultados que se observaron distaron mucho de lo esperado. Entre los resultados más destacados, se observaron en el modelo de co-cultivo indirecto en suspensión la aparición de estructuras similares a ovocitos (OLCs) que eran excluidas de la superficie de los EBs tanto en las condiciones de co-cultivo como sin co-cultivo a partir de la primera semana de diferenciación (Fig. 20A). Estas OLCs fueron aisladas y analizadas mediante tinción con DAPI para ver si se trataba de estructuras unicelulares o no. Observamos que, efectivamente, se trataba de estructuras unicelulares muchas veces rodeadas de varias células más pequeñas formando estructuras similares a folículos (Fig. 20B). Sin embargo, no detectamos la expresión de ningún marcador germinal mediante RT-PCR, por lo que no se llegó a una conclusión clara (datos no mostrados).



**Figura 20.** Morfología de las OLCs observadas en el modelo de co-cultivo indirecto en suspensión. **(A)** OLC siendo extruida de un EB de la línea H9 en día 7 de co-cultivo. **(B)** Tinción con DAPI de las OLCs aisladas. Como se observa, algunas OLCs resultaron ser células únicas, mientras que otras eran racimos celulares que envolvían una OLC. Las barras de escala representan una distancia de 10  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, mediante citometría de flujo se pudo observar un aumento en el porcentaje de células VASA+ en el modelo de co-cultivo indirecto en suspensión a lo largo del tiempo con respecto a los controles en los que la misma línea celular se ponía a diferenciar en suspensión sin co-cultivo (10.41% versus 1.54% de los controles),

indicando que el tejido testicular podría actuar induciendo un mayor número de células a diferenciarse a células germinales (Fig. 21). Sin embargo, estos resultados resultaron ser muy poco reproducibles, por lo que nuevamente los experimentos fueron no concluyentes.



**Figura 21.** Histogramas representativos del aumento del porcentaje de células VASA+ a lo largo del tiempo en las células sometidas a co-cultivo indirecto en suspensión de hasta un 10.41% con respecto al 1.54% de los controles sin co-cultivo.

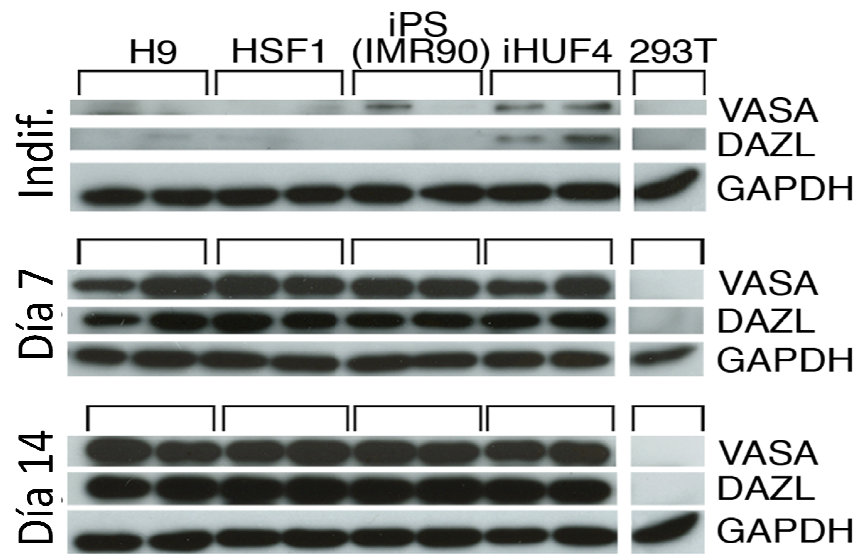
Debido a la baja reproducibilidad de los resultados, se decidió cambiar de modelo de diferenciación y centrar la atención en el papel de las proteínas de unión al RNA como posibles reguladores de la meiosis.

## **2.1.- Las iPSCs son una fuente alternativa equiparable a las hESCs para la obtención de células germinales *in vitro*.**

Tomando como referencia el modelo previamente publicado de diferenciación de células germinales *in vitro* mediante sobreexpresión ectópica de los genes de la familia *DAZ* *DAZ2*, *DAZL* y *BOULE* en líneas de hESCs (Kee et al, 2009), el proyecto se centró en la capacidad de las hiPSCs para diferenciarse en células germinales y llevar a cabo la meiosis. Este trabajo se realizó durante una estancia en la Universidad de Stanford en California, USA, y los resultados de esta colaboración fueron publicados en Diciembre de 2010 (Panula et al, 2011). Este estudio ha sido el primero en el que se ha demostrado la capacidad de generar células germinales haploides a partir de líneas iPSC humanas.

En primer lugar, se estudió la capacidad intrínseca de las líneas de iPSCs humanas IMR90 (46, XX) y iHUF4 (46, XY) para formar células germinales espontáneamente en monocapa mediante su inducción con BMP4 (100 ng/mL) mediante la detección de expresión de VASA y DAZL por Western blot a diferentes tiempos de diferenciación y se comparó con las líneas hESC H9 (46, XX) y HSF1 (46, XY) (Fig. 22).

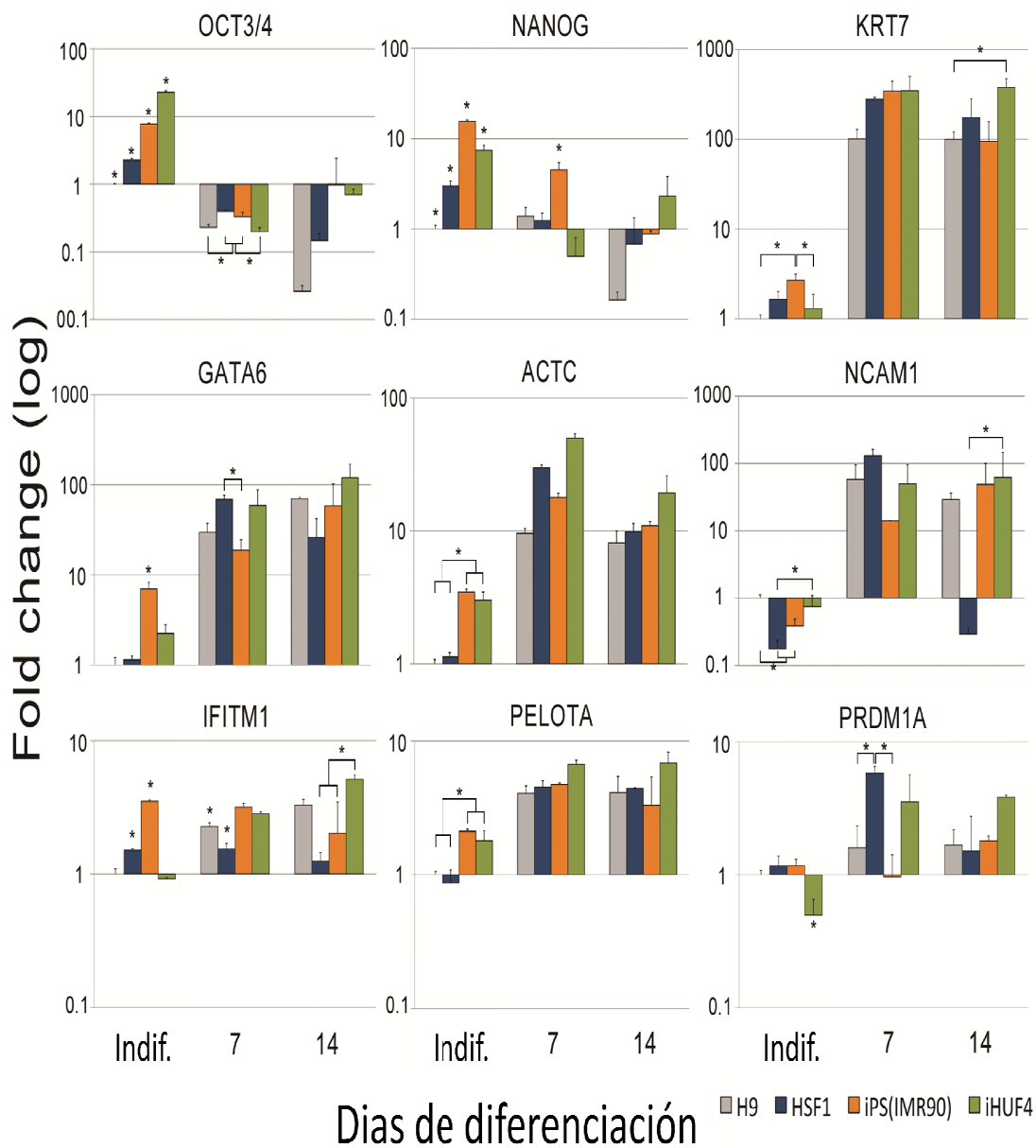




**Figura 22.** Análisis mediante Western blot de la expresión de VASA y DAZL en las líneas indiferenciadas y sometidas a diferenciación espontánea en monocapa con BMP4 100 ng/mL durante 7 y 14 días. En todas las líneas observamos un aumento significativo de la expresión de VASA y DAZL, demostrándose su capacidad intrínseca de formar células germinales *in vitro*. Se empleó GAPDH como control de carga y la línea celular de riñón humano 293T como control negativo para VASA y DAZL. Como se puede observar, todas las muestras se analizaron por duplicado.

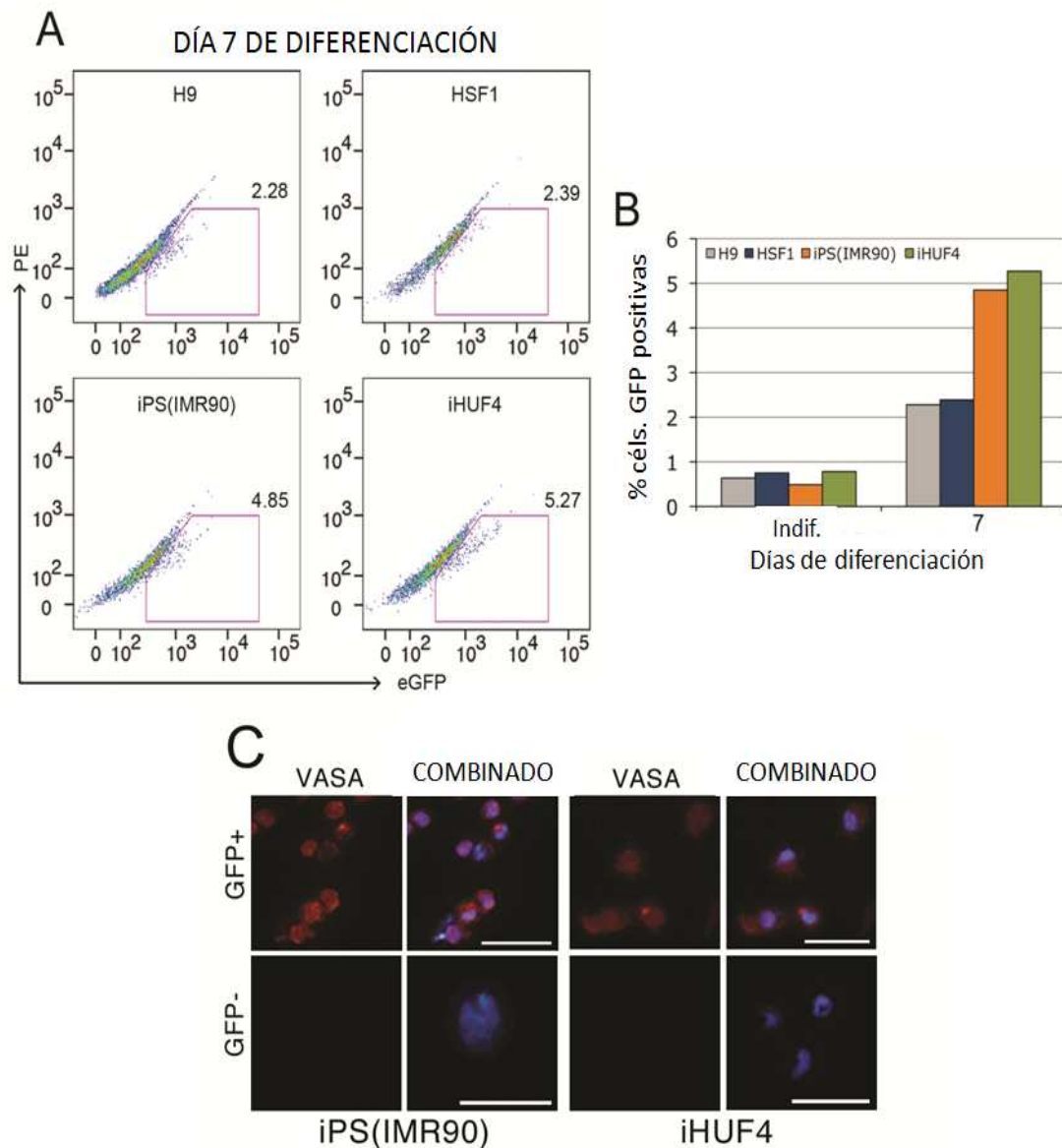
Tras esto, se analizaron los perfiles de expresión genética de las cuatro líneas celulares a nivel de mRNA mediante RT-qPCR tras 7 y 14 días de diferenciación espontánea (Fig. 23). Mediante este análisis se observó cómo la expresión de los factores de pluripotencia OCT4 y NANOG tenían un nivel de expresión significativamente mayor en las líneas iPSC en comparación con las hESC en estado indiferenciado, pero estos niveles disminuían hasta valores similares con la diferenciación espontánea de las líneas. Por otra parte, todas las líneas demostraron poseer similar potencial de

diferenciación mediante la detección de niveles similares de expresión de marcadores de las tres capas embrionarias ectodermo (NCAM1, del inglés Neural Cell Adhesion Molecule 1), mesodermo (ACTC1, del inglés Alpha Cardiac muscle 1) y endodermo (GATA6), así como de trofoectodermo (KRT7, del inglés KeRaTin 7). Respecto a los marcadores germinales analizados PRDM1A, IFITM1 y PELOTA, se observó un aumento significativo de su expresión con la diferenciación de las líneas de una manera similar en todas ellas. Aun así, es remarcable que la expresión de IFITM1 o PELOTA era significativamente mayor en las líneas iPSC en estado indiferenciado.



**Figura 23.** Análisis de la expresión génica de las cuatro líneas celulares a nivel de mRNA mediante RT-qPCR tras 7 y 14 días de diferenciación espontánea. Los datos se muestran como expresión relativa respecto a los niveles de expresión de cada marcador en las células H9 indiferenciadas (fold change) en escala logarítmica y fueron normalizados respecto a los genes *housekeeping* GAPDH y RPLPO. Los datos están presentados como la media +/- SEM. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Una vez demostrada la capacidad de las líneas iPSC para formar células germinales *in vitro*, con el fin de comparar su eficiencia con las líneas hESC, se construyó un vector de expresión lentiviral VASA-GFP, el cual permite la detección de las células VASA+ mediante la expresión de una proteína eGFP bajo el control del promotor de VASA que se expresa sólo cuando éste está transcripcionalmente activo. De esta manera, se transdujeron las líneas celulares con este vector, fueron sometidas a diferenciación espontánea durante 7 días, y analizadas mediante FACS (Fig. 24A). Sorprendentemente, se observó que mientras la eficiencia de las líneas hESC H9 y HSF1 resultó ser similar con un porcentaje de células VASA-GFP+ de 2.28 y 2.39% respectivamente, en las líneas iPSC IMR90 y iHUF4 resultó ser más del doble con unos porcentajes de células VASA-GFP+ de 4.85 y 5.27%, respectivamente (Fig. 24B). Estos resultados indican que, al menos en las líneas analizadas, las iPSC tienen igual o incluso mayor potencial para formar células germinales que las hESC *in vitro*. La especificidad del marcaje con GFP fue demostrada mediante inmunocitoquímica de las células separadas con anticuerpos específicos contra VASA, donde se observó que solo las células GFP+ se marcaron con VASA en un porcentaje superior al 80% (Fig. 24C).



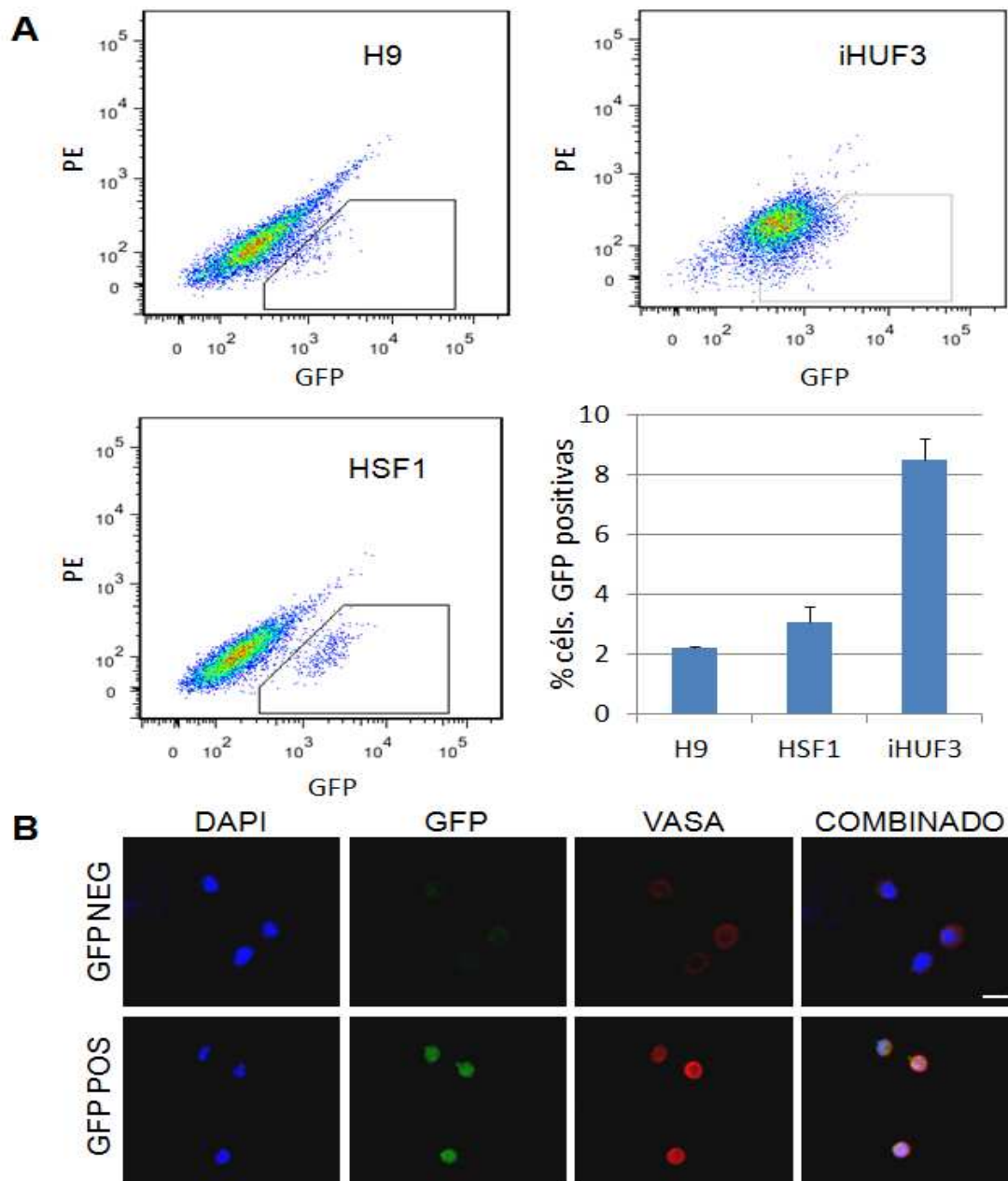
**Figura 24.** Análisis mediante FACS de las líneas celulares transducidas con el vector VASA-GFP tras 7 días de diferenciación espontánea en monocapa. **(A)** Para una separación celular más precisa, todas las células que se salían de la relación lineal de auto-fluorescencia en los canales rojo (PE, del inglés Phyco Eritrin) y verde (GFP) fueron consideradas GFP positivas, previa exclusión de posibles dobletes celulares. **(B)** Representación de los porcentajes de células VASA-GFP+ encontradas en las líneas indiferenciadas y sometidas a diferenciación durante 7 días. Los porcentajes se vieron incrementados hasta valores alrededor de 2.4% en ambas líneas hESC y cerca de 5% en el caso de las líneas iPSC. **(C)** Marcaje inmunocitoquímico para VASA sobre las poblaciones celulares GFP positivas y negativas obtenidas mediante FACS de las líneas de iPSCs. Las barras de escala representan una distancia de 50  $\mu$ m.

## **2.2.- Perfil de expresión de las células VASA positivas obtenidas mediante diferenciación espontánea *in vitro*.**

En siguientes experimentos, se volvió a analizar la eficiencia de diferentes líneas iPSCs en la formación de células germinales *in vitro* en comparación con las líneas hESC por FACS mediante el uso del vector lentiviral VASA-GFP. Los resultados de estos experimentos corroboraron la alta eficiencia de las líneas iPSC para formar espontáneamente células VASA-GFP+, como es el caso de la línea iHUF3 (46, XX). De esta manera, en las líneas hESC H9 y HSF1 que se emplearon como control se observaron nuevamente valores de células VASA-GFP positivas alrededor de 2.4% en ambas. Sin embargo, la eficiencia de la línea iHUF3 resultó ser aun mayor que lo observado en las líneas iHUF4 e IMR90 con valores de células VASA-GFP + cercanos al 8%. La expresión específica de VASA en la población de células GFP+ aislada volvió a demostrarse mediante inmunocitoquímica (Fig. 25).

El análisis de expresión molecular de las células separadas por FACS (Fig. 26A) confirmó su identidad germinal al verse cómo las poblaciones GFP positivas tenían niveles de expresión de VASA significativamente superiores que sus correspondientes poblaciones GFP negativas en cada línea celular. Además de VASA, las células GFP positivas también mostraron niveles de expresión significativamente

superiores de otros marcadores germinales como IFITM1, DAZL, PRDM1A, GCNF, GDF3, c-KIT y PELOTA.

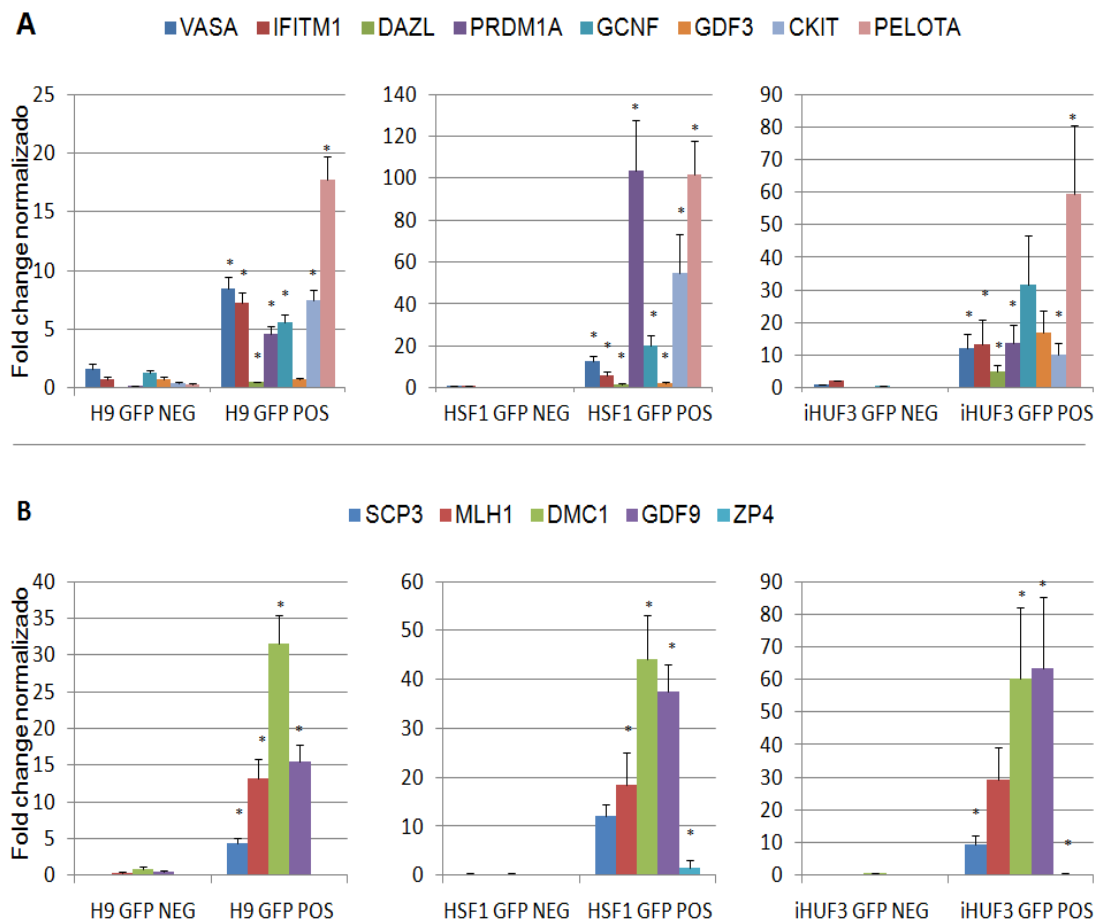


**Figura 25. (A)** Análisis mediante FACS de las líneas celulares transducidas con el vector VASA-GFP tras 7 días de diferenciación espontánea en monocapa y representación de los porcentajes de células VASA-GFP+. Los datos están presentados como la media  $\pm$  SEM. **(B)** Marcaje inmunocitoquímico para VASA sobre las poblaciones celulares GFP positivas y negativas obtenidas mediante FACS de las líneas de iPSCs. La barra de escala representa una distancia de 10  $\mu$ m.

Sin embargo, el resultado más interesante fue la detección de niveles de expresión significativamente superiores de marcadores germinales tardíos en las células GFP positivas (Fig. 26B). Tal fue el caso de los marcadores meióticos SCP3, MLH1 y DMC1 y de los marcadores de ovocitos GDF9 y ZP4. El hecho de que las células GFP positivas muestren niveles de expresión tan elevados de marcadores meióticos y de gametos maduros indica que posiblemente las células VASA positivas constituyan una población heterogénea de células germinales en avanzado estado de maduración con cierta evidencia de que parte de esas células han iniciado la meiosis.

En base a estos resultados, junto con anteriores evidencias de que ciertas proteínas de unión al RNA altamente conservadas en la línea germinal de todos los metazoos como la familia DAZ son capaces de inducir la meiosis de las células germinales derivadas a partir de hESCs *in vitro* (Kee et al, 2009; Panula et al, 2011), se hipotetizó que posiblemente la expresión de VASA sea necesaria para la iniciación de la meiosis y por tanto actúe de una manera similar como regulador de su iniciación. Los experimentos derivados de esta hipótesis condujeron a la publicación en Diciembre de 2011 de un tercer trabajo original derivado de los resultados experimentales de esta tesis doctoral (Medrano et al, 2011).





**Figura 26.** Análisis de la expresión genética de las células VASA-GFP positivas y negativas separadas por FACS. **(A)** Análisis de marcadores germinales tempranos pre-meióticos. **(B)** Análisis de marcadores germinales tardíos y meióticos. Los datos están presentados como la media +/- SEM. Los asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

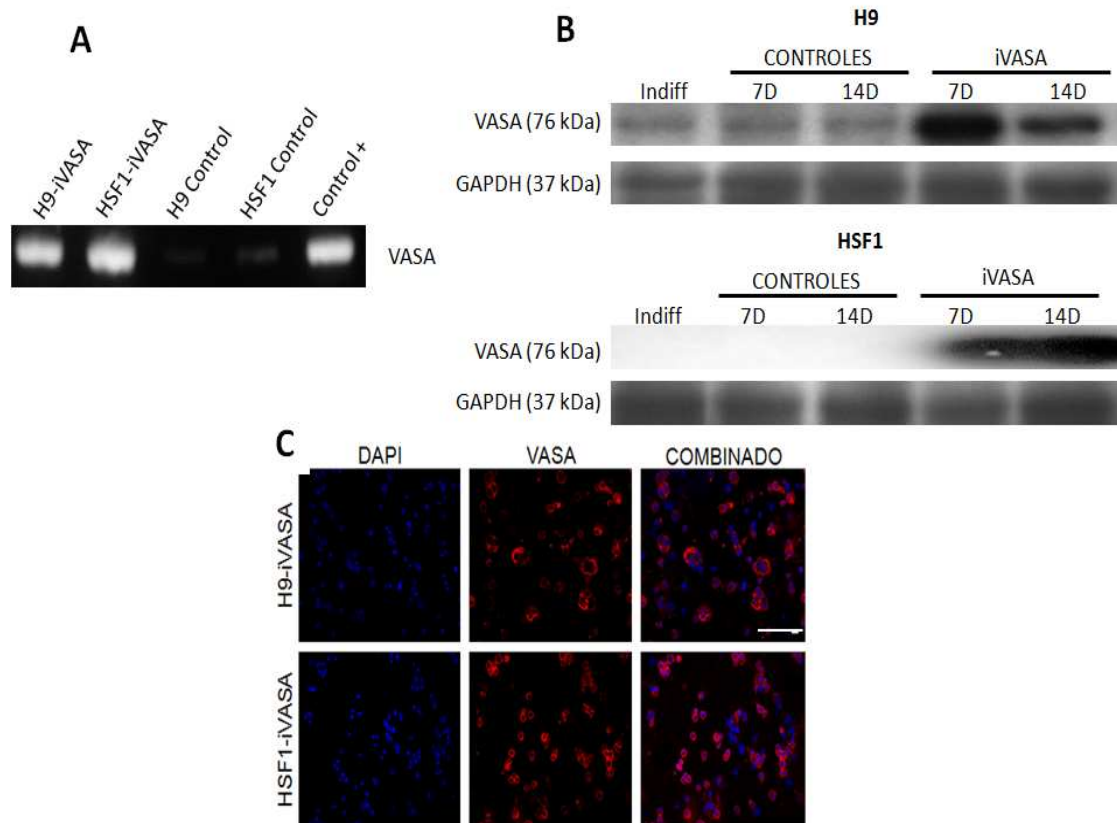
### 2.3.- La expresión ectópica de VASA induce la progresión meiótica en las células germinales obtenidas mediante diferenciación espontánea *in vitro*.

En base al avanzado perfil de maduración de las células germinales VASA positivas aisladas mediante FACS, se estudió cómo

la expresión ectópica de VASA en las líneas pluripotentes era capaz de alterar su dinámica de diferenciación en monocapa para formar células germinales *in vitro*.

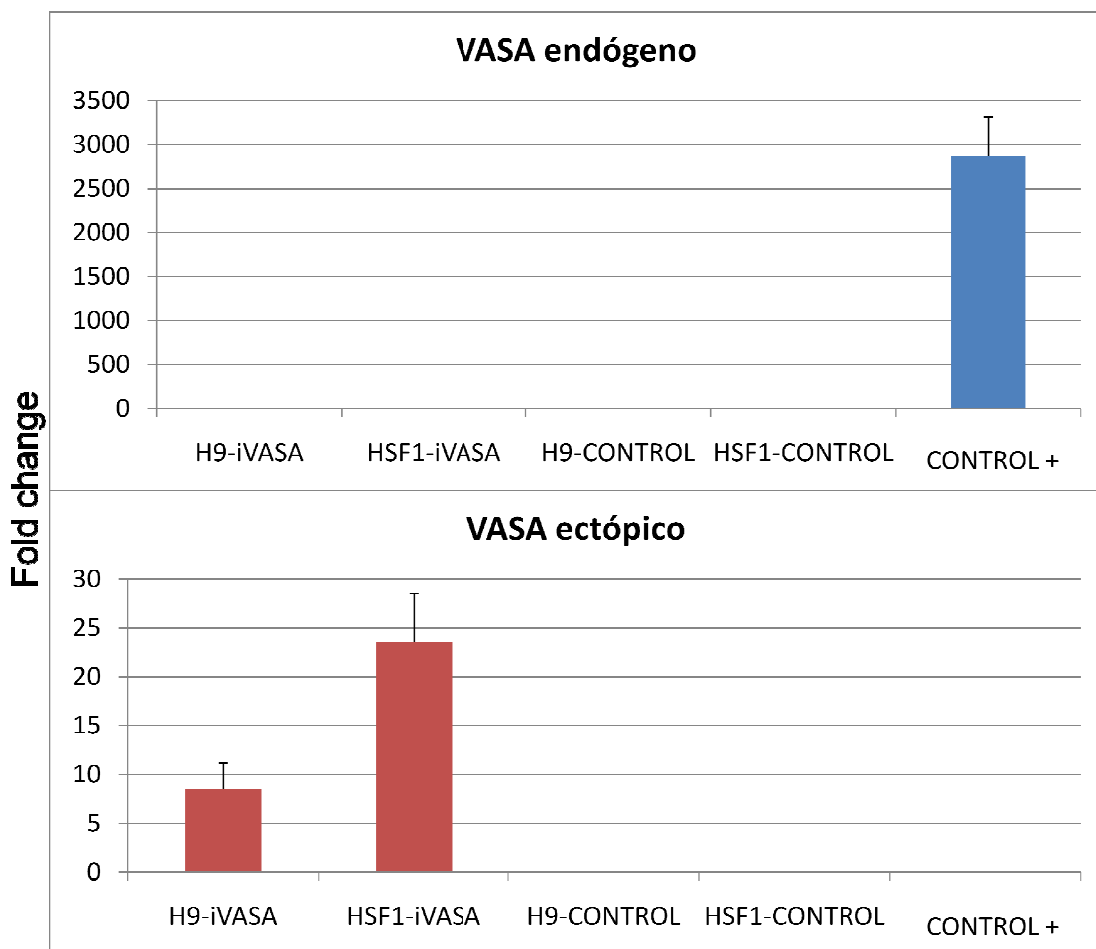
De esta forma, se aisló la secuencia codificadora de VASA a partir de muestras testiculares humanas mediante PCR y se clonó en un vector lentiviral bajo el control del promotor fuerte eucariota del EF1 $\alpha$ . Este vector lentiviral que se denominó iVASA (del inglés induced VASA) fue empleado posteriormente para la transducción de las líneas celulares pluripotentes.

La correcta expresión ectópica de VASA en las líneas transducidas fue demostrada tanto a nivel de mRNA mediante PCR (Fig. 27A) como a nivel de proteína mediante Western blot (Fig. 27B) y inmunocitoquímica (Fig. 27C). En todos los casos, se observó que a pesar de detectarse un silenciamiento activo, al menos el 75% de las células transducidas aun mantenían la expresión ectópica de VASA incluso tras dos semanas de diferenciación espontánea en monocapa.



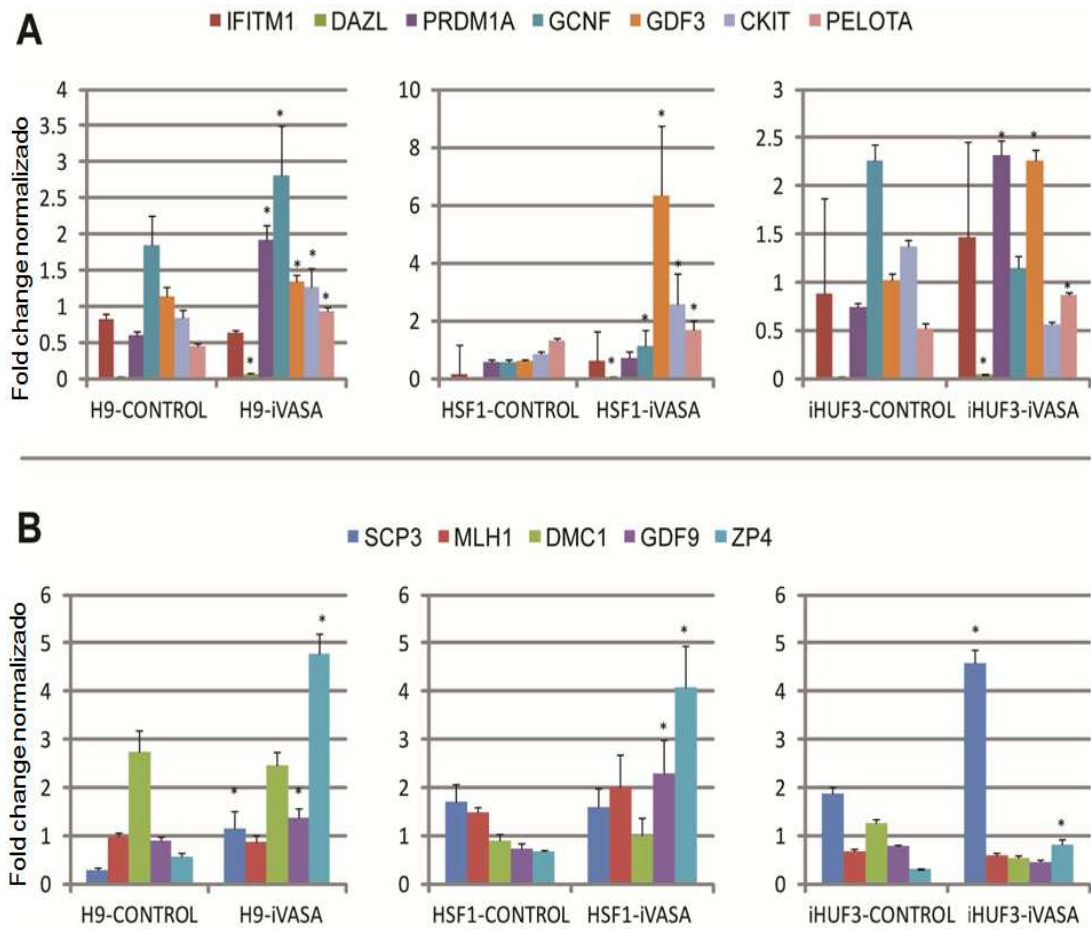
**Figura 27.** Caracterización de la expresión de VASA en las líneas transducidas y sometidas a diferenciación espontánea. **(A)** Análisis de la expresión de VASA a nivel de mRNA mediante RT-PCR tras 14 días de diferenciación espontánea en monocapa. cDNA de testículo humano fue empleado como control positivo. **(B)** Análisis de la expresión de VASA a nivel de proteína mediante Western blot tras 7 y 14 días de diferenciación espontánea en monocapa. La detección de VASA resultó en una proteína de 76 kDa, tal y como se esperaba. La detección de GAPDH se empleó como control de carga. **(C)** Detección de la expresión citoplásmica de VASA mediante inmunocitoquímica sobre células recogidas mediante Cytospin tras 7 días de diferenciación. La barra de escala representa una distancia de 50  $\mu\text{m}$ .

Adicionalmente, mediante el empleo de cebadores diseñados específicamente para discernir entre la expresión de VASA endógeno o ectópico, se comprobó que su expresión en las líneas era debida a la inducción ectópica, con niveles muy elevados comparables a los encontrados en los testículos que se usaron como controles positivos (Fig. 28).



**Figura 28.** Cuantificación de la expresión endógena y ectópica de VASA mediante RT-qPCR. cDNA obtenido a partir de testículos humanos fue empleado como control positivo. La expresión de VASA endógeno resultó ser prácticamente nula en todas las muestras, excepto en los testículos humanos. Por su parte, se observó un aumento de expresión de VASA ectópico en las muestras transducidas respecto a los controles de entre 8 y 23 veces. cDNA de testículo humano fue empleado como control positivo. Los datos están presentados como la media +/- SEM.

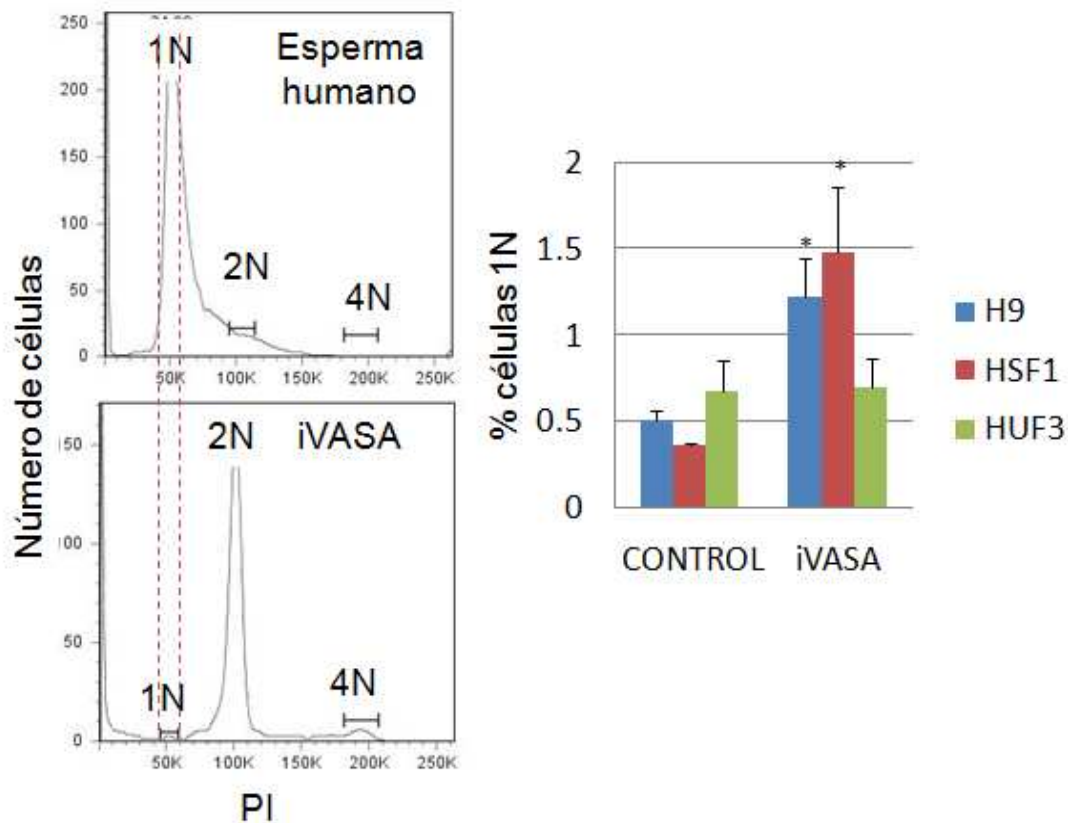
Tras la caracterización inicial de las líneas diferenciadas con expresión ectópica de VASA (iVASA), se analizó su perfil de expresión para diferentes marcadores germinales mediante RT-qPCR (Fig. 29). Los perfiles de expresión genética de las células iVASA resultaron ser diferentes de sus respectivos controles formados por células diferenciadas transducidas con el vector vacío. En general, las células iVASA mostraron una expresión significativamente superior de los marcadores germinales analizados tanto tempranos como tardíos, de manera similar a como se había observado anteriormente al comparar las células VASA-GFP positivas y negativas. Estos resultados indicaron que probablemente la expresión ectópica de VASA estaba induciendo la maduración gamética de las células germinales que se habían formado mediante diferenciación espontánea a partir de las líneas pluripotentes.



**Figura 29.** Comparación de los perfiles de expresión genética entre las células transducidas con VASA (iVASA) y sus respectivos controles no transducidos. **(A)** Análisis de marcadores germinales tempranos pre-meióticos. **(B)** Análisis de marcadores germinales tardíos y meióticos. Los datos están presentados como la media +/- SEM. Los asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Para indagar si la expresión ectópica de VASA era capaz de inducir la progresión meiótica de las células germinales obtenidas *in vitro* de manera efectiva, se indagó en el estudio de la formación de células haploides en nuestros cultivos celulares. Para ello, tras 14 días de diferenciación espontánea, se marcaron las células con Ioduro de Propídeo (PI) y las separamos mediante FACS según su

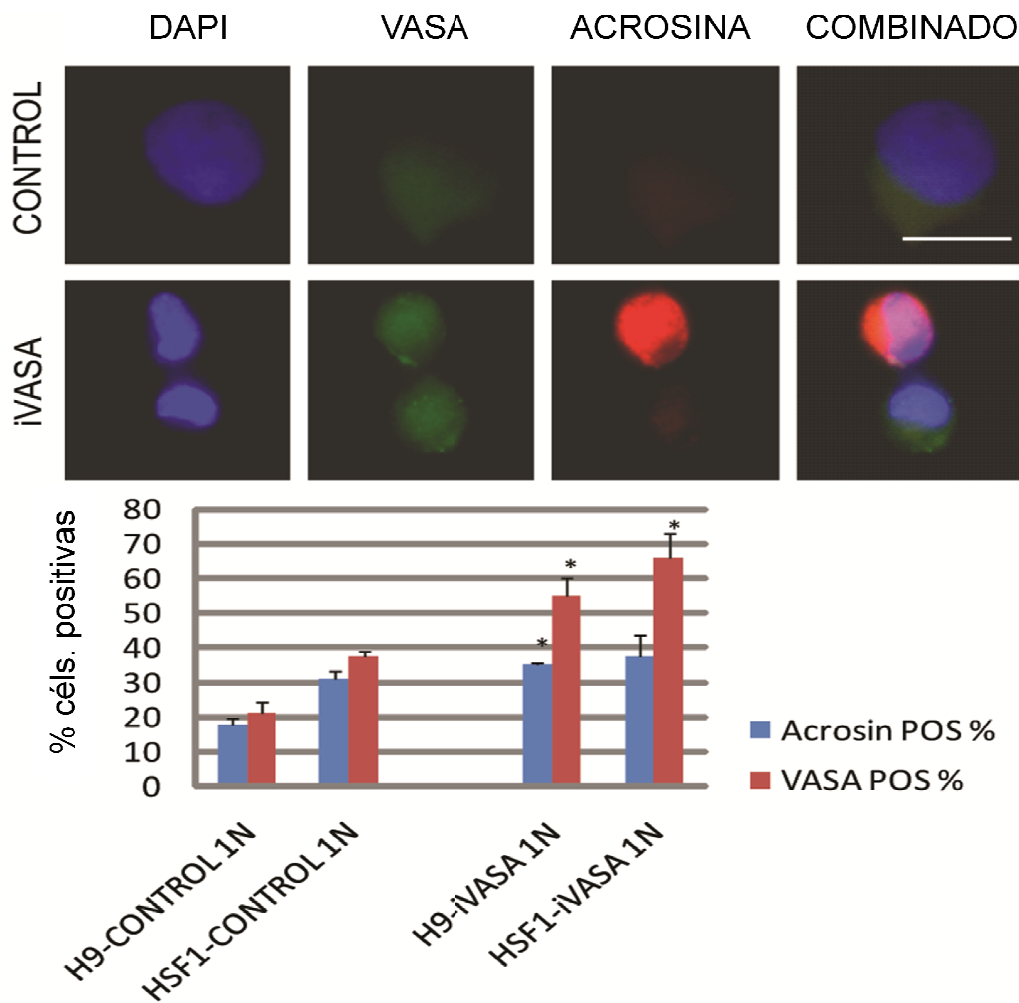
contenido de DNA con el fin de aislar la población celular supuestamente haploide (Fig. 30). Tras excluir el posible *debris* celular, los histogramas de citometría procedentes de este experimento mostraron pequeños pero evidentes picos de células supuestamente haploides (1N) que se correspondieron con un incremento significativo de células aisladas en la zona 1N (en dos de las tres líneas celulares estudiadas) en las poblaciones de células iVASA.



**Figura 30.** Histogramas representativos de la separación de células mediante FACS según su contenido de DNA y porcentajes de células 1n aisladas a partir de cada línea celular. Muestras de esperma humano fueron usadas como control para identificar la zona del histograma correspondiente a las células haploides 1N. Los datos están presentados como la media +/- SEM. Los asteriscos representan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

En la posterior caracterización de las células 1N aisladas mediante FACS, se estudió nuevamente la expresión de VASA mediante inmunocitoquímica y su co-localización con la acrosina, otro marcador específico de espermátidas y espermatozoides maduros (Fig. 31). De esta manera, se observó que, dentro de la población 1N aislada mediante FACS, alrededor de un 55-65% de las células iVASA mantenían la expresión de VASA frente al 20-40% de los controles. Sin embargo, lo más llamativo fue la observación de que alrededor de un 35% de las células iVASA 1N además co-expresaban el marcador acrosina frente al 20-30% de los controles, indicando una mayor eficiencia en la maduración de las células germinales cuando VASA se está expresando. Interesantemente, la expresión de acrosina, un marcador específico de células germinales maduras masculinas, fue similar en las células germinales 1N obtenidas a partir de líneas de distinto sexo, lo cual apoya la hipótesis de que el nicho celular gonadal puede tener un control importante en la determinación del sexo de las células germinales (Byskov, 1986).

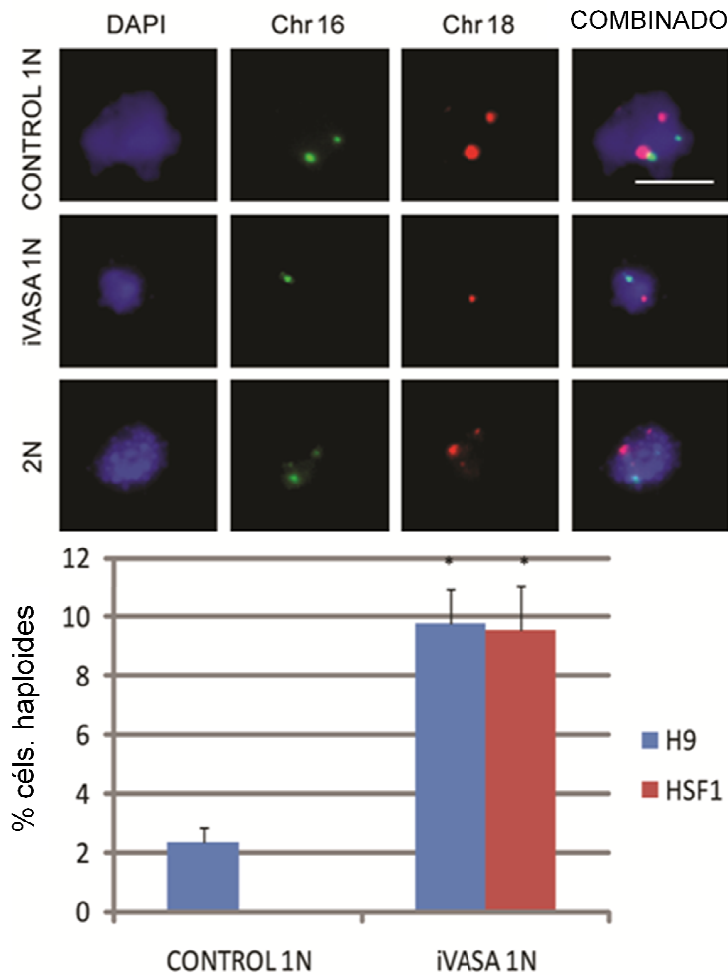




**Figura 31.** Co-localización citoplásmica de la expresión de VASA (verde) y acrosina (rojo) en las células supuestamente haploides separadas mediante FACS y porcentaje resultante del recuento de células positivas para cada marcador. La barra de escala representa una distancia de 10  $\mu$ m. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. Los datos están presentados como media  $\pm$  SEM de experimentos por triplicado.

Finalmente, se analizó la ploidía de las células aisladas 1N mediante FISH, empleando sondas marcadas contra los cromosomas 16 y 18, con el fin de averiguar qué porcentaje efectivo era realmente haploide (Fig. 32). De esta manera, comprobamos que efectivamente una parte de las células supuestamente haploides que

fueron aisladas mediante FACS realmente lo eran. Además, el porcentaje de células haploides iVASA observado resultó ser de alrededor de un 10% para las dos líneas celulares analizadas en este experimento, frente a la práctica inexistencia de células haploides observada en los controles. Este aumento en el porcentaje de células haploides que se formaron fue un dato claramente indicativo de la función de VASA como regulador de la meiosis.



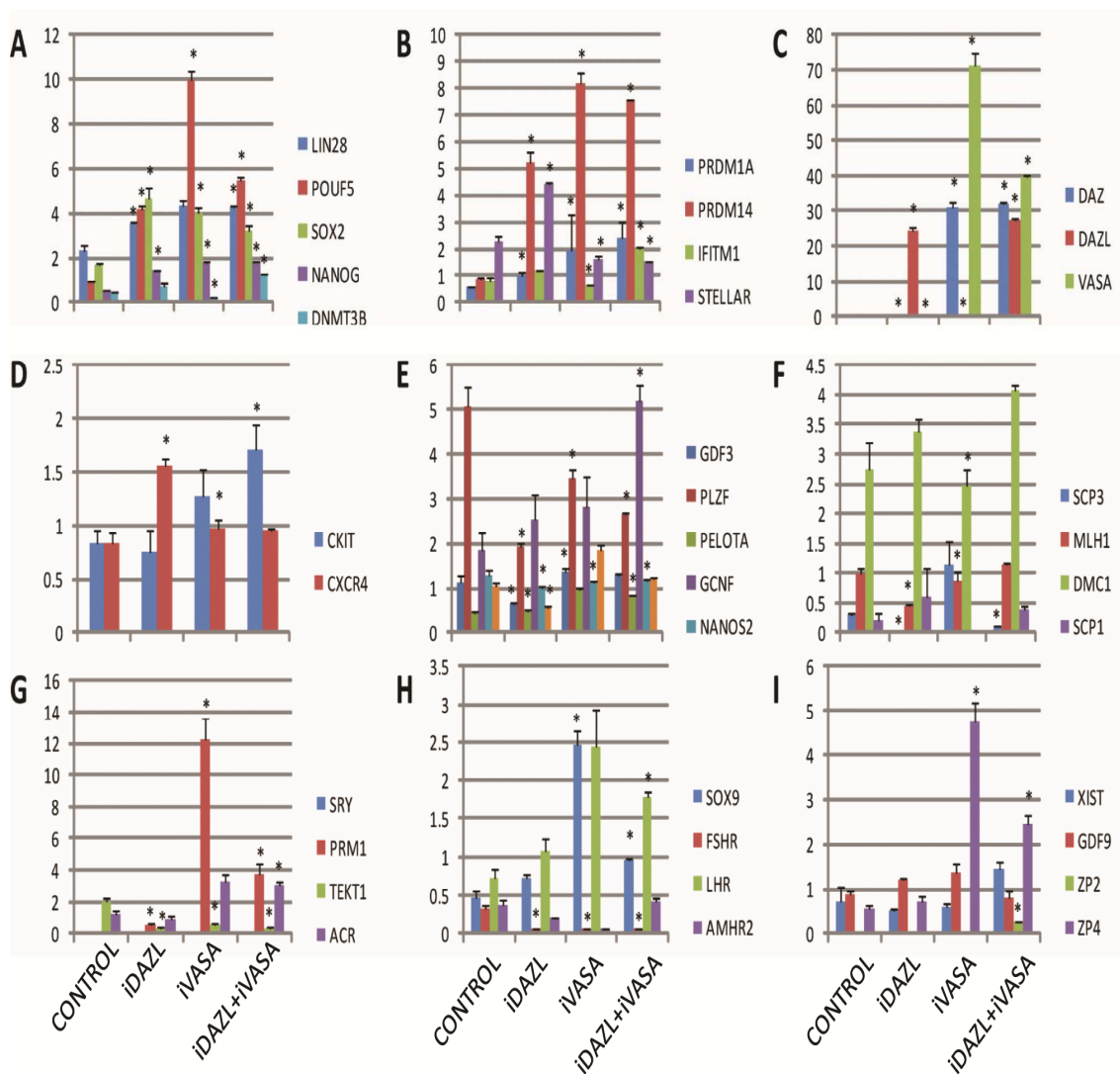
**Figura 32.** Resultados del análisis de ploidía de las células separadas por FACS mediante FISH con sondas contra los cromosomas 16 (verde) y 18 (rojo), así como porcentaje de células haploides encontradas en cada línea celular. La barra de escala representa una distancia de 10  $\mu$ m. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. Los datos están presentados como media  $\pm$  SEM de experimentos por triplicado.

## **2.4.- La sobreexpresión combinada de DAZL y VASA no tiene un efecto sinérgico en la maduración gamética.**

Tras comprobar el efecto de la expresión ectópica de VASA como regulador de la meiosis *in vitro*, se decidió comparar su eficiencia con la expresión ectópica de otra proteína de unión al RNA de demostrada importancia en la regulación meiótica como DAZL (Kee et al, 2009; Panula et al, 2011), así como la combinación de ambas.

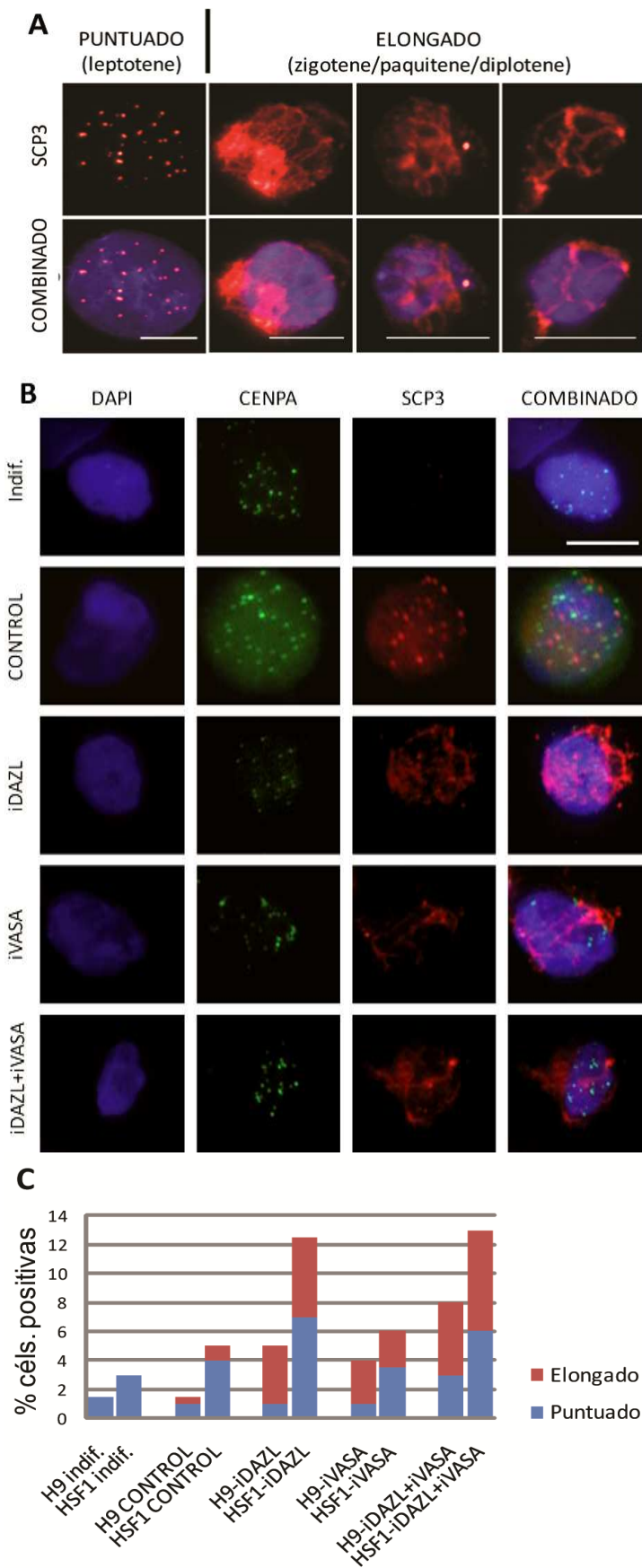
En el análisis cuantitativo de expresión genética mediante microfluidos se compararon los perfiles de expresión de una batería de marcadores germinales entre las muestras con sobreexpresión ectópica de DAZL (iDAZL), VASA (iVASA) y ambos (iDAZL+iVASA) respecto a muestras control que sufrieron el mismo tratamiento de diferenciación pero sin ningún tipo de manipulación genética. Para facilitar el análisis de los datos, se dividieron los marcadores estudiados en grupos según el estadio de desarrollo germinal en que su expresión es característica (Fig. 33). De esta manera, se observó que en todos los casos en que indujimos la expresión ectópica de DAZL+VASA había una expresión significativamente superior de los marcadores OCT4 (POUF5), LIN28, SOX2, NANOG, DNMT3B, BLIMP1 (PRDM1A), PRDM14, FRAGILIS (IFITM1), STELLAR, DAZ, DAZL, VASA (*DDX4*), PELOTA, GCNF, SCP3, PRM1 y ZP4 en comparación con los controles, demostrándose así que la expresión ectópica conjunta de estas dos proteínas de unión al RNA inducía un fenotipo

característico de células germinales. Sin embargo, a pesar de que se mostraba una tendencia, se detectó una gran variabilidad en los perfiles de expresión génica al comparar las células iVASA y iDAZL entre si, por lo que no se pudieron hallar diferencias estadísticamente significativas. Este hecho pone además de manifiesto la posibilidad de que la reprogramación inducida mediante la sobreexpresión de VASA y DAZL sea un hecho estocástico y no ordenado.



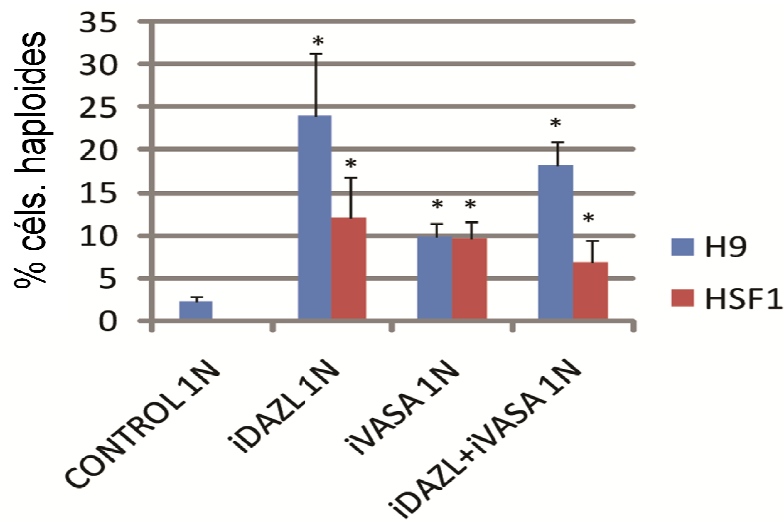
**Figura 33.** Análisis comparativo de la expresión genética de marcadores específicos de distintos estadios del desarrollo germinal en las células sometidas a expresión ectópica de DAZL (iDAZL), VASA (iVASA) y DAZL+VASA (iDAZL+iVASA) y sus respectivos controles tras 7 días de diferenciación espontánea en monocapa. **(A)** Marcadores relacionados con pluripotencia, **(B)** marcadores de la formación de PGCs *in vivo*, **(C)** marcadores germinales sometidos a sobreexpresión ectópica, **(D)** marcadores de PGCs migratorias, **(E)** marcadores germinales tempranos, **(F)** marcadores de PGCs migratorias, **(G)** marcadores meióticos, **(H)** marcadores germinales tardíos específicos de gametos masculinos, **(I)** marcadores relacionados con señalización gonadal, **(I)** marcadores germinales tardíos específicos de gametos femeninos. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. Los datos están presentados como media  $\pm$  SEM de experimentos por triplicado.

Por otra parte, se analizó la capacidad de inducción de la meiosis mediante la sobreexpresión de VASA comparada con la de DAZL y la combinación de ambos. De esta manera, se estudió la formación de una estructura específica de las células meióticas como es el complejo sinaptonémico. Para ello, se marcaron inmunocitoquímicamente las células con SCP3, el cual es un componente estructural del complejo sinaptonémico en la profase I de la meiosis, y CENPA, el cual es un marcador del centrómero de los cromosomas. La mayoría de las células de los distintos grupos no mostraron ningún tipo de marcaje para SCP3, indicando que no se trataba de células meióticas o que eran células que quizá ya habían pasado la profase I meiótica. Sin embargo, una parte de las células analizadas mostraron un patrón punteado de SCP3 nuclear indicativo de las primeras etapas de la profase I, concretamente leptotene, mientras que otras adquirieron un patrón elongado de SCP3 nuclear indicativo de una progresión hacia las subfases de zigotene, paquitene o diplotene (Fig. 34A). Concretamente, se observó que el patrón punteado se dio tanto en controles como en células sometidas a sobreexpresión de DAZL y/o VASA con unos valores de entre 1 y 6%, mientras que en lo referente al patrón elongado, observamos un incremento sólo en las células sometidas a sobreexpresión genética, siendo la sobreexpresión ectópica de DAZL y la combinación de DAZL+VASA las condiciones de mayor eficiencia (Fig. 34B).



**Figura 34.** Análisis de la formación del complejo sinaptonémico en las líneas sometidas a expresión ectópica lentiviral tras 14 días de diferenciación espontánea en monocapa. **(A)** Representación del patrón de distribución de SCP3 a lo largo de las diferentes subfases de la profase I meiótica. **(B)** Imágenes representativas del patrón de distribución de SCP3 encontrado en el núcleo de las células analizadas. **(C)** Porcentaje de células positivas para SCP3 con patrón punteado/elongado en cada grupo. La barra de escala representa una distancia de 10  $\mu$ m.

Finalmente, se analizó la ploidía de las células mediante separación de las células 1N mediante FACS y posterior FISH con sondas contra los cromosomas 16 y 18. Mediante este análisis, se observó que, a pesar de que en todos los casos en que se sobreexpresó alguna de las proteínas de unión al RNA aumentó el porcentaje de células haploides respecto a los controles, nuevamente la expresión ectópica de DAZL fue el tratamiento que más efectivamente indujo la formación de células haploides, sin observarse un claro efecto sinérgico con la sobreexpresión combinada de DAZL y VASA (Fig. 35).

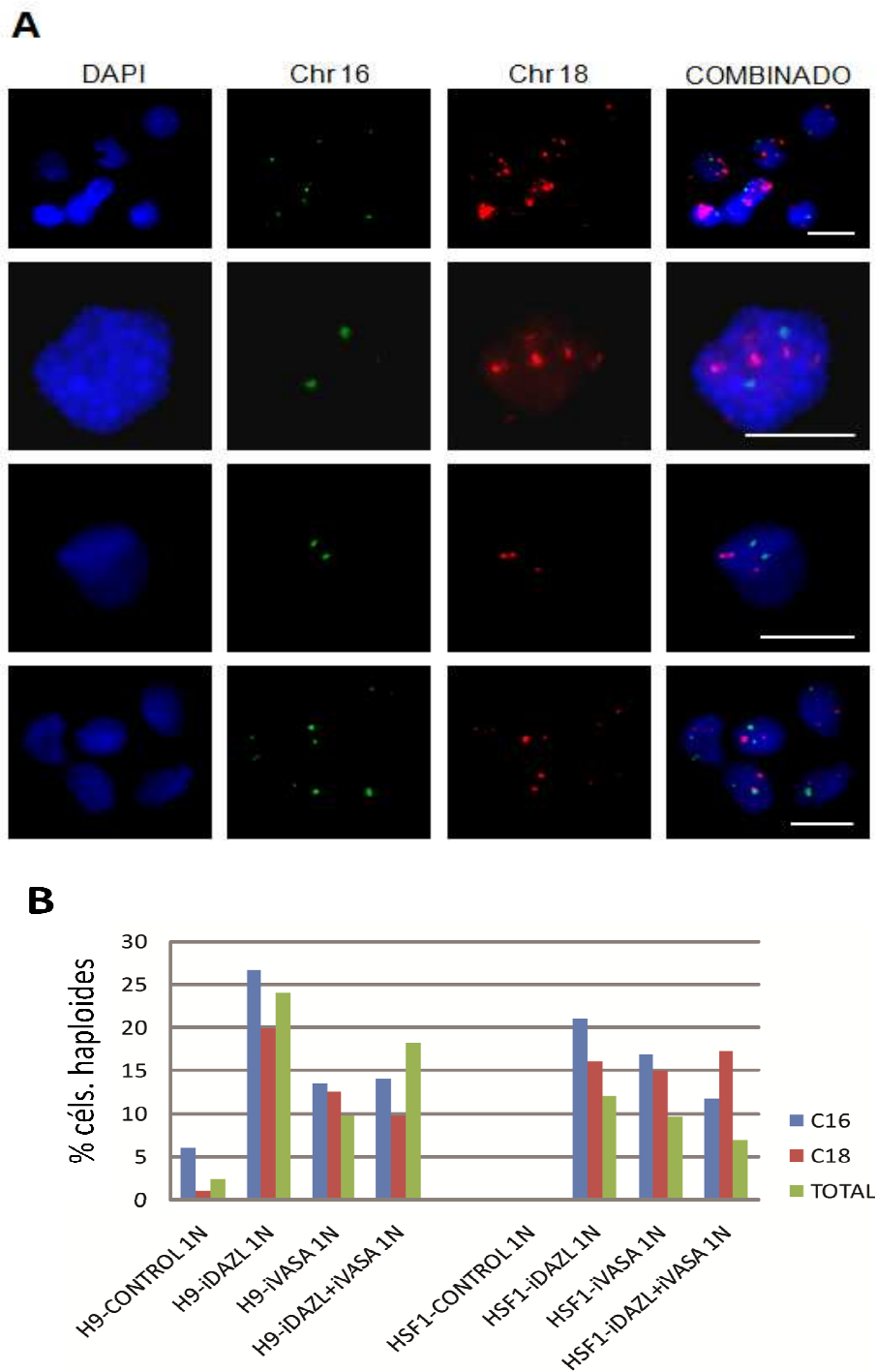


**Figura 35.** Porcentaje de células haploides encontradas mediante FISH de las células 1N obtenidas mediante FACS en cada grupo de estudio. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. Los datos están presentados como media +/- SEM de experimentos por triplicado.

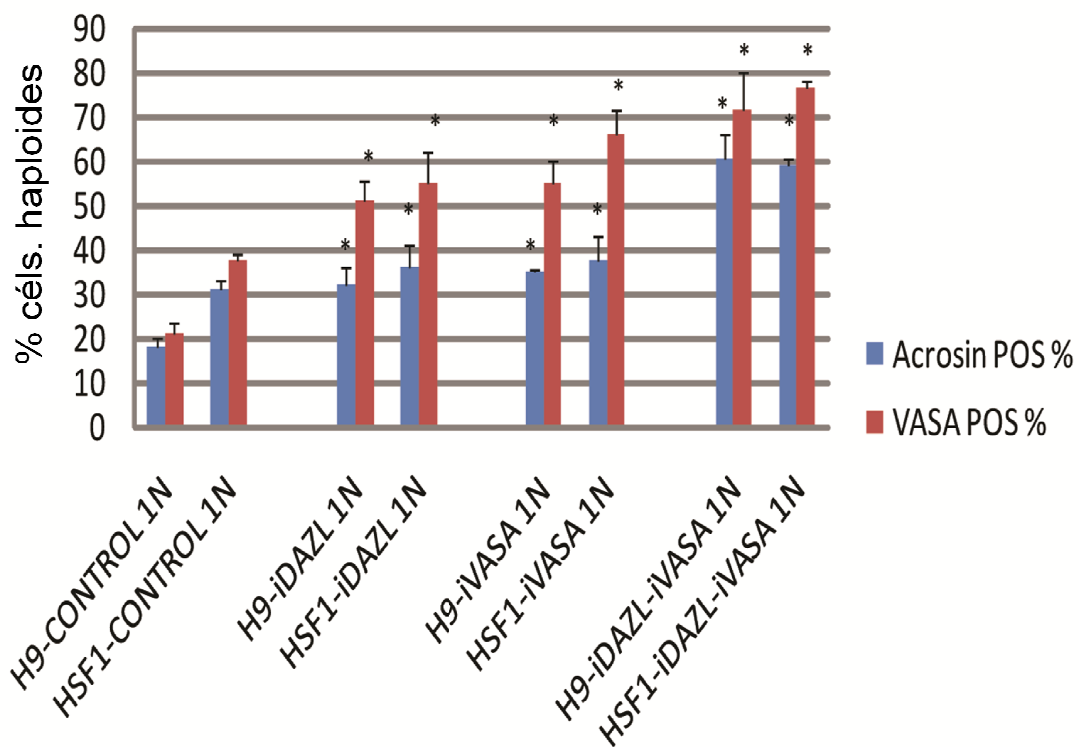


Sin embargo, durante estos experimentos se detectó frecuentemente la aparición de aneuploidías en todos los grupos muestrales (Fig. 36), lo cual nos indica que posiblemente la expresión ectópica de estas proteínas de unión al RNA tan sólo es parte de un complicado mecanismo que además necesita de la aportación de otros factores tales como el nicho gonadal para conseguir la correcta maduración meiótica de las células germinales obtenidas *in vitro*.

Por último, el análisis inmunocitoquímico de las células 1N obtenidas mediante FACS mostró que el mayor porcentaje de células positivas para VASA y acrosina se encontraba en el grupo iDAZL+iVASA, observándose así un efecto sinérgico en la expresión ectópica de estas proteínas de unión al RNA en la regulación traduccional de algunos marcadores tardíos de maduración gamética como es el caso de acrosina (Fig.37).



**Figura 36.** Aberraciones cromosómicas encontradas en el análisis de ploidía mediante FISH de las poblaciones celulares 1N obtenidas mediante FACS. **(A)** Ejemplos representativos de diferentes aberraciones cromosómicas encontradas para los cromosomas 16 (verde) y 18 (rojo). La barra de escala representa una distancia de 10  $\mu$ m. **(B)** Porcentaje de células haploides contadas en cada grupo de estudio si consideramos sólo el cromosoma 16 (serie azul), sólo el 18 (serie roja), o ambos (serie verde).



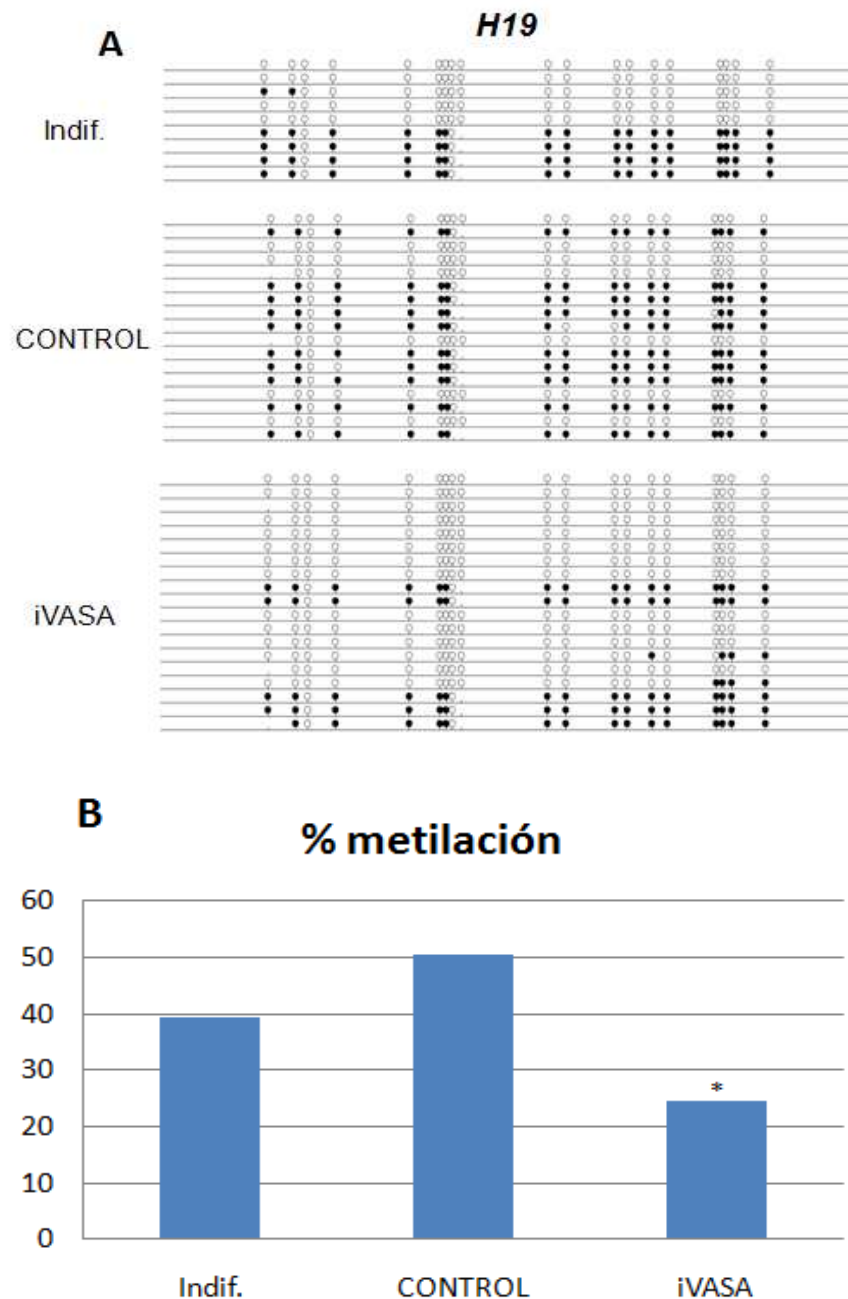
**Figura 37.** Porcentaje de células VASA y acrosina positivas de las células 1N obtenidas mediante FACS en cada grupo de estudio. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles. Los datos están presentados como media  $\pm$  SEM de experimentos por triplicado.

## 2.5.- La expresión ectópica de VASA recapitula algunos aspectos de la reprogramación epigenética de la línea germinal en el *locus* improntado *H19*.

El borrado de las marcas epigenéticas de los *loci* improntados es un proceso que ocurre específicamente en el desarrollo de la línea germinal de mamíferos en el momento en que las PGCs colonizan las crestas gonadales. La readquisición de la impronta epigenética

específica del sexo de los gametos ocurre posteriormente justo antes o durante la meiosis, según el sexo (Hajkova et al, 2002; Monk et al, 1987; Sato et al, 2003).

Con el objetivo de determinar si la expresión ectópica de VASA es capaz de alterar el programa epigenético de las células germinales derivadas *in vitro*, se estudió mediante secuenciación por bisulfito el estado de metilación de las islas CpG del promotor del gen maternamente improntado *H19*, el cual es un indicador clave del estado de reprogramación epigenética de la línea germinal en mamíferos (Bartolomei et al, 1991; Zhang & Tycko, 1992), (Fig. 38). De esta manera, encontramos que el *locus H19* se encontraba en un estado hemi-metilado en los controles de células pluripotentes indiferenciadas, pero tras ser sometidas a 14 días de diferenciación espontánea en monocapa, este patrón cambiaba. Mientras en los controles diferenciados el patrón de metilación de *H19* se veía incrementado con respecto al estado indiferenciado, tal y como ocurre en los tejidos somáticos *in vivo*, en el caso de las células iVASA este patrón de metilación disminuyó hasta el 20%, lo cual es indicativo de que se encuentran en un proceso de reprogramación epigenética en el que posiblemente VASA está involucrado, confirmando así la identidad germinal de estas células.



**Figura 38.** Análisis del estado de metilación de las islas CpG en el DMR de *H19*. **(A)** Diagramas representativos del estado de metilación de cada dinucleótido CpG en el DMR de *H19*. Cada línea representa un clon y cada columna un dinucleótido CpG. Los dinucleótidos CpG metilados están representados con círculos negros y los no metilados con círculos blancos. **(B)** Porcentaje de dinucleótidos CpG metilados encontrados en cada grupo. Los asteriscos representan diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) respecto a los controles.



# VI

# DISCUSIÓN

*“El destino es el que baraja las cartas, pero nosotros somos los que jugamos.”*

William Shakespeare (1564-1616) Escritor británico.





## **1.- ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO DE EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES GERMINALES c-KIT, VASA Y SSEA-1 CON APLICACIONES DIAGNÓSTICAS.**

A partir del empleo de biopsias testiculares humanas como controles positivos, se pusieron a punto diversas técnicas que después se emplearían en el desarrollo de los distintos modelos de diferenciación *in vitro* descritos anteriormente en los que se ha basado esta tesis. Sin embargo, es importante remarcar que a partir de este estudio preliminar también se obtuvieron interesantes datos acerca de la posibilidad de emplear algunos de los marcadores germinales estudiados como herramienta diagnóstica de la fertilidad masculina que posteriormente dieron lugar a una publicación científica (Medrano et al, 2010).

Los resultados en este estudio fueron consistentes con publicaciones previas en las que se sugirió a VASA como un robusto marcador de la línea germinal durante la espermatogénesis (Castrillon et al, 2000b; Fujiwara et al, 1994; Noce et al, 2001; Tanaka et al, 2000b; Toyooka et al, 2003) y también se empleó como herramienta diagnóstica de la fertilidad masculina (Guo et al, 2007). Por otra parte, la expresión dependiente del estadio de diferentes marcadores durante la espermatogénesis ha sido descrita anteriormente (Hakovirta et al, 1999; Schrans-Stassen et al, 1999; Shah et al, 2005; Vincent et al, 1998; Zhang et al, 2004). En concreto,

dos trabajos han reportado la expresión significativamente menor de c-KIT en los testículos de hombres infértiles en comparación con controles fértiles (Feng et al, 1999; Sandlow et al, 1996), y un tercer trabajo la localización específica de c-KIT en la membrana de las espermatogonias comprendidas entre los estadios I y III de maduración en los testículos humanos (Unni et al, 2009).

De esta manera, en este estudio se observó una expresión significativamente menor de VASA en los pacientes SCO al compararlos con los controles, lo cual demostró que en estos pacientes había un descenso drástico en la contribución de células germinales al total de células de cada muestra. Sin embargo, las muestras de pacientes MA sólo mostraron diferencias importantes en la expresión de VASA al compararlas con las biopsias SCO SPZ- y no con las SCO SPZ+, lo cual es indicativo de la posible presencia de zonas mosaico con espermatogénesis completa en las últimas que no es posible detectar mediante el estudio anatómo-patológico. Además, también se encontraron niveles de expresión de VASA significativamente superiores en las muestras SCO SPZ+ al compararlas con las SCO SPZ- (Fig. 15). En conjunto, estos resultados indicaron que la cuantificación de la expresión de VASA a nivel de mRNA es un parámetro candidato para ser empleado como herramienta diagnóstica que permita discernir rápidamente entre posibles pacientes SCO mosaicos o no mosaicos.

Asimismo, la cuantificación del porcentaje de células que expresaban VASA en las muestras de biopsia testicular mediante citometría de flujo (Fig. 19) corroboró los resultados obtenidos por RT-qPCR.

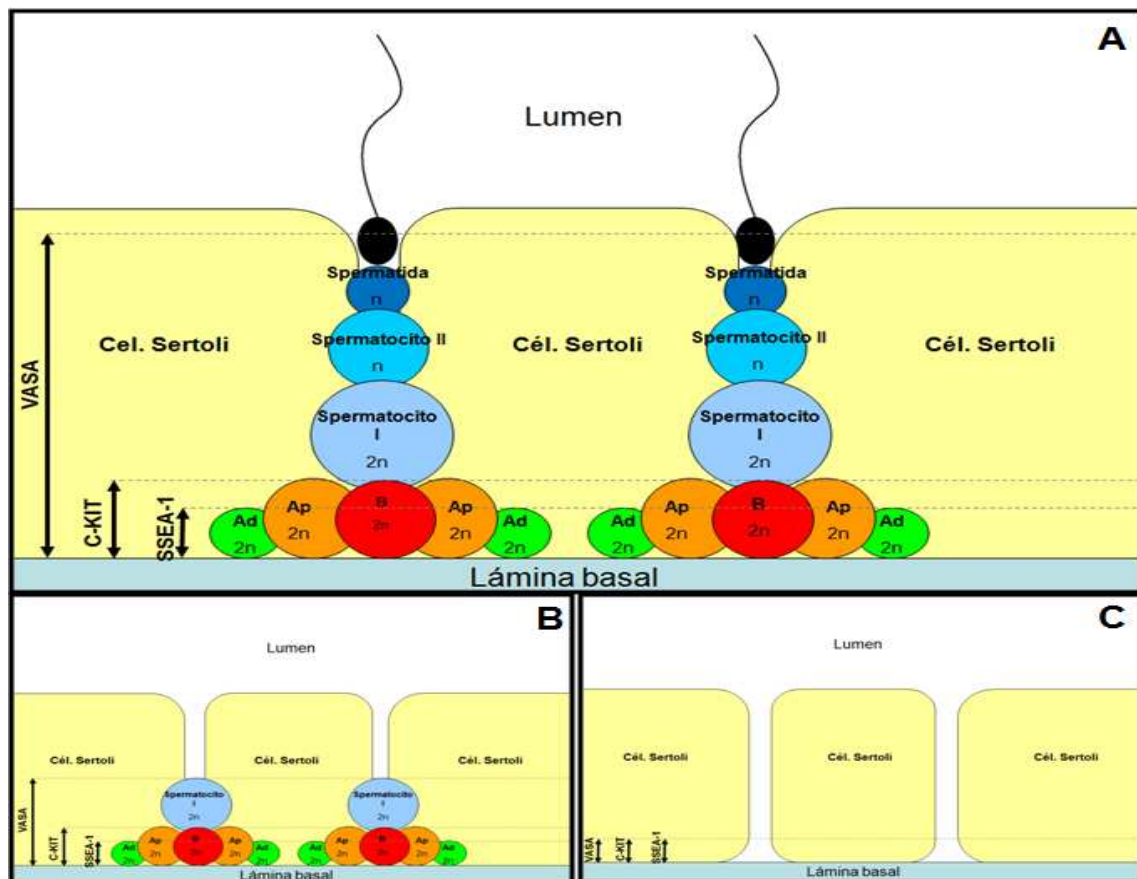
Por otra parte, teniendo en cuenta que el porcentaje de células VASA+ que fueron detectadas mediante citometría de flujo representa el total de células germinales en las biopsias testiculares y que el porcentaje de células c-KIT+ el de espermatogonias I-III pre-meióticas, se creó el parámetro VASA-KIT mediante la sustracción del porcentaje de células c-KIT+ al de VASA+ con el fin de analizar específicamente sólo la contribución de células meióticas y post-meióticas al total de células componentes de las muestras. Así, este parámetro VASA-KIT, representativo de las células germinales dentro de las biopsias testiculares que han pasado el estadio de espermatogonia III, mostró valores significativamente menores en ambos grupos de pacientes SCO en comparación con los OC y MA, lo cual es indicativo de un descenso significativo en el porcentaje de células germinales más allá del estadio de espermatogonia III por una detención temprana de la espermatogénesis.

Por último, a diferencia de los resultados presentados para VASA y c-KIT y a pesar de la expresión de SSEA-1 que observada en las muestras testiculares (Figs. 16 y 17) y de anteriores trabajos en los que se empleaba como marcador de las células germinales más

inmaduras dentro del testículo (Bucay et al, 2009 ; Park et al, 2009 ; Tilgner et al, 2008), en este estudio no se detectó ninguna capacidad discriminatoria entre las patologías analizadas mediante la cuantificación de este marcador.

Teniendo en cuenta lo comentado anteriormente, se ha creado un modelo de espermatogénesis basado en la expresión dependiente de estadio de maduración de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 (Fig. 39).

Finalmente, en base a estos resultados, se pudo concluir que el análisis cuantitativo combinado a nivel de RNA mediante RT-qPCR y de proteína mediante citometría de flujo de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 puede ser una útil herramienta diagnóstica del estado de la espermatogénesis, complementaria al informe anatómico-patológico en pacientes con problemas de infertilidad. Además, mediante este tipo de análisis cuantitativo es posible diagnosticar muestras de pacientes SCO mosaicos que serían técnicamente difíciles de detectar mediante técnicas histológicas y por tanto, indicar o no la necesidad de una segunda biopsia en los casos en que en una primera biopsia testicular no se obtuvieron espermatozoides.



**Figura 39.** Modelo de espermatogénesis basado en la expresión dependiente de estadio de maduración de los marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1. Las flechas indican la expresión dependiente del estadio de maduración de cada marcador durante la espermatogénesis humana. **(A)** En muestras obstructivas control (OC), VASA se expresa en todas las células germinales durante la espermatogénesis. Por su parte, la expresión de c-KIT se limita a las primeras etapas del desarrollo de las espermatogonias hasta el inicio de la meiosis cuando las espermatogonias B se transforman en espermatocitos I. Por último, la expresión de SSEA-1 es específica de las espermatogonias Ad (del inglés A dark), las cuales son las células germinales más inmaduras iniciadoras de la espermatogénesis. **(B)** Los pacientes con problemas de arresto de la maduración (MA) suelen tener afectada la etapa de transición entre espermatocito I (2n) y espermatocito II (n), de modo que la expresión de VASA se ve truncada al nivel en que las células germinales inician la meiosis, mientras que las células pre-meióticas que expresan c-KIT se mantienen igual que en los controles. **(C)** Los pacientes con SCO por su parte tienen completamente truncado el proceso espermatogénico, por lo que la expresión de los tres marcadores VASA, c-KIT y SSEA-1 desciende drásticamente. Sin embargo, existe la posibilidad de que se trate de pacientes SCO mosaicos en los que existen zonas del epitelio germinal cuya espermatogénesis esta conservada y es funcional.

A modo de conclusión, este estudio debe ser considerado como un estudio piloto de la cuantificación de la expresión dependiente de estadio de la espermatogénesis de marcadores germinales en muestras testiculares que puede servir a futuros estudios de mayor escala con una mayor colección muestral como referencia para mejorar la rapidez y precisión en el diagnóstico de patologías asociadas a la espermatogénesis humana. De igual manera, otros marcadores germinales relacionados con la meiosis también deberán ser considerados en el futuro como candidatos para ser utilizados a modo de herramientas diagnósticas de este tipo de patologías.

## **2.- LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN AL RNA DAZL Y VASA INDUCEN LA MADURACIÓN MEIÓTICA DE CÉLULAS GERMINALES INMADURAS OBTENIDAS *IN VITRO* A PARTIR DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES HUMANAS.**

El desarrollo de la línea germinal humana es un proceso del cual se conoce muy poco y la mayor parte de la información que se posee al respecto procede de organismos modelo como el ratón. De esta manera, se tiende a pensar que los datos obtenidos a partir de organismos modelo son directamente aplicables a los humanos. Sin embargo, según la experiencia desarrollada durante la elaboración de esta tesis doctoral, este hecho no siempre es así, o al menos no lo es

en el campo de la diferenciación *in vitro* de células germinales a partir de líneas de células madre pluripotentes. Debido a ello, a pesar de que los primeros modelos de co-cultivo de hESCs con tejido gonadal que se diseñaron en la elaboración de este estudio se basaron en la información recogida a partir de experimentos exitosos con células madre embrionarias de ratón, en nuestras manos los resultados fueron confusos, no concluyentes y no todo lo exitosos que se había esperado en un principio (Figs. 20 y 21).

Así, tomando como base los resultados publicados recientemente acerca de la posible función de algunos miembros de la familia génica *DAZ* como inductores de la meiosis de las células germinales obtenidas *in vitro* a partir de hESC (Kee et al, 2009), se decidió abordar el tema desde la óptica de cómo esta familia génica y otras proteínas de unión al RNA altamente conservadas a lo largo de la evolución de la línea germinal de los metazoos pueden regular el desarrollo germinal y la meiosis de estas células *in vitro*.

En una primera serie de experimentos, tras comprobar la pluripotencialidad de las líneas iPSC (Fig. 23) y su capacidad para diferenciarse espontáneamente en células germinales (Fig.22), se demostró el potencial intrínseco de las líneas iPSC para formar células germinales VASA positivas espontáneamente *in vitro* con una eficacia igual e incluso mayor que las líneas hESC control, con independencia de su sexo cromosómico. Para ello, se empleó un sistema de

transducción lentiviral de un vector VASA-GFP reportero que permitió cuantificar las células germinales VASA-GFP positivas que espontáneamente se formaron a partir de las líneas hESC e iPSC que se emplearon (Fig. 24). A pesar de no poseer una explicación para este alto potencial mostrado por las líneas iPSC de formar células germinales *in vitro*, es posible que este hecho esté ligado al proceso de reprogramación por sobreexpresión de los genes relacionados con la pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC* al que se someten estas células o incluso a la tendencia natural de estas líneas a diferenciarse preferentemente en unos tejidos u otros (Panula et al, 2011).

Por otra parte, al analizar las células VASA-GFP positivas aisladas mediante FACS, se observó un perfil de expresión genética correspondiente a células germinales post-migratorias con avanzado grado de maduración germinal e incluso indicios de iniciación de la meiosis (Fig. 26).

VASA es una proteína de unión al RNA que, al igual que ocurre con DAZL (Juliano & Wessel, 2010; Ruggiu et al, 1997; Xu et al, 2001), está altamente conservada a lo largo de la evolución de la línea germinal de los metazoos y se considera esencial para su correcta formación y función (Castrillon et al, 2000b; Fujiwara et al, 2001; Gruidl et al, 1996; Gustafson et al, 2011; Komiya et al, 1994; Lasko & Ashburner, 1988; Medrano et al, 2010; Tanaka et al, 2000b). Aunque no se conoce mucho sobre la función específica de VASA, se sabe



que tiene funciones como regulador traduccional de otros factores también implicados en el desarrollo de la línea germinal como *Nanos* (Becalska & Gavis, 2009; Noce et al, 2001) y el procesamiento de piRNAs junto con PIWIL, necesario para la iniciación y progresión de la meiosis (Kuramochi-Miyagawa et al, 2010; Liu et al, 2009). En base a estos hechos, junto con la observación de que las células VASA-GFP positivas aisladas mediante FACS poseían un perfil de expresión propio de células germinales en avanzado estado de maduración, se hipotetizó que VASA puede actuar como regulador de la meiosis de las células germinales derivadas *in vitro* y por tanto la expresión ectópica de VASA en estas células podría empujar estas células hacia la meiosis (Medrano et al, 2011).

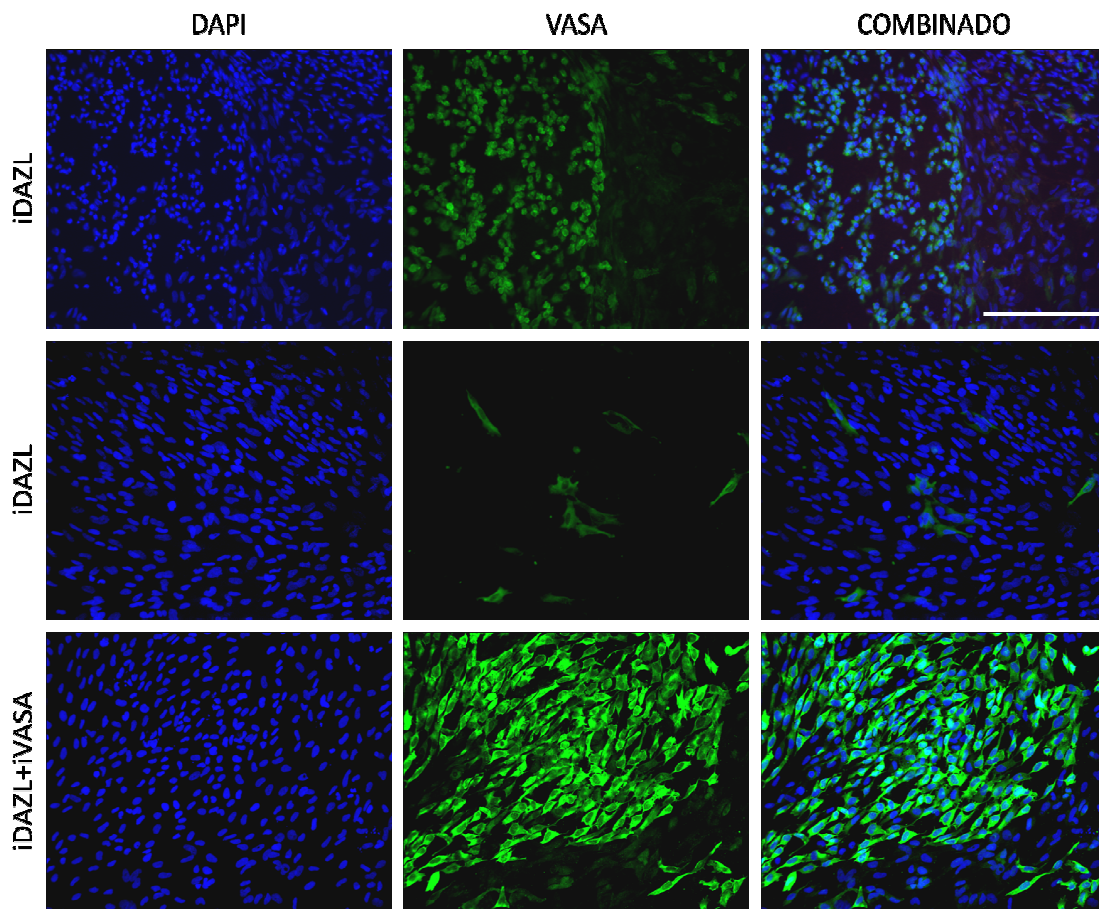
Al analizar las líneas de células hESC e iPSC sometidas a sobreexpresión ectópica de VASA, se observó un perfil de expresión correspondiente a una población heterogénea de células germinales en distintos estadios de desarrollo (Fig. 29), de manera similar a lo observado por otros grupos que realizaron una aproximación similar con otro organismo modelo (Lavial et al, 2009).

Con el fin de eliminar esta heterogeneidad, se marcaron las células con PI y fueron separadas según su contenido de DNA mediante FACS (Fig. 30), obteniendo así poblaciones supuestamente 1N (haploides) que contenían una población más homogénea de células germinales en avanzado estado de desarrollo. Así, al analizar

esta población celular 1N se observó que una parte de estas células expresaban el marcador de gametos masculinos post-meióticos acrosina (Florke-Gerloff et al, 1983). Interesantemente, la expresión de acrosina se observó en todas las líneas celulares con las que trabajamos, independientemente de su sexo cromosómico (Fig. 31), lo cual pone de manifiesto la determinación sexual aleatoria de las células germinales derivadas *in vitro*, debido a la carencia de interacción con las señales específicas de su nicho gonadal tal y como ocurre *in vivo* (Byskov, 1986; Clark et al, 2004; Kee et al, 2009; Panula et al, 2011). Finalmente, fue el análisis de la ploidía celular de estas células mediante FISH (Fig. 32) el resultado que definitivamente indicó el rol de VASA como inductor de la meiosis en las células germinales derivadas *in vitro* al demostrarse el aumento significativo de formación de células haploides en las células sometidas a sobreexpresión ectópica de VASA respecto a los controles.

A continuación se comparó la eficiencia de inducción de la meiosis de nuestro modelo de sobreexpresión de VASA con el modelo previamente reportado basado en DAZL (Kee et al, 2009; Medrano et al, 2011; Panula et al, 2011). Los resultados del análisis cuantitativo de expresión genética mediante microfluidos confirmaron que ambas proteínas de unión al RNA son capaces de inducir la maduración gamética de las células germinales *in vitro* al comparar el perfil de expresión de las poblaciones celulares

sometidas a expresión ectópica iDAZL, iVASA y iDAZL+iVASA con los controles (Fig. 33). Sin embargo, no se observó ninguna tendencia clara del perfil general de expresión al comparar las poblaciones celulares sometidas a sobreexpresión lentiviral entre sí. Este hecho puede ser un reflejo de la relación epistática que existe entre DAZL y VASA. De hecho, existen estudios que han sugerido que DAZL puede tener cierto control traduccional sobre el mRNA codificante de VASA (Reynolds et al, 2005), lo cual da sentido al hecho de que VASA se exprese más tardíamente a lo largo del desarrollo de la línea germinal de mamíferos *in vivo*. Apoyando esta afirmación, mediante técnicas inmunocitoquímicas se observó la aparición de grupos de células VASA positivas con morfología tanto redondeada (típica de células germinales post-migratorias o gonocitos) como elongada/ameboidea (típica de células germinales migratorias) dentro de las poblaciones celulares sometidas a expresión ectópica de DAZL, lo que demuestra que la expresión ectópica de DAZL de algún modo indujo la expresión endógena de VASA a nivel de proteína (Fig. 40).



**Figura 40.** Imágenes representativas de la morfología de las células VASA positivas en cultivo. La expresión ectópica de DAZL (iDAZL) indujo la formación de agrupaciones celulares de células VASA positivas cuya morfología fue tanto redondeada (típica de células germinales post-migratorias o gonocitos) como elongada/ameboidea (típica de células germinales migratorias). La barra de escala representa una distancia de 100  $\mu\text{m}$ .

Adicionalmente, tanto mediante el análisis de la formación del complejo sinaptonémico (Fig. 34) como mediante FISH (Fig. 35), se detectó una mayor eficiencia en la inducción de la meiosis *in vitro* cuando las células fueron sometidas a la expresión ectópica de DAZL, además de que no se observaron claras evidencias de un efecto

sinérgico en la inducción de la meiosis cuando sobreexpresamos conjuntamente DAZL y VASA. Estos hechos pueden ser explicados por la relación epistática entre DAZL y VASA anteriormente comentada. Sin embargo, sí se observa la aparición de un mayor porcentaje de células acrosina positivas cuando las células fueron sometidas a sobreexpresión de VASA, lo cual pone de manifiesto la posible función de VASA como regulador de la expresión de genes tardíos de la maduración gamética (Fig. 37).

Por otra parte, se conoce que la tasa de errores en la segregación cromosómica durante la meiosis en la línea germinal de los humanos es de alrededor del 5-20%. Esta tasa de aneuploidías es extremadamente elevada si la comparamos con la calculada en organismos modelos como el ratón, con tasas de aproximadamente el 1%, o *Drosophila*, donde la tasa de aneuploidías es de sólo el 0.1% (Hunt & Hassold, 2002). En este estudio también fue detectada frecuentemente la aparición de aneuploidías en los cromosomas analizados mediante FISH (Fig. 36). Este dato sugiere la idea de que posiblemente este sistema de inducción de la meiosis *in vitro* mediante diferenciación espontánea de las líneas celulares pluripotentes con expresión ectópica de las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA es un modelo incompleto con una baja eficiencia que posiblemente necesite de la aportación de otros factores, así como de la crucial señalización que sólo el nicho gonadal *in vivo* es capaz de propiciar (McLaren, 1995; McLaren, 2003).

Finalmente, el borrado de las marcas epigenéticas y su posterior re-adquisición es un proceso específico a la vez que crítico del desarrollo de las células germinales necesario para el correcto desarrollo del embrión (Hajkova et al, 2002; Monk et al, 1987; Sato et al, 2003). En este estudio, se analizó por tanto el estado de metilación del DMR del *locus* maternamente improntado *H19* como marcador del estado epigenético de las células germinales derivadas *in vitro* y observamos un descenso importante en su patrón de metilación cuando las células fueron sujetas a expresión ectópica de VASA (Fig. 38). Este resultado resultó ser, por tanto, indicativo del grado de reprogramación epigenética que alcanzaron estas células en respuesta a la expresión de VASA, el cual ha sido sugerido anteriormente como un factor con posibles funciones reguladoras de esta reprogramación epigenética en la línea germinal de mamíferos por su función en la regulación de diversos piRNAs (Kuramochi-Miyagawa et al, 2010). Sin embargo, estudios más detallados acerca de este efecto deberán ser llevados a cabo en el futuro.

A modo de sumario, en este estudio se ha demostrado cómo dos proteínas de unión al RNA no pertenecientes a la misma familia, pero conservadas evolutivamente como DAZL y VASA pueden tener un papel importante en la maduración meiótica de las células germinales derivadas *in vitro* (Medrano et al, 2011; Panula et al, 2011). Asimismo, los resultados hallados en la elaboración de esta tesis doctoral pueden suponer un modelo base para el estudio de la

meiosis humana *in vitro*, el cual es un proceso sujeto a errores con un alto grado de incidencia que causan aneuploidías en los embriones. El hecho de que diversas familias de proteínas de unión al RNA se hayan mantenido tan conservadas a lo largo de la evolución de la línea germinal de todos los metazoos sugiere la existencia de un importante papel de este tipo de regulación post-transcripcional. De este modo, cabe indicar que el estudio de otras proteínas de unión al RNA también conservadas en la evolución de la línea germinal como las ya mencionadas NANOS, PUMILIO y PIWIL, así como de sus dianas y el mecanismo de regulación de los piRNAs, puede aportar luz a este apasionante campo de investigación. Es posible pues, que algún día tengamos tal conocimiento de la regulación del desarrollo de la línea germinal humana que lleguemos a dar con un conjunto de factores que nos permitan la reprogramación de cualquier tipo celular en células germinales, de manera similar a como ya se ha conseguido con las células madre pluripotentes inducidas o iPSCs (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Finalmente, es importante remarcar que aunque los fines de esta tesis doctoral han sido meramente académicos, sus resultados pueden ayudar a crear algún día una solución para las parejas con problemas de infertilidad relacionados con la producción de gametos, las cuales representan aproximadamente el 15% de los pacientes que acuden a una clínica de fertilidad. En este aspecto, la generación de gametos funcionales *in vitro* a partir de células madre

pluripotentes puede usarse como modelo de estudio del desarrollo de la línea germinal humana, lo que sería imposible de abordar *in vivo* por cuestiones éticas, así como para conocer las causas y tratar la disfuncionalidad de los gametos de pacientes con problemas de fertilidad mediante el empleo de iPSCs del mismo paciente diferenciadas a células germinales *in vitro*.



# VII

# CONCLUSIONES

*“A veces creo que hay vida en otros planetas, y a veces creo que no.  
En cualquiera de los dos casos la conclusión es asombrosa.”*

Carl Sagan (1934-1996) Astrónomo estadounidense.



Las conclusiones finales de esta tesis doctoral son:

- 1.- El análisis cuantitativo de la expresión de VASA y c-KIT mediante RT-qPCR y citometría de flujo puede ser empleado como herramienta diagnóstica diferenciadora entre patologías asociadas a la espermatogénesis, sobre todo para detectar posibles casos de mosaicismo en pacientes con síndrome de sólo células de Sertoli.
- 2.- Las iPSCs humanas poseen una capacidad equiparable o incluso mayor que las hESCs de diferenciarse espontáneamente a células germinales *in vitro*.
- 3.- El perfil de expresión de las células VASA positivas obtenidas mediante diferenciación espontánea *in vitro* de diferentes líneas de hESCs e iPSCs corresponde a una población heterogénea de células germinales en un avanzado estado de maduración.
- 4.- Aunque con una baja eficiencia, la expresión ectópica de VASA y/o DAZL induce la progresión meiótica en las células germinales obtenidas mediante diferenciación espontánea *in vitro* a partir de líneas de células pluripotentes humanas.
- 5.- La sobreexpresión combinada de DAZL y VASA no tiene un efecto sinérgico en la maduración gamética, posiblemente

debido a la relación epistática existente entre DAZL y VASA en el desarrollo de la línea germinal de mamíferos.

6.- La expresión ectópica de VASA en células madre pluripotentes sometidas a diferenciación espontánea es capaz de inducir la de-metilación del *locus* improntado *H19*, lo cual es una característica específica del desarrollo de la línea germinal en mamíferos.

Como conclusión general, en este estudio hemos demostrado la implicación de las proteínas de unión al RNA DAZL y VASA como inductores de la meiosis *in vitro* mediante su expresión ectópica en diferentes líneas de hESCs e iPSCs humanas sometidas a diferenciación espontánea en monocapa. Este trabajo puede suponer un modelo para el estudio del desarrollo de la línea germinal humana *in vitro*, así como punto de partida para el estudio de cómo estas y otras proteínas de unión al RNA altamente conservadas a lo largo de la evolución de la línea germinal de todos los metazoos son capaces de regular su desarrollo, progresión meiótica y maduración funcional.

# VIII

# BIBLIOGRAFÍA

*“Si consigo ver más lejos es porque he conseguido auparme a  
hombros de gigantes.”*

Sir Isaac Newton (1642-1727) Matemático y físico británico.



**BILIOGRAFÍA**

1. Adamson GD, de Mouzon J, Lancaster P, Nygren KG, Sullivan E, Zegers-Hochschild F (2006) World collaborative report on in vitro fertilization, 2000. *Fertil Steril* 85: 1586-1622
2. Al-Bader MD, Al-Sarraf HA (2005) Housekeeping gene expression during fetal brain development in the rat-validation by semi-quantitative RT-PCR. *Brain Res Dev Brain Res* 156: 38-45
3. Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM (1991) Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 351: 153-155
4. Becalska AN, Gavis ER (2009) Lighting up mRNA localization in *Drosophila* oogenesis. *Development* 136: 2493-2503
5. Bellve AR, Millette CF, Bhatnagar YM, O'Brien DA (1977) Dissociation of the mouse testis and characterization of isolated spermatogenic cells. *J Histochem Cytochem* 25: 480-494
6. Bestor T, Laudano A, Mattaliano R, Ingram V (1988) Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases. *J Mol Biol* 203: 971-983

7. Bestor TH (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet* 9: 2395-2402
8. Bowles J, Knight D, Smith C, Wilhelm D, Richman J, Mamiya S, Yashiro K, Chawengsaksophak K, Wilson MJ, Rossant J, Hamada H, Koopman P (2006) Retinoid signaling determines germ cell fate in mice. *Science* 312: 596-600
9. Bowles J, Koopman P (2010) Sex determination in mammalian germ cells: extrinsic versus intrinsic factors. *Reproduction* 139: 943-958
10. Bucay N, Yebra M, Cirulli V, Afrikanova I, Kaido T, Hayek A, Montgomery A (2009) A novel approach for the derivation of putative primordial germ cells and sertoli cells from human embryonic stem cells. *Stem Cells* 27: 68-77
11. Burgoyne PS (1988) Role of mammalian Y chromosome in sex determination. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 322: 63-72
12. Burgoyne PS, Mahadevaiah SK, Turner JM (2009) The consequences of asynapsis for mammalian meiosis. *Nat Rev Genet* 10: 207-216
13. Byskov AG (1986) Differentiation of mammalian embryonic gonad. *Physiol Rev* 66: 71-117



14. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP (2000a) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 9585-9590
15. Castrillon DH, Quade BJ, Wang TY, Quigley C, Crum CP (2000b) The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *PNAS* 97: 9585-9590
16. Clark AT, Bodnar MS, Fox MS, Rodriguez RT, Abeyta MJ, Firpo MT, R.A. Reijo Pera (2004) Spontaneous differentiation of germ cells from human embryonic stem cells in vitro. *Hum Mol Genet* 13: 727-739
17. Clark JM, Eddy EM (1975) Fine structural observations on the origin and associations of primordial germ cells of the mouse. *Dev Biol* 47: 136-155
18. Davis TL, Yang GJ, McCarrey JR, Bartolomei MS (2000) The H19 methylation imprint is erased and re-established differentially on the parental alleles during male germ cell development. *Hum Mol Genet* 9: 2885-2894
19. Dobson MJ, Pearlman RE, Karaiskakis A, Spyropoulos B, Moens PB (1994) Synaptonemal complex proteins: occurrence, epitope mapping and chromosome disjunction. *J Cell Sci* 107 ( Pt 10): 2749-2760

20. Donovan PJ, Stott D, Cairns LA, Heasman J, Wylie CC (1986) Migratory and postmigratory mouse primordial germ cells behave differently in culture. *Cell* 44: 831-838
21. Dyce PW, Wen L, Li J (2006) In vitro germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nat Cell Biol* 8: 384-390
22. Eguizabal C, Montserrat N, Vassena R, Barragan M, Garreta E, Garcia-Quevedo L, Vidal F, Giorgetti A, Veiga A, Izpisua Belmonte JC (2011) Complete meiosis from human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 29: 1186-1195
23. Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156
24. Ewen KA, Koopman P (2010) Mouse germ cell development: from specification to sex determination. *Mol Cell Endocrinol* 323: 76-93
25. Feng HL, Sandlow JI, Sparks AE, Sandra A, Zheng LJ (1999) Decreased expression of the c-kit receptor is associated with increased apoptosis in subfertile human testes. *Fertil Steril* 71: 85-89

26. Florke-Gerloff S, Topfer-Petersen E, Muller-Esterl W, Schill WB, Engel W (1983) Acrosin and the acrosome in human spermatogenesis. *Hum Genet* 65: 61-67
27. Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M (1977) The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec* 188: 315-330
28. Fujiwara T, Dunn NR, Hogan BL (2001) Bone morphogenetic protein 4 in the extraembryonic mesoderm is required for allantois development and the localization and survival of primordial germ cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13739-13744
29. Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, Sato M, Fujimoto H, Furusawa M, Noce T (1994) Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila vasa* and its specific expression in germ cell lineage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12258-12262
30. Geijsen N, Horoschak M, Kim K, Gribnau J, Eggan K, Daley GQ (2004) Derivation of embryonic germ cells and male gametes from embryonic stem cells. *Nature* 427: 148-154

31. Gill ME, Hu YC, Lin Y, Page DC (2011) Licensing of gametogenesis, dependent on RNA binding protein DAZL, as a gateway to sexual differentiation of fetal germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7443-7448
32. Ginsburg M, Snow MH, McLaren A (1990) Primordial germ cells in the mouse embryo during gastrulation. *Development* 110: 521-528
33. Godin I, Wylie C, Heasman J (1990) Genital ridges exert long-range effects on mouse primordial germ cell numbers and direction of migration in culture. *Development* 108: 357-363
34. Gomperts M, Garcia-Castro M, Wylie C, Heasman J (1994) Interactions between primordial germ cells play a role in their migration in mouse embryos. *Development* 120: 135-141
35. Gondos B, Westergaard L, Byskov AG (1986) Initiation of oogenesis in the human fetal ovary: ultrastructural and squash preparation study. *Am J Obstet Gynecol* 155: 189-195
36. Goto T, Adjaye J, Rodeck CH, 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

37. Gruidl ME, Smith PA, Kuznicki KA, McCrone JS, Kirchner J, Roussel DL, Strome S, Bennett KL (1996) Multiple potential germ-line helicases are components of the germ-line-specific P granules of *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13837-13842
38. Guo X, Gui YT, Tang AF, Lu LH, Gao X, Cai ZM (2007) Differential expression of VASA gene in ejaculated spermatozoa from normozoospermic men and patients with oligozoospermia. *Asian J Androl* 9: 339-344
39. Gustafson EA, Yajima M, Juliano CE, Wessel GM (2011) Post-translational regulation by gustavus contributes to selective Vasa protein accumulation in multipotent cells during embryogenesis. *Dev Biol* 349: 440-450
40. Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* 117: 15-23
41. Hakovirta H, Yan W, Kaleva M, Zhang F, Vanttinen K, Morris PL, Soder M, Parvinen M, Toppari J (1999) Function of stem cell factor as a survival factor of spermatogonia and localization of messenger ribonucleic acid in the rat seminiferous epithelium. *Endocrinology* 140: 1492-1498

42. Handel MA, Schimenti JC (2010) Genetics of mammalian meiosis: regulation, dynamics and impact on fertility. *Nat Rev Genet* 11: 124-136
43. Heyting C, Dettmers RJ, Dietrich AJ, Redeker EJ, Vink AC (1988) Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei. *Chromosoma* 96: 325-332
44. Hubner K, Fuhrmann G, Christenson LK, Kehler J, Reinbold R, De La Fuente R, Wood J, Strauss JF, 3rd, Boiani M, Scholer HR (2003) Derivation of oocytes from mouse embryonic stem cells. *Science* 300: 1251-1256
45. Hunt PA, Hassold TJ (2002) Sex matters in meiosis. *Science* 296: 2181-2183
46. Juliano C, Wessel G (2010) Developmental biology. Versatile germline genes. *Science* 329: 640-641
47. Kassir Y, Adir N, Boger-Nadjar E, Raviv NG, Rubin-Bejerano I, Sagee S, Shenhar G (2003) Transcriptional regulation of meiosis in budding yeast. *Int Rev Cytol* 224: 111-171
48. Kee K, Angeles V, Flores M, Nguyen H, Pera RR (2009) Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ cell and haploid gamete formation. *Nature* 462: 222-225

49. Kee K, Gonsalves JM, Clark AT, Pera RA (2006) Bone morphogenetic proteins induce germ cell differentiation from human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev* 15: 831-837
50. Kerkis A, Fonseca SA, Serafim RC, Lavagnolli TM, Abdelmassih S, Abdelmassih R, Kerkis I (2007) In vitro differentiation of male mouse embryonic stem cells into both presumptive sperm cells and oocytes. *Cloning Stem Cells* 9: 535-548
51. Komiya T, Itoh K, Ikenishi K, Furusawa M (1994) Isolation and Characterization of a Novel Gene of the Dead Box Protein Family Which Is Specifically Expressed in Germ-Cells of *Xenopus-Laevis*. *Developmental Biology* 162: 354-363
52. Koopman P, Munsterberg A, Capel B, Vivian N, Lovell-Badge R (1990) Expression of a candidate sex-determining gene during mouse testis differentiation. *Nature* 348: 450-452
53. Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC (2006) Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2474-2479

54. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Takamatsu K, Chuma S, Kojima-Kita K, Shiromoto Y, Asada N, Toyoda A, Fujiyama A, Totoki Y, Shibata T, Kimura T, Nakatsuji N, Noce T, Sasaki H, Nakano T (2010) MVH in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons. *Genes Dev* 24: 887-892
55. Lacham-Kaplan O, Chy H, Trounson A (2006) Testicular cell conditioned medium supports differentiation of embryonic stem cells into ovarian structures containing oocytes. *Stem Cells* 24: 266-273
56. Lange UC, Saitou M, Western PS, Barton SC, Surani MA (2003) The fragilis interferon-inducible gene family of transmembrane proteins is associated with germ cell specification in mice. *BMC Dev Biol* 3: 1
57. Lasko PF, Ashburner M (1988) The product of the Drosophila gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335: 611-617
58. Laval F, Acloque H, Bachelard E, Nieto MA, Samarut J, Pain B (2009) Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev Biol* 330: 73-82



59. Lawson KA, Dunn NR, Roelen BA, Zeinstra LM, Davis AM, Wright CV, Korving JP, Hogan BL (1999) Bmp4 is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13: 424-436
60. Lawson KA, Hage WJ (1994) Clonal analysis of the origin of primordial germ cells in the mouse. *Ciba Found Symp* 182: 68-84; discussion 84-91
61. Liu N, Han H, Lasko P (2009) Vasa promotes Drosophila germline stem cell differentiation by activating mei-P26 translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. *Genes Dev* 23: 2742-2752
62. Lyle R (1997) Gametic imprinting in development and disease. *J Endocrinol* 155: 1-12
63. Maatouk DM, Resnick JL (2003) Continuing primordial germ cell differentiation in the mouse embryo is a cell-intrinsic program sensitive to DNA methylation. *Dev Biol* 258: 201-208
64. Matsui Y, Zsebo KM, Hogan BL (1990) Embryonic expression of a haematopoietic growth factor encoded by the Sl locus and the ligand for c-kit. *Nature* 347: 667-669

65. Mochizuki K, Matsui Y (2010) Epigenetic profiles in primordial germ cells: global modulation and fine tuning of the epigenome for acquisition of totipotency. *Dev Growth Differ* 52: 517-525
66. McLaren A (1984) Meiosis and differentiation of mouse germ cells. *Symp Soc Exp Biol* 38: 7-23
67. McLaren A (1988) Somatic and germ-cell sex in mammals. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 322: 3-9
68. McLaren A (1995) Germ cells and germ cell sex. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 350: 229-233
69. McLaren A (2003) Primordial germ cells in the mouse. *Dev Biol* 262: 1-15
70. Medrano JV, Marques-Mari AI, Aguilar CE, Riboldi M, Garrido N, Martinez-Romero A, O'Connor E, Gil-Salom M, Simon C (2010) Comparative analysis of the germ cell markers c-KIT, SSEA-1 and VASA in testicular biopsies from secretory and obstructive azoospermias. *Mol Hum Reprod* 16: 811-817
71. Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, Simon C, Reijo-Pera RA (2011) Divergent RNA-Binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived In vitro. *Stem Cells*

72. Miozzo M, Simoni G (2002) The role of imprinted genes in fetal growth. *Biol Neonate* 81: 217-228
73. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S (2003) The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* 113: 631-642
74. Mohr S, Stryker JM, Lambowitz AM (2002) A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* 109: 769-779
75. Molyneaux KA, Stallock J, Schaible K, Wylie C (2001) Time-lapse analysis of living mouse germ cell migration. *Dev Biol* 240: 488-498
76. Monk M, Boubelik M, Lehnert S (1987) Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development. *Development* 99: 371-382
77. Monk M, McLaren A (1981) X-chromosome activity in foetal germ cells of the mouse. *J Embryol Exp Morphol* 63: 75-84

78. Nayernia K, Nolte J, Michelmann HW, Lee JH, Rathsack K, Drusenheimer N, Dev A, Wulf G, Ehrmann IE, Elliott DJ, Okpanyi V, Zechner U, Haaf T, Meinhardt A, Engel W (2006) In vitro-differentiated embryonic stem cells give rise to male gametes that can generate offspring mice. *Dev Cell* 11: 125-132
79. Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa N (2001) Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Struct Funct* 26: 131-136
80. Novak I, Lightfoot DA, Wang H, Eriksson A, Mahdy E, Hoog C (2006) Mouse embryonic stem cells form follicle-like ovarian structures but do not progress through meiosis. *Stem Cells* 24: 1931-1936
81. Ohinata Y, Payer B, O'Carroll D, Ancelin K, Ono Y, Sano M, Barton SC, Obukhanych T, Nussenzweig M, Tarakhovsky A, Saitou M, Surani MA (2005) Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. *Nature* 436: 207-213
82. Okano M, Xie S, Li E (1998) Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19: 219-220

83. Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergstrom R, Nguyen HN, Byers B, Wilson KD, Wu JC, Simon C, Hovatta O, Reijo Pera RA (2011) Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20: 752-762
84. Park T, Galic Z, Conway A, Lindgren A, Handel Bv, Magnusson M, Richter L, Teitell M, Mikkola H, Lowry W, Plath K, Clark A (2009 ) Derivation of primordial germ cells from human embryonic and induced pluripotent stem cells is significantly improved by coculture with human fetal gonadal cells. *Stem Cells* 27: 783-795
85. Pesce M, Wang X, Wolgemuth DJ, Scholer H (1998) Differential expression of the Oct-4 transcription factor during mouse germ cell differentiation. *Mech Dev* 71: 89-98
86. Peters L, Meister G (2007) Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell* 26: 611-623
87. Pittman DL, Cobb J, Schimenti KJ, Wilson LA, Cooper DM, Brignull E, Handel MA, Schimenti JC (1998) Meiotic prophase arrest with failure of chromosome synapsis in mice deficient for Dmc1, a germline-specific RecA homolog. *Mol Cell* 1: 697-705

88. Qing T, Shi Y, Qin H, Ye X, Wei W, Liu H, Ding M, Deng H (2007) Induction of oocyte-like cells from mouse embryonic stem cells by co-culture with ovarian granulosa cells. *Differentiation* 75: 902-911
89. Reik W, Dean W, Walter J (2001) Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089-1093
90. Reynolds N, Collier B, Bingham V, Gray NK, Cooke HJ (2007) Translation of the synaptonemal complex component Sycp3 is enhanced in vivo by the germ cell specific regulator Dazl. *Rna* 13: 974-981
91. Reynolds N, Collier B, Maratou K, Bingham V, Speed RM, Taggart M, Semple CA, Gray NK, Cooke HJ (2005) Dazl binds in vivo to specific transcripts and can regulate the pre-meiotic translation of Mvh in germ cells. *Hum Mol Genet* 14: 3899-3909
92. Rideout WM, 3rd, Eggan K, Jaenisch R (2001) Nuclear cloning and epigenetic reprogramming of the genome. *Science* 293: 1093-1098
93. Robey PG (2000) Stem cells near the century mark. *J Clin Invest* 105: 1489-1491

94. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, McKay SJ, Kilanowski F, Saunders P, Dorin J, Cooke HJ (1997) The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389: 73-77
95. Saitou M, Barton SC, Surani MA (2002) A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418: 293-300
96. Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A (1996) Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J Androl* 17: 403-408
97. Sato S, Yoshimizu T, Sato E, Matsui Y (2003) Erasure of methylation imprinting of Igf2r during mouse primordial germ-cell development. *Mol Reprod Dev* 65: 41-50
98. Saunders PT, Turner JM, Ruggiu M, Taggart M, Burgoyne PS, Elliott D, Cooke HJ (2003) Absence of mDazl produces a final block on germ cell development at meiosis. *Reproduction* 126: 589-597
99. Scholer HR, Dressler GR, Balling R, Rohdewohld H, Gruss P (1990a) Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex. *EMBO J* 9: 2185-2195

100. Scholer HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P (1990b) New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature* 344: 435-439
101. Schrans-Stassen BH, van de Kant HJ, de Rooij DG, van Pelt AM (1999) Differential expression of c-kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. *Endocrinology* 140: 5894-5900
102. Shah C, Modi D, Sachdeva G, Gadkar S, Puri C (2005) Coexistence of intracellular and membrane-bound progesterone receptors in human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 474-483
103. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R, Goodfellow PN (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244
104. Surani MA (2001) Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122-128
105. Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126: 663-676



106. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T (2000a) The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Gene Dev* 14: 841-853
107. Tanaka SS, Toyooka Y, Akasu R, Katoh-Fukui Y, Nakahara Y, Suzuki R, Yokoyama M, Noce T (2000b) The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells. *Genes Dev* 14: 841-853
108. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147
109. Tilgner K, Atkinson S, Golebiewska A, Stojkovic M, Lako M, Armstrong L (2008) Isolation of primordial germ cells from differentiating human embryonic stem cells. *Stem Cells* 26: 3075-3085
110. Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, Noce T (2003) Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11457-11462

111. Ueda T, Abe K, Miura A, Yuzuriha M, Zubair M, Noguchi M, Niwa K, Kawase Y, Kono T, Matsuda Y, Fujimoto H, Shibata H, Hayashizaki Y, Sasaki H (2000) The paternal methylation imprint of the mouse H19 locus is acquired in the gonocyte stage during foetal testis development. *Genes Cells* 5: 649-659
112. Unni SK, Modi DN, Pathak SG, Dhabalia JV, Bhartiya D (2009) Stage-specific localization and expression of c-kit in the adult human testis. *J Histochem Cytochem* 57: 861-869
113. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034
114. Vincent S, Segretain D, Nishikawa S, Nishikawa SI, Sage J, Cuzin F, Rassoulzadegan M (1998) Stage-specific expression of the Kit receptor and its ligand (KL) during male gametogenesis in the mouse: a Kit-KL interaction critical for meiosis. *Development* 125: 4585-4593

115. Vincent SD, Dunn NR, Sciammas R, Shapiro-Shalef M, Davis MM, Calame K, Bikoff EK, Robertson EJ (2005) The zinc finger transcriptional repressor Blimp1/Prdm1 is dispensable for early axis formation but is required for specification of primordial germ cells in the mouse. *Development* 132: 1315-1325
116. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* 7: 618-630
117. Wilhelm D, Palmer S, Koopman P (2007) Sex determination and gonadal development in mammals. *Physiol Rev* 87: 1-28
118. Wylie CC, Stott D, Donovan PJ (1986) Primordial germ cell migration. *Dev Biol (N Y 1985)* 2: 433-448
119. Xu EY, Moore FL, Pera RA (2001) A gene family required for human germ cell development evolved from an ancient meiotic gene conserved in metazoans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7414-7419

120. Ying Y, Liu XM, Marble A, Lawson KA, Zhao GQ (2000) Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* 14: 1053-1063
121. Ying Y, Qi X, Zhao GQ (2001) Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7858-7862
122. Yoshida K, Kondoh G, Matsuda Y, Habu T, Nishimune Y, Morita T (1998) The mouse RecA-like gene Dmc1 is required for homologous chromosome synapsis during meiosis. *Mol Cell* 1: 707-718
123. Zhang QY, Qiu SD, Ge L (2004) [Studies on expression and location of VEGF protein in rat testis and epididymis]. *Shi Yan Sheng Wu Xue Bao* 37: 1-8
124. Zhang Y, Tycko B (1992) Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat Genet* 1: 40-44
125. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, Trauger S, Bien G, Yao S, Zhu Y, Siuzdak G, Scholer HR, Duan L, Ding S (2009) Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell* 4: 381-384

126. Ziebe S, Loft A, Petersen JH, Andersen AG, Lindenberg S, Petersen K, Andersen AN (2001) Embryo quality and developmental potential is compromised by age. *Acta Obstet Gynecol Scand* 80: 169-174



**IX**

# **ANEXOS**

*“Vive como si fueras a morir mañana. Aprende como si fueras a vivir para siempre.”*

Mahatma Gandhi (1869-1948) Político y pensador indio.





**1.- ANEXO I: MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE BIOPSIA TESTICULAR.**

**CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN EL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN TITULADO “ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS MARCADORES GERMINALES c-KIT, SSEA-1 Y VASA EN BIOPSIAS TESTICULARES DE PACIENTES CON AZOOSPERMIAS SECRETORAS Y OBSTRUCTIVAS”.**

Con el fin de que pueda decidir si desea participar en este estudio, usted debe comprender las ventajas e inconvenientes del mismo para que sea capaz de tomar una decisión informada al respecto. Este proceso es lo que se conoce como consentimiento informado.

Este consentimiento informado le da información detallada sobre el estudio y además, su médico comentará esta información con usted. Cuando haya comprendido el estudio, se le solicitará que firme este consentimiento informado si desea participar en él. Se le dará una copia de este documento para que pueda guardarlo.

La posibilidad de que usted(es) done(n) este material biológico se ampara en la Ley 14/2007, de 3 de julio, sobre investigación

biomédica. Su identidad y todos los datos referentes a su información personal serán confidenciales, salvo que se solicite lo contrario por la ley. No se publicará ninguna información que lo identifique en los informes o publicaciones resultantes de este estudio. Se permitirá el acceso para la revisión de sus registros médicos al Comité Ético, y a las Autoridades Sanitarias. Firmando este documento usted está de acuerdo con este documento. Sus datos se encontrarán protegidos por la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos Personales.

Tiene el derecho de abandonar el estudio en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación médico-enfermo ni se produzca perjuicio en su tratamiento. Si tiene cualquier pregunta relativa al estudio o a sus derechos como paciente, contacte con el Dr. Carlos Simón Vallés, investigador principal del Banco Nacional de Células Madre Embrionarias - Nodo de la Comunidad Valenciana, y director científico de la Fundación IVI. E-mail: csimon@cipf.es

La esterilidad es un problema de salud que afecta al 15% de las parejas en edad reproductiva. Entre las muchas causas que la pueden causar, está la disminución de las células germinales masculinas, conocidas como espermatozoides, así como un gran empeoramiento de su calidad para dar lugar a embriones sanos. En estos casos, el diagnóstico de la patología asociada al problema es un punto clave para la elección del tratamiento más adecuado que

conlleve al éxito reproductivo. Es por ello que el desarrollo de nuevas técnicas analíticas que aprovechen los últimos avances técnicos es necesario con el fin de facilitar la labor diagnóstica.

Nuestro estudio pretende avanzar en el conocimiento de diferentes marcadores germinales masculinos con el fin de desarrollar nuevas herramientas diagnósticas que ayuden a la adecuación del tratamiento de hombres aquejados de problemas de fertilidad.

Mediante este consentimiento, usted accede a **donar** para poder ser utilizado en el estudio arriba mencionado y crear las condiciones de cultivo necesarias para la obtención de células madre pluripotentes, **el material sobrante de la biopsia testicular**, la cual se destinará a la obtención de sus espermatozoides o sus espermátidas para la posible fecundación *in vitro* o congelación.

Así mismo, queremos manifestarle claramente que si en algún momento usted(es) decidiera(n) revocar esta decisión, puede(n) hacerlo libremente, siendo las muestras celulares y/o los cultivos o material celular obtenidos a partir de ellas destruidos, sin que su relación con el equipo médico que la atiende se vea afectada en ningún momento.

Nº Historia de la paciente:

**TÍTULO DEL ESTUDIO: “Análisis comparativo de los marcadores germinales c-KIT, SSEA-1 y VASA en biopsias testiculares de pacientes con azoospermias secretoras y obstructivas”.**

**INVESTIGADOR PRINCIPAL DEL PROYECTO: Dr. Carlos Simón Vallés.**

D. \_\_\_\_\_  
(nombre y apellidos), mayor de edad, con DNI \_\_\_\_\_,  
MANIFIESTO que tras haber sido debidamente informada/os sobre el estudio a realizar, ACEPTO de forma libre y consciente la donación de parte de la muestra de biopsia testicular necesaria para llevar a cabo el proyecto de investigación arriba mencionado.

En Valencia, a

Firma y DNI del participante

Firma y DNI del Testigo

-----

REVOCACIÓN:

D.....  
, mayor de edad, con domicilio en .....  
....., con DNI ..... y  
D....., con DNI.....

MANIFIESTO que he decidido dejar el estudio y que no se utilice para investigación ninguna muestra biológica que me haya sido extraída.

En Valencia, a.....

## **2.- ANEXO II: PUBLICACIONES CIENTÍFICAS DERIVADAS DE LA PRESENTE TESIS DOCTORAL.**

### **2.1.- Revistas internacionales.**

1. Medrano JV, Ramathal C, Nguyen HN, Simon C, Reijo-Pera RA (2011) Divergent RNA-Binding Proteins, DAZL and VASA, Induce Meiotic Progression in Human Germ Cells Derived In vitro. *Stem Cells*
2. Panula S, Medrano JV, Kee K, Bergstrom R, Nguyen HN, Byers B, Wilson KD, Wu JC, Simon C, Hovatta O, Reijo Pera RA (2011) Human germ cell differentiation from fetal- and adult-derived induced pluripotent stem cells. *Hum Mol Genet* 20: 752-762
3. Medrano JV, Marques-Mari AI, Aguilar CE, Riboldi M, Garrido N, Martinez-Romero A, O'Connor E, Gil-Salom M, Simon C (2010) Comparative analysis of the germ cell markers c-KIT, SSEA-1 and VASA in testicular biopsies from secretory and obstructive azoospermias. *Mol Hum Reprod* 16: 811-817

4. Aguilar C, Poo ME, Gomez E, Galan A, Sanchez E, Marques-Mari A, Ruiz V, Medrano J, Riboldi M, Enseñat-Waser R, Valbuena D, Simon C (2009) Derivation, Characterization, Differentiation and Registration of Seven Human Embryonic Stem Cell Lines (VAL-3, -4, -5, -6M, -7, -8, and -9) on Human Feeder. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 46(3-4):317-26
5. Marques-Mari AI, Lacham-Kaplan O, Medrano JV, Simon C (2009) Differentiation of Germ Cells and Gametes from Stem Cells. *Hum Reprod Update* 1: 1–12

## **2.2.- Capítulos de libro.**

1. Medrano JV, Simon S, Reijo Pera R. Human germ cell differentiation from pluripotent embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells (2012) In Wassarman and Rosenwaks (ed.), Human fertility. Mount Sinai School of Medicine publishing group
2. Medrano JV, Marqués-Marí AI, Simon C. Germline Differentiation From Stem Cells (2010) In Sook-Cheng LIM (ed.), Stem cells: from bench to the bedside, 2<sup>nd</sup> edition. World Scientific publishing 557-582

3. Marques-Mari AI, Medrano JV, Simon C. Differentiating Gametes from Stem Cells (2009) In H. Baharvand (ed.), Trends in Stem Cell Biology and Technology. Humana press 137-147

### **2.3.- Congresos.**

1. Medrano JV, Nguyen HN, Ramathal C, Simon C, Reijo Pera RA. Ectopic expression of conserved RNA-binding proteins induces meiotic progression in germ cells differentiated from pluripotent human stem cells. European Society of Human Reproduction and Embryology Annual Meeting 2010. Estocolmo, Suecia, Junio de 2011. Tipo de participación: Poster.
2. Medrano JV, Panula S, Kee K, McElroy SL, Hovatta O, Simon C, Reijo Pera RA. Overexpression of conserved RNA-binding proteins promotes meiotic progression in germ cells differentiated from pluripotent stem cells. Stanford School of Medicine Annual Stem Cell Retreat 2010. Stanford, CA, USA. Enero de 2011. Tipo de participación: Poster.



3. Medrano JV, Panula S, Kee K, Nguyen HN, McElroy SL, Bergstrom R, Hovatta O, Simon C, Reijo Pera RA. Overexpression of conserved RNA-binding proteins promotes meiotic progression in germ cells differentiated from pluripotent stem cells. Cold Spring Harbor Germ Cell meeting 2010. Cold Spring Harbor, NY, USA. Octubre de 2010. Tipo de participación: Speaker.
  
4. Jose V. Medrano, M<sup>a</sup> Eugenia Poo and Carlos Simón. Células Madre y Medicina Regenerativa. Semana de la Ciencia UPV 2008. Campus de Alcoy de la Universidad Politécnica de Valencia, Alicante, Spain. Noviembre de 2008. Tipo de participación: Speaker.