



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Biotecnología de la Reproducción Humana Asistida

TESIS DOCTORAL

**“Identificación, caracterización y aislamiento
de células madre somáticas
en los miomas humanos”**

Autora:

Aymara Mas Perucho

Licenciada en Biología

Directores:

Prof. Carlos Antonio Simón Vallés

Dra. Irene Cervelló Alcaraz

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).

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Identificación, caracterización y aislamiento de células madre somáticas en los miomas humanos”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Aymara Mas Perucho 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 12 de Julio de 2012.

Fdo. Prof. Carlos Antonio Simón Valles



Dra. Irene Cervelló Alcaraz, Doctora en Biología e Investigadora de la Fundación IVI.

CERTIFICA:

Que el trabajo de investigación titulado: **“Identificación, caracterización y aislamiento de células madre somáticas en los miomas humanos”** ha sido realizado íntegramente por Dña. Aymara Mas Perucho 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 12 de Julio de 2012.

Fdo. Dra. Irene Cervelló Alcaraz

AGRADECIMIENTOS

Siempre que leo un libro, observo las páginas en las que los autores presentan sus agradecimientos. Lo hago porque creo que son una parte importante del trabajo publicado.

Esta es la primera vez que una servidora hace un trabajo tan extendido que representa el fin-comienzo de una nueva etapa de mi vida. Por ello, quiero expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me han acompañado en este viaje. Sin ellas, hubiese sido imposible afrontar con éxito la elaboración de este proyecto, en la que tanta ilusión he puesto.

En primer lugar, quiero agradecer al profesor Carlos Simón, mi director de tesis, la oportunidad y confianza depositada en mí desde el inicio. Gracias por haber sido mi ejemplo, mi punto de referencia, porque a tu lado he aprendido y aprendo muchísimo día a día.

A mi co-directora Irene Cervelló, gracias por tu disponibilidad y orientación, por el seguimiento y supervisión continua de la presente tesis, pero sobre todo gracias por la motivación y el apoyo recibido a lo largo de estos años.

A los doctores Pellicer y Remohí, por permitir la realización de esta tesis en los laboratorios de la Fundación IVI.

A todos los miembros del IVI que, en mayor o menor medida, han ayudado a la elaboración de esta tesis proporcionando muestras o apoyo técnico, especialmente a Vicenta y al Dr. Jaime Ferro.

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a mis compañeros de Fundación IVI, Tamara, Alicia, Claudia, Amparo, Horten, Carmen, Leslie, Isa, Juanma, Sebas, Paco, José Vicente, Felip, Ana, Mercedes y a la recién incorporada Eva. Gracias a todos por vuestro cariño, por ayudarme, quererme y aceptarme como soy. Por hacerme más fácil la convivencia día a día con almuerzos, debates, confesiones... Aunque solo os haya nombrado, cada uno sabe lo que significa para mí y todo lo que hemos compartido en estos años.

Agradecer de forma especial a mis amigas y compañeras de viaje: Claudia y Amparo. Sin vosotras nada habría tenido sentido. Gracias por todas las horas y esfuerzo dedicados. Gran parte del trabajo es vuestro. Ha sido un placer trabajar codo con codo.

Gracias también a los compañeros que han estado y por algún motivo u otro ya no están. Porque de vosotros he obtenido más que apoyo y amistad. Carlos Estella, Isabel Galarza, Laura, Federica, Oscar, Paquillo, Josón, Patri... os deseo todo lo mejor.

A la gente de administración: Jaime, Loreto, Carmen, Mari Carmen, Raquel, Teresa, Marcos y Leo, gracias por hacer más fácil todos los aspectos burocráticos e informáticos que tanto nos complican la vida a veces. A los Igenómicos María Ruiz y David Blesa. Gracias también a toda la gente de DGP: Ana, Julio, Pere, José Antonio, Vicente, Mila, Mariaje y a nuestros compañeros más recientes de FISH, con los que espero compartir buenos momentos.

A mis compañeros del CIPF, a cada uno de ellos, gracias por los momentos compartidos. Diana, Amparo Galán, Eva Sánchez, Marcia, Cristóbal, Eva Gómez, José Vicente, Anabel, Ana Martínez y María Eugenia. Os deseo lo mejor en esta nueva etapa que nos ha tocado vivir. Pero sobretodo a mis cómplices Sonia, Vero y María, gracias por vuestro cariño y apoyo día tras día, por todas las cosas que nos unen.

A José Enrique O'Connor y todo su equipo, por su apoyo y amabilidad. Especialmente a Alicia y Domingo, por hacer tan amenas las tardes sorteo y por facilitarme tanto las cosas. Ha sido un placer conocerlos y poder colaborar con vosotros.

A Viviana Bisbal, veterinaria del CIPF, por su cercanía y ayuda con el manejo de animales.

A Marga, gracias por haberme guiado y asesorado durante estos meses. Por demostrarme tu preocupación y apoyo para que todo esto saliera adelante de la mejor forma posible.

A mis compañeros de la Uni, por los comienzos en este mundo *bioloco*, porque a pesar de la distancia, siempre os tengo presentes y porque la mayoría han pasado, están pasando o pasarán por la misma situación que yo. Gracias Eliseta, Fer, Carmenxu, Ana, Elena, Sarah, Aranza y especialmente a Teresa, por tu amistad incondicional, por tu apoyo y por tu cariño.

A mis amigas de siempre, porque habéis estado a mi lado día a día aún sin entender nada de lo que hacía: Tamara, Rosa, Maite, María, Juan, Ari, Virginia H, Vita, Ángela y Virginia S, mil gracias chicas. Pero sobretodo, agradecer a mi fiel amiga Ana el apoyo recibido durante estos años, por ayudarme a ver el lado bueno de las cosas y por ser mi espejo tantas veces. Porque nuestra amistad perdure toda la vida.

A mis amigos más recientes pero no por ello menos importantes en mi vida, Cris y Bau, Lorena y Quique, Sisa y Primo, Víctor y Sheila, Mari y Blesa y en general a toda la cuadrilla de Segorbe, por todo lo que nos queda por compartir juntos.

Gracias a toda mi familia, la cercana y la lejana, la política y la heredada: tíos Carmen y Jorge, Mari y Goyo, tía Carmen, Vicenta, Anna...Y en especial a dos personas que han sido mi sosiego y distracción en los momentos más difíciles: Vicenta y Luis, gracias por suplir el papel de mis abuelos a los que apenas he tenido oportunidad de conocer y por quererme como una nieta más.

A mi hermano, mi chico pequeño, por hacerme sentir un ejemplo a seguir y por tener el privilegio de ser su "*chacha*". Porque te querré siempre.

A mi padre, porque me has inculcado valores tan importantes como el cariño, la honradez y el esfuerzo, por demostrarme que en la vida se puede conseguir lo que deseas si te lo propones. Gracias por ser mi paño de lágrimas en los momentos más difíciles y por disfrutar a mi lado todo lo bueno que nos ha pasado. Te quiero papi.

A mi madre, por tu amor incondicional y tu ejemplo de trabajo y superación. Por darme todo sin esperar nada a cambio, por disfrutar y sufrir conmigo, por enseñarme a vivir. Porque a pesar de tus despistes, sé que siempre estarás ahí. Te adoro mamá.

Finalmente quiero dedicarle esta tesis a la persona con la que comparto mi vida desde hace ocho años, la que me da fuerzas para levantarme todas las mañanas y la que me anima en los momentos más difíciles. Paco eres mi mejor amigo, mi compañero, mi confidente. Gracias por tu infinita paciencia. Sin tu cariño y apoyo continuo, simplemente no habría llegado hasta aquí. Te quiero.

El presente trabajo de tesis doctoral ha sido realizado en parte en los laboratorios de la Fundación IVI, así como en los laboratorios del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia, y también en las dependencias del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), gracias a la ayuda de un proyecto de investigación con la Universidad de Valencia en la Facultad de Medicina, Departamento de Obstetricia y Ginecología que ha sido financiado por la ayuda PROMETEO de la Generalitat Valenciana para la realización de proyectos I+D para grupos de investigación (Diciembre 2008-Diciembre 2011).

SIGLAS, ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y ANGLICISMOS

7-ADD:	7-aminoactinomicina
ABCG2:	A TP- b inding c assette sub-family G member 2
ADN:	Ácido D esoxirribo N ucleico.
ADNc:	Ácido D esoxirribo N ucleico c omplementario.
APC:	Allophycocyanin (aloficocianina)
ARN:	Ácido R ibo N ucleico.
ARNm:	Ácido R ibo N ucleico m ensajero.
A-T:	Adenina- Timina
BSA:	B ovine S erum A lbumin
BSP:	B one s ialoprotein
CALP:	Calponina (receptor muscular)
CE:	C loning E fficiency (Eficiencia clonal)
CEEA:	C omité É tico de E xperimentación con a nimales
CIPF:	C entro de I vestigaciones P ríncipe F elipe
CIT:	C ell I nitiator of T umor (célula iniciadora de tumor)
CMF:	C itometría de F lujo
TC:	T omografía C omputarizada
DAPI:	4',6-diamidino-2-phenylindole
DEPC:	D ietil P iro c arbonato
DMEM:	D ulbecco's m odified E agle's m edium
DNasa:	D esoxirribonucleasa
dNTP:	D eoxyribonucleotide t riphosphate
E₂:	E stradiol.
ESCs:	E mbryonic S tem C ells (células madre embrionarias)
ESR1:	Receptor de estrógenos α
EDTA:	E thylenediaminetetraacetic a cid

FC:	F old C hange (tasa de cambio, número de veces de cambio de una situación con respecto a otra).
FITC:	Isotiocinato de fluoresceína
FS:	F orward S catter
FSHr:	Receptor de la hormona folículo-estimulante
FT:	F racción T otal
GAPDH:	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
G-C:	G uanina- C itosina
HBSS:	H ank's b uffered s alt s olution
HEPES:	(4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)
H&E:	H ematoxilina y E osina.
IBMX:	3- i sobuty- l - m ethyl- x anthine
ICM:	I nnner C ell M ass (masa celular interna)
IMR:	Imagen de resonancia m agnética
IP:	Ioduro de P ropidio
IVI:	Instituto V alenciano de I nfertilidad.
LDH:	Lactato deshidrogenasa
LeioSP:	Línea generada a partir de la Side Population de miomas
LHr:	Receptor de hormona luteinizante.
MCGS:	M esenchymal C ell G rowth S upplement
MMLV-RT:	Moloney Murine Leukemia Virus R etro- T ranscriptase (retrotranscriptasa del virus murino de la leucemia Moloney).
MDR1:	M ulti D rug R esistance 1
N:	número de muestras.
NK:	N atural- K iller (células nulas)
NOD:	N on- O bese D iabetic
NSP:	N on S ide P opulation
O₂:	O xígeno
P₄:	P rogesterona

PBS:	Phosphate buffered saline (tampón salino fosfato)
PGC:	Primordial Germ Cells (células madre germinales)
PGR:	Receptor de progesterona
PE:	Phycoerythrin (ficoeritrina)
p/v:	peso/ volumen
RNasa:	Ribonucleasa
RNM:	RNM: Resonancia nuclear magnética
RT-PCR:	RT-PCR: Real Time Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real).
SBF:	Suero Bovino Fetal
SCID:	Severe Combined Immune Deficiency
SMOOTH:	smoothelina (receptor muscular)
SP:	Side population
SS:	Side Scatter
SSC:	Somatic Stem Cells (células madre somáticas)
TA:	Transit Amplifying cells (células de amplificación transitoria)
TAC:	Tomografía axial computarizada
Taq:	ADN polimerasa
VAL-9:	Línea de células madre embrionarias
v/v:	volumen/ volumen

ANGLICISMOS:

Batch Effect: tendencia en los resultados debida a las condiciones del experimento.

Blast: (Basic Local Alignment Search Tool) es un programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local, ya sea de ADN, ARN o de proteínas.

Dot plots: Representación gráfica que permite la comparación de secuencias biológicas y la identificación de determinadas regiones de interés.

Fold change (FC): tasa de cambio.

Forward Scatter (FS): Luz dispersada a 0° en un citómetro de flujo

Imprinting: impronta génica

In vivo: En el cuerpo. Conjunto de experimentos y de fenómenos observados que se efectúan directamente sobre el organismo vivo.

In vitro: Conjunto de fenómenos observados en el laboratorio, investigando y manipulando fuera del organismo vivo.

Microarray de expresión génica: Matriz bidimensional de soporte sólido en las que están impresas miles de sondas que detectan los genes expresados con una secuencia conocida.

Pathway: ruta de señalización.

Pellet: comprimido hormonal

Primer: cebador. Secuencia corta de ácido nucleico que contiene un grupo 3'hidroxilo libre que forma pares de bases con una hebra molde complementario y actúa como punto de inicio para la adición de nucleótidos con el fin de copiar la hebra molde.

Screening: cribado o tamizaje

Side Population (SP): Población lateral

Side Scatter (SS): luz dispersada a 90° del eje de haz lumínico

Software: programa informático.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.- INTRODUCCION.....	1
1. El útero: fisiología y patología.....	1
1.1 El endometrio humano.....	1
1.2 El miometrio humano.....	4
1.3 Alteraciones del miometrio.....	4
1.3.1 Adenomiosis.....	4
1.3.2 Miomas o fibromas uterinos.....	6
1.3.3 Leiomiomas.....	9
1.4 Teorías relacionadas con la formación de miomas.....	10
2. Implicación de las células madre en el desarrollo de miomas..	12
2.1 Tipos de células madre y clasificación.....	12
2.1.1 Células madre embrionarias.....	13
2.1.2 Células madre germinales.....	15
2.1.3 Células madre de teratocarcinomas.....	16
2.1.4 Células madre somáticas.....	17
3. Células madre somáticas en el útero humano.....	21
3.1 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano.....	21
3.2 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en el miometrio humano.....	23
3.3 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en los miomas.....	25
II. -HIPÓTESIS.....	31

III.-OBJETIVOS.....	35
IV.-DISEÑO EXPERIMENTAL.....	39
1. Identificación, aislamiento y caracterización de la Side Population.	39
2. Modelo <i>in vitro/ in vivo</i>	40
V.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
1. Obtención de candidatas a células madre somáticas formadoras de miomas.....	45
1.1 Muestras biológicas y criterios de inclusión.....	45
1.2 Aislamiento de la Side Population.....	45
1.2.1 Obtención y procesado de muestras biológicas....	46
1.2.1 Citometría de flujo.....	47
1.2.3 Viabilidad celular.....	51
1.2.4 Tinción con Hoechst.....	52
1.2.5 Aislamiento de las células Side Population.....	54
1.3 Caracterización molecular de la Side Population.....	55
1.3.1 Aislamiento de ARN.....	55
1.3.2 Retrotranscripción.....	56
1.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa.....	57
1.4 Transcriptómica de la Side Population.....	63
1.4.1 Aislamiento de ARN.....	64
1.4.2 Análisis transcriptómico: <i>microarrays</i> de expresión	65
1.4.3 Validación de la técnica de <i>microarrays</i>	66

2. Modelo <i>in vitro</i>: Generación de líneas celulares a partir de la Side Population de miomas.....	67
2.1 Ensayo de clonogenicidad <i>in vitro</i>	67
2.2 Creación de líneas celulares: LeioSP1 y Leio SP2.....	67
2.3 Análisis citogenético de LeioSP1 y LeioSP2.....	69
2.4 Caracterización molecular de las líneas.....	70
2.5 Caracterización fenotípica de las líneas.....	73
2.6 Diferenciación <i>in vitro</i>	75
2.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	76
3. Modelo <i>in vivo</i>.....	77
3.1 Elaboración de un modelo animal.....	78
3.2 Caracterización inmunohistoquímica en tejidos candidatos.....	82
3.2.1 Detección de componentes de matriz extracelular en tejidos candidatos.....	82
3.2.2 Inmunohistoquímica de receptores hormonales....	83
3.2.3 Controles.....	84
VI.- RESULTADOS.....	87
1. Identificación, aislamiento y caracterización de candidatas a células madre somáticas en los miomas humanos.....	87
1.1 Viabilidad celular.....	87
1.2 Presencia y aislamiento de la Side Population en miomas.....	88

1.3 Caracterización molecular de la Side Population.....	89
1.4 Perfil génico de la Side Population: <i>arrays</i> de expresión	91
2. Modelo <i>in vitro</i>: Generación y caracterización de líneas celulares obtenidas a partir de la SP de miomas humanos: LeioSP1 y LeioSP2.....	94
2.1 Evaluación de eficiencia clonal.....	94
2.2 Generación y establecimiento de líneas: LeioSP1 y LeioSP2.....	96
2.3 Análisis molecular e inmunofenotipo de LeioSP1 y LeioSP2.....	97
2.4 Diferenciación adipogénica y osteogénica de LeioSP1 y LeioSP2.....	100
3. Modelo <i>in vivo</i>: Reconstrucción de tejido miomatoso humano en ratones NOD-SCID desde las líneas LeioSP1y LeioSP2.....	102
3.1 Modelo Animal.....	102
3.2 Caracterización inmunohistoquímica del tejido reconstruido.....	103
VII.-DISCUSIÓN.....	109
VIII.- CONCLUSIONES.....	125
IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	129
X.- ANEXOS.....	153

I. Introducción

∞ Lo que con mucho trabajo se adquiere, más se ama ∞
Aristóteles

I.- INTRODUCCIÓN

1. El útero: fisiología y patología

Situado en la cavidad pélvica, el útero es un órgano muscular, extraperitoneal y hueco, destinado a albergar el embarazo. Tiene forma de pera invertida y presenta un estrechamiento circular denominado istmo que lo divide en dos regiones anatómicas distintas: el cérvix y el cuerpo. A su vez, la pared gruesa del útero se compone desde dentro hacia fuera, principalmente por tres capas: endometrio, miometrio y serosa o perimetrio (tejido laxo que se extiende por los lados del útero), tal y como se detalla a continuación(Figura1).

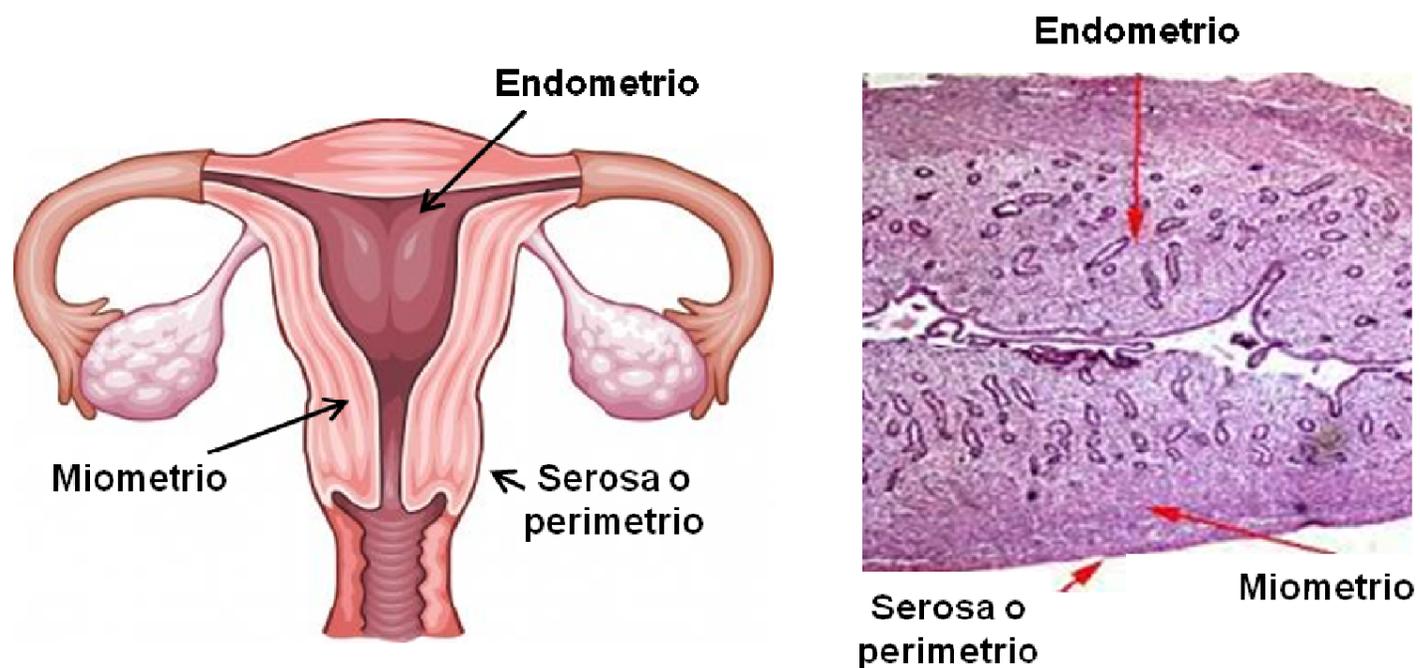


Figura 1. Representación esquemática e histología del útero humano.

1.1 El endometrio humano

El endometrio humano es la capa mucosa que tapiza el interior de la cavidad uterina. Está regulado hormonalmente y sufre unos cambios periódicos que son la base del ciclo menstrual en humanos y primates

INTRODUCCIÓN

superiores. Estos cambios van a servir para su preparación en la adquisición del estado receptivo, imprescindible para la implantación embrionaria y el desarrollo de la gestación. Asimismo, puede sufrir alteraciones patológicas como la endometriosis y el cáncer endometrial.

Desde el punto de vista celular-histológico, el endometrio se encuentra constituido por un compartimento epitelial, uno estromal y otro vascular con la existencia, además, de una población de células inmunes residentes. Todo ello se encuentra distribuido en dos regiones denominadas *capa functionalis* y *capa basalis*. La primera responde a progesterona y estradiol, ejerciendo su acción a través de mediadores locales que actúan de manera paracrina sobre las células vecinas o sobre las propias células del endometrio de manera autocrina (Giudice, 1994; Giudice y cols., 2002), dando lugar a la descamación durante la menstruación y a lo largo del ciclo reproductivo de la mujer. Por el contrario, la región *basalis* no responde a hormonas esteroideas y no sufre descamación, constituyendo la base para la regeneración cíclica del endometrio.

Durante el ciclo menstrual, el endometrio sufre una serie de cambios en respuesta a fluctuaciones en los niveles de hormonas esteroideas procedentes del ovario. Ello hace que a lo largo del ciclo se distingan dos fases: la proliferativa y la secretora, separadas ambas por la ovulación (Figura2).

Fase proliferativa: en ella se desarrolla el folículo que contiene el ovocito. Se extiende desde el final de la menstruación (día 28/0) hasta la ovulación (día 14), y en ella existe una secreción elevada de estrógenos. En esta fase, todos los componentes del endometrio sufren una intensa

proliferación; se hacen visibles muchas mitosis y aumenta el grosor endometrial desde 0,5 mm hasta unos 7 mm (McLennan y Rydell, 1965). Se produce una inducción de los receptores de progesterona, que permitirán a las células responder a esta hormona durante la segunda mitad del ciclo. Varios factores de crecimiento y citoquinas como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de fibroblastos y el factor de crecimiento de células vasculares endoteliales entre otros, favorecen esta rápida proliferación (Figura 2).

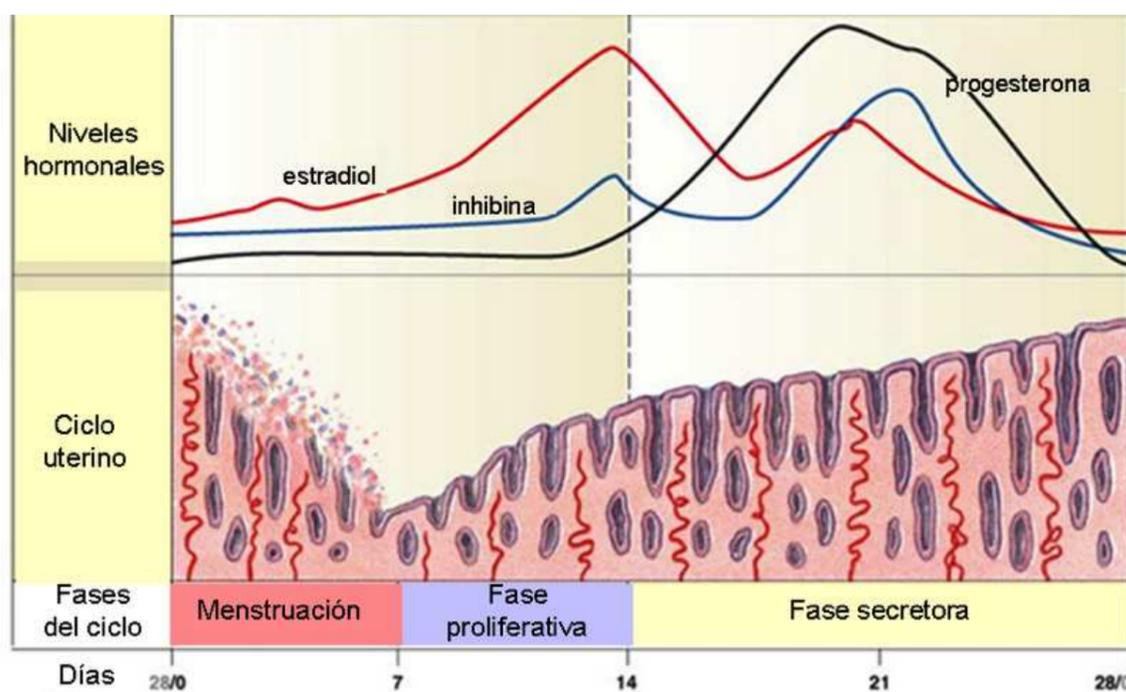


Figura 2. Representación gráfica del endometrio humano durante las distintas fases del ciclo menstrual

Fase secretora: comprendida desde el momento de la ovulación (día 14) hasta la menstruación (día 28/0). En ella, la concentración de progesterona aumenta debido a la secreción del cuerpo lúteo, y los estrógenos permanecen altos. Todos estos cambios están enfocados a la preparación del endometrio para la implantación del embrión. De modo que en ausencia de fecundación, el cuerpo lúteo se degenera y, los niveles de hormonas ováricas caen bruscamente, produciéndose la involución y descamación del endometrio, dando lugar al flujo menstrual (Figura 2).

1.2 El miometrio humano

Constituye casi la totalidad de la pared uterina y está formado por una intrincada red de fibras musculares lisas, dispersas en una matriz extracelular de tejido conectivo principalmente por fibras de colágeno y proteoglicanos. Esta musculatura está dispuesta en 3 capas: una capa fina externa longitudinal, una oblicua media y una circular submucosa, que aportan al útero su tonicidad normal.

En humanos, el crecimiento del útero durante el embarazo se debe principalmente a la hipertrofia (aumento del tamaño celular) del miometrio, sin embargo en las primeras semanas de gestación también tiene lugar una importante hiperplasia (aumento en el número de células) que contribuye de forma más significativa a este engrosamiento del miometrio. Ambos procesos contribuyen de forma dramática al crecimiento del útero durante el embarazo, exhibiendo una expansión hasta 20 veces superior a la longitud de la fibra del estado no grávido, y se repite sucesivamente en cada gestación (Ramsey, 1994). También existe un aumento en el número de uniones estrechas entre las células miometriales, que conducen el estímulo electrofisiológico y favorecen una adecuada transmisión de las contracciones uterinas antes de iniciarse el parto (Garfield y cols., 1977).

1.3 Alteraciones del miometrio

1.3.1 Adenomiosis

La adenomiosis es una enfermedad benigna del útero en la cual componentes normalmente limitados al endometrio son encontrados en el miometrio. Los adenomiomas se presentan como un nódulo circunscrito

compuesto por fibras musculares lisas, glándulas endometriales y ocasionalmente estroma endometrial. Puede presentarse como un pólipo endometrial o como una masa intramiometrial (Fukunaga y cols., 1995).

La prevalencia exacta no es conocida, aunque algunos estudios consideran que el 20% de las mujeres padecen la enfermedad, siendo más frecuente entre los 40 y 50 años. Sin embargo, cuando se efectúa un análisis microscópico cuidadoso su prevalencia puede incrementar hasta en un 65%.

La causa de la adenomiosis es también desconocida. La teoría más aceptada acerca del desarrollo de la enfermedad propone que la barrera entre el endometrio y el miometrio se encuentra alterada, la cual normalmente previene la invasión de las glándulas endometriales y el estroma hacia el miometrio. Esta alteración permite que ocurra invasión hacia el miometrio. Se piensa que este proceso solo ocurre bajo la presencia de estrógenos, sin embargo, existe muy poca evidencia científica que apoye esta hipótesis.

En la mayoría de casos, la adenomiosis está asociada con otros trastornos uterinos. De hecho, más del 80% de las mujeres con adenomiosis tienen otro proceso patológico asociado: 50% tienen fibromas, 11% endometriosis (tejido endometrial fuera del útero, más común en los ovarios) y 7% tienen pólipos endometriales (sobrecrecimiento benigno del tejido endometrial). Por todo ello, los síntomas de estas patologías asociadas pueden a menudo ocultar el diagnóstico de adenomiosis.

1.3.2 Miomas o fibromas uterinos

Los miomas uterinos también conocidos como leiomiomas, fibromas o fibroides uterinos, son el tumor pélvico benigno más frecuente en la mujer (Stewart y cols., 2001). Crecen en el miometrio y se caracterizan por ser masas firmes, blanquecinas o rosado grisácea, fasciculadas, bien delimitadas y no encapsuladas. Histológicamente están constituidos por haces de musculatura lisa con un alto contenido en matriz extracelular fundamentalmente colágeno, fibronectina y proteoglicanos.

Pueden presentar diferentes tamaños, ser únicos o múltiples. Se clasifican generalmente en función de su localización en el útero, distinguiendo entre **submucosos** – se originan en la pared miometrial y hacen protrusión hacia la cavidad endometrial-, **intramurales** - localizados en el miometrio, pudiendo distorsionar la cavidad uterina- y **subserosos** – situados debajo de la serosa uterina protruyendo en su crecimiento hacia la cavidad abdominal, estos a su vez pueden ser pedunculados (adosados al cuerpo del útero por un tallo estrecho) o sésiles (de base ancha) (Figura 3).



Figura 3. Representación gráfica de un útero polimiomatoso en el que se pueden observar los distintos tipos de miomas.

A nivel histológico también se han identificado varios subtipos de miomas: **miomas celulares** - constituidos por células pequeñas y citoplasma escaso-, **atípicos**- con células atípicas distribuidas por el tumor-, **epiteloides**- incluyen los leiomioblastomas y los miomas plexiformes, su conducta clínica va a depender de la atipia, grado de hialinización, tamaño y actividad mitótica-, **mixoides**- bien circunscritos sin numerosas mitosis ni atipias-, **lipoleiomiomas**- con áreas de tejido adiposo, circunscritas o difusas y **miomas con túbulos**- poco frecuentes, se observan túbulos revestidos por epitelio y diferenciación mesotelial.

Aunque las causas exactas de los miomas son desconocidas, existe una cierta tendencia hereditaria, familiar y racial (National Center for Health Statistics). Esta triada, hace pensar en una etiología genética, sin embargo, hasta el momento, los genes determinantes no han podido ser descritos. También se han descrito factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, de tipo insulínico, etc) y factores hormonales (prolactina, hormona del crecimiento) involucrados en su desarrollo (Flake y cols., 2003).

Estos factores posiblemente son responsables de la iniciación de los cambios genéticos adquiridos, incluyendo anomalías en el miometrio, cambios hormonales, una respuesta al daño isquémico y una elevada presencia de los receptores de estrógenos en el miometrio. De hecho, la aparición y crecimiento de los miomas se ven favorecidos por los estrógenos, por lo que su presentación se produce en la edad fértil de la mujer. Se estima que aproximadamente una de cada cuatro a cinco mujeres en edad reproductiva padecen de este tipo de tumor, resultando muy

INTRODUCCIÓN

infrecuente que lo haga antes de la primera menstruación (menarquia) o después de la menopausia. (Figura 4).

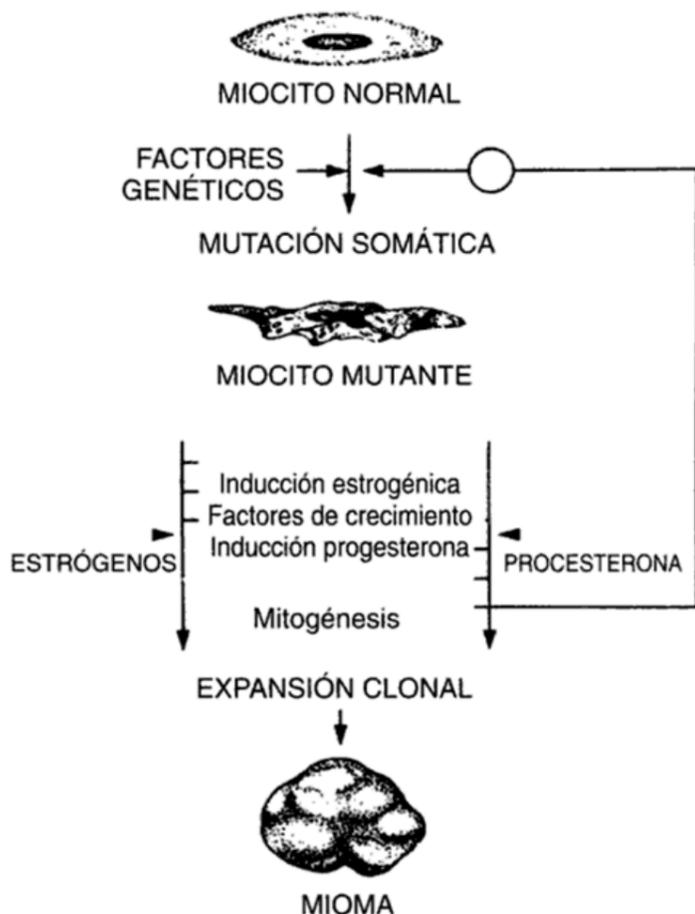


Figura 4. Acción de los diferentes factores que influyen en el desarrollo del mioma uterino.

Obsérvese el papel que se le concede no solo a los estrógenos, sino también a la progesterona, a los factores genéticos y de crecimiento.

En muchos casos, la exploración por un ginecólogo permite detectar la presencia de estos tumores, su tamaño y localización, aunque en pacientes obesas con miomas pequeños, la exploración puede ser confusa (falsos negativos). La técnica diagnóstica más útil es la ecografía, que se puede realizar tanto por vía vaginal como abdominal. Los ecógrafos modernos permiten detectar miomas de hasta 5mm y los sistemas Doppler que incorporan, permiten analizar su vascularización. Otras técnicas diagnósticas son la tomografía axial computerizada (TAC) y la resonancia nuclear magnética (RNM). Además, los estudios de imagen como por ejemplo la ultrasonografía, imágenes de la resonancia magnética (IRM), y tomografía computerizada (TC) pueden ser útiles a la hora de confirmar el diagnóstico y distinguir los miomas de otras lesiones intramurales.

El tratamiento de los miomas depende de varios factores: a) de la edad, b) de que la paciente desee tener hijos o no, c) del número, d) tamaño y e) de la localización de los miomas y por supuesto, de la sintomatología que se presente. Si la paciente desea tener hijos y el mioma puede ser el causante de su infertilidad, la mejor medida será la quirúrgica (Buttram, 1986). Existen técnicas como la histeroscopia y la laparoscopia que evitan heridas mayores y normalmente son ambulatorias (Hurst y cols., 2003). Si los miomas son pequeños y están estables, el mejor tratamiento serán los controles ginecológicos periódicos. Si se observa que los miomas crecen y/o empiezan a causar dolor, hinchazón abdominal y sangrados excesivos, determinados fármacos como los progestágenos, esteroides andrógenos (danazol y gestrinona) y los antiinflamatorios que inhiben la síntesis de las prostaglandinas pueden ayudar a controlarlos. Cuando los miomas crecen muy deprisa, o cuando los síntomas no responden a las medidas farmacológicas, el mejor tratamiento serán técnicas quirúrgicas o procedimientos menos invasivos como es la embolización de arterias que irrigan el mioma por parte de los radiólogos intervencionistas.

1.3.3 Leiomioma

La transformación de los miomas uterinos (benignos) en leiomiomas uterinos (tumores malignos del músculo liso del útero) es extremadamente inusual, y de hecho muchos investigadores y clínicos creen que nunca ocurre este tipo de transformación. Sin embargo, sin un examen patológico del útero, no es posible determinar si es el caso. El diagnóstico con lactato deshidrogenasa (LDH) total en suero y la resonancia nuclear magnética (RNM) con contraste de gadolino (Gd-DTPA) con imágenes cada 40 y 60 segundos ha resultado ser de una alta

precisión. Gracias a estas técnicas se estima que los leiomiomas uterinos se encuentran en aproximadamente el 0.1% de las mujeres con miomas y se ha reportado que están frecuentemente asociados con fibromas grandes o que crecen rápidamente. Por lo tanto, en mujeres con estos tipos de tumores se puede considerar una intervención quirúrgica para descartar el leiomioma, una lesión poco común pero médicamente importante.

1.4 Teorías relacionadas con la formación de miomas

A pesar del importante impacto de los miomas, poco se sabe acerca de las principales causas implicadas en su formación y desarrollo. Hasta hace poco, las hormonas esteroides (estrógeno y progesterona) fueron consideradas los más importantes reguladores del crecimiento de los miomas. Hay abundantes evidencias científicas que indican que el estrógeno fomenta el crecimiento del fibroma, incluyendo las observaciones clínicas de que los fibromas crecen en presencia de altos niveles de estrógeno, durante los años reproductivos, y que sufren un retroceso en presencia de niveles bajos de estrógeno, como se produce después de la menopausia o durante la terapia con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). Además, los fibromas tienen más receptores de estrógenos, y convierten el estradiol a estrona más lentamente que el miometrio normal. (Sabry y cols., 2012)

También se cree que la progesterona desempeña un papel importante en el crecimiento del fibroma, sobre todo a nivel clínico. Por ejemplo, el tamaño del fibroma aumenta durante el tratamiento con progestágenos sintéticos. La disminución del tamaño del mioma bajo

tratamiento con el agente antiprogesterona, RU-486, también apoya el papel de la progesterona como promotor del crecimiento de los fibromas. Histológicamente, los fibromas de las pacientes tratadas con progesterona muestran mayor crecimiento que los de las pacientes sin tratar y a nivel bioquímico, también se observa una mayor concentración de receptores de progesterona en los fibromas que en miometrio normal. En conjunto, estos datos sugieren que la progesterona también aumenta el crecimiento del fibroma.

Otras hormonas como la hormona del crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) también parecen promover el crecimiento de los fibromas, pero su papel aún no está claramente definido.

Más recientemente, se ha demostrado que los factores de crecimiento, (mediadoras de los efectos de promoción del crecimiento de los estrógenos) podrían jugar un papel importante en el desarrollo de fibromas. Los factores potencialmente importantes incluyen factor de crecimiento transformante-beta ($TGF-\beta$), factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento insulínico (IGF), y el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). En general, los factores de crecimiento y la progesterona probablemente también actúan sobre el crecimiento del tumor, pero sólo después de que éstos ya se hayan formado.

La incidencia de miomas con alteraciones cromosómicas es aproximadamente de un 40%, debido fundamentalmente a translocaciones, deleciones y duplicaciones en los cromosomas 7, 12, 14 y 6 (Brosens y cols., 1998). Además se ha visto una posible relación de estas alteraciones

con el tamaño del tumor (Rein y cols., 1998) y su localización (Brosens y cols., 1998).

En los últimos años, se han identificado mutaciones en los genes “*high mobility group*” (HMGA) (Tallini y Dal, 1999; Ligon y Morton, 2000) y en “*mediator complex subunit 12*” (MED12) (Mäkinen y cols., 2011; McGuire y cols., 2012), que parecen ser importantes en el desarrollo de algunos fibromas. Normalmente, estos genes codifican proteínas que ayudan a controlar el crecimiento celular al regular indirectamente la transcripción del ADN. Sin embargo, las mutaciones en estos genes son probablemente cambios secundarios en las células ya genéticamente susceptibles.

2. Implicación de las células madre en el desarrollo de miomas

2.1 Tipos de células madre y clasificación

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

A lo largo del desarrollo ontogénico, podemos identificar y aislar distintos tipos de células madre. Atendiendo a su potencial de desarrollo se clasifican como totipotentes (capaces de diferenciarse en un nuevo organismo), pluripotentes (capaces de dar lugar a cualquier tipo celular del organismo) o multipotentes (dan lugar a células especializadas de su mismo linaje). Dependiendo de su procedencia se distinguen, varios tipos diferentes de células madre: embrionarias, germinales, de teratocarcinomas y somáticas,

tal y como se muestra en la figura 5 (Thomson, 1998; Reubinoff y cols., 2000).

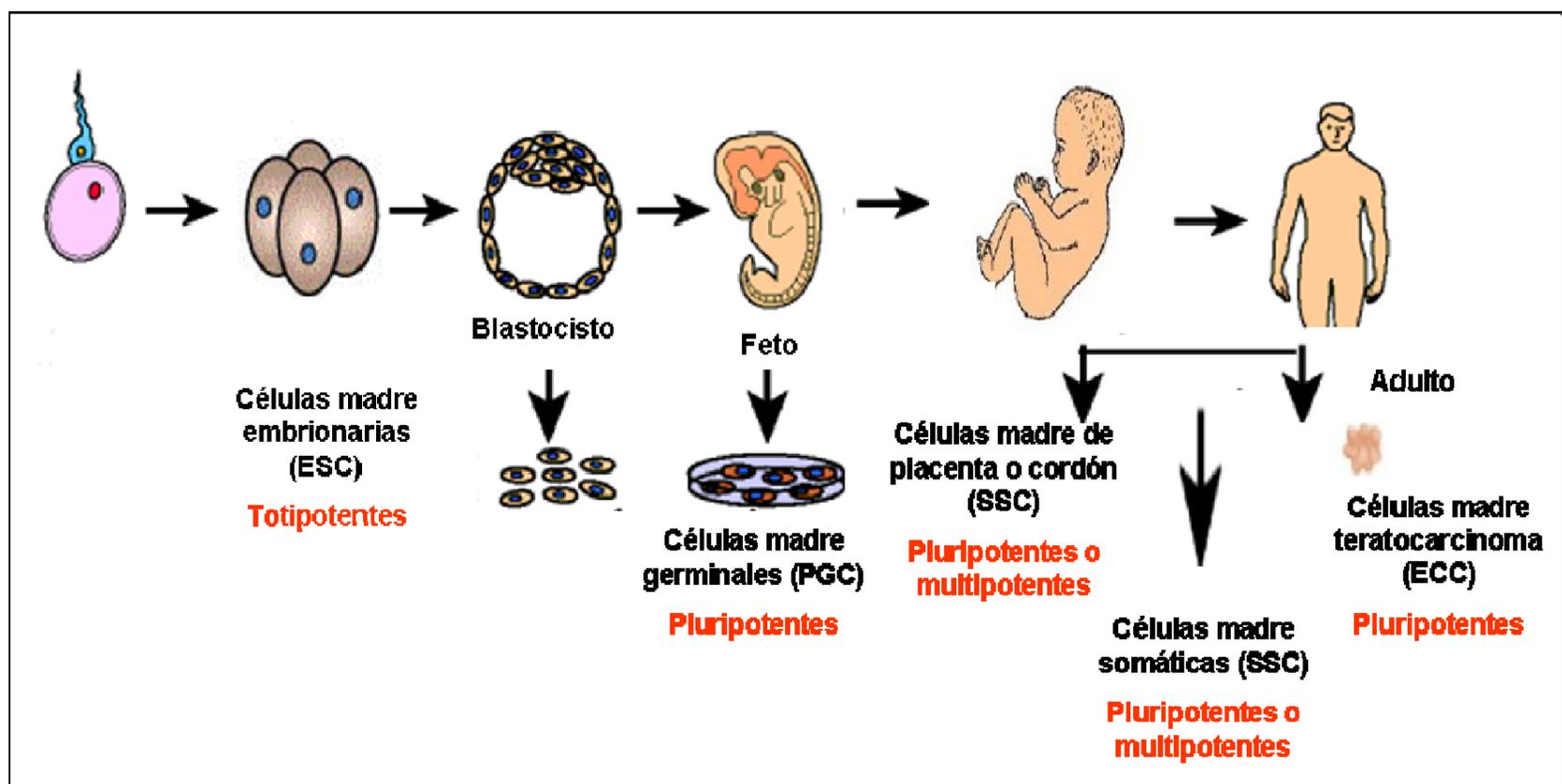


Figura 5. Desarrollo ontogénico y tipos de células madre, ESC (células madre embrionarias), PGC (células madre germinales), SSC (células madre somáticas) y ECC (células madre de teratocarcinoma).

2.1.1 Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias (del inglés Embryonic Stem cells, ESCs) fueron aisladas por primera vez en 1981 a partir de la masa celular interna (ICM) de blastocistos de ratón (Evans y Kaufman, 1981) y más tarde a partir de embriones humanos (Thomson y Marshall, 1998). Se trata de células de morfología redondeada y con un reducido ratio núcleo: citoplasma, 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

cuerpos embrioides y teratomas, respectivamente), así como de mantenerse indiferenciadas en cultivo manteniendo su identidad genética.

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

- Proceden de la masa celular interna de embriones en estado de blastocisto, de mórula o incluso de blastómera única.
- Tienen capacidad de división asimétrica ilimitada, y se mantienen indiferenciadas en las condiciones de cultivo adecuadas.
- Presentan cariotipo normal que permanece estable.
- Son capaces de diferenciarse a derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, mesodermo, endodermo y también células germinales. Por lo tanto tienen capacidad pluripotente, lo que las convierte en un tipo celular único.
- Cuando se transplantan durante el desarrollo embrionario murino, poseen la capacidad de integrarse en todos los tejidos fetales dando lugar a quimeras.
- Tienen la capacidad de dar lugar a células de la línea germinal
- Presentan expresión de marcadores de indiferenciación, entre ellos los factores de transcripción *octamer-binding transcription factor 4* (Oct-4), *Sex determining Region Y-box 2* (SOX2) y Nanog, que regulan gran número de genes y mantiene las células embrionarias en estado de proliferación e indiferenciación.
- Pueden inducir su proliferación o diferenciación bajo condiciones *in vitro*.

Estas características convierten a las ESC 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 (procedentes de pacientes sanos) para reparar órganos dañados en pacientes con enfermedades crónico-degenerativas. Sin embargo, el hecho de que para su derivación haya que manipular embriones humanos, ha puesto en entredicho su utilización por razones éticas. 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.

2.1.2 Células madre germinales

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 células germinales primordiales (del inglés Primordial Germ Cells, PGCs). Se obtienen de la cresta gonadal de embriones de ratón entre los días E8.5 y E12.5 (Wylie y cols., 1986) y de embriones humanos de 5-9 semanas de gestación (Fujimoto y cols., 1977) siendo las precursoras de los gametos.

Las células madre germinales o "*primordial germ cells*" (PGC) tienen propiedades bioquímicas, morfológicas, inmunológicas y de desarrollo comunes a las células madre embrionarias, ya que son pluripotentes y contribuyen a la formación de la línea germinal cuando se inyectan en blastocistos dando lugar a animales quiméricos (Matsui y cols., 1992; Stewart y cols., 1994). Asimismo, pueden diferenciarse a cuerpos

embrioides y formar teratomas *in vivo*. No obstante, existen diferencias a nivel del patrón de metilación de estos tipos celulares, ya que la secuencia de ADN se mantiene inalterada, pero su capacidad de expresión se ve modificada. Dichas diferencias podrían reflejar los cambios en el programa de desarrollo de las PGC *versus* las ESC. A pesar de ello, la existencia de este patrón de metilación génica no parece afectar a la capacidad de estas células para contribuir al desarrollo de la línea germinal en quimeras (Sato y cols., 2003).

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

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

2.1.3 Células madre de teratocarcinomas

Los teratocarcinomas son tumores que contienen una gran variedad de tipos celulares que incluyen desde una población de células indiferenciadas, hasta células con una diferenciación completa como son las células musculares, cartílago, hueso, epitelio, neuroectodermo primitivo, estructuras ganglionares y epitelio glandular.

Se localizan en las gónadas y se forman a partir de células madre pluripotentes de carcinoma embrionario, también llamadas células madre de teratocarcinomas, que derivan, a su vez, de células primordiales germinales del embrión. Ésta población de células indiferenciadas, tienen propiedades bioquímicas y de desarrollo similares a las de la masa celular interna. Además, no solo se dividen, sino que también pueden diferenciarse hacia una amplia variedad de tejidos y formar tumores constituidos por una amalgama de tejidos somáticos yuxtapuestos de manera desorganizada (Kleinsmith y Pierce 1964; Stevens, 1984).

Las primeras líneas de células madre aisladas a partir de teratocarcinomas se obtuvieron en los años setenta (Kahan y Ephrussi, 1970; Jakob y cols., 1973; Gearhart y Mintz, 1974; Nicolas y cols., 1976). Estas conservan su capacidad de diferenciación, produciendo derivados de las 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo y ectodermo (Nicolas y cols., 1976). Además, tras micro-inyectarlas en la masa celular interna de blastocistos de ratón, dan lugar a animales quiméricos viables y fértiles (Mintz y Illmensee, 1975). Sin embargo, las células madre de teratocarcinomas embrionarios no conservan la misma capacidad pluripotente de las células embrionarias tempranas y además de presentar un cariotipo aneuploide, sufren cambios durante su transición *in vivo* al estado tumoral (Andrews, 2002).

2.1.4 Células madre somáticas

Una población de células madre somáticas (del inglés Somatic Stem Cells, SSC) es una población relativamente indiferenciada de células localizadas en tejidos u órganos adultos, que pueden renovarse a sí

mismas y diferenciarse en tipos celulares más especializados de su propio tejido (Weissman, 2002; Potten y Loeffler, 1990; Eckfeldt y cols., 2005). Su singularidad, escasez y la falta tanto de características morfológicas distintivas como marcadores específicos hacen que su identificación y localización sean muy complejas en la mayoría de los tejidos. Por ello, gran parte de las SSC son identificadas por sus propiedades funcionales, entre las cuales se incluye el alto potencial de proliferación, la importante capacidad reparadora y la capacidad para diferenciarse hacia las estirpes celulares de las que provienen e incluso hacia otras distintas.

La propiedad de autorenovación o la capacidad de producir células hijas idénticas a sí mismas es esencial para mantener la reserva de células madre en los tejidos. La mayoría de los tejidos que tienen células madre somáticas (SSC), son capaces de renovar un número limitado de células diferenciadas de acuerdo con su localización (Sanai y cols., 2004; Beltrami y cols., 2003). En algunos tejidos, estas células son unipotenciales y están capacitadas para generar un tejido celular específico (Körbling y cols., 2003; Alison y cols., 2004). En otros tejidos, las SSC están relativamente indiferenciadas y se localizan en un microambiente fisiológico denominado nicho (Schofield, 1978; Li y cols., 2007), en el que permanecen en estado de quiescencia a través de micro ambientes moleculares de señalización inhibitorios frente a la división y a la diferenciación celular, entre los cuales a menudo están implicados el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y miembros de la familia morfogénica del hueso, también conocida como Bone Morphogenic Protein (BMP) (Li y Xie, 2005).

Dentro del proceso de diferenciación, tiene lugar un proceso de división celular asimétrica que genera una célula progenitora y otra célula intermedia parcialmente diferenciada y con capacidad de división, conocida como célula de amplificación transitoria (*transit Amplifying cells*, TA). Esta célula transitoria dará lugar a diferentes tipos celulares adultos presentes en el tejido de origen, mientras que las progenitoras generaran, a su vez, células idénticas a sí mismas que permitan mantener el reservorio de células madre somáticas (SSC) en el órgano o tejido en cuestión (Figura 6).

Para que este proceso se lleve a cabo son cruciales las interacciones con el nicho donde se localizan (Zhang y cols., 2003; Li y cols., 2007). Por lo general, estas células están en fase G_0 y su papel es mantener, renovar y/o reparar el tejido donde residen. Pueden dar lugar a células diferenciadas del mismo linaje del tejido de origen y son mucho más plásticas de lo que en principio se pensó, ya que también pueden dar lugar a células de linajes diferentes.

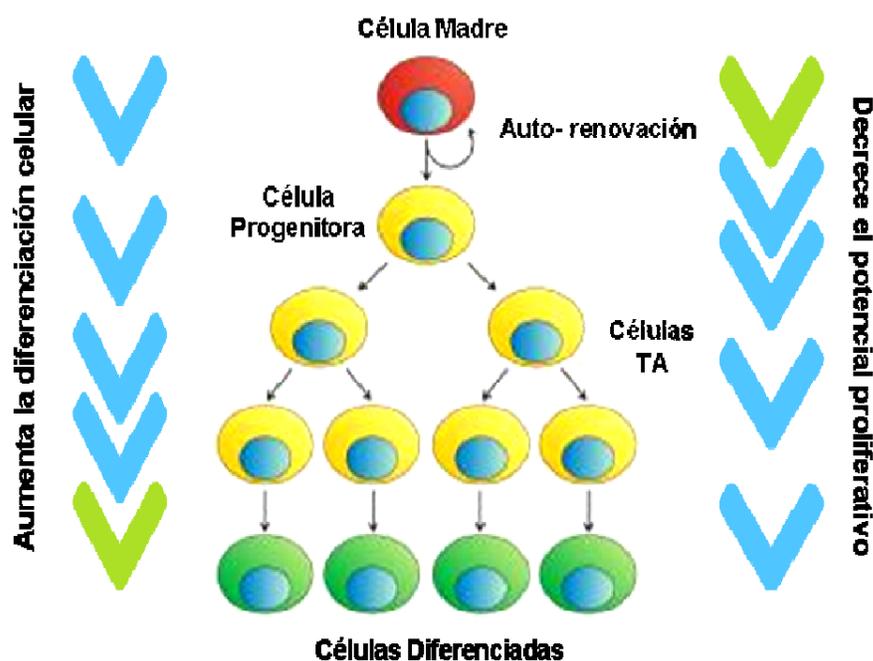


Figura 6. Esquema de la jerarquía de la diferenciación de las células madre. Las células madre son capaces de auto-renovarse y de diferenciarse a células progenitoras. Estas proliferan y dan lugar a células TA, las cuales darán lugar a células diferenciadas sin capacidad de diferenciación.

Se define como plasticidad celular, la capacidad de una célula madre somática de un tejido específico para generar un tipo celular especializado

diferente al de su origen embrionario. Por lo tanto, para evaluar la plasticidad en condiciones experimentales deben cumplirse criterios básicos que incluyen: la capacidad de auto-renovación, la diferenciación morfológica y funcional hacia tipos celulares de su origen embrionario y por lo menos a un tipo celular de diferente linaje.

Hasta el momento, la mayor fuente de células madre en el organismo adulto es la médula ósea (Prockop, 1997; Weissman, 2000; Pittenger, 1999), aunque en los últimos años han sido descritas en prácticamente todos los tejidos: sistema nervioso central (Gage, 2000; Reynolds y cols., 1992), hígado (Forbes y cols., 2002), órganos hematopoyéticos (Bonnet, 2002), músculo esquelético (Hughes y Blau, 1990), endometrio (Chan y cols., 2004; Cervelló y cols., 2007a, 2007b ; Gargett, 2007) y más recientemente en miometrio (Ono y cols., 2007). Con todo ello, queda más que demostrada la presencia de células madre somáticas (SSC) en los tejidos adultos.

Estas células madre somáticas obtenidas de los diferentes tejidos juegan un papel clave en la homeostasis celular ya que promueven el reemplazamiento celular, por un lado en los tejidos altamente regenerativos y por otro lado la pérdida celular (Li y Xie, 2005; Snyder y Loring, 2005). Al hallarse parcialmente diferenciadas se evita tanto la producción de tejidos no deseados, como la formación de tumores, al contrario de lo que ocurre con las embrionarias, o indiferenciadas. Además, es posible obtenerlas del enfermo que las va a necesitar, evitándose así completamente el rechazo inmunológico. A diferencia de las embrionarias, el uso de estas células madre no ofrece inconvenientes éticos ya que no se obtienen a partir de embriones, aunque tienen otra serie de inconvenientes como son las mismas deficiencias genéticas que el individuo del que se obtienen.

3. CÉLULAS MADRE SOMÁTICAS EN EL ÚTERO HUMANO

3.1 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en el endometrio humano

El endometrio humano tiene una alta capacidad regenerativa; crece desde 0,5mm hasta 7mm en grosor durante cada ciclo menstrual (McLennan y Rydell, 1965), y mantiene procesos celulares cíclicos que implican proliferación, diferenciación y desprendimiento del tejido endometrial. Estos procesos hicieron postular por primera vez hace 35 años, la teoría de la existencia de células madre en el endometrio y su localización en la zona basal (Prianishnikov, 1978).

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

Las primeras evidencias de la existencia de una población de células madre endometriales humanas basadas en ensayos funcionales han sido publicadas hace unos años (Chan y cols., 2004; Cho y cols., 2004; Schwab y cols., 2005; Chan y cols., 2006; Matthai y cols., 2006).

Tras el cultivo de suspensiones celulares endometriales purificadas, el grupo de la Dra.Gargett obtuvo dos tipos de colonias celulares de diferente

INTRODUCCIÓN

tamaño (Chan y cols., 2004). Las más grandes, poco frecuentes, podrían ser las candidatas a células madre endometriales y se localizarían en las criptas glandulares y estroma de la zona basalis (Figura7). En este trabajo se identificaron además una serie de factores de crecimiento requeridos para la formación de colonias: *epidermal growth factor* (EGF), *transforming growth factor- α* (TGF- α) o *platelet derived growth factor B* (PDGF-BB). Asimismo, se examinaron algunos marcadores clásicos de células madre hematopoyéticas (c-kit/ CD117 y CD34) y pluripotencia (Oct-4) respectivamente, que fueron localizados en el endometrio humano desde el período fetal hasta la vejez (Cho y cols., 2004; Matthai y cols., 2006).

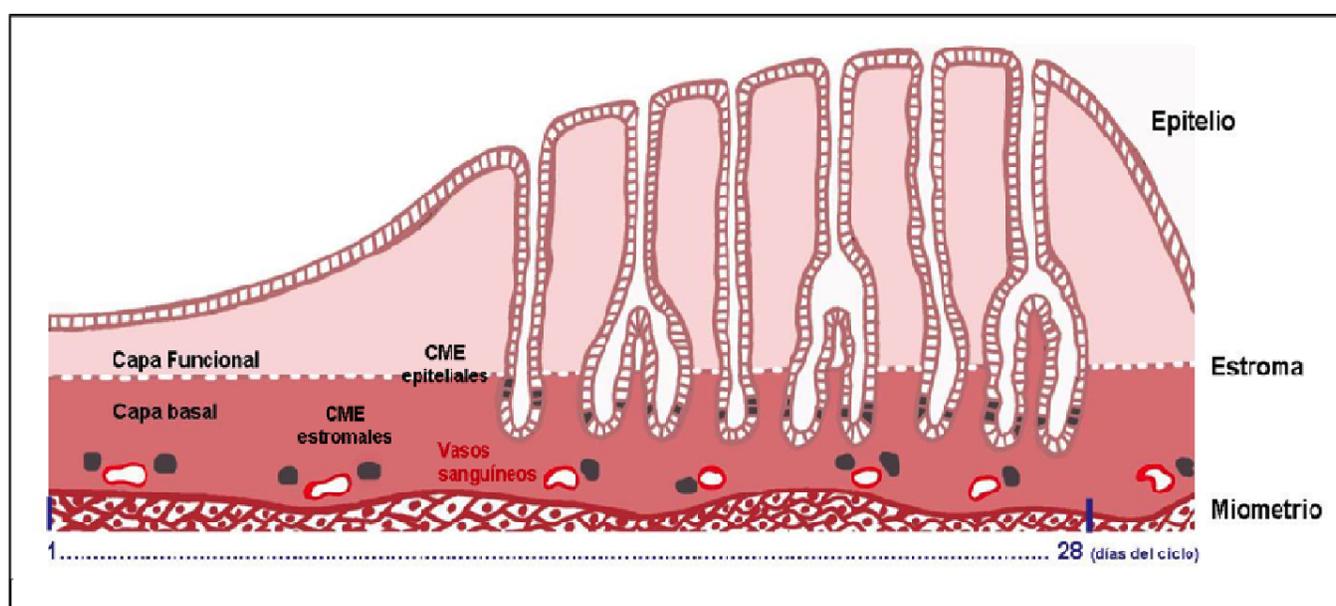


Figura 7. Diagrama de la posible localización de las CME en la base de las glándulas y estroma, localizados en la zona basalis cerca de los vasos sanguíneos. Adaptado de Cervelló y cols., 2009. *Expert Review*, 4(3): 273-282.

Otra evidencia de la existencia de células madre endometriales está basada en la capacidad de expulsión del colorante vital Hoechst 33342, determinada por la presencia de transportadores de membrana ABC: *multidrug resistance protein 1* (MDR1), *ATP-binding cassette sub-family G member 2* (ABCG2), etc, propios de células inmaduras candidatas a células

madre (Goodell y cols., 1996). Las células capaces de expulsar este colorante a corto plazo son las que se sitúan en la región lateral del diagrama de *Cell Sorting*, de ahí su nombre *Side Population (SP)*. Se caracterizan por presentar una gran plasticidad y autorrenovación y han sido identificadas en la mayor parte de tejidos adultos, incluido el endometrio humano (Kato y cols., 2007; Cervelló y cols., 2010, Cervelló y cols., 2011; Cervelló y cols., 2012).

3.2 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en el miometrio humano

Las primeras evidencias de la existencia de una población de células madre miometriales están relacionadas con la embriología del tracto reproductivo femenino. En humanos, durante los estadios tempranos del desarrollo uterino fetal, tiene lugar la formación del canal genital por la fusión de los conductos paramesonéfricos (conductos de Müller), mientras que la forma del útero es el resultado de la proliferación de las células mesenquimales que lo constituyen (Teixeira y cols., 2001; Hu y Spencer, 2005). El proceso de diferenciación se inicia a las 12 semanas de gestación. En este estadio, las células mesenquimales se distribuyen de forma escasa por el mesénquima uterino. La mayoría tienen forma redondeada y un alto ratio núcleo-citoplasma. A las 14 semanas, se pueden distinguir dos capas de células mesenquimales: unas hacia el lumen (capa interna), escasas y con formas redondeadas, y otras cerca de la serosa (capa externa), abundantes y alargadas; estas últimas irán aumentando en número hasta la semana 20 aproximadamente, de forma que el grosor de la capa externa quedará altamente definido en comparación con el de la parte interna. A las 31-40 semanas del desarrollo ya se pueden apreciar paquetes celulares de

INTRODUCCIÓN

músculo liso en la capa más próxima a la serosa (Figura 8). Estas observaciones implicarían que la parte mesenquimal externa del útero fetal daría lugar a miometrio, mientras que la interna correspondería con el estroma endometrial del útero adulto (Ramsey, 1994; Kurita y cols., 2001).

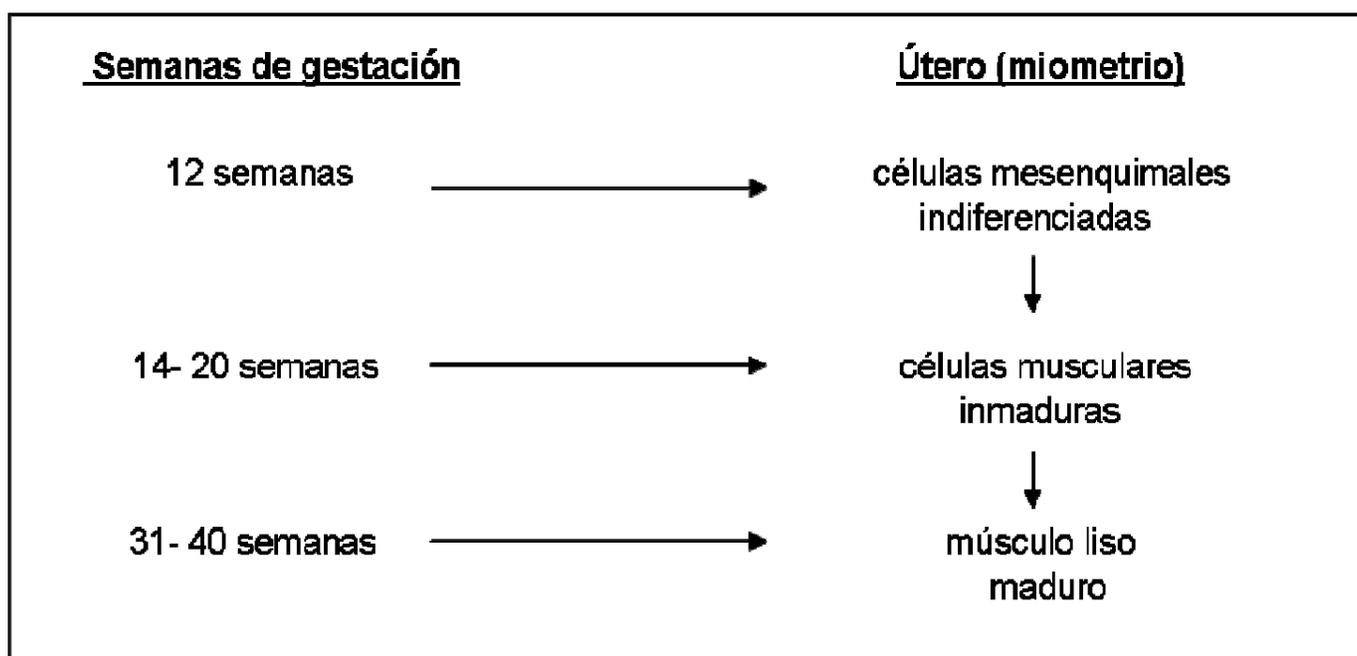


Figura 8. Esquema del proceso de diferenciación del miometrio durante el desarrollo embrionario.

Se cree que un pequeño número de células mesenquimales permanece en el miometrio adulto y contribuye a la constitución de las células madre. No se sabe aún si hay una célula madre uterina primordial que tiene capacidad para reemplazar todos los tipos celulares endometriales y miometriales, o si hay células madre epiteliales y mesenquimales separadas.

Recientemente algunos investigadores, entre los que cabe destacar al grupo de Ono y cols. han sugerido que estos cambios cíclicos de crecimiento, diferenciación y regresión en el miometrio podrían deberse no sólo a los fenómenos anteriormente descritos de hiperplasia e hipertrofia sino, a la existencia de una población de células madre (Ono y cols., 2007).

Dicha población ha sido caracterizada como *Side Population (SP)*, en base a la capacidad de expulsión a corto plazo, del colorante vital Hoechst 33342 a través de transportadores de membrana ABC, situándose en la región lateral del diagrama de *Cell Sorting*. Además cuando se les compara con el resto de células miometriales, se observa que esta población candidata a células madre, presenta un *estatus* de quiescencia e indiferenciación y es capaz de diferenciarse *in vitro* en células miometriales bajo condiciones de hipoxia, e incluso hacia otras células de linaje mesenquimal como adipocitos y osteocitos. La prueba final que demuestra esta evidencia es la capacidad de estas células para regenerar el tejido miometrial cuando se inyectan en el útero de ratones inmunodeprimidos. (Ono y cols., 2007).

Según esto, dicha población celular permanecería indiferenciada en sus nichos, susceptible de ser inducida para un posible embarazo. Además debería de disponer de mecanismos de autocontrol para evitar patologías derivadas de su proliferación benigna incontrolada como es la formación de miomas o de su propagación maligna como el cáncer de miometrio (Zaitseva y cols., 2008).

3.3 Evidencias sobre la existencia de células madre somáticas en los miomas

A pesar de su alta prevalencia, se desconoce cuál es el origen de los miomas, aunque podría estar asociado con trastornos en la función, proliferación y el destino de un subconjunto de células miometriales candidatas a células madre mesenquimales (Dixon y cols., 2002; Sozen y Arici, 2002; Chang y cols., 2010). Varias evidencias sugieren que éstos podrían tener un origen clonal (Walker y Stewart, 2005) y una alta

proliferación en condiciones de hipoxia (Fukuhara y cols., 2002; Pavlovich y Schmidt, 2004; Grayson y cols., 2006).

Según las hipótesis relacionadas con las células iniciadoras de tumores, también conocidas como *Cells Initiator of Tumor* (CIT), las células tumorales estarían organizadas jerárquicamente, al igual que los tejidos normales, con una pequeña población de células madre con potencial de auto-renovación, generando una gran población de células proliferantes que difieren del resto. Estas CIT se han identificado en gran variedad de tumores sólidos, como el de mama (Al-Hajj y cols., 2003), próstata (Dunning y cols., 2011), colorrectal (Dalerba y cols., 2007) pancreáticos (Li y cols., 2007), cerebro (Galli y cols., 2004; Singh y cols., 2003), y cáncer de ovario (Baba y cols., 2009; Bapat y cols., 2005; Curley y cols., 2009; Szotek y cols., 2006; Zhang y cols., 2008).

Las células de la SP se han utilizado como una exitosa herramienta para identificar a las células madre somáticas (SSC) en diferentes órganos y tejidos como la médula ósea (Prockop, 1997; Pittenger, 2008), páncreas (Bonner-Weir y Sharma, 2002), glándula mamaria (Smalley y Clarke, 2005), piel (Larderet y cols., 2006), pulmón (Martin, 2008), pulpa dental (Iohara y cols., 2008), endometrio (Cervelló y cols., 2010; Masuda y cols., 2010) y miometrio (Ono y cols., 2007), así como en tumores malignos tipo cáncer de ovario (Szotek y cols., 2006) y más recientemente en miomas uterinos (Chang y cols., 2010; Mas y cols., 2012; Ono y cols., 2012).

El grupo del Dr. Henry Chang comparó el porcentaje de células aisladas de la SP, tanto en miomas como en miometrio normal, observando que en las primeras el porcentaje de células candidatas era mucho menor que en

miometrio y que su actividad *in vitro* también (Chang y cols., 2010). Sin embargo, acumuladas evidencias demuestran que la progresión celular del tumor podría resultar de la interacción entre las CIT y su microambiente o nicho (De Wever y Mareel, 2002), específicamente con el compartimento estromal (Jordan y cols., 2006; Schofield, 1978).

II. Hipótesis

*∞ Lo importante es no dejar de hacerse preguntas ∞
Albert Einstein*

II.- HIPÓTESIS

La hipótesis de partida está basada en la premisa de que el origen de los miomas podría ser el resultado de una proliferación anómala de las células madre somáticas del nicho miometrial, y no de cualquier tipo celular del miometrio.

III. Objetivos

∞ El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra ∞
Claude Bernard

III- OBJETIVOS

1. Objetivo general

El objetivo general planteado en esta tesis doctoral es la identificación, caracterización y aislamiento de la población de células candidatas a ser las células madre somáticas formadoras de miomas.

2. Objetivos específicos

2.1 Demostrar la existencia de una población de células madre somáticas (SSC) en los miomas, mediante la identificación y aislamiento de la “*Side Population*” (SP) por citometría de flujo (CMF) con capacidad de separación celular.

2.2 Analizar el grado de indiferenciación de las células aisladas a nivel de ARN mensajero y proteína.

2.3 Evaluar mediante ensayos de proliferación “*in vitro*”, la capacidad de clonogenicidad de las células candidatas a SSC en los miomas, así como la diferenciación inducida hacia linajes mesenquimales.

2.4 Generar líneas celulares basándonos en el origen clonal de las SSC a partir de las células candidatas aisladas por CMF.

2.5 Demostrar la funcionalidad de las líneas celulares generadas mediante la reconstrucción *in vivo* de tejido “miomatoso” en un modelo animal.

IV. Diseño experimental

*∞ Saber para prever, a fin de poder ∞
Auguste Comte*

IV.- DISEÑO EXPERIMENTAL

1. Identificación, aislamiento y caracterización de la *Side Population* en miomas

La metodología a seguir implicó la recogida de muestras, la puesta a punto del protocolo de disgregación del mioma y la identificación de células madre somáticas con el método de extrusión del Hoechst 33342. Este colorante vital permite identificar a la población denominada *Side Population* (SP) en una suspensión de células vivas mediante citometría de flujo (CMF). Las células identificadas como SP presentan cierto grado de indiferenciación y están enriquecidas en canales transportadores tipo ABC *transporters* (proteínas tipo MDR1, ABCG2...) capaces de expulsar el colorante vital Hoechst al espacio extracelular. Aunque existe cierto desconocimiento acerca del origen, del fenotipo y del potencial de las células SP, esta técnica es en la actualidad una de las más utilizadas para la obtención e identificación de células madre somáticas (SSC) de cualquier tejido ante la falta de marcadores específicos (Figura 9).

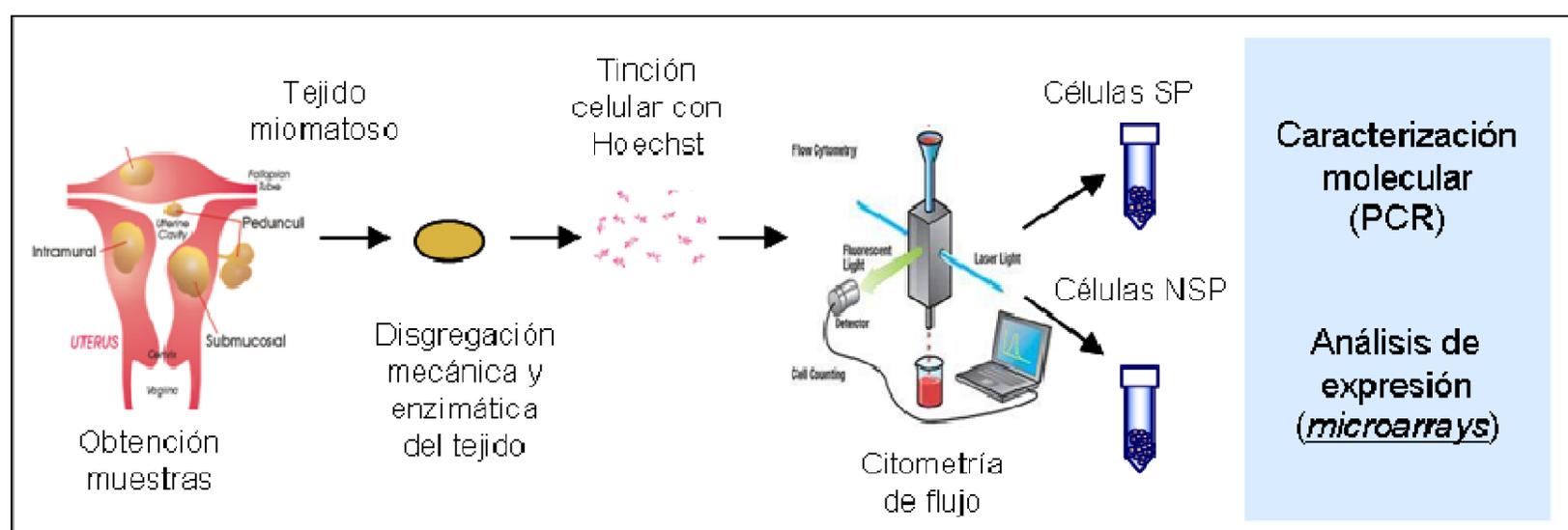


Figura 9. Diseño experimental de las diferentes técnicas realizadas en este apartado. Tras la disgregación del tejido miomatoso mediante métodos mecánicos y enzimáticos, la fracción celular obtenida fue sometida a diferentes técnicas para su aislamiento y posterior análisis.

Una vez separada esta población celular candidata, se procedió a la caracterización de la misma a nivel de ARN mensajero (ARNm) y al análisis de expresión génica mediante la técnica de *microarrays*.

2. Modelos *in vitro*/ *in vivo*

A partir del modelo "*in vitro*" se pretendía reproducir diferentes condiciones de cultivo para el mantenimiento de las células candidatas aisladas en el punto anterior y proceder a realizar estudios de clonogenicidad, así como generar líneas celulares basándonos en el origen clonal de las SSC en los miomas. Una vez generadas las líneas, se procedería a realizar un análisis citogenético y una caracterización molecular y fenotípica de las mismas, para finalmente demostrar su capacidad de diferenciación hacia linajes mesenquimales.

El modelo "*in vivo*" también es imprescindible a la hora de asegurar la capacidad regeneradora de las poblaciones celulares candidatas a células madre somáticas (SSC) y para evaluar funcionalmente las posibles diferencias entre ellas. El modelo animal propuesto en nuestro caso es el murino (*Mus musculus*), concretamente ratones NOD/SCID (Non-Obese Diabetic/ Severe Combined Immune Deficiency) que son inmunológicamente incompetentes a la hora de combatir las infecciones o rechazar el tejido trasplantado.

De este modo, las células candidatas obtenidas por citometría de flujo (CMF) y mantenidas *in vitro* tras la generación de líneas (LeioSP1 y LeioSP2), fueron inyectadas de dos formas distintas:

- inyección subcutánea: células disueltas en matrigel (1:1) e inyectadas en el flanco izquierdo del animal.
- inyección en cápsula renal: exteriorizamos riñón e inyectamos las células en cápsula suprarrenal.

En esta misma intervención quirúrgica las ratonas ovariectomizadas fueron sometidas a tratamiento hormonal (estradiol y progesterona) durante los 60 días que duro el experimento. Tras este período, los ratones fueron sacrificados y se estudió mediante análisis inmunohistológico el tejido subcutáneo y los riñones inyectados con el fin de encontrar alguna formación de tejido humano procedente de las suspensiones celulares inyectadas.

V. Materiales y Métodos

*∞ La manera cómo se presentan las cosas no es la manera como son;
y si las cosas fueran como se presentan, la ciencia entera sobraría ∞*

Karl Marx

V.- MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de candidatas a células madre somáticas formadoras de miomas.

La utilización de muestras de origen humano para el desarrollo de este apartado, fue aprobada por parte del Comité Ético del Instituto Universitario IVI. De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, dichas muestras fueron obtenidas tras la explicación del proyecto y firma del consentimiento informado por parte de las pacientes participantes (Anexo I).

1.1 Muestras biológicas y criterios de inclusión

Las muestras de mioma extraídas fueron destinadas para su diagnóstico histológico y una parte del tejido, se recogía para este proyecto de investigación. La recolección del mismo se llevó a cabo inmediatamente después de su extracción y su procesamiento se realizó en las siguientes 24 horas, tal y como se explica en los apartados sucesivos.

A lo largo de este estudio se han recogido aproximadamente un total de 20 muestras de miomas y miometrio de pacientes de raza caucásica, con un índice de masa corporal entre 19-25 kg/m² con los siguientes criterios de inclusión:

- Pacientes con indicación quirúrgica de miomectomía laparoscópica o pararotómica por diagnóstico de miomas intramurales y/o subserosos
- Edad comprendida entre 20 y 40 años.

- Firma del consentimiento informado para obtención de un fragmento de mioma/s para esta investigación.

1.2 Aislamiento de la *Side Population* (SP)

1.2.1 Obtención y procesado de las muestras biológicas

Tanto la obtención como el procesado de las muestras se realizaron en condiciones de esterilidad para evitar cualquier tipo de contaminación microbiológica, ya que esto tendría efectos muy negativos en el mantenimiento de las mismas. Dada la importancia del proceso, utilizamos material estéril (guantes, calzas, mascarilla, gorro...) y trabajamos en campanas de flujo laminar ubicadas en zonas de cultivo celular...

Las muestras obtenidas desde quirófano, fueron lavadas inicialmente para eliminar los restos de sangre y moco y posteriormente se sometieron a disgregación mecánica con ayuda de bisturís. De este modo, se trocearon cuidadosamente hasta alcanzar fragmentos menores de 1mm³. Una vez disgregado el tejido, se mantuvo a 4° C durante 6-12 horas en un medio de mantenimiento formado por M199 (Invitrogen, España) suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF(Gibco, Barcelona, España)), una solución antibiótica- antimicótica (Sigma-Aldrich, España) para evitar contaminaciones y 10mM de 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES, Invitrogen, España) para evitar cambios bruscos de pH que pudieran afectar a la viabilidad de las muestras.

Transcurrido este período, se procedió a la digestión enzimática de las muestras durante dos horas en agitación a 37°C, separando cada 30

minutos la porción disgregada. La enzima empleada, colagenasa tipo II (Labclinics, España) hidroliza el colágeno en su conformación de triple hélice liberando fragmentos pequeños de tejido y células aisladas. Así, una vez disgregado el tejido completo se procedió a la obtención de la fracción celular existente en los miomas mediante sedimentación y centrifugación según el protocolo establecido con breves modificaciones (Cervelló y cols., 2010).

Las suspensiones celulares obtenidas mediante los sucesivos lavados, se filtraron a través de filtros de polietileno de 50 μm con el fin de eliminar los agregados celulares y los restos de tejido sin digerir. Una vez filtradas, fueron tratadas durante cinco minutos con tampón de lisis de eritrocitos (1,5M de NH_4Cl , 100 mM NaHCO_3 y Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA 1mM) a pH 7,4 que elimina las células sanguíneas por choque hipotónico.

Tras su lavado, las células se resuspendieron a una concentración de millón/ml en medio de cultivo de SP compuesto por DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* (Sigma-Aldrich, Madrid, España)), 10% de SBF (Gibco, Barcelona, España) y con 10mM de HEPES (Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se mantuvieron a 4°C hasta su posterior análisis. Por ejemplo, para una muestra de 100mg se obtuvieron 6 millones de células que se resuspendieron en 6ml de medio SP con el fin de poderlas analizar posteriormente por citometría de flujo (CMF).

1.2.2 Citometría de flujo

La citometría de flujo (CMF) es un método de análisis celular multiparamétrico, cada día más usado en biología celular, que permite una

rápida medición de ciertas características físicas y químicas de las células o partículas en suspensión, produciendo una señal celular de forma individual al incidir en una fuente de luz. Estas señales son recogidas por distintos detectores que las convertirán en señales electrónicas posteriormente digitalizadas para permitir la medida simultánea de varios parámetros (tamaño, forma, complejidad...) en una misma célula. De este modo, a la hora de realizar las mediciones en el citómetro de flujo, las células pueden estar vivas o fijadas, pero necesariamente en suspensión celular y en forma de célula única.

Utilizamos esta técnica para conocer, a partir de las suspensiones celulares obtenidas desde miomas y descritas en el apartado anterior (1.2.1), la viabilidad celular (apartado 1.2.3), el aislamiento de las células de la *Side Population* (SP, apartado 1.2.5) y el fenotipo con distintos marcadores de las suspensiones celulares aisladas (1.5.5).

Fases para la realización de la citometría de flujo:

Generalmente consta de tres etapas independientes:

- Fase pre-citometría: Implica el diseño del protocolo, la preparación de los reactivos, de las células y la tinción de las mismas con los reactivos fluorescentes.
- Fase de citometría de flujo: Involucra el procesamiento de las células marcadas y la recolección de datos para cada uno de los parámetros realizados en cada célula individual. Así, al obligarlas a pasar alineadas una a una frente a un haz láser mediante un flujo continuo, cada célula a la vez que dispersa la luz, emite luz fluorescente como consecuencia de la excitación láser a la que es sometida. La luz

dispersada hacia delante (llamada *forward scatter*, FS a 0 grados) está relacionada con el tamaño celular, mientras que la luz dispersada a 90° del eje de haz lumínico (*side scatter*, SS) está relacionada con la estructura interna y la complejidad citoplasmática. Además de la dispersión de la luz, si previamente a su análisis se coloca a las células en presencia de anticuerpos monoclonales marcados con moléculas fluorescentes, se pueden evaluar que células poseen los antígenos complementarios a los anticuerpos monoclonales usados. En la actualidad disponemos de diferentes marcadores de fluorescencia dependiendo de su unión a la célula. Por un lado, los marcadores fluorescentes de unión covalente (ficoeritrina, PE, fluoresceína FITC, rodamina, ROD...) que reaccionan con lípidos y proteínas. Por otro lado estarían, los marcadores fluorescentes de unión no covalente, que debido a su composición especial se unen a otro tipo de componentes celulares (Hoechst, 4',6-diamidino-2-fenylindole (DAPI), yoduro de propodio...). En ambos casos, la excitación de los fluorocromos ocurre en el punto de interacción de la célula y el haz lumínico, dando como resultado la emisión de una luz de longitud de onda superior a la que incide. Esta luz es recogida a 90 grados, siendo dirigidas las longitudes de onda seleccionadas mediante espejos (dicróicos) y filtros de banda que fotomultiplican la señal. Si se dispone de múltiples fluorocromos, excitables con la fuente de luz única, pueden unirse a las células permitiendo, de este modo, medidas fluorescentes simultáneas de varios parámetros de una sola célula.

- Fase de análisis: Implica el estudio de los datos recolectados. Así, tanto la luz desviada como las emisiones fluorescentes, son

recogidas mediante tubos fotomultiplicadores en forma de señales eléctricas analógicas. Estas serán convertidas posteriormente en señales digitales y procesadas por un ordenador, con el fin de generar histogramas “*dot plots*” correlacionados con los parámetros deseados y finalmente poder efectuar el análisis de los mismos.

Ventajas de la citometría de flujo:

Las ventajas de este tipo de técnicas son:

- Acceso no invasivo a parámetros celulares.
- Análisis y cuantificación de un número estadísticamente significativo de células (desde 1000 a más de 100.000 células) en corto tiempo (5.000 eventos /segundo).
- Múltiples procesos funcionales analizables.
- Integración de respuestas y mecanismos.
- Resolución de heterogeneidad celular de forma cuantitativa: discriminación de las células según la cantidad de marcador.
- Alta sensibilidad y objetividad.

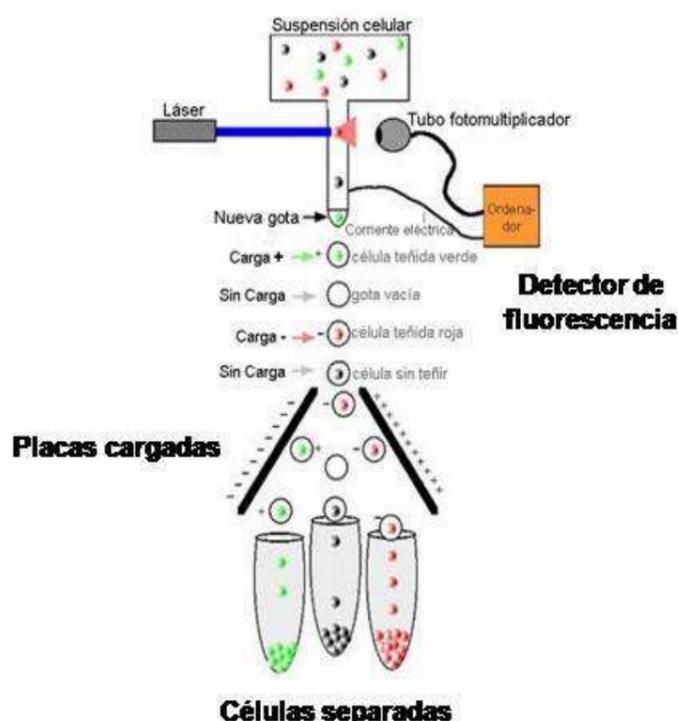


Figura 10. Esquema del funcionamiento de un citómetro con capacidad de separación celular. Las células se tiñen con los fluorocromos correspondientes y en base a esto y a la carga, se separan en tubos independientes.

1.2.3 Viabilidad celular

Un aspecto muy importante para poder trabajar con nuestras muestras es que tengamos baja mortalidad celular en los protocolos que vayamos a desarrollar.

Para poder determinar la viabilidad de las suspensiones celulares obtenidas de los miomas, utilizamos un método usado frecuentemente en biología celular, que se basa en la expulsión del ioduro de propidio (IP) por parte de las células vivas. El IP es un fluorocromo se une a los ácidos nucleicos de doble cadena y emite fluorescencia rojo-anaranjada cuando es excitado con un láser de 488 nm.

Se evaluó la viabilidad celular añadiendo a las muestras IP a una concentración de 5 µg/ml (IP, Sigma-Aldrich, Madrid, España) dejándose en oscuridad y temperatura ambiente durante 15-20 minutos, para posteriormente proceder a su análisis por técnicas citométricas.

Según este método, la membrana de las células vivas forma una barrera con permeabilidad selectiva entre el contenido intracelular y el medio extracelular, evitando así el paso de IP al interior del citoplasma. Las células muertas habrán perdido esta propiedad y por lo tanto incorporaran el colorante, el cual se intercala entre las bases del ADN y del ARN en una relación de 1 molécula de colorante cada 4 o 5 pares de bases. Una vez unido a los ácidos nucleicos, la fluorescencia del IP se ve incrementada 20 a 30 veces, pudiendo evaluar el porcentaje de células marcadas con el fluorocromo (muertas) y excluirlas.

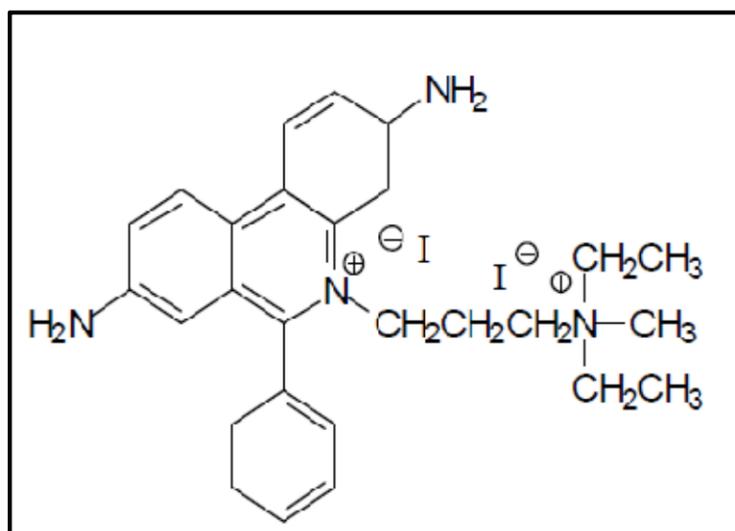


Figura 11. Estructura química del ioduro de propidio extraída del catálogo de productos de Sigma-Aldrich, Madrid, España.

1.2.4 Tinción con Hoechst

Una vez aisladas las células viables procedentes de los miomas, se realizó el conteo celular en una cámara de Neubauer y se resuspendieron en medio SP a una densidad celular de millón/ml. A continuación, se procedió a la tinción celular, añadiendo a las muestras Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, Madrid, España) a una concentración de 5 µg/ml e incubando en baño a 37°C durante 90-120 minutos en oscuridad.

Este colorante vital fluorescente (Hoechst 33342), tiene la capacidad de penetrar en la célula a través de la membrana e intercalarse entre las regiones Adenina-Timina (A-T) del ADN con una baja citotoxicidad, pudiendo ser empleado para evaluar el contenido de ADN en la célula y los diferentes estadios del ciclo celular (Arndt-Jovin y cols., 1977). Además, se ha descrito, que aquellas células con cierto grado de indiferenciación estarán enriquecidas en canales transportadores de membrana tipo ABC

transporters (proteínas tipo MDR1, ABCG2...) y por tanto, serán capaces de expulsar este colorante vital a lo largo del período de incubación.

El control negativo de la técnica está basado en el uso de bloqueantes (verapamil, reserpina) de los canales transportadores de membrana tipo ABC *transporters*, responsables de la expulsión del Hoechst. En nuestro caso se emplearon verapamil y reserpina. Como consecuencia, una alícuota de cada una de las muestras analizables, fue teñida con Hoechst 33342 en combinación con verapamil 100 μ M y otra con reserpina 50 μ M (Sigma-Aldrich, Madrid, España). Cuando las suspensiones celulares fueron analizadas, se comprobó que la región lateral desaparecía, indicando que las células eran incapaces de expulsar el colorante. Puesto que se obtuvo mejores resultados de inhibición con reserpina que con verapamil, se escogió la primera como candidato óptimo para nuestros experimentos.

Tras el periodo de incubación, tanto las muestras como los controles negativos, se centrifugaron a 580g durante 7 minutos con el fin de recoger las células tras las tinciones. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en un medio frío compuesto por Hank's Buffered Salt Solution (HBSS), SBF 2% y 10mM de HEPES, manteniéndose a 4^o C hasta el análisis. Finalmente se añadió yoduro de propidio (IP) a concentración de 5 μ g/ml (IP, Sigma-Aldrich, Madrid, España) y se filtraron las muestras por filtros de polietileno con un tamaño de poro de 30 μ m para evitar agregados a la hora del análisis.

1.2.5 Aislamiento de las células Side Population

En 1996, Goodell y colaboradores describieron por primera vez en células hematopoyéticas, la existencia de una subpoblación celular muy minoritaria, caracterizada por presentar una gran plasticidad y autorrenovación. En presencia de Hoechst 33342, estas células se teñían menos que las demás, pudiéndose ser identificadas y aisladas por citometría de flujo (CMF), pues formaban una cola en la región lateral, adyacente a la población de células en fase G0/G1 del ciclo celular (ver Figura 12), por lo que se denominó *Side Population* o células SP.

Para esta parte del estudio, las células teñidas previamente con Hoechst 33342 y con Hoechst 33342 y reserpina, fueron analizadas y separadas en un citómetro MoFlo® (*Modular Flow cytometer*) Dako, Dinamarca) con capacidad de separación celular.

La excitación se llevó a cabo con el láser *Coherent Enterprise II* (California, USA) con dos picos de emisión (488 nm y 351 nm) y otros dos de excitación, trabajando a 30mW. Por un lado pudimos detectar la fluorescencia roja emitida por el Hoechst 33342 a 405/30 nm y por otro lado, la fluorescencia azul a través de un filtro con paso de banda de 670/20 nm, mediante un histograma biparamétrico, midiendo las señales en escala lineal. Finalmente, se creó otro histograma biparamétrico donde se representaba la fluorescencia del IP, detectada en filtro de 613/20nm frente al *Forward Scatter* (FS), en escala logarítmica descartando así las células muertas del análisis.

Gracias a esta técnica, se aislarían y separarían del total de la suspensión celular, las células vivas y con baja fluorescencia emitida por el Hoechst (células de la *Side Population*, SP) y las células vivas con alta fluorescencia emitida por el Hoechst (células de la *Non -Side Population*, NSP), que corresponderían a la población celular en la transición de la fase G0/G1 y fase S.

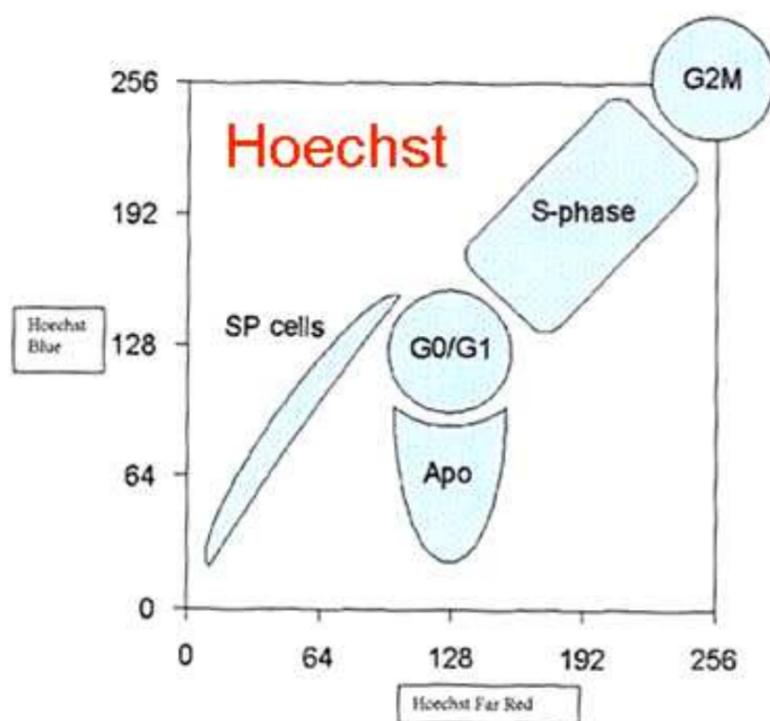


Figura 12. Diagrama digitalizado obtenido a través del *software* del citómetro de flujo. En él, se muestra la distribución de los diferentes eventos del ciclo celular cuando las células son tratadas con Hoechst 33342.

1.3 Caracterización molecular de la *Side Population*

1.3.1 Aislamiento de ARN

En un primer paso, las suspensiones celulares correspondientes a las regiones SP y NSP aisladas en el citómetro de flujo con capacidad de separación celular, fueron centrifugadas a 580g durante 7 minutos.

Para la extracción del material genético (ARN) de las mismas, se empleó el kit de Mini RNA Isolation (Zymo Research) siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, tras eliminar el sobrenadante de las muestras centrifugadas, se resuspendió el botón celular en 600µl de Buffer

ZR ARN, vórtiendo brevemente. A continuación, se transfirió el lisado celular, a través de la columna Zymo-Spin™, a un tubo de recogida y se centrifugó a 12.000g durante 1 minuto, descartando de nuevo el sobrenadante. Posteriormente, se procedió al lavado de ARN a través de las columnas y se volvió a centrifugar para asegurar la eliminación completa de la solución de lavado. Finalmente se colocaron las columnas en un tubo de recogida libre de DNAsa/RNAsa y se añadió agua destilada para eluir el ARN retenido en la columna, que sería utilizado para futuros experimentos.

Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a la cuantificación y análisis de pureza del ARN mediante técnicas espectrofotométricas con ayuda de un *NanoDrop* (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Los criterios establecidos para aceptar la muestra como válida fueron:

- Una relación de absorbancias A260/A280 con un valor cercano a 2.
- Baja presencia de restos de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm

Una vez medida la concentración, el ARN se guardó a -80°C hasta su posterior utilización.

1.3.2 Retrotranscripción

Para la obtención de la primera cadena de ADN molde a partir del ARN total, se realizó una transcripción reversa, mediante la utilización del kit *Advantage RT-for-PCR* (Clontech, Palo alto, CA USA), siguiendo las

indicaciones del fabricante. Se tomó 1 µg de ARN de cada muestra y se le añadió 1 µL de oligo-18-dT y agua-DEPC hasta un volumen final de 13,5 µL, calentándose a 70°C durante 2 minutos para desnaturalizar la cadena de ARN y evitar la formación de estructuras secundarias de las mismas. Después de esos 2 minutos se añadió a cada tubo 6,5 µL de la mezcla de reacción que contenía: 4 µL de tampón de reacción 5X, 1 µL de Deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP mix (10mM cada uno), 0,5 µL de inhibidor recombinante de RNasa, 1 µL de la transcriptasa reversa MMLV (*Moloney- Murine Leukemia Virus*). Completados los 20 µL de volumen final se procedió a llevar a cabo la reacción de retro-transcripción en un termociclador T3000 Thermocycler (Biometra) con el siguiente programa: 1 hora a 42°C y 5 minutos a 94°C al final del mismo, para detener la reacción. El producto final fue diluido hasta un volumen total de 20 µL con agua-DEPC y almacenado a 4°C hasta su análisis por PCR.

1.3.3 Reacción en cadena de la polimerasa

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

PCR semi-cuantitativa

Esta técnica sirve para amplificar un fragmento de ADN diana. Se fundamenta en la propiedad natural de las ADN polimerasas para replicar hebras de ADN, para lo cual emplea ciclos a altas y bajas temperaturas

alternadas para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí, tras cada fase de replicación y, a continuación, dejar que vuelvan a unirse a polimerasas para que vuelvan a duplicarlas.

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

El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 cambios repetidos de temperatura llamados ciclos; cada ciclo suele consistir en 2-3 pasos a diferentes temperaturas (ver Figura 13).

a) Inicio y desnaturalización

En primer lugar se pretende llevar la reacción hasta una temperatura de 94-96°C, necesaria para la activación de las ADN polimerasas. Una vez alcanzada dicha temperatura, comenzará la desnaturalización del ADN (se separan las dos hebras de las cuales está constituido). Este paso puede realizarse de diferentes modos, siendo el calentamiento (94-95°C) de la muestra la forma más habitual. La temperatura a la cual se decide realizar la desnaturalización depende, por ejemplo, de la proporción de Guanina-Citosina (G-C) que tenga la hebra, así como la longitud de la misma. Otros métodos, raramente empleados en la técnica de la PCR, serían la adición de sales o agentes químicos capaces de realizar la desnaturalización.

b) Alineamiento o unión del cebador

A continuación se producirá la hibridación del cebador, es decir, el cebador se unirá a su secuencia complementaria en el ADN molde. Para ello es necesario bajar la temperatura a 40-68 °C durante 20-40 segundos (según el caso), permitiendo así el alineamiento. Los puentes de hidrógeno estables entre las cadenas de ADN (unión ADN-ADN) sólo se forman cuando la secuencia del cebador es muy similar a la secuencia del ADN molde. La polimerasa une el híbrido de la cadena molde y el cebador, y empieza a sintetizar ADN. Los cebadores actuarán como límites de la región de la molécula que va a ser amplificada.

c) Extensión o elongación de la cadena

La ADN polimerasa, toma el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. La temperatura para este paso depende de la ADN polimerasa que usemos. Para la polimerasa *Taq*, la temperatura de máxima actividad está en 72 °C. El tiempo de extensión depende tanto de la ADN polimerasa usada como de la longitud del fragmento de ADN que se va a amplificar. La elongación final se llevará a cabo durante 5-15 minutos a una temperatura de 70-74°C tras el último ciclo de PCR. Con ella se asegura que cualquier ADN de cadena simple restante sea totalmente ampliado. Una vez terminada la reacción, la temperatura descenderá hasta 4-15 °C durante un tiempo indefinido para su mantenimiento.

La técnica de PCR semi-cuantitativa se usa para determinar la presencia o ausencia de las secuencias buscadas. La PCR semi-cuantitativa fue conformada con 600ng/μL del producto del paso de la retrotranscripción. A ese volumen de ADNc (ADN monocatenario y complementario al ARN

MATERIALES Y MÉTODOS

mensajero que contiene la secuencia codificante de un gen), le fue añadida la mezcla de reacción que contenía 2,5 μL de tampón de reacción 10X (Bioline, Londres, Inglaterra), 1,25 μL de MgCl_2 50mM (Bioline), 15,5 μL de agua DEPC, 0,5 μL de mezcla de dNTPs (Sigma-Aldrich, Madrid, España), 0,5 μL de cebadores en extremos 5' y 3' a 20mM, 0,25 μL de *Taq pol* (Bioline) hasta llegar a un volumen final de 25 μL . Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un termociclador Unoll (Biometra, Gottingen, Alemania). Como control negativo de la técnica en cada PCR se sustituyó el ADNc por agua bidestilada comprobando en estos casos que no existía amplificado alguno.

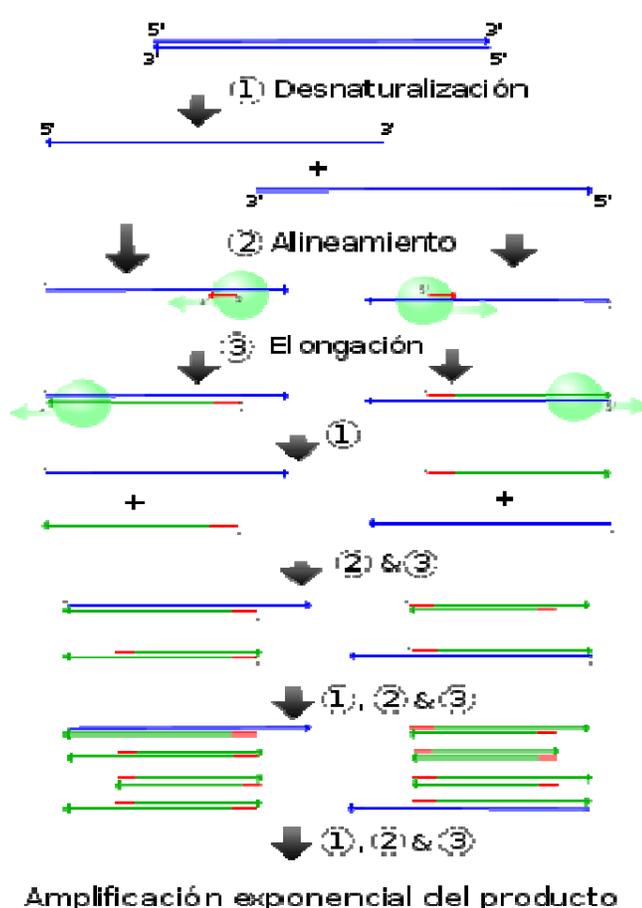


Figura 13. Fases de la reacción en cadena de la polimerasa

Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante programas informáticos, a través de la web Primer3 Input (versión 0.4.0). Las secuencias y los tamaños del fragmento que amplifican se muestran en la siguiente tabla.

Transcrito	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'	Tamaño
ABCG2	GGCCTCAGGAAGACTTATGT	AAGGAGGTGGTGTAGCTGAT	342 pb
Receptor de Estrógeno - α (ESR1)	ACAAGCGCCAGAGAGATGAT	CAGATTCATCATGCGGAACC	521 pb
Receptor de Progesterona (PGR)	AAATCATTGCCAGGTTTTTCG	TGTGAGCTCGACACAACCTCC	363 pb
Receptor hormona Folículo estimulante (FSHr)	GAGGTTTGTCTCACCACCAAGC	AAGGCCTCAGGGTTGATGTA	195 pb
Receptor hormona Luteinizante (LHr)	CTCAATGTGGTGGCCTTCTT	CCATTTTTGCAGTTGGAGGT	398 pb
Smoothelin (SMOOTH)	GCTGAGGAGCTGATGACTAT	CTCCTTCTCCAGCTTCTCAA	585 pb
Calponina (CALP)	AAGTATGACCACCAGCGGGAGCAG	TAGGCGGAATTGTAGTAGTTGTGT	821 pb
GAPDH	TCACCATCTTCCAGGAGCG	CTGCTTCACCACCTTCTTGA	263 pb

Tabla I. Cebadores usados para la PCR semi-cuantitativa

Para cada reacción de PCR se estandarizó el siguiente programa: 94°C durante 5 minutos para la desnaturalización de ADN; 35 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 56°C durante 30 segundos y una extensión final a

72°C durante 1 minuto, para finalizar a 4°C durante un tiempo indefinido de mantenimiento.

Los controles positivos fueron: una línea de células madre embrionarias (VAL-9) para el marcador de indiferenciación *ABCG2*, células de endometrio y ovario para testar la expresión de receptores hormonales: receptor de estrógenos α (*ESR1*), receptor de progesterona (*PGR*), receptor de la hormona folículo-estimulante (*FSHr*), receptor de la hormona luteinizante (*LHr*), y células miometriales para comprobar la expresión de marcadores musculares: smoothelina (*SMOOTH*) y calponina (*CALP*). En todos los casos, se empleó agua bidestilada como control negativo y Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como control interno.

Para verificar que la PCR había generado el fragmento de ADN previsto, se emplearon técnicas de electroforesis, que separan los fragmentos de ADN generados de acuerdo a su longitud y tamaño. Así, los fragmentos de ADN amplificados fueron separados mediante electroforesis durante 45 minutos a 120 V en gel de agarosa al 2% (p/v), con 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de bromuro de etidio y finalmente fueron observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron recortadas del gel y purificadas con el kit *Pharmacia Elution Band Kit* (Amershan, Barcelona, España) para poder secuenciarlas y comprobar la correlación de dicho amplificado con la secuencia estudiada. La secuenciación se llevó a cabo por el servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia, y en todos los casos se comprobó que los amplificados eran correctos mediante el uso del programa informático Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Esta opción es usada por lo general, para validar el producto amplificado y compararlo con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas pudiendo así inferir en su función.

1.4 Transcriptómica de la *Side Population*

Recientemente se han producido grandes avances en la genómica de los miomas mediante el uso de la tecnología de “*microarrays*” y la bioinformática, que proporcionan una amplia cantidad de información sobre la expresión génica (Horcajadas y cols., 2008).

Los ensayos de hibridación en “*microarrays*”, descritos a finales de los años ochenta, se basan en la disposición de material genético sobre un sustrato (plástico, cristal, membranas), en posiciones conocidas. En la actualidad existen en el mercado científico herramientas de análisis genómico (matrices o *microarrays*) diseñadas a partir de ácidos nucleicos en forma de ADNc, secuencias cortas de nucleótidos (oligonucleótidos), o ADN de doble cadena. En todos los casos, cada material genético que se coloca en el “*array*” o matriz, está referido a un gen de situación y características conocidas o predichas con cierta verosimilitud (Habb y cols., 2001). Es decir, cada uno de los puntos del “*microarray*” representa un gen y la información que nos genera se refiere al estatus de ese gen en la muestra analizada. De este modo, el material obtenido de la muestra problema, convenientemente tratado y marcado (radioactividad, fluorescencia) se pone en contacto con el “*array*” o matriz, hibridando en aquellas posiciones en que se complementa con las sondas. Mediante el escaneado de estas matrices de puntos, donde cada punto corresponde a una unión específica (por ejemplo, antígeno-anticuerpo) podemos analizar diferencias cuantitativas en abundancia de cada proteína.

Una de las ventajas fundamentales de esta tecnología es su capacidad para medir cientos de proteínas de forma simultánea usando pequeños volúmenes tanto de las muestras clínicas o biológicas a analizar, como de

los anticuerpos. Ello resulta de gran utilidad por ejemplo, para poder evaluar una ruta biológica concreta o analizar el conjunto de proteínas que son secretadas. Este abordaje permite diseños experimentales que responden a hipótesis específicas, así como, la interpretación biológica de los resultados obtenidos.

1.4.1 Aislamiento de ARN

El primer paso para el análisis de “microarrays” consistió en la extracción del material genético (ARN) de las suspensiones celulares correspondientes a la población miomatosa completa (fracción total; FT) y a la región SP aislada en el apartado 1.2.5. Se utilizó el kit de Mini RNA Isolation (Zymo Research) y se siguieron las instrucciones del fabricante (ver apartado 1.3.1).

Una vez terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a la cuantificación y análisis de pureza del ARN mediante técnicas espectrofotométricas con ayuda de un *NanoDrop* (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Los criterios establecidos para aceptar la muestra como válida fueron:

- Una relación de absorvancias A260/A280 con un valor cercano a 2.
- Baja presencia de restos de proteínas, fenol u otros contaminantes que absorben fuertemente a 280 nm

Una vez medida la concentración, el ARN se guardó a -80°C hasta su posterior análisis.

1.4.2 Análisis transcriptómico: *microarrays de expresión*

Con objeto de evaluar el nivel de expresión génica de la SP aislada de los miomas respecto a su población celular completa (FT), se utilizaron un total de 4 muestras de ARN para la SP y otras 4 muestras de ARN para la FT. Todas ellas se hibridaron con Whole Human Genome Oligo Microarray (Agilent Technologies, Madrid, España), que abarca más de 44.000 sondas de ADN humano. Los protocolos para la preparación e hibridación de las muestras fueron adaptados del manual técnico de Agilent. Una vez obtenido el patrón de hibridación, fue revelado en un escáner Axón 4100A (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU) cuya imagen resultante se convirtió en valores numéricos gracias al *software* GenePix Pro 6,0 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EEUU).

Previamente al estudio de expresión génica diferencial, se empleó el *Principal Component Analysis* (PCA) para analizar la variabilidad de las muestras y para saber si teníamos un tamaño muestral adecuado. Además, nos permitió detectar el posible *batch effect*, observando si las muestras analizadas de la misma fracción se agrupaban automáticamente, descartando aquellas más distales. Una vez realizado este primer método exploratorio, se determinó, a través del *software* GenePix Pro 6,0, el perfil de expresión génica mediante la comparación del grupo experimental frente al grupo control con pruebas no paramétricas, utilizando dos criterios a la hora de considerar los genes más significativos: una tasa de cambio o “*fold change*” absoluto de 2.0 o superior y un p-valor menor de 0.05.

Una de las ventajas significativas es que, debido a la miniaturización del sistema, la alta concentración del material permite la identificación de muestras presentes en un bajo número de copias. Además las técnicas de

revelado por fluorescencia ofrecen una elevada relación señal/ruido incluso en casos de transcritos poco abundantes. El alto grado de integración del “*array*” permite, en un solo ensayo, obtener multitud de valores de expresión génica relativa para distintas condiciones biológicas, lo que convierte a esta técnica en una herramienta de alto rendimiento para trabajos en el área de la genómica funcional.

En último lugar, con el fin de detectar activaciones o inactivaciones en procesos biológicos o *pathways*, se utilizó la base de datos DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery., Dennis y cols, 2003).

1.4.3 Validación de la técnica de *microarrays*

La validación mediante Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) o PCR cuantitativa, fue realizada para dos genes seleccionados: *Transmembrane 4 superfamily member (TMSF4)* y Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6). Ambos estaban disminuidos de forma significativa en la fracción SP respecto a la población celular completa y además de ser relevantes en procesos inflamatorios, señalización celular, desórdenes genéticos, etc, teníamos la certeza de que los *primers* diseñados amplificaban bien en la RT-PCR. Como gen *housekeeping* de control interno para normalizar se utilizó el gen ribosomal 18S (18srARN).

2. Modelo *in vitro*: Generación de líneas celulares a partir de la *Side Population* de miomas

2.1 Ensayos de clonogenicidad *in vitro*

Una de las pruebas indirectas para caracterizar a las células madre somáticas (SSC) es que éstas tienen actividad clonogénica. Esta actividad es definida como la habilidad de una célula para producir una colonia celular cuando es sembrada a bajas densidades (Chan y cols., 2004). En lo que respecta a las células SP candidatas a células madre somáticas (SSC) y derivadas de los miomas, existen evidencias que sugieren que también podrían tener un origen clonal (Walker y Stewart, 2005).

Basándonos en estas premisas, las suspensiones celulares aisladas de las fracciones SP y NSP de los miomas fueron sembradas por triplicado en placas de 6 pocillos a diferentes densidades clonales: 156, 260 y 520 células/cm², con la finalidad de determinar la eficiencia óptima de proliferación celular. El medio de cultivo empleado contenía DMEM/F-12 (Sigma-Aldrich, España) con 10% de SBF, 2 mM de glutamina (Invitrogen) y una solución antibiótica- antimicótica y las condiciones de cultivo fueron en hipoxia (2% O₂), 37°C, 5% de CO₂ y 90% de humedad. Tras 15 días, las células presentes en los pocillos fueron lavadas con tampón fosfato salino (PBS), fijadas con paraformaldehído al 4% y teñidas con azul de toluidina. La eficiencia clonal o Cloning Efficiency (CE) se determinó a partir de la fórmula $CE (\%) = (\text{número de colonias} / \text{número de células sembradas}) \times 100$. Se calculó tanto la media, como el error estándar de la misma para ambas fracciones celulares (SP y NSP) y se procedió al análisis estadístico

de los datos mediante la prueba t-Student, considerando significativo un p-valor de 0,05.

2.2 Creación de líneas celulares: LeioSP1 y LeioSP2

Una vez demostrada la capacidad clonogénica de las células SP aisladas de los miomas, el siguiente paso fue generar líneas celulares estables para poder trabajar con ellas en el futuro (LeioSP1 y LeioSP2). La generación de las mismas requería varios pasos: inicialmente, las fracciones aisladas de la SP de mioma se sembraron a la densidad clonal óptima de 156 cels/cm², siguiendo el protocolo descrito en el apartado 1.5.1 y se mantuvieron 15 días bajo las mismas condiciones. Tras este periodo, se seleccionaron los clones primarios derivados de las células individuales y se re-sembraron para generar clones secundarios y así purificar la población. Después de dos semanas adicionales de cultivo, se volvieron a seleccionar los clones y se re-sembraron, pero esta vez se el cultivo se mantuvo hasta que las células alcanzaron el 80-100% de confluencia y se volvieron a re-sembrar. Estos cultivos celulares se mantuvieron en serie cada 5-7 días y continuaron de esta manera durante nueve pases (7 semanas) para finalmente ser criopreservados o usados para posteriores experimentos (ver Figura 14).

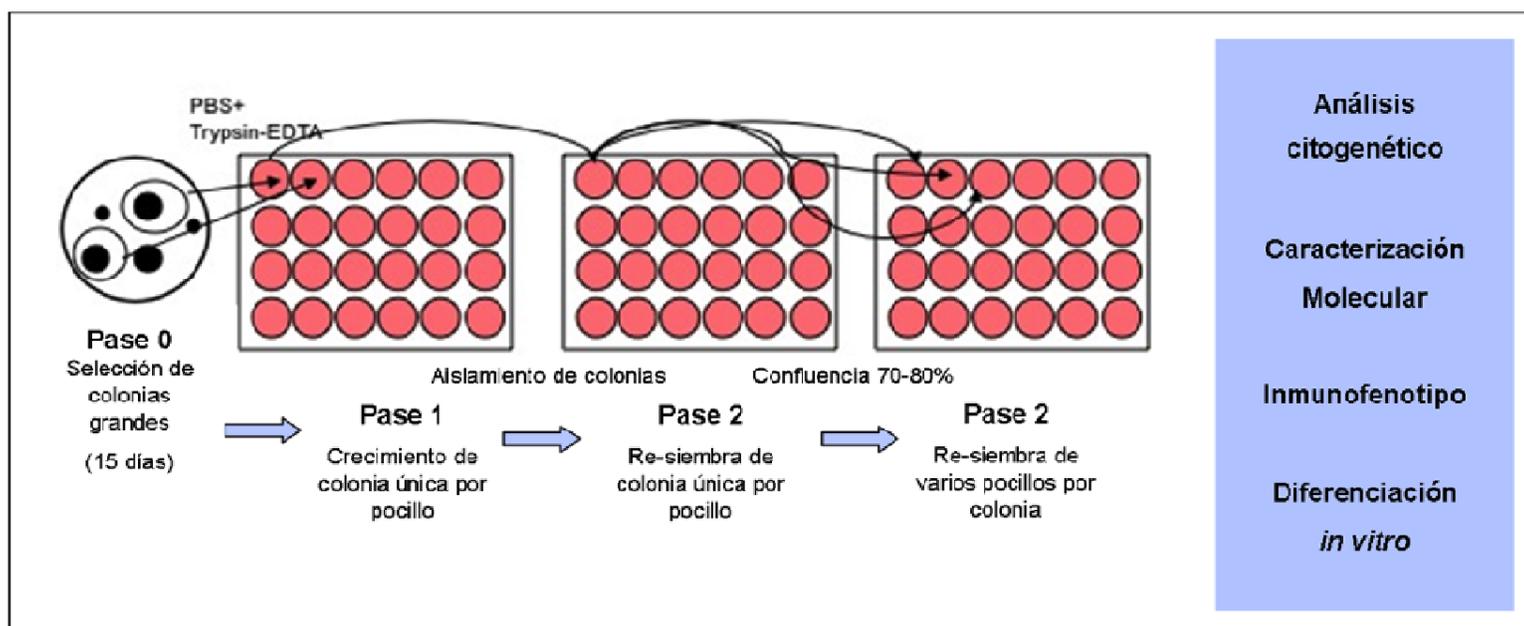


Figura 14. Representación de la generación de líneas celulares a partir de los clones aislados de la *Side Population* de miomas.

2.3 Análisis citogenético de LeioSP1 y LeioSP2

Debido a las anomalías cromosómicas detectadas alrededor del 40-50% de los miomas (Ligon y Morton, 2001), era conveniente realizar un cariotipo de las líneas celulares generadas con el fin de confirmar la integridad citogenética de las mismas. Para el desarrollo de esta técnica, las líneas celulares en pase 4-5, fueron tratadas durante 30 minutos con colchicina (KaryoMAX[®] ColcemidTM solution, Invitrogen), cuya función consiste en detener la mitosis al interferir en la polimerización de los microtúbulos del huso mitótico. A continuación, se pusieron durante 15 minutos en contacto con cloruro de potasio (0.075M KCl, Invitrogen) generando un medio hipotónico que hacía que las células se hincharan. Así al dejarlas caer sobre un portaobjetos, estallarían por la presión, facilitando la salida del material genético del núcleo para su posterior análisis. Finalmente, las suspensiones celulares fueron fijadas en metanol: ácido acético, en proporción 3:1

respectivamente y teñidas con 4'6- diamidino-2-phenylindole (DAPI, Invitrogen), conservándose a temperatura ambiente hasta su estudio.

2.4 Caracterización molecular de las líneas

Tras obtener las suspensiones celulares correspondientes a las líneas generadas (LeioSP1 y LeioSP2), se procedió al aislamiento de ARN de las mismas, previa centrifugación durante 7 minutos a 580g.

A continuación, el botón celular conteniendo estas células se resuspendió en Trizol™ (Invitrogen) y posteriormente se adicionaron 0,2 volúmenes de cloroformo por cada volumen de Trizol utilizado en origen. Se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó en hielo durante unos 15 minutos. Tras la incubación, se realizó una nueva centrifugación a 12.000 rpm durante 25 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a otro tubo al que se añadieron 0,5 volúmenes de isopropanol por cada volumen de Trizol utilizado en el paso previo. Se dejó precipitar durante toda la noche a -20°C y al día siguiente, se efectuó una nueva centrifugación a 12.000 rpm durante 25 minutos a 4°C para descartar el isopropanol. Seguidamente, se realizó un lavado del precipitado en etanol al 70% (v/v) en agua dietil pirocarbonato (DEPC), y se volvió a centrifugar por última vez en las mismas condiciones, resuspendiendo finalmente en un volumen de 15 µL de agua DEPC.

Terminada la fase de extracción de ARN de cada una de las muestras, se procedió a la cuantificación y análisis de pureza del ARN mediante técnicas espectrofotométricas con ayuda de un NAnoDrop (ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific, USA). Posteriormente, a partir del ARN total, se llevó a cabo la retrotranscripción para la obtención de la

primera cadena de ADN molde, siguiendo los protocolos descritos en los apartado 1.3.2.

A continuación, se realizó una PCR semi-cuantitativa con objeto de caracterizar las líneas generadas a nivel molecular. Para ello, se emplearon los siguientes marcadores de indiferenciación: Octamer-binding transcription factor 4 (*OCT-4*), Nanog, Sry-box2 (*SOX2*), DNA cytosine-5-methyltransferase 3 beta (*DNMT3B*), *GABR3* y Growth differentiation factor-3 (*GDF3*), así como marcadores de diferenciación de origen mesenquimal: Cluster of differentiation 90 (*THY-1/CD90*), Wilm's Tumour 1 (*WT1*), Renin (*REN*), Cardiac Actin (*CARD ACT*), Enolase (*ENO*) y Gamma-Globin (δ -*GLOB*); de linaje endodérmico: amylase (*AMY*) y de ectodermo: neurofilament heavy polypeptide (*NFH*) (Ver Tabla II).

Esta técnica se realizó del mismo modo que lo explicado en el apartado 1.3.3. Tras una primera etapa de desnaturalización, se llevó a cabo la unión de los cebadores y finalmente la extensión- amplificación de los fragmentos deseados. Se empleó la línea de células madre embrionarias VAL-9 (Aguilar-Gallardo y cols., 2010) como control positivo de marcadores de indiferenciación, y tejidos como riñón, hígado y cerebro para demostrar el origen mesodérmico, endodérmico y ectodérmico respectivamente. Como control negativo de la técnica en cada PCR se sustituyó el ADNc por agua bidestilada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Transcrito	Secuencia Fw 5'-3'	Secuencia Rv 5'-3'	Caracterización
OCT4	AAGAACATGTGTAAGCTGCGGCC	GGAAAGGCTTCCCCCTCAGGGAAAGG	Indif
NANOG	GATTTGTGGGCCTGAAGAAA	TGGGGTAGGTAGGTGCTGAG	Indif
SOX2	AACCCCAAGATGCACAACCTC	CGGGGCCGGTATTTATAATC	Indif
DNMT3B	TTTGGCCACCTTCAATAAGC	GGCAACATCTGAAGCCATTT	Indif
GABR3	CTTGACAATCGAGTGGCTGA	CAACCGAAAGCTCAGTGACA	Indif
GDF3	CTTCACCCCAGAAGTTCCAA	GCAGGTTGAAGTGAACAGCA	Indif
CD90	AGCATCGCTCTCCTGCTAAC	GCACGTGCTTCTTTGTCTCA	Meso
WT1	TCCTTCATCAAACAGGAGCCGAGC	CTGTAGGGCGTCCTCAGCAGCAAAG	Meso
REN	AGTCGTCTTTGACACTGGTTCGTCC	GGTAGAACCTGAGATGTAGGATGC	Meso
ACARD	TCTATGAGGGCTACGCTTTG	CCTGACTGGAAGGTAGATGG	Meso
ENO	TGACTTCAAGTCGCCTGATGATCCC	TGCGTCCAGCAAAGATTGCCTTGTC	Meso
δ -GLOB	ACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGG	ACTTGTGAGCCAAGGCATTAGCCAC	Meso
AMY	GCTGGGCTCAGTATTCCCAAATAC	GACGACAATCTCTGACCTGAGTAGC	Endo
NFH	TGAACACAGACGCTATGCGCTCAG	CACCTTTATGTGAGTGGACACAGAG	Ecto
GAPDH	TGAGCTGAACGGGAAGCTCA	GTCTACATGGCAACTGTGAGGA	GC

Tabla II. Cebadores usados para la PCR semi-cuantitativa de las líneas generadas.

Encontramos cebadores característicos de indiferenciación (*Indif*), de origen mesodérmico (*Meso*), endodérmico (*Endo*), ectodérmico (*Ecto*) y gen constitutivo (GC).

Los fragmentos de ADNc amplificados fueron separados mediante electroforesis durante aproximadamente 45 minutos a 120V en un gel de agarosa 2% (p/v) con 0,5µg/ml de bromuro de etidio y finalmente observados bajo luz ultravioleta. Las bandas visualizadas fueron recortadas del gel y purificadas con el kit Pharmacia Elution Band Kit (Amershan, Barcelona, España) para poder secuenciarlas y comprobar la correlación de dicho amplificado con lo esperado. La secuenciación se llevó a cabo en el

servicio de secuenciación de la Universidad de Valencia mediante el uso del programa informático BLAST, que nos permitió comparar la secuencia de nuestras muestras con otras secuencias previamente caracterizadas.

2.5 Caracterización fenotípica de las líneas

La caracterización fenotípica o inmunofenotipado es el proceso de identificación y cuantificación de distintas poblaciones celulares en base a la expresión diferencial de marcadores de membrana. Este tipo de análisis se realiza empleando anticuerpos monoclonales antígeno-específicos marcados con fluorocromos. Suelen medirse de forma simultánea varios marcadores celulares, por lo que se emplean combinaciones de anticuerpos acopladas a fluorocromos con diferentes espectros de emisión (ver Figura 15).

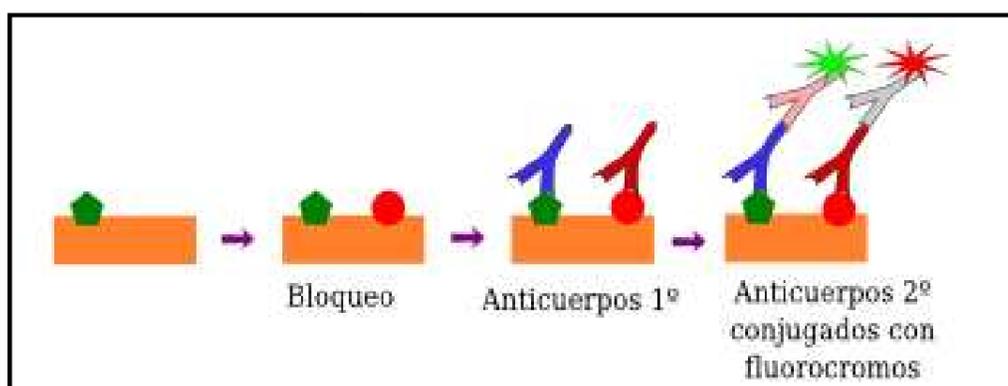


Figura 15.
Representación de
las etapas de
inmunofenotipado

Con el fin de confirmar la pureza, el origen y las características de las líneas celulares generadas, se realizó una sólida caracterización mediante un análisis inmunofenotípico. Para llevar a cabo este inmunofenotipaje, era necesaria que las líneas celulares fueran dispuestas en forma de célula única en suspensión celular. Tras esto, las células fueron mantenidas en tampón de bloqueo (10^6 células en $100 \mu\text{L}$) PBS-BSA 5% (p/v) durante 30 minutos para bloquear los sitios de unión inespecífica, y se volvieron a centrifugar. A continuación, se resuspendieron en solución de incubación de

MATERIALES Y MÉTODOS

anticuerpo que se compone de PBS-BSA al 3% (p/v) y del anticuerpo correspondiente en cada uno de los casos a las concentraciones de trabajo establecidas tras la titulación de estos. Entre los usados destacaban: CD90, CD73 y CD105 anticuerpos típicos de las células madre mesenquimales, CD34 y CD45, característicos de células madre hematopoyéticas, CD31 presente en las células endoteliales y CD133 de las células progenitoras endoteliales (ver Tabla III). También se incluyeron los controles de isotipo en cada muestra para corregir la unión inespecífica y la fluorescencia de fondo.

Antígeno	Clon	Isotipo
BCRP	5D3	FITC- conjugated mouse IgG2
CD90	F15-42-1	FITC- conjugated mouse IgG1
CD73	AD2	PE- conjugated mouse IgG1
CD 105	8 E 11	FITC- conjugated mouse IgM
CD45	HuLy-m4	FITC- conjugated mouse IgG1
CD34	Q-BEND/10	PE- conjugated mouse IgG1
CD31	WM59	PE- conjugated mouse IgG1
CD133	AC133	APC conjugated mouse IgG1

Tabla III. Lista de anticuerpos usados para el análisis inmunofenotípico

Tras la incubación de 60 minutos a 4° C, se centrifugó la muestra a 2000 rpm durante 7 minutos y se resuspendió en PBS para llevarse a cabo el análisis inmunofenotípico en el citómetro de flujo Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, CA, EE.UU). Este citómetro está equipado con un láser de Argón (488nm, 15mW) y con dos detectores de dispersión de luz, donde la dispersión frontal (FS) es una medida proporcional al tamaño celular, y la lateral (SS) es un indicador de la complejidad celular. De los 5 detectores de fluorescencia, se utilizaron el de 525 nm para los anticuerpos conjugados con isotiocinato de fluoresceína (FITC), el de 575 nm para los conjugados

con ficoeritrina (PE) y el de 670 nm para el conjugado con alofococianina (APC).

Con el fin de excluir las células muertas del análisis, las células se tiñeron con ioduro de propidio (IP) en el caso de los anticuerpos conjugados con FITC, o con 7-aminoactinomicina D (7-ADD) en los conjugados con PE y APC. Para el IP se utilizó el detector de 625 nm y para el 7-ADD el de 625 nm. Las señales de FS y SS se recolectaron en escala lineal y para las fluorescencias se utilizó la amplificación logarítmica.

2.6 Diferenciación *in Vitro*

La capacidad de diferenciación *in vitro* de determinadas células hacia un linaje específico es una de las características de las células madre somáticas (SSC). Basándonos en esta habilidad, se intentó evaluar el potencial de diferenciación *in vitro* de las líneas celulares generadas (LeioSP1-2) hacia células de linaje mesodérmico: adipocitos y osteocitos.

Tanto LeioSP1 como LeioSP2 se cultivaron *in vitro*, durante dos o tres semanas, en condiciones de normoxia (18-20% de O₂, 37 °C, 5% CO₂, 90% de humedad) a lo largo de todo el proceso de diferenciación. Para el protocolo se empleó medio de inducción adipogénico (Lonza, Barcelona, España) formado por: h -insulina, L-Glutamina, Mesenchymal Cell Growth Supplement (MCGS), dexametasona, indometacina, 3-isobuty-1-methyl-xanthine (IBMX) y penicilina/ estreptomina, así como medio de inducción osteogénico (Lonza, Barcelona, España), que consta de dexametasona, L-glutamina, ascorbato, MCGS, penicilina / estreptomina y β-glicerofosfato. Las células tratadas con medio de mantenimiento fueron el control negativo del proceso de diferenciación.

Una vez finalizado el protocolo, las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4% para, posteriormente evaluar la diferenciación adipogénica mediante tinción específica con Oil-Red-O, que tiene afinidad por las vacuolas lipídicas (Dominici y cols., 2006). El control positivo empleado en este caso fueron adipocitos obtenidos de tejido graso humano.

En referencia a la diferenciación osteogénica, se realizó una inmunohistoquímica para detectar la proteína bone sialoprotein (BSP, MAB1061, Chemicon International), empleándose como control positivo de la técnica, explantes de hueso humano. En todos los casos, los controles negativos de la técnica, fueron células miometriales humanas.

2.7 Análisis estadístico de los datos obtenidos.

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

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

3. Modelo *in vivo*.

La demostración funcional de la existencia de células madre somáticas (SSC) productoras de miomas a partir de un modelo animal es imprescindible para asegurar la capacidad regeneradora de las poblaciones celulares candidatas y las posibles diferencias entre ellas.

Los animales más usados en investigación y medicina regenerativa son los ratones NOD/SCID (Non- Obese Diabetic/ Severe Combined Immune Deficiency). Estos ratones presentan defectos severos en la producción y función de las células T, con defectos en los linfocitos B como un problema primario o secundario y, en algunos casos, también en la producción de células Natural- Killer (NK). Se trata de un modelo murino que es inmunológicamente incompetente a la hora de combatir las infecciones o rechazar el tejido trasplantado. Por medio del trasplante de tejidos inmunes inmaduros y/o células inmunes a estos ratones, los científicos han creado un modelo *in vivo* que promete ser de inmenso valor para aumentar nuestro entendimiento del sistema inmunológico (Ito y cols., 2002; Masuda y cols., 2007).

De acuerdo con los objetivos del presente trabajo, todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el Consejo de Revisión Institucional y el Comité de Ética del Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF) y el Instituto Valenciano de Infertilidad (IVI) de España.

3.1 Elaboración de un modelo animal

Basándonos en los trabajos anteriormente descritos por Ito y Masuda, se propuso utilizar el modelo murino (*Mus musculus*) como modelo animal más óptimo para nuestro estudio. (Ito y cols., 2002; Masuda y cols., 2007). Se emplearon hembras de la cepa Fox chase SCID (Charles River Laboratoires) de cuatro semanas de edad y se mantuvieron en cuarentena en nuestro animalario hasta el inicio del experimento.

Se pretendía demostrar la alta capacidad regeneradora y proliferativa de las células aisladas (LeioSP1 y LeioSP2), por lo que utilizamos este modelo para intentar reproducir un mioma humano en ratones desde una población celular escogida. Así, una vez seleccionada la cepa animal más acorde con el estudio se diseñó el modelo y el procedimiento experimental (ver Figura 16).

Cuatro semanas después del nacimiento y pasada la cuarentena establecida por el estabulario del centro de investigación, se ovariectomizó a las ratonas siguiendo un protocolo de inducción y mantenimiento anestésico mediante el uso de Isoflorano (Isoflo®, Esteve Barcelona) y se les premedicó con morfina 30 minutos antes de la intervención. De este modo fijamos la dosis exacta de hormonas durante el experimento, evitando cualquier tipo de variación debido a cambios endógenos y de diferencias inter-ratón relacionadas con los diferentes estadios del ciclo estral. Una vez ovariectomizadas, las ratonas se mantuvieron en racks autoclavados con lecho de virutas hasta que se iniciara el experimento, dos semanas después aproximadamente.

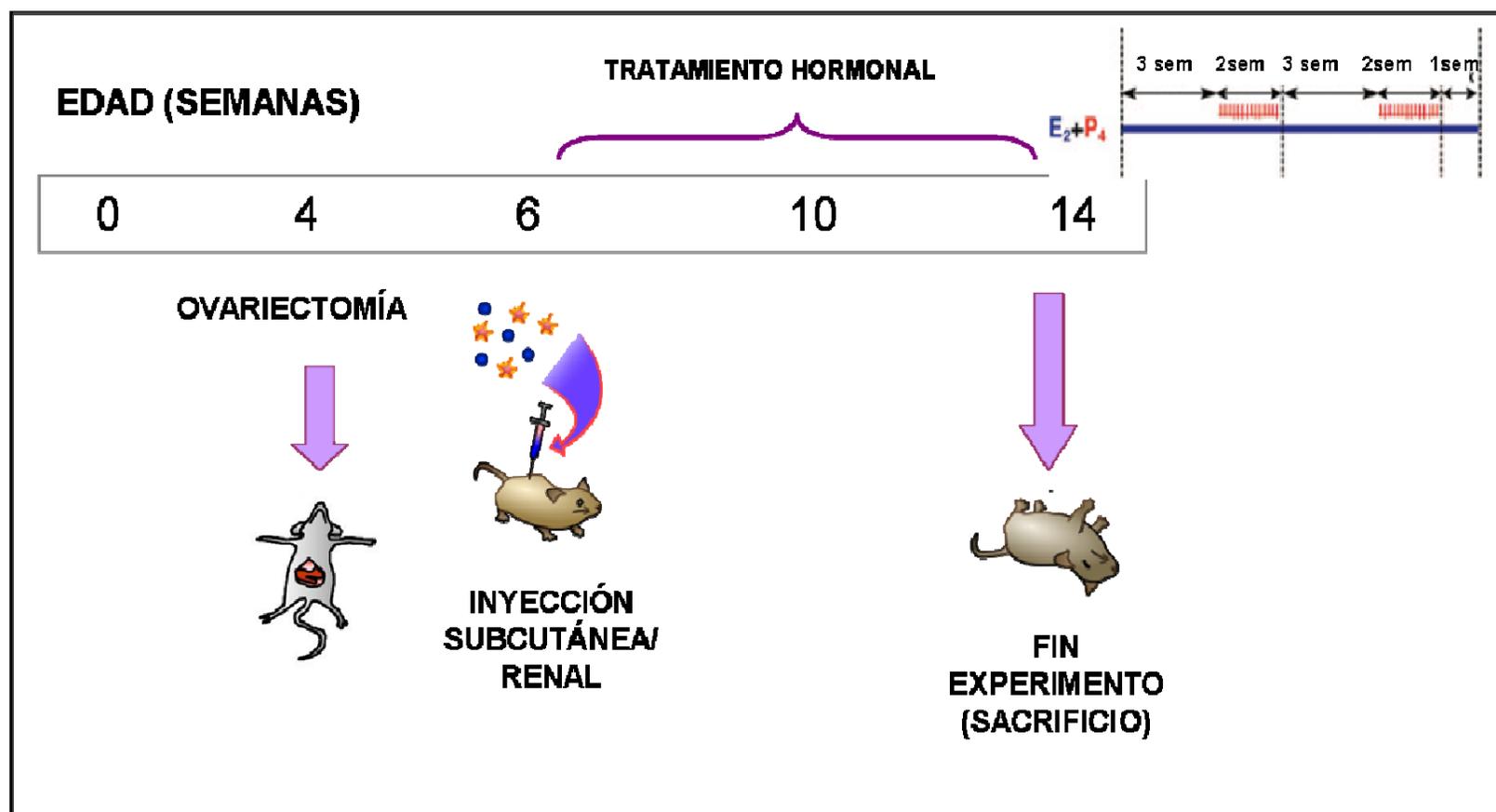


Figura 16. Diseño experimental del modelo animal. Cuatro semanas después del nacimiento se ovariectomizó a las ratonas y dos semanas más tarde, tras su recuperación, se inició el experimento (6^o semana de vida del ratón). A los 60 días (8 semanas aproximadamente) los ratones fueron sacrificados para el posterior análisis de los tejidos inyectados (sem= semanas).

Apoyándonos en la literatura (Tsuiji y cols., 2010; Ishikawa y cols., 2010), se emplearon dos métodos basados en diferentes sitios de inyección. El primer método consistía en la inyección subcutánea de 500.000-1.000.000 de células aisladas (LeioSP1-2) embebidas en (1:1) matrigel (Sigma-Aldrich, España) en el flanco izquierdo de ratones hembra de 6 semanas de edad ovariectomizadas (n=7). A lo largo de todo el experimento, los animales fueron tratados hormonalmente con estradiol (E₂) y con estradiol y progesterona (E₂+P₄) respectivamente. Los controles negativos usados en este caso fueron animales inyectados con matrigel (sin células) y animales inyectados con células NSP; en ambos casos los

MATERIALES Y MÉTODOS

ratones también fueron tratados hormonalmente como en la situación anterior (ver Figura 17A).

El segundo método estaba basado en la inyección de células aisladas (LeioSP1-2) bajo la cápsula renal. Tras la externalización del riñón de ratones hembra de 6 semanas de edad, ovariectomizadas (n=8), se inyectaron entre 500.000- 1.000000 células de LeioSP1 y LeioSP2 aisladas o mezcladas con células miometriales. Todas resuspendidas en 30µl de medio (DMEMF-12, Sigma-Aldrich, Spain). Al igual que en el caso anterior, los animales también fueron tratados hormonalmente con estradiol (E₂) y con estradiol y progesterona (E₂+P₄) respectivamente, durante la duración del experimento. Los controles negativos usados en este caso fueron animales inyectados con medio (sin células) (Figura 17B).

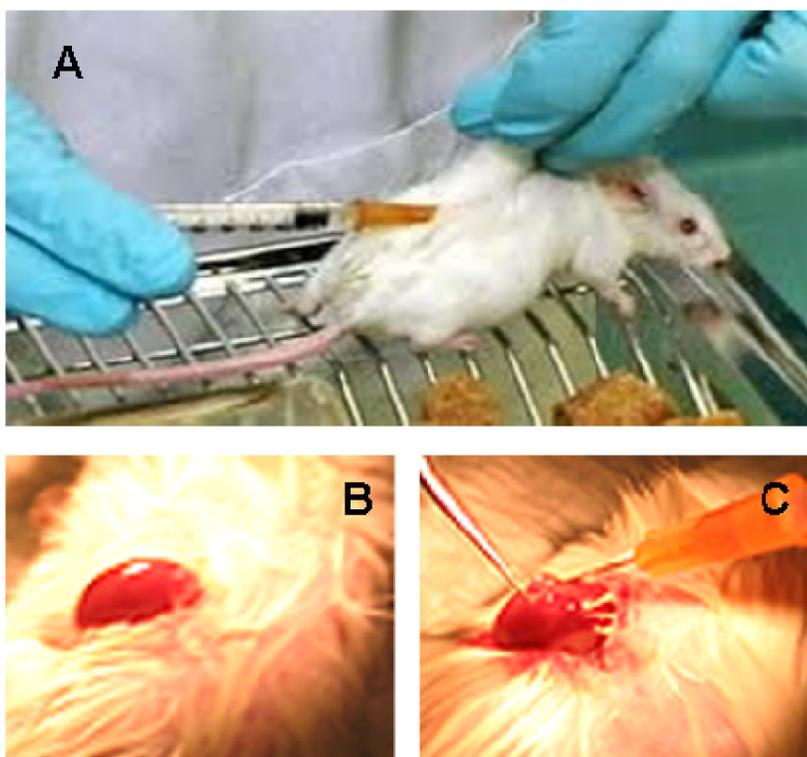


Figura17. Inyección subcutánea (A) y renal (ByC) en ratonas hembra de seis semanas de edad, ovariectomizadas.

En todos los casos, en el momento del trasplante los ratones NOD-SCID fueron tratados durante 60 días con “*pellets*” de 0.18 mg de E₂ (SE121, 17β-estradiol; Innovative Research of America, Sarasota, FL) implantados en el cuello. De acuerdo con la información de los fabricantes,

las cápsulas proporcionan una liberación continua de hormona con una concentración de 150-250 pmol/l en suero, de acuerdo con el rango de los niveles fisiológicos en los ratonas durante su ciclo estral. Además, algunos de los ratones tratados con estrógenos, también fueron tratados con 1mg de progesterona (P₄, Dr. Carreras, Hospital14, Barcelona, España) inyectada en dos ciclos diarios de dos semanas duración, con un intervalo entre ciclos de tres semanas (Ishikawa y cols., 2010). Se escogió este tratamiento basándonos en estudios previos que demostraban unos niveles hormonales similares a los mantenidos en el ciclo de la mujer (McDonnel y cols., 2005; Ishibashi y cols., 2005).

Tras los 60 días de duración del experimento, los ratones fueron sacrificados por inhalación con dióxido de carbono (CO₂) causando inmediatamente la muerte por combinarse con la hemoglobina eritrocitaria, produciendo anoxemia. A continuación, se extrajeron los órganos inyectados para poder comprobar si las poblaciones celulares habían dado lugar a los tejidos esperados y finalmente se almacenaron en paraformaldehído 4% hasta su inclusión en parafina.

A lo largo de todo el experimento, los animales fueron mantenidos, tratados y sacrificados de acuerdo con el protocolo establecido por el Comité Ético de Experimentación con animales (CEEAA). La toma de muestras se realizó según la directiva 86/609/CEE del 14 de Noviembre de 1986 y el RD 223/1988 del 14 de marzo, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. Los controles y el mantenimiento de los ratones se llevaron a cabo en el Servicio de animalario del Centro de investigaciones Príncipe Felipe (CIPF), en

condiciones adecuadas de estabulación, con alimentación y bebida *ad limitum*.

3.2 Caracterización inmunohistoquímica en tejidos candidatos

3.2.1 Detección de componentes de matriz extracelular en tejidos candidatos

A nivel histológico se ha demostrado que los miomas se componen de paquetes de músculo liso rodeados de un alto contenido en matriz extracelular (Berto A y cols., 2003). Para determinar la presencia de componentes de matriz extracelular en los órganos y tejidos murinos inyectados, se procedió a realizar una tinción con Alcian Blue pH 2.5. Se trata de un colorante soluble en agua, de carácter básico y que forma un compuesto salino de color azul debido a la presencia de cobre en la molécula. Este colorante tiñe los mucopolisacáridos sulfatados, carboxílicos y hialurónicos, así como glicoproteínas en los miomas, por medio de enlaces electronegativos, siempre y cuando el pH sea ácido.

Tras el sacrificio de los animales, los órganos extraídos fueron fijados en paraformaldehído al 4% (v/v) durante 6-18 horas y posteriormente incluidos en parafina según protocolos ya establecidos. Se tomaron para este estudio los riñones inyectados así como el tejido subcutáneo, utilizando como controles de la técnica los riñones que no habían sido inyectados con las células candidatas y tejido murino subcutáneo sin inyectar. De las muestras parafinadas se hicieron secciones de entre 3 y 5 μm en microtomo, se montaron en porta-objetos cubiertos con *poli-Lys* (poli-lisina) y se incubaron toda la noche a 37°C para facilitar su adhesión al portaobjetos. El desparafinado se realizó calentando los cortes a 60°C durante 1 hora y

posteriormente con 3 baños de xileno de 5 minutos cada uno, 3 baños de etanol absoluto de 3 minutos y una posterior rehidratación en alcoholes de concentración decreciente (95%, 85% y 70% (v/v), 3 minutos en cada uno de ellos) y agua para poder conformar la tinción. A continuación, se procedió a la tinción de las muestras con Alcian Blue pH2.5. El protocolo a seguir consistía en la tinción con el colorante durante 30 minutos seguido de dos lavados (x5min) con agua destilada y contratinción con el colorante rojo nuclear durante 5 minutos. Finalmente, se lavaría el tejido, se deshidrataría mediante una concentración creciente de alcoholes (70%, 85% y 95%), 3 baños de etanol absoluto y otros 3 baños de xileno y se montaría con medio de montaje (Entellan®).

3.2.2 Inmunohistoquímica de receptores hormonales en tejidos candidatos

Tras el desparafinado y rehidratación de las muestras, las secciones se sometieron a un baño en tampón citrato 10mM (pH6, 95°C) durante 20 minutos para el desenmascaramiento de antígenos. A continuación, se realizó una incubación de 30 minutos con 0.3% de agua oxigenada para eliminar la actividad peroxidasa endógena y posteriormente se hizo un bloqueo con BSA al 4% durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

El siguiente paso fue la incubación de las muestras durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo Rabbit Polyclonal Progesterone Anti-human IgG (Dako), seguido de otra incubación de 30 minutos con el anticuerpo biotinilado goat anti-rabbit, a partir de las instrucciones del fabricante (Vectastain® Universal, Vector Labs, Burlingame, CA, USA). Finalmente fueron contrateñidos con Methyl Green (Vector Labs, Burlingame, CA, USA).

La inmunolocalización de las poblaciones celulares candidatas en el sitio de inyección se visualizaron y fotografiaron con una cámara de 35mm Olympus conectada al microscopio ((Olympus Provis AX70, Olympus, Optical España SA).

3.2.3 Controles.

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

- **Control negativo de la técnica:** Nos sirve para comprobar que la elaboración del modelo animal haya sido la correcta y que la inyección de células no candidatas o de medio, no da lugar a tejidos con alto contenido en matriz extracelular. Por lo tanto esperamos que en estas muestras no se identifiquen tejidos teñidos con el colorante Alcian Blue.
- **Control positivo del marcador de componentes de matriz extracelular** Se usó intestino y mioma humano para determinar en ambos, la presencia de componentes de matriz que expresan este colorante, ya que ha sido ampliamente descrito.

VI. Resultados

⇒ Lo que es afirmado sin prueba, puede ser negado sin prueba
Euclides de Alejandría

VI.- RESULTADOS

1. Identificación, aislamiento y caracterización de células madre somáticas productoras de miomas humanos.

1.1 Viabilidad celular.

Uno de los ensayos a tener en cuenta cuando se trabaja con muestras biológicas que se van a disgregar, es determinar si las células obtenidas del proceso de disgregación, van a ser viables. Por ello, tras la disección mecánica y el tratamiento enzimático de las muestras de mioma, se procedió al análisis mediante citometría de flujo (CMF) para conocer la viabilidad celular de las mismas, como paso previo a futuros ensayos.

La adición de yoduro de propidio (IP) a las suspensiones celulares permitió discriminar el porcentaje de células muertas, basándonos en la fluorescencia roja emitida por las células que habían incorporado el yoduro de propidio (IP). Así mismo, pudimos identificar el porcentaje de células vivas (no emitían fluorescencia al no capturar el yoduro de propidio (IP) que fue entre un 60-75% (Figura 18).

La variabilidad en los resultados obtenidos es un dato que se correlaciona más con la heterogeneidad de las muestras (variabilidad inter-pacientes) que con los protocolos desarrollados. No obstante, estos resultados avalan que la viabilidad obtenida en todos los casos era lo suficientemente alta para realizar los estudios basados en la capacidad de expulsión de un colorante vital descritos en el apartado de materiales y métodos.

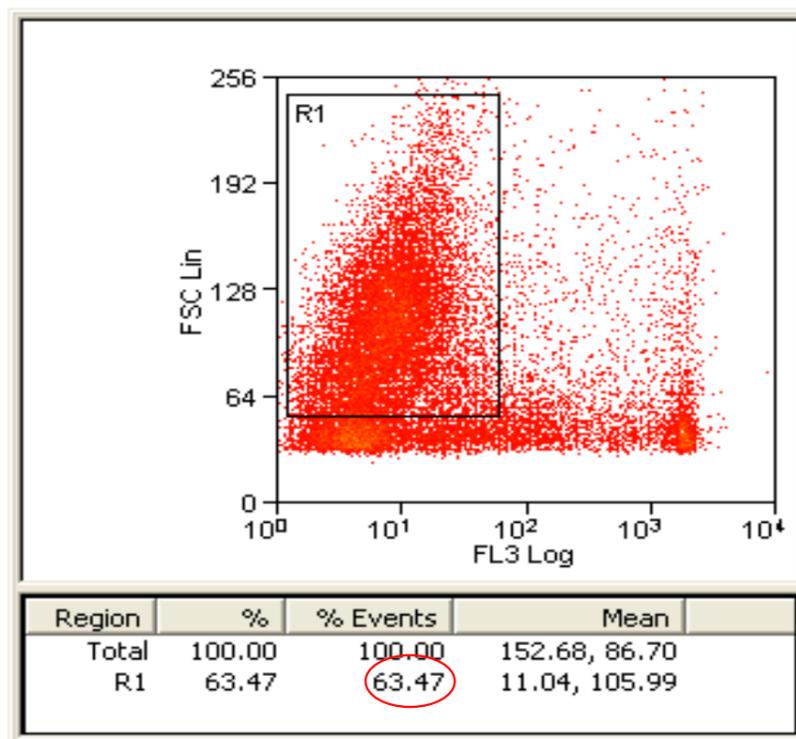


Figura18. Diagrama de viabilidad obtenido por citometría de flujo. Se aprecian dos regiones en la gráfica, la de la derecha correspondiente a células que emiten una alta fluorescencia y por lo tanto han incorporado yoduro de propidio (células muertas). Y la región de la izquierda, señalada mediante polígonos y que corresponde a las células que no emiten fluorescencia, que no capturan yoduro de propidio y que son las células vivas.

1.2 Presencia y aislamiento de la *Side Population* en miomas humanos.

En el diagrama digitalizado obtenido gracias al citómetro de flujo, esta población se sitúa en una región lateral, de ahí su nombre *Side Population (SP)*. El control negativo de la técnica se realizó mediante el uso de bloqueadores de los canales transmembrana anteriormente citados, concretamente el ABCG2. Se emplearon Verapamil y Reserpina, de forma aislada o combinados, siendo la Reserpina sin combinar, la que presentaba mejores resultados de inhibición (Figura 19).

De este modo, cuando la suspensión celular es incubada con Hoechst y Reserpina, la región lateral desaparece indicando que las células son incapaces de expulsar el colorante.

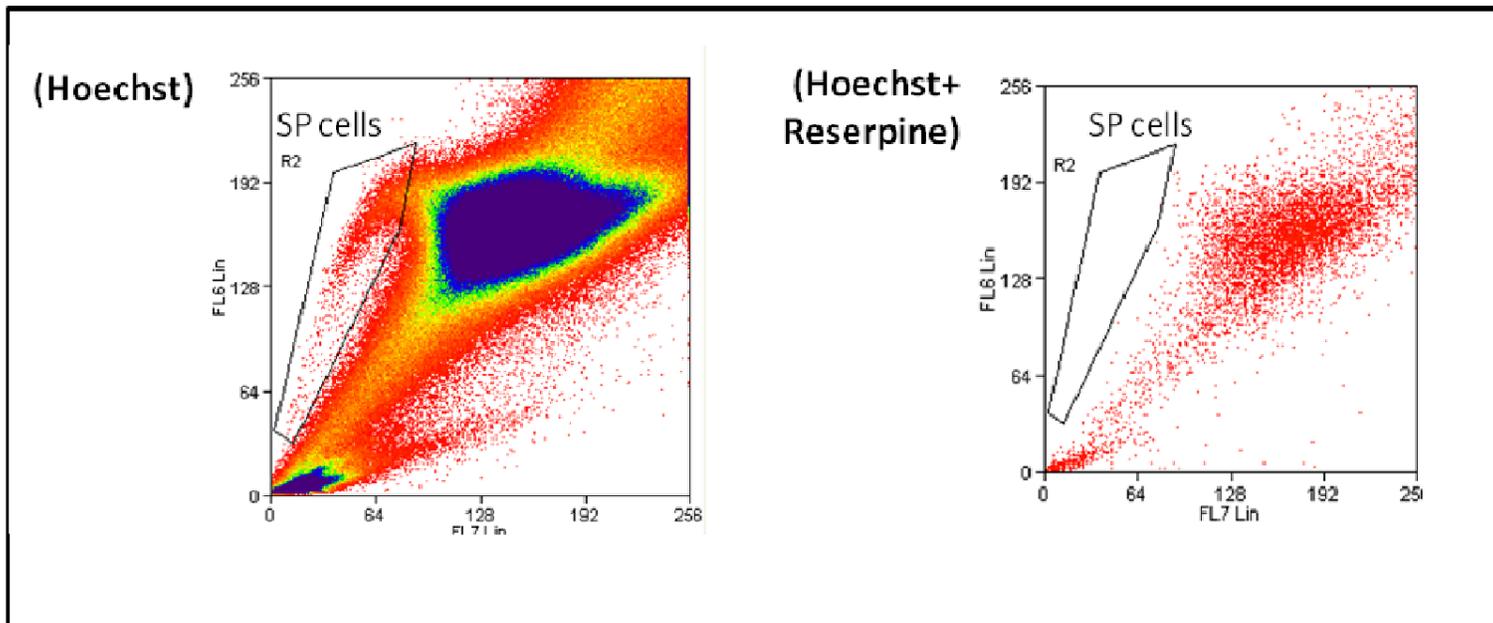


Figura 19. La reserpina inhibe los transportadores responsables de la expulsión del Hoechst desapareciendo la población capaz de expulsarlo (SP).

Así pues, se separaron desde suspensiones celulares obtenidas de miomas, las poblaciones correspondientes a la SP y a la región central correspondiente a la Non-SP (NSP) para la realización de los análisis posteriores. En un total de 16 muestras analizadas, la media de SP de miomas fue de 0,63% con un rango de $\pm 0,21$.

1.3 Caracterización molecular de la *Side Population* (SP) de miomas.

Las suspensiones celulares obtenidas en los apartados anteriores referentes a leiomyoma SP y leiomyoma NSP, se sometieron a PCR para comprobar la existencia de marcadores relacionados con el fenotipo SP, mediante la expresión del gen *ABCG2*, de receptores hormonales (*ESR1*,

RESULTADOS

PGR, *FSHr*, *LHr*) y marcadores de tipo muscular (*SMOOTH* y *CALP*), cada uno con su correspondiente control positivo (C+), como se especifica en el apartado 1.3.3. La integridad del ARNm también quedaba demostrada mediante el uso de un gen constitutivo como *GAPDH*. En todos los casos se empleó agua bidestilada como control negativo (C-) (Figura 20).

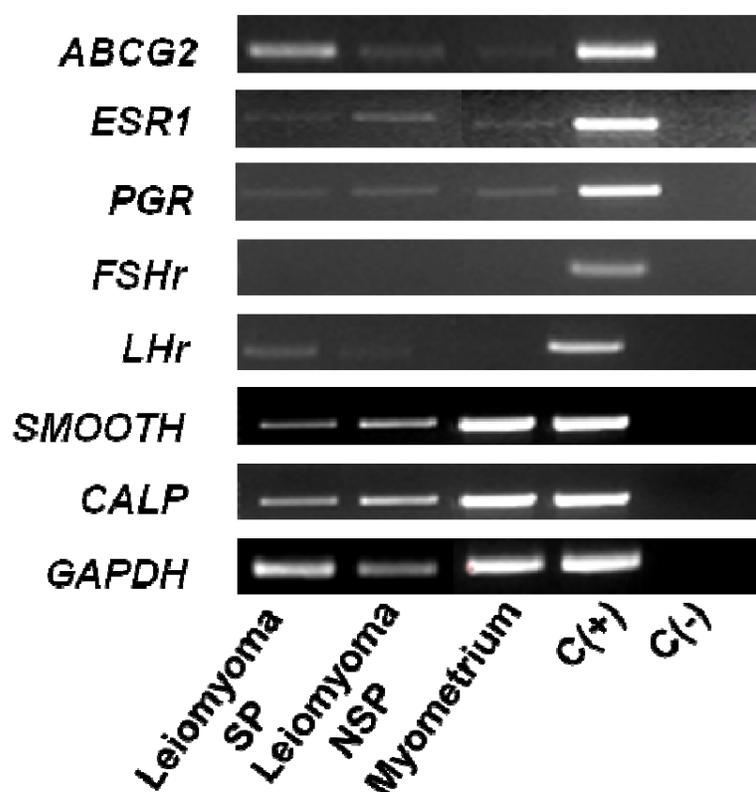


Figura 20. Visualización de las bandas correspondientes a los productos de PCR de *ABCG2*, receptores hormonales (*ESR1*, *PR*, *FSHr*, *LHr*) y marcadores musculares (smoothelin y calponin) en Leiomyoma SP, Leiomyoma NSP y tejido miometrial en un gel de agarosa al 2%. C(+): VAL9 para *ABCG2*, endometrio y ovario para receptores hormonales y miometrio para marcadores musculares. C (-): agua.

Tal y como se observa en la Figura 19, los resultados obtenidos a nivel de ARNm mostraron que la fracción SP expresa el transportador *ABCG2* en concordancia con el fenotipo SP obtenido por citometría de flujo (CMF). Sorprendentemente, el receptor de la hormona luteinizante (*LHr*) tenía una expresión significativamente mayor en la fracción SP comparada con la NSP o el tejido miometrial. Sin embargo, la expresión del resto de receptores hormonales (*ESR1*, *PGR* y *FSHr*) así como los marcadores musculares era mucho menor en la SP en comparación con la fracción NSP o el tejido miometrial (Figura 20), lo que sugiere un cierto grado de indiferenciación de las células candidatas (SP) respecto al resto de poblaciones celulares.

1.4 Perfil génico de la *Side Population*: arrays de expresión.

Con la finalidad de identificar el perfil génico de la SP de miomas, se realizó un análisis de expresión génica diferencial entre el transcriptoma del genoma de la SP y la fracción total (FT) de miomas.

Así pues, a partir de los criterios pre-definidos en el apartado de Materiales y Métodos ($Fold\ Change \geq 2$ y $p\text{-valor} \leq 0.05$), se hallaron un total de 100 genes sobre-expresados y 53 genes infra-expresados. Todos ellos se encontraban diferencialmente expresados en la fracción SP de mioma *versus* la FT de mioma (Ver Anexo II). Los datos brutos de los experimentos fueron depositados en la base de datos NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) bajo el número GSE36157. Además, cuando se analizó la función biológica de estos genes mediante el software (<http://www.ingenuity.com>), se observaron interesantes conexiones entre los genes seleccionados. A continuación se detallan aquellos procesos biológicos, desórdenes asociados e interacciones de los genes sobre-expresados (tabla IV) e infra-expresados (tabla V), obtenidos del análisis de expresión y seleccionados como “*top ten*”.

Los principales genes sobre-expresados en la SP, cuando se comparan con la fracción completa, están implicados en procesos de señalización celular, crecimiento, proliferación y migración. Sin embargo, la mayoría de genes infra-expresados en la SP están implicados en ciclo celular, transporte y señalización.

Entre las rutas metabólicas más significativas en los que están implicados estos genes, encontramos: la vía de señalización de Rho, una

RESULTADOS

regulación diferencial de la producción de citoquinas y el sistema del complemento. Además, parecen tener un papel clave en procesos como cáncer, respuesta inflamatoria y desarrollo del sistema hematológico entre otros.

GENES TOP TEN SOBRE-EXPRESADOS EN LA POBLACIÓN SP		
Nombre del Gen	Proceso biológico en el que participa	Desórdenes asociados
CSF1R Colony stimulating factor 1 receptor	Regula la actividad kinasa y las interacciones con proteínas de señalización.	Posible contribución en la invasión de cáncer epitelial. Tumoral.
HBB Hemoglobin beta	Transportador de oxígeno.	Enfermedades Hematológicas: Beta Talasemia, anemia, drepanocitosis).
C1QB Complement component 1, q subcomponent, B chain	Inmunidad/defensa. Induce maduración de células dendríticas humanas. Vía clásica de activación de C3.	Síndrome Lupus Sistémico.
CTSZ Cathepsin Z	Tiene actividad catalítica específica.	Implicación en tumorigénesis
CCL3 Chemokine (C-C motif) ligand 3	Inmunidad/defensa, inflamación. Regula la proliferación de las células madre.	Esclerosis Múltiple.
ACP5 Acid phosphatase 5, tartrate resistant	Esencial para el desarrollo normal del esqueleto. Juega un importante papel en el metabolismo del colágeno.	Tumoral. Carcinoma Hepatocelular.
AIF1 Allograft inflammatory factor 1	Regulación negativa en el crecimiento de células musculares lisas. Incrementa la proliferación y migración de células endoteliales y promueve la transición G0/G1 a fase S acompañada por la up-regulación del factor básico de crecimiento fibroblástico	Arthritis Reumatoide. Diana terapéutica para tratamiento de inflamaciones nerviosas y vasculares. En cáncer, principalmente de mama, también podría ser usada como molécula clave para diagnóstico y terapia.
HBA1/HBA2 Hemoglobin, alpha 1	Transportador de oxígeno.	Enfermedades Hematológicas: Alfa Talasemia.
CCL19 Chemokine (C-C motif) ligand 19	Migración y motilidad celular. Inmunidad/ defensa.	Polimiositis (inflamación de los músculos).
VSIG4 V-set and immunoglobulin domain containing 4	Inmunidad/ defensa.	Desconocido.

Tabla IV. Selección de los genes “top ten” sobre-expresados en la población SP de miomas. En la tabla se describen los principales procesos biológicos y desórdenes asociados.

GENES SP TOP TEN INFRA-EXPRESADOS EN LA POBLACIÓN SP		
Nombre del Gen	Proceso biológico en el que participa	Desórdenes asociados
SELE selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	Implicado en arterioesclerosis.	Mutaciones del gen pueden ser un factor de riesgo en arterioesclerosis.
XCL1 Chemokine (C motif) ligand 1	Señalización de quimoquinas. Actividad quimiotáctica para linfocitos pero no para monocitos o neutrófilos.	Desconocido.
XCL2 Chemokine (C motif) ligand 2	Desconocido.	Osteoartritis de rodilla.
KLRB1 Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	Activación celular de células NK (<i>Natural Killer</i>)	Desconocido.
PLK2 Polo-like kinase 2	Juega un importante papel en la división de algunos tipos celulares como fibroblastos. Posible función durante la embriogénesis.	Desconocido.
EMP Epithelial Membrane Protein1	c-Myc target Juega un importante papel como biomarcador de resistencia a gefitinib, y también está implicado en la vía de señalización de EGFR.	Biomarcador de resistencia a gefitinib en cáncer de pulmón.
KLRC4 Killer cell Lectin- like Receptor subfamily C, member 4	Inmunidad/ defensa.	Desconocido.
TM4SF1 Transmembrane 4 Superfamily Member 1	Juega un papel clave en la regulación del desarrollo, activación, crecimiento y motilidad celular.	Presente en complejos de elevado peso molecular de células tumorales.
CYTH1 Cytohesin 1	Transporte de tráfico celular.	Desconocido.
DUSP6 Dual Specificity Phosphatase 6	Participa en la transducción de señales, inactivando las map kinasas.	Tumoral.

Tabla V. Selección de los genes “top ten” infra-expresados en la población SP de miomas. En la tabla se describen los principales procesos biológicos y desórdenes asociados.

- **Validación de los resultados obtenidos del “array” de expresión**

Con objeto de validar los resultados se seleccionaron dos de los genes infra-expresados para analizar su expresión por RT-PCR. Esta selección se basó en su relevancia biológica y su implicación en el desarrollo de miomas. Tanto *TM4SF1* (transmembrane 4 superfamily member) presente en células tumorales, como *DUSP6* (dual specificity phosphatase 6) descrito en tumores de origen mesenquimal, mostraban una menor expresión en la fracción SP que en la fracción total (FT), quedando así validados los resultados derivados de la técnica de “microarrays”.

2. Modelo *in vitro*: Generación y caracterización de líneas celulares obtenidas a partir de la SP de miomas humanos: LeioSP1 y LeioSP2.

2.1 Evaluación de la eficiencia clonal.

Una de las pruebas indirectas más utilizadas hoy en día para caracterizar una población candidata a células madre somáticas (SSC) en diferentes órganos y tejidos, es demostrar que éstas tienen actividad clonogénica, definida como la capacidad de una célula para producir una colonia celular cuando es sembrada en baja densidad celular (Chan y cols., 2004). Basándose en esta aproximación, algunos investigadores han sugerido que, en humanos, los miomas uterinos tendrían un posible origen clonal, lo que significaría que se originan en el miometrio a partir de un solo clon de células de músculo liso (Walker y Stewart, 2005) y cuya proliferación se vería favorecida en condiciones de hipoxia (Fukuhara y cols., 2002; Pavlovich y Schmidt, 2004; Grayson y cols., 2006).

En este experimento, las suspensiones celulares aisladas de las fracciones SP y NSP de los miomas fueron sembradas a diferentes densidades celulares: 156, 260 y 520 células/cm², con la finalidad de determinar la eficiencia óptima de proliferación celular. Se escogió una densidad de 156 células/cm² a partir de la cual se obtuvo una eficiencia clonal (CE) de 1.185% en la fracción SP comparada con 0.775% en la fracción NSP (Figura 21).

Aunque se observó una mayor CE en la fracción SP que en la NSP de mioma, cuando se procedió al análisis estadístico de los datos, se pudo comprobar que las diferencias observadas no eran estadísticamente significativas. Esto podría ser explicado por el bajo tamaño muestral (n=3).

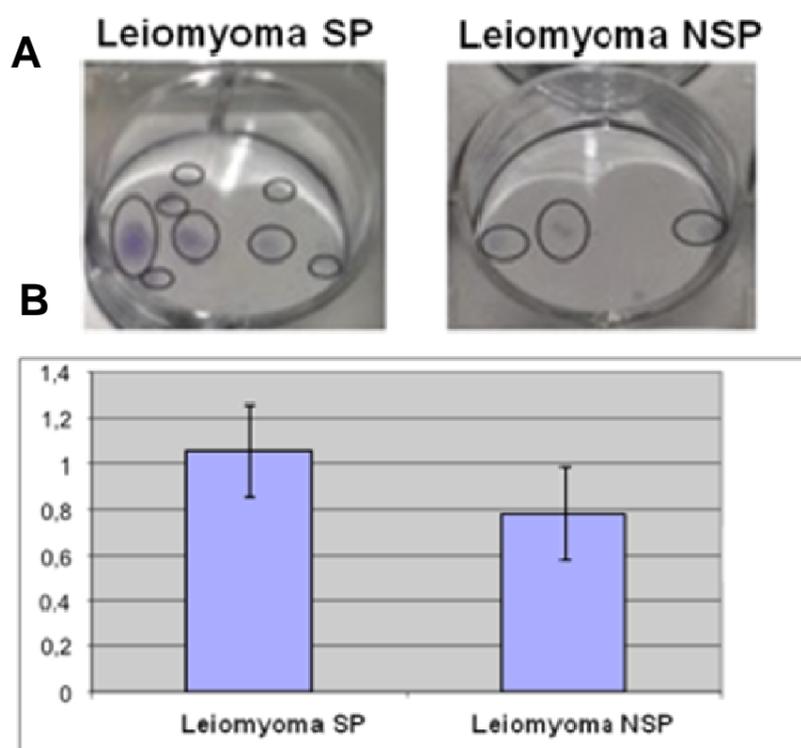


Figura 21. (A) Visualización macroscópica de las colonias formadas *in vitro* a partir de células SP (izquierda) y NSP (derecha) de miomas humanos. **(B)** Gráfica correspondiente a la eficiencia clonal de ambas fracciones celulares, siendo de 1.185% en la SP *versus* 0.775% en la NSP (resultados expresados como media±SEM).

2.2 Generación y establecimiento de líneas: LeioSP1 y LeioSP2

Las células SP obtenidas desde miomas humanos, fueron cultivadas a una densidad celular óptima de 156 células/cm² (establecida en el apartado anterior) y mantenidas *in vitro* bajo condiciones de hipoxia durante dos semanas con el fin de obtener clones. Tras este periodo, las colonias grandes descritas como SSC en anteriores estudios, fueron seleccionadas y resembradas cada 5-7 días con la finalidad de purificar la población celular obtenida (Chan y cols., 2004; Chang y cols., 2010; Cervelló y cols., 2011).

De este modo, tras nueve pases (7-9 días por pase) se establecieron dos líneas celulares: Leiomyoma SP1 (LeioSP1) y Leiomyoma SP2 (LeioSP2), que fueron caracterizadas y criopreservadas posteriormente para futuros estudios.

Las líneas celulares generadas a partir de la SP de miomas, mostraban un cariotipo normal. Esta prueba era indispensable para saber que partimos de líneas celulares cromosómicamente normales, debido al alto riesgo de anomalías cromosómicas detectadas en los miomas (alrededor de un 40-50%) (Ligon y Morton, 2001).

Así, tras realizar el análisis de cariotipo de las líneas celulares en pases 5-6, se pudo confirmar la integridad cromosómica de LeioSP1 y LeioSP2, demostrando que ambas presentaban un cariotipo normal 46XX (Figura 22).

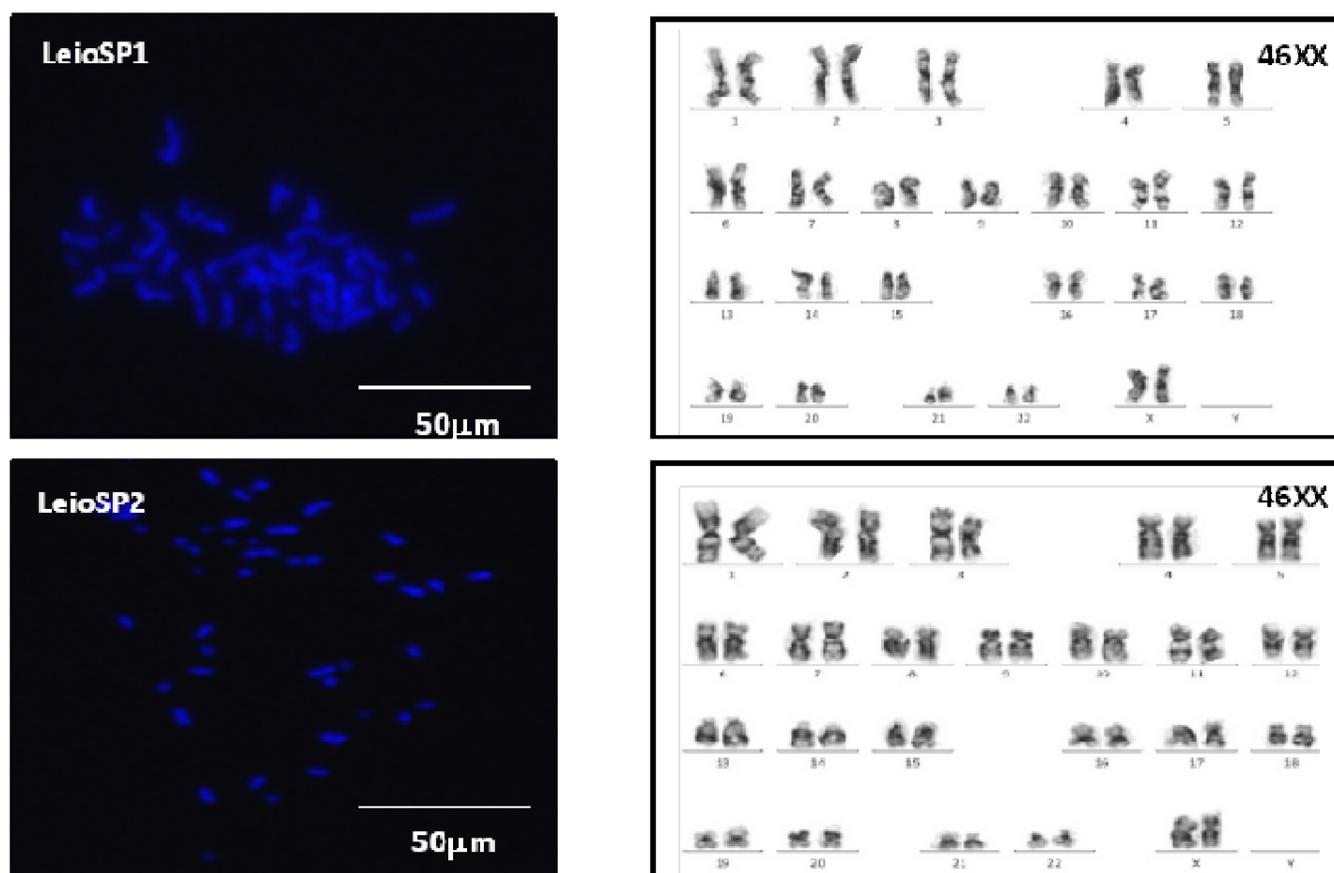


Figura 22. Análisis citogenético de las líneas LeioSP1 y LeioSP2. Se observa un cariotipo normal 46XX en ambos casos.

2.3 Análisis molecular e inmunofenotipo de LeioSP1 y LeioSP2

Las suspensiones celulares de LeioSP1 y LeioSP2 obtenidas en el apartado anterior (Figura 2.2), se sometieron a PCR semi-cuantitativa para comprobar la existencia de diferentes marcadores: **a) marcadores de indiferenciación de hESC:** Octamer-binding transcription factor 4 (*OCT-4*), Nanog, Sry-box2 (*SOX2*), DNA cytosine-5-methyltransferase 3 beta (*DNMT3B*), *GABR3* y Growth differentiation factor-3 (*GDF3*). **b) marcadores de diferenciación característicos de mesodermo:** Cluster of differentiation 90 (*THY-1/CD90*), Wilm's Tumor 1 (*WT1*), Renin (*REN*), Cardiac Actin (*CARD ACT*), Enolase (*ENO*) and Gamma-Globin (δ -*GLOB*), **c) marcadores de diferenciación característicos de endodermo:** amylase (*AMY*) y **d) marcadores de diferenciación característicos de**

RESULTADOS

ectodermo: neurofilament heavy polypeptide (*NFH*). Antes de realizar este tipo de análisis, se comprobó la integridad de ARNm mediante el uso de un gen constitutivo como *GAPDH*.

Los resultados obtenidos demostraron la expresión de *OCT-4*, *NANOG*, *DNMT3B* y *GDF3* en ambas líneas. Además en LeioSP1 se observó la presencia de algunos marcadores de linaje mesenquimal como *THY-1/CD90*, *WT1*, *REN*, *CARD ACT* y *ENO*, mientras que en LeioSP2 solo se expresaba *THY-1/CD90*. Sorprendentemente, el marcador característico de linaje endodérmico *AMY* también se expresaba en ambas líneas celulares (Figura 23).

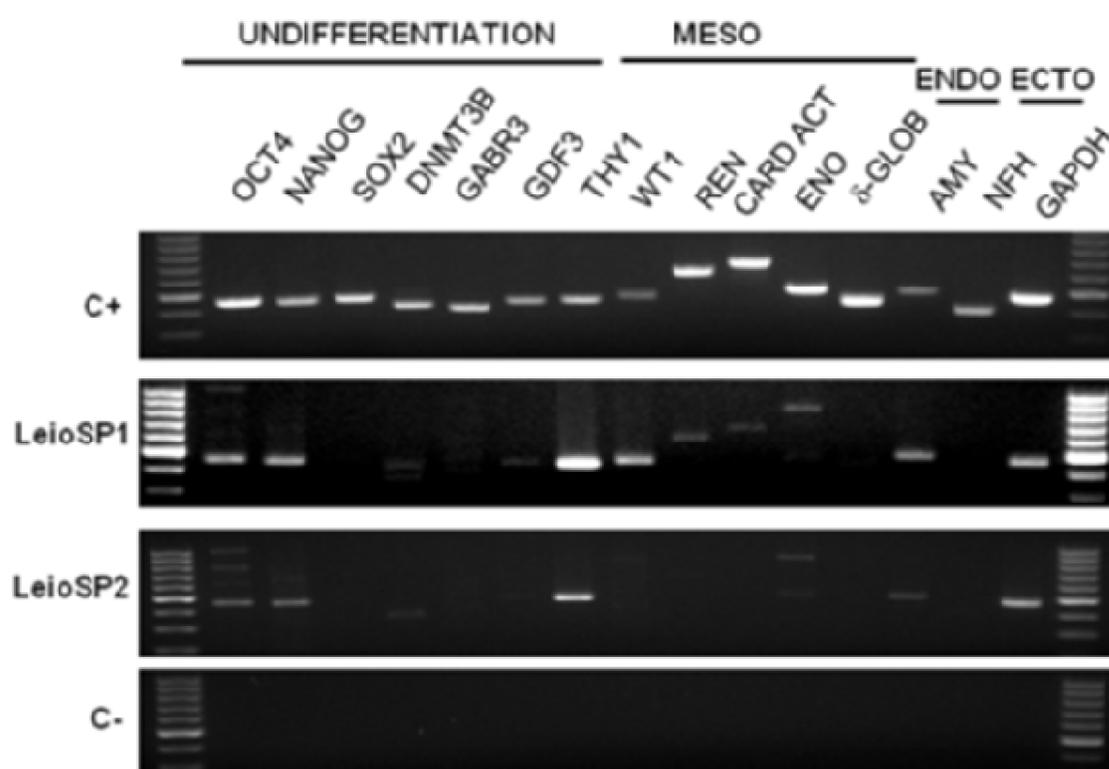


Figura 23. Expresión de genes de indiferenciación, así como los característicos de linaje mesodérmico (MESO), endodérmico (ENDO) y ectodérmico (ECTO) en ambas líneas celulares. VAL-9 (ESC) fue usada como control positivo para marcadores de indiferenciación y diversos tejidos como corazón, riñón, hígado y cerebro se emplearon para testar el origen mesenquimal, endodérmico y ectodérmico respectivamente.

Para determinar el posible origen de las líneas celulares generadas desde la SP de mioma, se procedió al fenotipado con marcadores de indiferenciación del linaje hematopoyético (CD34 y CD45), mesenquimal (CD90, CD73 y CD105) así como CD31 presente en las células endoteliales y CD133 presente en las células progenitoras endoteliales (Figura 24).

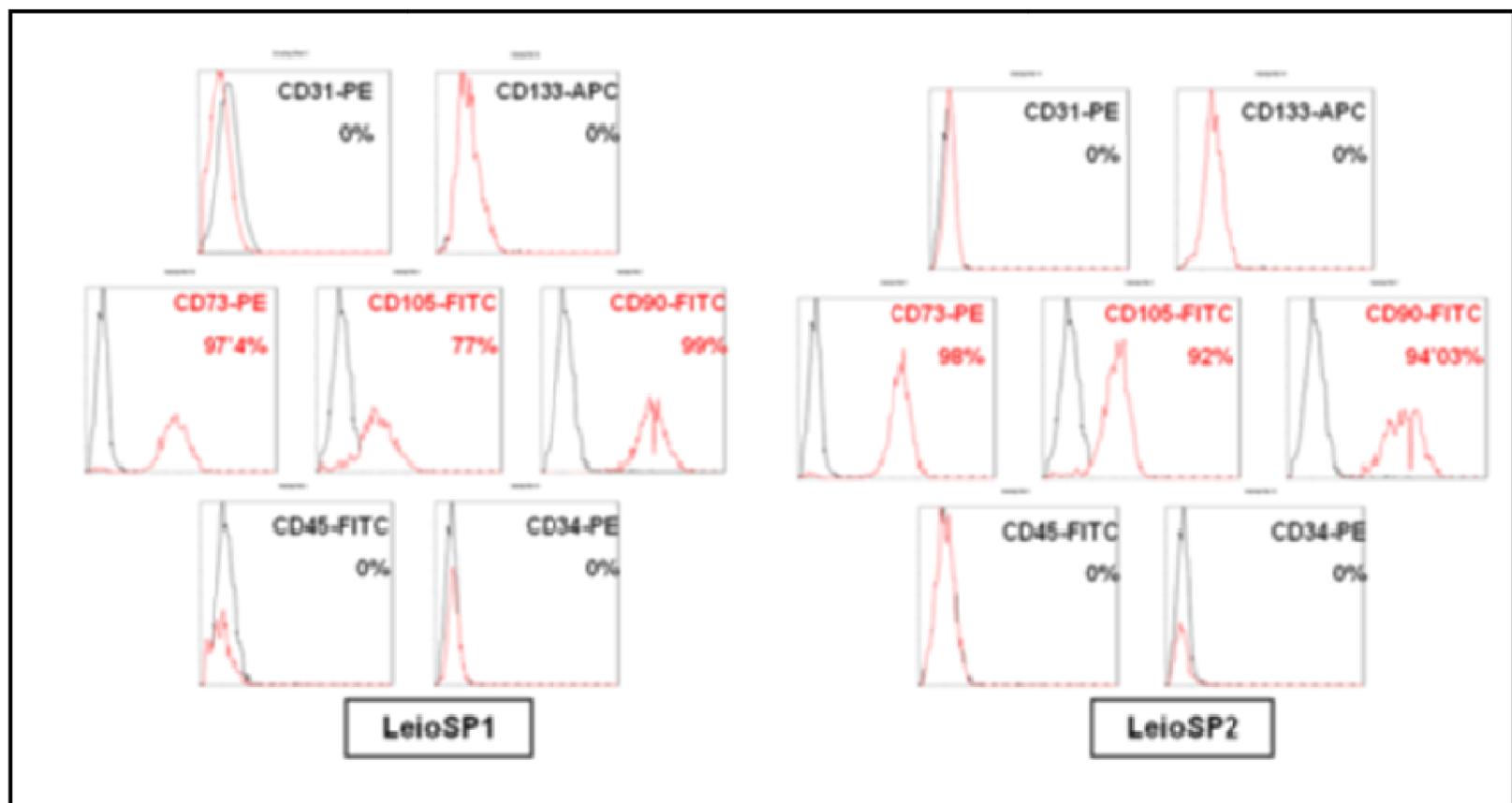


Figura 24. Diagramas y resultados obtenidos mediante citometría de flujo de los diferentes marcadores usados en este apartado.

De este modo, el inmunofenotipo basado en el análisis por citometría de flujo (CMF) muestra que en LeioSP1 los marcadores de linaje mesodérmico estaban presentes en un 99% de las células para CD90, un 77% para CD105 y un 98% aproximadamente para CD73. En LeioSP2, la expresión de estos marcadores estaba presente en un 94% de las células para CD90, 92% para CD105 y 98% para CD73. En ambos casos, no se detectó la expresión de marcadores hematopoyéticos (CD34 y CD45) ni endoteliales (CD31 y CD133).

RESULTADOS

En la tabla VI se detalla el nivel de expresión de los marcadores analizados. Estos resultados indican que las líneas LeioSP1 y LeioSP2 tienen un fenotipo mesenquimal (Dominici y cols., 2006).

	LeioSP1	LeioSP2
CD90	++++	++++
CD105	++++	++++
CD73	++++	++++
CD34	-	-
CD45	-	-
CD31	-	-
CD133	-	-

Tabla VI. Fenotipado de las líneas celulares LeioSP1-2 con diferentes marcadores y mediante técnicas de citometría de flujo. Los porcentajes obtenidos corresponden a medias tras diferentes análisis; los datos obtenidos tal que <10% se consideraron negativos (-); los obtenidos entre 10-25% fueron considerados positivos (+), entre 25-50% se indican como ++, los porcentajes >50% se indican como +++ y finalmente los >75% +++++.

2.4 Diferenciación adipogénica y osteogénica de LeioSP1 y LeioSP2

Una de las características de las SSC es la capacidad de diferenciarse a tipos celulares de un linaje celular específico. En este contexto, se examinó el potencial de diferenciación *in vitro* de las líneas LeioSP1-2 hacia distintos tipos de células de linaje mesenquimal como adipocitos y osteocitos. Para ello, se seleccionaron ambas líneas celulares en pase 6 y fueron cultivadas en presencia de medios de inducción adipogénico u osteogénico (ver Materiales y Métodos) en condiciones de normoxia.

En presencia del medio de inducción adipogénica, ambas líneas celulares (LeioSP1-2) exhibían una acumulación de microgotas lipídicas, que quedaba demostrada por la tinción citoplásmica, con un colorante de afinidad lipídica, denominado Oil-Red-O (Figura 25A). Por contra, en las líneas LeioSP1-2 tratadas con los medios de control (no inducidos) no se observaron estas microgotas de lípidos, por lo que el proceso de diferenciación se limitaba únicamente al primer caso en el que las células habían sido inducidas a tal efecto.

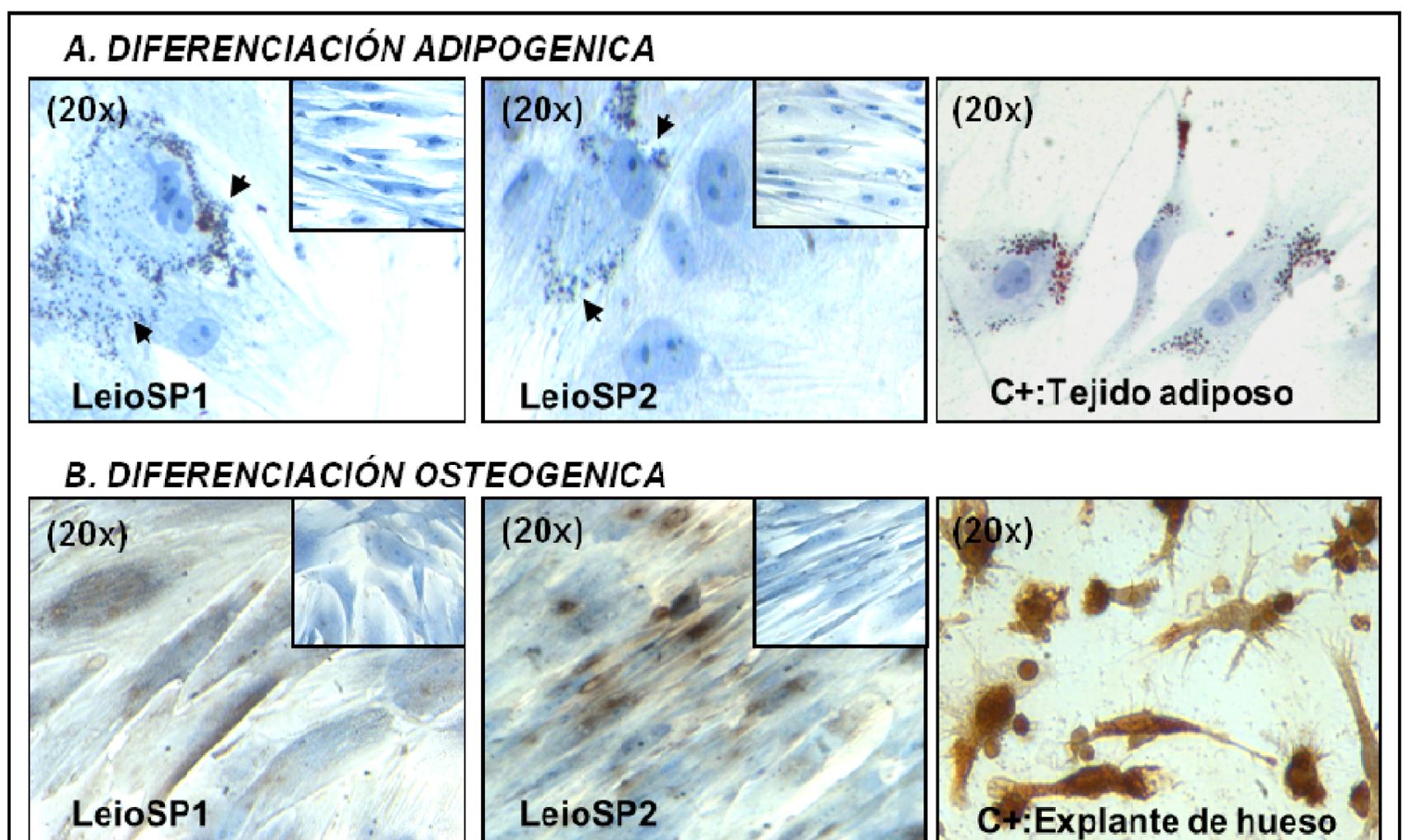


Figura 25. (A) Diferenciación adipogénica de las líneas LeioSP1 y LeioSP2 validada por la presencia de Oil-Red-O. Se empleó como control positivo, adipocitos obtenidos de explante de tejido adiposo humano, los cuales eran positivos para el colorante. Las líneas celulares que no fueron tratadas con medios de diferenciación, se incluyeron como controles negativos (ver foto pequeña) y fueron negativas para la tinción adipogénica. **(B)** La diferenciación osteogénica fue detectada mediante la expresión de la BSP en LeioSP1 y LeioSP2. Los osteocitos obtenidos a partir de explante de hueso humano, fueron incluidos como un control positivo, mientras que las células no tratadas con el medio de diferenciación, se incluyeron como control negativo (ver foto pequeña). Todas las imágenes histológicas fueron examinadas bajo una lente de 10X-20X.

De manera similar, las líneas LeioSP1-2 tratadas con medios de inducción osteogénico, expresaban la bone sialoprotein (BSP), un marcador específico de tejidos mineralizados; mientras que las células tratadas con los medios de control fueron negativas para la expresión de la BSP (Figura 25B).

Estos resultados son similares a los ya publicados recientemente a partir de la SP de otros tejidos como endometrio (Cervelló y cols., 2010; Cervelló y cols., 2011) y miometrio (Ono y cols., 2007), demostrando por tanto, que LeioSP1 y LeioSP2 son capaces de diferenciarse *in vitro* a adipocitos y osteocitos a partir de protocolos estandarizados.

3. Modelo *in vivo*: Reconstrucción de tejido miomatoso humano en ratones NOD-SCID desde las líneas LeioSP1 y LeioSP2

Los experimentos de xenotrasplante en ratones NOD-SCID, se realizaron mediante dos técnicas diferentes: inyección de células LeioSP1-2 en cápsula renal o por vía subcutánea. Se utilizaron suspensiones obtenidas a partir de LeioSP con el fin de evitar la heterogeneidad significativa que existe entre las distintas muestras de miomas humanos.

3.1 Modelo animal:

Las suspensiones de células individuales obtenidas a partir de LeioSP (de 500.000 a 1.000.000 de células) fueron inyectadas vía subcutánea (n=7) o bajo la cápsula renal (n=8) de ratones inmunodeprimidos (NOD-SCID). Se eligió este número de células debido a que en estudios anteriores se había demostrado que la inyección de células a concentraciones más bajas (menos de 500.000 células) implicaba un patrón de crecimiento del tumor inconsistente (Ishikawa y cols., 2010).

3.2 Caracterización inmunohistoquímica del tejido reconstruido

Trascurridas 8 semanas desde la inyección celular bajo tratamiento hormonal (E_2 o E_2+P_4) sólo se observaron resultados positivos en aquellos ratones que habían sido inyectados con 1.000.000 de células de LeioSP y que habían sido tratados con E_2+P_4 de forma conjunta, formándose tejidos uniformes con una histología comparable a la del tejido miomatoso original (Figura 26).

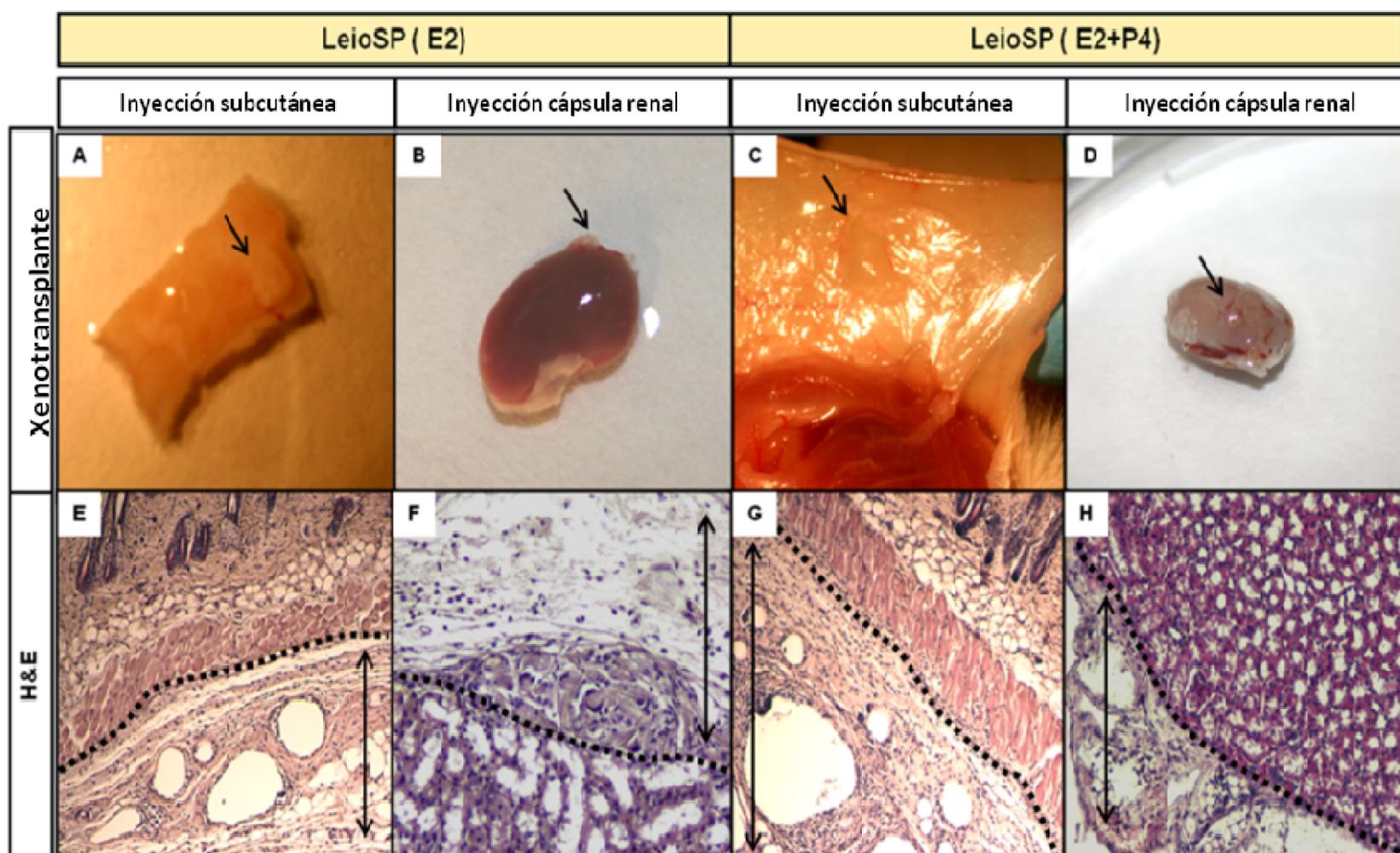
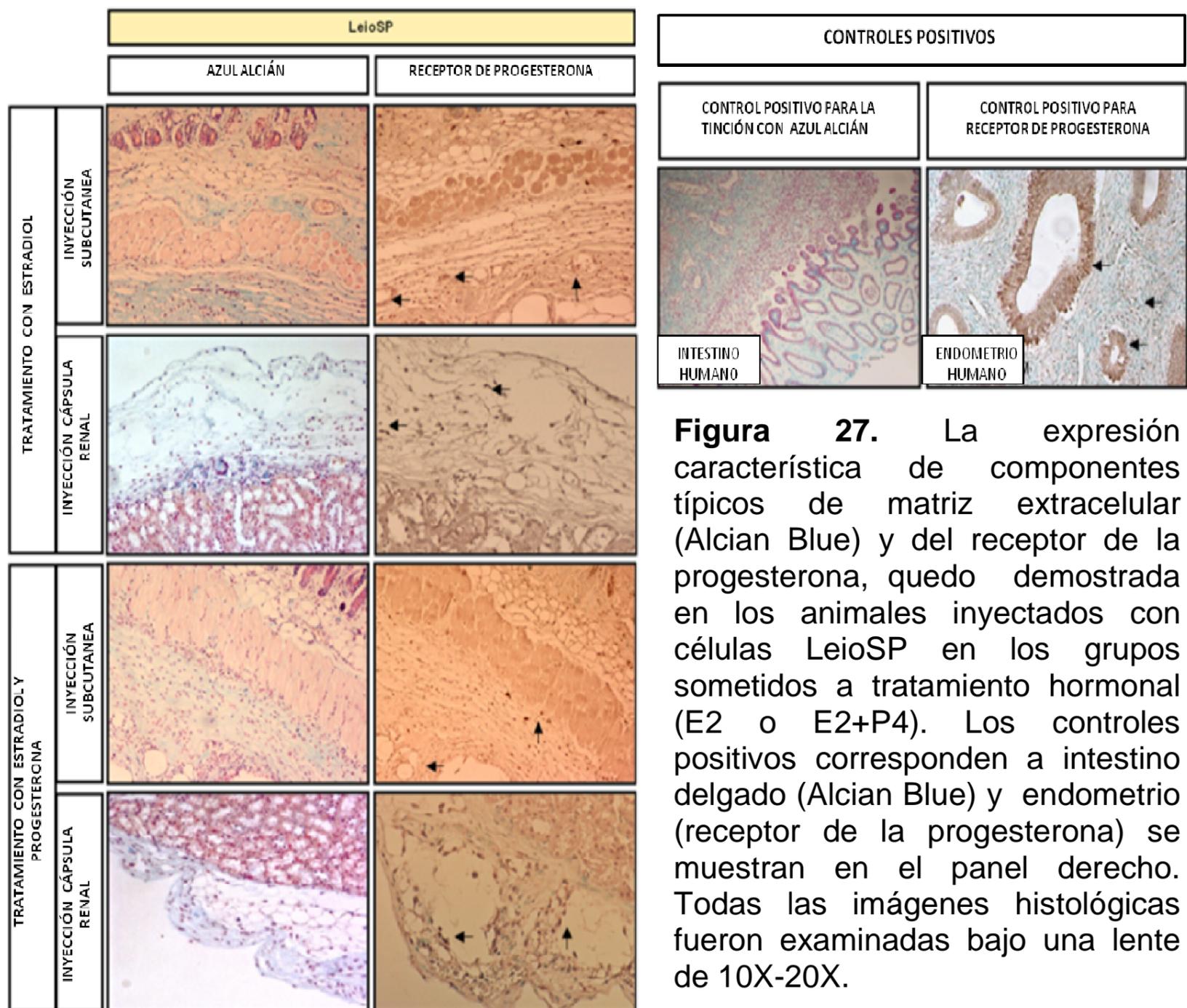


Figura 26. Imagen macroscópica (indicada por una flecha) de los xenotransplantes generados a partir de las líneas LeioSP a nivel renal y en tejido subcutáneo (A-D). Imagen histológica de los xenotransplantes anteriormente citados mediante tinción de Hematoxilina-Eosina (H&E) en el tejido subcutáneo (E-G) y en el riñón inyectado (F-H), ambas tratadas con E_2 o $E_2 + P_4$, ocho semanas después de la inyección celular. El análisis histológico de los sitios de inyección de animales tratados con $E_2 + P_4$ muestran una mayor reconstrucción tisular (panel derecho), en comparación con aquellos que solo han sido tratados con E_2 (panel izquierdo).

RESULTADOS

En una primera aproximación para demostrar el origen humano del tejido reconstruido a nivel subcutáneo y renal, se realizó una tinción con Azul Alcian pH 2.5, con el fin de confirmar la presencia de componentes de la matriz extracelular. De hecho, se pudo observar la distribución de glicoproteínas y mucopolisacáridos ácidos carboxilados mediante tinción positiva para dicho colorante (Figura 27).



Varios estudios han demostrado que las células de mioma en cultivo pueden alterar su perfil de expresión *in vitro* y por lo tanto perder la expresión de receptores hormonales (Severino y cols., 1996). A fin de

evaluar el origen humano y la expresión de receptores hormonales en el xenotransplante reconstruido, se realizó un análisis inmunohistoquímico de los tejidos subcutáneos y cápsulas renales inyectadas, utilizando un anticuerpo anti-humano del receptor de progesterona (PR).

Los resultados que se muestran en la Figura 27 indican que las líneas celulares LeioSP son capaces de regenerar un tejido similar a un mioma, determinado por la presencia de componentes de la matriz extracelular. Además, se confirmó la expresión del receptor de progesterona humana (PR) en todos los xenotransplantes obtenidos de animales tratados hormonalmente con E_2+P_4 .

En un intento de proporcionar un nicho miometrial en nuestros modelos de xenotrasplantes, se combinaron las células de LeioSP con células de miometrio (línea comercial). Los resultados obtenidos también demostraron que las líneas celulares LeioSP mezcladas con las células del miometrio eran capaces de regenerar un tejido similar al mioma, sugiriendo una posible interacción de células iniciadoras de tumor con el miometrio (Figura 28).

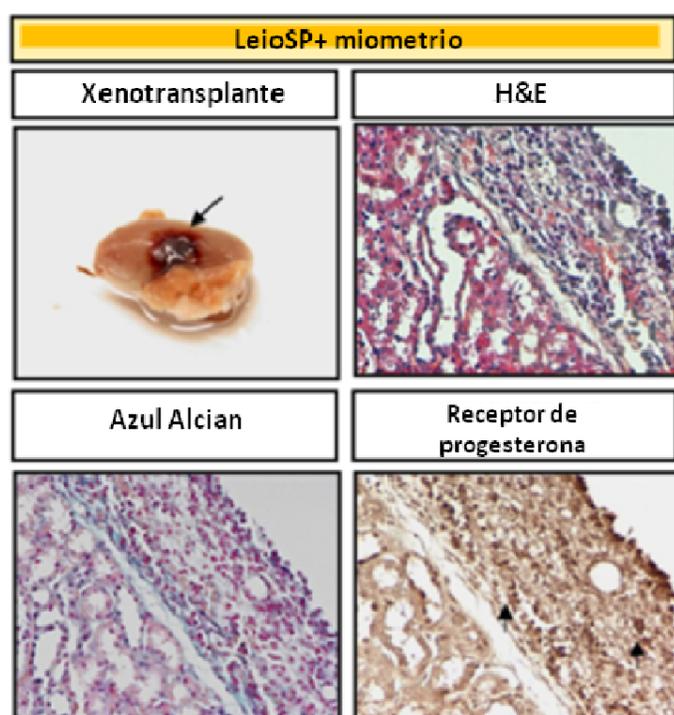


Figura 28. Imagen macroscópica e histología de los xenotransplantes generados a partir de las líneas LeioSP y células miometriales a nivel renal, en ratones tratados hormonalmente con $E_2 + P_4$. Obsérvese, la expresión positiva tanto para el Azul Alcian como para el receptor de progesterona humana. Todas las imágenes histológicas fueron examinadas bajo una lente de 10X-20X.

VII. Discusión

*↻ Si no puedes explicar a todo el mundo lo que has hecho,
tu trabajo ha sido en vano ↻
E.Schrödinger*

VII.- DISCUSIÓN

En términos generales, los miomas se encuentran en el 20-40% de mujeres en edad reproductiva y la mayoría son asintomáticos, aunque aquellas pacientes que presentan sangrado irregular, crecimiento del mioma con síntomas de compresión y dolor pélvico, suelen ser intervenidas, siempre que sea posible, de forma conservadora.

En los últimos años la Medicina y la Biología han experimentado varias revoluciones. La más reciente es la denominada Medicina Regenerativa (Robey, 2000), basada principalmente en el conocimiento y potencial uso terapéutico de las células madre con la finalidad de regenerar tejidos u órganos dañados y, de este modo, poder tratar enfermedades crónico-degenerativas hasta ahora incurables, así como poder profundizar en los mecanismos que regulan el cáncer.

Por otro lado, el tejido miometrial humano, debido a su función fisiológica durante el embarazo requiere de la existencia de una población de células madre somáticas funcionalmente relevantes y activas, que han sido identificadas aisladas y caracterizadas recientemente (Ono y cols 2007). Dicha población celular debe permanecer indiferenciada en su nicho y susceptible de ser inducida durante el embarazo. Además, debe de disponer de mecanismos de autocontrol para evitar patologías derivadas de su proliferación benigna incontrolada como es la formación de miomas o de su proliferación maligna como el cáncer de miometrio. Por lo tanto, nos encontramos en la situación adecuada para intentar identificar y caracterizar esta población celular y profundizar aún más la idea del origen de los miomas como una enfermedad derivada a partir de la división anómala de estas células madre somáticas.

Estudios con marcadores de indiferenciación

A pesar de que en la actualidad no existen marcadores fenotípicos específicos de células madre somáticas, se hace necesario aislar estas poblaciones puras, para su caracterización y eventual uso en aplicaciones de terapia celular.

Es importante destacar que la expresión de un marcador de célula madre somática no está necesariamente implicado en la actividad de estas células, es más, marcadores actuales conocidos de células madre somáticas son también expresados en células maduras (como por ejemplo el CD34 para hematopoyéticas y este mismo marcador para células maduras de endotelio).

Centrándonos en estudios actuales referidos al miometrio humano, Ono y cols (2007) estudiaron la expresión de diferentes marcadores de indiferenciación en células de la Side Population (SP) y MP (Main Population o Non Side Population), como CD31 y CD34. El análisis de citometría de flujo reveló que el 99% de las células de la SP eran positivas para CD34, mientras que sólo el 55% de las células de la MP, fueron positivas para CD34. Las células CD34+ se dividieron a su vez en CD31+ y CD31- (67% y 33%, respectivamente). Aunque CD34 es un marcador de células madre hematopoyéticas y células endoteliales en humanos, sólo el $0,11 \pm 0,05\%$ de la población de células de la SP fueron positivas para el marcador linaje hematopoyético CD45, indicando que las SP no eran de origen hematopoyético. Además, ésta población de células de la SP fue negativa para marcadores de diferenciación endotelial como CD106, el receptor del factor crecimiento vascular endotelial (VEGF-A) y el factor VIII.

Por otro lado, en 2010 Chang y colaboradores observaron que mientras en miometrio normal había una expresión heterogénea de CD90, un marcador de superficie celular asociada con el potencial de diferenciación de los fibroblastos del útero, en los miomas, había una expresión homogénea de CD90, lo que sugería que las células de los miomas estaban más diferenciadas. Por otra parte, se encontró que mientras que las células de mioma sólo podrían producir células que expresan CD90, las células del miometrio CD90+/CD90- podrían restablecer su perfil heterogéneo original cuando eran expandidas in vitro. Estos resultados sugieren que el miometrio normal contiene una población de células madre / progenitoras que están ausentes en los miomas. Sin embargo, hacen falta más estudios para verificar estos resultados.

Estudios funcionales a partir de un modelo animal

A pesar de su elevada incidencia, la patología y la fisiología de los miomas hoy en día es poco conocida (Walker y Stewart, 2005). Uno de los modelos animales más utilizados en el estudio de miomas es el de la rata Eker. Las hembras de esta especie desarrollan miomas de forma espontánea a los 12-16 meses de edad, con una frecuencia de un 65% aproximadamente. Esto es debido a una alteración genética del gen de la esclerosis tuberosa 2 (TSC-2) que codifica para la proteína tuberina. La mutación de TSC-2 implicaría la pérdida de función de la tuberina, que es actuar como gen supresor de tumor (Howe y cols., 1995) pudiendo desencadenar en tumorigénesis de forma espontánea. En cuanto a la presentación, respuesta a hormonas y las alteraciones moleculares de estos tumores mesenquimales del músculo liso, se asemejan mucho a los miomas humanos. De hecho, los miomas desarrollados en estas ratas comparten

características fenotípicas, bioquímicas y genéticas con los miomas uterinos humanos (Walker y cols., 2003). Es por este motivo, que tanto los animales como las líneas celulares derivadas de estos tumores benignos (líneas ELT) se han empleado como un modelo para estudios preclínicos y para la identificación de nuevos agentes terapéuticos frente a esta enfermedad. Sin embargo, hay algunas limitaciones críticas como la baja penetrancia, el alto coste y la histología tipo sarcoma, que impiden que sea óptimo.

Recientemente, para superar estas limitaciones se desarrolló un nuevo modelo animal para el xenotransplante de miomas uterinos de origen humano, denominado Memy I (Hassan y cols., 2008). En este modelo, se utilizaron pequeños fragmentos de miomas, obtenidos de pacientes con indicación quirúrgica de miomectomía laparoscópica. Estos fragmentos miomatosos (3x2mm) fueron transfectados *in vitro* con vectores adenovirales para la sobre-expresión de la ciclo-oxigenasa2 (COX-2) y del factor de crecimiento vascular -endotelial A (VEGF-A. Posteriormente fueron implantados a nivel subcutáneo en ratones con inmunodeficiencia severa combinada (SCID). En este estudio, el tejido miomatoso humano se integraba junto con el resto de tejidos y con la vasculatura del hospedador murino, llegando a ser viable durante un mes aproximadamente. La gran ventaja que ofrece este modelo era el bajo coste que permitía el estudio *in vivo* de los miomas humanos. Por contra, las desventajas del mismo implicaban la necesidad de un sistema de transfección adenoviral y sobre-expresión de COX-2 y VEGF-A, que podían modificar las características del propio tejido miomatoso humano *per se*.

Para lograr una mayor eficiencia en el trasplante de tejidos humanos, Ito y colaboradores en 2002, desarrollaron un ratón diabético- no obeso

(NOD)/ SCID/ γ c-null (NOG) mouse. El ratón NOG es doble homocigoto para la mutación SCID y para la mutación del receptor de interleukina-2 (γ c-null). Estos ratones tienen un déficit de linfocitos T y B y exhiben una actividad defectuosa de células NK. De acuerdo con su inmunodeficiencia severa, los ratones NOG tienen la capacidad de recibir trasplantes de células o tejidos de otras especies sin que se produzcan rechazos; posibilitando así el estudio *in vivo* de esos implantes humanos en esta especie animal.

Pese a que se han descrito una gran variedad de trabajos usando este modelo a partir de diferentes tejidos como el endometrial (Masuda y cols 2007; Cervelló y cols., 2010) y el tejido ovárico humano (Terada y cols., 2008), o incluso a partir de poblaciones celulares aisladas como la Side Population de miometrio humano (Ono y cols., 2007), el trabajo más reciente que demuestra la regeneración de tejido miomatoso en un modelo animal es el publicado por Ishikawa y colaboradores en 2010, en el que además se justifica el papel esencial de la progesterona junto con el estradiol en el crecimiento de estos tumores benignos. Los xenotrasplantes de tejido o células de mioma se realizaron en cápsula renal de ratones inmunodeficientes bajo diferentes tratamientos hormonales. Así, aquellos injertos que habían sido tratados con estradiol y progesterona iban aumentando su volumen tanto a nivel celular como de matriz extracelular, mientras que cuando se retiraba la progesterona el volumen de los mismos se veía reducido. Sorprendentemente, el tratamiento solo con estradiol, no aumentaba ni mantenía el tamaño del tumor. Sin embargo, aunque no tiene actividad mitogénica por sí mismo, esta hormona inducía la expresión del receptor de la progesterona y su acción.

En conjunto, estos resultados definen que el mantenimiento del volumen y el crecimiento de los miomas humanos son dependientes de la

progesterona. Además, el potencial de células disociadas de mioma para reconstituir un nuevo mioma, conduce a la posibilidad de que las células madre presentes en este tipo de tejido puedan participar como células iniciadoras del tumor.

Nuestro trabajo.

La existencia de células madre en el miometrio ha sido validada mediante la identificación de células que retienen el marcaje, también conocidas como *Label retaining cells* (LRC) en un modelo animal (Shynlova y cols., 2006; Szotek y cols., 2007) y en el miometrio humano por el método de SP (Ono y cols., 2007). En nuestro estudio, hemos dado un paso adelante demostrando la existencia de células SP en miomas uterinos con características de células iniciadoras del tumor. Hemos demostrado que el porcentaje de SP de miomas correspondía a un $0,63 \pm 0,21\%$. Además, este porcentaje está en concordancia con las recientes publicaciones en el área (Chang y cols., 2010), independientemente de los diferentes parámetros clínicos como la edad del paciente, su fertilidad o la ubicación y el tamaño del mioma.

La caracterización molecular de esta supuesta población de células madre de miomas indicó que éstas aún no están comprometidas hacia un linaje específico, dada la falta de marcadores musculares típicos: smoothelina (SMOOTH) y calponina (CALP), y de receptores hormonales: receptor de estrógenos 1 (ESR1) y receptor de progesterona (PR). Sin embargo, el receptor de la hormona luteinizante (LH) estaba sobre-expresado en la fracción de la Side Population (SP) respecto al resto de fracciones celulares: Non-Side Population (NSP) y miometrio completo, lo

que podría sugerir un posible papel de esta hormona en la formación de miomas. Sin embargo se necesitan más estudios para aclarar la acción específica de este marcador.

El análisis de *microarrays* también nos ha permitido identificar 100 genes regulados al alza (sobre-expresados) y 53 regulados a la baja (infra-expresados) en la Side Population (SP) *versus* la fracción total (FT) de mioma, proporcionando un perfil génico de la SP que está implicado en varios procesos biológicos y celulares, tales como respuesta inflamatoria, señalización e interacción celular... Entre los principales genes sobre-expresados en la fracción de SP de mioma y que resultaron de interés por sus funciones, se identificaron: CSF1R (colony stimulating factor 1 receptor) referido en procesos tumorales, ACP5 (acid phosphatase 5) relacionado con procesos hormonales, y AIF1 (allograft inflammatory factor1) descrito como una nueva diana molecular en la proliferación de las células musculares. En cuanto a los genes infra-expresados más relevantes destacamos: PLK2 (polo-like kinase 2) que interactúa con receptores hormonales y con la proteína p53 implicada en tumorigénesis, TM4SF1 (transmembrane 4 superfamily member) presente en las células tumorales, y DUSP6 (dual specificity phosphatase) descrito en tumores mesenquimales como el tumor de Wilms. Estos hallazgos podrían conducir al establecimiento de un conjunto de marcadores para la identificación de células madre iniciadoras de tumores en los miomas.

Debido a la ausencia de marcadores específicos de células madre en la mayoría de tejidos adultos, se ha descrito la técnica de la SP como una herramienta útil para identificar estas células candidatas en diferentes órganos y tejidos, entre ellos los miomas.

Basándonos en estos criterios de selección: alta proliferación celular en la formación de clones y el fenotipo SP, hemos generado dos líneas celulares de miomas humanos nombradas como LeioSP1 y LeioSP2. La demostración de que ambas mostraban un cariotipo estable 46XX, excluyó la posibilidad de que presentaran anomalías observadas a nivel citogenético, las cuales se pueden detectar en el 40-50% de los miomas uterinos (Ligon y Morton, 2001) y podrían haber alterado la obtención de la línea celular. Además, el perfil molecular corroboró su estado indiferenciado, así como un cierto compromiso hacia el linaje mesenquimal.

La expresión de marcadores mesenquimales ha sido identificada en otros tipos celulares como el adiposo y las células madre de médula ósea (Baer y cols., 2011; Chanda y cols., 2010; Yarak y Okamoto, 2010). En nuestro estudio, también quedó demostrado el destino mesenquimal de las líneas celulares LeioSP mediante el análisis de inmunofenotipo. Se verificó la expresión de marcadores mesenquimales como CD90, CD105 y CD73, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD45 y CD34 y progenitores endoteliales:CD31 y CD133.

Las células madre somáticas se definen como células progenitoras auto-renovables y multipotentes, que tienen la capacidad de diferenciarse hacia diversos tipos de células de un linaje específico. A través de este estudio, hemos demostrado capacidad de diferenciación *in vitro* de las líneas LeioSP hacia linajes mesodérmicos específicos, tales como adipocitos y osteocitos. Este fenómeno está en consonancia con el hecho de que los miomas humanos pueden contener componentes adipogénicos y osificados (De Wever y Mareel, 2002).

La prueba definitiva se basa en la capacidad de esta población de células madre somáticas de reconstruir un tejido similar al mioma en ratones inmunodeficientes. Este hecho, fue confirmado mediante la reconstrucción, en el sitio de inyección, de tejido de aspecto miomatoso a nivel subcutáneo y renal (xenotransplante). Además fue validado a nivel histológico mediante la co-expresión de Alcian Blue (típico de los componentes de matriz extracelular y el receptor hormonal de progesterona (PGR).

El papel de la progesterona es esencial en el desarrollo del mioma humano a través de su receptor, y la demostración de que el estrógeno no es necesario por sí mismo en este proceso también ha sido demostrada recientemente (Ishikawa y cols., 2010). En este contexto, en nuestro trabajo, se corroboró el papel de la progesterona en el crecimiento y mantenimiento de los xenotransplantes reconstruidos (Mas y cols., 2012).

En un intento de demostrar la importancia del nicho celular en nuestros modelos de xenotransplante, se combinaron las células LeioSP con las células del miometrio dando lugar a la neo-formación de tejido miomatoso de un modo similar al que ocurría en el caso anterior. Este hecho se corroboraba además, que la interacción de las células iniciadoras del tumor con el nicho es fundamental para el desarrollo de la patología.

En conclusión, los resultados de este estudio son un fuerte argumento para apoyar la implicación de las células SP aisladas de miomas humanos, como supuestas células iniciadoras del tumor. Estas células tienen una elevada capacidad de proliferación *in vitro* bajo condiciones de hipoxia, un posible origen mesenquimal con la capacidad de diferenciarse *in vitro* en adipocitos y osteocitos, así como la capacidad para dar lugar a un

tejido similar a un mioma *in vivo*. Sin embargo, las limitaciones de este modelo hacen indispensable la búsqueda de marcadores específicos basados en las características de la SP, como se sugiere en el análisis genómico.

Además, el establecimiento de las dos líneas celulares generadas LeioSP1-2, podría proporcionar un excelente modelo *in vitro* e *in vivo* para ampliar conocimientos acerca de la fisiología de los miomas y las estrategias a seguir para testar fármacos que nos ayuden a reducir o incluso eliminar estos tumores benignos.

Perspectivas clínicas en el tratamiento de miomas

Las opciones para el tratamiento de los miomas son diversas y su principal objetivo es aliviar los síntomas: hemorragia uterina, dolor y presión. Por ello, las diferentes estrategias están basadas en el tamaño y la localización de las lesiones, la edad del paciente y su proximidad cronológica a la menopausia, así como sus deseos reproductivos (Somigliana y cols., 2007).

Las opciones van desde el uso de la acupuntura (método chino antiguo) a la extracción total del útero o histerectomía (Viswanathan y cols., 2007), aunque el patrón estándar del tratamiento de miomas es la intervención quirúrgica, sobretodo la miomectomía de mujeres con deseos reproductivos (Sabry y cols., 2012).

Las técnicas más desarrolladas recientemente, incluyen la embolización de la arteria uterina (EAU), la resonancia-magnética guiada enfocada por ultrasonido (MRgFUS) y la miolisis (Kim y cols., 2011).

Hasta la fecha, no existen agentes terapéuticos para el tratamiento definitivo de los miomas uterinos, sin embargo hay varios candidatos que pueden ser utilizados para el control de este tumor benigno. Entre ellos, los análogos de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRHa), que son empleados a corto plazo como terapia pre-operatoria logrando reducir el tamaño del mioma, el dolor y el sangrado menstrual (Palomba y cols., 2008). Sin embargo, su efecto es temporal y se ha reportado que tras la interrupción del tratamiento, los miomas pueden emerger de nuevo y seguir creciendo, además de los síntomas de pseudomenopausia asociados y el impacto adverso sobre la densidad ósea en las pacientes (Surrey y cols., 2010).

Otros agentes, los moduladores selectivos de receptores de estrógeno (SERM) como tamoxifeno y raloxifeno, muestran una acción agonista- antagonista específica de tejido y se utilizan con frecuencia en el tratamiento de cáncer de mama y como agente inductor de ovulación, aunque también se han descrito recientemente en el tratamiento de miomas (Lethaby y cols., 2008).

Sorprendentemente, los recientes resultados sugieren que el volumen de mantenimiento y crecimiento de los miomas uterinos son también en gran medida dependiente de la progesterona y por tanto las antiprogestinas podrían ser empleadas en el tratamiento de estos tumores benignos (Wilkins y cols., 2008). Los fármacos más empleados son la mifepristona (Carbonell y cols., 2008), el asoprisnil (Williams y cols., 2007;

Wilkins y cols., 2008) y la telapristona acetato (BDC-2914) o el Ulipristal (BDC-4124) (Attardi y cols., 2004), que actúan reduciendo el volumen de los miomas y los síntomas asociados con la enfermedad.

Los inhibidores de la aromatasa (IA), la carbegolina, el danazol y la gestrinona, también han sido evaluados en el tratamiento de miomas con diversos grados de éxito (De Leo y col., 2002). Otros fármacos como la vitamina D (Sharan y cols., 2011) y Epigallocatechin Gallate, un extracto del té verde (Zhang y cols., 2010) están siendo testados actualmente.

Sin embargo, el verdadero desafío para los científicos es desarrollar un agente de bajo coste, con capacidad para reducir el tamaño del mioma y con los mínimos efectos secundarios, sin interferir con la ovulación o con potencial de fertilidad.

Direcciones futuras: Terapia celular y nanotecnología en el tratamiento de miomas

El enorme desarrollo biotecnológico y los grandes avances científicos ocurridos en esta última década permiten un nuevo concepto de la medicina del futuro basado en las nuevas terapias y métodos a aplicar para cada una de las enfermedades a tratar. Todo ello ha dado lugar a la medicina personalizada que puede ser de origen autólogo/alogénico o xenogénico; y puede estar basada en el uso de células (terapia celular), de genes (terapia génica) o de tejidos (bioingeniería). Estos progresos junto con la nanomedicina ofrecen hoy en día grandes avances tanto en el diagnóstico, como en la prevención y en el tratamiento de esta enfermedad. Aunque aún persisten algunos problemas para alcanzar el potencial terapéutico de estas nuevas herramientas biotecnológicas.

Terapia celular

La terapia celular consiste en introducir nuevas células en un tejido diana con el objetivo de tratar determinadas enfermedades. Pueden ser células del propio paciente (autólogas) o de individuos cercanos (allogénicas). Ocasionalmente, células no humanas pueden ser usadas para producir respuestas en el paciente (xenotrasplantes), aunque esto implica una serie de inconvenientes éticos.

Normalmente las células usadas en terapia celular suelen ser células que han sido funcionales en algún momento como son las células madre somáticas, las cuales tienen la habilidad de diferenciarse hacia una gran variedad de células maduras somáticas. Así, tanto los procesos de regeneración como diferenciación están regulados por señales inter e intracelulares, haciendo de ellas una herramienta crucial para el desarrollo de las terapias avanzadas en enfermedades, para las cuales los tratamientos convencionales no son eficaces (diabetes tipo 1, lesiones cardiovasculares y enfermedades neurodegenerativas). Las células madre embrionarias son pluripotentes pudiendo diferenciarse en gran cantidad de tipos de células y/o tejidos derivados de las tres hojas embrionarias: ectodermo, endodermo y mesodermo. Debido a los problemas ético-legales derivados del uso de células madre embrionarias, hoy en día las investigaciones se centran en el uso de células madre somáticas o también células madre derivadas del cordón umbilical. Estos tipos celulares son multipotentes, y solo pueden diferenciarse a un limitado número de células, aunque cada vez más estudios les otorgan propiedades o habilidades para convertirse en pluripotentes.

Nanotecnología

La nanotecnología juega un papel importante en el desarrollo futuro de la terapia celular por ejemplo a la hora de diseñar nuevos tipos de vectores que puedan ser dianas celulares con un gran nivel de especificidad y baja toxicidad. Parte de esta nueva tecnología permitió acuñar el término de nanomedicina, cuyo objetivo es “el control, la reparación y la mejora integral de todos los sistemas biológicos, trabajando desde el nivel molecular con dispositivos de ingeniería y nanoestructuras para lograr beneficios médicos”.

Varias nanoplataformas como fullerenos (forma estable del carbono), nanotubos, puntos cuánticos, nanoporos... están siendo estudiadas y/o comercializadas. De hecho, los liposomas los primeros nanosistemas utilizados en investigación biomédica, han ido evolucionando a pasos agigantados debido a su gran inestabilidad, creándose las nanopartículas: nanosferas constituidas por matrices poliméricas o nanocápsulas formadas por núcleo con cubierta polimérica, que han ido ganando importancia gracias a su atoxicidad, carácter promotor y versatilidad son: poliláctico, poliglucólico y quitosan.

Finalmente, diversas enfermedades son en la actualidad prometedoras dianas para el uso de nanovehículos, sobre todo aquellas que tienen que ver con el desarrollo de tumores. En este sentido, se están desarrollando nuevos métodos que eliminan resistencias, que permiten la rápida detección y diagnóstico, así como el empleo de nanopartículas de oro como sistemas transportadores inteligentes. Y aunque actualmente existen grandes pegos para aprovechar las ventajas que ofrecen las nuevas terapias avanzadas, existe una esperanza generalizada de que todos ellos presentarán un gran beneficio en la terapéutica actual y futura.

VIII.

Conclusiones

∞ La ciencia más útil es aquella cuyo fruto es el más comunicable ∞
Leonardo Da Vinci

VIII. - CONCLUSIONES

Las conclusiones que hemos extraído de la presente tesis doctoral son:

1. Existe una población candidata de células madre somáticas en los miomas humanos que podría ser considerada como la iniciadora de estos tumores benignos.
2. Esta población ha sido identificada y aislada mediante el método de la *Side Population*, basado en la selección de células con un enriquecimiento de transportadores ABC transmembrana, tratándose de un fenotipo compatible con células más indiferenciadas.
3. La ausencia de marcadores hormonales (ESR1, PR) y musculares (SMOOTH, CALP) a nivel molecular, confirma el estado indiferenciado de estas células. Así mismo, el análisis de expresión mediante microarrays nos ha permitido identificar un perfil génico específico de esta población.
4. Basándonos en estas premisas, se han generado dos líneas celulares de miomas humanos LeioSP1 y LeioSP2 que presentan un alto grado de indiferenciación y cierto compromiso hacia el linaje mesenquimal (presencia de CD90, CD73, CD105).
5. La capacidad de diferenciación *in vitro* de las líneas LeioSP1 y LeioSP2 a adipocitos y osteocitos confirman su capacidad multipotencial y su origen mesodérmico.

6. La reconstrucción de tejido miomatoso a nivel subcutáneo y renal en un modelo murino, demuestra la capacidad iniciadora de tumores de esta población candidata a células madre somáticas en los miomas humanos, bajo la influencia del nicho celular y de hormonas esteroideas inductoras del tumor.

En conclusión, hemos identificado, aislado y caracterizado, las células madre somáticas de los miomas humanos, permitiendo un nuevo enfoque en el estudio de la fisiología y patología de estos tumores benignos. Además, la generación de las líneas celulares LeioSP podrían proporcionar un excelente modelo *in vitro/ in vivo* para el cribado de moléculas que permitan la reducción, incluso la desaparición de esta frecuente patología miometrial.

IX. Bibliografía

Si he conseguido ver más lejos, es porque me he aupado en hombros de gigantes ✨
Isaac Newton

IX. - BIBLIOGRAFÍA

Aguilar-Gallardo C, Poo M, Gomez E, Galan A, Sanchez E, Marques-Mari A, Ruiz V, Medrano J, Riboldi M, Valbuena D, Simon C (2010) 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): 317-326.

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

Alison MR, Vig P, Russo F, Bigger BW, Amofah E, Themis M, Forbes S (2004) Hepatic stem cells: from inside and outside the liver? *Cell Proliferation*, 37:1-21.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernández A, Morrison SJ, Clarke MF (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100(7):3983-3988.

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

Arndt- Jovin DJ, Jovin TM (1977) Analysis and sorting of living cells according to deoxyribonucleic acid content. *J Histochem Cytochem*, 25:585-589.

BIBLIOGRAFÍA

Attardi BJ, Burgenson J, Hild SA, Reel JR. (2004) In vitro antiprogestational/antiglucocorticoid activity and progestin and glucocorticoid receptor binding of the putative metabolites and synthetic derivatives of CDB-2914, CDB-4124, and mifepristone. *J Steroid Biochem Mol Biol*; 88(3):277-288

Baba T, Convery PA, Matsumura N, Whitaker RS, Kondoh E, Perry T, Huang Z, Bentley RC, Mori S, Fujii S, Marks JR, Berchuck A, Murphy SK (2009) Epigenetic regulation of CD133 and tumorigenicity of CD133C ovarian cancer cells. *Oncogene*. 28:209–218.

Baer PC, Brzoska M, Geiger H. (2011) Epithelial differentiation of human adipose derived stem cells. *Methods Mol Biol*; 702:289–98.

Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB & Kurrey NK (2005) Stem and progenitor like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Research*. 65:3025–3029

Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P (2003) Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*, 114:763-776.

Berto AG, Sampaio LO, Franco CR, Cesar RM Jr, Michelacci YM (2003) A comparative analysis of structure and spatial distribution of decorin in human leiomyoma and normal myometrium. *Biochim Biophys Acta*.1619(1):98-112.

Bonner-Weir S, Sharma A (2002) Pancreatic stem cells. *J Pathol*.197(4):519-26.

Bonnet D (2002) Haematopoietic stem cells. *J Pathol*, 197:430-440

Brosens I, Deprest J, Dal Cin P, Van den Berghe H (1998) Clinical significance of cytogenetic abnormalities in uterine myomas. *Fertil Steril*, 69: 232-235.

Buttram Jr VC. (1986) Uterine leiomyomata- aetiology, symptomatology and management. *Prog Clin Biol Res* 225: 275-296.

Carbonell Esteve JL, Acosta R, Heredia B, Perez Y, Castañeda MC, Hernández AV. (2008) Mifepristone for the treatment of uterine leiomyomas: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol*; 112(5): 1029-1036.

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

Cervelló I, Martínez-Romero A, Martínez- Conejero JA *et al.* (2007b) The molecular profile of stromal side population in human has the features of a progenitor stem cell population. *Reproductive Sciences*, 14:283A.

Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, Delgado-Rosas F, Martínez-Conejero JA, Galán A, Martínez-Romero A, Martínez S, Navarro I, Ferro J, Horcajadas JA, Esteban FJ, O'Connor JE, Pellicer A, Simón C (2010) Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. *Plos One* 5(6): e10964.

Cervelló I, Mas A, Gil-Sanchis C, Peris L, Faus A, Saunders PT, Critchley HO, Simón C (2011) Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. *Plos One* 6(6): e21221.

Cervelló I, Gil-Sanchis C, Mas A, Faus A, Sanz J, Moscardó F, Higuera G, Sanz MA, Pellicer A, Simón C (2012) Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. *PLoS One*. 7(1):e30260.

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

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

Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S (2010) Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *J Cell Biochem* 1, 11:249–57.

Chang HL, Senaratne TN, Zhang L, Szotek PP, Stewart E, Dombkowski D, Preffer F, Donahoe PK, Teixeira J (2010) Uterine leiomyomas exhibit fewer stem/progenitor cell characteristics when compared with corresponding normal myometrium. *Reprod Sci.* 17(2):158.

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

Curley MD, Therrien VA, Cummings CL, Sergent PA, Koulouris CR, Friel AM, Roberts DJ, Seiden MV, Scadden DT, Rueda BR, Foster R (2009) CD133 Expression Defines A Tumor Initiating Cell Population In Primary Human Ovarian Cancer. *Stem Cells* 27:2875–2883.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF. (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* ; 12:104(24):10158-63.

De Leo V, Morgante G, La Marca A, Musacchio MC, Sorace M, Cavicchioli C, Petraglia F (2002) A benefit- risk assessment of medical treatment for uterine leiomyomas. *Drug Saf*; 25(11):759-779.

Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. (2003) DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 4: P3.

De Wever O, Mareel M (2002) Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem* 383:55-67.

Dixon D, Flake GP, Moore AB, He H, Haseman JK, Risinger JI, Lancaster JM, Berchuck A, Barrett JC, Robboy SJ (2002) Cell proliferation and apoptosis in human uterine leiomyomas and myometria. *Virchows Arch*; 441 (1):53-62.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317

Dunning NL, Laversin SA, Miles AK, Rees RC. (2011) Immunotherapy of prostate cancer: should we be targeting stem cells and EMT? *Cancer Immunol Immunother.* 60(8): 1181-93

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

Evans MJ, Kaufman MH (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154-156.

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

Flake GP, Andersen J, Dixon D (2003) Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review. *Environ Health Perspect*; 111:1037–54.

Forbes S, Vig P, Poulsom R, Thomas H, Alison M (2002) Hepatic stem cells. *J Pathol*, 197(4):510-518.

Fujimoto T, Miyayama Y, Fuyuta M (1977) The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. *Anat Rec* 188: 315-330.

Fukunaga M, Endo Y, Ushigome S, Ishikawa E (1995) Atypical polypoid adenomyomas of the uterus. *Histopathol*; 27:35-42.

Fukuhara K, Kariya M, Kita M, Shime H, Kanamori T, Kosaka C, Orii A, Fujita J, Fujii S.(2002) Secreted frizzled related protein 1 is overexpressed in uterine leiomyomas, associated with a high estrogenic environment and unrelated to proliferative activity. *J Clin Endocrinol Metab* 87:1729-1736.

Gage FH. Mammalian neural stem cells. (2000) *Science*, 287:1433-1438.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A.(2004) Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* 64:7011–21.

Garfield RE, Sims S, Daniel EE (1997) Gap junctions: their presence and necessity in myometrium during parturition. *Science* 198(4320):958-60.

BIBLIOGRAFÍA

Gargett CE (2007) Uterine stem cells: what is the evidence? *Hum Reprod*, 13:87-101.

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

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

Giudice LC, Glasser S and Aplin J (2002) The endometrium. Informa Healthcare, ISBN: 0415273439. Book.

Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. (1996) Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*, 1996, 183:1797-1806.

Grayson WL, Zhao F, Izadpanah R, Bunell B, Ma T (2006) Effects of hypoxia on human mesenchymal stem cell expansion and plasticity in 3D constructs. *J Cell Physiol*, 207:331-339.

Habb BB, Dunham MJ, Brown PO (2001) Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions. *Genome Biol.* 2.

Hassan MH, Eyzaguirre E, Arafa HM, Hamada FM, Salama SA, Al-Hendy A (2008) Memy I: a novel murine model for uterine leiomyoma using adenovirus- enhanced human fibroid explants in severe combined immune deficiency mice. *Am. J. Obstet. Gynecol* 199,156e: 1-8.

Horcajadas JA, Goyri E, Higón MA, Martínez-Conejero JA, Gambadauro P, García G, Meseguer M, Simón C, Pellicer A (2008) Endometrial receptivity and implantation are not affected by the presence of uterine intramural leiomyomas: a clinical and functional genomics analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* (9):3490-8.

Howe SR, Gottardis MM, Everitt JI, Golesworthy TL Wolf DC, Walker C (1995) Rodent model of reproductive tract leiomyomata. Establishment and characterization of tumor- derived cell lines. *Am.J. Pathol* 146, 1568-1579.

Hu J, Spencer TE (2005) Carbonic anhydrase regulate endometrial gland development in the neonatal uterus. *Biol Reprod*, 73:131-138.

Huang L, Teng XY, Cheng YY, Lee KM, Kumta SM (2004) Expression of preosteoblast markers and Cbfa-1 and Osterix gene transcripts in stromal tumour cells of giant cell tumour of bone. *Bone* 34(3): 393–401.

Hughes SM, Blau HM (1990) Migration of myoblasts across basal lamina during skeletal muscle development. *Nature*, 345:350-353.

Hurst BS, Matthews ML, Marshburn PB (2005) Laparoscopic myomectomy for symptomatic uterine myomas. *Fertil Steril*, 83:1-23.

BIBLIOGRAFÍA

Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M (2008) A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells* 26 (9): 2408-18.

Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Niikawa H, Lu L, Miki Y, Moriya T, Hayashi S, Handa M, Kondo T, Sasano H (2005) Progesterone receptor in non-small cell lung cancer—a potent prognostic factor and possible target for endocrine therapy. *Cancer Res* 65:6450–6458

Ishikawa H, Ishi K, Ann Serna V, Kakazu R, Bulun S.E Kurita T (2010) Progesterone Is Essential for Maintenance and Growth of Uterine Leiomyoma. *Endocrinology* 151(6):2433-2442.

Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, Ueyama Y, Koyanagi Y, Sugamura K, Tsuji K, Heike T, Nakahata T. (2002) NOD/SCID/γC mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*, 100:3175-3182.

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

Jordan CT, Guzman ML, Noble M (2006) Cancer Stem cells. *N.Engl.J.Med.* 355 (12):1253-1261.

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

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

Kim CH, Kim SR, Lee HA, Kim SH, Chae HD, Kang BM (2011) Transvaginal ultrasound-guided radiofrequency myolysis for uterine myomas. *Hum Reprod.* 26(3):559-63.

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

Körbling M, Estrov Z (2003) Adult stem cells for tissue repair- A new therapeutic concept? *N Engl J Med*, 349:570-582.

Kurita T, Cooke PS, Cunha GR (2001) Epithelial- stromal tissue interaction in paramesonephric (Mullerian) epithelial differentiation. *Dev Biol*, 240:194-211.

Larderet G, Fortunel NO, Vaigot P, Cegalerba M, Maltère P, Zobiri O, Gidrol X, Waksman G, Martin MT (2006) Human side population keratinocytes exhibit long-term proliferative potential and specific gene expression profile and can form a pluristratified epidermis. *Stem Cells* 24(4): 965-74.

Lethaby AE, Vollenhoven BJ (2008) An evidence-based approach to hormonal therapies for premenopausal women with fibroids. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*; 22(4): 283-288.

BIBLIOGRAFÍA

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

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007) Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 1; 67(3):1030-7.

Ligon A.H, Morton C.C (2000) Genetics of uterine leiomyomata. *Genes Chromosomes Cancer* (3):235-45.

Ligon A.H and Morton C.C (2001) Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Human Reproduction Update* 7(1):8-14

Mäkinen N, Mehine M, Tolvaven J, Kaasinen E et al (2011) MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas. *Scienceexpress*.

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

Martin U (2008) Methods for studying stem cells: adult stem cells for lung repair. *Methods* 45(2): 121-32.

Mas A, Cervelló I, Gil-Sanchis C, Faus A, Ferro J, Pellicer A, Simón C (2012) Identification and characterization of the human leiomyoma side population as putative tumor-initiating cells. *Fertil Steril*. [Epub ahead of print]

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

Masuda H, Matsuzaki Y, Hiratsu E, Ono M, Nagashima T, Kajitani T, Arase T, Oda H, Uchida H, Asada H, Ito M, Yoshimura Y, Maruyama T, Okano Hn (2010) Stem cell-like properties of the endometrial side population: implication in endometrial regeneration. *Plos One* 5(4): e10387

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

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

McDonnell AC, Van Kirk EA, Isaak DD, Murdoch WJ (2005) Effects of progesterone on ovarian tumorigenesis in xenografted mice. *Cancer Lett* 221:49–53

McGuire M.M, Yatsenko A, Hoffner L, Jones M et al (2012) Whole exome sequencing in a random sample of north American women with leiomyomas identifies MED12 mutations in majority of uterine leiomyomas. 7 (3):e33251.

McLennan CE, Rydell AH (1965) Extent of endometrial shedding during normal menstruation. *Obstet Gynecol* 26 (5): 605-21.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

National Center for Health Statistics. *Hysterectomies in the United States 1965-84* Vital and Health Statistics Series 1987:13 No92 Pub No 88:1753

Ono M, Maruyama T, Masuda H, Kajitani T, Nagashima T, Arase T, Ito M, Ohta K, Uchida H, Asada H, Yoshimura Y, Okano H, Matsuzaki Y (2007) Side population in human uterine myometrium displays phenotypic and functional characteristics of myometrial stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (47):18700-18705.

Ono M, Qiang W, Serna VA, Yin P, Coon JS 5th, Navarro A, Monsivais D, Kakinuma T, Dyson M, Druschitz S, Unno K, Kurita T, Bulun SE (2012) Role of stem cells in human uterine leiomyoma growth. *PLoS One.* 7(5):e36935.

Otto WR (2002) Lung epithelial stem cells. *J Pathol.* 197(4):527-35.

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

Palomba S, Orio F Jr, Falbo A, Oppedisano R, et al (2008) Tivolone reverses the cognitive effects caused by leuprolide acetate administration, improving mood and quality of life in patients with symptomatic uterine leiomyomas. *Fertil Steril*; 90 (1): 165-173.

Pavlovich CP, Schmidt LS (2004) Searching for the hereditary causes of renal- cell carcinoma. *Nat Rev Cancer* 4:381-393.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-147.

Pittenger MF (2008) Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. *Methods Mol Biol* 449: 27–44.

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

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

BIBLIOGRAFÍA

Prockop DJ (1997) Marrow stromal cells as stem cells for non hematopoietic tissues. *Science*, 276:71-74.

Ramsey EM (1994) Anatomy of the human uterus. Cambridge Univ Press, Cambridge UK, 18-40.

Rein MS, Poweil WL, Walters FC y cols (1998) Cytogenetic abnormalities in uterine myomas are associated with myoma size. *Mol Hum Reprod* 4:83-86.

Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY *et al* (2000) Embryonic stem cells lines from human blastocyst: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol*, 18:399-404.

Reynolds BA, Weiss S (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255:1707–1710.

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

Sabry M and Al-Hendy A (2012) Medical treatment of uterine fibroids. *Reproductive Sciences*, 19 (4):339-353.

Sanai N, Tramontin AD, Quinones-Hinojosa A, Barbaro NM, Gupta N, Kunwar S, Lawton MT, McDermott MW, Parsa AT, Manuel-García Verdugo J, Berger MS, Alvarez-Buylla A. (2004) Unique astrocyte ribbon in adult human brain contains neural stem cells but lacks chain migration. *Nature*, 427:740-744.

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

Schofield R. (1978) The relationship between the spleen colony-forming cell and the haematopoietic stem cell. *Blood Cells*, 4(1-2):7-25.

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

Severino MF, Murray MJ, Brandon DD, Clinton GM, Burry KA, Novy MJ (1996) Rapid loss of oestrogen and progesterone receptors in human leiomyoma and myometrial explant cultures. *Mol Hum Reprod* 2:823–828

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003) Identification of a cancer stem cell in human brain tumour. *Cancer Res*; 63:5821–8.

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

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

BIBLIOGRAFÍA

Sharan C, Halder SK, Thota C, Jaleel T et al. (2011) Vitamin D inhibits proliferation of human uterine leiomyoma cells via catechol-O-methyltransferase. *Fertil Steril* 95(1):247-253.

Shynlova O, Oldenhof A, Dorogin A, Xu Q, Mu J, Nashman N, Lye SJ (2006) Myometrial apoptosis: Activation of the caspase cascade in the pregnant rat myometrium at midgestation. *Biol Reprod*, 74:839-849.

Smalley MJ, Clarke RB (2005) The mammary gland “side population”: a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 10: 37-47.

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

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

Somigliana E, Vercellini P, Daguati R, Pasin R, De Giorgi O, Crosignani PG (2007) Fibroids and female reproduction: a critical analysis of the evidence. *Hum Reprod Update*, 13: 465-76.

Sozen I, Arici A (2002) Interactions of cytokines, growth factors, and the extracellular matrix in the cellular biology of uterine leiomyomata. *Fertil Steril*. 78 (1): 1-12.

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

Stewart EA (2001) Uterine fibroids. *Lancet*, 357: 293-298.

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

Szotek P, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos P, Dinulescu D, Connolly D, Foster R, Dombkowski D, Preffer F, Maclaughlin DT, Donahoe PK (2006) Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian Inhibiting Substance responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 103:11154-11159.

Szotek PP, Chang HL, Zhang L, Preffer F, Dombkowski D, Donahoe PK, Teixeira J (2007) Adult mouse myometrial label-retaining cells divide in response to gonadotropin stimulation. *Stem Cells* 25(5):1317-25.

Surrey ES (2010) Gonadotropin- releasing hormone agonist and add-back therapy: what do the data show? *Curr Opin Obstet Gynecol* 22(4): 283-288.

Tallini G, Dal Cin P (1999) HMGI(Y) and HMGI-C dysregulation: a common occurrence in human tumors. *Adv Anat Pathol*. 6(5):237-46.

Teixeira J, Maheswaran S, Donahoe PK (2001) Mullerian inhibiting substance: an instructive developmental hormone with diagnostic and possible therapeutic applications. *Endocr Rev*, 22:657-74.

BIBLIOGRAFÍA

Terada Y, Terunuma-Sato Y, Kakoi-Yoshimoto T, Hasegawa H, Ugajin T, Kayahagi Y y cols (2008) Development of human graafian follicles following transplantation of human ovarian tissue into NOD/SCID/gammac null mice. *Am.J. Reprod. Immunol.* 60, 534-540.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS *et al.* (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:145-1147.

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

Tsuiji K, Takeda T, Li B, Kondo A, Ito M and Yaegashi N (2010) Establishment of a novel xenograft model for human uterine leiomyoma in immunodeficient mice. *Tohoku J.Exp.Med.* 222:56-61.

Viswanathan M, Hartmann K, McKoy N, Stuart G, Rankins N, Thieda P, Lux LJ, Lohr KN.(2007) Management of uterine fibroids: an update of the evidence. *Evid Rep Technol Assess (Full Rep)*. 154):1-122.

Walker CL, Hunter D & Everitt JI (2003) Uterine leiomyoma in the Eker rat: a unique model for important diseases of women. *Genes, Chromosomes and Cancer* 38, 349-356.

Walker CL, Stewart EA (2005) Uterine fibroids: the elephant in the room. *Science* 308:1589-1592.

Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science*, 287:1442-1446.

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

Williams AR, Critchley HO, Osei J, et al (2007) The effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on the morphology of uterine tissues after 3 months treatment in patients with symptomatic uterine leiomyomata. *Hum Reprod*; 22(6): 1696-1704.

Wilkins J, Chwalisz K, Han C, et al (2008) Effects of the selective progesterone receptor modulator asoprisnil on uterine artery blood flow, ovarian activity, and clinical symptoms in patients with uterine leiomyomata scheduled for hysterectomy. *J Clin Endocrinol Metab*; 93(12):4664-4671.

Wylie CC, Stott D, Donovan PJ (1986) Primordial germ cell migration. *Dev Biol* 2: 433- 488

Yarak S, Okamoto OK. (2010) Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. *An Bras Dermatol*; 85:647–56.

Zaitseva M, Vollenhoven BJ, Rogers PA (2008) Retinoids regulate genes involved in retinoic acid synthesis and transport in human myometrial and fibroid smooth muscle cells. *Hum Reprod*, 23:1076-1086.

Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, Ross J, Haug J, Johnson T, Feng JQ, Harris S, Wiedemann LM, Mishina Y, Li L (2003) Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425:836-841.

BIBLIOGRAFÍA

Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai HC, Matei D, Schilder JM, Yan PS, Huang TH, Nephew KP (2008) Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumours. *Cancer Res* 68 (11):4311-4320.

Zhang D, Al-Hendy M, Richard-Davis G, Montgomery-Rice V, Rajaratnam V, Al-Hendy A. (2010) Antiproliferative and proapoptotic effects of epigallocatechin gallate on human leiomyoma cells. *Fertil Steril*. 94(5):1887-1893.

X. Anexos

*☞ Soy gran creyente en la suerte, y he descubierto que
mientras más duro trabajo, más suerte tengo ☞*

S.Leacock

X.- ANEXOS

Anexo I. Consentimiento informado

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

TÍTULO DEL ESTUDIO: Búsqueda, aislamiento y caracterización de las células madre adultas formadoras de miomas.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: Dr. Carlos Simón Vallés, Médico Ginecólogo y Director Científico.

CENTRO: Fundación IVI (FIVI)- Instituto Universitario IVI (IUIVI)- Universidad de Valencia.

INTRODUCCIÓN

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica correspondiente.

Nuestra intención es tan solo que usted reciba la información correcta suficiente para que pueda evaluar y juzgar si quiere o no participar en este estudio. Para ello, lea esta hoja informativa con atención y nosotros le aclararemos las dudas que le puedan surgir después de la explicación. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA

Debe saber que su participación en este estudio es voluntaria y que puede

decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico no se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

DESCRIPCION Y PROPÓSITO DEL ESTUDIO

Se le ha propuesto que participe en un estudio piloto para la determinación de células madre adultas en el tejido miometrial de pacientes diagnosticadas con miomas.

Dado el interés generado sobre el estudio de células madre, tanto embrionarias como adultas, se presenta un proyecto de investigación para localizar poblaciones de células madre adultas en el miometrio. Los investigadores que participan en este trabajo ya han descrito la existencia de células madre adultas endometriales en un modelo animal así como en el endometrio humano. La capacidad de regeneración del tejido miometrial proporciona un escenario perfecto para llevar a cabo este tipo de estudio. La localización, el aislamiento, la cuantificación de células madre procedentes de tejido miometrial humano en pacientes con miomas, suponen el objetivo central de dicho proyecto.

BENEFICIOS Y RIESGOS DERIVADOS DE SU PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO

Los beneficios que se pueden generar de la consecución de este proyecto en medicina regenerativa y enfermedades relacionadas con infertilidad son obvios pudiéndose, en un futuro, disponer de una de las herramientas biotecnológicas más innovadoras que existen hoy en día en el ámbito científico. Además, usted no tiene ningún riesgo adicional por estar incluida

en este estudio ya que vamos a utilizar únicamente un fragmento de tejido de su útero.

No obstante, se entiende que en cualquier momento usted tiene derecho a cambiar de opinión y no participar en este estudio. Además, puede solicitar al investigador una mayor información acerca del estudio.

PERMISO PARA LA REVISION DE SUS DATOS / CONFIDENCIALIDAD

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código y solo su médico del estudio/colaboradores, podrán relacionar dichos datos con usted y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Sólo se transmitirán a terceros y a otros países los datos recogidos para el estudio que en ningún caso contendrán información que le pueda identificar directamente, como nombre, apellidos, iniciales, dirección, nº de la seguridad social, etc. En el caso de que se produzca esta cesión, será para los mismos fines del estudio descrito y garantizando la confidencialidad como mínimo con el nivel de protección de la legislación vigente en nuestro país.

El acceso a su información personal quedará restringido al médico del estudio/colaboradores, autoridades sanitarias (Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios), al Comité Ético de Investigación Clínica y personal autorizado por el promotor, cuando lo precisen para comprobar los datos y procedimientos del estudio, pero siempre manteniendo la confidencialidad de los mismos de acuerdo a la legislación vigente.

COMPENSACIÓN ECONÓMICA

El promotor del estudio es el responsable de gestiona la financiación del mismo. Para la realización del estudio el promotor del mismo ha firmado un contrato con el centro donde se va a realizar y con el médico del estudio.

OTRA INFORMACIÓN RELEVANTE

Si usted decide retirar el consentimiento para participar en este estudio, ningún dato nuevo será añadiendo a la base de datos y, puede exigir la destrucción de todas las muestras identificables previamente retenidas para evitar la realización de nuevos análisis.

También debe saber que puede ser excluido del estudio si el promotor los investigadores del estudio lo consideran oportuno, ya sea por motivos de seguridad, por cualquier acontecimiento adverso que se produzca por la medicación en estudio o porque consideren que no está cumpliendo con los procedimientos establecidos. En cualquiera de los casos, usted recibirá una explicación adecuada del motivo que ha ocasionado su retirada del estudio.

Al firmar la hoja de consentimiento adjunta, se compromete a cumplir con los procedimientos del estudio que se le han expuesto.

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Código del Estudio:

Yo _____ (nombre y apellidos)

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con _____ (nombre del investigador)

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

1. Cuando quiera
2. Sin tener que dar explicaciones
3. Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio y doy mi consentimiento para el acceso y utilización de mis datos en las condiciones detalladas en la hoja de información.

Firma del participante

Firma del Investigador

Fecha:

Fecha:

Anexo II. Listado de genes *sobre-infra* expresados en Leiomyoma SP versus Leiomyoma FT, obtenidos tras el análisis transcriptómico mediante *arrays* de expresión. En él se muestran los 100 genes sobre-expresados y los 53 infra-expresados, los cuales se encuentran diferencialmente expresados en Leiomyoma SP versus Leiomyoma FT. Se indican el símbolo, el nombre del gen y la tasa de cambio (*Fold Change*, FC) según la matriz de datos original (transcriptoma de genoma completo) de las muestras para la selección de genes.

GENES SOBRE-EXPRESADOS EN LA POBLACIÓN SP		
Símbolo del gen	Nombre del gen	FC
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor, oncogene homolog	5,47
HBB	Hemoglobin, beta	4,86
C1QB	Complement component 1, q subcomponent, B chain	4,57
CTSZ	Cathepsin Z	3,89
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	3,89
ACP5	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	3,83
HIGD1B	HIG1 domain family, member 1B	3,81
AIF1	Allograft inflammatory factor 1	3,78
HBA1	Hemoglobin, alpha 1	3,64
CCL19	Chemokine (C-C motif) ligand 19	3,60
VSIG4	V-set and immunoglobulin domain containing 4	3,56
IL1B	interleukin 1, beta	3,56
C1QA	Complement component 1, q subcomponent, A chain	3,29
GJA4	Gap junction protein, alpha 4, 37kDa (connexin 37)	3,21
PPP1R14A	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A	3,13
CCL3L3	Chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	3,12
MYL9	Myosin, light chain 9, regulatory	3,10
ACTG2	Actin, gamma 2, smooth muscle, enteric	3,09
CD163	CD163 molecule	2,98
TAGLN	Transgelin	2,96

CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	2,90
CD248	CD248 molecule, endosialin	2,83
AVPR1A	Arginine vasopressin receptor 1A	2,79
DKFZp686D0972	Similar to RIKEN cDNA 4732495G21 gene	2,78
ACTA2	Actin, alpha 2, smooth muscle, aorta	2,75
NLRP3	NLR family, pyrin domain containing 3	2,74
PFDN6	Prefoldin subunit 6	2,72
FOLR2	Folate receptor 2 (fetal)	2,69
CH25H	Cholesterol 25-hydroxylase	2,68
SMOC2	SPARC related modular calcium binding 2	2,68
TPM2	Tropomyosin 2 (beta)	2,63
GUCY1A3	Guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	2,60
PPP1R12B	Protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12B	2,57
PCP4	Purkinje cell protein 4	2,55
MUSTN1	Musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1	2,54
C4B	Complement component 4B (Childo blood group)	2,54
CENTA2	Centaurin, alpha 2	2,53
MS4A7	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	2,53
S100A4	S100 calcium binding protein A4	2,52
RAMP1	Receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1	2,52
CGI-38	Brain specific protein	2,51
RGS1	Regulator of G-protein signalling 1	2,49
HBA2	Hemoglobin, alpha 2	2,49
OSM	Oncostatin M	2,48
FRZB	Frizzled-related protein	2,46
ISOC2	Isochorismatase domain containing 2	2,46
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	2,44
LMOD1	Leiomodin 1 (smooth muscle)	2,43
SH3BP5L	SH3-binding domain protein 5-like	2,43
H19	H19, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	2,42
ACTC1	Actin, alpha, cardiac muscle 1	2,42
WISP2	WNT1 inducible signaling pathway protein 2	2,41

LOC619208	Hypothetical protein LOC619208	2,40
HEYL	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	2,40
HSPB2	Heat shock 27kDa protein 2	2,40
LPL	Lipoprotein lipase	2,39
LOC255275	Similar to myeloid-associated differentiation marker (LOC728889)	2,39
PGM5	Phosphoglucomutase 5	2,37
EMX2	Empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	2,37
DES	Desmin	2,36
MARVELD1	MARVEL domain containing 1	2,36
THBS4	Thrombospondin 4	2,32
BAX	BCL2-associated X protein (BAX), transcript variant delta	2,30
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	2,29
LOC389607	Hypothetical gene supported by AK128318	2,29
CFD	Complement factor D (adipsin)	2,27
HIST1H4H	Histone cluster 1, H4h	2,27
TKT	Transketolase (Wernicke-Korsakoff syndrome)	2,24
FCGR2A	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)	2,24
TCEAL6	Transcription elongation factor A (SII)-like 6	2,24
FKBP10	FK506 binding protein 10, 65 kDa	2,23
MRVI1	Murine retrovirus integration site 1 homolog	2,23
WFDC1	WAP four-disulfide core domain 1	2,21
SERPINF1	Serpin peptidase inhibitor, member 1	2,21
IFI30	Interferon, gamma-inducible protein 30	2,20
DSCR1L1	Down syndrome critical region gene 1-like 1	2,20
MFAP4	Microfibrillar-associated protein 4	2,20
CBX6	Chromobox homolog 6	2,19
EGFLAM	EGF-like, fibronectin type III and laminin G domains	2,19
TCEAL3	Transcription elongation factor A (SII)-like 3	2,18
KCNE4	Potassium voltage-gated channel, Isk-related family, member 4	2,18
CRIP1	Cysteine-rich protein 1 (intestinal)	2,18
HSPB3	Heat shock 27kDa protein 3	2,17

ANXA6	Annexin A6	2,17
CTF8	Chromosome transmission fidelity factor 8 homolog (S. cerevisiae)	2,16
ND6	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6	2,15
C6orf173	Chromosome 6 open reading frame 173	2,15
PRELP	Proline/arginine-rich end leucine-rich repeat protein	2,14
WFDC3	WAP four-disulfide core domain 3	2,14
DPEP3	Dipeptidase 3	2,14
KCTD11	Potassium channel tetramerisation domain containing 11	2,13
C6orf125	Chromosome 6 open reading frame 125	2,13
F13A1	Coagulation factor XIII, A1 polypeptide	2,13
STEAP4	STEAP family member 4	2,12
TGFBI	Transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	2,11
HIST1H4E	Histone cluster 1, H4e	2,09
ASB2	Ankyrin repeat and SOCS box-containing 2	2,05
PCOLCE	Procollagen C-endopeptidase enhancer	2,05
CHRDL2	Chordin-like 2	2,02
ANKRD35	Ankyrin repeat domain 35	1,99

GENES INFRA-EXPRESADOS EN LA POBLACIÓN SP

Símbolo del gen	Nombre del gen	FC
SELE	Selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	-5,45
XCL1	Chemokine (C motif) ligand 1	-4,66
XCL2	Chemokine (C motif) ligand 2	-4,04
LOC441208	Hypothetical gene supported by AK094370	-4,03
KLRB1	Killer cell lectin-like receptor subfamily B, member 1	-3,54
PLK2	Polo-like kinase 2 (Drosophila)	-3,41
EMP1	Epithelial membrane protein 1	-3,27
KLRC4	Killer cell lectin-like receptor subfamily C, member 4	-3,15
TM4SF1	Transmembrane 4 L six family member 1	-3,01
PSCD1	Pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1(cytohesin 1)	-2,92
DUSP6	Dual specificity phosphatase 6	-2,91

PTTG1	Pituitary tumor-transforming 1	-2,86
ID2	Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	-2,77
HSPA2	Heat shock 70kDa protein 2	-2,73
MGC14376	Hypothetical protein MGC14376	-2,69
LOC646626	PREDICTED: hypothetical LOC646626	-2,67
SLC38A2	Solute carrier family 38, member 2	-2,64
FLJ11783	Hypothetical protein FLJ11783	-2,62
KLF4	Kruppel-like factor 4 (gut)	-2,61
GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	-2,55
XIST	X (inactive)-specific transcript (XIST) on chromosome X	-2,53
H2AFX	H2A histone family, member X	-2,52
ADM	Adrenomedullin	-2,46
SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase	-2,46
FLJ39575	Hypothetical protein FLJ39575	-2,44
MAP3K8	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8	-2,44
SFRS2	splicing factor, arginine/serine-rich 2	-2,43
ARHGAP9	Rho GTPase activating protein 9	-2,42
ENST00000229270	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	-2,37
C1orf63	cDNA FLJ14412 fis, clone HEMBA1004669	-2,34
SLC27A4	Solute carrier family 27 (fatty acid transporter), member 4	-2,34
NXF1	Nuclear RNA export factor 1	-2,33
MAP2K3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	-2,32
SNHG1	Small nucleolar RNA host gene (non-protein coding) 1	-2,28
LAG3	Lymphocyte-activation gene 3	-2,26
ZNF217	Zinc finger protein 217	-2,25
DNAJB9	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 9	-2,23
POLG2	Polymerase (DNA directed), gamma 2, accessory subunit	-2,23
ID3	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein	-2,22
MESDC1	Mesoderm development candidate 1	-2,21
CD200	CD200 molecule	-2,21
TUFT1	Tuftelin 1	-2,20

NP	nucleoside phosphorylase	-2,19
FOXF1	forkhead box F1	-2,19
EZH2	cDNA FLJ13754 fis, clone PLACE3000362	-2,16
HEXIM1	hexamethylene bis-acetamide inducible 1	-2,16
C1orf79	cDNA clone IMAGE:5258564	-2,15
LOC389286	similar to FKSG62	-2,15
KIAA1683	KIAA1683	-2,13
IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	-2,13
PALM2-AKAP2	PALM2-AKAP2 protein	-2,12
HDC	histidine decarboxylase	-2,11
IFRD1	interferon-related developmental regulator 1	-2,10

Anexo III. Publicaciones derivadas de la presente tesis doctoral

Revistas internacionales

Cervelló I, Gil-Sanchis C, **Mas A**, Delgado-Rosas F, Martínez-Conejero JA, Galán A, Martínez-Romero A, Martínez S, Navarro I, Ferro J, Horcajadas JA, Esteban FJ, O'Connor JE, Pellicer A, Simón C. Human endometrial side population cells exhibit genotypic, phenotypic and functional features of somatic stem cells. PLoS One. 2010 Jun 24;5(6):e10964.

Cervelló I, **Mas A**, Gil-Sanchis C, Peris L, Faus A, Saunders PT, Critchley HO, Simón C. Reconstruction of endometrium from human endometrial side population cell lines. PLoS One. 2011;6(6):e21221. Epub 2011 Jun 21.

Cervelló I, Gil-Sanchis C, **Mas A**, Faus A, Sanz J, Moscardó F, Higuera G, Sanz MA, Pellicer A, Simón C. Bone marrow-derived cells from male donors do not contribute to the endometrial side population of the recipient. PLoS One. 2012;7(1):e30260. Epub 2012 Jan 19.

Aymara Mas, Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, Amparo Faus, Jaime Ferro, Antonio Pellicer and Carlos Simón. Identification and Characterization of the Human Leiomyoma Side Population as Putative Tumor-Initiating Cells. Fertil and Steril. *In press*.

Congresos

Irene Cervelló, **Aymara Mas**, Claudia Gil-Sanchis, Alicia Martínez-Romero, Sebastián Martínez-Escribano, Patricia Cañete, Santiago Domingo, Jose

Bellver, Jaime Ferro, Antonio Pellicer, Jose Enrique O'Connor, Carlos Simón. Adipogenic Differentiation of Side Population cells from human Endometrium.

ISSCR 7th Annual Meeting (International Society for Stem Cells Research). Barcelona (España), Julio 2009. Tipo de participación: Póster

***Aymara Mas**, *Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, Alicia Martínez-Romero, Amparo Galán, Verónica Ruiz, Jaime Ferro, José Enrique O'Connor, Antonio Pellicer and Carlos Simón. Somatic Stem Cell Lines from Human Endometrium. Society for Gynecologic Investigation 57th Annual Scientific Meeting (SGI). Orlando, Florida. March 24-27, 2010. Tipo de participación: Póster

Aymara Mas, Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, Laura Peris-Pardo, Amparo Faus, Jaime Ferro, Antonio Pellicer, Carlos Simón. Identification and characterization of putative leiomyoma stem cells. ESHRE Annual Meeting. Estocolmo (Suecia), Julio 2011. Tipo de participación: Póster. ***Pre-selected for the Basic Science Award.***

Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, **Aymara Mas**, Xavier Santamaría, Federico Moscardó, Jaime Sanz, Gema Higuera, Miguel Ángel Sanz, Antonio Pellicer, Carlos Simón. Endometrial *versus* bone marrow source of somatic stem cells in human endometrium? ESHRE Annual Meeting. Estocolmo (Suecia), Julio 2011. Tipo de participación: Comunicación oral.

Aymara Mas, Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, Amparo Faus, Jaime Ferro, Antonio Pellicer and Carlos Simón. Identification of novel genes implicated in leiomyoma formation by analysis of Side Population

microarrays. Society for Gynecologic Investigation 59th Annual Scientific Meeting (SGI) San Diego, California, USA. March 21-24, 2012. Tipo de participación: Póster

Irene Cervelló, Claudia Gil-Sanchis, Xavier Santamaría, **Aymara Mas**, Amparo Faus, Tamara Garrido-Gómez, Alicia Quiñonero, Antonio Pellicer and Carlos Simón. Demonstration of Leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 (Lgr5) as a putative human endometrial stem cell marker. ESHRE Annual Meeting. Estambul (Turquía) Julio 2012. Tipo de participación: Comunicación oral. **Basic Science Award for oral presentation.**