

# Resumen

Los procesos de comunicación celular permiten a las células desarrollar una acción coordinada durante la embriogénesis, asimilar de forma coherente a las señales recibidas a través del entorno y reclutar células madre desde sus nichos para llevar a cabo la regeneración e un tejido dañado. Algunas de las moléculas señalizadoras más usadas en la clínica y la investigación son los factores de crecimiento y citoquinas. Sin embargo, existe una tendencia creciente en el uso de otro tipo de moléculas, como los iones metálicos. Algunos iones como el calcio y el zinc actúan como segundos mensajeros intracelulares, transmitiendo señales en cascada. Otros como el litio son capaces de inactivar proteínas quinasa alterando rutas de señalización. En el desarrollo de esta tesis doctoral, se ha estudiado el efecto del zinc en células musculares de ratón (mioblastos), el papel del zinc en la auto-renovación replicativa de células madre embrionarias (CMEs), y el papel del litio en la diferenciación de CMEs.

El estudio del efecto del zinc sobre los mioblastos demostró que el zinc es capaz de estimular la diferenciación de los mioblastos generando un mayor número de miotubos y más desarrollados. El análisis del zinc intracelular, en los diferentes estadios de diferenciación de las células musculares, demostró que los miotubos (mioblastos diferenciados) eran capaces de albergar mayor cantidad de zinc en su interior. Los resultados mostraron que la adición de zinc extracelular estimula la fosforilación y activación de la proteína quinasa Akt, cuyo papel en la diferenciación de los mioblastos ha sido bien estudiado por otros autores. Ha sido demostrado que el transportador de zinc, Zip7, es crítico en el proceso de diferenciación celular mediado por el zinc, y que tras su activación se incrementa la fosforilación de Akt. La inhibición de Zip7 mediante ARN interferente, originó una reducción en los niveles de fosforilación de Akt y consecuentemente unos niveles menores de diferenciación de los mioblastos expuestos a zinc extracelular. Nuestros resultados demuestran que altas concentraciones de zinc extracelular producen un incremento en la diferenciación de los mioblastos debido a la activación de Akt mediada por Zip7.

Para el segundo estudio, se analizó el efecto del zinc sobre las CMEs. Como control de mantenimiento de la pluripotencia se usó medio suplementado con

## Resumen

factor inhibidor de leucemia (LIF). Se ha observado que la adición externa de concentraciones de zinc superiores a 100  $\mu$ M produce un incremento inmediato de la concentración de zinc intracelular, lo cual resulta en la activación de Akt mediada por Zip7. Se han realizado experimentos para estudiar el efecto del zinc en la diferenciación de las CMEs. Los resultados demuestran que las células tratadas con altas concentraciones de zinc mantienen su capacidad de auto-renovación. El papel de Akt en la auto-renovación de las CMEs se ha descrito múltiples veces. Para demostrar que el efecto observado del zinc en CMEs está asociado a la activación de Akt mediada por Zip7 se inhibió la fosforilación de Akt y se silenció el transportador Zip7. Ambos abordajes dieron como resultado un incremento en la diferenciación de las células tratadas con zinc, y por lo tanto una menor capacidad de auto-renovación de las CMEs. Por otro lado, CMEs cultivadas durante 30 días en presencia de zinc, fueron capaces de retener su pluripotencia, mientras que el control sin zinc presentaba rasgos claros de diferenciación celular espontánea, así como la pérdida de la capacidad de diferenciación dirigida. Por último, la combinación de LIF con zinc produjo un incremento importante del efecto del LIF en cuanto al mantenimiento de la capacidad de auto-renovación celular.

Por último, se ha estudiado el efecto del litio en la diferenciación de las CMEs. El litio es un inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (GSK3 $\beta$ ). En términos de CMEs, GSK3 $\beta$  activa los mecanismos de diferenciación, por lo que su inhibición mantiene la auto-renovación de las CMEs. Los resultados obtenidos indican que altas concentraciones de litio (10 mM) son capaces de fosforilar y por tanto inhibir fuertemente la proteína GSK3 $\beta$ . Sin embargo, en lugar de mantener la pluripotencia, las células madre se diferenciaron hacia el linaje del mesodermo tras 3 días de cultivo. Después de un total de 6 días, las células tratadas con 10 mM de litio presentaron características de endotelio hemogénico. La fosforilación de GSK3 $\beta$  dio como resultado la activación de la proteína  $\beta$ -catenina, cuya actividad transcripcional es necesaria para la hematogénesis embrionaria. La capacidad de las células endoteliales con potencial hemogénico obtenidas a partir de CMEs tratadas con litio de derivar en células madre hematopoyéticas fue confirmada tras su maduración durante 11 días, dando como resultado agregados de células redondeadas positivas para Sox17.