

## UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

# GENERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS HUMANAS Y SU DIFERENCIACIÓN NEURONAL

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestro en Ciencias

### PRESENTA:

## VICENTE ARBESÚ LAGO

COMITÉ TUTORAL:

Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez Instituto de Fisiología Celular

Tutor principal

Dra. Rosana Pelayo Camacho

Centro Médico Nacional Siglo XXI

Dr. Jesús Chimal Monroy Instituto de Investigaciones Biomédicas

### Ciudad Universitaria, Cd. Mx. Noviembre de 2016



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

#### DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# Agradecimientos

Esta tesis se desarrolló en la División de Neurociencias del Instituto de Fisiología Celular (IFC), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y en el Laboratorio de Reprogramación Celular IFC/UNAM en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía "Manuel Velasco Suárez".

Se agradece el apoyo a través de los donativos de Conacyt (131281, 256092 y Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa) y de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Papiit IN208713/IN213716).

Agradezco también a mis compañeros de laboratorio AL-101 del Instituto de Fisiología Celular por todo su apoyo prestado, por los conocimientos enseñados y por la experiencia compartida. Gracias en particular al Dr. Iván Velasco por la oportunidad brindada y por su paciencia en mi proceso de formación. Asimismo, doy las gracias a Lety García del Posgrado en Ciencias Bioquímicas por su pronta ayuda.

Gracias a mi comité tutoral, formado por la Dra. Rosana Pelayo, el Dr. Jesús Chimal y el Dr. Iván Velasco por sus aportaciones científicas y por los consejos brindados a lo largo de mi posgrado. También agradezco a mi comité jurado, integrado por la Dra. Hilda M. Lomelí Buyoli, Dra. Mónica Lamas Gregori, Dra. Rosa Estela Navarro González, Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia, y la Dra. María Antonieta Chávez González, por sus importantes comentarios que me permitieron mejorar este escrito.

## Resumen

Las células troncales embrionarias (ESC) son derivadas de embriones en etapa pre-implantación llamados blastocistos- que se mantienen indiferenciadas in vitro y conservan su potencial para generar elementos de las tres capas germinales embrionarias, lo que se conoce como pluripotencialidad. Diversos protocolos se han desarrollado para diferenciar ESC en una gran variedad de linajes celulares, incluyendo neuronas. Estudios en modelos animales han mostrado que el trasplante de neuronas diferenciadas de ESC puede tratar satisfactoriamente las deficiencias de la enfermedad de Parkinson. En 2006, se reportó la reprogramación de células somáticas diferenciadas a un estado pluripotencial mediante la expresión de factores transcripcionales; a estas células se les denominó células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC). Las iPSC son una fuente prometedora para utilizar en terapia regenerativa, pues evitan problemas de rechazo inmune al poder originarse de células del propio paciente. En el presente trabajo se realizó la reprogramación de fibroblastos dermales humanos a un estado pluripotencial, por medio de la electroporación de plásmidos episomales que permiten la expresión transitoria de factores de pluripotencia. Las características morfológicas de las células obtenidas, pruebas de detección de marcadores de pluripotencia, resultados de RT-PCR y la inyección de células en ratones inmunodeprimidos para la formación de teratomas, proveen evidencia para aseverar que las células obtenidas son pluripotenciales. Las iPSC obtenidas fueron inducidas a diferenciarse hacia neuronas dopaminérgicas mesencefálicas por medio de un protocolo de inducción neural. Los resultados de RT-PCR y de inmunocitofluorescencia indican que las células obtenidas presentan características de neuronas dopaminérgicas. Como conclusión se puede afirmar que la reprogramación con vectores episomales permite la diferenciación neuronal por inhibición dual de las proteínas SMAD para producir neuronas dopaminérgicas.

# Índice

Agradecimientos	3
Resumen	4
ndice	5
ista de Tablas	6
ista de Figuras	7
Abreviaturas	9
. Introducción	11
.1 Células troncales	11
.2 Células troncales embrionarias	12
3 iPSC	16
.4 Aplicación de iPSC: Diferenciación a neuronas dopaminérgicas	22
2. Justificación	27
B. Hipótesis	28
I. Objetivos	29
5. Materiales y métodos	30
5. Resultados	41
7. Discusión	55
3. Conclusiones	59
Referencias	60

# Lista de Tablas

Tabla 1. Comparación entre diversos métodos usados para la reprogramación de células somáticas a un estado pluripotencial
Tabla 2. Densidad celular y volumen de medio a utilizar dependiendo del tamaño de caja en la que se siembren los fibroblastos
Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunocitofluorescencia   38
Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para las reacciones de PCR   40
Tabla 5. Características del análisis de cariotipo de diversas clonas de iPSC obtenidas, así como de las células de las que se partió para la reprogramación (fibroblastos)

# Lista de Figuras

Figura 1. Origen de las Células Troncales Embrionarias (ESC) y ejemplos de su diferenciación a distintos tipos celulares
Figura 2. Red regulatoria transcripcional en ESC humanas13
Figura 3. Formas de evaluación de la pluripotencia15
Figura 4. Representación del método de reprogramación de Yamanaka
Figura 5. Eventos críticos durante la reprogramación19
Figura 6. Derivación del linaje neural a partir de una célula troncal neural (Neural Stem Cell, o NSC), así como los marcadores más representativos para cada población
Figura 7. Mecanismos por los que SB431542 y Noggin (o LDN193189) contribuyen a la inducción neural de PSC (células troncales pluripotenciales)
Figura 8. Clases principales de protocolos de diferenciación de células pluripotenciales a neuronas dopaminérgicas
Figura 9. Vectores de expresión episomal utilizados
Figura 10. Protocolo de inducción neural, que en los primeros días combina la inhibición dual de SMAD (por SB431542 y LDN) y el uso de moléculas que inducen a un fenotipo VM DA (dopaminérgico del mescencéfalo ventral)
Figura 11 .Imagen de microscopía en campo claro de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados, que muestra su morfología característica
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (3%) tras la PCR de los plásmidos expandidos, que muestra la amplificación de secuencias de ADN contenidas en los transgenes
Figura 13. Imágenes de microscopía en campo claro de diferentes días del proceso de reprogramación, en donde se observa el cambio morfológico de los fibroblastos a células tipo pluripotentes que se agregan formando colonias
Figura 14. Expresión transitoria del gen reportero GFP en las células transfectadas con los plásmidos episomales

Figura 20. Formación de un teratoma por inyección de iPSC en ratones inmunocomprometidos.. 49

# Abreviaturas

ALK	Cinasa linfoma anaplástica
ANE	Aminoácidos no esenciales
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro
BMP	Proteína morfogenética del hueso
BSA	Albúmina de suero bovina
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CNS	Sistema nervioso central
DA	Dopaminérgico
DMEM	Dulbeco's Modified Eagle Medium
DMR	Región diferencialmente metilada
DMSO	Dimetilsulfóxido
EBNA-1	Antígeno nuclear Epstein-Barr
EC	Carcinoma embrionario
ESC	Células troncales embrionarias
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GDNF	Factor neurotrófico derivado de la glía
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK3β	Glucógeno sintasa cinasa 3 beta
hESC	Células troncales embrionarias humanas
hiPSC	Células troncales pluripotenciales inducidas humanas
ICM	Masa celular interna
iPSC	Célula troncal pluripotencial inducida
KSR	Reemplazo de suero knockout
LIF	Factor inhibitorio de leucemia
MEF	Fibroblastos embrionarios de ratón
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero

OSKM	Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc
PAX6	Paired box 6
PBS	Buffer fosfato salino
PD	Enfermedad de Parkinson
PFA	para-formaldehído
PSC	Célula troncal pluripotente
RT-PCR	Transcripción reversa – reacción en cadena de la polimerasa
SFB	Suero fetal bovino
SHH	Sonic Hedgehog
shRNA	ARN tipo short-hairpin
SMAD	Composición de sma (small body size) y MAD (Mothers against decapentaplegic)
SSEA	Antígeno embrionario específico de superficie
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
тн	Tirosina hidroxilasa
TRA	Antígeno de reconocimiento de tumor
VM	Mescencéfalo ventral

## 1. Introducción

#### 1.1 Células troncales

Las células troncales se caracterizan por su autorrenovación en estado indiferenciado y su capacidad de diferenciar a uno o varios tipos celulares especializados. El término "célula troncal" se deriva del inglés *stem cell*, que fue acuñado en 1868 por el biólogo alemán Ernst Haeckel, con el cual nombra dos conceptos: describe el organismo unicelular ancestral del que consideraba evolucionaron todos los organismos multicelulares, además de la célula primordial de la que se derivan todas las demás células del organismo [1].

Para finales del siglo XIX, el término *stem cell* se empezó a utilizar en el contexto de preguntas fundamentales en el campo de la Embriología: la continuidad de la línea germinal y en el origen del sistema sanguíneo. En este último, se debatía la existencia de un solo antecesor común para todo el linaje hematopoyético, lo que fue demostrado hasta 1961 con el descubrimiento de células formadoras de colonias provenientes de la médula ósea, que daban lugar a todos los tipos celulares de dicho linaje [2]. Estas células se llamaron células troncales hematopoyéticas, y fueron el primer grupo de células en las que se establecieron las características ya mencionadas de las células troncales: su autorrenovación y su capacidad para dar lugar a una o varias clases de células diferenciadas [1,3]. Con el paso de los años, se han encontrado células troncales en muchos otros tipos de tejidos embrionarios, como el músculo, el cerebro, la piel, el intestino, etc. Incluso en el organismo adulto se han encontrado algunas células troncales, en el cual son las encargadas de la renovación de las células que mueren y de regeneración en heridas y tejidos dañados [4].

A partir del potencial que tenga cada célula troncal para diferenciarse en uno o varios linajes celulares específicos a lo largo del desarrollo de un ser vivo, se pueden clasificar en diferentes niveles. Se les llama <u>totipotentes</u>, si son capaces de formar un individuo completo, produciendo tanto tejido embrionario como extra-embrionario [5]; <u>pluripotentes</u>, si pueden dar origen a todos los distintos fenotipos celulares que componen a un organismo adulto, ya sean células germinales o somáticas [6] y <u>multipotentes</u>, si pueden generar las distintas células dentro de un linaje determinado [7]. Sin embargo, en los últimos años, una gran cantidad de estudios *in vivo* (principalmente en ratones) han generado evidencias que indican que las células troncales multipotentes poseen una plasticidad de diferenciación que excede a su tejido de origen [8]. El término plasticidad se refiere a la capacidad de una célula troncal de un tejido específico para dar origen a células de otros tejidos.

#### 1.2 Células troncales embrionarias

Posteriores investigaciones con carcinoma embrionario (*Embryonal Carcinoma*, o EC) de ratón, llevaron a la obtención de células troncales embrionarias (*Embryonic Stem Cells*, o ESC) directamente de la Masa Celular Interna (*Inner Cell Mass*, o ICM) de blastocistos de ratones por Martin Evans en 1981 [9,10], y finalmente de blastocistos humanos por James Thomson en 1998 [11,12].

Las ESC, que son capaces de dar origen a todos los distintos fenotipos celulares que componen a un organismo adulto, presentan tres características principales: 1) Se derivan de embriones en etapa de pre-implantación; 2) proliferan por tiempo indefinido manteniéndose indiferenciadas; y 3) conservan en forma estable su potencial para generar elementos de las tres capas germinales embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) aún después de cultivos prolongados (ver Figura 1). Entre sus principales características se incluyen poseer un núcleo celular grande con un citoplasma pequeño, crecer rápidamente en colonias compactas, poseer una alta actividad de telomerasa y presentar un cariotipo normal [7].



Figura 1. Origen de las Células Troncales Embrionarias (ESC) y ejemplos de su diferenciación a distintos tipos celulares. Modificado de [13].

El entendimiento de los circuitos regulatorios transcripcionales responsables de la pluripotencia y autorrenovación de las ESC es fundamental para comprender el desarrollo embrionario temprano y el potencial terapéutico de estas células. Se han identificado reguladores muy importantes de la pluripotencialidad, entre los que destacan Oct4, Nanog (dos factores de transcripción homeodominio) y Sox2, los cuales forman un círculo de retroalimentación positiva entre ellos, además que comparten muchos de los genes a los que regulan.

Estas proteínas desempeñan un papel central en la regulación transcripcional que especifica la identidad de las ESC, debido a sus patrones de expresión y sus roles esenciales durante el desarrollo temprano [14] (ver Figura 2). Uno de estos reguladores, Oct4 (llamado también Oct3/4 y POU5F1), es un factor de transcripción de la familia POU en mamíferos, indispensable para el mantenimiento de la pluripotencialidad en las células internas del blastocisto y además para la señalización de un factor parácrino de crecimiento (FGF-4) que es necesario para la proliferación de las células del trofectodermo [15]. También juegan un papel importante en este circuito transcripcional los genes conocidos por su contribución a la carcinogénesis, tales como c-Myc y Klf4 [7].



Figura 2. Red regulatoria transcripcional en ESC humanas. En las columnas **A** y **B** se muestran genes que son regulados positiva- y negativamente, respectivamente. Editado de [14].

La red de genes puesta en marcha por estas proteínas de unión a ADN permite la expresión de genes asociados con la proliferación y la pluripotencialidad, e impide la expresión de genes que pueden causar diferenciación. Diversas vías de señalización están también involucradas en estos procesos: las vías de transducción de señales de TGF $\beta$  y WNT convergen en la inducción de los eventos moleculares que subyacen al estado indiferenciado [14].

La activación de SMAD2/3 (de la rama TGF $\beta$ /Activina/Nodal de la superfamilia de las Transforming Growth Factor  $\beta$ ) y la inhibición de SMAD1/5 (de la rama de las BMP de la misma superfamilia), son sucesos necesarios para la adqusición de la pluripotencia [16]. La vía canónica de Wnt contribuye además al mantenimiento de la pluripotencia, ya que el receptor Frizzled al activarse transduce una señal que inhibe a la glucógeno sintasa cinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ), lo que permite la translocación al núcleo de  $\beta$ -Catenina y activa a diversos genes río abajo que colaboran con la red de pluripotencia de los factores Oct4, Sox2 y Nanog [17].

Para que las células troncales embrionarias puedan crecer indefinidamente y mantener su estado indiferenciado *in vitro*, se utiliza en los cultivos una monocapa "alimentadora" formada por fibroblastos de ratón extraídos de embriones postimplantación de 14 días de gestación. Los fibroblastos producen factores solubles que promueven el mantenimiento de las células de la ICM en estado pluripotencial y con proliferación ilimitada [7,18]. Cuando se descubrió que el factor inhibidor de leucemia (Leukemia Inhibitory Factor, o LIF) era el principal componente segregado por los fibroblastos para mantener el estado indiferenciado de las ESC, se logró el mantenimiento de ESC de ratón sin el uso de la monocapa alimentadora [19]. LIF, un miembro de la familia de Interlecuina-6 (IL6) se une al receptor de LIF (LIFR) y promueve la fosforilación de Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3), el cual dimeriza y se transloca al núcleo para activar una serie de genes río abajo que reprimen diferenciación [17].

Una prueba directa de pluripotencia requiere que las células expresen proteínas –llamadas marcadores– asociadas a la autorrenovación y a mantener el estado indiferenciado. Estas proteínas incluyen a los factores ya antes mencionados como Oct4, Nanog y Sox2, a otros como la fosfatasa alcalina citoplásmica y marcadores de superficie como los antígenos embrionarios de etapa-específica (Stage-Specific Embryonic Antigen, o SSEA) SSEA-3 y SSEA-4, así como los antígenos de reconocimiento de tumores (Tumor Recognition Antigen, o TRA) TRA-1-60 y TRA-1-81. La expresión de estos marcadores de superficie de pluripotencia es analizada por inmunocitoquímica y/o citometría de flujo [20].

En el caso de las ESC humanas, el factor LIF no tiene el efecto de lograr la supervivencia de las células; en su lugar, se ha encontrado que el Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (Fibroblast Growth Factor-2, ó FGF-2) cumple esta función. FGF-2 es también un factor crítico en la proliferación celular en la retina, telencéfalo, hipocampo, mesencéfalo y médula espinal del embrión [21]. Además, ya se han reportado métodos para la supervivencia y propagación de ESC humanas libres de capa alimentadora de fibroblastos, en los que se utilizan proteínas de la matriz extracelular (como Matrigel ©) como sustrato adherente [22].



Figura 3. Formas de evaluación de la pluripotencia. A Imagen de campo claro de una colonia de ESC humanas, con su morfología típica, sembrada sobre una capa de fibroblastos. B Marcaje de inmunocitofluorescencia que muestra la expresión nuclear de Oct4 en una colonia de ESC. Escala: 100 μm. C Ensayo de formación de teratomas en ratones "desnudos" (con deficiencias en el sistema inmunológico); al trasplantar ESC subcutáneamente en estos ratones se forma un teratoma después de 1-2 semanas. Cartílago (C), epitelio (Ep) y tejido conectivo (TC). D Ratones quiméricos obtenidos por inyección de ESC de una cepa de ratones con pelaje obscuro en blastocistos de otra cepa de ratón que tiene pelaje blanco. A, B, C y D fueron obtenidos de [18, 22, 7 y 23], respectivamente.

Pruebas más estrictas para determinar si una célula es pluripotente consisten en probar si la célula y su progenie contribuyen en la formación de un organismo. ESC murinas son transferidas a un embrión de ratón en etapa pre-implantación, en el que las ESC se incorporan a la ICM del blastocisto y generan ratones quiméricos tanto en células somáticas como germinales [24]. En el caso de las ESC humanas no se puede realizar esta técnica por razones éticas y prácticas. El estándar utilizado para evaluar la pluripotencia de células humanas es su capacidad de generar teratomas con tejidos diferenciados de las tres capas germinales tras ser inyectadas en ratones inmunodeprimidos. Las células pluripotenciales deben, además, poder responder a una diferenciación dirigida *in vitro* a algún tejido o linaje celular específico [25] (ver Figura 3). Por lo tanto, las ESC proveen de un sistema *in vitro* invaluable para la identificación experimental y caracterización de los factores que controlan el crecimiento embrionario temprano y la diferenciación celular.

#### 1.3 iPSC

Una gran controversia se ha generado en la comunidad por la derivación y el uso de células embrionarias humanas, pues para ello se interrumpe el desarrollo de un embrión que tiene la potencialidad de convertirse en un individuo. En 1952 se demostró que las células somáticas de vertebrados pueden ser reprogramadas a un estado embrionario por la transferencia de su contenido nuclear a ovocitos a los que previamente se les ha retirado el núcleo. Este suceso promovió la búsqueda de los factores que participan en el proceso de reprogramación, con miras al desarrollo de una metodología que permitiera obtener células con las características de las embrionarias pero sin la necesidad de utilizar un óvulo ni de formar un embrión humano [7].

En 2006, los científicos japoneses Yamanaka y Takahashi reportaron un procedimiento para reprogramar células somáticas a un estado pluripotencial mediante la expresión de factores transcripcionales. Dichas células, que presentaban características similares a las células troncales embrionarias, se les denominó *induced Pluripotent Stem Cells*, o iPSC [26]. Para generar iPSC se utilizaron fibroblastos de ratón (tanto embrionarios como de adultos) en los que se indujo la expresión de solamente cuatro genes exógenos: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM) para reprogramarlos a un estado pluripotencial. Este procedimiento se realizó por transducción mediada por retrovirus (ver Figura 4), tras la cual se obtuvieron líneas celulares con el potencial de diferenciarse en distintos linajes celulares.

Poco después de haber logrado la reprogramación de células de ratón, un procedimiento similar para reprogramar fibroblastos humanos a iPSC fue reportado por el mismo grupo de investigación [27]. En dicho procedimiento se utilizaron los mismos 4 factores exógenos para inducir la pluripotencia, aunque se realizaron algunos cambios con respecto a la reprogramación de células de ratón. Uno de estos cambios es el uso de FGF-2 en lugar de LIF para promover y mantener el estado indiferenciado.

Se ha reportado también la reprogramación de fibroblastos humanos con los factores Nanog y Lin28, en vez de Klf4 y c-Myc (este último factor es un oncogen que está asociado a carcinogénesis en posteriores aplicaciones terapéuticas) [28]. Además, en este último procedimiento de reprogramación se utilizaron lentivirus, que son un tipo de retrovirus capaces de infectar células mitóticamente inactivas. Los lentivirus pueden infectar una mayor variedad de tipos celulares que el resto de las categorías de retrovirus, que sólo pueden infectar células que se encuentren en división celular.



Figura 4. Representación del método de reprogramación de Yamanaka. Modificado de [29].

Análisis genéticos de las iPSC obtenidas por el grupo de Yamanaka mostraron que estas células presentaban muchas similitudes con las ESC, incluyendo un patrón de expresión genética bastante parecido. Sin embargo, una firma recurrente de expresión genética aparece en las iPSC, la cual parece provenir del estado previo de la célula somática que fue usada para la reprogramación

(llamada "memoria epigenética") y sin importar el método que se utilice para ello [30]. Esta memoria epigenética se ha observado en los patrones de metilación de ADN.

Las ESC presentan como característica distintiva una baja proporción de metilación en los residuos de citosina de nucleótidos CpG en la región promotora de genes (una alta metilación se correlaciona usualmente con represión transcripcional). Si el nivel de metilación de ADN en una región de un gen es significativamente diferente entre dos genomas que se están comparando, se le conoce a esta zona como región diferencialmente metilada (DMR, por sus siglas en inglés). Un análisis a escala global de genoma encontró 71 DMR entre tres líneas de iPSC y tres líneas de ESC. Casi la mitad de las DMR muestran una reprogramación epigenética incompleta del genoma de la célula diferenciada de origen [31].

Otras características epigenéticas que poseen las ESC son una cromatina permisiva, bajos niveles de heterocromatina y alta frecuencia de dominios bivalentes [32]. Estos dominios bivalentes se encuentran en genes involucrados en la diferenciación, los cuales permanecen silenciados. Sin embargo, al tener dichos genes una estructura permisiva de cromatina, son sensibles a señales inductoras de diferenciación, lo que los convierte en áreas reguladoras de las células pluripotenciales. Diferencias en el estado de metilación de ADN de estos dominios bivalentes entre iPSC y ESC, que se relacionan con la memoria epigenética descrita anteriormente, sugieren la existencia de importantes barreras epigenéticas impuestas durante la diferenciación. Presentes probablemente para preservar la identidad de la célula, estas barreras necesitan ser superadas para lograr una reprogramación completa de vuelta al estado pluripotencial [33].



Figura 5. Eventos críticos durante la reprogramación. Los procesos 1, 2 y 3 son explicados debajo de este texto. Modificado de [33].

Los eventos críticos para la reprogramación se resumen a continuación (ver Figura 5):

1. - Las células transducidas que sobreviven al estrés, apoptosis y senescencia replicativa causadas por el método de reprogramación muestran marcaje para fosfatasa alcalina y SSEA-1 (en ratones, o SSEA-3 y -4 en humanos). En esta etapa, de 5 a 7 días post-transducción, las células pueden autorrenovarse pero dependen de la expresión de los transgenes.

2. - Una segunda etapa de reprogramación se caracteriza por la activación de los genes endógenos de pluripotencia (Oct4, Sox2, Nanog). La célula mantiene su autorrenovación de manera independiente de los transgenes. Esta etapa se alcanza a los 10-12 días tras la transducción.

3. - Tras la reactivación de la red de pluripotencia, varias divisiones celulares pueden necesitarse para borrar la memoria epigenética de la célula, lo que se caracteriza por la desaparición de metilación de ADN en los dominios bivalentes. El restablecimiento correcto de estos dominios es un determinante crítico de la calidad de las células reprogramadas [33].

El método de reprogramación con retrovirus presenta un importante problema: la integración del vector viral y de los transgenes al genoma de la célula, lo que puede producir

mutaciones insercionales que interfieran con su funcionalidad. De igual manera, una expresión residual de los transgenes puede influir en la diferenciación hacia un linaje específico (o por el contrario, impedir la diferenciación) [34] o resultar en la formación de tumores [35].

Se han desarrollado diversos métodos para la generación de iPSC libres de integración genómica, entre los que se encuentran el uso de adenovirus, virus Sendai, introducción directa de proteínas, mRNA sintético y vectores episomales [36,37,38,39,40]. Sin embargo, la utilización de estos métodos suele rendir una eficiencia muy baja (<0.01% para adenovirus e introducción directa de proteínas en fibroblastos dermales), aún menor que con la utilización de retrovirus (alrededor de 0.1%). Algunos de estos métodos, como la introducción de mRNA y la modificación de virus Sendai, han resultado en eficiencias de reprogramación mayores (que llegan hasta el 1%). Desgracidamente, estos procedimientos son técnicamente demandantes y requieren de mucho más tiempo de trabajo [35,41,42]. En la Tabla 1 se muestra una comparación entre las diversas características antes mencionadas de los principales métodos de reprogramación.

Tipo de método	Integ	rativo	Removible	No integrativo		Libre de ADN exógeno	
Tipo de vector	Retroviral	Lentiviral	Transposón	Adeno- virus	Plásmidos	Proteína	ARN
Tipos celulares	Fib, Quer, NSC, Hep, Sang, DP, entre otros	Fib, Quer	Fib	Fib, Quer	Fib, DP	Fib	Fib
Eficiencia	0.02 - 0.5 %	0.1 - 1 %	0.01 %	<0.001 %	0.01 - 0.05 %	0.002 %	0.5 - 4 %
Ventajas	Buena eficiencia	Buena eficiencia	Buena eficiencia, sin integración	Sin integra- ción	Sin integra- ción	Sin integra- ción, sin ADN	Sin integra- ción, buena eficiencia
Desven- tajas	Integra- ciones múltiples	Integra- ciones múltiples	Pueden quedar restos de secuencias	Baja eficiencia	Baja eficiencia	Baja eficiencia	Rondas múltiples de trans- fección

Tabla 1. Comparación entre diversos métodos usados para la reprogramación de células somáticas a un estado pluripotencial. Fib: Fibroblastos, Quer: Queratinocitos, NSC: Célula Troncal Neural, Hep: Hepatocitos. Sang: Células sanguíneas, DP: Células de la Pulpa Dental. Editado de [35,42].

Una manera de mejorar sustancialmente la eficiencia de la reprogramación es la inhibición de la vía del conocido gen supresor de tumores p53 [43]. Tanto el uso de fibroblastos de ratón *knockout* para p53, así como el incluir un ARN interferente para dicho gen en el coctel de reprogramación retroviral (OSKM), han logrado elevar la eficiencia de este procedimiento hasta en un 20%, o en un 10% utilizando sólo los factores Oct4, Sox2 y Klf4. Incluso se han reprogramado células T de ratón (las cuales son células terminalmente diferenciadas que presentan una mayor dificultad para transformar a iPSC) utilizando un short hairpin RNA (shRNA) para p53 [44].

Los hallazgos anteriores, junto con el hecho que el uso del factor c-Myc promueve notablemente la generación de iPSC, señalan una probable relación entre los mecanismos involucrados en la pluripotencia y en el cáncer [43]. Además, el uso de c-Myc entre los factores de reprogramación incrementa la formación de tumores en los ratones quiméricos derivados de iPSC. En contraste con ello, el grupo de Yamanaka ha encontrado que otro miembro de la familia de genes Myc que tiene casi nula actividad transformante –en específico L-Myc– promueve con mayor eficiencia la producción de iPSC sin la indeseada formación de tumores que produce c-Myc [45]. En este hallazgo se atribuye el efecto de las proteínas Myc en la formación de iPSC principalmente a la supresión de genes de diferenciación expresados en fibroblastos y no en células pluripotentes. El efecto tumorigénico está asociado a la activación de genes enriquecidos en células proliferativas, por lo que la acción de mejorar la eficiencia de reprogramación y la acción tumorigénica son probablemente procesos independientes.

Recientemente se han reportado mayores avances en los métodos de reprogramación no integrativos, entre los que destaca el uso de plásmidos episomales. Estos métodos tienen la ventaja de no requerir una manipulación excesiva como la que conllevan los métodos que utilizan proteínas o ARN. Para incrementar la eficiencia de reprogramación, se han utilizado los hallazgos ya mencionados de silenciar p53 y utilizar L-Myc en vez de c-Myc. Otra estrategia que ha logrado incrementar dicha eficiencia es el uso de vectores virales derivados del virus Epstein-Barr (EBV). El EBV es uno de los replicones extracromosómicos más eficientes que infectan a células de mamíferos [46]. Al no integrarse a la célula hospedera, el promotor viral EBNA-1 (Epstein-Barr Nuclear Antigen) se va silenciando con el paso de las rondas de división celular. La pérdida de los episomas derivados de vector viral –a una tasa de ~5% por ciclo celular debido a defectos en la síntesis vectorial y en la partición– permite que se vayan removiendo los vectores episomales de las iPSC así obtenidas sin la necesidad de manipulación adicional [39].

Se ha reportado el uso del método de electroporación para la transfección transitoria y estable de diversos tipos celulares, tanto en células de ratón como humanas. Diversos métodos comerciales basados en liposomas, con Lipofectamine siendo el más utilizado, también se han descrito. Recientemente, un método basado en electroporación llamado *Nucleofection* (o nucleofección) en el que una combinación de una solución específica y parámetros eléctricos específicos logran la introducción de ADN plasmídico en el núcleo de la célula, resulta en una más eficiente expresión genética [47]. Este método de nucleofección obtiene un incremento de 10 a 20 veces en la eficiencia de transfección transitoria comparado con otros métodos de electroporación y de lipofección [48].

Las células troncales pluripotenciales inducidas humanas (hiPSC, por sus siglas en inglés) han sido generadas a partir de diferentes tejidos, con la edad del donante, la fuente de tejido y el tipo celular específico como factores que influyen en el proceso de reprogramación. Se obtiene una mayor eficiencia de reprogramación entre menos diferenciado sea el tipo celular de origen [34]. Las hiPSC son una fuente prometedora de células que se pueden utilizar en terapia regenerativa, pues al poder originarse de células somáticas del propio paciente, se evitan los problemas de rechazo que se presentan al transplantar células o tejidos provenientes de organismos distintos al paciente. Dichas células se pueden utilizar para el estudio de enfermedades humanas y también como modelos *in vitro* para desarrollar medicamentos específicos, y en el largo plazo como posible tratamiento individualizado de diversas enfermedades.

#### 1.4 Aplicación de iPSC: Diferenciación a neuronas dopaminérgicas

El establecimiento de las hESC ha provocado un gran interés tanto en la comunidad científica como en la sociedad en general, con respecto a su potencial en terapias regenerativas. Estudios en modelos animales han mostrado que el transplante de ESC puede tratar satisfactoriamente los síntomas de diversas enfermedades crónicas, como la enfermedad de Parkinson, diabetes, lesión traumática de la médula espinal, fallo cardiaco o hepático, y osteogénesis imperfecta [17].

Diversos protocolos se han desarrollado para diferenciar ESC en una variedad de linajes celulares como neuronas, adipocitos, miocitos esqueléticos, células hematopoyéticas y cardiomiocitos. Una de estas enfermedades crónicas descritas, la enfermedad de Parkinson (*Parkinson's Disease*, o PD) es un transtorno neurodegenerativo progresivo, causado principalmente por la muerte de neuronas dopaminérgicas (DA) de la vía nigroestriatal del mesencéfalo ventral

(VM). Se ha demostrado que estudios de trasplantes de neuronas humanas diferenciadas tanto de ESC como de iPSC pueden tratar satisfactoriamente las deficiencias en modelos animales de la enfermedad de Parkinson [7,49,50]. Existen además indicios que la terapia de reemplazo celular con neuronas VM DA fetales puede ser benéfica para pacientes con PD [51].

Se han descrito varios métodos para diferenciar células troncales pluripotenciales a neuronas dopaminérgicas [20,52]. En general, los protocolos de diferenciación buscan imitar (aunque sea de una forma limitada o más simple) los procesos moleculares que suceden durante el desarrollo embrionario. La inducción neural de células pluripotenciales *in vitro* da origen al neuroepitelio a través de dos categorías de métodos: 1) Co-cultivar hESC (o iPSC; se referirá ahora a cualquiera de ellas como *Pluripotent Stem Cells*, o PSC) con células estromales, como HepG2, MS5 y PA6, lo que ayuda a promover la diferenciación hacia progenitores neurales [20,53].

2) La otra categoría de métodos involucra la separación de las PSC de las células alimentadoras y posterior agregación en condiciones no adherentes para formar cuerpos embrioides [54]. Para promover la diferenciación neural e inhibir las otras capas germinales, los cuerpos embrioides son transferidos a un medio neural, en el cual crecen en suspensión formando neuroesferas. Tras al menos 7 días de diferenciación, se observa la aparición de células organizadas en columna, llamadas rosetas neurales. Las rosetas neurales son células neuroepiteliales primitivas (asemejan al tubo neural en el desarrollo embrionario) que maduran después de otros 4-7 días [55]. Estas células son positivas para los marcadores de precursores neurales PAX-6, Sox1, Sox2 y Nestina. En la Figura 8 se muestran las principales etapas de estos dos tipos de métodos.

Células de rosetas neurales maduras son aisladas, se siembran en platos de cultivo recubiertos con laminina y pueden diferenciarse posteriormente en neuronas, astrocitos u oligodentrocitos, dependiendo de los factores de crecimiento que le sean agregados [54]. En la Figura 6 se representa el proceso de diferenciación del linaje neural que sucede durante el desarrollo embrionario, que es el modelo a partir del cual se basan los métodos aquí descritos.



Figura 6. Derivación del linaje neural a partir de una célula troncal neural (Neural Stem Cell, o NSC), así como los marcadores más representativos para cada población. PAT: Progenitor de Amplificación Transitoria. Obtenido de [7].

En años recientes se ha desarrollado un tercer método para la diferenciación neuronal de PSC, mediante la acción de dos inhibidores de la vía de señalización SMAD (Noggin y SB431542). En este método varios mecanismos contribuyen en la inducción de las células pluripotenciales hacia un destino neural. El compuesto SB431542, el cual es un inhibidor de la vía TGFβ/Activina/Nodal (por medio del bloqueo de la fosforilación de los receptores ALK4, ALK5 y ALK7), desestabiliza la vía de pluripotencia mediada por Nanog y Activina mencionada anteriormente [16]. Además, la inhibición de la vía de Activina suprime también la inducción de destino mesendodermal, por lo que al evitar que las células dirijan su diferenciación a linajes de mesodermo o endodermo, las induce hacia el linaje ectodermal.

La proteína Noggin bloquea la vía de BMP dentro de la superfamilia de las TGFβ, ya que interfiere con la activación de los receptores ALK2 y ALK3. La acción en esta vía es sinérgica con la acción recién descrita para SB431542, pues una vez dirigido el destino de las células hacia el linaje del ectodermo, promueve la neuralización dentro de dicho linaje. Por otra parte, la pérdida de la pluripotencia mediada por SB431542 está asociada a diferenciación hacia linaje trofoblástico, efecto que es suprimido por la represión de los niveles endógenos de BMP que ejerce la acción de Noggin

[53]. La molécula LDN193189, que tiene la misma actividad inhibitoria de BMP que la proteína Noggin, se ha usado en años más recientes para producir el mismo efecto [56]. En resumen, la inducción neural por inhibición dual de la vía de las SMAD se da en múltiples etapas durante la diferenciación, como se esquematiza en la Figura 7.



Figura 7. Mecanismos por los que SB431542 y Noggin (o LDN193189) contribuyen a la inducción neural de PSC (células troncales pluripotenciales). SNC: Sistema Nervioso Central, son células en cultivo que asemejan a células neuroectodermales. Editado de [53].

Durante el desarrollo embrionario, las células neuroectodermales se van posicionando en los ejes rostro-caudal y dorso-ventral del tubo neural, a la vez que se van diferenciando a sus respectivos linajes neuronales, dependiendo de los morfógenos que actúan en cada zona específica. El factor de crecimiento de fibroblastos 8 (Fibroblast Growth Factor 8, o FGF8) y la proteína Sonic Hedgehog (SHH) son dos moléculas importantes requeridas para la inducción de neuronas VM DA (dopaminérgicas del mescencéfalo ventral) [55]. SHH es una proteína expresada a lo largo de la parte ventral del tubo neural, mientras que FGF8 se expresa en el organizador del istmo (que es la frontera entre el mescencéfalo y el romboencéfalo). La acción conjunta de estas dos moléculas difundibles es crucial para la inducción de un fenotipo VM DA [57].

Otra molécula, la glicoproteína Wnt1 (expresada en el organizador del istmo y en el mescencéfalo en desarrollo), es también un regulador clave en la inducción de neuronas DA. Wnt1 está implicada en la regulación de la proliferación, supervivencia y posterior diferenciación de los precursores neurales dopaminérgicos. Se ha descrito que SHH, FGF8 y Wnt1 son importantes y suficientes para la diferenciación de neuronas VM DA [50]. La activación de Wnt1 se puede lograr con la supresión de GSK3B, un conocido inhibidor de la vía canónica de Wnt. Se ha reportado el uso de CHIR99021 como un potente inhibidor de GSK3B [56]. Una vez que las células han recibido todas

estas señales que las inducen a adquirir un compromiso neuronal VM DA, se requiere la presencia de factores que promuevan la maduración y supervivencia de las neuronas, como BDNF, GDNF y cAMP. El uso de otros factores como TGFβ3 (proteína que favorece la formación del mescencéfalo) y DAPT (inhibidor de la vía de Notch, el cual está involucrado en diferenciación glial) robustecen la supervivencia neuronal y su identidad dopaminérgica [52].

Protocolos que realizan la inhibición dual de SMAD logran una conversión neural rápida y eficiente de hESC y hiPSC bajo condiciones adherentes de cultivo, en donde hasta el 70% (en el caso de las ESC) del total de las células en dicho cultivo son neuronas dopaminérgicas [56]. Una correcta inducción a neuronas DA puede ser evaluada por la expresión de Tirosina Hidroxilasa (TH), la enzima limitante en la síntesis de dopamina [57]. La Figura 8 compara el esquema del protocolo de inhibición dual de SMAD con el de los dos principales métodos de diferenciación neuronal anteriormente mencionados (co-cultivo con células estromales y cultivo no adherente).



Figura 8. Clases principales de protocolos de diferenciación de células pluripotenciales a neuronas dopaminérgicas.

# 2. Justificación

La diferenciación a neuronas dopaminérgicas por medio de la inhibición dual de SMAD se ha usado en distintas líneas de hESC y hiPSC. Sin embargo, no se ha reportado el uso de este protocolo en iPSC reprogramadas por el método de plásmidos episomales que contienen, además de factores claves para inducir pluripotencia, un ARN interferente para p53. Por lo tanto, no se conoce con seguridad si líneas de iPSC obtenidas por el método de reprogramación ya mencionado son capaces de diferenciar a neuronas dopaminérgicas por medio del protocolo de inhibición dual de SMAD.

# 3. Hipótesis

La reprogramación de fibroblastos humanos con vectores episomales producirá células iPS que responderán al protocolo de diferenciación neuronal dopaminérgica que utiliza la inhibición dual de las proteínas SMAD.

## 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

El objetivo de este proyecto es la obtención de nuevas líneas celulares hiPSC a partir de fibroblastos humanos utilizando un conjunto de plásmidos episomales que expresen diversos factores de reprogramación (Oct-4, Sox2, Lin28, Klf4, L-Myc y un *short hairpin* RNA de p53), así como la diferenciación in vitro de estas líneas de hiPSC a neuronas dopaminérgicas a través de un protocolo de inducción neuronal que conlleva una inhibición dual de la vía de las proteínas SMAD.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Producir medio condicionado al incubar con fibroblastos embrionarios de ratón inactivados por radiación.

- Realizar la transfección de fibroblastos de prepucio humano con los tres plásmidos que contienen los factores de reprogramación por nucleofección para generar celulas iPSC.

- Realizar la caracterización de las iPSC obtenidas (inmunocitofluorescencia y RT-PCR para marcadores de pluripotencia, formación de teratomas en ratones inmunodeprimidos y cariotipo de las células obtenidas).

- Diferenciación de iPSC a neuronas dopaminérgicas por un método de inhibición dual de la vía de las SMAD.

- Evaluación de la expresión de marcadores de neuronas dopaminérgicas en las células diferenciadas obtenidas (inmunocitofluorescencia y RT-PCR).

## 5. Materiales y métodos

#### Obtención de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)

Los fibroblastos se obtienen de embriones de rata Winstar con 13.5 días de gestación. Para obtener los embriones, se sacrifica la rata preñada mediante dislocación cervical. Se desinfecta el abdomen con etanol 70%, se abre la pared abdominal y se extrae el útero, que se introduce en una caja de Petri con 50 ml de solución de Krebs. Se disecciona el útero con pinzas para sacar los embriones y se elimina la placenta con otras pinzas de disección. Se elimina la cabeza, el hígado y las vísceras de cada embrión para únicamente quedarse con la cavidad torácica. Ésta se pasa a otra placa con una solución de amortiguador de fosfatos (PBS) 1x donde se trocea lo más posible con las pinzas.

Los agregados celulares se disocian mecánicamente con una jeringa y se colocan en cajas de Petri de 100 mm previamente tratadas con gelatina al 0.1% (Sigma-Aldrich, USA). Los fibroblastos son mantenidos en estas cajas con medio DMEM alto en glucosa (Gibco, Carlsbad, CA) suplementado con 10% de Suero fetal bovino inactivado (SFB, Wisent, Quebec, Canada) y 0.5% de Penicilina/estreptomicina (Gibco, Carlsbad, CA). Los fibroblastos obtenidos directamente de los embriones se denominan fibroblastos pasaje 0 ó MEFs p0 (por sus siglas en inglés: *Mouse Embryonic Fibroblast*).

#### Pasaje celular de fibroblastos

Cuando los fibroblastos hayan alcanzado una confluencia cercana al 100% de la superficie donde están sembrados, se realiza su pasaje celular. Se lavan las cajas con PBS para quitar todas las células que no se hayan adherido. Se aspira el PBS, se coloca Tripsina al 0.05% (Gibco, Carlsbad, CA) y se incuba durante 5-8 minutos a 37 °C. La reacción de la Tripsina se detiene con medio con suero y se centrifuga la suspensión a 1200 rpm por 5 minutos. Se decanta el sobrenadante, el pelet se resuspende en 5 ml de medio y se realiza un conteo celular con azul de tripano en un hematocitómetro (Cámara de Neubauer).

Se distribuye el medio con las células en frascos T25 previamente tratados con gelatina al 0.5% y se mantienen con medio DMEM/SFB/antibiótico. Los fibroblastos subcultivados aumentan su número de pasaje, siendo este el pasaje 1 o MEF's p1. Se siembran de acuerdo a la Tabla 2:

Superficie de cultivo	Densidad	Volumen de medio	
Placas de 6 pozos	3.75 x 10 <sup>5</sup> células/pozo	3-4 ml	
T25	9.3 x 10⁵ células/frasco	7 ml	
T75	1.8 x 10 <sup>6</sup> células/frasco	15 ml	
T150	3.6 x 10 <sup>6</sup> células/frasco	30 ml	
T225	7.2 x10 <sup>6</sup> células/frasco	45 ml	

Tabla 2. Densidad celular y volumen de medio a utilizar dependiendo del tamaño de caja en la que sesiembren los fibroblastos.

#### Congelación de fibroblastos

El almacenamiento de los fibroblastos que no son utilizados se realiza en una solución de suero fetal bovino más 10% de dimetilsulfóxido (DMSO). Se coloca esta solución y los fibroblastos en un criovial de 1 ml (2-3 x 10<sup>6</sup> fibroblastos por vial) y se guardan en un contenedor Mr. Frosty<sup>™</sup> (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) con isopropanol, a -80 °C en un Congelador REVCO (Delca Científica, México, D.F.) el primer día de congelación para posteriormente almacenarlos en tanques de nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C.

#### Descongelación de fibroblastos

Los fibroblastos se descongelan en un baño húmedo a 37 °C. Antes de estar descongelados del todo, se pasan a un tubo de centrífuga de 15 ml, con 9 ml de medio DMEM, añadiendo las células lentamente. Se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos y se retira el sobrenadante. El pelet se resuspende en 5 ml de medio, se cuentan las células, y se siembran con medio DMEM/SFB/antibiótico en la superficie adecuada de acuerdo con la cantidad de fibroblastos que se descongelen.

#### Inactivación de fibroblastos por irradiación

Para inactivar las células, éstas son irradiadas con un irradiador GAMMA CELL 3000 Elan (Nordian, Canadá), que contiene un lápiz de Cesio 137. Los parámetros utilizados para irradiar las células son: 15 minutos, 12 segundos a 4000 rads. Una vez irradiadas las células, se decanta el sobrenadante y se resuspenden normalmente en 5 ml de medio nuevo para iniciar el recuento

celular que se realiza con la cámara de Neubauer. Las células irradiadas se congelan o se cultivan en cajas adherentes.

#### Preparación de medio condicionado

Se irradian fibroblastos humanos BJ1 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2522<sup>™</sup>) con el mismo procedimiento descrito anteriormente. Estos fibroblastos se utilizan para producir medio condicionado, el cual es fundamental para mantener las células troncales embrionarias humanas en Matrigel. Se siembran éstos en matraces T225 previamente tratados con gelatina al 0.5% y se deben mantener según el protocolo previamente descrito.

48 horas después de haber sembrado los fibroblastos, se sustituye el medio DMEM por medio Knockout-DMEM (KO-DMEM, Gibco) suplementado con 20% de remplazo de suero Knockout (KSR Gibco, por sus siglas en inglés: *Knockout Serum Replacement*), 0.2% de  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM (Gibco), 1% de L-glutamina 100x (Gibco) y 1% de aminoácidos no esenciales 100x (ANE Gibco). Se agrega diariamente 4 ng/ml de factor de crecimiento fibroblástico básico humano (bFGF humano recombinante, Peprotech, Rocky Hill NJ) por 7 días, durante los cuales se recupera el medio también diariamente y se filtra (0.22 µm) antes de almacenarlo a -80 °C.

#### Expansión de los plásmidos episomales.

Se utilizan los plásmidos pCXLE-hOCT3/4-shp53-F (Addgene Plasmid 27077), pCXLE-hSK (Addgene Plasmid 27078) y pCXLE-hUL (Addgene Plasmid 27080), además del plásmido que tiene el gen reportero GFP (pCXLE-EGFP, Addgene Plasmid 27082) (ver Figura 9). Estos plásmidos fueron donados por el Dr. Rodrigo López. Con dichos plásmidos se realiza la transformación de bacterias DH5α por medio de choque térmico (42°C por 30 seg, seguidos de 2 min en baño de hielo). Se les agrega medio SOC y se incuban por 1 hora (37°C y 225 rpm), tras lo cual se plaquean en cajas de agar con Ampicilina y se incuban de 12 a 16 horas (37°C sin agitación).

El plásmido se expande y se purifica por medio de QIAfilter<sup>™</sup> Plasmid Maxi Kit (purificación de plásmido de ADN basada en intercambio aniónico con clarificación de lisado bacteriano por filtración). Se cuantifica la concentración y pureza del plásmido por el espectrofotómetro UV-Vis Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA).



Figura 9. Vectores de expresión episomal utilizados. De izquierda a derecha son los plámidos pCXLE-hOCT3/4-shp53-F, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL. Resaltadas en negro se muestran las zonas del cDNA que codifican para los factores de pluripotencia. CAG: promotor híbrido formado por el enhancer de Citomegalovirus (CMV) y el promotor de la β-actina de pollo. OriP: origen de replicación. EBNA-1: Antígeno nuclear de Epstein-Barr. WPRE: Elemento Regulatorio Post-transcripcional del virus de hepatitis Woodchuck, usado para incrementar la expresión de los genes asociados. 2A: Secuencia que permite la traducción independiente de dos secuencias consecutivas. Obtenido de [35].

#### Generación de iPSC.

4 x 10<sup>5</sup> fibroblastos de prepucio de neonatos BJ1 (ATCC<sup>®</sup> CRL-2522<sup>™</sup>) en cultivo adherente son tripsinizados y resuspendidos en PBS 1x con 100 µl de solución Nucleofector: Amaxa<sup>®</sup> Human Dermal Fibroblast Nucleofector<sup>®</sup> Kit (Lonza, Basel, Switzerland) previamente suplementada. Se agregan 1-3 µg de cada plásmido a la suspensión, tras lo cual se transfiere a una cubeta del Kit, se inserta ésta en el electroporador y se selecciona el programa U-023 para alta eficiencia de transfección. Se retira la cubeta al finalizar el programa, se agregan 500 µl de medio para fibroblastos (DMEM/SFB/antibiótico, que debe estar a 37°C) y gentilmente (utilizando las pipetas del Kit) se transfiere la muestra a una placa de 6 pozos.

Cada dos días se cambia el medio, y al día 6 post-transfección se levantan las células de la superficie adherente con TrypLE<sup>TM</sup> 1x (Thermo Scientific) y se resiembran sobre una capa alimentadora de MEF's irradiados. Un día después se cambia el medio a Knockout DMEM suplementado con KSR,  $\beta$ -mercaptoetanol, L-glutamina, y ANE (descrito anteriormente en la obtención de medio condicionado) y bFGF humano. Se cambia el medio cada 2-3 días (dependiendo de la confluencia de las células).

#### Pasaje celular de las iPSC

Una vez que las células alcanzan una confluencia del 80-90%, o las colonias han alcanzado un tamaño relativamente grande y antes que empiecen a fracturarse y presentar huecos (o se comiencen a diferenciar las células), se realiza el pasaje celular. Se aspira el medio de cultivo del frasco y se coloca en el matraz 1-2 ml de solución de Colagenasa IV (Invitrogen<sup>™</sup>, USA) 0.7 mg/ml previamente calentada a 37 °C. Se incuba de 8-10 minutos a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Se aspira la colagenasa y se añaden 5 ml de medio de cultivo nuevo para detener la reacción de esta enzima.

Se levantan las colonias del cultivo adherente con ayuda de un Cell Scraper (Corning), realizando movimientos horizontales y verticales. El medio es recolectado con una pipeta y se disocia mecánicamente. El medio se distribuye en matraces T25 (en una proporción 1:3) previamente sembrados con MEFs irradiados (descongelados 48 horas antes), al cual se le aspiró el medio y se le agregó medio Knockout-DMEM suplementado; se agita el frasco suavemente para distribuir las células. Las células son incubadas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### Congelación de iPSC

Se levantan las colonias de la superficie adherente usando el protocolo de pasaje celular. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos, se retira el medio y se resuspenden las colonias en 500 µl de medio de congelación 1 (50% de SFB/50% KSR). Se añaden lentamente 500 µl de medio de congelación 2 (20% de DMSO y 80% de mezcla de congelación 1). Se coloca 1 ml de solución por criovial, que contiene las células provenientes de 1 T-25. Los crioviales se colocan en un contenedor Mr. Frosty<sup>™</sup> con isopropanol. Las células se congelan a -80 °C y a las 24 horas se cambian los viales a un contenedor de nitrógeno líquido a -196 °C.

#### Descongelación de iPSC

Se coloca el crioval que contiene las células en un baño húmedo a 37 °C para descongelarlas. Antes de estar descongeladas del todo, se pasan gota a gota a un tubo Falcon de 15 ml con 9 ml de medio KO-DMEM. Se centrifugan a 800 rpm durante 3 minutos y se retira el sobrenadante. Se resuspenden en 5 ml de medio KO-DMEM suplementado (como se describió anteriormente). Se distribuye el medio con las células en un matraz T25 y se etiqueta el frasco con el nombre de la línea, número de pasaje y fecha. Se realiza cambio de medio cada 2 días o diario si el medio se ve muy consumido.

#### Preparación de Matrigel

Se descongela el Matrigel (BD Biosciences, USA) a 4 °C durante toda la noche para evitar la formación de un gel. Se añaden 10 ml de medio KO-DMEM al frasco de 10 ml de matrigel y se mezcla

bien con una pipeta previamente enfriada. Se realizan alícuotas en tubos de 15 ml prerefrigerados, añadiendo 1 ml por cada tubo. Las alícuotas se almacenan a -20 °C.

#### Pasaje celular de iPSC a Matrigel

Una alícuota de Matrigel se descongelar durante toda la noche a 4 °C. Se realiza una dilución 1:10 de la alícuota de Matrigel con medio KO-DMEM. De esta dilución, se colocan 2 ml en un matraz T25 un día antes de realizar el pasaje celular, se sella el matraz y se almacena a 4 °C durante toda la noche. Antes de hacer el pasaje celular, se incuba el frasco o matraz durante una hora a temperatura ambiente, se retira el exceso de matrigel y se lavan los frascos con 2 ml de medio KO-DMEM. Para sembrar las células, se usa el protocolo de pasaje celular, modificando únicamente el medio que se usa para mantener las células, que en este caso es medio condicionado. Las células se incuban a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>.

#### Prueba de la Fosfatasa Alcalina

Se aspira el medio donde se encuentran las células y se lavan con PBS 1x. Se fijan las células con PFA (para-formaldehído) al 4 % por 20 minutos; posteriormente se retira el PFA, se lavan con PBS 1x y se incuban con Buffer 100 mM Tris por 10 minutos a temperatura ambiente. Después se retira el Buffer y se vuelven a incubar por 30 minutos con Buffer nuevo que contenga además los sustratos de la reacción: 5 mg/ml en H<sub>2</sub>O de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, Thermo Scientific), 7.5 mg/ml en dimetilformamida de NBT (Nitro blue tetrazolium, Sigma-Aldrich) y 10 mg/ml en H<sub>2</sub>O de Levamisol. Se retira el medio de la reacción y se lava con PBS.

#### Generación y extracción de teratoma

Para la formación de teratomas las células se mantuvieron en cultivo sobre un matraz T25 con Matrigel hasta que observó una confluencia del 90%. Las células se despegaron utilizando el protocolo de pasaje celular descrito anteriormente. Las células se lavaron en PBS 1x y se resuspendieron en PBS suplementado con 30% de una alícuota de Matrigel para un volumen final de 200  $\mu$ l. Se inyectaron 1 x 10<sup>6</sup> células en la parte dorso-lateral dentro del espacio subcutáneo de un ratón desnudo inmunosuprimido (nu/nu; CINVESTAV, MEX).

#### Perfusión, cortes histológicos de los teratomas y tinción con hematoxilina/eosina

Entre 6 a 8 semanas después de la inyección de las iPSC en el costado de los ratones desnudos, estos animales fueron sacrificados mediante una sobredosis anestésica (3 mililitros por 2.5 Kg de peso) de Pentobarbital sódico (Pfizer, MEX) y posteriormente se perfundieron con PBS 1x a 37 °C por vía intracardiaca con la ayuda de una bomba de perfusión (Cole-Palmer Instrument Company, Masterflex, USA). Una vez realizado este procedimiento los animales fueron fijados con para-formaldehído (PFA) al 4% disuelto en amortiguador de fosfatos 0.1 M a un pH de 7,4.

El teratoma se extrajo, se depositó en un frasco con PFA durante 24 horas y después se mantuvo en gradientes de sacarosa (10, 20, 30%, 24 horas en cada uno) para posteriormente realizar tinciones. Se embebió el teratoma en Tissue-Tek<sup>®</sup> (VWR<sup>®</sup>, Radnor PA, USA) para poder realizar cortes histológicos de 20 µm en un criostato (Leica, USA). Estos cortes se fijaron en laminillas y se mandaron al Laboratorio de Histología del IFC (División de Neurociencias, IFC UNAM) donde se tiñeron utilizando la técnica de tinción con hematoxilina/eosina. Posteriormente se guardan a 4 °C.

#### Diferenciación de iPSC a neuronas dopaminérgicas

Para realizar la inducción neural, se realiza primero el pasaje celular de iPSC a matraces T25 con Matrigel usando el método previamente descrito. La diferenciación se inicia cuando las células estén a una confluencia del 80-90%; en este momento se cambia el medio condicionado por medio KO-DMEM suplementado, y se cuenta como día 0 de diferenciación. Se exponen a las células a diferentes compuestos: LDN193189 (LDN), SB431542 (SB), Purmorphamine más SAG (agonistas ambos de la vía de SHH), FGF8 y CHIR99021 (activador de la vía canónica de Wnt) de acuerdo a la Figura 10.

Se va cambiando gradualmente el medio KO a DMEM-F12 suplementado con N2 desde el día 5. Al día 11 se cambia el medio a Neurobasal/B27 (medio especializado para la supervivencia de células neuronales) suplementado con CHIR99021 (o simplemente CHIR) (hasta el día 13) y con las siguientes moléculas: BDNF (*Brain Derived Neurotrophic Factor*), GDNF (*Glial cell line-Derived Neurotrophic Factor*), TGFβ3 (Transforming Growth Factor Beta 3), dibutiril cAMP, ácido ascórbico y DAPT. Al medio así preparado se le llama medio de diferenciación. Al día 20, se resiembran las células con medio de diferenciación en una caja de 6 pozos, previamente tratada con poli-ornitina (Sigma, USA) y fibronectina/laminina (Sigma, USA).



Figura 10. Protocolo de inducción neural, que en los primeros días combina la inhibición dual de SMAD (por SB431542 y LDN) y el uso de moléculas que inducen a un fenotipo VM DA (dopaminérgico del mescencéfalo ventral). Estas moléculas son: FGF8, dos agonistas de la proteína Smoothened (SAG y Purmorphamine) de la vía de SHH, y CHIR99021 (activador de la vía canónica de Wnt). Se va cambiando gradualmente el medio KO a DMEM-F12 suplementado con N2, (25 % al día 5, 50% al día 7 y 75 % al día 9). A partir del día 11, se les pone a las células medio de diferenciación, que consiste en medio Neurobasal suplementado con B27. Además, este medio de diferenciación contiene los siguientes factores: BDNF, GDNF, db-cAMP y ácido ascórbico, que promueven supervivencia y maduración neuronal. DAPT inhibe diferenciación glial. TGFβ3 promueve una identidad dopaminérgica. Basado en [56].

#### Ensayos de inmunocitofluorescencia.

Las células que van a ser utilizadas para los ensayos de inmunofluorescencia deben ser sembradas sobre cubreobjetos en los pozos donde se pone el Matrigel antes que sean cultivadas. Una vez que se ha llegado al día específico de diferenciación en el que se va a realizar este ensayo, se aspira el medio y se lava con PBS 1x durante 5 minutos, tras lo cual se fijan las células utilizando PFA al 4% durante 20 minutos. Las células son lavadas con PBS 1x y 0.1% de Albúmina de Suero Bovina (BSA, por sus siglas en inglés: *Bovine Serum Albumin*) para eliminar el PFA en exceso. Las células fueron incubadas por 1 hora en una solución de PBS con suero de cabra (Gibco, Invitrogen) al 10% y tritón (Sigma-Aldrich) al 0.3%. Posteriormente, se lavaron con PBS y 0.1% de BSA y se incubaron con anticuerpos primarios de acuerdo a la Tabla 3.

Los anticuerpos fueron incubados en una solución de PBS-suero de cabra al 1% por 24 horas a 4 °C. Después de la incubación, se retiró el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados en una solución de PBS con BSA al 0.1% para después ser incubadas con sus respectivos anticuerpos secundarios: anti-ratón (dilución 1:1000 en PBS-suero de cabra al 10%) acoplado a Alexa 488 (Invitrogen) y anti-conejo (dilución 1:1000 en PBS-suero de cabra al 10%) acoplado a Alexa 568

(Invitrogen). Se incuban durante 2 horas a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Las células son lavadas con PBS 1x y 0.1% de BSA y se incuban con colorante Hoechst (1 ng/ml; Sigma) por 5 minutos, se lavaron nuevamente con PBS 1x y se montaron en laminillas.

Anticuerpo primario	Especie	Dilución	Marca
Anti-Oct4	Ratón	1:250	BD Bioscience
Anti-SSEA4	Ratón	1:400	Abcam
Anti-Sox2	Conejo	1:500	Abcam
Anti-Nanog	Conejo	1:1000	Peprotech
Anti-Nestina	Ratón	1:800	Millipore
Anti-Vimentina	Conejo	1:100	Thermo
Anti-Tuj1	Ratón	1:1000	Covance
Anti-TH	Conejo	1:1000	Pel-Freez

Tabla 3. Anticuerpos utilizados para los ensayos de inmunocitofluorescencia.

#### **RT-PCR punto final y cuantitativa**

Para la técnica de Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR, por sus siglas en inglés) se extrae primero el ARN total de las células por medio el método de TRIzol<sup>®</sup> (Thermo Inc.), en el que las células son tratadas con este reactivo, seguido por adición de cloroformo, para separar el ARN del ADN y las proteínas. Después se realiza la reacción de la Transcriptasa Reversa, en la cual al ARN extraído anteriormente se le agrega una mezcla de dNTPs (desoxinucleotil-trifosfatos), primers aleatorios, un inhibidor de RNasas y la enzima con actividad transcriptasa reversa, para obtener el cDNA correspondiente.

Se realizó este procedimiento para obtener el cDNA de las iPSC y de las células diferenciadas a neuronas dopaminérgicas a los días 7, 14, 22 y 28 de diferenciación. Las secuencias que se utilizaron para la detección de cada transcrito de interés se describen en la Tabla 4. Todos los oligonucleótidos se colocaron en una concentración 10  $\mu$ M, añadiendo a cada reacción 100 ng de ADN molde, en un volumen final de 25  $\mu$ l.

El programa que se utilizó para los todos los oligos en la PCR punto final fue el siguiente: un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C durante 1 minuto, una temperatura de emparejamiento de los oligos de 66 °C (excepto para los oligos de TH, que fue de 62 °C) durante 1 minuto, y una temperatura de alargamiento a 72 °C durante 1 minuto, con un alargamiento final a 72 °C durante 1 minutos y un posterior mantenimiento de los tubos de reacción a 4 °C.

Las condiciones de amplificación para la PCR cuantitativa (qPCR), o PCR en tiempo real, fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización a 95 °C durante 5 minutos, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 10 segundos y una temperatura de emparejamiento de los oligos a 60 °C durante 30 segundos. Para la qPCR se utilizó el equipo StepOnePlus<sup>™</sup> Real-Time PCR System (Life Technologies, Thermo Scientific) y para analizar los datos se utilizó el software StepOnePlus Software v2.3.

Oligos	Secuencia	Fragmento		
Oct4 (and)	Fwd: CCCCAGGGCCCCATTTTGGTACC	142 pb		
Oct4 (end)	Rev: ACCTCAGTTTGAATGCATGGGAGAGC			
Oct4(pla)	Fwd: CATTCAAACTGAGGTAAGGG	122 nh		
Oct4 (pla)	Rev: TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG	172 hn		
Klf4 (and)	Fwd: ACCCATCCTTCCTGCCCGATCAGA	55 nh		
Kii4 (end)	Rev: TTGGTAATGGAGCGGCGGGACTTG	od cc		
Klf4 (plp)	Fwd: CCACCTCGCCTTACACATGAAGA	155 pb		
Kii4 (pia)	Rev: TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG	100 00		
Sov2 (end)	Fwd: TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA	79 nh		
50x2 (end)	Rev: TCACATGTGTGAGAGGGGGCAGTGTGC	75 00		
Sov2 (nla)	Fwd: TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA	110 ph		
50x2 (pia)	Rev: TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT	110 pb		
L-Myc (end)	Fwd: GCGAACCCAAGACCCAGGCCTGCTCC	142 nh		
L-IVIYC (EIIU)	Rev: CAGGGGGTCTGCTCGCACCGTGATG	142 00		
L-Myc (pla)	Fwd: GGCTGAGAAGAGGATGGCTAC	121 nh		
L-IVIYC (pia)	Rev: TTTGTTTGACAGGAGCGACAAT	121 hn		
LIN28 (end)	Fwd: AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC	128 pb		
	Rev: TCAATTCTGTGCCTCCGGGAGCAGGGTAGG			
IIN28 (n z)	Fwd: AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC	250 nh		
LINZO (pid)	Rev: TAGCGTAAAAGGAGCAACATAG	200 pb		

GAPDH	Fwd: ACCACAGTCCATGCCATCAC	119 ph
	Rev: TCCACCACCCTGTTGCTGTA	440 hn
тн	Fwd: GTCCCCTGGTTCCCAAGAAAAGT	222 nh
	Rev: TCCAGCTGGGGGGATATTGTCTTC	552 pu
β-Actina	Fwd: TGAGGTAGTCAGTCAGGTCC	165 pb
	Rev: GCTATCCAGGCTGTGCTATC	nd cot

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos para las reacciones de PCR. End: transcrito endógeno, pla: transcrito proveniente del plásmido episomal.

# 6. Resultados

Cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón e inactivación para producir medio condicionado y para usarlos como capa alimentadora.

Con la intención de obtener una capa adherente que soportara el mantenimiento y crecimiento de las células troncales pluripotenciales, se realizó el cultivo y posterior inactivación (por radiación) de fibroblastos embrionarios de ratón. A partir de éstos se obtuvo también medio condicionado para cultivar hiPSC en condiciones libre de capa alimentadora. La Figura 13 muestra la morfología de los fibroblastos cultivados e inactivados.



Figura 11 .Imagen de microscopía en campo claro de fibroblastos embrionarios de ratón irradiados, que muestra su morfología característica. Aumento: 10x.

# Expansión de los 3 plásmidos que contienen los factores de reprogramación así como del plásmido con la proteína GFP como reportero en bacterias competentes

Los plásmidos episomales fueron expandidos por transformación de bacterias competentes. Posteriormente fueron purificados y cuantificados por espectrofotometría. Se realizó una amplificación por PCR de los plásmidos expandidos, en la que se utilizaron oligonucleótidos que incluyen un fragmento del plásmido junto a un fragmento de los genes de reprogramación. Posteriormente se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa para visualizar el resultado de la PCR y así poder comprobar la presencia de los transgenes de reprogramación en los vectores episomales expandidos (ver Figura 12).



Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (3%) tras la PCR de los plásmidos expandidos, que muestra la amplificación de secuencias de ADN contenidas en los transgenes. Pla: transcrito proveniente del plásmido. Se usó GAPDH como control positivo. Los números debajo de cada columna indican el tamaño (en pares de bases) del fragmento amplificado esperado para cada par de oligonucleótidos. En el carril de la derecha se muestra la escalera molecular de 100 pb como comparación, donde los números indican la cantidad de pares de bases pertenecientes a algunos fragmentos de dicha escalera.

# Transfección de fibroblastos de prepucio humano con los plásmidos por nucleofección para lograr la reprogramación celular a iPSC.

Fibroblastos humanos BJ1 fueron reprogramados utilizando plásmidos episomales según el método de Okita *et al.* [35]. Durante los primeros días después de la transfección, se observa una alta proporción de células que no sobreviven al procedimiento. Después de 6 días de iniciado el experimento, se observa la aparición de algunos cúmulos cuyas células tienen un aspecto más redondo y de menor tamaño que el que tienen los fibroblastos. Con el paso de los días, los cúmulos observados siguieron creciendo en el número de células que contenían. A partir de 12-14 días post-transfección, los cúmulos celulares comienzan a parecer colonias con clara morfología tipo hESC, las cuales se siguieron cultivando por lo menos hasta el pasaje 25 sin que se viera afectada su morfología (ver Figura 13).



Figura 13. Imágenes de microscopía en campo claro de diferentes días del proceso de reprogramación, en donde se observa el cambio morfológico de los fibroblastos a células tipo pluripotentes que se agregan formando colonias. Aumento: 10x.

Para comprobar la expresión transitoria de los plásmidos en los fibroblastos transfectados, se observó la expresión del gen reportero GFP en un microscopio de fluorescencia a diferentes tiempos después de la transfección. A partir del Día 1 post-transfección se observa que la mayoría de los fibroblastos que sobreviven a las condiciones del proceso de electroporación muestran marca de la expresión de GFP. La intensidad de la señal de GFP se mantiene en los fibroblastos durante dos semanas después de la transfección, aun cuando estos van cambiando su morfología en este lapso. Después de este tiempo (aproximadamente, a partir del día 14 post-transfección) la intensidad de la señal de GFP comienza a disminuir, hasta que hacia el día 21 post-transfección deja de ser detectable (ver Figura 14).

La morfología que han adoptado las colonias celulares formadas, así como su expresión transitoria del gen reportero GFP, indican que el proceso de reprogramación ha iniciado en las células transfectadas que sobrevivieron al proceso, que muestran ahora claros signos de ser células con apariencia pluripotencial.



Figura 14. Expresión transitoria del gen reportero GFP en las células transfectadas con los plásmidos episomales. Durante el primer par de semanas posteriores a la transfección (en la imagen se muestra el día 6 post-transfección) la marca de GFP es intensa en muchas de las células presentes. Esta intensidad disminuye con el paso de los días, hasta que después de la tercera semana (en la imagen se muestra el día 22 post-transfección) no se observa ya la marca de GFP. Del lado izquierdo se observan las imágenes en microscopía de campo claro, mientras que del lado derecho se observa el mismo campo pero utilizando microscopía de fluorescencia, donde la señal verde observada corresponde a la señal de GFP. Aumento de todas las imágenes: 10x.

Pruebas de pluripotencia de las iPSC obtenidas (inmunocitofluorescencia de marcadores de pluripotencia, RT-PCR, formación de teratomas en ratones inmunodeprimidos, cariotipo de las células obtenidas).

Se realizó una prueba para marcaje de Fosfatasa Alcalina, un indicador temprano de pluripotencia [58], en las células reprogramadas a 28 días post-transfección. En la Figura 15 se puede observar la superficie de cultivo donde se realizó la reprogramación, y las colonias celulares que dieron un marcaje positivo para la prueba. Para estimar la eficiencia de reprogramación se realizó un cálculo considerando el número inicial de fibroblastos humanos electroporados y el número de colonias positivas a fosfatasa alcalina resultante después de 28 días. Se ha reportado que cada colonia se forma por un evento de reprogramación, es decir, las colonias tienen un origen clonal. El resultado de este análisis fue que el 0.04% de células fueron reprogramadas al estado pluripotencial.



Figura 15. Colonias de células que resultaron positivas para la prueba de Fosfatasa Alcalina, un marcador temprano de pluripotencia, a 28 días post-transfección. La escala se observa en la imagen (20mm).

Se aislaron 58 clonas que se siguieron cultivando en MEF y algunas sufrieron diferenciación espontánea o se perdieron. Con 4 de ellas se realizaron más pruebas para corroborar la pluripotencia. A estas clonas las nombramos clona 1, clona 2, clona 3 y clona 4. Se llevaron a cabo inmunotinciones de estas células con anticuerpos para los siguientes marcadores de pluripotencia: Oct4, Sox2, Nanog y SSEA4. Estas células (las cuatro clonas) presentaron marca positiva para dichas proteínas, como se observa en la Figura 16 (la cuales se analizaron a un pasaje 4).



Figura 16. Ensayos de inmunocitofluorescencia que muestran marcaje positivo para proteínas asociadas a pluripotencia (Sox2, Oct4, Nanog y SSEA4) en las células reprogramadas. A: Las células obtenidas por la técnica de reprogramación presentan marca positiva desde pasajes tempranos (pasaje 4). B: Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), que se utilizaron como capa alimentadora sobre la que se cultivaron las

células reprogramadas, no muestran marcaje para dichas proteínas (en esta imagen, se muestra para Sox2). Se utilizó colorante Hoechst para marcar los núcleos celulares. El aumento es el mismo para todas las imágenes y la escala se muestra en ellas (450 μm).

Para determinar la presencia o ausencia de los transcritos de los factores de pluripotencia en las células reprogramadas, se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa tras la Transcripción Reversa (RT-PCR) de extractos de ARN de dichas células. Para poder apreciar la diferencia en la expresión de los genes externos de la expresión de los genes endógenos se utilizaron sets de primers (oligonucleótidos) diferentes para cada uno de ellos. En las cuatro clonas analizadas se observó la expresión de la totalidad de los genes endógenos. Sin embargo, varios de los transgenes introducidos por la reprogramación todavía aparecían expresados en un pasaje temprano (pasaje 4), como se aprecia después de hacer una electroforesis en gel de agarosa tras la RT-PCR. En el gel de agarosa se observan las bandas provenientes de la amplificación de las secuencias pertenecientes a los transgenes para Sox2, L-Myc y LIN28, tal como se aprecia en la Figura *17*.



Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa (3%) tras la RT-PCR por punto final del extracto de ARN de las células reprogramadas de la clona 3, en la cual se observa la expresión de todos los genes endógenos asociados a pluripotencia y la expresión de algunos transgenes (Sox2, L-Myc y LIN 28) en el pasaje 4. End: transcrito endógeno, pla: transcrito proveniente del plásmido introducido. Los números debajo de cada columna indican el tamaño (en pares de bases) del fragmento amplificado esperado para cada par de oligonucleótidos. En la parte derecha de la figura se muestran los marcadores de peso molecular en pares de bases. Se usó GAPDH como control.

Con el propósito de verificar si los transgenes dejan de ser expresados en las células reprogramadas a pasajes más tardíos, se realizó el análisis de RT-PCR por punto final de estas células

al pasaje 17. Se observa que estas células conservan su morfología tipo-ESC; además, siguen expresando los factores endógenos asociados a pluripotencia. Estas células ya no expresan los transgenes plasmídicos, como se puede apreciar en la Figura *18*.



Figura 18. Electroforesis en gel tras la RT-PCR por punto final del extracto de ARN de las células reprogramadas de la clona 1 al pasaje 17, donde se observa que las células ya no expresan factores exógenos provenientes de los plásmidos de reprogramación. Los números debajo de cada columna indican el tamaño (en pares de bases) del fragmento amplificado esperado para cada par de oligonucleótidos. Se usó ADN de los diversos plásmidos episomales como controles positivos. En el carril de la derecha se muestran los marcadores de peso molecular con una escalera molecular de 100 pb.

Se realizaron estudios de cariotipo de las células obtenidas por reprogramación en el Laboratorio de Genética, Hospital Ángeles del Pedregal por la Dra. Maribel Cerrillo (como se puede apreciar en la Figura 19). Se encontró que en promedio, entre el 57.5% y el 100% de las clonas analizadas presentaban un cariotipo normal. El resto de las células, presentaban algunas alteraciones cromosómicas (aneuploidia, poliploidia o rompimientos cromosómicos). Se analizaron también los fibroblastos BJ1 que fueron las células que se reprogramaron, y del total de células analizadas un 95.2% presentó un cariotipo normal (observar Tabla 5).



Figura 19. Imagen del cariotipo normal de células reprogramadas de la clona 1 obtenida en el pasaje 8. Se analizaron 71 células, de las cuáles 57 (80.2 %) presentaron un cariotipo normal.

Células analizadas	Clona iPSC 1	Clona iPSC 2	Clona iPSC 3	Clona iPSC 4	Fibroblastos BJ1
Número de pasaje	8	7	7	8	9
Número de células analizadas por clona	71	23	40	50	87
Células con cariotipo normal (Porcentaje)	57 (80.3%)	15 (65.2%)	23 (57.5%)	50 (100%)	83 (95.4%)
Aberraciones presentadas (número de células)	Poli (12), div (1), romp (1)	Poli (5), div (2), gap (1)	Aneu (10), poli (4), romp (3)	Sin alteraciones	Aneu (1), poli (1), romp (2)

Tabla 5. Características del análisis de cariotipo de diversas clonas de iPSC obtenidas, así como de las células de las que se partió para la reprogramación (fibroblastos). Poli: poliploidia, aneu: aneuplodia, div: división alterada, romp: rompimientos cromosómicos, gap: brechas o gaps.

Para comprobar la pluripotencialidad de las células reprogramadas, se realizaron ensayos de formación de teratomas. Las células de solamente una de las clonas (clona 3) generaron un teratoma al ser inyectadas subdérmicamente en un ratón inmunocomprometido. El ratón fue sacrificado y perfundido, tras lo cual se retiró el teratoma y se fijó con p-formaldehído (ver Figura 20A). Se le hicieron cortes al teratoma (tras ser congelado a -20 °C) de 20 µm en un criostato, los cuales se montaron en laminillas y fueron posteriormente teñidos con Hematoxilina y Eosina. Estos cortes fueron observados al microscopio y se encontraron tejidos derivados de ectodermo (pseudo-rosetas neurales), mesodermo (músculo esquelético y adipocitos) y probablemente endodermo (zonas que parecen ser tejido glandular) (ver Figura 20B).



Figura 20. Formación de un teratoma por inyección de iPSC en ratones inmunocomprometidos. A) Células de la clona 3 inyectadas subdérmicamente en un ratón de la cepa nu/nu formaron un teratoma. Después de 11 semanas se sacrificó al ratón y se extrajo el tumor. B) Análisis histológico del teratoma, teñido con hematoxilina-eosina. Se observan tejidos derivados de las 3 capas embrionarias: células que asemejan rosetas neurales indican tejido ectodermal. Se observan células de músculo esquelético y adipocitos, que provienen del mesodermo. Zonas de células que parecen ser tejido glandular indican diferenciación hacia tejido endodermal. El aumento para cada imagen se indica debajo de cada una.

Diferenciación de iPSC a neuronas dopaminérgicas por un método de inhibición dual de la vía de las SMAD.

Se realizó el protocolo de diferenciación neural descrito anteriormente (ver Figura 10), en el que las células pluripotentes fueron sembradas en recipientes cubiertos con la solución Matrigel<sup>®</sup> (consistente en proteínas de matriz extracelular), y posteriormente fueron inducidas a diferenciarse hacia neuronas dopaminérgicas. Durante el paso de los días, se observa el cambio en la morfología de las células, que pasaron de tener una forma redonda y agruparse en colonias, a tener una morfología más alargada, formando estructuras llamadas rosetas neurales (aproximadamente entre los días 12 y 14), y posteriormente formando proyecciones que asemejan neuritas, a partir de los días 16-17 (ver Figura 21).



Figura 21. Cambio de la morfología de las iPSC diferenciadas con el protocolo de inducción neuronal. Las células van adquiriendo morfología de neuronas conforme avanzan los días de diferenciación. Alrededor del día 12 se observan células con forma de precursores neurales. Entre los días 17 y 21 se observa la aparición de proyecciones neuronales. El aumento correspondiente a cada imagen se indica debajo de cada una.

Evaluación de la expresión de diversos marcadores en las células en proceso de diferenciación por inmunocitofluorescencia: marcadores asociados a pluripotencia, a progenitores neurales y de neuronas con identidad dopaminérgica.

Para corroborar que dejaran de expresarse marcadores asociados a células pluripotenciales y se adquirieran marcaje asociado a neuronas dopaminérgicas, se evaluó la expresión de diversas proteínas por medio de inmunocitofluorescencia durante el proceso de diferenciación de las células. Al día 7 de diferenciación, se observa que algunas células ya expresan los marcadores de precursores neurales Vimentina y Nestina, aunque también se observó la persistencia de la marca de Oct4 en este estadío (ver Figura 22A). Al día 14 de diferenciación, el marcaje de Vimentina y Nestina es más claro, y el correspondiente a Oct4 es prácticamente nulo, tal como se aprecia en la Figura 22B.



Figura 22. Ensayos de inmunocitofluorescencia de las células iPSC en diferenciación neuronal, que muestran un paulatino descenso en la marca de proteínas asociadas a pluripotencia, y un aumento en la marca de proteínas de precursores neurales. **A)** Marcadores al día 7 de diferenciación, en donde se observa que aunque hay células ya positivas para los marcadores de precursores neurales Nestina y Vimentina, todavía se encuentran células positivas para los marcadores de pluripotencia (Oct4 y Sox2). La escala (100 μm) se observa en cada imagen. **B)** Marcadores al día 14 de diferenciación, donde ya no se observa prácticamente la marca de los factores de pluripotencia. El aumento de las tres imágenes superiores es 40x, mientras en las tres imágenes inferiores tienen un aumento de 20x.

Hacia el día 21 de diferenciación, se sigue observando la expresión de los marcadores asociados a precursores neurales (Vimentina y Nestina) en algunas células, mientras que en otras se observa ya la expresión del marcador Tuj1, asociado a neuronas en proceso de maduración, y de TH, enzima limitante en la síntesis de dopamina y por lo tanto un importante marcador de neuronas dopaminérgicas, tal como se aprecia en la Figura *23*A [57]. De igual forma, al día 28 de diferenciación se observan las marcas de Tuj1 y TH con una intensidad similar al día 21 (ver Figura *23*B).





Figura 23. Expresión de diversas proteínas en las células en los días 21 y 28 de diferenciación, en los cuales se observa marcaje positivo para proteínas asociadas a neuronas dopaminérgicas. A: Al día 21 de diferenciación, se sigue observando un marcaje positivo de precursores neurales (Vimentina y Nestina) en algunas células, mientras que en otras ya se observa marca de neuronas inmaduras (Tuj1) y de neuronas dopaminérgicas (TH). La escala se indica en cada imagen (50 μm para las tres imágenes superiores, y 100 μm para las tres imágenes inferiores). B: Al día 28 de diferenciación se mantiene el marcaje positivo de Tuj1 y TH, que parece ser de una intensidad similar al del día 21 (aumento 40x).

# Pruebas de RT-PCR por punto final de marcadores de pluripotencia y de neuronas dopaminérgicas, así como de RT-PCR en tiempo real del marcador TH para neuronas dopaminérgicas.

Con el objetivo de comprobar el resultado obtenido por la prueba de inmucitofluorescencia, en la cual se observó una disminución paulatina de la marca del factor de pluripotencia Oct4, se realizaron experimentos de RT-PCR a partir de extractos de las células en diferenciación. La expresión de Oct4 disminuyó hacia el día 7, y es prácticamente nula para el día 14, lo que coincide con lo observado en la inmunocitofluorescencia (ver Figura 24A). Por otra parte, el marcador para neuronas dopaminérgicas TH se expresa sólo en días más tardíos de diferenciación, específicamente al día 22 y al día 28, como se observa en la PCR en punto final (ver Figura 24B). Para poder cuantificar si la expresión de este marcador de neuronas con identidad dopaminérgica se incrementó entre estos días, se realizó una qPCR, o PCR en tiempo real. En esta prueba se observaron niveles similares de la expresión de TH para los días 22 y 28 de diferenciación (ver Figura 24C).



Figura 24. RT-PCR de un marcador de pluripotencia (Oct4) y de un marcador de neuronas dopaminérgicas (TH) en las células en diferenciación, que corrobora la desaparición paulatina de la marca de pluripotencia y la aparición de la marca de neuronas dopaminérgicas a partir de la tercera semana de diferenciación. A) PCR por punto final del marcador de pluripotencia Oct4 a los días 0, 7 y 14. En el carril de la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular con una escalera molecular de 100 pb. B) PCR punto final del marcador de neuronas dopaminérgicas TH a los días 0, 7, 14, 22 y 28 de diferenciación. En el carril de la derecha se muestran los marcadores de peso molecular con una escalera molecular de 100 pb. C) Expresión de TH por qPCR, la cual muestra niveles similares de expresión de este marcador en los días 22 y 28 de diferenciación.

## 7. Discusión

En el presente trabajo se realizó la reprogramación de fibroblastos humanos dermales hacia células troncales pluripotentes, por medio de la electroporación con plásmidos episomales que contienen factores claves de pluripotencia (Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc, LIN28 y shp53) siguiendo el método de Okita *et al.* [35]. La utilización de plásmidos episomales sobre el método original de reprogramación [27] (y más utilizado) de transducción con retrovirus provee la ventaja que los transgenes no son integrados al genoma de la célula hospedera. Esto disminuye el riesgo de la formación de tumores al ser utilizadas estas células en medicina regenerativa. La eficiencia de reprogramación obtenida fue de un 0.04%, la cual es comparable con los resultados reportados en otros trabajos que utilizan el mismo método de reprogramación (plásmidos episomales), cuyas eficiencias varían entre 0.01 y 0.05% [35,41].

La pluripotencia de las células obtenidas fue evaluada por diversos métodos: primero por su morfología, la cual cambió de células elongadas y aplanadas, típica de células mesenquimales, a células más pequeñas, con forma redondeada que se agrupan en colonias compactas, típicas de las células embrionarias pluripotentes. Este cambio en la morfología y agrupación de las células asemeja a una transición inversa de lo que ocurre durante la etapa embrionaria de la gastrulación. Durante el desarrollo embrionario sucede un cambio en las células en la etapa de gástrula, el cual se conoce como Transición Epitelio-Mesénquima (o EMT, por sus siglas en inglés). La transición inversa, llamada Transición Mesénquima-Epitelio (MET) es característica del proceso de reprogramación de fibroblastos humanos a células pluripotentes, las cuales alrededor del día 6 comienzan a formar pequeños agregados compactos, que más tarde (a partir del día 12) formarán las primeras colonias con una clara morfología epitelial [59].

El inmunomarcaje de las células con proteínas asociadas a pluripotencia es otra forma de evaluar dicha característica de troncalidad. Por medio de la técnica de inmunocitofluorescencia se determinó que las células obtenidas eran positivas para las marcas de Oct4, Sox2, Nanog (factores de transcripción claves en el mantenimiento de la pluripotencia) y SSE4, un antígeno de superficie expresado por células pluripotentes humanas. Dichas células presentan proteínas asociadas a la pluripotencia tanto a nivel nuclear como a nivel de su membrana plasmática –por los factores que dieron marca positiva–, lo cual es una fuerte evidencia de que cumplen con características de células pluripotentes.

Para evitar que las células reprogramadas no respondan a estímulos que las lleven a diferenciación dirigida posteriormente, se requiere que los factores de reprogramación dejen de expresarse. Se analizó la presencia de los transcritos de los genes de pluripotencia Oct4, Sox2, Klf4, L-Myc, LIN28 (tanto endógenos como los provenientes de los plásmidos) y del ARN de interferencia para el gen supresor de tumores p53 (que también se introdujo en un plásmido) por medio de la técnica de RT-PCR. A un pasaje temprano analizado (4to pasaje), se observa ya la presencia de los transcritos derivados de los genes propios (endógenos) del genoma de las células, lo cual se muestra con las bandas que se amplificaron con los oligonucleótidos hechos para genes endógenos. Por lo tanto, estas células se encuentran en una etapa de reprogramación en la que ya se ha superado la barrera epigenética asociada a una organización de la cromatina compacta. Esto quiere decir que la cromatina se encuentra en un estado más abierto que permite la unión de los anteriores factores de transcripción a sus blancos y que activan la red de pluripotencia propia de las células [33]. Se observó asimismo la expresión de los transcritos derivados de los plásmidos en este pasaje temprano, lo que conlleva a inferir que el mantenimiento de estas características pluripotenciales es debido todavía en parte a los transgenes provenientes de los plásmidos. A pasajes más tardíos (del pase 10 en adelante) se ha reportado que las células iPSC reprogramadas por plásmidos episomales ya no expresan los trasgenes, o bien los han integrado en su genoma [35,40,41]. En este trabajo se analizó si las células seguían expresando estos vectores episomales en el pasaje 17, y se encontró que ya no había dicha expresión. Aunque no se puede excluir formalmente la presencia de fragmentos plasmídicos, estos resultados muestran que las iPSC obtenidas están probablemente libres de integración de los plásmidos en su genoma.

Los análisis de cariotipo de diversas clonas de iPSC obtenidas muestran aberraciones cromosómicas entre el 0% y el 42% de las células, con una media del 21% de células con alteraciones. Este porcentaje es mayor al 11.5% reportado en un extensivo estudio que utiliza el mismo método de reprogramación [41]. La explicación para una mayor proporción de células con aberraciones en su genoma no es sencilla, ya que las variaciones genéticas pueden tener diversos orígenes:

A) Podrían ser heredadas de las células somáticas de partida e inducidas o seleccionadas durante el proceso de reprogramación.

B) Pueden derivarse durante el proceso de reprogramación, en donde una elevada expresión de genes involucrados en la proliferación y la división celular durante el establecimiento del estado pluripotente puede inducir mutaciones en las células.

c) Cultivos prolongados podrían introducir o seleccionar alteraciones que faciliten la propagación celular (cuya probabilidad es casi nula en este caso pues las aberraciones se observan desde pasajes tempranos) [60]. Por otro lado, la inhibición temporal de la vía antitumoral de p53

durante la reprogramación interfiere con el proceso de dicha vía en la reparación del daño del ADN, por lo que células con un genoma no íntegro escapan el punto de verificación (*check point*) que implica esta vía y podrían explicar el incremento en la proporción de células no euploides que terminan siendo reprogramadas [43]; sin embargo, hasta el día de hoy no hay evidencia suficiente de que la inhibición de p53 promueva una mayor carga mutagénica ni sobre la contribución de p53 a las variaciones genéticas detectadas en las iPSC [60].

La prueba más estricta para evaluar la pluripotencia de una línea celular es un ensayo funcional, puesto que al encontrarse las células en un ambiente in vivo responden a diferente información de todos los tejidos circundantes para inducir su diferenciación. Solamente si las células son pluripotenciales contribuirán a tejidos derivados de las 3 capas embrionarias que conforman a un organismo [7]. Las células de solamente una de las cuatro clonas evaluadas generaron un teratoma al ser inyectadas en el costado de un ratón inmunosuprimido. El teratoma generó tejidos derivados de las 3 capas embrionarias, lo cual es una prueba fehaciente de la pluripotencialidad de estas células. Las células provenientes de esta clona (clona 3) fueron las que contenían un menor porcentaje de células con cariotipo normal: 57.5%, en comparación con las otras 3 clonas celulares analizadas: 80.3%, 65.2% y 100%, respectivamente. Este resultado podría explicar el por qué las células de esta clona lograron generar un teratoma y no las demás, pues al tener mayores aberraciones cromosómicas, pueden encontrarse sobreexpresados genes involucrados en la proliferación y la división celular. En general, estos resultados parecen sugerir que el estado pluripotente no se ha establecido con la calidad esperada para que las células pudieran ser utilizadas posteriormente en aplicaciones terapéuticas, sobre todo por el alto porcentaje de aberraciones cromosómicas. Mayores experimentos de reprogramación son necesarios en este espacio de trabajo para lograr una mayor uniformidad en las características de las células obtenidas; en especial se necesita que las células obtenidas presenten un menor porcentaje de errores en su genoma.

Las iPSC obtenidas fueron dirigidas a diferenciarse hacia neuronas dopaminérgicas siguiendo un protocolo de inducción neural. En dicho protocolo se realizó una inhibición dual de la vía de las SMAD para dirigir la diferenciación de las células pluripotentes a precursores neurales que parecen asemejar en forma a pseudo-rosetas neurales, cuya morfología característica se observa alrededor de los días 12-14 del protocolo. Lo anterior concuerda con lo reportado en los estudios que estandarizaron este protocolo de diferenciación, en donde se empiezan a observar estas estructuras a partir del día 11 de diferenciación [53,56]. Los ensayos de inmunocitofluorescencia muestran que conforme avanzan los días de diferenciación, se incrementa el marcaje de proteínas expresadas en precursores neurales. Además, ensayos con RT-PCR confirman junto con la anterior

técnica que la expresión de genes asociados a pluripotencia va disminuyendo con el avance de la diferenciación, y que a partir de etapas más avanzadas (día 21 de diferenciación) se expresan genes asociados a neuronas con características dopaminérgicas.

Este resultado confirma la hipótesis planteada en este trabajo, pues las células reprogramadas tuvieron la capacidad de diferenciarse a neuronas con identidad dopaminérgica, a pesar de que las células tenían una mayor proporción de aberraciones cromosómicas de lo esperado. Desafortunadamente, no se alcanzó a evaluar la supervivencia de estas células en un tiempo mayor, lo cual podría mostrar si las aberraciones genómicas que presentan pueden afectar a las neuronas dopaminérgicas en estadíos más maduros. Cabe destacar que no se había reportado a la fecha la diferenciación de fibroblastos reprogramados por el método no integrativo de Okita *et al.* [35] siguiendo el protocolo de diferenciación dopaminérgica por medio de la inhibición dual de la vía de las SMAD [56]. Los resultados obtenidos sugieren que el uso de ambas técnicas puede resultar en la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de fibroblastos humanos. Sin embargo, para que estas células puedan ser utilizadas de forma segura en aplicaciones clínicas, se necesita mejorar el resultado de la reprogramación en el aspecto de la proporción de aberraciones cromosómicas de las células así obtenidas.

Para caracterizar mejor las células que surgen durante el proceso de diferenciación, se podrían analizar otros marcadores que son expresados en los precursores neurales, como PAX6, o marcadores más específicos para células provenientes del mescencéfalo ventral, que son las que dan lugar a las neuronas dopaminérgicas de la *substantia nigra*, como Lmx1a o FOXA2. Para caracterizar a estas neuronas dopaminérgicas en etapas postmitóticas, con mayor grado de maduración, se pueden utilizar anticuerpos para las proteínas Pitx3, el transportador vesicular de monoaminas VMAT2, el canal de potasio GIRK2, o la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos AADC [52].

# 8. Conclusiones

Se realizó la reprogramación de fibroblastos humanos a un estado pluripotencial, por medio de la transfección por electroporación de plásmidos episomales que permiten la expresión transitoria de factores de pluripotencia. Las características morfológicas de las células obtenidas, pruebas de detección de marcadores de pluripotencia, resultados de RT-PCR y la inyección de células en ratones inmunodeprimidos para la formación de teratomas, proveen evidencia para aseverar que las células obtenidas son pluripotenciales. Los resultados de RT-PCR y de inmunocitofluorescencia indican que las células obtenidas por el protocolo de diferenciación neuronal presentan características de neuronas dopaminérgicas.

# Referencias

<sup>1</sup> Ramalho-Santos, M., Willenbring Holger (2007). On the Origin of the Term "Stem Cell". *Cell Stem Cell* **1**, 35-38

<sup>2</sup> Till, J. E. *et al.* (1961). A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiation Research* **14**, 213-222

<sup>3</sup> Till, J. E. *et al.* (1964). A stochastic model of Stem Cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **51**, 29-36

<sup>4</sup> Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions. Department of Health and Human Services. June 2001

<sup>5</sup> Verfaillie, C. M. et al. (2002). Stem Cells: Hype and Reality. Amer. Soc. of Hematology 2002, 369-361

<sup>6</sup> Brunt, K. R. *et al.* (2012). Stem cells and regenerative medicine – future perspectives. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **90**, 327-335

<sup>7</sup> Velasco, I., Santa-Olalla, J., Pelayo, R. (2011). "Células Troncales y Medicina Regenerativa" Universidad Nacional Autónoma de México. Primera Edición, México, D.F.

<sup>8</sup> Wulf, G. G. *et al.* (2001). Somatic stem cell plasticity: Current evidence and emerging concepts. *Experimental Hematology* **29**, 1361–1370

<sup>9</sup> Evans, M. J., Kaufman, M. H. (1981). Establisment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **292**, 154-156

<sup>10</sup> Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **78** (12), 7634-7638

<sup>11</sup> Thomson, J. A. *et al.* (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* **282**, 1145-1147.

<sup>12</sup> Reubinoff, B. E. *et al.* (2000). Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nature Biotechnology* **18**, 399-404

<sup>13</sup> Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008). "Molecular Biology of the Cell" *Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC*. 5<sup>th</sup> Edition, UK.

<sup>14</sup> Boyer, L. A. *et al.* (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* **122**(6), 947–956

<sup>15</sup> Nichols, J. *et al.* (1998). Formation of Pluripotent Stem Cells in the Mammalian Embryo Depends on the POU Transcription Factor Oct4. *Cell* **95**, 379-391.

<sup>16</sup> James, D. *et al.* (2005). TGFβ/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* **132**, 1273-1282.

<sup>17</sup> Manganelli, G.; Fico, A.; Filosa, S. (2011). Embryonic Stem Cells: from Blastocyst to in vitro Differentiation. "Methodological Advances in the Culture, Manipulation and Utilization of Embryonic Stem Cells for Basic and Practical Applications" *InTech*. 1<sup>st</sup> Edition.

<sup>18</sup> Amit, M., Itskovitz-Eldor, J. (2012). "Atlas of Human Pluripotent Stem Cells: Derivation and Culturing, Stem Cell Biology and Regenerative Medicine". © *Springer Science+Business Media*, LLC.

<sup>19</sup> Daley, G. Q. *et al.* (2003). Realistic Prospects for Stem Cell Therapeutics. *Amer. Soc. of Hematology* **2003**, 398-418

<sup>20</sup> Chamberlain, S. J. *et al.* (2008). Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. *Neurogenetics* **9**, 227–235

<sup>21</sup> Tropepe, V. *et al.* (1999). Distinct Neural Stem Cells Proliferate in Response to EGF and FGF in the developing Mouse Telencephalon. *Developmental Biology* **208**, 166-188

<sup>22</sup> Klimanskaya I. *et al.* (2005). Human embryonic stem cells derived without feeder cells. *Lancet* **365**, 1636-1641.

<sup>23</sup> Zhu, G. *et al.* (2014). Coordination of Engineered Factors with TET1/2 Promotes Early-Stage Epigenetic Modification during Somatic Cell Reprogramming. *Stem Cell Reports* **2**, 253-261

<sup>24</sup> Li, M. (2005). Embryonic Stem Cells. Advances in Clinical Neuroscience and Rehabilitation 5(1), 8-9

<sup>25</sup> Daley, G. Q. *et al.* (2009). Broader Implications of Defining Standards for the Pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell* **4**, 200-201

<sup>26</sup> Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676

<sup>27</sup> Takahashi, K. *et al.* (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* **131**, 861–872

<sup>28</sup> Yu, J. *et al.* (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science* **318**, 1917-1920

<sup>29</sup> Hochedlinger, K. (2010). Your inner healers: Reprogramming cells from your own body could give them the therapeutic power of embryonic stem cells, without the political controversy. *Scientific American* (May 2010), **302**, 46-53

<sup>30</sup> Chin, M. H. *et al.* (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell* **5**, 111-123

<sup>31</sup> Doi, A. *et al.* (2009). Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat. Genet.* **41**(12), 1350-1353

<sup>32</sup> Bilic, J., Izpisua-Belmonte, J. C. (2012). Concise Review: Induced Pluripotent Stem Cells Versus Embryonic Stem Cells: Close Enough or Yet Too Far Apart? *Stem Cells* **30**, 33-41

<sup>33</sup> Barrero, M. J. et al. (2010). Epigenetic Mechanisms that Regulate Cell Identity. Cell Stem Cell 7, 565-570

<sup>34</sup> Ramos-Mejía, *et al.* (2012). Residual Expression of the Reprogramming Factors Prevents Differentiation of iPSC Generated from Human Fibroblasts and Cord Blood CD34+ Progenitors. *PLoS One* **7**(4):e35824.

<sup>35</sup> Okita, *et al.* (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods* **8**(5), 409-414

<sup>36</sup> Stadtfeld, M. *et al.* (2008). Induced Pluripotent Stem Cells Generated Without Viral Integration. *Science* **322**, 945-949

<sup>37</sup> Kim, D. *et al.* (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Cell Stem Cell* **4**, 472-476

<sup>38</sup> Warren, L. *et al.* (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells using synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618-630

<sup>39</sup> Yu, J. *et al.* (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. *Science* **324**, 797-800

<sup>40</sup> Okita, K. *et al.* (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science* **322**, 949-953

<sup>41</sup> Schlaeger, T. M. *et al.* (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology* **33**(1), 58-65

<sup>42</sup> Stadtfeld, M. *et al.* (2010). Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes and Development* **24**, 2239-2263

<sup>43</sup> Dolgin, E. (2009). p53 prevents pluripotency. *Nature Reports Stem Cells*. Published online: 20 August 2009.

<sup>44</sup> Hong, H. *et al.* (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* **460**, 1132-1136.

<sup>45</sup> Nakagawa, M. *et al.* (2010). Promotion of direct reprogramming by transformation-deficient Myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**(32), 14152-14157.

<sup>46</sup> Nanbo, A. *et al.* (2007). The coupling of synthesis and partitioning of EBV's plasmid replicon is revealed in live cells. *The EMBO Journal* **26**, 4252-4262.

<sup>47</sup> Lakshmipathy U., *et al.* (2004). Efficient Transfection of Embryonic and Adult Stem Cells. *Stem Cells* **22**, 531-543

<sup>48</sup> Iversen, N. *et al.* (2005). Electroporation by nucleofector is the best nonviral transfection technique in human endothelial and smooth muscle cells. *Genetic Vaccines and Therapy* **3**:2

<sup>49</sup> Díaz-Martínez, N. E. *et al.* (2013). Recovery From Experimental Parkinsonism by Semaphorin-guided Axonal Growth of Grafted Dopamine Neurons. *Molecular Therapy* **21**(8), 1579-1591.

<sup>50</sup> Sundberg, M. *et al.* (2013). Improved Cell Therapy Protocol for Parkinson's Disease Based on Differentiation Efficiency and Safety of Hesc-, Hipsc and Non-Human Primate Ipsc-Derived DA Neurons. *Stem Cells* **31**(8), 1548-1562

<sup>51</sup> Ma, Y. *et al.* (2010). Dopamine Cell Implantation in Parkinson's Disease: Long-Term Clinical and <sup>18</sup>F-FDOPA PET Outcomes. *J Nucl Med.* **51**(1), 7–15

<sup>52</sup> Perrier, A. L. *et al.* (2004). Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**(34), 12543–12548

<sup>53</sup> Chambers, S. M. *et al.* (2009). Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nature Biotechnology* **27**(3), 275-280

<sup>54</sup> Zhang, S. C. *et al.* (2001). In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology* **19**, 1129–1133

<sup>55</sup> Elkabetz, Y. *et al.* (2008). Human ES cell-derived neural rosettes reveal a functionally distinct early neural stem cell stage. *Genes and Dev.* **22**, 152-165

<sup>56</sup> Kriks, S. *et al.* (2011). Dopamine neurons derived from human ES cells efficiently engraft in animal models of Parkinson's disease. *Nature* **480**, 547–551

<sup>57</sup> Hegarty, S. *et al.* (2013). Midbrain dopaminergic neurons: A review of the molecular circuitry that regulates their development. *Developmental Biology* **379**, 123-138

<sup>58</sup> Štefková, C. *et al.* (2015). Alkaline Phosphatase in Stem Cells. *Stem Cells International* Article ID 628368, 1-11.

<sup>59</sup> Høffding, M. K., Hyttel, P. (2015). Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Research* **14**, 39-53

<sup>60</sup> Liang, G.; Zhang, Y. (2013). Genetic and Epigenetic Variations in iPSCs: Potential Causes and Implications for Application. *Cell Stem Cell* **13**, 149-159