



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio de los mecanismos de reprogramación de células somáticas humanas
hacia el estado pluripotente: papel de la ruta WNT

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Ricardo Raúl Cevallos Guerra

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Karlen Gazarian

[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Hilda Lomelí Buyoli

[Instituto de Biotecnología](#)

Dr. Rolando Hernández Muñoz

[Instituto de Fisiología Celular](#)

Ciudad de México. Agosto, 2018



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

Un agradecimiento especial a la Dra. Griselda Rodríguez Martínez por su importante contribución experimental y analítica a la realización del proyecto y la publicación de nuestro artículo.

Agradezco a mis tutores, Dra. Hilda Lomelí Buyoli, Dr. Rolando Hernández y Dr. Karlen Gazarian, así como al Dr. Jesús Chimal Monroy, la Dra. Aliesha González y Lic. Silvia Anahí Valdés, por el análisis crítico del presente proyecto.

Agradezco a los investigadores Dra. Mónica Lamas Gregori, Dr. Iván Velasco Velázquez, Dr. Horacio Merchant, Dra. Magdalena Guerra Crespo y Dra. Martha Robles Flores por su dedicación a la revisión y análisis de la presente tesis.

Agradezco al Dr. Jorge Ramírez y su equipo de trabajo de la Unidad de Microarreglos del Instituto de Fisiología Celular por su asistencia en el servicio de análisis de expresión por microarreglos.

Agradezco a la M.C. Alejandra Flores Bray, a la M.C. Azucena Hernández, y al Lic. Germán Mora por su asistencia técnica.

A la Facultad de Química y al Posgrado en Ciencias Bioquímicas por darnos la oportunidad de formarnos en su prestigioso programa.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por darme el espacio y medios para desarrollar mi proyecto.

Dedicatoria

A mi familia.

*it is "not birth, marriage or death, but
gastrulation which is truly the most
important time in your life."*

Lewis Wolpert

Contenido

Índice de figuras	3
Abreviaturas	5
Resumen.....	6
Abstract	7
1. Introducción y antecedentes.....	8
1.1 Las células troncales y el estado pluripotente	8
1.2 Las células troncales pluripotentes “ <i>primed</i> ” y “ <i>naive</i> ” de mamíferos	11
1.3 Reprogramación hacia el estado pluripotente: un proceso bifásico	12
1.4 Expresión de genes asociados al mesendodermo durante la reprogramación	14
1.5 La ruta Wnt en la pluripotencia y la reprogramación hacia el estado pluripotente	17
2. Planteamiento del problema	21
3. Hipótesis.....	22
4. Objetivo general:.....	22
5. Objetivos específicos:.....	22
6. Materiales y métodos	23
6.1 Células somáticas humanas	23
6.2 Células pluripotentes embrionarias	24
6.4 Generación de vectores lentivirales.....	26
6.5 Generación de iPSC humanas.....	26
6.6 Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina (AP).....	27
6.7 Análisis de expresión por RT-PCR y RT-qPCR	27
6.8 Análisis por citometría de flujo	28
6.9 Inmunocitoquímica	28
6.10 Análisis por microarreglos.....	29
6.11 Tamizaje con moléculas pequeñas.....	30
6.12 Ensayo de formación de teratomas	30
6.13 Ensayos de diferenciación	31
6.14 Western blot.....	32
6.15 Análisis de intensidad de la señal fluorescencia en las preparaciones inmunocitoquímicas	33
6.16 Análisis estadístico	33

7.	Resultados	34
7.1	Los fibroblastos humanos en proceso de reprogramación activan un programa de diferenciación mesendodermal específico de la fase de maduración.....	34
7.2	La expresión de genes mesendodermales se correlaciona con un aumento en la actividad de la ruta Wnt y de la expresión del gen <i>WNT3</i>	37
7.3	La activación e inhibición de la ruta Wnt promueve la formación de colonias de una manera específica de cada fase	39
7.4	La activación de la ruta Wnt induce la expresión de genes mesendodermales durante la fase de maduración del proceso de reprogramación	43
7.5	La inhibición de la ruta Wnt por medio de IWR-1 permite la derivación de líneas de iPSC. 46	
7.6	El efector TCF7L1 inhibe la expresión de los genes mesendodermales.....	48
7.7	La activación de la ruta Wnt promueve la formación de colonias epiteliales de manera dependiente de <i>TCF7</i>	53
7.8	La modulación bifásica de la ruta Wnt promueve la reprogramación de fibroblastos.....	60
8.	Discusión	62
9.	Conclusión	65
10.	Perspectivas	66
11.	Referencias:.....	68

Índice de figuras

Figura 1 Embriogénesis temprana en humanos hasta la formación del blastocisto post-implantación	9
Figura 2 Caracterización de las células pluripotentes humanas.....	10
Figura 3 La reprogramación es un proceso bifásico	14
Figura 4 Ruta canónica de la señal de Wnt	18
Figura 5 Colonias no-compactas con morfología diferenciada aparecen durante la fase de maduración y presentan un perfil de expresión de genes asociado al mesendodermo del surco primitivo	35
Figura 6 Genes específicos del mesendodermo se expresan durante la fase de maduración	37
Figura 7 La actividad de la ruta Wnt y la expresión de <i>WNT3</i> son reguladas positivamente durante la fase de maduración.....	38
Figura 8 La molécula IWR-1 es un inhibidor eficiente de la ruta canónica de Wnt.....	40
Figura 9 Efecto de la activación e inhibición de la ruta Wnt sobre el número de colonias.....	42
Figura 10 La activación de la ruta Wnt es responsable de la expresión de los genes mesendodermales durante la reprogramación	45
Figura 11 Análisis morfológico e inmunofenotípico de las colonias luego de ser aisladas de los cultivos control, tratados con IWR-1 y tratados con Wnt3a.....	47
Figura 12 Generación de líneas de iPSC derivadas de cultivos tratados con IWR-1.....	48
Figura 13 Efecto de la modulación temprana de la ruta Wnt sobre la expresión de genes mesendodermales y de los efectores de la ruta Wnt	50
Figura 14 Efecto del <i>knock-down</i> y de la sobre-expresión de TCF7L1 sobre la expresión de los genes mesendodermales	52
Figura 15 El gen del represor TCF7L1 es altamente expresado en células troncales pluripotentes y es regulado negativamente durante la diferenciación mesodermal	53
Figura 16 La activación de la ruta Wnt promueve la aparición de grupos epiteliales durante la fase de iniciación	55

Figura 17 Efecto de la modulación de la ruta Wnt sobre los parámetros de proliferación celular durante la fase de iniciación.....	56
Figura 18 Efecto de la interferencia de los TCFs sobre la formación de grupos epiteliales y el número de colonias	57
Figura 19 Efecto específico de fase de la interferencia de TCF7 y β-catenina sobre el número de colonias	58
Figura 20 Efecto de la interferencia de la expresión de TCF7 sobre el efecto potenciador de Wnt3a sobre la epitelización durante la fase de iniciación	58
Figura 21 La sobre-expresión de TCF7 promueve la formación de grupos epiteliales durante la fase de iniciación	59
Figura 22 La modulación bifásica de la ruta Wnt aumenta la eficiencia de la reprogramación de fibroblastos humanos	61

Abreviaturas

- AP:** Fosfatasa alcalina (*Alkaline Phosphatase*)
- iPSC:** Células troncales pluripotentes inducidas (*induced-Pluripotent Stem Cells*)
- hESC:** Células troncales pluripotentes embrionarias humanas (*human Embryonic Stem Cells*)
- hMSC:** Células mesenquimales humanas (*human Mesenchymal Stromal Cells*)
- HDF:** Fibroblastos dermales humanos (*Human Dermal Fibroblasts*)
- FGF2:** Factor de Crecimiento de Fibroblastos-2 (*Fibroblast Growth Factor 2*)
- TGF- β :** Factor de Crecimiento Transformante-Beta (*Transforming Growth Factor β*)
- PDGF:** Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (*Platelet Derived Growth Factor*)
- EGF:** Factor de Crecimiento Epidermal (*Epidermal Growth Factor*)
- TCF:** Factor de Células T (*T-Cell Factor*)
- LIF:** Factor Inhibidor de Leucemias (*Leukemia Inhibitory Factor*)
- PSC:** Célula Troncal Pluripotente (*Pluripotent Stem Cell*)
- Epi-PSC:** Célula Troncal Pluripotente Epiblastica (*Epiblast-Pluripotent Stem Cell*)
- PSMN:** Mesendoderma del Surco Primitivo (*Primitive Streak Mesendoderm*)
- Wnt:** *Wingless/Int1*

Resumen

Las células somáticas humanas pueden ser reprogramadas hacia un estado troncal pluripotente por medio de la expresión ectópica de factores de transcripción definidos y generar Células Troncales Pluripotentes inducidas o *iPSC*. La reprogramación celular es un proceso bifásico compuesto por una transición mesénquima-a-epitelio durante la fase de iniciación, seguida por la fase de maduración durante la cual las células epitelizadas adquieren un estado pluripotente. El objetivo de este trabajo fue describir los efectos de la activación de la ruta de señalización celular Wnt durante estas fases de reprogramación y definir posibles mecanismos implicados con estos efectos. En este trabajo se demostró que estas fases de la reprogramación responden de manera contrastante a la actividad de la ruta de señalización celular Wnt. La activación de la ruta Wnt promueve la formación de colonias al favorecer la transición mesénquima-a-epitelio durante la fase de iniciación, pero induce una diferenciación mesendodermal en las colonias formadas durante la fase de maduración. Nos fue posible determinar que la promoción de la formación de colonias mediada por la activación de la ruta Wnt es dependiente del factor de transcripción TCF7. Por otro lado, pudimos observar que la diferenciación mesendodermal promovida por Wnt durante la fase de maduración es regulada negativamente por el represor TCF7L1. En este trabajo encontramos que la modulación fase-específica de la señal de la ruta Wnt permite mejorar la eficiencia de la reprogramación en términos de la cantidad de colonias reprogramadas así como en la calidad de las colonias obtenidas definida como una morfología compacta, una expresión homogénea de marcadores de pluripotencia y la ausencia de marcadores de diferenciación mesendodermal. Este trabajo contribuye al entendimiento de los mecanismos de la reprogramación hacia el estado pluripotente y propone nuevas estrategias para mejorar su eficiencia, como la modulación de la ruta WNT en ambas fases para aumentar el número de colonias e inhibir su diferenciación.

Abstract

Human somatic cells can be reprogrammed towards the pluripotent state by the ectopic expression of defined transcription factors and generate induced Pluripotent Stem Cells or iPSCs. Cellular reprogramming is a biphasic process, characterized by mesenchymal-to-epithelial during initiation phase, followed by a maturation phase wherein epithelial cells acquire pluripotency. The aim of this work was to describe the effects of Wnt signaling activation during this reprogramming phases, and to define possible mechanisms associated with this effects. In this work, we demonstrate that reprogramming phases respond to Wnt signaling activation in a contrasting manner. Wnt signaling activation promotes the formation of colonies favoring the mesenchymal-to-epithelial transition during the initiation phase, but induces mesendodermal differentiation in forming colonies during the maturation phase. We could define that the promotion of the Wnt-induced colony formation was dependent of TCF7. On the other hand, we observed that Wnt-induced mesendodermal differentiation during maturation phase is negatively regulated by TCF7L1. In this work, we could demonstrate that phase-specific Wnt signaling modulation enables the improvement of reprogramming efficiency in terms of colony quantity as well as in colony quality, the later defined as a compact morphology, homogenous expression of pluripotency markers and the absence of expression of mesendodermal genes. Therefore, this work represents a contribution to the understanding of the mechanisms of cellular reprogramming towards pluripotency and propose new strategies to improve reprogramming efficiency, such as the phase-specific modulation of Wnt signaling to enhance colony output and to inhibit the differentiation of colonies.

1. Introducción y antecedentes

1.1 Las células troncales y el estado pluripotente

Las células troncales son células con la capacidad de auto-renovarse y con el potencial para diferenciarse hacia diversos tipos celulares. La auto-renovación se refiere a la capacidad de las células para generar células hijas con las mismas propiedades fenotípicas y funcionales [1]. Las células troncales pueden auto-renovarse de manera simétrica o asimétrica, dependiendo de si luego de la división mitótica generan dos células hijas con las mismas propiedades troncales o solo una de ellas las mantiene y la otra se diferencia en una célula más especializada, respectivamente.

Las células troncales pluripotentes (PSC, *pluripotent stem cells*) son células capaces de diferenciarse hacia todos los tipos celulares del organismo adulto, por lo que representan una fuente celular importante para el estudio de mecanismos de diferenciación *in vitro*, para el modelamiento de enfermedades, para el desarrollo de tecnologías terapéuticas o la prueba de fármacos. Las PSC pueden ser aisladas de la masa celular interna del blastocisto (día 6 de gestación en humanos) (Figura 1) [2], pueden ser generadas *in vitro* por medio de la transferencia nuclear [3], o por la sobre-expresión de factores de transcripción definidos en un proceso denominado reprogramación celular [4].

Las PSC pueden ser cultivadas por medio de la adición de los factores de crecimiento específicos para su auto-renovación. Así, las células pluripotentes de ratón requieren del factor de crecimiento LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) y la activación de la ruta Wnt para auto-renovarse, mientras que las PSC humanas requieren de los factores FGF-2, TGF- β e

insulina [5]. La adición de estos factores de crecimiento al cultivo *in vitro* de PSC permite su expansión de manera indefinida, razón por lo cual a las PSC se les denomina células inmortales bajo estas condiciones. Esta propiedad de las PSC está directamente asociada a su capacidad para resistir a la senescencia y la expresión de la enzima telomerasa [6].

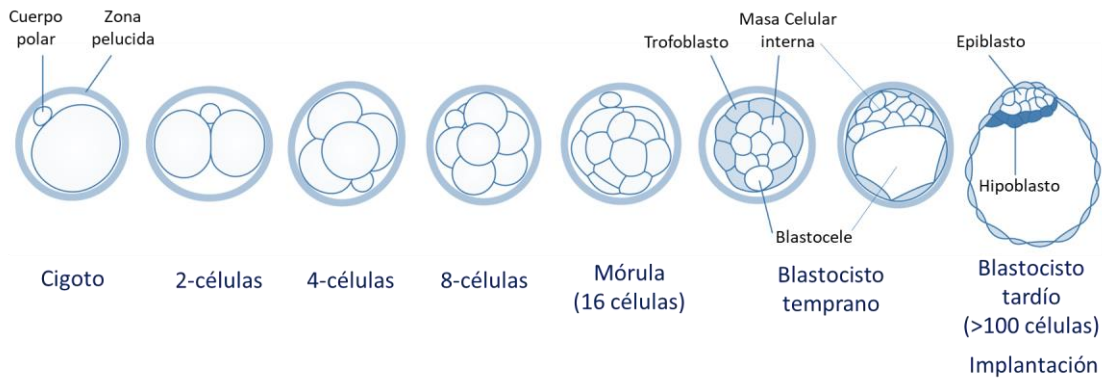


Figura 1. Embriogénesis temprana en humanos hasta la formación del blastocisto post-implantación. El proceso desde la fertilización y la formación del cigoto hasta la formación del blastocisto tardío tarda 6 días en humanos. Luego de la formación del blastocisto temprano (pre-implantación), la zona pelúcida se descompone y permite la implantación del embrión en el endometrio. Durante este proceso la masa celular interna se diferencia en el epiblasto y el hipoblasto.

Las propiedades de troncalidad de las PSC están reguladas por el circuito regulatorio de la pluripotencia compuesto por los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG. Estos genes, además de inducir la expresión de genes relacionados con la auto-renovación y el mantenimiento de la pluripotencia, también están encargados de reprimir genes de diferenciación y senescencia [7]. Otros genes inducidos por el circuito regulatorio de la pluripotencia son los que codifican proteínas tales como los antígenos de superficie SSEA4, Tra1-60 y Tra1-81, así como la enzima Fosfatasa Alcalina (AP, *Alkaline Phosphatase*). Se conoce muy poco sobre la función de éstas proteínas sobre la troncalidad de las PSC, aunque son muy útiles para la identificación y caracterización de las PSC (Figura 2A y 2B).

A nivel funcional, las PSC son capaces de formar derivados de las 3 capas embrionarias tanto *in vivo* como *in vitro*. Las líneas de PSC deben ser caracterizadas funcionalmente para ser catalogadas como tales, para lo cual generalmente se recurre al ensayo de la formación de teratomas en ratones inmunocomprometidos como los ratones NOD-SCID o los ratones FoxN1nu “*nude*” (Figura 2C). Los análisis histológicos de los teratomas por medio de la tinción de Hematoxilina-Eosina permiten revelar estructuras de las 3 capas embrionarias para poder verificar la pluripotencia de las PSC (Figura 2D).

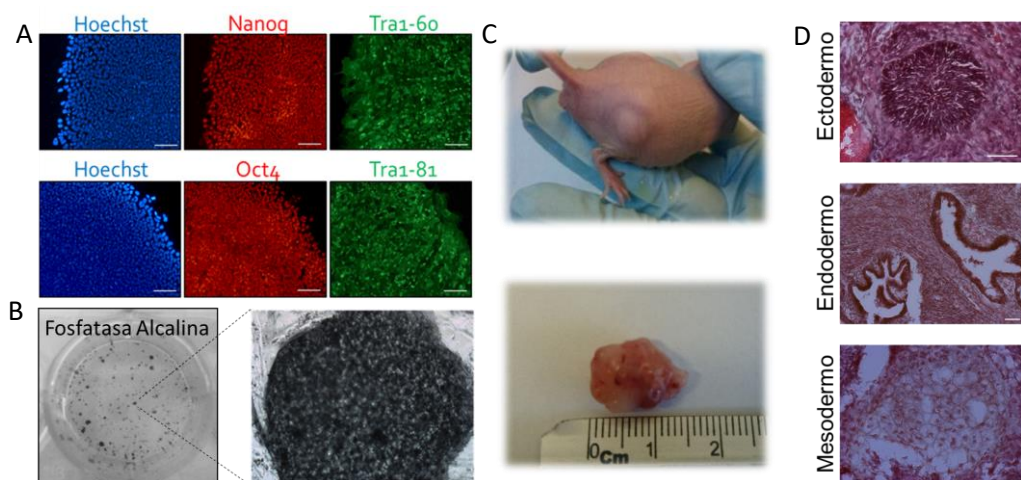


Figura 2. Caracterización de las células pluripotentes humanas. A) Ensayo de inmunofluorescencia para detectar la expresión de las proteínas de pluripotencia NANOG, OCT4, Tra1-60 y Tra1-81, en una línea de células embrionarias de la línea ESI-017 (ESI-BIO). Barra=100 μ m. B) Ensayo de detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en las colonias de células pluripotentes embrionarias. Barra=100 μ m. C) Generación de tumores de tipo teratoma en ratones inmunodeprimidos de la cepa FoxN1nu al día 60 post-trasplante en una línea de iPSC humana generada en el laboratorio (iFS1) con el vector no-integrativo Sendai. D) Tinción de Hematoxilina-Eosina para la caracterización de secciones del teratoma mostrado en C. Barra=100 μ m. Todas las imágenes en esta figura fueron generadas en el laboratorio por el autor del presente trabajo.

1.2 Las células troncales pluripotentes “*primed*” y “*naive*” de mamíferos

Se ha demostrado que los requerimientos específicos para la auto-renovación en términos de los factores de crecimiento mencionados anteriormente están relacionados directamente con el estado de pluripotencia en que se encuentran las PSC. Así, las PSC de ratón que se auto-renuevan gracias al factor LIF y la activación de la ruta Wnt, se encuentran en un estado de pluripotencia denominado “naive” característico de la masa celular interna del blastocisto pre-implantación (ver Figura 1, Blastocisto temprano). A este estado de pluripotencia se le conoce también como “ground state of pluripotency” o estado “basal de la pluripotencia” que se caracteriza por ser un estado pluripotencial muy estable *in vitro* [8]. Cuando el blastocisto avanza en el desarrollo y se implanta en el endometrio, la masa celular interna se diferencia en dos capas celulares denominadas Epiblasto e Hipoblasto (ver Figura 1, Blastocisto tardío). El epiblasto se compone de las células troncales pluripotentes que finalmente darán lugar a las 3 capas embrionarias (ectodermo, mesodermo y endodermo definitivo), mientras que las células del hipoblasto contienen células epiteliales que darán lugar principalmente al endodermo extra-embrionario incluyendo al saco vitelino. A las células pluripotentes del epiblasto se les conoce como “primed” ya que se encuentran listas para diferenciarse hacia las 3 capas embrionarias. Las células pluripotentes humanas son aisladas inicialmente en un estado *primed* o de post-implantación por lo que se las relaciona con las Epi-PSC (*Epiblast-PSC*) obtenidas de PSC de ratones [8]. Así mismo, las PSC humanas se auto-renuevan por la adición conjunta de los factores de crecimiento FGF-2, TGF- β e insulina a concentraciones definidas. En estas células, el factor LIF no cumple ningún papel en el mantenimiento de la

auto-renovación y la activación de la ruta Wnt, por otro lado, resulta contraproducente debido a que induce su diferenciación mesendodermal (progenitor temprano del mesodermo y endodermo generado en la zona anterior del surco primitivo). Es importante señalar que la diferenciación mesendodermal de epiblasto en presencia de Wnt solo se lleva a cabo si las rutas de BMP y TGF- β no están inhibidas [9]. Dada esta aparente inestabilidad del estado epiblastico, muchos laboratorios se han interesado en convertir a estas células hacia un estado *naive*. Las estrategias descritas hasta ahora para la conversión hacia el estado *naive* consisten en la sobreexpresión sostenida de genes como *KLF2* y *NANOG* o el uso de moléculas inhibitoras de cinasas tales como MEK1, GSK3, SRC, PKC y RAF [10, 11].

1.3 Reprogramación hacia el estado pluripotente: un proceso bifásico

Las células troncales pluripotentes pueden ser generadas *in vitro* por medio de la transferencia de factores de transcripción definidos. Los investigadores Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi descubrieron que los factores de transcripción OCT4, SOX2, KLF4 y MYC, al ser sobre-expresados en células diferenciadas, son capaces de reprogramarlas hacia un estado pluripotencial. A las células resultantes de esta inducción se las denomina Células Troncales Pluripotentes Inducidas (iPSC, *induced-Pluripotent Stem Cells*). La generación de iPSC es un proceso lento e ineficiente (solo el 0.01-0.2% de las células logran formar colonias, pero solo una fracción de éstas adquieren una pluripotencia completa y estable), pero más importante aún, el conocimiento sobre los mecanismos involucrados en la inducción de la pluripotencia es aún deficiente [12, 13]. Sumado a esto, se ha observado que las células adquieren aberraciones epigenéticas que pueden impactar negativamente la

diferenciación de las iPSC a nivel de su maduración hacia células funcionales [14]. Se ha observado que estas aberraciones epigenéticas afectan la maduración hacia linajes celulares derivados del mesendodermo, tales como las células hematopoyéticas y las células hepáticas. Estos cambios epigenéticos por ejemplo, influyen en la accesibilidad de la cromatina en regiones promotoras de los genes *IGF2* y *GATA6*. De hecho, se ha observado que la expresión de *IGF2* se correlaciona directamente con la productividad de progenitores hematopoyéticos CD34+ en diferentes líneas de hPSC. Se ha propuesto que el estudio de los mecanismos de reprogramación que permiten el entendimiento de las señales que afectan su eficiencia y la calidad de las células reprogramadas, podría ayudar a resolver estos problemas [15].

A pesar de este desconocimiento sobre los mecanismos de la reprogramación, se sabe que la inducción de la pluripotencia mediada por la sobreexpresión de factores es un proceso bifásico compuesto por una fase de iniciación y una fase de maduración. Durante la fase de iniciación, una fracción de células transducidas con los factores de reprogramación adquieren un estado epitelial a través de la transición mesénquima-epitelio y la regulación positiva de proteínas de adhesión tales como E-cadherina y queratina [16] (Fig. 3). Esta epitelización celular está asociada con una alta proliferación y es necesaria para la compactación posterior de las colonias pluripotentes en la fase de maduración. Durante la fase de maduración, los grupos epiteliales de la primera fase empiezan a adquirir una mayor compactación y se induce el estado pluripotente gracias a la activación endógena del circuito regulatorio de la pluripotencia y la regulación de todos los genes que son blanco del circuito (Fig. 3). De manera notable, durante esta fase se observa una fuerte regulación

positiva de las proteínas de superficie SSEA-4, Tra1-60 y Tra1-81. Esta fase de maduración ha sido reportada como un periodo decisivo sobre la eficiencia en que las células somáticas humanas adquieren un estado pluripotente completo [17].

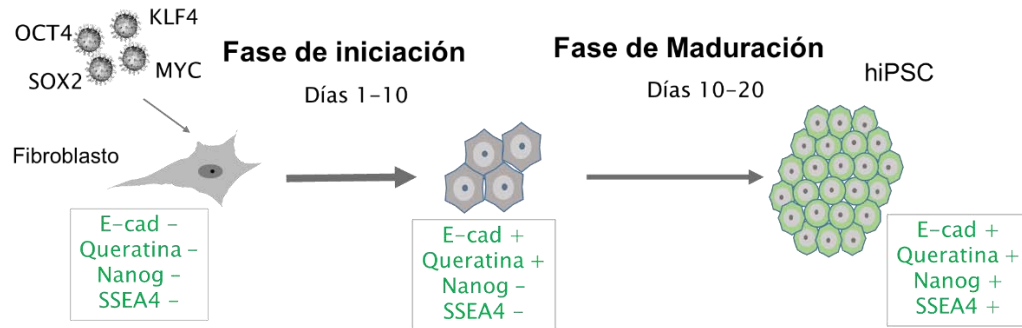


Figura 3. La reprogramación es un proceso bifásico. En los fibroblastos humanos transducidos con vectores portadores de los cDNA de *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* y *MYC* se induce un estado epitelial durante la fase de iniciación, generando cúmulos de células positivas a E-cadherina (E-cad) y queratina. Luego de alrededor de 10 días post-transducción, algunos cúmulos epiteliales forman colonias compactas de células pluripotentes positivas a los factores del circuito de regulación de la pluripotencia como Nanog, y a antígenos de membrana típicos de las células pluripotentes como SSEA4.

1.4 Expresión de genes asociados al mesendodermo durante la reprogramación

La reprogramación de una célula somática hacia un estado pluripotente por medio de la sobreexpresión de factores de transcripción es un proceso lento si lo comparamos con otras técnicas de reprogramación como la transferencia nuclear (20 días para la reprogramación celular *in vitro* versus 7 días para la transferencia nuclear) [3, 18]. Una pregunta que se mantuvo mucho tiempo en discusión era si la células somática durante este proceso de reprogramación regresaba paulatinamente hacia estadios transitorios asociados con el desarrollo embrionario, pero de manera inversa. Es decir, que si un fibroblasto (derivado del mesodermo) era reprogramado hacia el estado pluripotencial debía o no pasar por un estado de progenitor mesodermal o mesendodermal antes de

alcanzar la pluripotencia. Estudios independientes demostraron que efectivamente durante la reprogramación existe una expresión transitoria de genes asociados con el desarrollo temprano, pero que no estaba asociada a la capa embrionaria de la célula somática de la cual se partía, sino que era algo intrínseco del proceso de reprogramación de cualquier célula somática. Takahashi y colaboradores (2014) pudieron demostrar que independientemente del tipo celular reprogramado, las células atraviesan por un estado transitorio similar al mesendodermo, dado que durante dicho estado se detectan factores de transcripción como Brachyury (T), FOXA2, FOXH1, NODAL, EOMES, MIXL, entre otros [19]. Este es el primer hallazgo que indicó que las células reprogramadas no regresan por su camino ontogénico, sino que pasan por un estado común independientemente de su origen embrionario. De manera interesante, en este trabajo se observó la expresión transitoria de estos genes mesendodermales en células positivas a Tra1-60, purificadas periódicamente durante la reprogramación con el fin de eliminar el efecto de células no reprogramadas. Con esto los autores sugieren que la expresión de genes de diferenciación mesendodermal marca un estado transitorio en las células que tiene potencial para generar iPSC, y que este estado transitorio debe inhibirse para completar el proceso de maduración hacia colonias pluripotentes. Aunque los autores no concluyen si este estado transitorio de las células en reprogramación es necesario o no para alcanzar la pluripotencia, ellos observaron que la sobreexpresión de algunos de estos factores mesendodermales promueve la formación de colonias pluripotentes. Los autores pusieron especial atención al factor FOXH1, el cual al ser sobre-expresado promueve sustancialmente la formación de colonias y, por otro lado, su inhibición resulta deletérea

para el proceso de reprogramación. Sin embargo, los autores no toman en cuenta que para las células pluripotentes humanas que se encuentran en un estado de pluripotencia “primed”, algunos genes mesendodermales como *FOXH1* son parte del circuito regulatorio de pluripotencia y se expresan normalmente en PSC humanas indiferenciadas. Por lo tanto, al no identificarse de manera concreta el inductor de la expresión de estos genes no queda claro si realmente la expresión de genes mesendodermales o el establecimiento del estado transitorio mesendodermal son necesarios o no para la reprogramación.

Según nuestras observaciones durante experimentos realizados en el laboratorio, hemos podido observar que los grupos epiteliales que logran atravesar la fase de iniciación son vulnerables a señales de diferenciación que los llevan hacia un fenotipo no-compacto similar al epitelio intestinal derivado del endodermo (Ver resultados, apartado 7.1). Estas colonias pierden su compactación y auto-renovación, y por tanto no son elegibles como potenciales líneas de células iPSC. Por medio de inmunocitoquímica pudimos observar que las colonias de células no-compactas siguen siendo positivas a los marcadores de superficie SSEA4 y Tra1-60, pero presentan una baja expresión del factor de pluripotencia NANOG. Esto sugiere que las colonias en la fase de maduración están siendo dirigidas hacia un estado de diferenciación temprano, probablemente inducido por señales asociadas a la formación del surco primitivo tomando en cuenta el reporte de Takahashi y colaboradores.

La formación del surco primitivo y la diferenciación mesendodermal es inducida por la acción conjunta de señales como la de la ruta Wnt, TGF- β y BMP [20]. Sin embargo, la señal

de la ruta Wnt ha sido identificada como una señal central para dar inicio a la gastrulación, dado que los animales *knockout* para componentes de la ruta canónica de Wnt son incapaces de formar el surco primitivo y solo pueden generar estructuras asociadas al ectodermo, mientras que los *knockout* para rutas como BMP o TGF- β muestran fallas en la formación de derivados del mesendodermo pero no presentan fallas severas en la formación del surco primitivo como tal [21]. Tomando en cuenta este conocimiento sumado a experimentos realizados *in vitro* con células pluripotentes humanas, resulta muy probable que la inducción del estado transitorio descrito por Takahashi y colaboradores sea resultado de la activación de la ruta Wnt.

1.5 La ruta Wnt en la pluripotencia y la reprogramación hacia el estado pluripotente

La ruta Wnt es una ruta esencial durante el desarrollo y está involucrada en diversos procesos celulares, influyéndolos de una manera contexto-dependiente [22]. La ruta Wnt opera por medio de la estabilización del transductor de señal intracelular y co-activador transcripcional β -catenina. Cuando un ligando Wnt se une a sus receptores Frizzled, el complejo de destrucción de β -catenina, compuesto por AXIN, APC, CK1, GSK3 y β -TrCP, es inactivado permitiendo la acumulación de β -catenina y su translocación al núcleo (Figura 4). Una vez que β -catenina se ha traslocado al núcleo, ésta se une a las proteínas de la familia TCF/LEF, haciendo que de éstas últimas sean desplazadas proteínas represoras como Groucho, promoviendo a su vez una función activadora de la transcripción de los blancos de la ruta Wnt. Es importante señalar que las proteínas TCF/LEF son componentes importantes de los efectos contexto-dependientes de la señal de Wnt y han sido identificados como reguladores esenciales de la pluripotencia y la diferenciación.[23] Es así

que muchos genes blanco de la ruta Wnt son participantes directos de la regulación de la auto-renovación y la diferenciación como los genes de la familia SOX (SOX2, SOX17, SOX10, SOX7, SOX9) [24] o los genes que participan en la especificación mesendodermal como Brachyury (*T*) y BMP4.[25] Es importante señalar que la ruta sufre regulación por retro-alimentación negativa gracias a que uno de los blancos de la ruta es el gen de AXIN2. La expresión de AXIN2, a diferencia de AXIN1 cuya expresión es constitutiva, es inducida por una alta actividad de la ruta Wnt, acumulándose en el citoplasma y participando en la formación del complejo de destrucción de β -catenina. Por este motivo, la expresión de AXIN2 es comúnmente utilizada como un sensor de la actividad de la ruta Wnt[26].

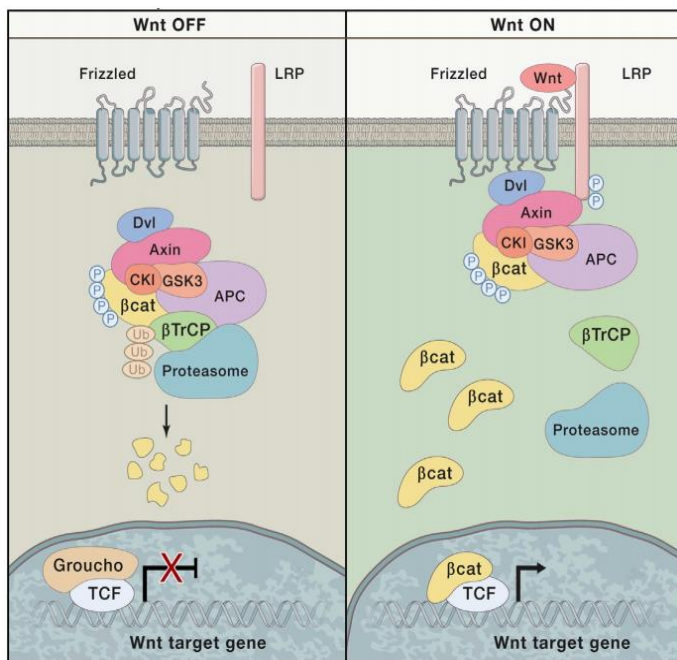


Figura 4. Ruta canónica de la señal de Wnt.

En el estado apagado (izquierda, *Wnt OFF*) o en ausencia de ligando Wnt, β -catenina está degradándose continuamente gracias al complejo de destrucción de β -catenina. En este estado, los efectores TCF junto con co-represores como Groucho, reprimen la expresión de los genes blanco de la ruta. En el estado encendido (derecha, *Wnt ON*), o en presencia de Wnt, β -catenina se libera del complejo de destrucción y puede acumularse para traslocarse eficientemente al núcleo. Una vez en el núcleo, β -catenina se une a los TCFs y los convierte en activadores de los

genes blanco de la ruta. Modificado de Nusse R y Clevers H, 2017 [27].

Las células troncales embrionarias de ratón (mESC, *mouse Embryonic Stem Cells*), las cuales son derivadas del blastocisto temprano pre-implantación, son influenciadas

positivamente por la señal de la ruta Wnt en términos de su auto-renovación [28]. En estas células, la eliminación del represor TCF7L1 permite la expansión de las mESC de manera independiente de activadores de Wnt [29], mientras que la expresión de TCF7 es requerida para la auto-renovación de las células [30]. Por el contrario, en las células pluripotentes epiblasticas derivadas de blastocistos post-implantación, la ruta canónica de Wnt es una señal de diferenciación que promueve la formación del surco primitivo y la especificación mesendodermal, un proceso regulado por TCF7L1 [31].

Varios trabajos previos indican que la señal Wnt es perjudicial para el mantenimiento de la auto-renovación en células pluripotentes humanas, siendo esta señal parcialmente responsable de su diferenciación mesendodermal [32]. Estas evidencias son consistentes con el hecho de que las PSC humanas se encuentran estables en un estado epiblastico, post-implantación, tal como se ha mencionado previamente. De hecho una publicación reciente indica que el represor TCF7L1 es central en el mantenimiento de la pluripotencia en células pluripotentes embrionarias humanas, y que su inhibición es necesaria para la entrada de las células a diferenciación [33].

A pesar de la relevancia que tiene esta ruta sobre procesos asociados con la diferenciación temprana y el posible impacto que esta ruta podría ejercer sobre el proceso de reprogramación de células diferenciadas hacia un estado pluripotente, son escasos los reportes en los que se describen los efectos de la activación o inhibición de esta ruta durante la reprogramación de células somáticas. Estudios en células de ratón han demostrado que la activación de la ruta Wnt durante la fase de iniciación de la reprogramación resulta perjudicial para la formación de colonias mientras que la

activación de la ruta durante la fase de maduración promueve la generación de iPSC, lo cual parece depender de TCF7 y LEF1 [34]. Por otro lado, en humanos, el único reporte que se tiene sobre la implicación de la ruta Wnt en reprogramación es el artículo publicado por Ross y colaboradores (2014) en el cual se demuestra que los fibroblastos de pacientes con el síndrome de Hipoplasia Dérmica Focal o FDH (*Focal Dermal Hypoplasia*) son incapaces de reprogramarse hacia el estado pluripotencial [35]. Las células de pacientes con FDH tienen una mutación en el gen *PORCN* que interrumpe la función de la Porcupina, una proteína importante para la modificación post-traducciona l de los ligandos de la ruta Wnt (tanto canónicos como no-canónicos). El uso de un inhibidor de la Porcupina logra reproducir parcialmente este fenómeno demostrando que la inhibición de Wnt es perjudicial para la efectiva reprogramación de células humanas. Por otro lado, los autores demuestran que la adición del ligando Wnt3a, activador de la ruta canónica, promueve la formación de colonias durante la reprogramación de fibroblastos normales y permite la reprogramación de fibroblastos de pacientes con FDH. Esta evidencia aparentemente contrastante con lo que se conoce sobre el efecto de Wnt en las células troncales pluripotentes humanas expone la controversia alrededor del papel de la ruta Wnt durante la reprogramación de células somáticas humanas y apunta hacia funciones específicas de la ruta Wnt para cada fase de la reprogramación, que aún no han sido caracterizadas y que podrían estar influidas por la naturaleza bifásica de la reprogramación.

Además, en el estudio de Ross y colaboradores, no fueron descritos los efectos de la activación de la ruta canónica de Wnt durante la fase de maduración en términos de la compactación o diferenciación de las colonias obtenidas. Tampoco se identifican los

mecanismos por los cuales la ruta Wnt promueve la formación de colonias ni se explica la inconsistencia existente entre los reportes en células de ratón, en donde se observa que la activación de la ruta Wnt tiene un efecto negativo en la fase de iniciación. Es importante señalar que el efecto positivo de la ruta Wnt sobre la fase de maduración en células murinas es consistente con el hecho de que las PSC de ratón, a diferencia de las PSC humanas, requieren de un estado activo de Wnt para mantener su auto-renovación. Tomando en cuenta estos antecedentes, sumados al comportamiento contexto-específico de la ruta Wnt, resulta interesante determinar los mecanismos por los cuales la activación de la ruta Wnt podría influir tanto sobre la formación de colonias, -posiblemente sobre la fase de inicio-, como sobre la expresión de genes mesendodermales y la formación de colonias no-compactas que comprometen la eficiencia de la reprogramación durante la fase de maduración.

2. Planteamiento del problema

Una de las rutas de señalización celular más importantes durante el desarrollo temprano es la ruta Wnt, la cual es clave en la generación del mesendodermo del surco primitivo durante la gastrulación. Igualmente, esta ruta está implicada en varios procesos de diferenciación durante fases más avanzadas del desarrollo, así como en fenómenos patológicos como el cáncer y la fibrosis, actuando generalmente de manera contexto-específico. Sin embargo, son pocos los estudios realizados donde se describen los efectos de la activación o inhibición de esta ruta durante la reprogramación hacia el estado pluripotente, y aún menores son los reportes sobre su implicación en la reprogramación de células somáticas humanas. Dado el comportamiento contexto-específico de la ruta así

como la naturaleza bifásica de la reprogramación, es posible que la activación de la ruta Wnt tenga un papel dual, específico de cada fase, que afecte ambos componentes importantes de la reprogramación celular: la formación de las colonias y su maduración hacia colonias compactas. Por lo tanto, el problema a resolver en el presente trabajo será el relacionado con la implicación de la ruta Wnt sobre estos dos componentes clave para la eficiente reprogramación de células somáticas humanas.

3. Hipótesis

La modulación de la ruta Wnt tiene un efecto específico de cada fase durante la reprogramación de fibroblastos humanos, favoreciendo la epitelización durante la fase de iniciación e influyendo la adquisición del estado pluripotente durante la fase de maduración.

4. Objetivo general:

Analizar el efecto de la activación e inhibición de la ruta canónica de Wnt sobre la formación de colonias y su maduración durante las fases de la reprogramación de las células somáticas humanas hacia el estado pluripotente.

5. Objetivos específicos:

- Determinar los efectos de la activación e inhibición de la ruta canónica de Wnt en términos de número de colonias totales, así como de colonias diferenciadas y compactas a diferentes tiempos de tratamiento.

- Explorar el efecto de la activación e inhibición farmacológica y genética de la ruta Wnt y su especificidad en relación a otras rutas de señalización celular, en la expresión de genes mesendodermales y la diferenciación.
- Determinar el efecto de la activación e inhibición de la ruta Wnt sobre la expresión de los efectores de Wnt (TCF7, TCF7L1, TCF7L2 y LEF1) para encontrar posibles reguladores de la maduración hacia iPSC.
- Determinar el efecto de la inhibición y la sobre-expresión de los efectores de la ruta Wnt sobre la expresión de los genes de diferenciación mesendodermal y la formación de colonias.

6. Materiales y métodos

6.1 Células somáticas humanas

Los fibroblastos dermales humanos (HDF, *Human Dermal Fibroblasts*) se obtuvieron de la empresa ATCC (catálogo PCS-201-010) y se cultivaron en DMEM/F12 suplementado con 200 mM Glutamax (Gibco), 10% Suero fetal bovino (FBS) (Corning) y 10 µg/mL Gentamicina.

Las células mesenquimales humanas (hMSC, *Human mesenchymal cells*) fueron aisladas según la publicación de Bray y colaboradores (2014) [36] y la publicación de Ramírez y colaboradores [37]. Las hMSC se obtuvieron de terceros molares bajo carta de consentimiento (**formato anexo 1**) y la aprobación del comité de bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (**carta anexo 1**). Los molares se procesaron dentro de las 24 horas posteriores a la extracción y durante este periodo fueron mantenidos en solución Hank's (Gibco)

suplementado con 2X Antibiótico-Antimicótico (Anti-Anti, Gibco). Posteriormente los dientes fueron lavados en enjuague bucal comercial durante 1 minuto. Los molares fueron fragmentados por medio de fórceps tipo Gubia para exponer la pulpa dental. La pulpa fue aislada, cortada y digerida con 1 mg/mL de colagenasa tipo I durante 30 minutos. La colagenasa fue inactivada por dilución y la suspensión celular fue centrifugada a 300xg por 10 minutos. Las células fueron cultivadas en medio UltraMEM+ITES (Lonza) suplementado con 2% FBS, 10 µg/ml Factor de crecimiento epitelial (EGF), 10 µg/mL Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), 2 µg/ml Factor de crecimiento de fibroblasto 2 (FGF-2) y 10 µg/mL Gentamicina (Lonza).

6.2 Células pluripotentes embrionarias

Las Células Pluripotentes Embrionarias Humanas (hESC) fueron adquiridas de la empresa ESI-BIO (catalogo ES-700) y cultivadas en medio TeSR-E8 (Stem Cell Technologies). Las células fueron subcultivadas utilizando 0.1% Colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich) seguido de una disgregación mecánica. Los fragmentos de colonias fueron colectados y sembrados en placas de cultivo cubiertas con Matrigel reducido en factores (Growth Factor Reduced-Matrigel, Corning).

6.3 Vectores lentivirales utilizados en el proyecto

Se utilizó el vector de empaque psPAX2 (Addgene) y el vector de envoltura pCMV-VSV-G (Addgene) para la construcción de vectores lentivirales. Para la determinación del título viral y como vector mock en algunos experimentos se utilizó el vector de transferencia pLenti_CMV_GFP_Puro (658-5) (Addgene). Para la reprogramación hacia el estado pluripotentes se utilizaron los vectores de transferencia pSIN4-EF2-O2S

portador de los cDNA de *OCT4* y *SOX2* (O2S) (Addgene), y pSIN4-CMV-K2M portador de los cDNA de *KLF4* y *MYC* (K2M) (Addgene). El vector de transferencia PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP, portador del promotor quimérico EOS (*early transposon promoter + Oct3/4 and Sox2 enhancers*) dirigiendo la expresión de GFP, fue utilizado como reportero para identificar colonias maduras de iPSC.

Para el silenciamiento de los efectores de Wnt - LEF1, TCF7, TCF7L1 y TCF7L2 - se utilizaron los siguientes vectores validados adquiridos de la empresa Sigma-Aldrich: TRCN0000020163 (LEF1 MISSION shRNA), TRCN0000021675 (TCF7 MISSION shRNA), TRCN0000232678 (TCF7L1 MISSION shRNA), TRCN0000262848 (TCF7L2 MISSION shRNA). Las secuencias de los shRNAs se describen en la **tabla anexa 1**. El análisis funcional de estos shRNAs se muestra en la **figura anexa 2**.

Para la sobre-expresión de TCF7L1, el ORF del plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK TCF7L1 (GenScript, clone ID: OHu11221) fue clonado en el vector pLenti-CMV-GFP-Puro utilizando los sitios de restricción XbaI y Sall. Para la sobre-expresión de TCF7, el ORF del plásmido pcDNA3.1+/C-(K)-DYK TCF7 (GenScript, clone ID: OHu21084) fue clonado en el vector pLenti-CMV-GFP-Puro utilizando los sitios de restricción XbaI y Sall.

Los vectores constitutivos pLenti-EOS-CMV-GFP-Puro and pLenti-EOS-CMV-TCF7L1-Puro fueron generados por transferencia del enhancer EOS del vector PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP utilizando primers específicos con sitios de restricción ClaI. El análisis funcional de los vectores se muestra en las **figuras anexas 3 y 4**. La orientación correcta del inserto fue verificada por PCR. Los primers utilizados para la clonación de los cDNA de TCF7 y TCF7L1 se muestran en la **tabla anexa 1**.

6.4 Generación de vectores lentivirales

Las partículas lentivirales fueron generadas por medio de la transfección por fosfato de calcio y un sistema de empaque de segunda generación. La transfección se realizó en células HEK293T (ATCC) a una confluencia del 80 al 90%. Las células fueron transfectadas con los vectores de envoltura y empaque pCMV-VSV-G y psPAX2, junto con un vector de transferencia, en una relación 1:3:4 respectivamente, sumando un total de 20 µg de DNA. Los precipitados fueron formados por medio del kit CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech), adicionados por goteo sobre el cultivo de HEK293T e incubado por 6-7 horas bajo condiciones estándar de cultivo celular. Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y cultivadas con DMEM/F12 suplementado con 10% SFB. El medio de cultivo con las partículas lentivirales fue colectado cada 12 horas por 3 ocasiones, clarificado por medio de filtros pirinola de 0.45 µm y mantenido a 4°C.

6.5 Generación de iPSC humanas

Para la generación de iPSC humanas mediada por lentivirus, los fibroblastos humanos de pase 3 a 10, o células mesenquimales de pase 3 a 5, se transdujeron con los sobrenadantes lentivirales durante 20 horas. Las células fueron infectadas con una combinación de los vectores O2S y K2M, y cultivadas en medio de expansión por 3 días. Del día 1 a 2 post-transducción las células fueron despegadas de la placa de cultivo por medio de Accutase (Sigma-Aldrich) y sembradas a una densidad de 2.5×10^4 células/cm² en placas cubiertas con Matrigel. Desde el día 3 post-transducción, las células se cultivaron en medio TeSR-E8. El medio de cultivo fue renovado diariamente. Del día 15

a 20, colonias individuales con morfología similar a células embrionarias se aislaron por medio del tratamiento con 0.1% de colagenasa tipo IV, y se sub-cultivaron en placas cubiertas con Matrigel. Las colonias se sub-cultivaron por 10 pasajes para establecer líneas de iPSC.

Para la reprogramación mediada por el virus no-integrativo Sendai, se utilizó el kit Cytotune 2.0 (Life Technologies) bajo el procedimiento recomendado por el fabricante. Las células fueron infectadas con los vectores Sendai a una densidad de 2×10^4 células/cm². Las células infectadas se cultivaron en medio de expansión hasta el día 3 y, posteriormente, en medio mTeSR-E8 como se describió en el párrafo anterior.

6.6 Ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina (AP)

La actividad de la fosfatasa alcalina fue detectada por medio del ensayo colorimétrico SigmaFast BCIP/NBT (Sigma) al día 20 post-transducción. Las células se fijaron rápidamente con PFA durante 10 segundos y luego se realizó un lavado con TBS. El reactivo SigmaFast BCIP/NBT fue adicionado a las células e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. El reactivo fue retirado y las células fueron lavadas con TBS. Las colonias positivas a AP (colonias azul oscuro) se contabilizaron utilizando un microscopio Olympus IX71 (Olympus Scientific Solutions, USA).

6.7 Análisis de expresión por RT-PCR y RT-qPCR

El RNA total se aisló utilizando TRIzol seguido de un tratamiento con DNAsa I (Invitrogen) y un lavado en columna utilizando el kit RNeasy (Qiagen). Las reacciones de RT-PCR se realizaron utilizando el kit One-step RT-PCR kit (Qiagen). Las reacciones

de RT-qPCR se llevaron a cabo utilizando el kit KAPA SYBR FAST (Kapa BioSystems) en un equipo RotorGene 6000 (Corbett Life Science). El análisis de datos fue realizado utilizando el software Roto-Gene Q (Qiagen) y la expresión relativa (“fold change”) fue calculada utilizando el método de calibración de eficiencias de Pfaffl [38]. Los *primers* utilizados se encuentran listados en la **Tabla Anexa 1**.

6.8 Análisis por citometría de flujo

El análisis de citometría se realizó en un equipo FACSCalibur (Becton Dickinson). Los anticuerpos conjugados utilizados para citometría de flujo se encuentran listados en la **Tabla Anexa 2**. La inmuno-tinción se realizó según la recomendación del manual técnico de cada anticuerpo. Para la detección de antígenos intracelulares se fijaron las células con paraformaldehído al 2% y se permeabilizaron con Perm Buffer III (Becton Dickinson) durante 20 minutos en hielo. Las células fueron lavadas 3 veces con PBS y luego se incubó el anticuerpo conjugado durante 30 minutos a 4°C, en solución de bloqueo compuesta por PBS, Albúmina sérica bovina (BSA) al 1% y 2 mM de EDTA. Luego de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y adquiridas en un citómetro FACScalibur (Becton Dickinson). Para la adquisición y análisis de datos se utilizaron los programas CellQuest y (Becton Dickinson) y FlowJo v10.0.7 (FlowJo, LLC).

6.9 Inmunocitoquímica

Las células se sembraron en *chamber slides* (Labtek) cubiertos con Matrigel. Las células se fijaron con 4% PFA durante 15 minutos y luego se permeabilizaron con 0.2% de Triton durante 10 minutos. Luego las células fueron bloqueadas con BSA al 1% y Triton

al 0.2% por 30 minutos, a temperatura ambiente. Luego el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo fue adicionado e incubado durante 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados, el anticuerpo secundario se adicionó en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego de 3 lavados con PBS, los núcleos fueron teñidos con una solución de Hoechst 33342 (Thermo Scientific). Las muestras fueron montadas utilizando solución VectaShield, cubriéndolos con un cubre-objetos. Los análisis de epi-fluorescencia fueron realizados por medio de un microscopio Olympus IX71 y el programa QCapture Suite. Los análisis por microscopía confocal fueron realizados utilizando un microscopio Leica TCS SP8 AOBS y el programa Leica Application Suite X software. Los anticuerpos utilizados para inmunocitoquímica se muestran en la **Tabla Anexa 2**.

6.10 Análisis por microarreglos

Para el análisis por microarreglos se utilizó la librería “A” de MWGBiotech disponible en el laboratorio de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. El protocolo de preparación de la librería, la plataforma del chip y la preparación de las muestras se detalla en la base de datos NCBI-GEO con el número de acceso GSE103491. Las muestra de RNA total de fibroblastos, iPSC y de colonias compactas y no compactas fueron utilizadas para la preparación del microarreglo. Se corrieron dos replicas técnicas por cada gen en cada muestra y el promedio de la intensidad de fluorescencia fue normalizado y transformado a valores de z-score. La clasificación funcional de los genes con una diferencia de z-score (*z-ratio*) $>\pm 1.5$ [39] fue realizada utilizando la herramienta bioinformática DAVID (Database

for Annotation, Visualization and Integrated Discovery, <https://david.ncicrf.gov/>). Los grupos de genes con una relación funcional asociada a la diferenciación temprana y a rutas de señalización celular fueron arreglados en un mapa de calor utilizando el programa GenePattern.

6.11 Tamizaje con moléculas pequeñas

Los fibroblastos humanos se transdujeron con el vector PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP (EOS-GFP) durante 24 horas por 2 días consecutivos. Las células con el vector EOS-GFP se infectaron con los vectores O2S y K2M como fue detallado previamente y posteriormente se sub-cultivaron en placas de 96 pozos cubiertas con Matrigel a una densidad de 2.5×10^4 células/cm². Las células se cultivaron inicialmente en medio de expansión hasta el día 5 y luego las células fueron cultivadas en medio TeSR-E8. Desde el día 7 post-transducción, las células fueron tratadas con una de 6 diferentes moléculas inhibitoras descritas en la **Tabla Anexa 3**. El número total de colonias, así como las colonias positivas a GFP fueron contabilizados por medio de microscopía confocal y de epi-fluorescencia. El RNA total de cada tratamiento fue aislado para su análisis por medio de RT-qPCR al día 20 post-transducción.

6.12 Ensayo de formación de teratomas

Alrededor de 2×10^6 iPSC se resuspendieron en 200 μ L de Matrigel en una dilución 1:2 con PBS. La mezcla celular fue trasplantada de manera subcutánea en la zona de la cadera de ratones FoxN1nu de 4 semanas de edad. Luego de 8 semanas, los teratomas fueron disecados, fijados y deshidratados por gradiente de sacarosa. Los teratomas

fueron seccionados por medio de un criostato y posteriormente las secciones fueron montadas en laminillas porta objetos. Las muestras montadas fueron deshidratadas por gradiente de etanol (100%, 96%, 80% y 50%). Las laminillas fueron sumergidas luego en Hemtoxilina Harris por 3 minutos y lavadas con agua corriente. Luego, las laminillas fueron tratadas con hidróxido de amonio al 5% por 1 minuto 30 segundos y rápidamente sumergidas en 1% de alcohol ácido (1% HCl y 70% etanol) durante 2 ocasiones por 2 segundos. Luego las laminillas fueron lavadas en agua destilada por 3 minutos. Finalmente, las laminillas fueron sumergidas en solución alcohólica de eosina (0.25% eosina, 80% etanol, 0.5% ácido acético) por 30 segundos y posteriormente las muestras fueron rehidratadas por un gradiente descendente de etanol (100%, 96% y 70%). Las muestras fueron clarificadas con xileno antes de su análisis por medio de microscopía de contraste de fases.

6.13 Ensayos de diferenciación

Para la diferenciación dirigida de las células pluripotentes se utilizaron métodos de diferenciación en monocapa. Para la diferenciación hacia endodermo definitivo, las células fueron tratadas por 24 horas con un medio definido compuesto por DMEM/F12 suplementado con 100 ng/ml Activin A (Invitrogen), 2 μ M CHIR99021 (Sigma-Aldrich), 0.1 μ M Wortmannin (Sigma-Aldrich) y suplemento NS21 sin insulina. Luego de 24 horas el medio fue cambiado por DMEM/F12 suplementado con 100 ng/ml Activin A (Invitrogen), 0.2 μ M DMH-1 (Sigma-Aldrich) y NS21 sin insulina. Las células fueron mantenidas en este medio por 48 horas con cambio de medio diario.

Para la diferenciación mesodermal, las iPSC a un 90% de confluencia fueron expuestas al medio StemLine (Sigma-Aldrich) suplementado con 40 ng/ml BMP-4 (Peprotech), 1X de Insulina-Transferrina-Selenio (ITS, Gibco) y 10 ng/ml FGF-2 (Peprotech). Las células fueron mantenidas en este medio con cambio de medio diario durante 3 días.

Para la diferenciación neural, las iPSC fueron cultivadas hasta un 90% de confluencia y fueron expuestas al medio StemDiff Neural Induction Medium (Stem Cell Technologies) por 3 días. Luego las células fueron levantadas del plato de cultivo por medio del tratamiento con Colagenasa tipo IV al 0.1%. Las células fueron sub-cultivadas 1:2 en platos cubiertos con Matrigel y en medio StemDiff durante 3 días más, o hasta observar la formación de rosetas.

6.14 Western blot

Las células fueron lavadas con PBS y despegadas del plato de cultivo por medio de tratamiento con tripsina al 0.25%. Las células fueron lavadas por centrifugación a 4°C y el pellet celular fue lisado con buffer RIPA suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche). Las células fueron incubadas en medio de lisis durante 5 minutos en hielo. Posteriormente la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C para eliminar el debris. El sobrenadante proteico fue aislado y una alícuota fue separada para su cuantificación. El restante de lisado fue mezclado en relación 1:1 con buffer de carga 2X (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0.01% azul de bromofenol). La mezcla fue homogenizada y hervida a 95°C por 10 minutos. Cantidades iguales de proteína fueron corridas por SDS-PAGE y transferidas a membranas de PVDF (BioRad). Luego de ser bloqueadas en leche al 5%

en TBST, las membranas fueron cubiertas con el anticuerpo primario (anti- β catenina activa no-fosforilada en Ser37 y Thr41, clona 8E7, Merck-Millipore; o GAPDH, Merck-Millipore) y luego con el anticuerpo secundario (*Horseradish Peroxidase* anti IgG de ratón; Life technologies) diluidos en solución de bloqueo. Las membranas fueron luego reveladas por el método de quimioluminiscencia (Pierce) y visualizadas en una cámara Mini HD6 (UVITEC Cambridge).

6.15 Análisis de intensidad de la señal fluorescencia en las preparaciones inmunocitoquímicas

La intensidad de fluorescencia de la señal de Brachyury fue analizada por medio del programa de análisis y procesamiento de imágenes LASX (Leica). Para esto se analizaron imágenes de colonias marcadas con un anticuerpo primario anti-Brachyury (Abcam) y un secundario Alexa-546 Anti-IgG de conejo, al día 20 post-transducción, en los tratamientos control, tratado con Wnt3a y tratado con IWR-1, a partir del día 7 al día 20 post-transducción. La señal fue normalizada respecto a la señal de fondo de células no-reprogramadas.

6.16 Análisis estadístico

Los valores fueron expresados como promedio con error estándar (SEM). La significancia estadística fue calculada en al menos 3 réplicas biológicas. Se realizó la prueba *Student's t-test* o ANOVA para analizar 2 o más grupos de medias, respectivamente, utilizando el programa Prism5 GraphPad. La significancia estadística de la ANOVA fue calculada utilizando la prueba de Tukey.

7. Resultados

7.1 Los fibroblastos humanos en proceso de reprogramación activan un programa de diferenciación mesendodermal específico de la fase de maduración

La reprogramación de fibroblastos se llevó a cabo por medio de la transducción de los vectores lentivirales O2S y K2M portadores de los cDNA de los genes *POU5F1* y *SOX2*, y de *KLF4* y *MYC*, respectivamente. Pudimos observar que alrededor de los días 2 y 7 post-transducción, las células presentan cambios morfológicos que sugieren la adquisición de un estado epitelial (**Figura Anexa 1**). Durante esta etapa, también observamos que las células epiteliales proliferan activamente formando grupos que posteriormente tienden a compactarse y formar colonias de células iPS (Figura 5A y 5B). Adicionalmente, pudimos observar que algunas colonias en formación no se compactan sino que adquieren un fenotipo diferenciado, similar a la morfología de células epiteliales del mesendodermo (Figura 5B). Por medio de inmunocitoquímica pudimos observar que las colonias de células no-compactas siguen siendo positivas a los marcadores de superficie SSEA4 y Tra1-60, pero presentan una baja expresión del factor de pluripotencia Nanog (Figura 5C). Esto sugiere que las colonias en la fase de maduración están siendo dirigidas hacia un estado de diferenciación temprano, probablemente inducido por señales que especifican la formación del mesendodermo del surco primitivo [19]. Por medio de estudios moleculares utilizando microarreglos de 10.000 genes comparando RNA total de colonias compactas, no compactas e iPSC maduras respecto al perfil de expresión de fibroblastos no-reprogramados (Día 0) (Figura 5D), pudimos observar que las colonias no compactas presentan una expresión notable de genes asociados a la diferenciación embrionaria

temprana, incluyendo genes mesendodermiales como *Brachyury (T)*, *GATA2*, *GATA4*, *FOXA1* y *HNF1B* (Figura 5E). Así mismo pudimos encontrar grupos de genes asociados a rutas de señalización celular como BMP, WNT, TGF- β y PI3K/Akt particularmente aumentados en las colonias diferenciadas (figura 5F).

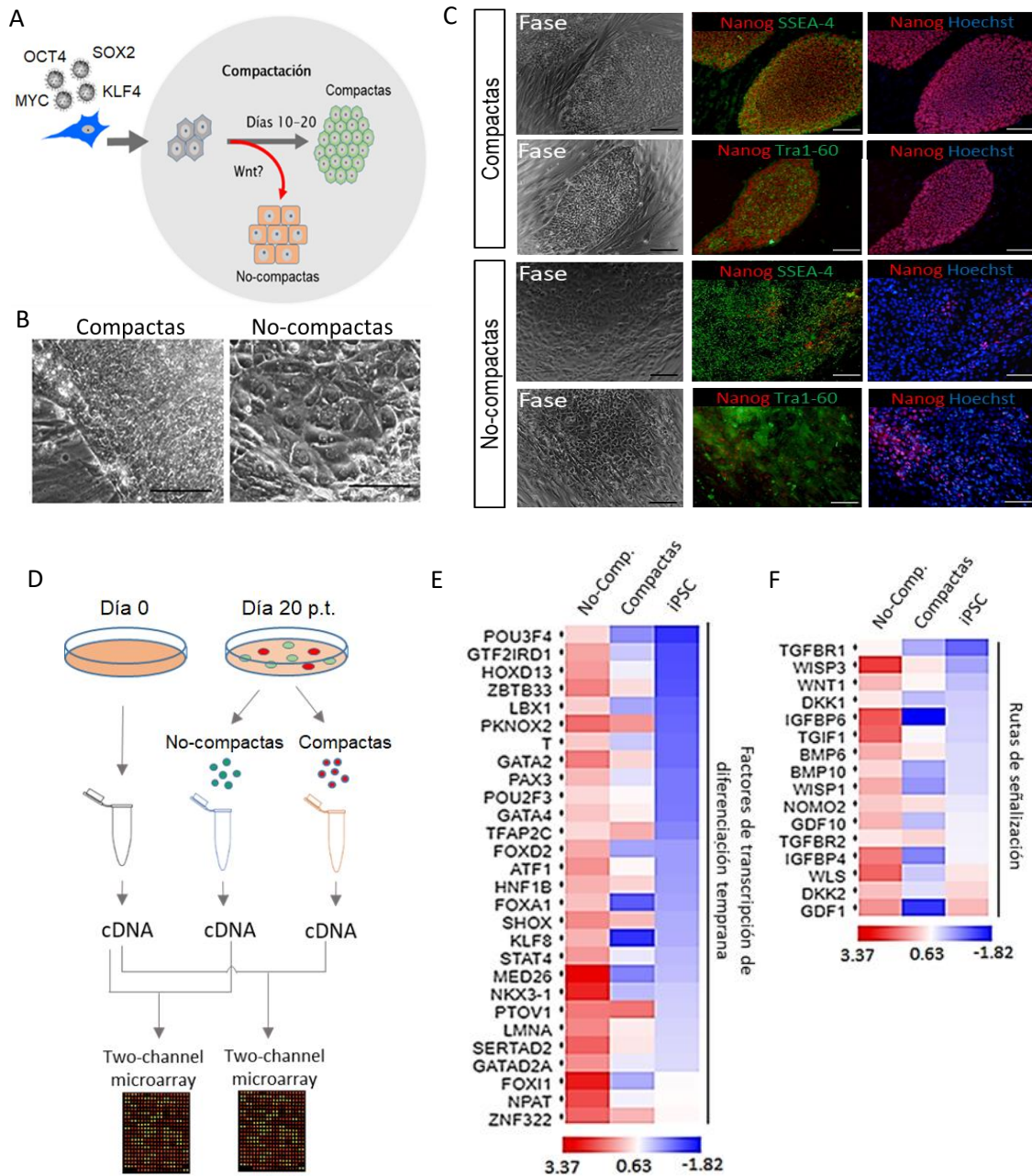


Figura 5. Colonias no-compactas con morfología diferenciada aparecen durante la fase de maduración y presentan un perfil de expresión de genes asociado al mesendodermo del surco primitivo. A) Esquema

representativo de la aparición de colonias no-compactas y compactas, la posible implicación de la señal de la ruta Wnt en este proceso. B) Caracterización morfológica e inmunofenotípica de las colonias compactas y no-compactas al día 20 post-transducción. Barra = 100 μm . C) Inmunocitoquímica de las colonias compactas y no compactas para la expresión de Nanog, Tra1-60 y SSEA4. Barra 100 μm . D) Esquema del experimento por medio de microarreglos para comparar el patrón de expresión de genes entre colonias compactas y no-compactas. E) Mapa de calor de un *cluster* de genes diferencialmente expresados y funcionalmente relacionados con la diferenciación temprana. En la parte inferior del mapa de calor se encuentra la escala de z-score que indica el nivel de expresión. F) Mapa de calor de un *cluster* de genes diferencialmente expresados y funcionalmente relacionados con rutas de señalización celular. En la parte inferior del mapa de calor se encuentra la escala de z-score que indica el nivel de expresión.

Para confirmar estos resultados, realizamos un análisis de expresión cuantitativa de genes relacionados con el mesendodermo (*GDF3*, *T*, *GSC*, *FOXA2*, *FOXA1*, *BMP4* y *NODAL*) y del ectodermo (*PAX6* y *SOX1*) al día 20 de reprogramación. Los resultados validaron la expresión significativa de los genes principales que caracterizan al mesendodermo: *GSC*, *FOXA2* y *T*. Un análisis de expresión de los genes *GSC* y *T* a lo largo del proceso de reprogramación nos permitió verificar que la inducción de estos genes es específica de la fase de maduración (Fig. 6C), justo cuando la expresión endógena de *POU5F1* (*OCT4*) y SSEA-4 (Figura 6C y 6B) es notable. Estos hallazgos nos permitieron sugerir que la formación de colonias no compactas podría estar asociada a una diferenciación mesendodermal. Si esto es cierto, la expresión de genes mesendodermales identificada por Takahashi y colaboradores podría estar relacionada con la presencia de señales que promueven la diferenciación y que activan el programa mesendodermal, lo cual más que ser un requerimiento para inducir la pluripotencia podría implicar una barrera para la maduración de las colonias.

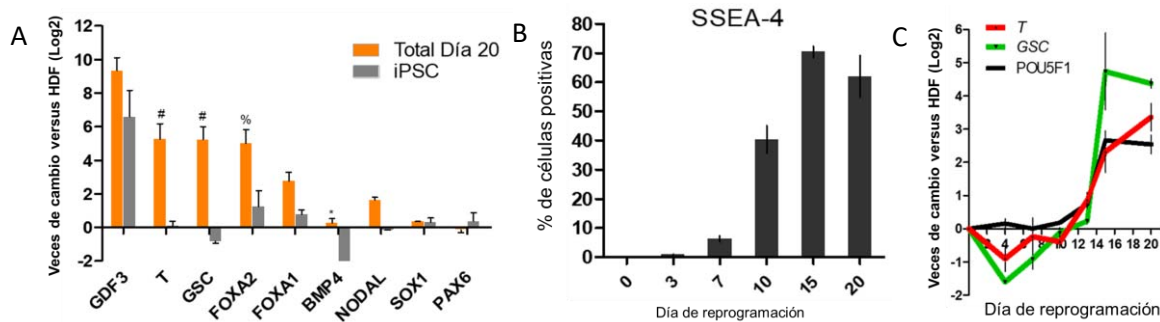


Figura 6. Genes específicos del mesendodermo se expresan durante la fase de maduración. A) Análisis de la expresión de genes mesendodermiales (*GDF3*, *T*, *GSC*, *FOXA2*, *FOXA1*, *BMP4*, *NODAL*) y ectodermiales (*SOX1*, *PAX6*) por medio de RT-PCR cuantitativo al día 20 de reprogramación. B) Análisis de la expresión del marcador de pluripotencia SSEA4 por medio de citometría de flujo, a diferentes tiempos post-transducción. C) Análisis de expresión por RT-PCR cuantitativo del gen de pluripotencia *POU5F1* (*OCT4* endógeno) y los genes mesendodermiales *T* y *GSC*, a diferentes tiempos post-transducción.

7.2 La expresión de genes mesendodermiales se correlaciona con un aumento en la actividad de la ruta Wnt y de la expresión del gen *WNT3*

Para explorar de manera inicial la posible implicación de la ruta canónica de Wnt durante la reprogramación, realizamos un análisis por citometría de flujo de la actividad de β -catenina a diferentes tiempos durante las dos fases de reprogramación (Figura 7A). Pudimos observar que la actividad de la ruta se ve aumentada en un cierto porcentaje de células durante la fase de maduración (después del día 7 post-transducción). Un análisis por RT-PCR de distintos ligandos de la ruta canónica a diferentes tiempos junto con el análisis del blanco de la ruta Wnt, *AXIN2* (Figura 7B), revelaron que existe una regulación positiva y transitoria del gen *WNT3* durante la fase de maduración. Es importante señalar que *WNT3* es un gen asociado al surco primitivo y posiblemente es la señal que regula la especificación mesendodermal [40, 41]. El análisis temporal de un blanco importante de la ruta Wnt, *AXIN2*, nos permitió observar que esta regulación positiva de *WNT3* se

correlaciona con un aumento en la actividad de la ruta (Figura 7C) y que este aumento también se correlaciona con la expresión del gen mesendodermal *Brachyury* (*T*). Estos resultados son consistentes con el aumento de expresión endógena de *OCT4* y del gen mesendodermal Goosecoid (*GSC*) analizados previamente (Figura 6C).

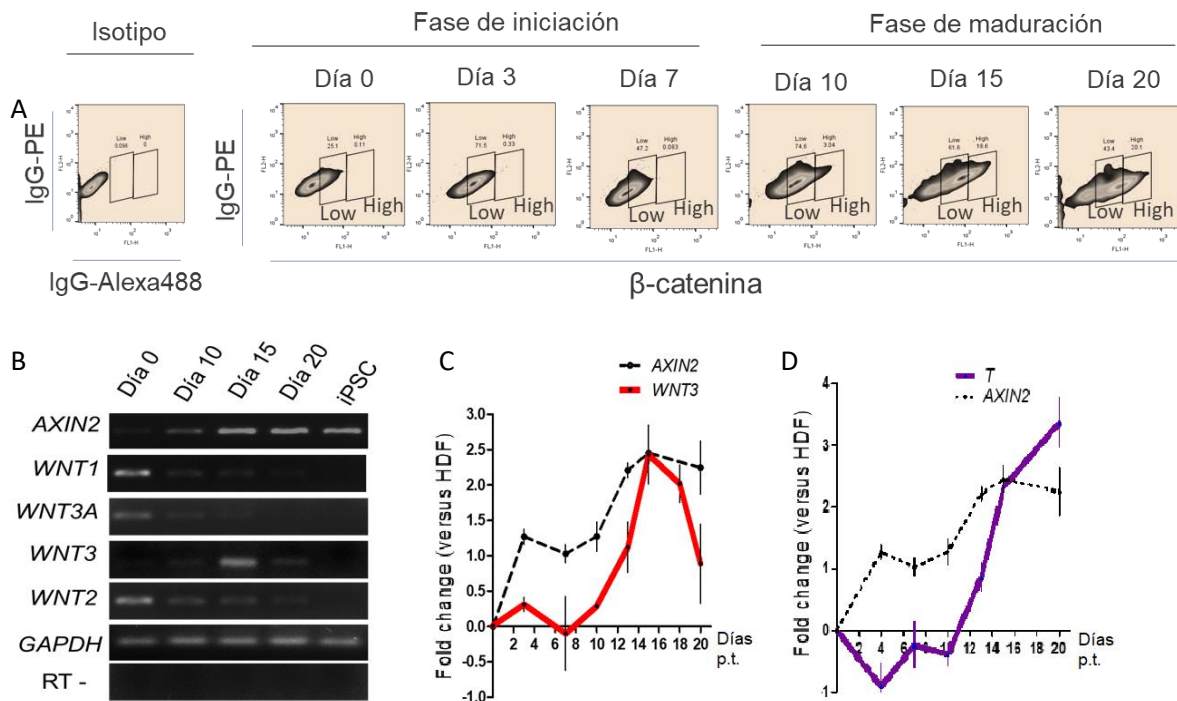


Figura 7. La actividad de la ruta Wnt y la expresión de *WNT3* son reguladas positivamente durante la fase de maduración. A) Porcentaje de células positivas a β -catenina activa (anticuerpo específico para la región no-fosforilada en Ser37 y Thr41) durante la fase de iniciación y maduración por medio de citometría de flujo. Las poblaciones con una alta (High) o baja (Low) señal de fluorescencia fue normalizada con un control de células tratadas con Wnt3a a 50ng/ml. Se utilizó el anticuerpo de isotipo IgG-PE para normalizar la señal de fluorescencia en el eje Y. B) Análisis por RT-PCR de los genes de ligandos de Wnt canónico así como del blanco de la ruta *AXIN2*. C) Análisis por RT-qPCR de *AXIN2* y *WNT3* a diferentes tiempos luego de la transducción. (N=2). D) Análisis por RT-qPCR de *AXIN2* y *T* a diferentes tiempos luego de la transducción (N=3). Los datos se muestran como veces de cambio (*Fold change*) versus el control de fibroblastos no-reprogramados (Log2). La expresión relativa fue normalizada con la expresión de GAPDH.

Estos resultados nos llevaron a la hipótesis de que la ruta canónica de Wnt puede estar implicada en la expresión de los genes mesendodermales y probablemente sobre la diferenciación de las colonias durante la fase de maduración. Por otro lado, y tomando en cuenta que la formación de colonias depende directamente de la epitelización inducida durante la fase de iniciación, es probable que el efecto positivo de la activación de la ruta Wnt sobre la formación de colonias observado por Ross *et al* sea exclusivo de la fase de iniciación. Para poder estudiar esta posibilidad, a continuación analizamos el efecto de la activación e inhibición de la ruta Wnt sobre el número de colonias y luego verificamos si este efecto se correlaciona con la expresión de genes mesendodermales durante la fase de maduración.

7.3 La activación e inhibición de la ruta Wnt promueve la formación de colonias de una manera específica de cada fase

Para poder estudiar los efectos de la activación o inhibición de la ruta Wnt sobre el fenómeno de la reprogramación celular se utilizó por un lado la molécula inhibidora IWR-1, un conocido estabilizador de Axina la cual promueve la degradación de β -catenina. Por otro lado se utilizó Wnt3a, un ligando que activa la ruta canónica de Wnt. Para confirmar la funcionalidad de la molécula IWR-1 se realizó un análisis de la cantidad de β -catenina no-fosforilada por medio de western-blot, o la inducción de la expresión de AXIN2 por RT-qPCR, en presencia o en ausencia de IWR-1 y en presencia o ausencia de Wnt3a en cultivos de fibroblastos mantenidos bajo condiciones libres de suero (Figura 8). Estas condiciones de cultivo fueron idénticas a las condiciones utilizadas para la reprogramación celular. Los resultados observados en este análisis inicial nos permitieron verificar que la molécula

IWR-1 es funcional y eficiente para inhibir la actividad de la ruta aún en presencia de Wnt3a.

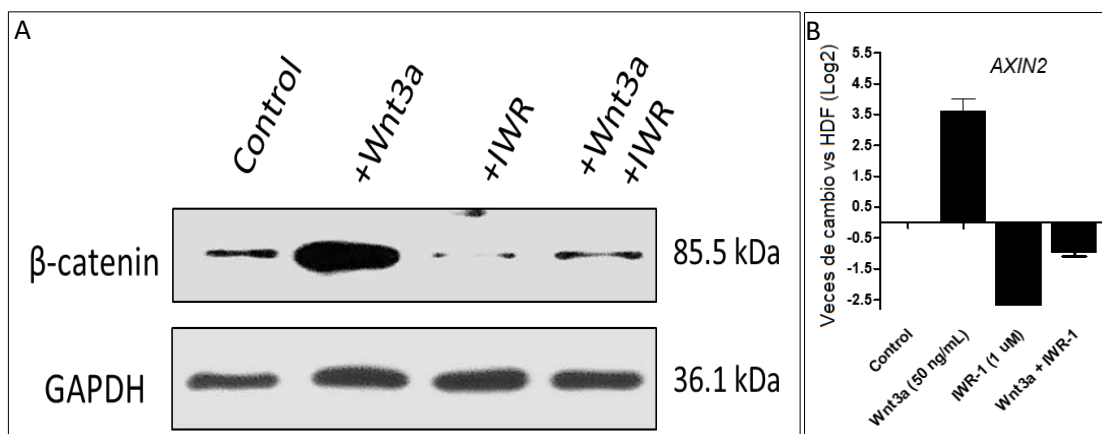


Figura 8. La molécula IWR-1 es un inhibidor eficiente de la ruta canónica de Wnt. A) Análisis de la presencia de β -catenina no-fosforilada en fibroblastos (HDF) cultivados durante 24 horas en un medio sin suero con y sin IWR-1 (1 μ M), y tratados con 50 ng/mL Wnt3a durante 8 horas. La cantidad de GAPDH fue analizada como control de carga. N=2. B) Los cultivos en A fueron también analizados por medio de RT-PCR cuantitativo para medir la expresión del blanco *AXIN2*. La expresión fue relativa a la expresión del control no-tratado y fue normalizada con la expresión de *GAPDH*. N=2.

Uno de los efectos más estudiados durante la reprogramación es la formación de colonias o la eficiencia final en el número de colonias positivas a fosfatasa alcalina. Ensayos preliminares nos permitieron observar que la activación de la ruta Wnt desde etapas tempranas del proceso (día 2-3 post-transducción) promueve la formación de colonias pero las colonias van tomando morfologías poco homogéneas, y un gran número de ellas degeneran en colonias no-compactas compuesta por células de morfología poligonal (Figura 9A). Por otro lado, la inhibición de la ruta por medio del inhibidor IWR-1, aunque no promovió la formación de colonias, promovió la compactación de las colonias (Figura 9B), eliminando casi por completo la aparición de colonias con células poligonales.

Con el fin de confirmar estas observaciones, se realizaron experimentos adicionando ya sea Wnt3a como activador de la ruta, o IWR-1 como inhibidor, a diferentes tiempos durante la reprogramación de HDF. Al día 20 post-transducción (p.t.) se cuantificó el número relativo de colonias positivas a fosfatasa alcalina así como el número relativo de colonias compactas y diferenciadas (no-compactas). Los resultados obtenidos con la adición de Wnt3a muestran un claro efecto positivo al adicionar el ligando durante la fase temprana de la reprogramación (día 3 a 11) (Figura 9C). Por otro lado, la adición de Wnt3a no tiene un efecto significativo durante fases intermedias ni tardías, indicando que los primeros 7 días de reprogramación parecen ser críticos para su efecto sobre la formación de colonias. Resultó interesante observar que el tratamiento con Wnt3a durante la fase de maduración promueve la aparición de colonias diferenciadas, mientras que los tratamientos que se limitaron a la fase de inicio no se diferenciaron notoriamente del control (Figura 9D).

La inhibición de la ruta por medio de IWR-1 tuvo resultados interesantes no descritos previamente. Pudimos observar que la adición del inhibidor desde o durante la fase de iniciación no tiene un efecto positivo sobre el número de colonias, pero cuando es adicionado desde el día 7 u 11 en adelante, es capaz de incrementar significativamente el número de colonias (Figura 9E) y al mismo tiempo logra reducir dramáticamente el número de colonias diferenciadas no-compactas (Figura 9F).

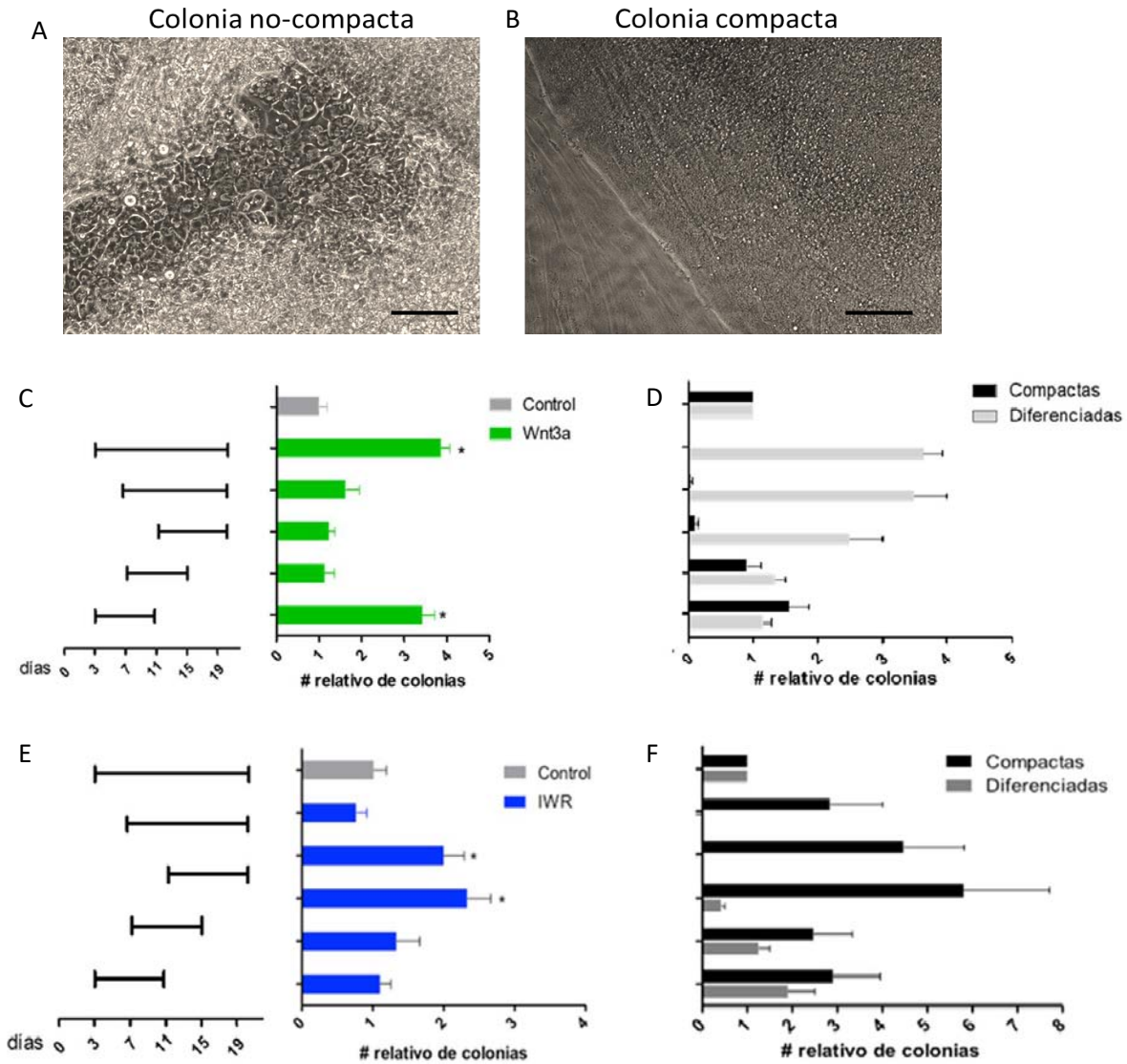


Figura 9. Efecto de la activación e inhibición de la ruta Wnt sobre el número de colonias. A) Morfología representativa de las células en una colonia no-compacta. Se pueden observar células grandes y poligonales dentro de la colonia. Barra=100 μ m. B) Morfología representativa de una colonia compacta. Barra=100 μ m. C) Número de colonias relativo al control al día 20 post-transducción (p.t.) luego de la adición de Wnt3a durante los tiempos indicados (izquierda). D) Número de colonias compactas y diferenciadas (no-compactas) relativo al control, luego de los tratamientos descritos en A. E) Número de colonias relativo al control, al día 20 p.t. luego de la adición del inhibidor IWR-1 durante los tiempos indicados en las barras en A. F) Número relativo al control de colonias compactas y diferenciadas al día 20 p.t. luego de los tratamientos descritos en C, durante los tiempos indicados en B. El número relativo de colonias en todas las figuras fue normalizado de manera independiente, en relación a cada control.

7.4 La activación de la ruta Wnt induce la expresión de genes mesendodermales durante la fase de maduración del proceso de reprogramación

La diferenciación mesendodermal puede ser inducida por la activación conjunta de diferentes rutas durante el desarrollo. Como una estrategia inicial para verificar el efecto de diferentes rutas sobre la expresión de genes mesendodermales en la reprogramación de fibroblastos, realizamos un tamizaje de moléculas orgánicas moduladoras de distintas rutas de señalización celular tales como Wnt, BMP, TGF- β y MEK/ERK (Figura 10A, **Tabla anexa 3**). Dado que la expresión de los genes mesendodermales es inducida durante la fase de maduración, las moléculas fueron adicionadas a partir del día 7 hasta el día 20 post-transducción. Como marcador del efecto de las moléculas, se analizó la expresión del gen de Brachyury (*T*) al día 20 luego de la inducción de la reprogramación. Los resultados del tamizaje revelaron que únicamente la inhibición o activación de la ruta Wnt con las moléculas IWR-1 o CHIR99021, respectivamente, son capaces de alterar la expresión de Brachyury al analizarla al día 20 post-transducción. La inhibición específica de la ruta por medio de IWR-1 inhibió casi por completo la expresión de *T* ($n=2$), mientras que la activación indirecta de la ruta por medio de CHIR99021, un inhibidor de GSK3 (α y β), aumentó la expresión de *T* más del doble (Figura 10B).

Con el fin de validar y demostrar el efecto de la activación e inhibición de la ruta Wnt sobre la expresión de varios genes mesendodermales durante la fase de maduración, se realizaron experimentos utilizando el activador de la ruta canónica Wnt3a, o bien el inhibidor específico IWR-1. Pudimos observar que la adición de Wnt3a aumenta significativamente la expresión de los genes mesendodermales *T*, *GSC*, *NODAL* y *FOXH1*,

mientras que el inhibidor IWR-1 reduce dicha expresión excepto en el caso de *FOXH1* (Figura 10C). Es importante señalar que *FOXH1*, es un factor expresado en células pluripotentes epiblasticas como es el caso de las PSC humanas. Resulta interesante observar que este gen no se ve alterado por la adición del inhibidor de Wnt. Esto sugiere que la inhibición de esta ruta no perturba la pluripotencia, lo cual se confirma por la expresión endógena de los genes *POU5F1* (*OCT4*), *NANOG* y *SOX2*. Por el contrario, fue interesante observar que la adición de Wnt3a, si bien aumenta la expresión de *OCT4*, disminuye la expresión de *SOX2*. Esta perturbación en la expresión de genes del circuito es consistente con la especificación del surco primitivo la cual se ve favorecida por el aumento en la expresión de *OCT4* y la disminución de *SOX2*, el cual especifica el ectodermo [42]. De manera importante, los resultados observados por medio de RT-qPCR fueron consistentes con el análisis inmunocitoquímico para el factor *T* (Figura 10D). Adicionalmente, pudimos verificar que el tratamiento con el inhibidor IWR1 promueve la compactación de las colonias (Figura 10E) mientras que el tratamiento con Wnt3a no solo induce una morfología diferenciada en las colonias sino que además reduce la señal de fluorescencia del reportero de pluripotencia EOS-GFP (Figura 10F), lo cual sugiere que Wnt interfiere con la maduración de las colonias hacia un estado pluripotente completo.

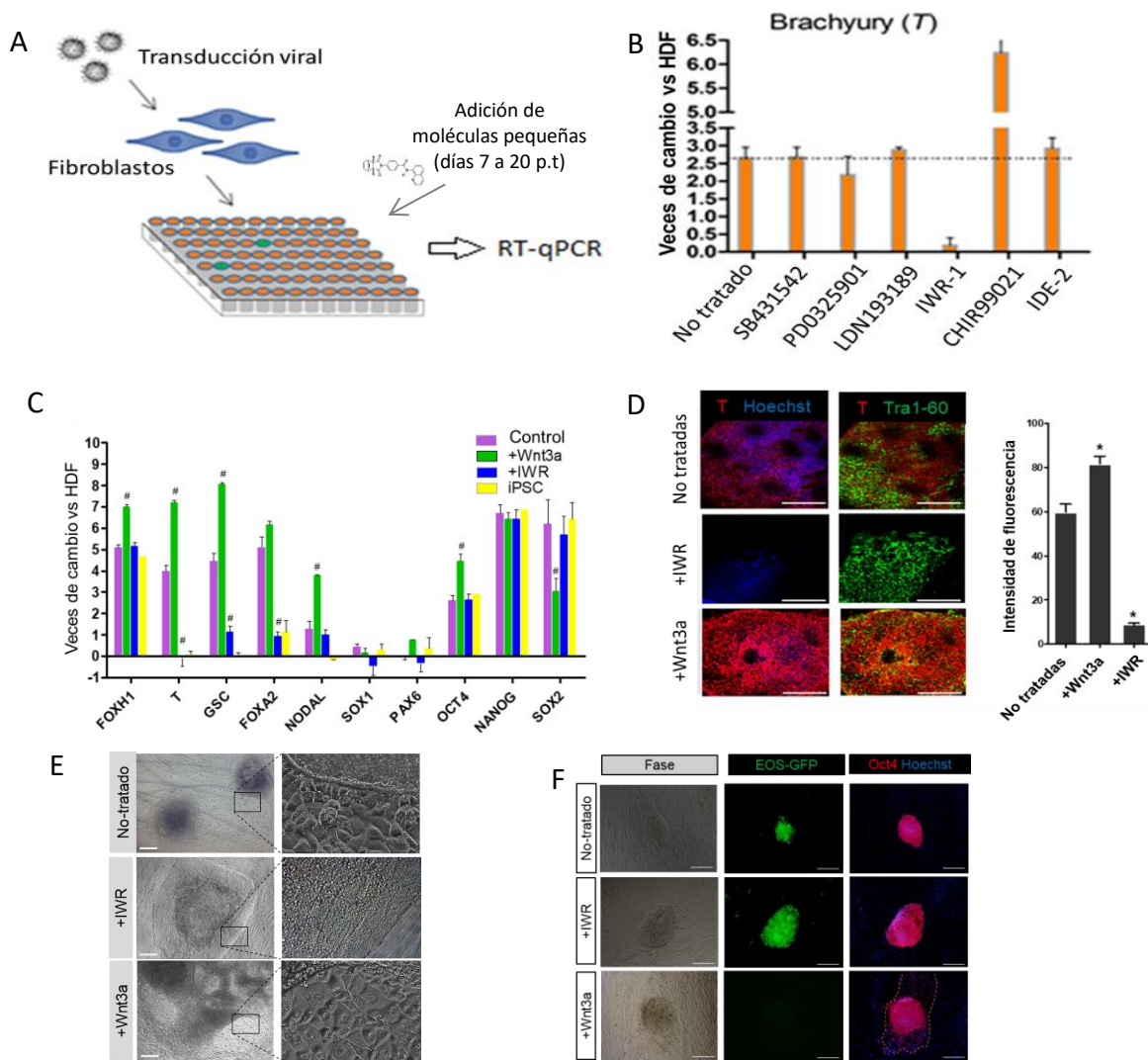


Figura 10. La activación de la ruta Wnt es responsable de la expresión de los genes mesendodermiales durante la reprogramación e interfiere con la reprogramación completa de las colonias. A) Esquema experimental del tamizaje de moléculas moduladoras de rutas de señalización celular durante la reprogramación. B) RT-qPCR para el gen mesendodermial Brachyury, al día 20 post-transducción bajo los diferentes tratamientos (N=2). C) RT-qPCR para genes de mesendodermo, ectodermo y pluripotencia, al día 20 post-transducción en cultivos tratados con Wnt3a, IWR o en cultivos No-tratados (Control). Se analizó la expresión de estos genes en iPSC como control. (N=3). D) Análisis inmunocitoquímico de la expresión de *T* y Tra1-60 en cultivos descritos en C. A la derecha se muestra el análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia para la marca de *T*. (N=4). E) Análisis morfológico de las colonias en los cultivos descritos en C. F) Análisis de la señal de fluorescencia del reportero de pluripotencia EOS-GFP y de la marca de OCT4 en colonias representativas en los cultivos descritos en C.

7.5 La inhibición de la ruta Wnt por medio de IWR-1 permite la derivación de líneas de iPSC.

Como prueba funcional del proceso de reprogramación se aislaron colonias provenientes de cultivos control, tratados con IWR-1 y tratados con Wnt3a, y las cultivamos bajo condiciones de expansión de células pluripotentes humanas, libres de células alimentadoras, en placas cubiertas con Matrigel. Desde los primeros días luego del pase pudimos observar diferencias morfológicas en las células tratadas con Wnt3a. Fue evidente en estos cultivos la aparición de células grandes con bordes brillantes dentro de las colonias, con una morfología muy parecidas a las células mesendodermales no compactas observadas durante el proceso de reprogramación (Figura 11A). Por otro lado, las colonias aisladas de los cultivos tratados con IWR-1 y los cultivos control tuvieron una morfología compacta durante el primer pase y proliferaron lo suficiente como para realizar un segundo pase. Las colonias de los cultivos tratados con Wnt3a también fueron subcultivadas bajo las mismas condiciones. Luego de 3 días de cultivo, la morfología de las células de los cultivos control y los tratados con IWR-1 mantuvieron un estado compacto comparable con células pluripotentes embrionarias (Figura 11A, pase #2). Por otro lado, las colonias de los cultivos tratados con Wnt3a tuvieron una morfología que sugiere diferenciación celular. El análisis por inmunofluorescencia de los cultivos al pase #2 confirmó que las colonias de los cultivos control y tratados con IWR-1 mantienen la expresión de las proteínas OCT4 y TRA1-60, mientras que las colonias de los cultivos tratados con Wnt3a pierden la expresión de estos marcadores en el pase #2 (Figura 11B).

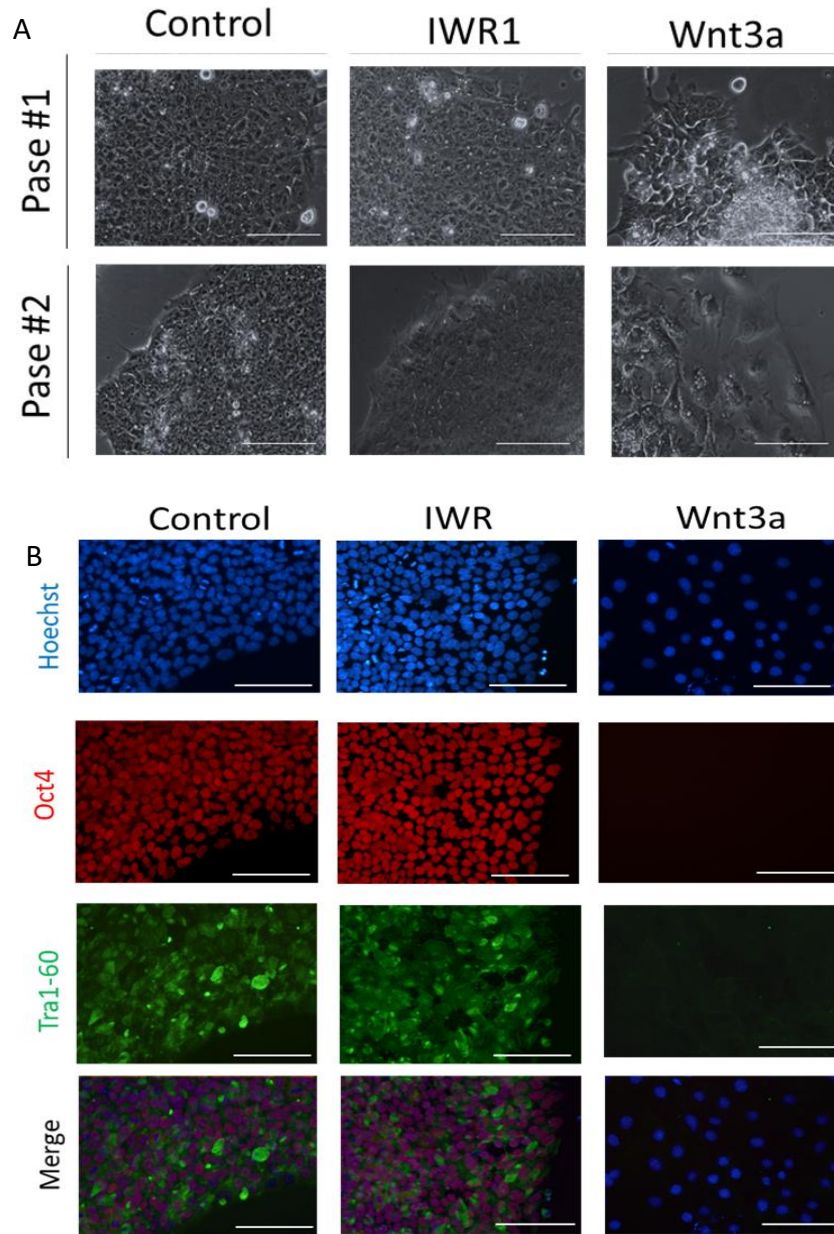


Figura 11. Análisis morfológico e inmunofenotípico de las colonias luego de ser aisladas de los cultivos control, tratados con IWR-1 y tratados con Wnt3a. A) Análisis morfológico de las colonias aisladas en el pase 1 y 2. B) Análisis inmunofenotípico para la expresión de OCT4 y Tra1-60 de las colonias en el pase 2. Barra=100 μ m.

De las colonias control y tratadas con IWR-1 pudimos mantener cultivos estables y pudimos generar líneas de iPSC con una morfología típica de células pluripotentes humanas (Fig. 12A). El análisis de expresión de genes inducidos por el proceso de

reprogramación como el gen *ZFP42* y el mismo gen *NANOG* nos permitió verificar la funcionalidad del circuito de pluripotencia (Fig. 12B). Así mismo, fue importante confirmar la ausencia de la expresión de los transgenes utilizados para la reprogramación, con el fin de verificar que la pluripotencia establecida en las líneas es independiente de la expresión de los transgenes (Fig. 12C).

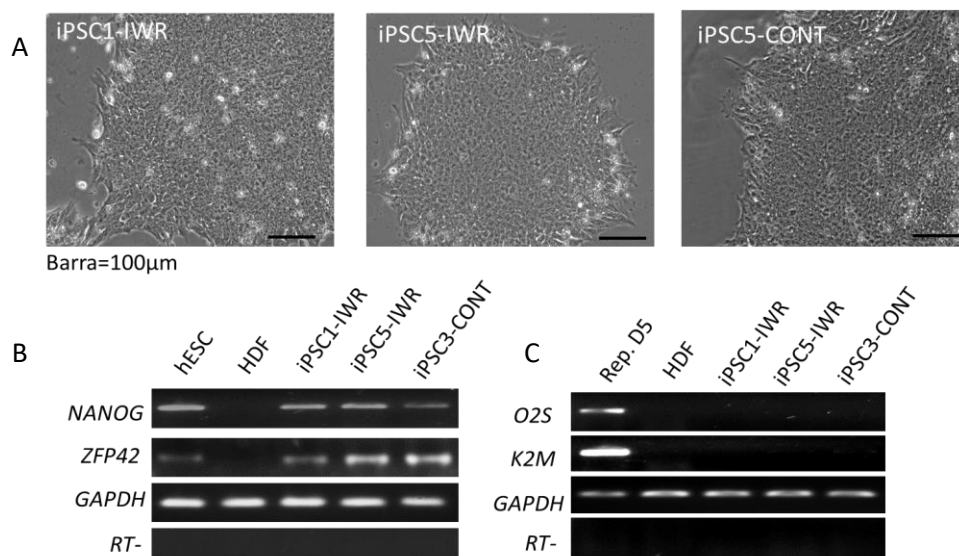


Figura 12. Generación de líneas de iPSC derivadas de cultivos tratados con IWR-1. A) Fotomicrografías en contraste de fase de las líneas iPSC1-IWR, iPSC5-IWR e iPSC-Cont al pase #5. B) Análisis de expresión de los genes de pluripotencia *NANOG* y *ZFP42* inducidos por el proceso de reprogramación en células pluripotentes embrionarias humanas (hESC), en fibroblastos humanos (HDF) y en las líneas de iPSC descritas en A. C) Análisis de expresión de los transgenes *O2S* y *K2M* en fibroblastos en proceso de reprogramación al día 5 post-transducción (Rep. D5), en fibroblastos no infectados (HDF) y en las líneas de iPSC descritas en A. La expresión del gen *GAPDH* fue analizado como control constitutivo así como para el control RT-.

7.6 El efector TCF7L1 inhibe la expresión de los genes mesendodermiales

Los resultados mostrados sugieren que la activación de la ruta Wnt induce la expresión de los genes mesendodermiales y promueve la diferenciación observada durante la fase de maduración. Sin embargo, resulta interesante conocer si este efecto de la ruta de Wnt es

específico de la fase de maduración. Por lo tanto, es importante analizar el efecto de la modulación de la ruta durante todo el proceso de reprogramación y evaluar posibles mediadores de este comportamiento específico de cada fase. La aproximación experimental para obtener información sobre posibles mediadores es el análisis temporal de la expresión de los efectores de la ruta (*TCF7*, *TCF7L1*, *TCF7L2*, *LEF1*) bajo los tratamientos de activación e inhibición de la ruta de manera temprana (Figura 13A). Inicialmente pudimos confirmar que la expresión de los genes mesendodermales al día 20 es promovida por la adición de Wnt3a, de manera consistente con los experimentos realizados adicionando Wnt3a desde el día 7 (Figura 10C). Igualmente pudimos verificar con estos experimentos que el número de colonias aumenta con la adición prematura de Wnt3a, mientras que la adición de IWR-1 no altera la eficiencia en términos de número de colonias (Figura 13C) lo cual es consistente con los resultados de la figura 9. Adicionalmente, el análisis temporal de la expresión de *T* nos permitió confirmar que la expresión de los genes mesendodermales es específica de la fase de maduración, aún cuando se estimula la ruta por medio de la adición de Wnt3a desde la fase de iniciación y por otro lado, que la inhibición de la ruta mantiene la expresión de *T* inhibida durante todo el proceso de reprogramación (Figura 13D).

Por medio del análisis de expresión relativa de los efectores *TCF7*, *TCF7L1*, *TCF7L2* y *LEF1* pudimos también observar un fenómeno fase específico sobre la regulación de estos genes bajo condiciones de inhibición o de activación de la ruta (Figura 13E, 13F, 13G y 13H). Fue interesante observar que bajo condiciones de activación con Wnt3a se puede ver un aumento significativo de la expresión de *TCF7* durante la fase de iniciación, sin

embargo, tanto en el control como en los tratamientos se observa una regulación negativa de *TCF7* durante la fase de maduración (Figura 13E). En el análisis de expresión de *TCF7L1*, *TCF7L2* y *LEF1* se observa un aumento transitorio de la expresión durante la fase de maduración, sin embargo, solo *TCF7L1* muestra una expresión diferencial significativa entre los tratamientos versus el control no tratado (Figura 13F). Es notable que la regulación de la expresión de *TCF7L1* se correlaciona de manera inversa a la regulación observada en el gen de Brachyury (Fig. 13D) con lo cual emergió la hipótesis de que este factor podría estar regulando la expresión de los genes mesendodermales al modular la ruta Wnt. Esta hipótesis es razonable tomando en cuenta que genes mesendodermales como *T*, *BMP4* y *NODAL* tienen sitios de reconocimiento para los TCFs en sus promotores.

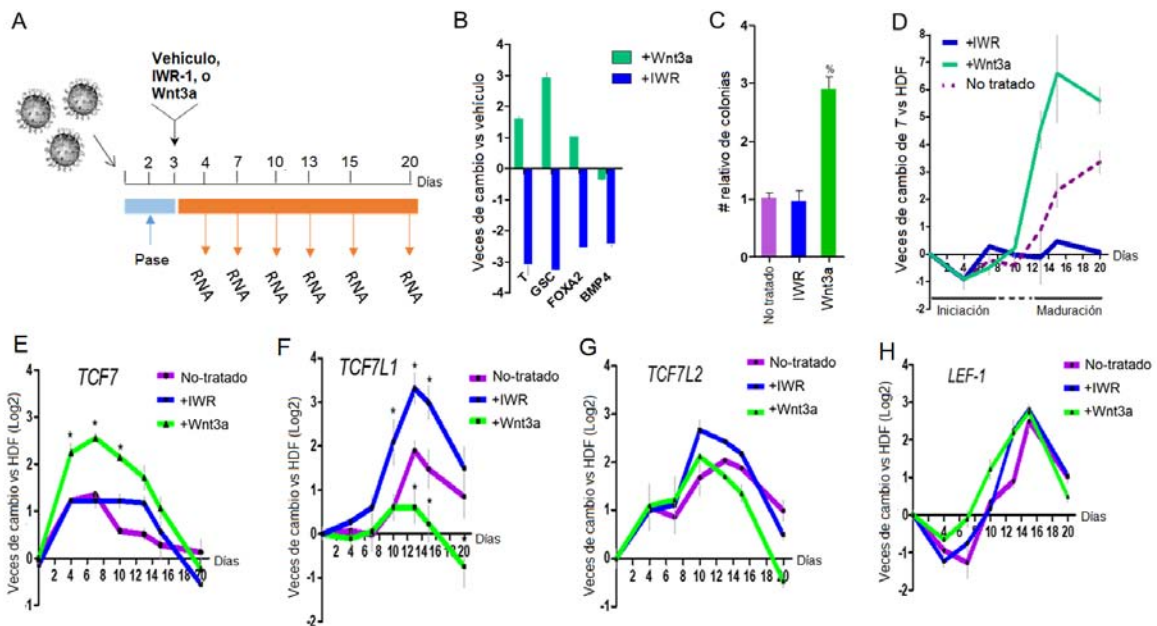


Figura 13. Efecto de la modulación temprana de la ruta Wnt sobre la expresión de genes mesendodermales y de los efectores de la ruta Wnt. A) Esquema del experimento de modulación de la ruta Wnt desde la fase de iniciación. B) Expresión relativa de los genes de mesendodermo al día 20 p.t. bajo los tratamientos descritos en A. (N=3). C) Número total de colonias observadas al día 20 p.t. en los tratamientos descritos en A. (N=3). D) Expresión relativa de *T* durante el proceso de reprogramación en los tratamientos descritos en A. (N=2) E) F) G) y H) Expresión relativa de los efectores *TCF7* (E), *TCF7L1*

(F), *TCF7L2* (G) y *LEF1* (H) durante el proceso de reprogramación bajo los tratamientos descritos en A (N=3). La expresión fue analizada por RT-qPCR relativa a la expresión de fibroblastos (tiempo 0) y normalizada con la expresión de *GAPDH*.

Con el fin de probar esta hipótesis, realizamos experimentos de reprogramación utilizando adicionalmente vectores lentivirales portadores de shRNAs específicos y validados para provocar un knockdown de cada uno de los TCFs. Estos vectores fueron transducidos hacia las células al día 2, luego de la transducción de los vectores de reprogramación. Al día 20 p.t. se analizó la expresión de los genes mesendodermales *GSC* y *T*. Los resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de estos genes en los casos en los que *TCF7L1* fue inhibido (Fig. 15A). Por otro lado, no se observó un efecto significativo en los casos en los que se interfirió la expresión de los demás TCFs, lo cual es consistente con la idea de que la acción de los TCFs activadores puede ser redundante y requeriría de una interferencia doble o triple para observar efectos notorios. Sin embargo y de manera importante, estos resultados sugieren que *TCF7L1* es un regulador negativo que interfiere con la expresión de los genes mesendodermales. Para confirmar estos resultados, utilizamos la estrategia de sobre-expresión del gen *TCF7L1* utilizando un vector lentiviral con un promotor CAG junto a un enhancer EOS que permite la sobre-expresión del gen en células pluripotentes. Diseñamos un experimento en el cual se utilizó un vector “Mock” como control y la adición de Wnt3a para verificar el efecto sobre la potenciación de la expresión de *GSC* y *T*. Los resultados de estos experimentos mostraron una fuerte reducción en la expresión de los genes mesendodermales en los tratamientos transducidos con el vector de *TCF7L1*, aún en presencia de Wnt3a, lo cual confirma que

este efector es un fuerte regulador negativo de la expresión de los genes mesendodermales durante la reprogramación (Fig. 15B). Estos resultados fueron consistentes con análisis morfológicos, análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina, así como de la expresión de la proteína Brachyury en las colonias (Fig. 15C). De manera interesante, la sobre-expresión de *TCF7L1* también tuvo un efecto positivo sobre el número de colonias EOS-GFP+, pero no modificó el número de colonias AP+, lo cual podría indicar la promoción de la maduración tal como se observa al inhibir la ruta Wnt con IWR-1 (Figura Anexa 5).

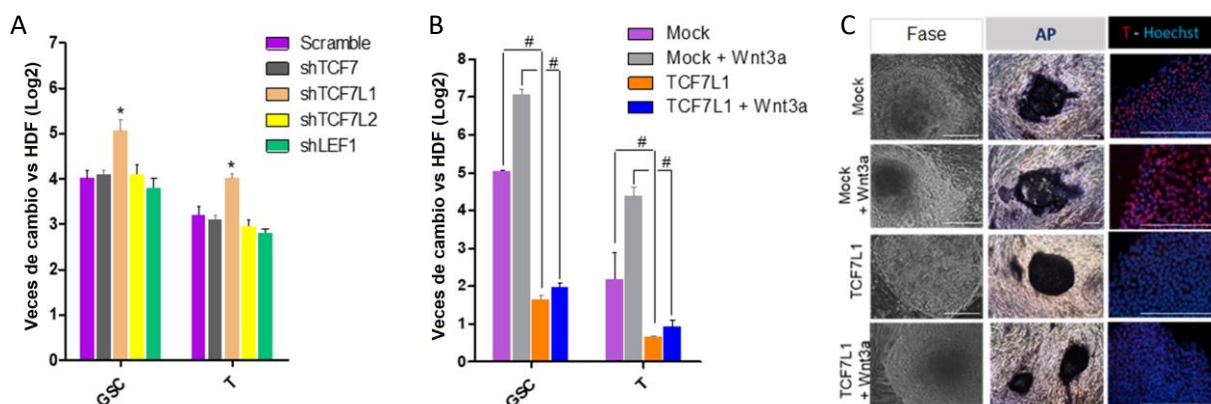


Figura 14. Efecto del *knock-down* y de la sobre-expresión de *TCF7L1* en la expresión de los genes mesendodermales. A) Expresión relativa de los genes *T* y *GSC* al día 20 p.t. en cultivos transducidos con los vectores shRNA para los efectores TCF. B) Expresión relativa de los genes *T* y *GSC* al día 20 p.t. en los cultivos transducidos con el vector de sobre-expresión de *TCF7L1* o con el vector “Mock”, con y sin la adición de Wnt3a. C) Análisis morfológicos e inmunofenotípicos de T en colonias representativas de los tratamientos descritos en B.

Con el fin de explorar si esta regulación sobre la expresión de *TCF7L1* es un proceso que se replica en líneas de células pluripotentes, primero analizamos el nivel de expresión de los TCFs “versus” la expresión en fibroblastos. Por medio de PCR cuantitativo pudimos confirmar que *TCF7L1* es el TCF que más se expresa tanto en hiPSC como en hESC (Figura 15A). Este resultado es consistente con las observaciones realizadas por Sierra y

colaboradores (2018) [33]. De manera interesante, las células iPSC humanas diferenciadas hacia linaje mesodermal, lo cual fue verificado por la fuerte expresión de *Brachyury* (Fig. 15B), presentan una regulación negativa de *TCF7L1* (Fig. 15C). Este resultado es consistente con la función inhibitoria de la diferenciación ejercida por la sobre-expresión de *TCF7L1* (Figura 14B y 14C).

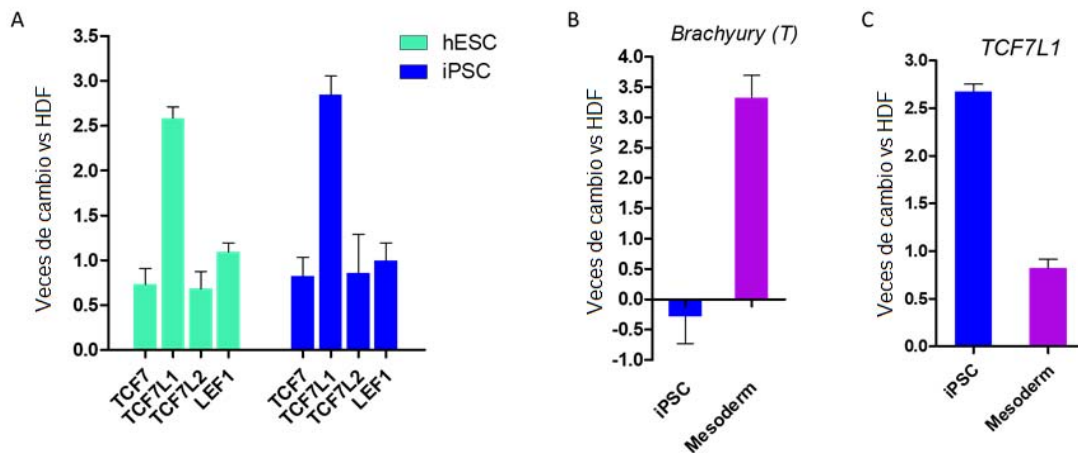


Figura 15. El gen del represor *TCF7L1* es altamente expresado en células troncales pluripotentes y es regulado negativamente durante la diferenciación mesodermal. A) Análisis de la expresión de los genes de la familia TCF/LEF por RT-PCR cuantitativo en células troncales embrionarias (hESC) e inducidas (iPSC). La cuantificación fue relativa a la expresión en fibroblastos dermales (HDF) (N=2). B) Análisis de la expresión de T al día 0 (iPSC) o al día 4 de diferenciación mesodermal (Mesoderm). C) Análisis de la expresión de *TCF7L1* en los cultivos descritos en B.

7.7 La activación de la ruta Wnt promueve la formación de colonias epiteliales de manera dependiente de *TCF7*

Los resultados obtenidos permiten describir posibles mecanismos por los cuales la ruta Wnt promueve la diferenciación durante la fase de maduración. Sin embargo, aún quedan sin explicar las razones por las cuales la ruta promueve la formación de colonias durante la fase de iniciación. Una observación interesante durante los experimentos realizados al activar e inhibir la ruta desde los primeros días post-transducción fue la notoria aparición

de un gran número de grupos epiteliales a los días 7 a 10 p.t. luego de la adición de Wnt3a (Figura 16A). La cuantificación de estos grupos epiteliales por medio de la inmunodetección de E-cadherina nos permitió sugerir que la adición de Wnt3a promueve la epitelización de las células transducidas con los vectores de reprogramación (Fig. 16B). Fue interesante observar que estos grupos epiteliales co-expresan moléculas típicas de células epidermales como la queratina y el antígeno Tra1-60 (Fig. 16C) [19]. Por medio de citometría de flujo pudimos verificar que la adición de Wnt3a aumenta la proporción de células positivas a E-cadherin y Tra1-60 lo cual sugiere que el efecto de la activación de la ruta Wnt se da sobre grupos epiteliales con potencial para formar colonias pluripotentes (Fig. 16D).

Queda claro que la activación de la ruta Wnt promueve la formación de grupos epiteliales positivos a E-cadherina, lo cual, como vimos previamente, repercute positivamente sobre la generación de colonias durante la fase de maduración. Sin embargo, no queda claro el mecanismo por el cual Wnt promueve esta epitelización inicial. Wnt es un factor conocido por su efecto sobre la promoción de la proliferación celular, por lo tanto resulta importante verificar el efecto de la modulación de la ruta Wnt sobre los parámetros de proliferación como el tiempo de duplicación y la expresión de Ki-67. De manera interesante, la modulación de la ruta Wnt por IWR-1 o por Wnt3a no alteraron de manera significativa el tiempo de duplicación de las células durante la fase de iniciación (Figura 17A). Esto sugería que probablemente el efecto de la activación de Wnt es específico sobre una población en particular. Para estudiar esta posibilidad, por medio de citometría de flujo analizamos la co-expresión de Ki-67 y E-cadherina al día 7 post-transducción. Los

resultados apuntan a que existe un aumento en la proporción de células epiteliales positivas a E-cadherina que están en proliferación cuando se activa la ruta Wnt (Figura 17B). Esto indica que la activación de la ruta Wnt está promoviendo la proliferación específica de la población epitelial.

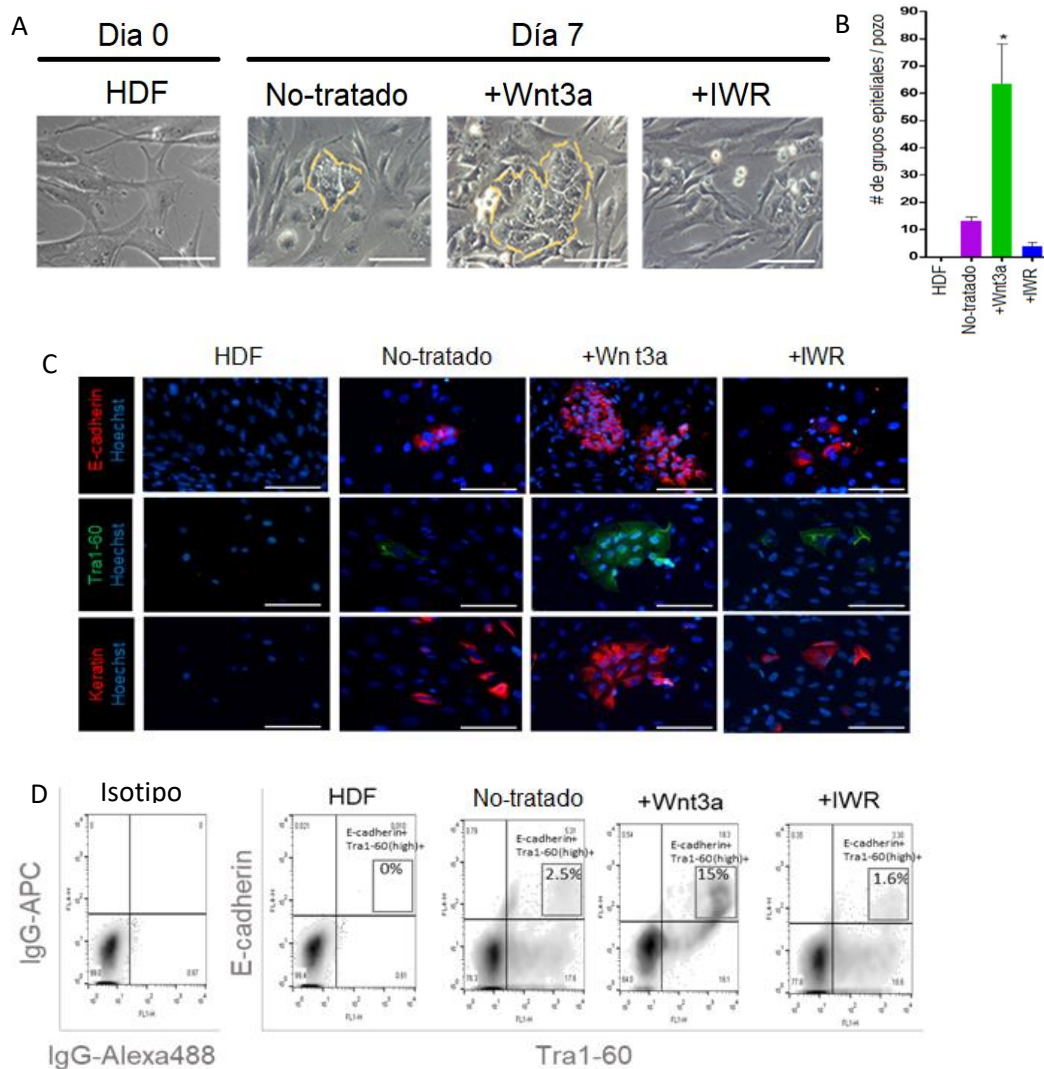


Figura 16. La activación de la ruta Wnt promueve la aparición de grupos epiteliales durante la fase de iniciación. A) Análisis morfológico de los grupos epiteliales al día 7 p.t. luego del tratamiento con Wnt3a o IWR, así como en el control no-tratado. Se muestran fibroblastos del día 0 como control (HDF). B) Análisis cuantitativo de los grupos epiteliales al día 7 p.t. descritos en A. C) Análisis inmunocitoquímico de los grupos epiteliales representativos observados con los tratamientos descritos en A. D) Análisis de expresión de E-cadherina y Tra1-60 por citometría de flujo de los grupos epiteliales observados en los cultivos descritos en A.

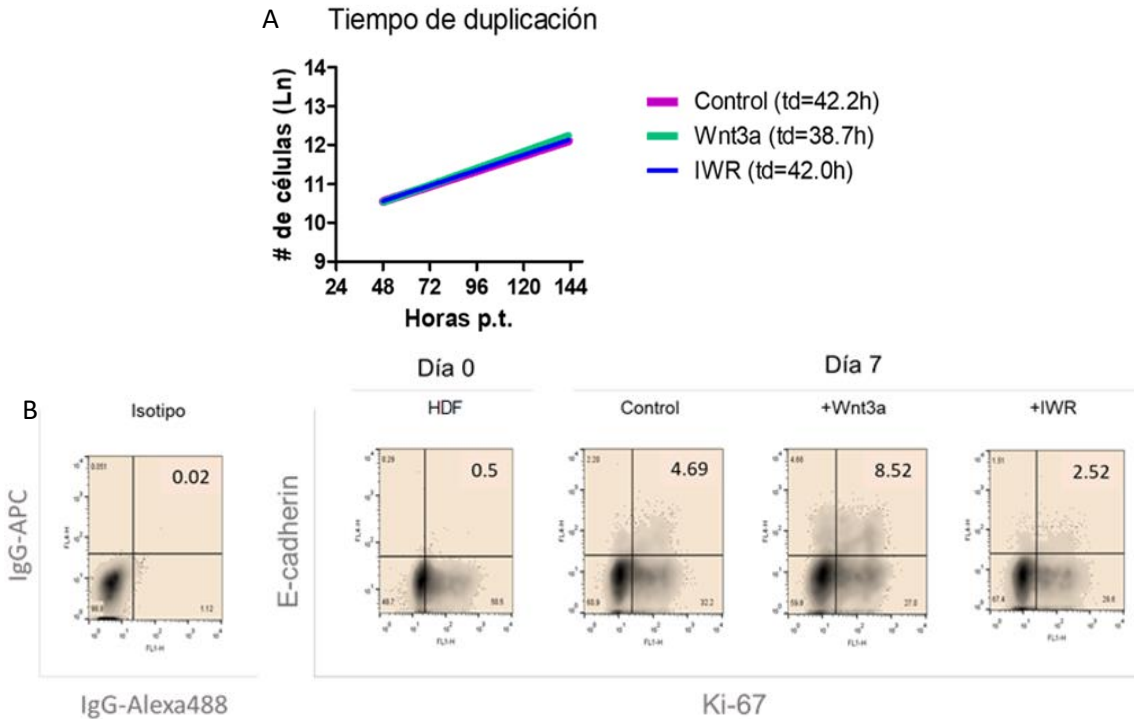


Figura 17. Efecto de la modulación de la ruta Wnt sobre los parámetros de proliferación celular durante la fase de iniciación. A) Análisis del tiempo de duplicación de la población total bajo el tratamiento Control, +Wnt3a y +IWR-1 durante la fase de iniciación (N=3). B) Análisis por citometría de flujo de la expresión de E-cadherina y Ki-67 en los cultivos control, +Wnt3a y +IWR-1, al día 7 post-transducción (N=2). A la izquierda se muestra el control de isotipo y señal inespecífica (Isotipo).

Con el fin de revelar el papel de los TCFs sobre este fenómeno, realizamos experimentos con los vectores shRNA para interferir la expresión de los TCFs desde el día 2 p.t. y analizar su efecto sobre la aparición de grupos epiteliales al día 7 p.t. así como sobre la formación de colonias al día 20 p.t. (Figura 18A). Los resultados revelaron una importante inhibición en la formación de grupos positivos a E-cadherina al interferir a *TCF7* (Fig. 18B). Así mismo, y de manera consistente, la interferencia de *TCF7* también redujo de manera significativa el número de colonias totales (Fig. 18C). Este efecto fue consistente con el análisis del efecto específico de fase, en el cual se observa que cuando *TCF7* es interferido desde el día 2 p.t. hay una reducción en el número de colonias, mientras que cuando se inhibe

desde el día 7 p.t. no tiene efecto negativo y por el contrario, parece haber un ligero aumento en el número relativo de colonias (Fig. 19). Este resultado fue consistente con el efecto de la interferencia de β -catenina, y además con el fenómeno específico de fase observado con IWR1, lo cual demuestra que el fenómeno de la inhibición de la ruta canónica es dependiente de TCF7 (Fig. 19). Con el fin de verificar el efecto de la interferencia de *TCF7* sobre la potenciación del número de grupos epiteliales y la expresión de E-cadherina mediada por la adición de Wnt3a, realizamos experimentos en los cuales utilizamos el vector shRNA contra *TCF7* o el vector control Scramble, en presencia o en ausencia de Wnt3a. Los resultados muestran que si bien la interferencia de *TCF7* no reduce significativamente la expresión del gen de E-cadherina (CDH1), si logra inhibir el efecto potenciador al adicionar Wnt3a (Fig. 20B). Este efecto fue consistente con el conteo de grupos epiteliales (Fig. 20A), por lo cual se confirma que la interferencia de *TCF7* reduce el efecto potenciador de Wnt3a sobre la formación de los grupos epiteliales.

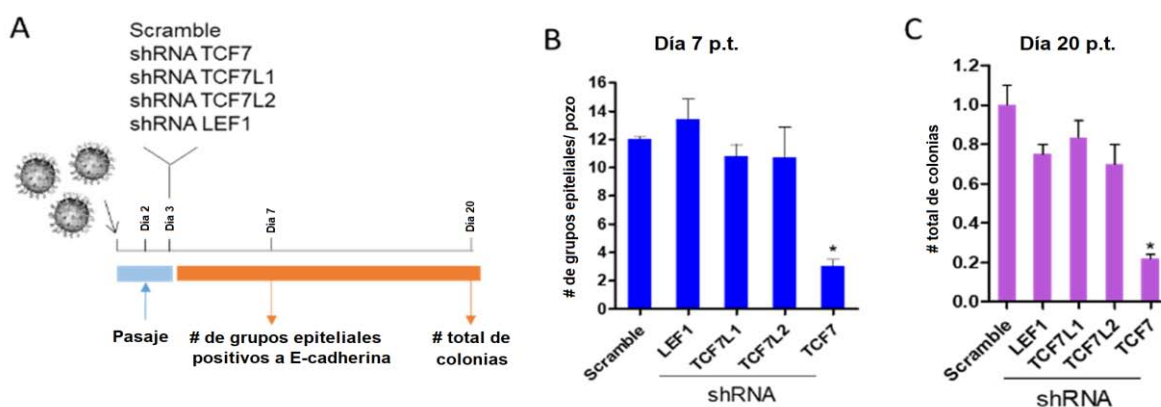


Figura 18. Efecto de la interferencia de los TCFs sobre la formación de grupos epiteliales y el número de colonias. A) Esquema del experimento de interferencia de los TCFs. B) Cuantificación del número de grupos epiteliales al día 7 p.t. bajo los tratamientos descritos en A. C) Cuantificación del número relativo de colonias observadas al día 20 p.t. en los cultivos descritos en A.

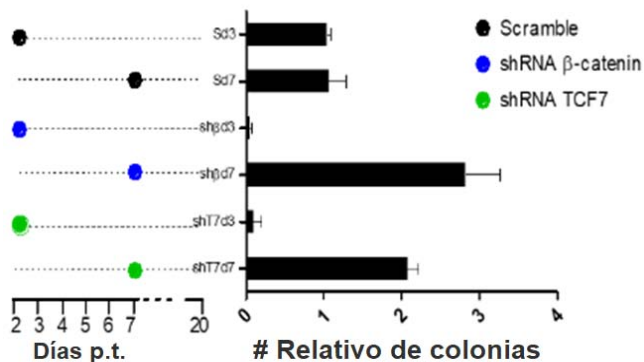


Figura 19. Efecto específico de fase de la interferencia de *TCF7* y β -catenina sobre el número de colonias. Los resultados en las barras indican la cuantificación relativa del número de colonias respecto al tratamiento con el vector control "Scramble".

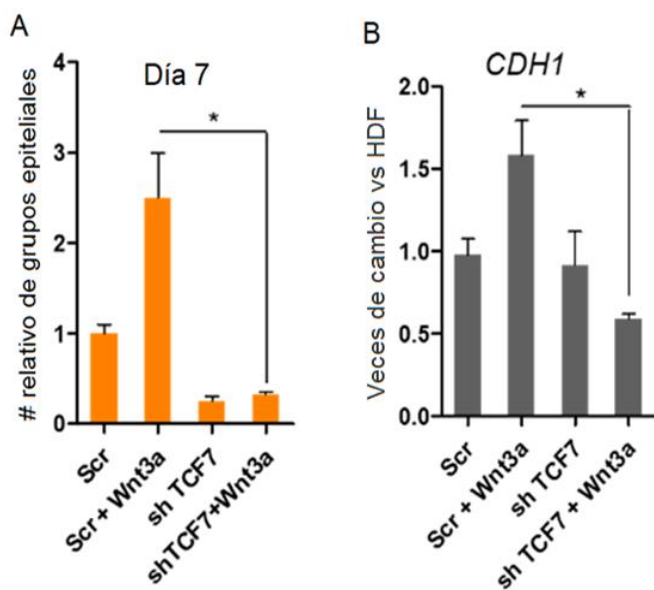


Figura 20. Efecto de la interferencia de la expresión de *TCF7* sobre el efecto potenciador de Wnt3a sobre la epitelización durante la fase de iniciación. A) Número relativo de grupos epiteliales al día 7 post-transducción en cultivos control scramble (Scr), scramble + Wnt3a, tratados con el interferencial de *TCF7* (shTCF7), y tratados con el interferencial más Wnt3a. B) Expresión relativa del gen de E-cadherina (*CDH1*) en los cultivos descritos en A. La expresión fue analizada por RT-qPCR y fue relativa a la expresión en fibroblastos (HDF) y normalizada con la expresión de GAPDH.

Los resultados descritos sugieren que *TCF7* es mediador del efecto potenciador de Wnt sobre la aparición de grupos epiteliales y la consecuente formación de colonias. Por tanto quise investigar si la sobre-expresión de *TCF7* podría tener un efecto potenciador similar al observado cuando se adiciona Wnt3a. Para esto construimos un vector lentiviral portador del cDNA de *TCF7* y transdujimos fibroblastos al día 2 luego de la transducción de los vectores de reprogramación. De manera interesante, pudimos observar que los

cultivos en los que se sobre-expresó *TCF7* contenían grupos epiteliales de mayor tamaño que en los controles (Fig. 21A). Un seguimiento del número de grupos epiteliales y colonias desde el día 7 p.t. nos permitió confirmar que los cultivos que sobre-expresan *TCF7* contenían más grupos epiteliales hasta el día 12 p.t. (Fig. 21B). Sin embargo, paulatinamente las colonias que se iban formando se fueron diferenciando o desprendiendo del cultivo, provocando que la cuantificación del número de colonias a los días 15 y 20 no fuera significativa al compararla con el control “Mock” (Fig. 21B). Estos resultados sugieren que si bien la expresión de *TCF7* es necesaria para la formación de grupos epiteliales durante la fase de iniciación, podría ser contraproducente durante la fase de maduración. Este fenómeno es consistente con la figura 13E, en donde se observa que la expresión de *TCF7* disminuye durante la fase de maduración en todos los tratamientos.

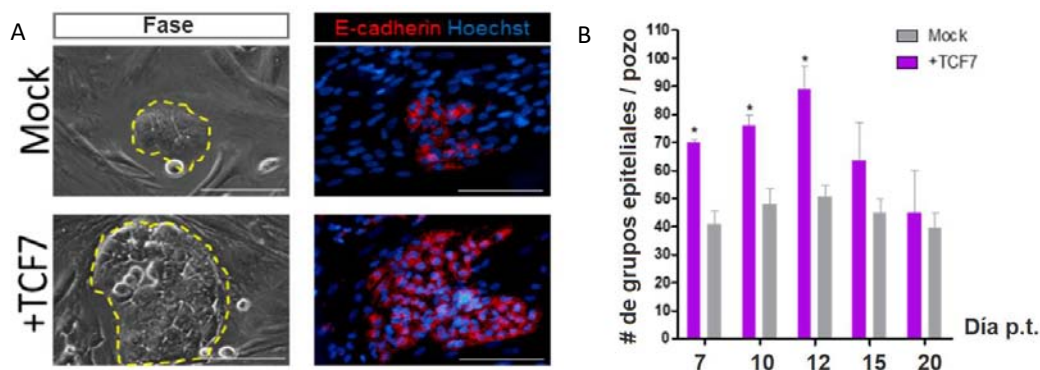


Figura 21. La sobre-expresión de *TCF7* promueve la formación de grupos epiteliales durante la fase de iniciación. A) Análisis morfológico e inmunofenotípico para la expresión de E-cadherina en grupos epiteliales representativos de cultivos transducidos con el vector control “Mock” o con el vector de sobre-expresión de *TCF7*. B) Cuantificación del número total de grupos epiteliales y colonias observadas a los días 7, 10, 12, 15 y 20 p.t. (N=3)

7.8 La modulación bifásica de la ruta Wnt promueve la reprogramación de fibroblastos

Dado que la activación de la ruta Wnt promueve la formación de colonias durante la fase de iniciación mientras que la inhibición de la ruta es positiva para la reprogramación durante la fase de maduración al inhibir la diferenciación mesendodermal. Por lo que resulta razonable pensar que una modulación fase-específica de la ruta podría mejorar la eficiencia de la reprogramación de células somáticas humanas. Para probar esta hipótesis, realizamos experimentos bajo una modulación bifásica de Wnt, activando la ruta durante los días 3 a 7 p.t. e inhibiéndola durante los días 7 a 20 p.t. (Fig. 22A). Estos experimentos fueron contrastados con controles no-tratados, o con tratamientos de simple activación o inhibición en los tiempos respectivos. De manera consistente, el análisis morfológico de los cultivos mostró una disminución en el número relativo de colonias diferenciadas en el tratamiento bifásico y en el tratamiento en el que solo se inhibió la ruta durante la fase de maduración (Fig. 22B, 22C). Así mismo, se observa un aumento en el número de colonias compactas en estos tratamientos, aunque el aumento es bastante notorio en los cultivos de tratamiento bifásico. Este aumento pronunciado en el número de colonias compactas se relaciona al aumento altamente significativo en el número relativo de colonias totales observado con el tratamiento bifásico (Fig. 22D). Tomando en cuenta que la eficiencia absoluta de reprogramación bajo las condiciones control en este estudio fue de 0.202% (± 0.05 , N=4), el aumento promedio esperado (6 veces respecto al control) en la eficiencia de reprogramación bajo la condición bifásica es del 1.2%. Fue importante también verificar que a pesar de este aumento en el número de colonias en el tratamiento bifásico, no hubo

aumento en la expresión del gen *T*, lo cual es consistente con la ausencia de colonias diferenciadas (Fig. 22E, 22C).

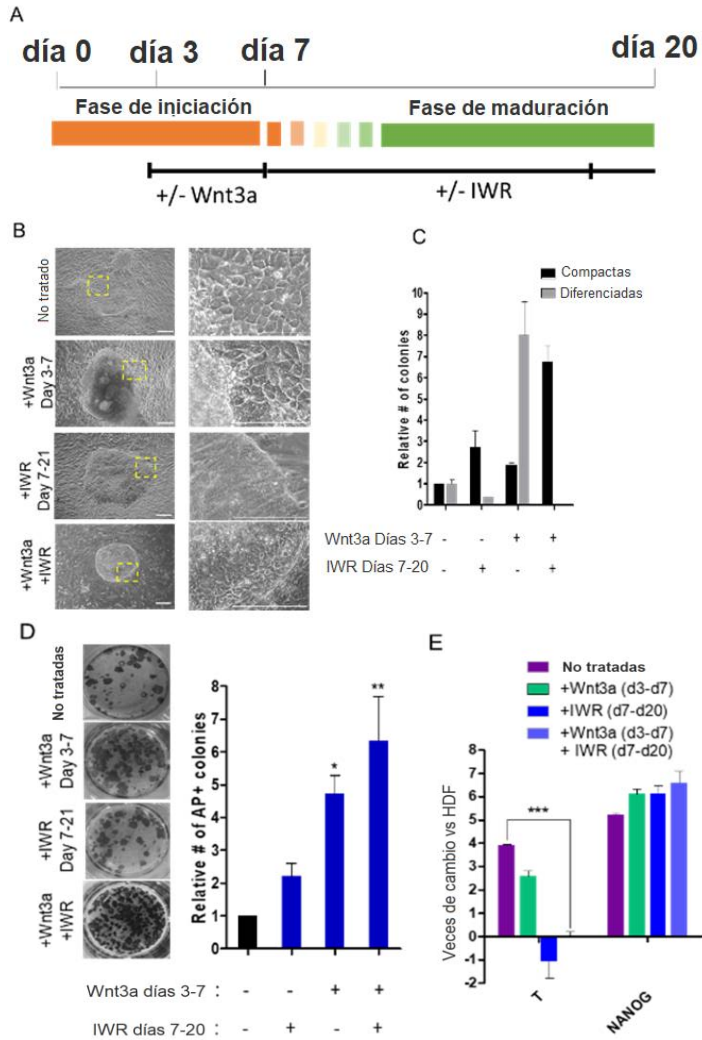


Figura 22. La modulación bifásica de la ruta Wnt aumenta la eficiencia de la reprogramación de fibroblastos humanos. A) Esquema de la estrategia experimental. B) Análisis morfológico de colonias representativas en los cultivos no tratados, tratados con Wnt3a desde el día 3 al 7 p.t. (Wnt3a day3-7), tratados con IWR-1 desde el día 7 al 20 p.t. (+IWR Day7-20) o tratados con Wnt3a del día 3 al 7 y con IWR-1 del día 7 al 20 (+Wnt3a+IWR). C) Número relativo de colonias compactas y diferenciadas al día 20 p.t. en los cultivos descritos en B. D) Número relativo de colonias totales al día 20 p.t. en los cultivos descritos en B. E) Expresión relativa de *T* y *NANOG* en los cultivos descritos en B.

8. Discusión

La reprogramación celular hacia el estado pluripotente se compone básicamente de 2 fases: fase de iniciación y fase de maduración. Durante la fase de iniciación una fracción de células transducidas adquiere una morfología epitelial en ausencia de la expresión endógena de genes de pluripotencia. Por otro lado, durante la fase de maduración, los grupos epiteliales empiezan a compactarse y se induce la expresión endógena de los genes de pluripotencia así como de genes asociados a la especificación mesendodermal. Por lo tanto, resulta razonable que la reprogramación hacia el estado pluripotente sea afectada por señales endógenas o exógenas de una manera fase-dependiente, y que este comportamiento revele la existencia de dos contextos celulares distintos y probablemente contrastantes. El presente trabajo demuestra que la ruta de señalización Wnt es una ruta importante que regula estas dos etapas del proceso de reprogramación, y que una modulación de la ruta, de manera específica en cada fase de reprogramación, permite mejorar la eficiencia de la reprogramación. De esta manera, una activación exógena de la ruta Wnt durante la fase de iniciación tiene un fuerte impacto sobre la epitelización celular, promoviendo la formación de grupos epiteliales y por lo tanto aumentando el número total de colonias. Sin embargo, la activación endógena o exógena de la señal de Wnt durante la fase de maduración induce la diferenciación mesendodermal de las células epitelizadas dentro de las colonias, impactando negativamente el mantenimiento de la pluripotencia y el número de colonias. De manera notable, el efecto positivo de la activación de la señal Wnt durante la fase de iniciación observada en este trabajo es consistente con el trabajo publicado por Ross y colaboradores [26], en el cual demuestran que los fibroblastos con una mutación en el gen

PORC son incapaces de formar colonias de iPSC. Aunque la proteína Porcupina está implicada en la secreción de ligandos de Wnt tanto canónicos como no-canónicos, el trabajo de Ross y colaboradores es la primera evidencia de que la reprogramación de células somáticas humanas es favorecida por la activación de la ruta Wnt. El presente trabajo demuestra de manera contundente que este efecto positivo está restringido a la fase de iniciación y que la promoción de la formación de grupos epiteliales es dependiente de la expresión de TCF7, un efector de la ruta Wnt previamente identificado como un regulador positivo de la auto-renovación en células pluripotentes de ratón y de la fase de maduración en la reprogramación de células somáticas murinas [25].

Un hallazgo interesante fue el patrón de expresión de TCF7 durante la reprogramación. Pudimos observar que la expresión de TCF7 se estimula por la activación exógena de Wnt durante la fase de iniciación, pero su expresión es gradualmente reducida durante la fase de maduración. Adicionalmente, pudimos observar que la sobre-expresión de TCF7 resultó positiva durante la fase de iniciación pero deletérea durante la fase de maduración provocando el desprendimiento y diferenciación de las células dentro de las colonias. Este efecto contrastante de la ruta Wnt/TCF7 durante la fase de iniciación y maduración presenta a su vez un contraste interesante entre el rol de la ruta Wnt durante la reprogramación de células humanas y de células de ratón, el cual puede estar relacionado con la diferencia fundamental entre los estados de pluripotencia que tienen las células troncales pluripotentes de humano y de ratón. Respecto a este punto, es necesario apuntar que la activación de la ruta Wnt resulta inapropiada para el mantenimiento de células pluripotentes humanas, pero no para las células pluripotentes murinas [28, 32] .

De manera consistente con estas evidencias, pudimos observar que la activación de la ruta Wnt es responsable de la inducción de la expresión de genes mesendodermales y la formación de zonas con células diferenciadas dentro de las colonias durante la fase de maduración, un fenómeno previamente descrito por Takahashi y colaboradores [19]. En este reporte, los autores utilizan la expresión de estos genes como un punto de referencia para identificar a un estado intermediario transitorio denominado PSMN (*Primitive Streak-like Mesendoderm*). Bajo el sistema de reprogramación utilizado en este estudio, pudimos observar que la expresión de los genes mesendodermales clave como *T*, *FOXA2* y *GSC* es dependiente de la actividad de la ruta Wnt. De esta manera, la inhibición de la ruta Wnt por medio de la molécula inhibidora IWR-1 o por medio de un shRNA contra β -catenina, inhibió la expresión de estos genes mesendodermales. Estos resultados claramente apuntan a la ruta Wnt como responsable del establecimiento del estado transitorio PSMN descrito por Takahashi y colaboradores. Dado que bajo condiciones de inhibición de la ruta Wnt es posible obtener colonias compactas de iPSC y además derivar líneas de iPSC a partir de estas colonias, se puede asumir que la expresión de estos genes y el establecimiento del PSMN no son necesarios para la reprogramación de células somáticas humanas. Otro dato notable fue que la expresión de genes del surco primitivo como *FOXH1*, *GDF3* y *NODAL*, previamente descritos como marcadores del PSMN, no fueron alterados por la inhibición de la ruta Wnt, probablemente debido a que estos genes son inducidos por el circuito regulatorio de la pluripotencia en el estado de pluripotencia del epiblasto [43, 44, 45]. Por lo tanto, la expresión de estos genes durante la fase de maduración es indicadora de la adquisición de un estado pluripotente epiblastico más que la adquisición de un estado diferenciado. Así, la expresión

de los genes *T*, *FOXA2* y *GSC*, los cuales son marcadores del surco primitivo anterior [46], pueden ser considerados marcadores confiables del estado diferenciado mesendodermal.

Otro hallazgo importante que remarca el efecto contrastante de la ruta Wnt sobre la reprogramación de células somáticas humanas y murinas, fue la fuerte regulación positiva del efector TCF7L1 durante la fase de maduración de la reprogramación de fibroblastos humanos. El efector TCF7L1 es un represor transcripcional de los blancos de la ruta Wnt, que previamente fue identificado como un componente del circuito regulatorio de la pluripotencia [47]. Durante la reprogramación de células de ratón, Ho y colaboradores (2013) demostraron que la sobre-expresión de *TCF7L1* impide la adquisición de la pluripotencia y por lo tanto, su expresión es contraproducente durante la fase de maduración. En este estudio con células humanas, pudimos observar que la expresión de *TCF7L1* tiene una fuerte dependencia con la actividad de la ruta Wnt y que la sobre-expresión de *TCF7L1* regula negativamente la expresión de genes mesendodermales sin alterar la adquisición de la pluripotencia. Es más, pudimos observar que la sobre-expresión de *TCF7L1* promueve la formación de colonias compactas positivas al reportero de maduración EOS-GFP. Estos resultados soportan la noción de que las células troncales pluripotentes humanas pueden mantenerse pluripotentes y auto-renovarse de manera independiente de la ruta Wnt [48], pero más aún, que la inactivación de la ruta Wnt puede ser positiva para la inducción y mantenimiento de la pluripotencia [49].

9. Conclusión

En conclusión el presente trabajo indica que la ruta Wnt tiene papeles diferentes y contrastantes durante la inducción de la pluripotencia en células somáticas humanas. Esto

implica que existen 2 distintos contextos celulares para la función de la ruta Wnt durante la reprogramación de células somáticas humanas: un contexto celular inicial en donde la ruta Wnt promueve la epitelización de una manera TCF7-dependiente, crítica para la formación de colonias, y un contexto celular de maduración, en el cual Wnt induce la diferenciación mesendodermal facilitado por la regulación negativa de TCF7L1. Este papel contrastante respecto a lo que se conoce sobre la función de Wnt en la reprogramación de células de ratón es probable que se derive de las diferencias biológicas fundamentales que caracterizan a los estados de pluripotencia *primed* y *naive*, y los mecanismos antagónicos involucrados en el mantenimiento de su auto-renovación.

10. Perspectivas

Tomando en cuenta los resultados obtenidos sobre la función específica de fase que caracteriza a la señal Wnt durante la reprogramación, el presente proyecto tiene las siguientes perspectivas:

- 1) Definir el mecanismo molecular por medio del cual la ruta Wnt/TCF7 facilita el proceso de epitelización durante la fase de iniciación: Aunque queda claro que la ruta Wnt/TCF7 es importante para favorecer la formación de grupos epiteliales durante la primera fase de reprogramación, aún queda sin definir el mecanismo molecular por medio del cual TCF7 tiene este efecto. No sabemos si dentro de los blancos de TCF7 se encuentran genes clave en la epitelización como E-cadherina, o si la promoción de la epitelización es un efecto indirecto de la activación o inhibición de otros genes. En este sentido sería muy interesante explorar el efecto que tiene Wnt sobre la expresión de genes importantes para la transición epitelio-a-

mesénquima o genes asociados al cambio metabólico que han demostrado ser clave para la reprogramación.

- 2) Definir el mecanismo molecular por medio del cual la expresión de *WNT3* es activada durante la transición entre la primera y segunda fase: Sabemos que la señal de Wnt es activada durante la fase de maduración y muy posiblemente esta activación es mediada por la alta expresión transitoria de *WNT3*. Sin embargo, aún no queda claro por qué la expresión de *WNT3* es activada. Tampoco queda claro si la señal de Wnt3 es la única señal causante de la sobre-activación de la ruta canónica de Wnt durante la fase de maduración. Es posible que la inducción endógena de los genes de reprogramación junto al re-arreglo epigenético que esto implica, permitan el acceso de factores de transcripción al promotor del gen *WNT3*.
- 3) Estudiar el efecto de la inhibición y activación de la ruta Wnt sobre la aparición de aberraciones epigenéticas que afectan la funcionalidad de las iPSC: Aunque queda claro que la inhibición de la ruta Wnt resulta positiva para promover la compactación e inhibir la expresión de genes de diferenciación mesendodermal, resulta aún más relevante el efecto que tendría la inhibición de la ruta Wnt sobre la aparición de cambios epigenéticos y la eliminación de la memoria epigenética, ambas con capacidad para influir sobre la eficiencia de diferenciación de las iPSC hacia linajes de las 3 capas embrionarias.

11. Referencias:

-
- ¹ Darr H, Benvenisty N. Human embryonic stem cells: the battle between self-renewal and differentiation. *Regen Med.* 2006. 1(3):317-325.
- ² Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998. 282(5391):1145-7.
- ³ Tachibana M, Amato P, Sparman M, et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell.* 2013. 153(6):1228-1238.
- ⁴ Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006. 126: 663-676.
- ⁵ Chen KG, Mallon BS2, McKay RD3, Robey PG. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell.* 2014. 14(1):13-26.
- ⁶ Koch CM, Reck K, Shao K, Lin Q, Jousen S, Ziegler P, Walenda G, Drescher W, Opalka B, May T, Brümmendorf T, Zenke M, Saric T, Wagner W. Pluripotent stem cells escape from senescence-associated DNA methylation changes. *Genome Res.* 2013. 23(2):248-259.
- ⁷ Boheler KR. Stem cell pluripotency: a cellular trait that depends on transcription factors, chromatin state and a checkpoint deficient cell cycle. *J Cell Physiol.* 2009. 221(1):10-17.
- ⁸ Davidson KC, Mason EA, Pera MF. The pluripotent state in mouse and human. *Development.* 2015. 142(18):3090-3099.

-
- ⁹ Loh KM, Ang LT, Zhang J, et al. Efficient Endoderm Induction from Human Pluripotent Stem Cells by Logically Directing Signals Controlling Lineage Bifurcations. *Cell Stem Cell*. 2014. 14(2):237-252.
- ¹⁰ Takashima Y, Guo G, Loos R, et al. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*. 2014. 158(6):1254-1269.
- ¹¹Theunissen TW, Powell BE, Wang H, et al. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2014. 15(4):471-487
- ¹² Yoshida Y, Yamanaka S. Recent stem cell advances: induced pluripotent stem cells for disease modeling and stem cell-based regeneration. *Circulation*. 2010. 122(1):80-87.
- ¹³ David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res*. 2014. 12(3):754-761.
- ¹⁴ Nishizawa M, et al. Epigenetic Variation between Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines Is an Indicator of Differentiation Capacity. *Cell Stem Cell*. 2016. 19(3):341-354.
- ¹⁵ Tanabe S. Signaling involved in stem cell reprogramming and differentiation. *World J Stem Cells*. 2015. 7(7): 992–998.
- ¹⁶ Li R, et al. A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010. 7(1):51-63.
- ¹⁷ Tanabe K, et al. Maturation, not initiation, is the major roadblock during reprogramming toward pluripotency from human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013. 110(30):12172-12179.
- ¹⁸ Akagi S, Matsukawa K, Takahashi S. Factors affecting the development of somatic cell nuclear transfer embryos in Cattle. *J Reprod Dev*. 2014. 60(5):329-35.

-
- ¹⁹ Takahashi K, et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun.* 2014. 5:3678.
- ²⁰ Gadue P, Huber TL, Paddison PJ, Keller GM. Wnt and TGF-beta signaling are required for the induction of an *in vitro* model of primitive streak formation using embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006. 103(45):16806-1.
- ²¹ Huelsken J, et al. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. *J Cell Biol.* 2000.148(3):567-578.
- ²² Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012. 149:1192-205.
- ²³ Van Camp JK, Beckers S, Zegers D, Van Hul W. Wnt signaling and the control of human stem cell fate. *Stem Cell Rev.* 2014. 10(2):207-229.
- ²⁴ Kormish JD, Sinner D, Zorn AM. Interactions between SOX factors and Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Dev Dyn.* 2010. 239(1):56-68.
- ²⁵ Martin BL, Kimelman D. Regulation of canonical Wnt signaling by Brachyury is essential for posterior mesoderm formation. *Dev Cell.* 2008. 15(1):121-133.
- ²⁶ Bernkopff DB, Hadjihannas MV, Behrens J. Negative-feedback regulation of the Wnt pathway by conductin/axin2 involves insensitivity to upstream signalling. *J Cell Sci.* 2015. 128(1):33-39.
- ²⁷ Nusse R, Clevers H. Wnt/ β -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 2017. 169(6):985-999.
- ²⁸ Sokol SY. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development.* 2011. 138:4341-4350.

-
- ²⁹ Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, Eckardt D, Cook A, Kemler R, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol* 2011. 13:838-845.
- ³⁰ Yi F, Pereira L, Hoffman JA, Shy BR, Yuen CM, Liu DR, et al. Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 2011. 13:762-770.
- ³¹ Merrill BJ, Pasolli HA, Polak L, Rendl M, García-García MJ, Anderson KV, Fuchs E. Tcf3: a transcriptional regulator of axis induction in the early embryo. *Development*. 2004. 131(2):263-274.
- ³² Kurek D, Neagu A, Tastemel M, Tuysuz N, Lehmann J, van de Werken HJ, et al. Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 2015. 4:114-128.
- ³³ Sierra RA, Hoverter NP, Ramirez RN, Vuong LM, Mortazavi A, Merrill BJ, Waterman ML, Donovan PJ. TCF7L1 suppresses primitive streak gene expression to support human embryonic stem cell pluripotency. *Development*. 2018. 145(4).
- ³⁴ Ho R, Papp B, Hoffman JA, Merrill BJ, Plath K. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Rep* 2013. 3:2113-2126.
- ³⁵ Ross J, et al. A rare human syndrome provides genetic evidence that WNT signaling is required for reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Cell Rep*. 2014. 9(5):1770-1780.

-
- ³⁶ Bray AF, Cevallos RR, Gazarian K, Lamas M. Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin. *Neuroscience*. 2014. 280:142-155.
- ³⁷ Ramírez-García L, Cevallos RR, Gazarian K. Unveiling and initial characterization of neural crest-like cells in mesenchymal populations from the human periodontal ligament. *J Periodontal Res*. 2017. 52(3):609-616.
- ³⁸ Michael W. Pfaffl. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001. 29(9): e45.
- ³⁹ Cheadle C, Vawter MP, Freed WJ, Becker KG. Analysis of microarray data using Z score transformation. *J Mol Diagn*. 2003. 5(2):73-81.
- ⁴⁰ Liu P, et al. Requirement for Wnt3 in vertebrate axis formation. *Nat Genet*. 1999. 22(4):361-365.
- ⁴¹ Yoon Y, et al. Extra-embryonic Wnt3 regulates the establishment of the primitive streak in mice. *Dev Biol*. 2015. 403(1):80-88.
- ⁴² Wang Z, et al. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012. 10(4):440-454.
- ⁴³ Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 2006. 133:209-216.
- ⁴⁴ Lu CC, Robertson EJ. Multiple roles for Nodal in the epiblast of the mouse embryo in the establishment of anterior-posterior patterning. *Dev Biol* 2004. 273:149-159.

⁴⁵ Yamamoto M, Meno C, Sakai Y, Shiratori H, Mochida K, Ikawa Y, et al. The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev* 2001. 15:1242-1256.

⁴⁶ Tada S, Era T, Furusawa C, Sakurai H, Nishikawa S, Kinoshita M, et al. Characterization of mesendoderm: a diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 2005. 132:4363-4374.

⁴⁷ Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008. 22:746-755.

⁴⁸ Davidson KC, Adams AM, Goodson JM, McDonald CE, Potter JC, Berndt JD, et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012. 109:4485-4490.

⁴⁹ Frank S, Zhang M, Scholer HR, Greber B. Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One* 2012. 7:e41958.

Anexos

Figura 1. Formación de grupos epiteliales durante la fase de iniciación. Los grupos epiteliales formados fueron fotografiados a los días 2 y 6 post-transducción. Las células control fueron infectadas con un vector “Mock” Las fotografías de las células control fueron tomadas al día 2. Barra de escala 100 μ m.

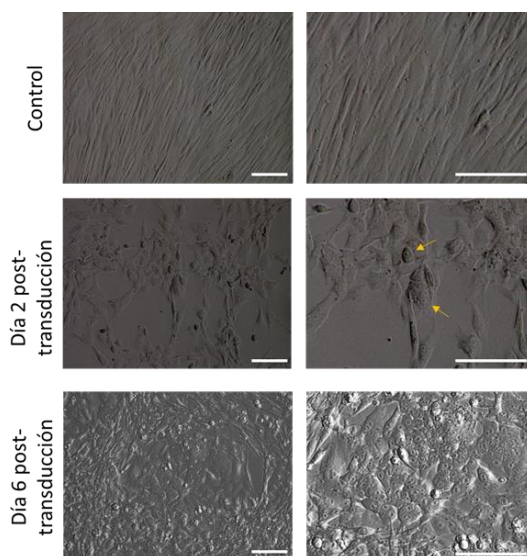


Figura 2. Análisis funcional de los shRNAs lentivirales para los TCFs. Los fibroblastos fueron transducidos con shRNAs contra LEF1, TCF7, TCF7L1, TCF7L2 o con el vector Scramble control, por 24 horas y fueron analizados por RT-PCR cuantitativo al día 5 post-transducción. Los valores de Ct fueron normalizados frente a la expresión de GAPDH. (N=2).

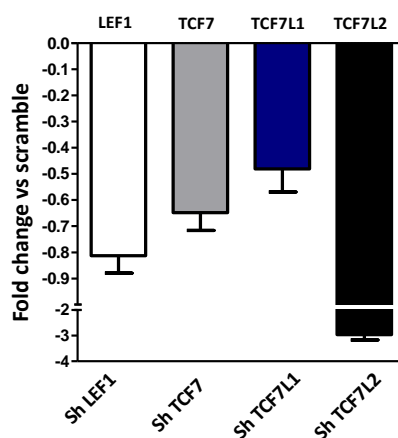


Figura 3. Análisis de los vectores lentivirales de sobre-expresión de TCF7L1. A) Mapa del vector pLenti-CMV-TCF7L1. B) Mapa del vector pLenti-EOS-CMV-TCF7L1. C) Análisis de expresión de TCF7L1 por RT-PCR en fibroblastos transducidos con los vectores mostrados en A y B versus los controles “Mock”. M= marcador de peso molecular. D) Análisis de expresión de TCF7L1 por RT-PCR cuantitativo de las muestras analizadas en C. El análisis de expresión fue relativo al control “Mock” y fue normalizado con la expresión de *GAPDH*. E) Análisis de la expresión de la proteína TCF7L1 por medio de inmunofluorescencia en las muestras anotadas en C.

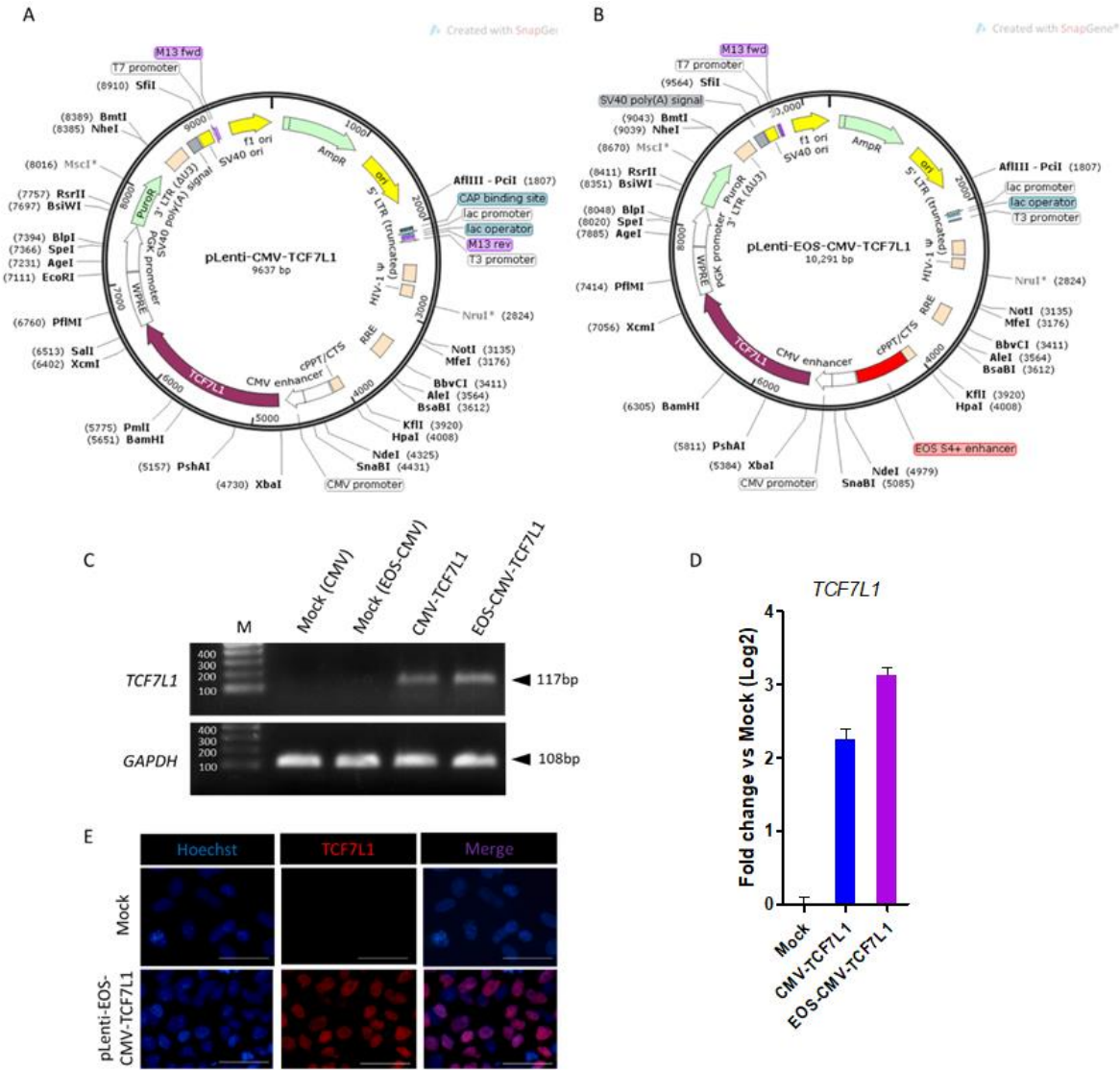


Figura 4. Análisis del vector lentiviral de sobre-expresión de TCF7. A) Mapa del vector pLenti-CMV-TCF7. B) Análisis de expresión de *TCF7* por RT-PCR en fibroblastos transducidos con el vector mostrado en A versus el control “Mock”. M= marcador de peso molecular. C) Análisis de expresión de *TCF7* por RT-PCR cuantitativo de las muestras analizadas en B. El análisis de expresión fue relativo al control “Mock” y fue normalizado con la expresión de *GAPDH*.

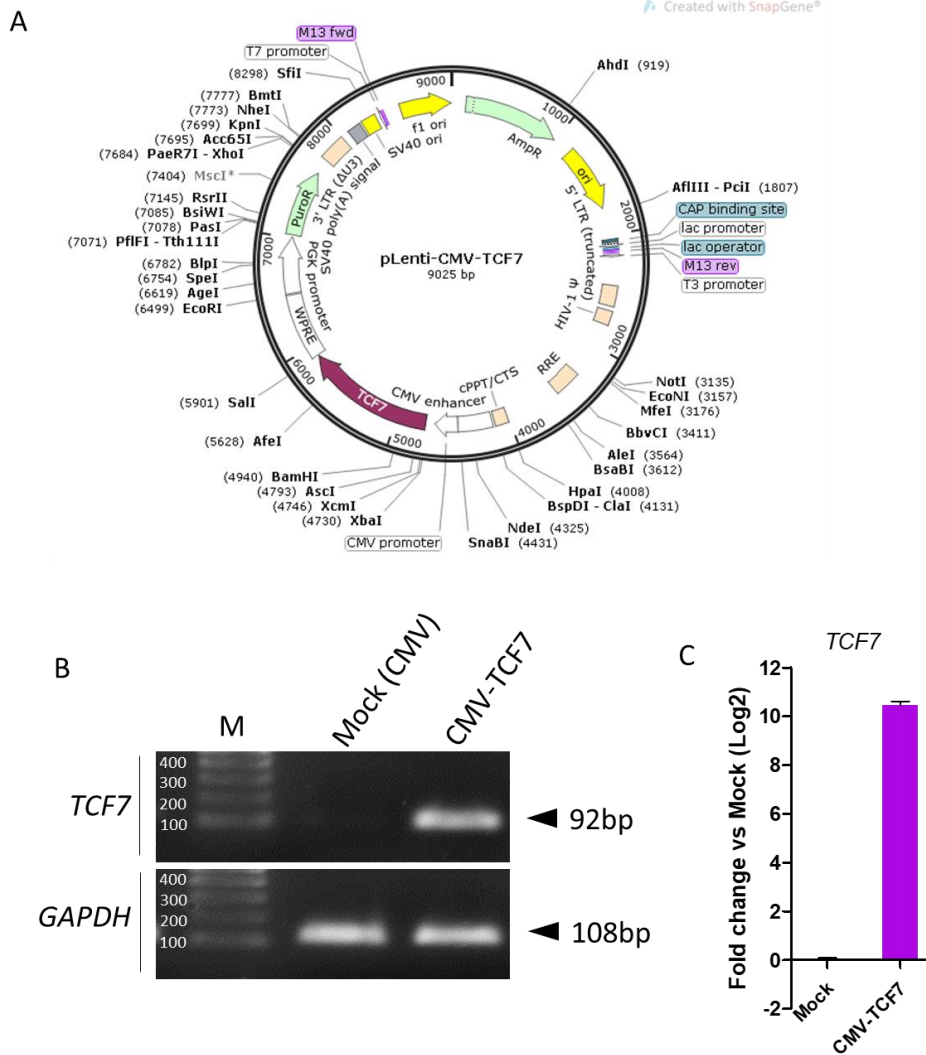


Figura 5. Análisis de la trans-activación del reportero EOS-GFP bajo la sobre expresión de TCF7L1 en ausencia y presencia de Wnt3a. A) Microfotografías en contraste de fase y fluorescencia de colonias representativas observadas al día 20 post-transducción en los cultivos control “Mock”, Mock+Wnt3a, TCF7L1 y TCF7L1+Wnt3a. B) Cuantificación del número de colonias AP+ y EOS-GFP+ observadas al día 20 post-transducción en los cultivos descritos en A.

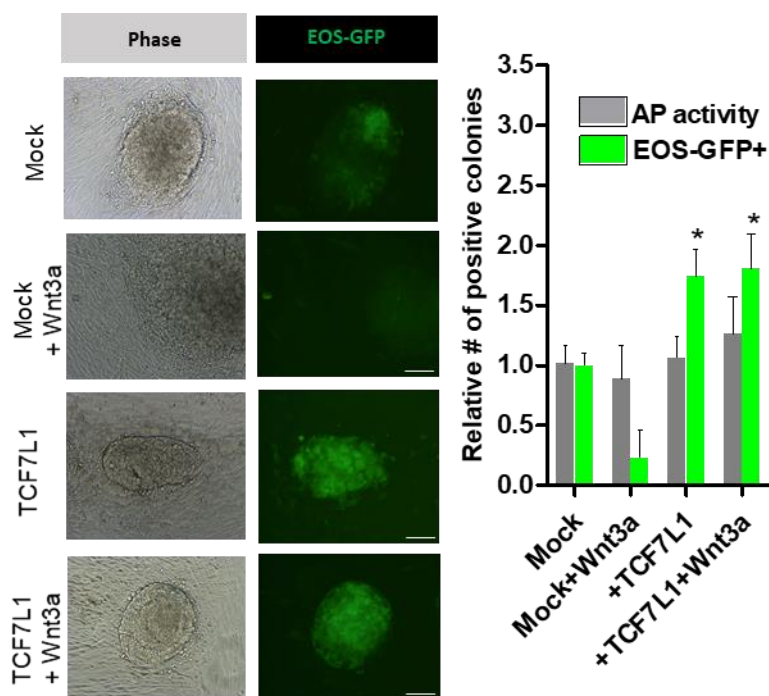


Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Secuencia	bp	Ta	Producto	Gen	Ref. Seq.
Primers para análisis de expresión						
GA3PDHF	AAGGTGAAGGTCGGAGTCAA	20	55	108	GAPDH	NM_002046.5
GA3PDHR	AATGAAGGGGCATTGATGG	20				
Oct3/4en-F	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	24	60	140	POU5F1	NM_002701.5
Oct3/4en-R	CCTCCAACCAGTTGCCCAAACCTCCC	26				
Nanog-en-F	GGACTGGCTGAATCCTTCC	21	57	143	NANOG	NM_024865.3
Nanog-en-R	CTCGCTGATTAGGCTCCAACC	21				
Sox2 en-F	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	26	59	152	SOX2	NM_003106.3
Sox2 en-R	TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG	26				
Klf4h-F	CAAGTCCC GCCGCTCATTACCAA	24	60	227	KLF4	NM_004235.5
Klf4h-R	CCACAGCCGTC CAGTCACAGTGG	24				
c-Myc-F	TGGTCTTCCCCTACCTCTCAAC	23	59	265	MYC	NM_002467.4
c-Myc-R	GATCCAGACTCTGACCTTTTGCC	23				

esg1-hf	ATATCCCGCCGTGGGTGAAAGTTC	24	59	243	DPPA5	NM_001025290.2
esg1-hr	ACTCAGCCATGGACTGGAGCATCC	24				
RexZfp42-hf	CAGATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	24	60	361	ZFP42	NM_174900.4
RexZfp42-hr	GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA	23				
CDH1-hf	AAAGGCCATTTCCTAAAAACCT	23	57	173	CDH1	NM_004360.3
CDH1-hr	TGCGTTCTCTATCCAGAGGCT	21				
gata4 f	AAATGCAGCTGGCAACTTCT	20	54	101	GATA4	NM_002052.3
gata4 r	AGCGGGAAGAGGGATTTTTA	20				
T-hf	CTGGTACTCCCAATGGGG	19	57	192	T	NM_003181.2
T-hr	GGTTGGAGAATTGTTCCGATGA	22				
Foxa2ex-f	TGCACTCGGCTTCCAGTATG	20	56	110	FOXA2	NM_021784.4
Foxa2ex-r	CATGTTGCTCACGGAGGAGT	20				
zeb1-hf	CCC CGCGCAATAACGTTACAA	23	61	224	ZEB1	NM_006941.3
zeb1-hr	TTCCTGTGCATCCTCCAGCAGTT	25				
Foxh1-hf	ACCTGCGACATGACAAGCC	19	57	154	FOXH1	NM_003923.2
Foxh1-hr	CTTCCAGCCCTCGTAGTCTT	21				
Hnf1b-hf	GTGGACCGGATGCTCAGTG	19	57	161	HNF1B	NM_000458.3
Hnf1b-hr	GGGTCTTCATAGGGGTGCC	19				
GSC-hf	AACCGGAGAAGTGAACAAG	21	54	90	GSC	NM_173849.2
GSC-hr	CTGTCCGAGTCAAATCGC	19				
FoxA1-hf	GCAATACTCGCCTTACGGCT	20	60	120	FOXA1	NM_004496
FoxA1-hr	TACACACCTTGGTAGTACGCC	21				
Nodal-hf	CAGTACAACGCTATCGCTGT	21	60	75	NODAL	NM_018055
Nodal-hr	TGCATGGTTGGTCGGATGAAA	21				
GDF3-hf	ACCCAGAAGTTCCAACCTG	20	60	138	GDF3	NM_020634
GDF3-hr	AGAAAAGCAAGTACATCCCG	21				
Axin2-hf	AGCCAAAGCGATCTACAAAAGG	22	57	188	AXIN2	NM_004655.3
Axin2-hr	AAGTCAAAAACATCTGGTAGGCA	23				
Bmp4-hf	ATGATTCTGGTAACCGAATGC	22	60	93	BMP4	NM_001202.4
Bmp4-hr	CCCCGTCTCAGGTATCAAAT	21				
TCF7-hf	CTGGCTTCTACTCCCTGACCT	21	54	92	TCF7	NM_003202.4
TCF7-hr	ACCAGAACCTAGCATCAAGGA	21				
TCF7L1-hf	TCGTCCCTGGTCAACGAGT	19	56	116	TCF7L1	NM_031283.2
TCF7L1-hr	ACTTCGGCGAAATAGTCCCG	20				
TCF7L2-hf	GCCTCTTATCACGTACAGCAAT	22	57	142	TCF7L2	NM_001146274.1
TCF7L2-hr	GCCAGGCGATAGTGGGTAAT	20				
LEF1-hf	TGCCAAATATGAATAACGACCCA	23	56	150	LEF1	NM_016269.4
LEF1-hr	GAGAAAAGTGCTCGTCACTGT	21				
Wnt3-hf	AGGGCACCTCCACATTTG	19	55	109	WNT3	NM_030753.4
Wnt3-hr	GACACTAACACGCCGAAGTCA	21				
Wnt1-hf	CGATGGTGGGGTATTGTGAAC	21	56	133	WNT1	NM_005430.3
Wnt1-hr	CCGGATTTTGGCGTATCAGAC	21				
Wnt2-hf	GATGCGTGCCATTAGCCAG	19	56	142	WNT2	NM_003391.2
Wnt2-hr	AGATTCGGACTACTTCGGAG	21				

Wnt2b-hf	CGGGACCACACCGTCTTTG	19	55	102	WNT2B	NM_004185.4
Wnt2b-hr	GCGAGTAATAGCGTGGACTAC	21				
Wnt3a-hf	AGTACCCGATCTGGTGGTC	20	58	430	WNT3A	NM_033131.3
Wnt3a-hr	CAAACCTCGATGTCCTCGCTAC	21				
Sox1-hf	TCTGTAACTCACCGGGACC	20	56	147	SOX1	NM_005986.2
Sox1-hr	ACTCAGGGTACACACAGGG	19				
Pax6-f	CGAATTCTGCAGGTGTCCAA	20	59	207	PAX6	NM_000280.4
Pax6-r	ACAGACCCCTCGGACAGTAAT	22				
pSINreverse	GCTCGTCAAGAAGACAGGGCCA	22				
Primers para clonación de cDNAs						
Xba-TCF7-f	CAGTCTAGAGCCACCATGCCGAGCTGGAC TC	32	62.5	1180	TCF7	NM_003202.4
Sal-TCF7-r	CGTGTGACCTAGAGCACTGTCATCGGAAG GAACG	35				
Xba-TCF7L1-f	CTCTCTAGACCCACCATGCCCCAGCTCG	28	62.5	1797	TCF7L1	NM_031283.2
Sal-TCF7L1-r	CGTGTGACGGAGCTTAGTGGGCAGACTT GGTGAC	35				
EOS-S4-Clal-f	CTCAATCGATCACTCCTTCTCTAGGCGCCGG A	32	61.7	669	-	-
EOS-S4-Clal-r	CAGAATCGATAGCAGGTTTCAGGCTGGGG GA	31				
Secuencias de los shRNA clonados en los vectores lentivirales para el silenciamiento de los TCFs						
shRNA TCF7	CCGGCCTCCGATGACAGTGCTCTACTCGA GTAGAGCACTGTCATCGGAAGTTTTT	57	N/A	N/A	TCF7	NM_003202.4
shRNA LEF1	CCGGCCATCAGATGTCAACTCCAACTCGA GTTGGAGTTGACATCTGATGGTTTTT	57	N/A	N/A	LEF1	NM_016269.4
shRNA TCF7L1	CCGGTCCAGCACACTTGTCTAATAACTCGA GTTATTAGACAAGTGTGCTGGATTTTTG	58	N/A	N/A	TCF7L1	NM_031283.2
shRNA TCF7L2	CCGGAGAGAAGAGCAAGCGAAATACCTCG AGGTATTCGCTTGCTCTCTCTTTTTG	58	N/A	N/A	TCF7L2	NM_001146274.1

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados para citometría de flujo (FC), inmunofluorescencia (IF) y Western Blot (WB).

	Marca	Dilución (1:X)		
		FC	IF	WB
Anticuerpos primarios				
Oct3/4	Cellsignaling	400	400	-
Nanog	Cellsignaling	400	400	-
SSEA-4 -APC	Miltenyi	10	-	-
SSEA-4	Abcam	-	1000	-
Tra1-60	Stemgent	300	300	-
Tra1-81	Stemgent	300	300	-
Vimentin	Invitrogen	200	-	-
Pan-Cytokeratin	Miltenyi	10	300	-
E-cadherin-APC	Miltenyi	10	-	-
E-cadherin	BD	-	200	-

β -catenin	Merck	1000	-	2000
Gapdh	Merck	-	-	2000
Foxa2	BD	125	125	-
Foxa2 -PE	BD	20	-	-
Brachyury	Abcam	300	300	-
Gata-4	Abcam	-	500	-
TCF7L1 (TCF3)	SantaCruz	-	100	-
PSA-NCAM-APC	Miltenyi	100	-	-
Ki67-Alexa647	BD	20	-	-
IgG-APC	Miltenyi	10	-	-
IgG-PE	Miltenyi	10	-	-
IgG-Alexa647	Abcam	1000	1000	-
Anticuerpos secundarios				
Anti-Mouse IgG Alexa568	Invitrogen	1000	1000	-
Anti-Mouse IgM Alexa594	Invitrogen	2000	2000	-
Anti-Mouse IgG+IgM Alexa488	Invitrogen	1000	1000	-
Anti-Rabbit IgG Alexa488	Invitrogen	20	20	-
Anti-Rabbit IgG Alexa594	Abcam	1000	1000	-
Anti-Rabbit IgG Alexa546	Invitrogen	2000	2000	-
Anti-Goat IgG (H+L) Alexa 488	Invitrogen	1500	1500	-
Anti-mouse IgG HRP	Invitrogen	-	-	6000

Tabla 3. Lista de moléculas utilizadas en el estudio.

	Molécula	Marca	Concentración	Descripción
#1	SB-431542	Sigma	2 μ M	Inhibidor del ALK-1
#2	PD0325901	Sigma	1 μ M	Inhibidor de MKK1 (MEK1) y MKK2 (MEK2)
#3	LDN193189	Sigma	0.5 μ M	Inhibidor de ALK2 y ALK3.
#4	IWR-1	Sigma	1 μ M	Estabilizador de Axina por interacción directa.
#5	CHIR99021	Sigma	2 μ M	Inhibidor de GSK3 α y β
#6	IDE-2	Stemgent	0.5 μ M	Inductor de la fosforilación de Smad2.

Formato anexo 1

Innovaciones y Desarrollo en Biotecnología Celular, S.A. de C.V.
Carta de Consentimiento Informado

De conformidad con la Ley General de Salud, los Principios Rectores de la Organización Mundial de la Salud sobre trasplante de células, tejidos y órganos humanos, el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de control sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos, el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, la Declaración de Ginebra de la citada Asociación y el Código Internacional de Ética Médica; se suscribe la presente carta de consentimiento informado, en los términos siguientes:

Justificación y objetivos. El signante de esta carta ha sido informado de que el objetivo de este consentimiento es acreditar que cuenta con la información necesaria y conoce el procedimiento a que se sujetará el tejido (la "Muestra") que en este acto dona de manera libre, voluntaria y sin que esto genere ninguna retribución económica para el signante o Innovaciones y Desarrollo en Biotecnología Celular, S.A. de C.V. ("INDEBIOC").

INDEBIOC manifiesta que la Muestra que recibe por parte del signante será utilizado, siempre y cuando el análisis a que se someta resulte viable, para extraer, expandir, criopreservar y almacenar células madre, las cuales se utilizarán con fines docentes, de investigación y/o uso terapéutico en terceros, siempre atendiendo a los principios de altruismo, ausencia de lucro y confidencialidad, o bien, serán destruidas (destino final) en estricto apego a las Normas Oficiales Mexicanas aplicables.

Procedimientos que van a usarse y su propósito. El signante ha sido informado ampliamente del procedimiento que aquí se describe de manera sucinta e INDEBIOC manifiesta que sólo utilizará la Muestra que entregue el signante, ya sea por extracción voluntaria y/o por indicación médica por motivo de su estado y que por razón de este documento pone a disposición de INDEBIOC para los fines señalados en el párrafo que antecede.

Etapas del procedimiento. Una vez recibida la Muestra en el laboratorio, éste realizará el proceso como sigue:

Procesamiento. Las células madre se obtendrán a partir de la Muestra que el signante ponga a disposición de INDEBIOC (la "Muestra"). El laboratorio procesará la Muestra y realizará los análisis necesarios para confirmar la existencia de células madre y su viabilidad para ser criopreservadas.

Expansión y criopreservación. Una vez determinada la obtención de células a partir de las Muestras, así como su viabilidad, el laboratorio realizará la expansión y criopreservación de las células madre, conforme a sus protocolos aprobados. La expansión será monitoreada de manera regular en intervalos máximos de tres días. La criopreservación comprende el depósito y congelamiento controlado de las células madre extraídas y sometidas al proceso de expansión.

Almacenamiento. Se almacenarán las células madre expandidas en el laboratorio.

Molestias o riesgos esperados. El signante fue informado de que la disposición de la Muestra respectiva no le representa ninguna molestia, riesgo o procedimiento adicional, toda vez que la Muestra puesta a disposición del laboratorio fue extraída con anterioridad con el médico cirujano certificado para ello y de confianza del signante, en razón de las propias indicaciones del médico cirujano o por voluntad del signante; por lo que al firmar la presente carta de consentimiento

informado libera a todo participante en el proceso descrito en el apartado anterior de cualquier responsabilidad.

Beneficios que puedan obtenerse. El signante ha sido debidamente informado por INDEBIOC que el estudio y desarrollo científico sobre las células madre extraídas de diversos tejidos, se encuentra en plena evolución científica, por lo que la Muestra que el signante entrega a INDEBIOC servirá para continuar con la investigación científica y, en su caso, para aplicación terapéutica a terceros.

Garantía de recibir respuesta a cualquier pregunta y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con el estudio. INDEBIOC garantiza al signante que toda inquietud, duda o consulta que tenga con relación al objetivo o al procedimiento del que se deriva esta carta de consentimiento informado, será atendida de manera oportuna y completa hasta que el signante encuentre total satisfacción a la misma.

Libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento. El signante sabe y comprende que podrá revocar la disposición realizada respecto de la Muestras respectiva y/o sus células madre, debiendo constar tal revocación por escrito y con acuse de recibido, en el entendido de que dicha revocación implica únicamente que INDEBIOC tendrá que dejar de disponer de las células madre a partir de la revocación del consentimiento, procediendo a realizar la destrucción de las mismas al amparo de la normatividad aplicable.

Seguridad de que no se identificará al signante y que se mantendrá la confidencialidad de la información relacionada con su privacidad. El signante autoriza la publicación de estadísticas o datos generales relativos a la disposición y/o criopreservación de células troncales obtenidas de la Muestra que entrega a INDEBIOC, siempre que exista un estricto apego al secreto profesional y de protección de sus datos personales, por lo cual su nombre e identidad no deberán ser revelados.

Compromiso de proporcionarle la información necesaria, aunque ésta pudiera afectar la voluntad del signante de entregar a INDEBIOC su Muestra. Se garantiza al signante que toda información que requiera saber se hará de su conocimiento de manera oportuna y completa hasta que el signante encuentre total satisfacción, con excepción de aquella información que se considere confidencial o reservada conforme a la normatividad aplicable.

Disponibilidad de tratamiento médico e indemnización. Toda vez que el signante ha sido debidamente informado de que derivado de la disposición y del procedimiento descrito en esta carta de consentimiento informado, como ya se señaló en el apartado correspondiente de esta carta, no existen molestias ni riesgos adicionales e independientes a la extracción de la Muestra, toda vez que no será necesaria intervención quirúrgica o tratamiento vinculado a ello; habiendo liberado a todo participante en este proceso de cualquier responsabilidad; mediante esta carta el signante acepta y reconoce que no existen daños que ameriten tratamiento médico o indemnización alguna que pudiera vincularse directamente como causados por el proceso en cuestión.

Gastos. La entrega de la Muestra que realiza el signante a INDEBIOC no genera gasto o retribución alguna para el signante, ya que hace la entrega de manera libre, voluntaria y de manera gratuita para que INDEBIOC continúe con sus estudios y desarrollos científicos de células madre, así como aplicación terapéutica a terceros.

INDEBIOC se compromete a tratar dicha Muestra bajo los estándares y lineamientos que la ley aplicable señala, respecto de tejidos entregados para procedimientos sin fines de lucro.

Los estudios en laboratorio o de naturaleza similar que sean necesarios para corroborar la inexistencia de patógenos en la Muestra respectiva, serán cubiertos por INDEBIOC, quién notificará al signante, en caso de que el resultado arroje existencia de patógenos, de lo contrario INDEBIOC no realizará notificación alguna al signante y continuará con el tratamiento al que vaya a ser destinada la Muestra.

En México, el día ___ del mes de _____ de 201_, con total información, pleno entendimiento de lo anterior y aclaradas todas las dudas, entrego de manera libre, voluntaria y gratuita la Muestra que me ha sido extraída voluntariamente y/o por indicación médica preexistente a INDEBIOC para que se utilicen únicamente en el objetivo señalado en este documento.

Firma: _____
Signante: _____
Dirección: Calle: _____ número exterior: _____ número interior: _____
colonia: _____ alcaldía o municipio: _____
código postal: _____ estado: _____ país: _____
teléfono(s) _____
correo electrónico _____

En caso de menores de edad, llenar al siguiente espacio

El Signante tiene la patria potestad y custodia del menor _____, una vez mayor de edad, el menor queda facultado para retirar su consentimiento respecto de este documento, si así lo desea.

Firma: _____
Testigo: _____
Relación con el signante: _____
Dirección: Calle: _____ número exterior: _____ número interior: _____
colonia: _____ alcaldía o municipio: _____
código postal: _____ estado: _____ país: _____
teléfono(s) _____
correo electrónico _____

POR INDEBIOC

Representante Legal

Carta anexa 1



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
APARTADO POSTAL 70228
CIUDAD UNIVERSITARIA
04510 MÉXICO, D. F.

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Comité de Ética en Investigación con Seres Humanos

A Quien Corresponda,

Después de revisar el proyecto "Papel de la vía de señalización WNT en la diferenciación de células troncales/progenitoras hematopoyéticas CD34+ definitivas a partir de células IPS" que presenta el Dr. Karlen Gazarian, investigador de este Instituto nos permitimos emitir este dictamen aprobatorio. En este proyecto se obtendrán células de pulpas dentales de individuos no identificados las que se cultivaran en condiciones que permitan la obtención de células troncales capaces de diferenciarse a células hematopoyéticas. Para este fin se obtendrán dientes extraídos por causas diversas en clínicas dentales. Los procedimientos no afectan de ninguna manera a los donantes, y por otra parte se adjunta una carta de consentimiento informado apropiada y se toman medidas de confidencialidad suficientes.

Atentamente,

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cd. Universitaria, a 6 de abril de 2016.

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Coordinador de la Comisión de Investigación
con Seres Humanos

RMJ/nlbb

Artículo principal

Wnt/ β -Catenin/TCF Pathway Is a Phase-Dependent Promoter of Colony Formation and Mesendodermal Differentiation During Human Somatic Cell Reprogramming

RICARDO RAÚL CEVALLOS,^a GRISelda RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ,^{a,b} KARLEN GAZARIAN ^a

Key Words. Cell reprogramming • Pluripotency • Wnt signaling • T-cell factors • Mesendoderm

^aBiomedical Research Institute; ^bCellular Physiology Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, México City, México

Correspondence: Karlen Gazarian, Ph.D., Laboratory of Cellular Reprogramming, Department of Genomic Medicine and Environmental Toxicology, Biomedical Research Institute, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Circuito Exterior S/N, 04510 México City, México. Telephone: 5255 56229206 (Office), 5255 56229207 (Lab); e-mail: karlen@unam.mx

Received October 11, 2017; accepted for publication January 10, 2018; first published online in *STEM CELLS EXPRESS* January 23, 2018.

<http://dx.doi.org/10.1002/stem.2788>

ABSTRACT

Somatic cell reprogramming is a biphasic phenomenon that goes through a mesenchymal-to-epithelial transition, called initiation phase, followed by a maturation phase wherein reprogramming cells acquire pluripotency. Here, we show that these phases display a differential response to Wnt signaling activation. Wnt signaling increases colony formation by promoting cellular epithelialization during the initiation phase in a *TCF7*-dependent manner. However, during maturation phase, it is also responsible for inducing mesendodermal differentiation, which is negatively regulated by *TCF7L1*. Thus, Wnt signaling inhibition or *TCF7L1* overexpression downregulates mesendodermal gene expression without perturbing pluripotency. Together, our results demonstrate that a phase-specific modulation of Wnt signaling leads to an improved reprogramming efficiency in terms of colony output and pluripotency acquisition. This work provides new insights into the cell context-dependent roles of Wnt signaling during human somatic cell reprogramming. *STEM CELLS* 2018;36:683–695

SIGNIFICANCE STATEMENT

Canonical Wnt signaling activation has been identified as a requisite for effective human somatic cell reprogramming. This study demonstrates that during the initiation phase of human cell reprogramming Wnt signaling activation is beneficial for increasing colony formation through cellular epithelialization promotion; however, in the maturation phase its activity is no longer required since it is responsible for the activation of a mesendodermal differentiation program that is deleterious for complete pluripotency acquisition. Thus, phase-specific modulation of Wnt signaling can be used during human somatic cell reprogramming for improving the reprogramming efficiency not only in terms of colony output but also for enhancing the quality of colonies.

INTRODUCTION

Human somatic cells can be reprogrammed to a pluripotent state through the ectopic expression of defined transcription factors to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) [1, 2]. Somatic cell reprogramming is characterized by stepwise epigenetic remodeling, which directs the cell to undergo a mesenchymal-to-epithelial transition (MET) [3, 4], called the initiation phase, that is followed by the maturation phase, during which reprogramming cells acquire pluripotency [5–7]. Details of the mechanisms behind reprogramming initiation and maturation, as well as the mediators of the transition between these phases during human somatic cell reprogramming are incompletely described. Nevertheless, it is reasonable that these phases may display a

differential response to endogenous and exogenous signals like Wnt [8]. Although activation of canonical Wnt signaling has been identified as a requirement for effective reprogramming of both human [9] and murine somatic cells [10–13], the molecular events underpinning the modulation of this pathway during reprogramming are not fully understood [14, 15].

Wnt signaling is essential during development and is involved in a wide range of biological processes [16, 17], usually influencing them in a context-specific manner [18–21]. Canonical Wnt pathway operates through the stabilization of the intracellular signal transducer and transcriptional coactivator β -catenin. When a Wnt ligand binds to frizzled receptors, the β -catenin destruction complex, consisting of AXIN, APC, CK1, GSK3 and the E3-ubiquitin ligase β -TrCP, is inactivated

allowing the accumulation of β -catenin and its translocation to the nucleus [16]. Once in the nucleus, β -catenin binds to TCF/LEF proteins and exchanges their repressive to active function, enabling the transcription of defined Wnt signaling targets [22]. Particularly, TCF7 and LEF1 are activators in the presence of β -catenin, whereas TCF7L1 works as a repressor that is displaced by β -catenin for adequate transcription of its target genes [23]. Importantly, TCF/LEF proteins are key components of the context-dependent effects of Wnt signaling activation and have been identified as essential regulators of pluripotency and differentiation [24–26].

Mouse embryonic stem cells (mES), which are derived from pre-implantation blastocysts, are positively influenced by Wnt signaling in terms of symmetric self-renewal in vitro [27–30]. In these cells, ablation of the Wnt signaling repressor TCF7L1 enables Wnt-independent mES expansion [29, 31, 32], while TCF7 is required for adequate self-renewal [33]. Furthermore, Wnt signaling agonists have been shown to positively regulate the maturation phase of mouse cell reprogramming toward pluripotency [20, 21], which is suggested to depend on the expression of *TCF7* and *LEF1* [11]. In contrast, in epiblast pluripotent stem cells of post-implantation embryos, canonical Wnt represents a differentiation signal, promoting primitive streak formation and mesodermal specification [34, 35], a process that is likely to be regulated by TCF7L1 [34].

Several reports have indicated that Wnt signaling is not favorable for human pluripotent stem cell (PSC) maintenance, being partially responsible for their spontaneous mesodermal differentiation [36, 37]. This is consistent with the fact that human PSCs are stable in the post-implantation epiblast state, in which Wnt signal induces differentiation [38]. However, a recent study using fibroblasts from focal dermal hypoplasia patients revealed that Wnt signaling is required for reprogramming human cells toward pluripotency [9]. This apparent contrasting evidence expose the controversy around the roles of Wnt signaling during human cell reprogramming and pluripotency, and points toward yet uncharacterized phase-specific functions of canonical Wnt pathway influenced by the biphasic nature of cellular reprogramming.

In this study, we analyzed the role of canonical Wnt signaling during human somatic cell reprogramming and described the effects of its activation and inhibition in the initiation and maturation phases. We demonstrate that Wnt signaling is responsible for the induction of mesodermal genes specifically during maturation phase. We also revealed a phase-specific role of Wnt signaling that influence colony emergence and reprogramming efficiency through the promotion of cell epithelialization. Our work describes novel, contrasting functions for canonical Wnt signaling during human fibroblast reprogramming contributing to the understanding of the molecular mechanisms behind iPSC generation from human somatic cells.

MATERIALS AND METHODS

Human Somatic Cells

Human dermal fibroblasts (HDF) were purchased from ATCC (catalog number PCS-201-010) and cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12 (DMEM/F12) (Gibco, MA, USA) supplemented with $1\times$ Glutamax (Gibco), 10% fetal bovine serum (FBS) (Corning, NY, USA) and 10 μ g/ml Gentamicin (Lonza,

Switzerland). Human mesenchymal cells (hMSC) were isolated as previously described [39] (Supporting Information Methods).

Lentiviral Vector Generation

Lentiviral particles were generated by transfection of a second generation packaging plasmid system into HEK293T (ATCC, Virginia, USA) cells, as previously described, with few modifications. Briefly, 80%–90% confluence HEK293T cells were transfected with envelope plasmid pCMV-VSV-G and packaging plasmid psPAX2, along with a transfer vector carrying the corresponding transgene, in a 1:3:4 ratio (20 μ g total DNA). DNA/Calcium-phosphate precipitates were generated using CalPhos Mammalian Transfection kit (Clontech, CA, USA), added dropwise to HEK293T cultures and incubated for 6–7 hours under standard cell culture conditions. Then, cells were washed with PBS and cultured with 10% FBS supplemented DMEM/F12. Virus supernatants were harvested every 12 hours for 3 times, then filtered with 0.45 μ m syringe filters and stored at 4°C until use. Complete description of lentiviral vectors used in the study are available in Supporting Information Methods.

Human iPSC Cell Generation

For lentiviral-mediated reprogramming, passage 3–10 HDF cultures, and passage 3–5 hMSC were transduced with filtered lentiviral supernatants for 20 hours. Cells were infected with a combination of O2S and K2M lentiviral vectors and cultured in expansion medium for 3 days. On day 1 or 2 post-transduction (p.t.), cells were detached using Accutase (Sigma-Aldrich, MO, USA), seeded at a density of 2.5×10^4 cells per cm^2 onto Matrigel (Corning) coated plates and cultured in a defined human ES medium (TeSR-E8, Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Cells were re-fed with fresh medium daily. When indicated, 50 ng/ml Wnt3a (Peprotech, NJ, USA) or 1 μ M IWR-1 (Sigma-Aldrich) was added to culture medium. At day 15–20 p.t., compact rounded colonies resembling embryonic stem cells were detached using 0.1% Type IV collagenase (Sigma-Aldrich) and sub-cultured onto Matrigel coated plates in TeSR-E8 medium. Colonies were re-plated for 10 passages to establish iPSC cell lines.

Alkaline Phosphatase Activity Assay

Alkaline phosphatase (AP) activity was detected by the colorimetric assay SigmaFast BCIP/NBT (Sigma-Aldrich). Briefly, cells were fixed with PFA for 20 seconds and then washed with TBS. BCIP/NBT reactive was added and incubated for 15 minutes at RT. AP positive colonies were counted using an Olympus IX71 (Olympus Scientific Solutions, MA, USA) phase contrast microscope.

Gene Expression Analysis By RT-PCR and RT-qPCR

Total RNA was isolated using TRIzol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, CA, USA). RNA isolation was followed by DNase I (Invitrogen) treatment and a RNA clean-up using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse-transcription reactions were performed using a One-step RT-PCR kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR (RT-qPCR) reactions were performed using KAPA SYBR FAST (Roche) master mix on a Rotor Gene 6000 thermal cycler (Qiagen). Data analysis was performed using Rotor-Gene Q series Software (Qiagen) and relative expression was calculated using Pfaffl's efficiency calibrated method [40]. Primers for RT-PCR and RT-qPCR are listed in Supporting Information Table S2.

Flow Cytometry Analysis

Flow cytometry analysis was performed in a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, NJ, USA). Fluorophore-conjugated antibodies used for flow cytometry immunostaining are listed in Supporting Information Table S3. Immunostaining was performed as recommended in the technical datasheet for each antibody. Analysis of flow cytometry acquisitions were performed using CellQuest Software (Becton Dickinson) and FlowJo v10.0.7 (FlowJo, LLC).

Immunocytochemistry

Cells were seeded on Matrigel-coated chamber slides (Nunc-Labtek, Thermo Scientific, USA). Cells were fixed with 4% PFA for 15 minutes at RT and then permeabilized with 0.2% Triton in PBS for 10 minutes. Cultures were blocked (1% BSA plus 0.2% Triton in PBS) for 30 minutes at RT and then incubated with primary antibody in blocking solution for 1 hour at RT or overnight at 4°C. After washing, the secondary antibodies were added in blocking solution for 1 hour at RT in the dark. After washing, nuclei were stained with Hoechst 33342 (Invitrogen), and the slides were mounted on coverslips with VectaShield. Epifluorescence analysis was performed using an Olympus IX71 phase-contrast microscope and images were analyzed with QCapture Suite software. Confocal microscopy analysis was performed using a Leica confocal microscope and images were analyzed with the Leica Application Suite X software.

Microarray Analysis

Human 50-mer oligo library set “A” from MWGBiotech Oligo Sets was used. Preparation of oligo library, slide printing, hybridization, acquisition, and analysis was performed as indicated in the microarray protocol and results, uploaded into NCBI GEO database and available with the accession number GSE103491. Total RNA isolates from human fibroblasts, iPSC line and pooled compact and non-compact colonies, obtained from at least three independent reprogramming experiments, were used for microarray assays. Two technical replicates were acquired for each gene and mean fluorescence intensity was normalized and transformed into z-score values.

Functional classification of significant differentially expressed genes (z-score difference $\geq \pm 1.5$) was performed using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) tool (<https://david.ncicrf.gov/>). Clusters of functionally related genes were imaged using GenePattern software.

Statistical Analysis

Values are given as mean with SE, and statistical significance was performed from at least three independent biological replicates. Student's *t* test or analysis of variance (ANOVA) were performed to analyze two or more group of means, respectively, using Prism5 GraphPad software. Tukey's post hoc test was performed to determine statistical significance of the ANOVA.

RESULTS

Expression of Primitive Streak Mesendodermal Genes During Reprogramming Is Induced By Canonical Wnt Signaling Activation

Somatic cell reprogramming is a stochastic process in which the transduced cells undergo dramatic changes related to

cellular epithelialization during initiation phase, and only a small fraction of these cells maintain the epithelial state to become the prospective compact iPSC colonies. In addition to this dynamic MET and epithelial-to-mesenchyme transitions during the initiation phase, we observed that spontaneous differentiation of colonies during advanced stages of maturation phase also contributed to cellular reprogramming failure. In the course of this differentiation process, a number of colonies seemed to abort pluripotency and acquired rhomboid morphologies resembling primitive gut epithelium, generally at the borders of compact and partially reprogrammed colonies, around days 15–20 post-transduction (p.t.) (Fig. 1A). Although morphological analysis and immunofluorescence analysis of the pluripotency factor Nanog suggested loss of compaction and differentiation, these polygonal cells maintained the expression of pluripotency markers SSEA4 and Tra1–60 (Fig. 1B), suggesting early stages of differentiation.

As an attempt to identify the nature of these non-compact cells, a global transcriptome analysis of compact and non-compact colonies isolated at day 20 after reprogramming vector transduction was performed (Fig. 1C). Non-compact colonies showed a prominent upregulation of functionally related transcription factors associated with early developmental processes, including several mesendodermal genes such as Brachyury (*T*), *FOXA1*, *HNF1B*, *GATA2*, and *GATA4* (Fig. 1C). Notably, *GATA2* and *HNF1B* were also upregulated in compact colonies and, as observed through RT-qPCR analysis, *T*, *FOXA1*, and *HNF1B* were detectable in both types of colonies but highly expressed in non-compact colonies (Supporting Information Fig. S1). Consistently, immuno-detection analysis confirmed the expression of Brachyury in compact and non-compact colonies, although its expression was particularly prominent in non-compact colonies (Fig. 1D, 1E). Quantitative RT-PCR analysis of representative mesendodermal and ectodermal genes in total colony RNA extracts confirmed a significant upregulation of the key mesendodermal transcription factors Brachyury (*T*), *FOXA2*, and Goosecoid (*GSC*) and the absence of ectodermal differentiation (Fig. 1F).

In order to determine a possible phase-specific upregulation of these genes, we first analyzed the expression of two representative pluripotency makers, SSEA-4 (Fig. 1G) and *POU5F1* (Fig. 1H) at different time points during reprogramming. We defined that the maturation phase started after day 7 p.t. and mesendodermal gene expression resulted to be upregulated specifically during this phase (Fig. 1H, 1I). These results are consistent with a previous report by Takahashi et al. [41] reporting that human somatic cells go through a transient primitive streak-like mesendoderm (PSMN) state during reprogramming, characterized by the upregulation of mesendodermal genes in prospective iPSCs (positive for the pluripotency marker Tra1–60). Notably, the authors showed that the expression of these mesendodermal genes were downregulated at later time points during maturation phase, suggesting that their expression can be considered an indicator of the maturation state.

Interestingly, our microarray experiment also revealed the upregulation of a cluster of genes related to Wnt, Bmp and TGF- β signaling pathways, which are essential for primitive streak formation and mesendodermal specification (Fig. 1C). Therefore, we hypothesized that both spontaneous differentiation of colonies and upregulation of mesendodermal genes

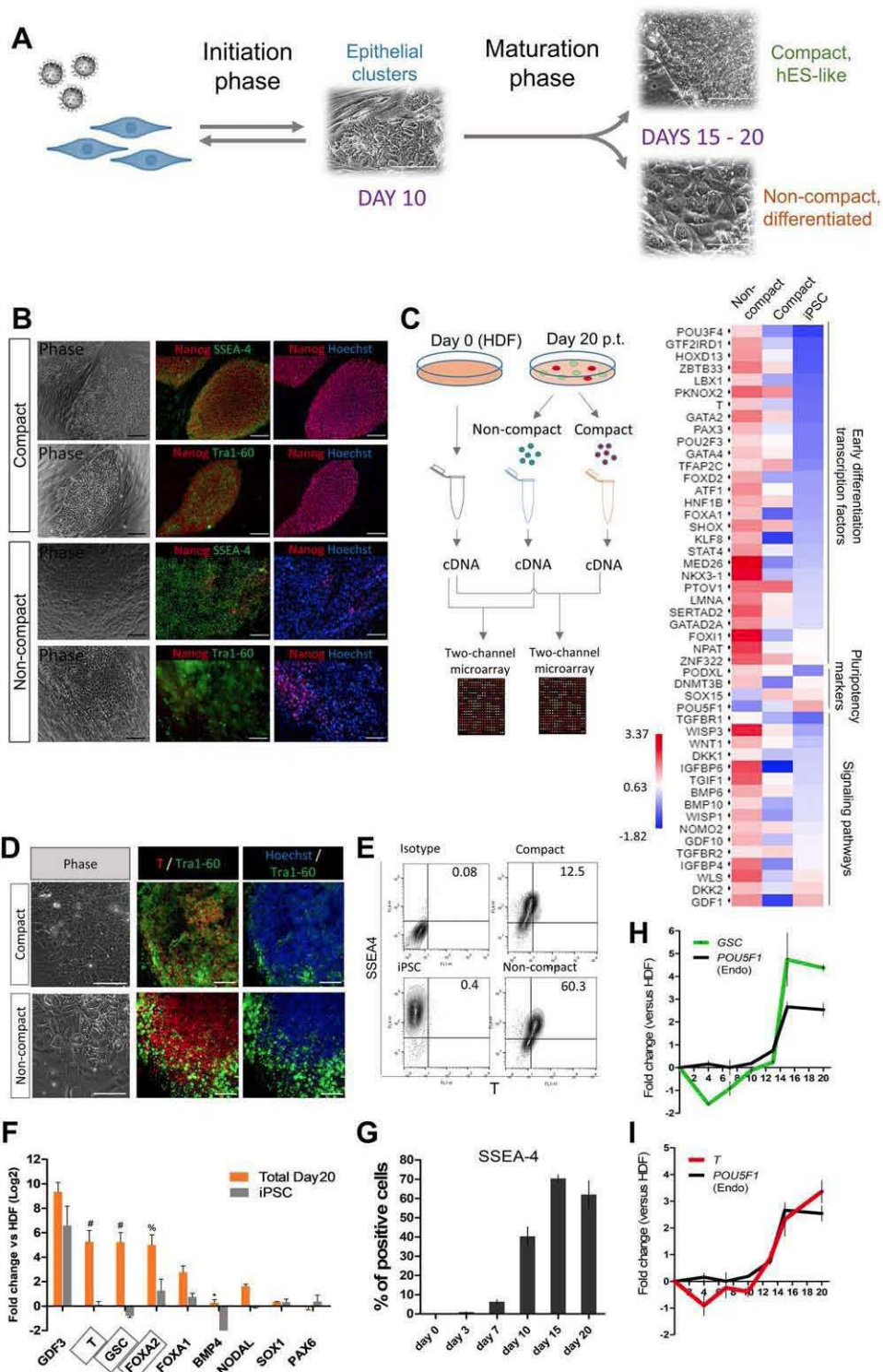


Figure 1. A mesodermal differentiation program is specifically induced during maturation phase of reprogramming. (A): Scheme representing the reprogramming process and the main morphological changes observed during maturation phase. (B): Morphology and immunocytochemical analysis of SSEA-4, Tra1-60, and Nanog expression in representative compact and non-compact colonies. (C): Global expression analysis strategy and results showing functionally related upregulated genes in non-compact colonies and their expression level in compact and iPSC colonies. (D): Comparative immunocytochemical analysis of Brachyury (T) expression in representative compact and non-compact colonies. (E): Flow cytometry analysis of T versus SSEA4 expression in isolated compact, non-compact, and iPSC colonies. (F): RT-qPCR analysis of representative mesodermal and ectodermal genes. #, $p < .001$; %, $p < .01$; *, $p < .05$. (Mean \pm SEM, $N = 3$). (G): Flow cytometry analysis of SSEA-4 positive cells during reprogramming (Mean \pm SEM, $N = 2$). (H): Time course RT-qPCR analysis of *T* and the pluripotency gene *POU5F1* during reprogramming (Mean \pm SEM, $N = 2$). (I): Time course RT-qPCR analysis of *GSC* and the pluripotency gene *POU5F1* during reprogramming (Mean \pm SEM, $N = 2$). Scale bar = 100 μ m. Abbreviations: *GSC*, goosecooid; HDF, human dermal fibroblasts; hES, human embryonic stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell; RT-qPCR, Quantitative RT-PCR.

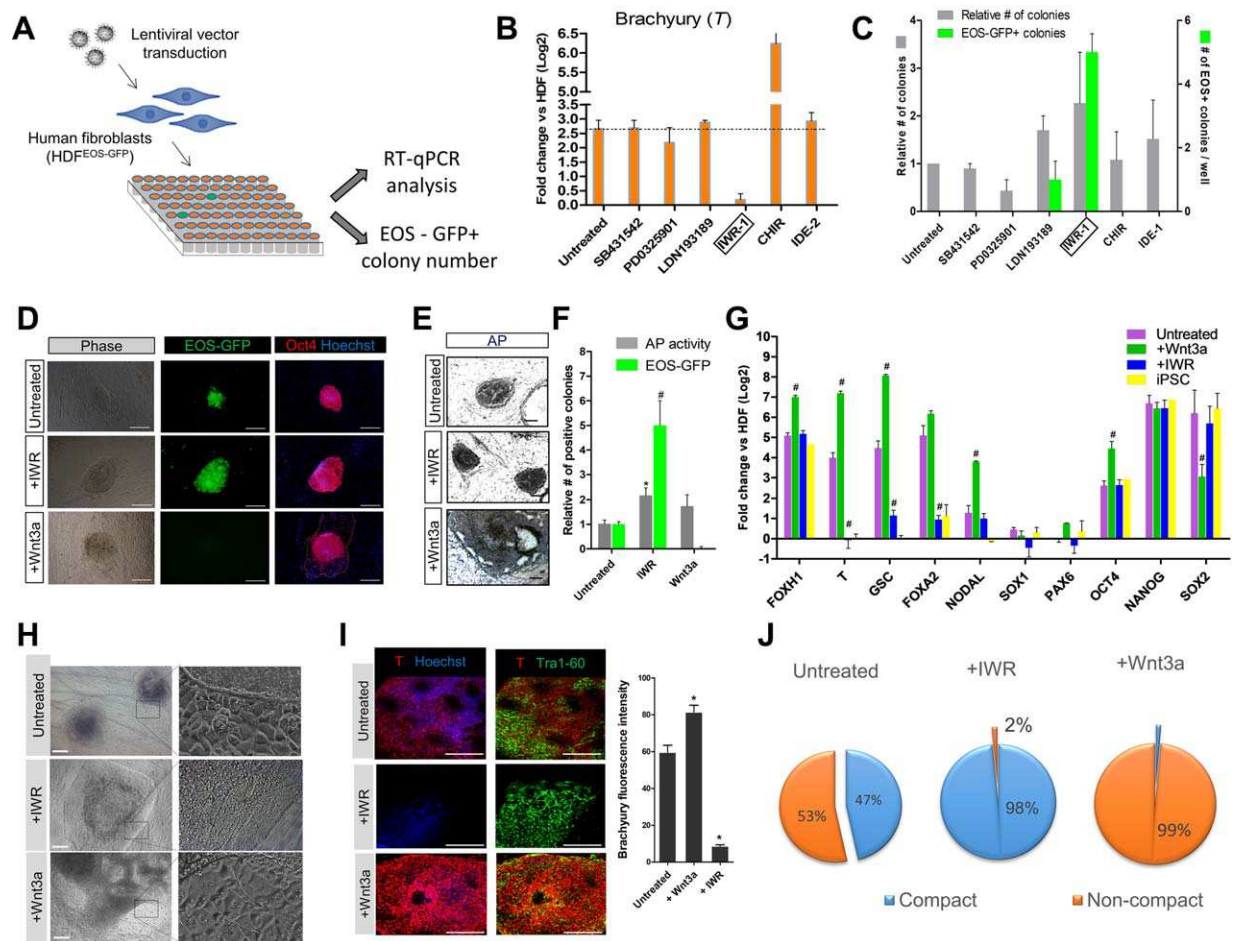


Figure 2. Canonical Wnt signaling activation induces mesendodermal gene expression and colony differentiation during reprogramming. **(A):** Scheme depicting the experimental strategy for screening small molecules that may affect mesendodermal differentiation during HDF reprogramming. **(B):** RT-qPCR analysis of Brachyury expression in small molecule-treated cultures at day 20 post-transduction (Mean \pm SEM, $N = 2$). **(C):** Number of EOS-GFP+ colonies (green bars) and relative number of total colonies (gray bars) per well (96-well plate) observed at day 20 post-transduction (Mean \pm SEM, $N = 2$). **(D):** Representative phase-contrast and epifluorescence microphotographs for the analysis of EOS-GFP+ and OCT4+ colonies from untreated, IWR-treated, and Wnt3a-treated cultures (dotted line indicate the actual size of the colony). Scale bar = 200 μ m. **(E):** Microphotographs of AP+ colonies in cultures described in (D). **(F):** Relative colony number counts from cultures described in (D, E). #, $p < .001$; *, $p < .05$, (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(G):** Quantitative RT-PCR analysis of representative mesendodermal, ectodermal, and pluripotency genes in untreated, Wnt3a-treated and IWR-treated cultures. iPSC RNA extracts were used as control. Ct values were normalized to GAPDH expression. #, $p < .001$. (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(H):** Morphological analysis of colonies in untreated, Wnt3a-treated and IWR-treated cultures emphasizing the apparition of differentiated outgrowths. Scale bar = 200 μ m. **(I):** Immunofluorescence analysis of Brachyury (T) and Tra1-60 expression and fluorescence intensity quantitation of Brachyury in cultures described in (G). Scale bar = 100 μ m. *, $p < .001$ (Mean \pm SEM, $N = 6$). **(J):** Percentage of compact (orange), partially reprogrammed (Partially rep., blue) and non-compact (gray) colonies observed at day 20 p.t. in cultures described in (G). Mean values are shown ($N = 4$). Abbreviations: GSC, goosecooid; HDF, human dermal fibroblasts; iPSC, induced pluripotent stem cell; RT-qPCR, quantitative RT-PCR.

may be induced by endogenous signal(s) that guide cells toward mesendodermal lineages, a phenomenon that might affect reprogramming efficiency. To test this hypothesis, we reprogrammed HDFs and screened small molecules that target different signaling pathways that has been reported to influence mesendodermal specification such as TGF- β , MAP kinase, BMP and Wnt signaling pathways (Fig. 2A, Supporting Information Table S1). To specifically investigate their effects during maturation phase, these molecules were added from day 7 p.t. and the expression of Brachyury (T) was determined by RT-qPCR at day 20 p.t. In parallel experiments using fibroblast harboring the pluripotency reporter EOS (composed of four repeats of the *SOX2* enhancer SRR2, followed by an early transposon promoter directing the expression of GFP)

(Supporting Information Methods, Reference 3) we counted the number of mature EOS-GFP+ colonies that emerged at day 20 p.t. in each treatment. The results showed a striking reduction of *T* expression in cells treated with IWR-1 (Fig. 2B), a small molecule that efficiently inhibit canonical Wnt signaling (Supporting Information Fig. S2) [42] and, conversely, a threefold increase in *T* expression was observed in cultures treated with the GSK3 inhibitor CHIR99021, which activates Wnt signaling. We also found that IWR-1 treatment resulted in the emergence of the highest number of homogeneous EOS-GFP+ colonies (Fig. 2C), suggesting a promotion of colony maturation. Further experiments confirmed that IWR-treated cultures greatly stimulated the emergence of EOS-GFP+ colonies, and conversely, the addition of the ligand

Wnt3a was inhibitory (Fig. 2D, 2F). Importantly, we verified that all EOS-GFP⁺ colonies in untreated and IWR-treated cultures are also positive for the pluripotency marker OCT4 (Fig. 2D). RT-qPCR analysis confirmed that IWR treatment, as well as β -catenin knockdown, efficiently inhibited mesendodermal gene expression without perturbing pluripotency (Fig. 2G, Supporting Information Fig. S3), whereas Wnt3a treated cells showed a significant upregulation of these genes and the downregulation of *SOX2* (Fig. 2G). Experiments using the porcupine inhibitor IWP2, which prevents the secretion of Wnt ligands, also showed an efficient inhibition of mesendodermal gene expression in IWP2-treated cultures (data not shown). No significant differences were observed in the expression of the ectodermal markers *SOX1* and *PAX6*, suggesting that ectodermal differentiation neither participates in this process nor is promoted by the treatments (Fig. 2G). Interestingly, in both IWR-treated and Wnt3a-treated cultures, an increase in alkaline phosphatase positive colonies was observed (Fig. 2F), suggesting that both conditions positively influenced colony emergence. However, morphological analysis of colonies indicated significant differences between the two treatments, revealing a higher colony compaction in IWR-treated cells and, by contrast, a substantial cellular differentiation in Wnt3a-treated cultures (Fig. 2E, 2H). Immunofluorescence analysis of representative colonies from both treatments confirmed a higher Brachyury signal and a heterogeneous Tra1–60 staining of colonies in the Wnt3a-treated cultures compared to the undetectable *T* staining in IWR-treated cultures (Fig. 2I). Quantification of the proportion of compact and non-compact colonies observed at day 20 p.t. also confirmed that colony differentiation was largely prevented in IWR-treated cultures which contrasted with numerous differentiated colonies in Wnt3a-treated cultures (Fig. 1J). Isolation and re-plating of representative colonies from each treatment showed spontaneous differentiation of colonies from Wnt3a-treated cultures which resulted in an inefficient iPSC line derivation, whereas efficient isolation of iPSC lines was achieved from IWR-treated cultures (Supporting Information Fig. S4).

Mesendodermal Gene Expression Is Inhibited By TCF7L1 During Maturation Phase

The above results clearly showed that endogenous Wnt signaling activation was responsible for the mesendodermal differentiation observed in most of the colonies during the maturation phase, hence modulation of Wnt signaling after day 7 p.t. positively impacted this phenomenon efficiently. However, active β -catenin as well as *AXIN2* expression revealed that endogenous Wnt signaling is activated from the beginning of the reprogramming process, but is further enhanced from day 10 p.t. (Supporting Information Fig. S5A, S5B) when pluripotency and mesendodermal genes, including the mesendodermal marker *WNT3* are concomitantly activated (Supporting Information Fig. S5B, S5C, S5D). Thus, we hypothesized that Wnt signaling may have different context-dependent roles during initiation and maturation phases that could be mediated by differential T-cell factor regulation. To test this hypothesis, we treated cells with Wnt3a or IWR from day 3 p.t. (Fig. 3A) and analyzed the relative expression of mesendodermal genes at different time points during reprogramming. As expected, an early treatment resulted in the upregulation of mesendodermal gene expression in Wnt3a-treated cultures and their strong downregulation in

IWR-treated cultures at day 20 p.t. (Fig. 3B). Time course analysis of Brachyury expression confirmed that even under early exogenous Wnt signaling activation, its expression was specifically upregulated during maturation phase, while Wnt inhibition by IWR treatment almost abolished *T* expression (Fig. 3C). Remarkably, under early Wnt signaling activation, we found an increase in colony numbers, whereas the colony output enhancement previously observed in IWR-treated cultures was now inhibited by premature Wnt signaling inhibition (Fig. 3D). These results suggested that Wnt signaling may play a positive role during initiation phase by promoting colony formation.

To investigate the effects of Wnt signaling modulation on the regulation of Wnt signaling effectors, we performed a time course RT-qPCR analysis of *TCF7*, *TCF7L1*, *TCF7L2*, and *LEF1* during reprogramming. We found that *TCF7* expression was upregulated during initiation phase and slowly downregulated during maturation phase (Fig. 3Ei). Interestingly, Wnt signaling activation increased *TCF7* expression levels during initiation phase, suggesting an implication of this transcription factor during reprogramming initiation (Fig. 3Ei). Strikingly, a differential pattern of expression was observed in *TCF7L1* during maturation phase, revealing a strong upregulation under signaling inhibition by IWR, and downregulation under signaling activation by Wnt3a (Fig. 3Eii). Although *TCF7L2* and *LEF1* showed a strong transient upregulation during maturation phase, differential expression due to Wnt signaling modulation was not found (Fig. 3Eiii–iv). Since differential expression of *TCF7L1* correlated inversely with that of Brachyury, we analyzed whether *TCF7L1* acts as a negative regulator of mesendodermal genes. Therefore, we knockdown the expression of each T-cell factor individually during maturation phase, using validated lentiviral shRNA vectors (Supporting Information Fig. S6) and quantified *T* and *GSC* expression at day 20 p.t. As expected, *TCF7L1* knockdown promoted a slight enhancement in mesendodermal gene expression (Fig. 3F), however this enhancement was not comparable to that observed with the addition of Wnt3a (Fig. 3B). Additionally, analysis of colonies at day 20 p.t. indicated no significant difference in EOS-GFP⁺ colony emergence, although a slight enhancement in colony output was observed in *TCF7*-knockdown cultures (Fig. 3G).

To further investigate the role of *TCF7L1* in mesendodermal gene expression and colony maturation, we analyzed the effect of over-expressing this gene with and without the addition of exogenous Wnt3a. Given the possibility of transgene silencing during maturation phase, *TCF7L1* cDNA was cloned under the control of a chimeric regulatory sequence comprising EOS enhancer and CAG promoter (Fig. 3H, Supporting Information Fig. S7). Analysis of *T* and *GSC* expression measured at day 20 p.t. showed a strong downregulation in *TCF7L1*-overexpressing cultures, even under Wnt3a stimulation (Fig. 3I). Also, we observed a decreased number of differentiated colonies and undetectable *T* protein Brachyury in *TCF7L1*-overexpressing cells (Fig. 3J). Quantification of AP⁺ and EOS-GFP⁺ colonies at day 20 p.t. indicated that *TCF7L1*-overexpression promoted the emergence of mature EOS-GFP⁺ colonies without varying total colony numbers (Fig. 3K, 3L). Analysis of T-cell factor expression in established PSC lines revealed that *TCF7L1* is highly expressed in these cells (Supporting Information Fig. S8A) and, consistent with the aforementioned results during reprogramming, *TCF7L1* was strongly downregulated after mesoderm directed differentiation

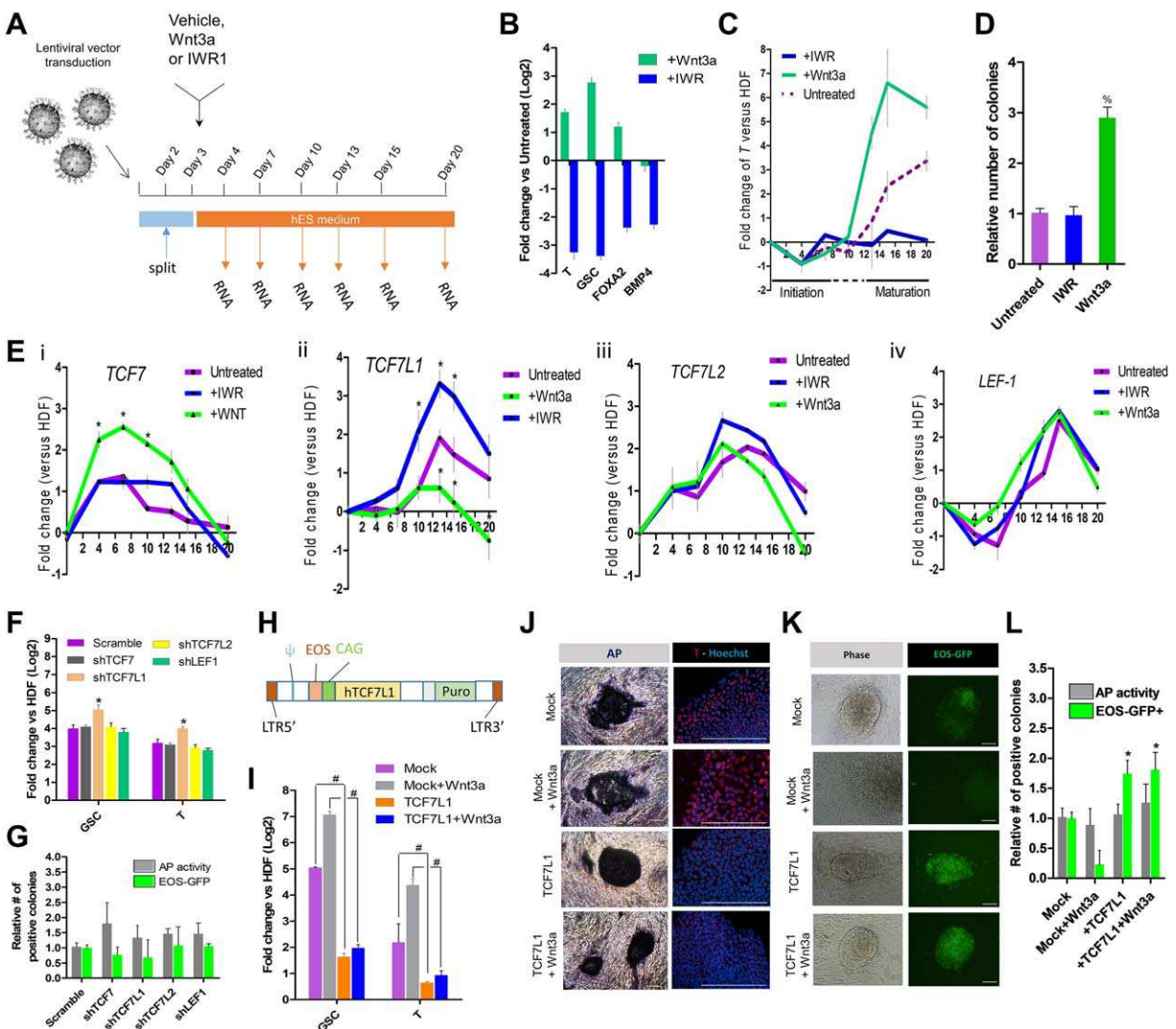


Figure 3. Wnt signaling repressor TCF7L1 is a negative regulator of mesendodermal gene expression during maturation phase. **(A):** Scheme of the experimental strategy used for the time course analysis of reprogramming cells under an early and continuous treatment with Wnt3a or IWR-1. **(B):** RT-qPCR analysis of representative mesendodermal genes from cultures treated with Wnt3a or IWR-1 at day 20 post-transduction. Expression was relative to untreated culture extracts (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(C):** Time course RT-qPCR analysis of Brachyury (T) in cultures described in (A) (Mean \pm SEM, $N = 2$). **(D):** Relative number of colonies observed at day 20 post-transduction, in cultures described in (A). #, $p < .001$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(E):** Time course RT-qPCR analysis of the TCF/LEF factors *TCF7* (i), *TCF7L1* (ii), *TCF7L2* (iii), and *LEF-1* (iv). *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(F):** Comparative RT-qPCR analysis of T and GSC at day 20 p.t. from cultures transduced at day 7 p.t. with shRNA lentiviral vectors against TCF/LEF factors and a Scramble control. *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(G):** Quantification of total colonies and EOS-GFP+ colonies in cultures described in (F). **(H):** Representative scheme of the lentiviral vector construct used for *TCF7L1* overexpression. **(I):** Comparative RT-qPCR analysis of GSC and T at day 20 post-transduction in cultures transduced with the EOS-TCF7L1 construct or with a Mock control at day 7 p.t., with or without the addition of Wnt3a. #, $p < .001$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(J):** Microphotographs showing AP and Brachyury (T) expression of representative colonies in cultures described in (I). **(K):** Microphotographs showing EOS-GFP signal in cultures described in (I). **(L):** Quantification of AP+ and EOS-GFP+ colonies in cultures described in (H). *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). Scale bar = 100 μ m. Abbreviations: AP, alkaline phosphatase activity; GSC, gooseoid; HDF, human dermal fibroblasts.

(Supporting Information Fig. S8B). Together, these results strongly suggest that *TCF7L1* upregulation is necessary for inhibiting spontaneous mesendodermal differentiation during maturation phase.

Wnt Signaling Promotes Colony Emergence During Initiation Phase in a TCF7-Dependent Manner

One interesting finding about the effects of Wnt signaling activation from early days of reprogramming was the strong enhancement of colony output which contrasted with that

observed when Wnt3a was added only during maturation phase (Fig. 4A). In addition, the early upregulation of the Wnt signaling effector TCF7 reinforced the hypothesis that Wnt signaling has a relevant role during reprogramming initiation (Fig. 3Ei). Accordingly, we observed that early activation of Wnt signaling strongly promoted colony output, even if the treatment was discontinued during maturation phase (Fig. 4A). Conversely, addition of IWR-1 from late stages promoted colony output whereas an early inhibition of Wnt hindered this effect (Fig. 4B).

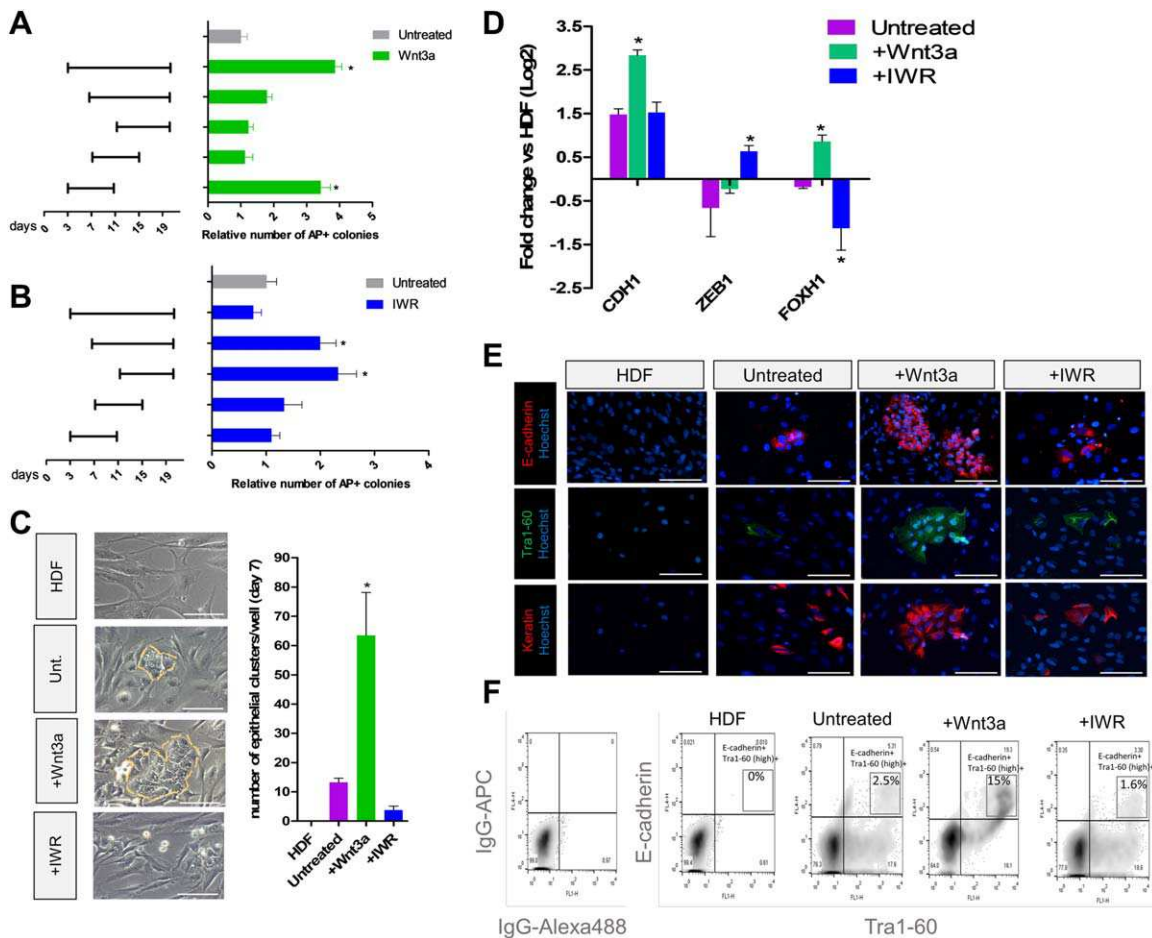


Figure 4. Wnt signaling activation promotes epithelialization and colony emergence during initiation phase. **(A):** Quantification of relative AP+ colony number at day 20 p.t. in cultures exposed to 50 ng/ml Wnt3a at different time frames during reprogramming, as indicated by bars in the left. *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(B):** Quantification of relative AP+ colony number at day 20 p.t. in cultures exposed to 1 μ M IWR-1 at different time frames during reprogramming, as indicated by bars in the left. *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(C):** Morphological analysis and quantification of total epithelial clusters per well (of 24-well plates) at day 7 p.t. in untreated, Wnt3a-treated, and IWR-treated cultures compared to HDF cultures. *, $p < .01$ (Mean \pm SEM, $N = 4$). **(D):** RT-qPCR analysis of expression of the epithelial-to-mesenchyme transition markers *CDH1*, *ZEB1* and *FOXH1*, in cultures described in (C). *, $p < .05$; %, $p < .01$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(E):** Immunofluorescence analysis of the expression of E-cadherin, Keratin, and Tra1-60 at day 7 p.t. in cultures described in (C). Scale bar = 100 μ m. **(F):** Flow cytometry analysis of expression of the epithelial marker E-Cadherin versus Tra1-60 at day 7 p.t. in cultures described in (C). Abbreviations: AP, alkaline phosphatase activity; HDF, human dermal fibroblasts.

During the early days of reprogramming, transduced cells suffer active morphological changes leading to polarization and epithelialization that result in the formation of epithelial-like clusters from days 5 to 10. It was noteworthy that the emergence of this epithelial-like clusters was strongly stimulated by the addition of exogenous Wnt from the beginning of reprogramming (Fig. 4C). Given that E-cadherin induction during this initial stage is one of the main requisites for colony formation [43–45], we analyzed its expression at day 7 p.t. We found that the E-cadherin gene *CDH1* was upregulated in Wnt3a-treated cells (Fig. 4D). Interestingly the epithelial marker *FOXH1* which has been suggested to promote MET was also upregulated by Wnt3a addition and strongly inhibited by IWR treatment (Fig. 4D). Consistently, upregulation of E-cadherin repressor *ZEB1* was observed in IWR-treated cultures (Fig. 4D).

Apart from E-cadherin protein, keratin, and Tra1-60 was also detected in epithelial clusters (Fig. 4E), resembling the epidermal-like cells previously described by Takahashi et al.

[41]. We noted that Wnt3a promoted the expansion of this epithelial population, positive for E-cadherin and Tra1-60, implying that this epithelialization is induced specifically in prospective iPSC cells (Fig. 4F). Although no major changes in total cell population doubling time was observed during initiation phase with the addition of Wnt3a or IWR-1 (Supporting Information Fig. S9A), an increase in the proportion of the E-cadherin + Ki67+ cells was detected in Wnt3a-treated cells (Supporting Information Fig. S9B), underscoring the role of Wnt signaling in the expansion of the initial epithelial cell population.

In order to investigate the role of T-cell factors during this early epithelialization process, we transduced cells with lentiviral vectors harboring shRNA against specific TCFs at day 2 p.t. (Fig. 5A). *TCF7* knockdown decreased the number of E-cadherin positive epithelial clusters observed at day 7 p.t. (Fig. 5B, Supporting Information Fig. S10) resulting in a lower colony output measured at day 20 p.t. (Fig. 5C). As expected, this *TCF7*-dependent effect on colony output was limited to

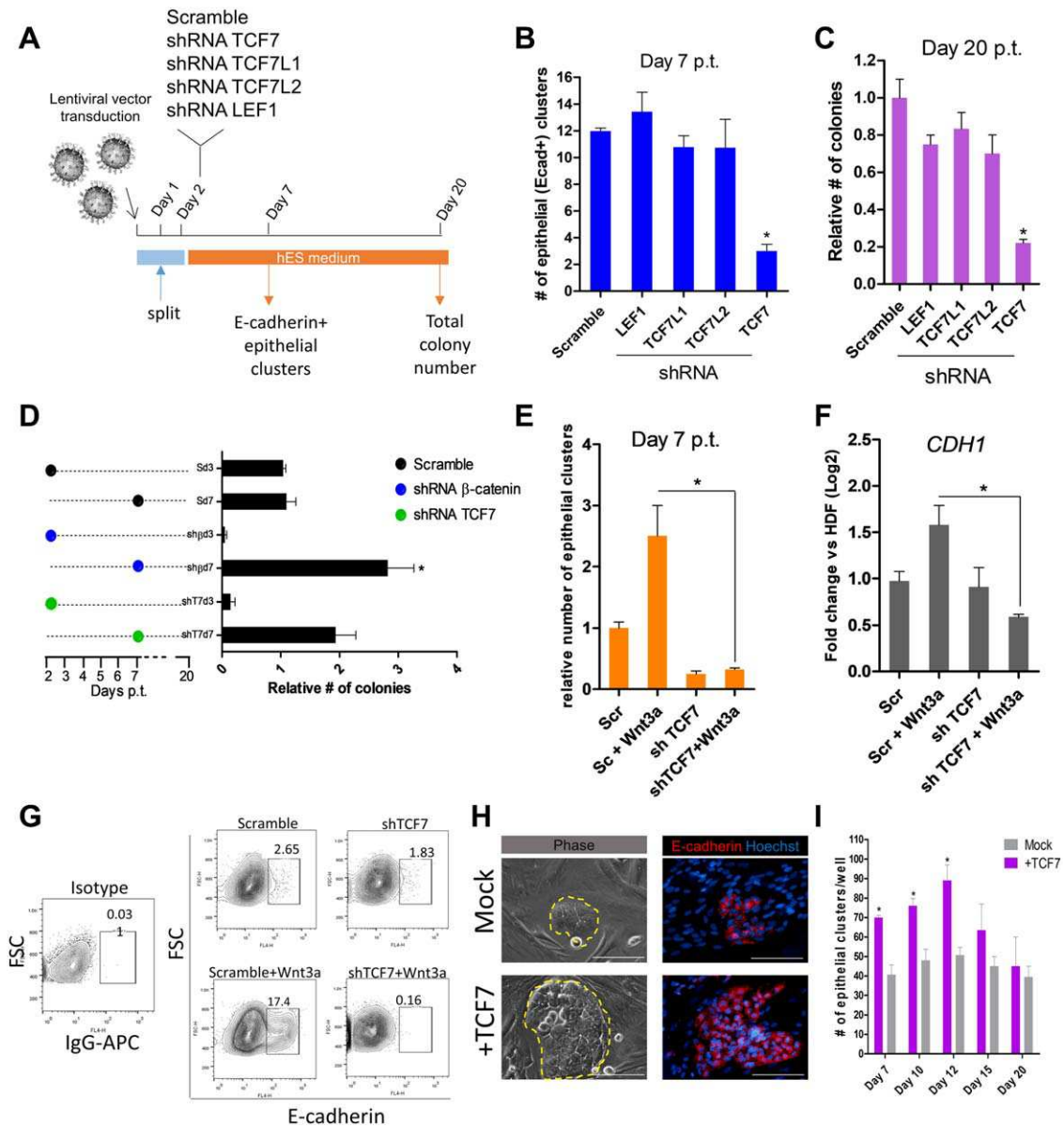


Figure 5. Wnt signaling regulates cellular epithelialization and colony output in a TCF7-dependent manner. **(A):** Scheme of the experimental strategy used for the analysis of reprogramming cells transduced with lentiviral vector shRNAs against either TCF7, TCF7L1, TCF7L2, or LEF1. **(B):** Number of E-cadherin+ epithelial clusters per well (46-well plates) that emerged until day 7 after transduction with reprogramming vectors along with an shRNA lentiviral vector as indicated in (A).*, $p < .01$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(C):** Number of total colonies observed at day 20 p.t. in experiments described in (A). **(D):** Total colony number at day 20 p.t. in experiments performed with shRNA lentiviral vectors against β -catenin, TCF7 or scramble controls; reprogramming cells were transduced with the shRNA vector or scramble vector at day 2 or at day 7 p.t. as indicated by bars in the left. *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(E):** Epithelial clusters that emerged until day 7 p.t. with or without Wnt3a stimulation and transduced with the shRNA-TCF7 vector or with the scramble control vector (Scr). *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(F):** Expression of E-cadherin gene *CDH1* in experiments described in (E). *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(G):** Flow cytometry analysis of E-cadherin expression in cultures described in (E). **(H):** Morphological and immunocytochemical analysis of representative epithelial clusters that emerged until day 7 p.t. in cultures co-transduced with a TCF7 overexpression vector or with a Mock control vector. **(I):** Total epithelial cluster/colonies per well (24 well plates) at days 7, 10, 12, 15, and 20 p.t. in cultures described in (H). *, $p < .01$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). Abbreviation: HDF, human dermal fibroblasts.

the initiation phase, since *TCF7* knockdown from day 7 p.t. did not reduce total colony number (Fig. 5D). Notably, this phase-specific effect of *TCF7* was comparable to that of β -catenin knockdown (Fig. 5D). In addition, knockdown of *TCF7* inhibited the formation of the epithelial cell population in the presence of Wnt3a (Fig. 5E), as well as downregulated *CDH1* gene expression (Fig. 5F, 5G).

On the other hand, overexpression of *TCF7* using a lentiviral construction (Supporting Information Fig. S11) transduced at day 2 p.t. promoted the formation of large epithelial cell clusters during initiation phase (Fig. 5H, 5I). Noteworthy, after day 12 p.t., we observed considerable colony differentiation and cellular detachment in *TCF7* overexpressing cells, indicating that constant expression of *TCF7* through maturation

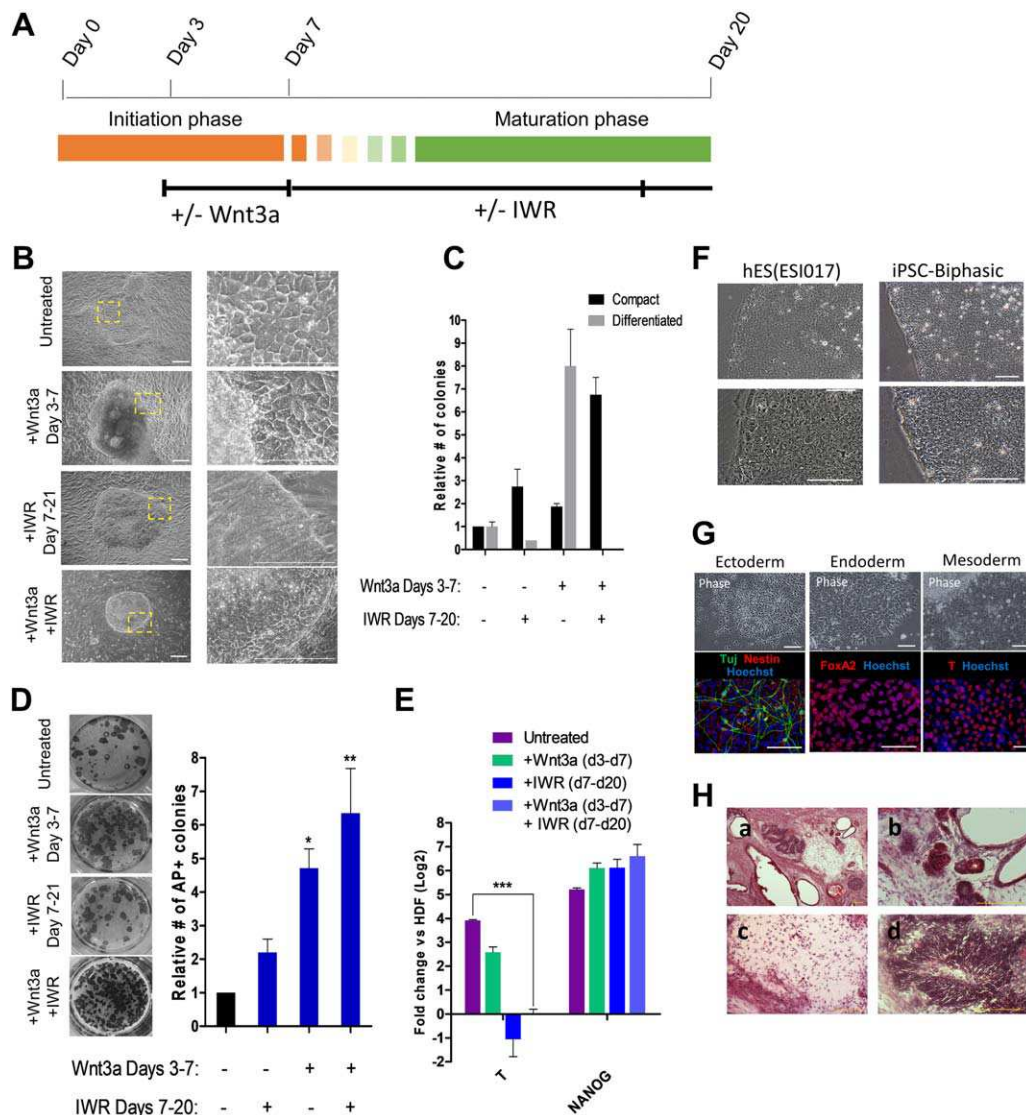


Figure 6. Biphasic modulation of canonical Wnt signaling promotes reprogramming efficiency of human fibroblasts. **(A):** Representative scheme of the phase-specific Wnt signaling modulation during reprogramming. **(B):** Morphological analysis of colonies of untreated, Wnt3a-treated, IWR-treated, and biphasic-treated cultures at day 20 p.t. Scale bar = 200 μ m. **(C):** Relative quantitation of compact and non-compact colonies observed at day 20 p.t. in cultures described in (B). **(D):** Alkaline phosphatase assay and relative AP+ colony number quantification in cultures described in (B). *, $p < .05$; **, $p < .01$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(E):** Comparative RT-qPCR analysis of expression of Brachyury (T) and the pluripotency factor NANOG, performed in cultures described in (B). Ct values were normalized to GAPDH gene expression. ***, $p < .001$; *, $p < .05$ (Mean \pm SEM, $N = 3$). **(F):** Morphological analysis of colonies from an hES line (ESI017) and an iPSC line derived from a biphasic-treated culture (iPSC-Biphasic). **(G):** iPSC-Biphasic cell lines have the potential to differentiate into ectodermal, endodermal, and mesodermal lineages in vitro. **(H):** Cryo-section of a teratoma generated from an iPSC-Biphasic cell line, stained with H&E and exhibiting structures suggesting endodermal (b), mesodermal (c) and ectodermal (d) differentiation. Abbreviations: HDF, human dermal fibroblasts; hES, human embryonic stem cell; iPSC, induced pluripotent stem cell.

phase resulted deleterious for colony stability. Thus, despite the intense epithelialization during initiation phase in *TCF7*-overexpressing cells, the final colony output did not increase (Fig. 5).

Biphasic Modulation of Wnt Signaling Enhances Human Somatic Cell Reprogramming

Based on the positive effect of Wnt activation during the initiation phase and its negative effect during the maturation phase, we speculated that exogenous phase-specific modulation of Wnt signaling could improve overall reprogramming efficiency in terms of both colony output and maturation

status. Consistently, we observed that stimulation of Wnt signaling during the initiation phase and its inhibition during the maturation phase (Fig. 6A) led to colony compaction and suppression of differentiation (Fig. 6B); and, as an overall result, it increased up to sevenfold the colony output (Fig. 6C, 6D). Moreover, this biphasic modulation of Wnt signaling efficiently downregulated the expression of the mesodermal gene *T* maintaining a strong upregulation of *NANOG* (Fig. 6E). With this optimized reprogramming strategy, using lentiviral and Sendai vectors we efficiently derived human iPSC lines from HDFs and mesenchymal cells, with normal morphological (Fig. 6F) and functional characters both in vitro (Fig. 6G) and

in vivo (Fig. 6H). Importantly, we observed efficient mesodermal and endodermal differentiation in these biphasic treated cells (Fig. 6G), indicating that Wnt signaling inhibition during reprogramming did not affect mesendodermal specification in established iPSC lines. Together, these results provide new evidence that confirm the relevance of the biphasic role of Wnt signaling during human somatic cell reprogramming.

DISCUSSION

Somatic cell reprogramming goes through two main phases: initiation and maturation. These two phases are represented by distinct cellular contexts that have been previously described [6, 46]. During the initiation phase, a fraction of transduced cells acquire epithelial morphology in the absence of endogenous expression of pluripotency genes. During maturation phase, however, epithelial cells start a process of compaction and the activation of endogenous pluripotency genes as well as mesendodermal differentiation genes is detected. Thus, it may be reasonable that somatic cell reprogramming is affected by endogenous and exogenous signals in a phase-dependent manner. Our work demonstrates that canonical Wnt signaling is a major pathway that regulates these two compartments of the reprogramming process, and that a phase-specific manipulation of this signal enables a significant improvement in reprogramming efficiency. Exogenous activation of Wnt signaling during initiation phase had a strong impact in cellular epithelialization, promoting the emergence of several epithelial clusters which resulted in a higher colony output. However, both endogenous and exogenous Wnt signaling activity during maturation phase induced mesendodermal differentiation in cells within colonies impacting pluripotency maintenance and colony output.

Notably, the positive effect of Wnt signaling activation during initiation phase observed in this study is consistent with a previous work by Ross et al. [9] demonstrating that fibroblasts with a mutation in the Porcupine gene *PORC* are unable to form iPSC colonies during reprogramming. Although Porcupine is a protein involved in the secretion of both canonical and non-canonical Wnt signaling ligands, their work provided the first evidence that human somatic cell reprogramming is favored by Wnt signaling activity. Our work goes further highlighting the specific positive role of canonical Wnt signaling during initiation phase and revealing that the promotion of epithelialization by Wnt is positively regulated by *TCF7*, a Wnt effector previously identified as a positive regulator of self-renewal of murine PSCs [47], as well as the pluripotency acquisition during maturation phase of murine cell reprogramming [10].

Although *TCF7* was highly upregulated by exogenous activation of Wnt signaling during initiation phase, its expression was gradually downregulated during maturation phase. Additionally, we observed that forced expression of *TCF7* resulted deleterious during maturation phase leading to colony detachment or differentiation. The implication of the Wnt/*TCF7* pathway during the initiation phase but not in pluripotency acquisition pose an interesting contrast between the role of Wnt signaling in human and mouse cell reprogramming, which can be related to the fundamental difference in the state of pluripotency that exist between human and murine

PSCs. In this respect, it has been shown that Wnt signaling activation can be deleterious for the maintenance of pluripotency in human PSC but not in murine PSC [48–51].

Consistent with this notion, we found that Wnt signaling is responsible for the induction of mesendodermal gene expression and the formation of differentiated outgrowths within colonies during maturation phase, a phenomenon previously described by Takahashi et al. using a feeder-dependent reprogramming system [41]. In our feeder-free system, the expression of the key primitive streak mesendodermal genes *T*, *FOXA2*, and *GSC* was dependent on Wnt activity. Small molecule-mediated inhibition of this signaling, as well as shRNA-mediated knockdown of β -catenin, strongly suppressed the expression of these genes, pointing to a role of Wnt/ β -catenin pathway in the establishment of the PSMN during maturation phase. Since we successfully generated iPSC lines from cultures in which the expression of mesendodermal genes was inhibited, we assume that the expression of these genes is dispensable for human somatic cell reprogramming. Of note, primitive streak genes *FOXH1*, *GDF3* and *NODAL*, previously described as markers of the PSMN [52], were not altered by Wnt signaling inhibition probably because these genes are induced by the pluripotency core circuitry in the epiblast state of pluripotency [53–55]. Hence, the expression of these genes during the maturation phase might indicate the acquisition of an epiblast pluripotency state rather than mesendodermal differentiation. Therefore, the expression of *T*, *FOXA2*, and *GSC*, which are also expressed during anterior primitive streak specification [56], can be considered reliable indicators of mesendodermal differentiation during reprogramming.

Another finding that highlighted the contrasting role of Wnt signaling in human and murine cell reprogramming, was the strong upregulation of *TCF7L1* during maturation phase of human cell reprogramming. *TCF7L1*, also known as *TCF3*, is a Wnt signaling transcriptional repressor that has been previously identified as a component of the pluripotency core circuitry in PSCs [57, 58]. During murine cell reprogramming, Ho et al. [11] demonstrated that *TCF7L1* over-expression was deleterious for pluripotency acquisition. In our reprogramming set up, *TCF7L1* expression showed a strong dependency on Wnt signaling activity and over-expression of *TCF7L1* downregulated mesendodermal gene expression and promoted the emergence of EOS-GFP⁺ colonies. This supports the notion that human PSCs are independent of the transcriptional activity of Wnt signaling target genes for maintaining self-renewal [36], but also, that the inactivation of Wnt signaling pathway can be positive for the induction and maintenance of pluripotency [34, 37]. Thus, we can hypothesize that the contrasting effects of Wnt signaling in human and murine pluripotency acquisition during reprogramming may arise from the profound biological difference existing between human “primed” and murine “naïve” pluripotency states, and the contrasting molecular mechanisms behind the maintenance of their self-renewal [59].

CONCLUSION

Taken together, our work indicates that Wnt signaling has contrasting, biphasic roles during pluripotency induction in

human fibroblasts. This implies the existence of two distinct cellular contexts for the function of canonical Wnt signaling during human somatic cell reprogramming: an initial cellular context where Wnt promotes epithelialization in a *TCF7*-dependent manner, which is critical for colony emergence, and a maturation phase context, in which Wnt induces mesendodermal differentiation facilitated by *TCF7L1* downregulation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank to Lorena Chávez González, Simón Guzmán León, José Luis Santillán Torres, and Jorge Ramírez (Microarray Unit of Instituto de Fisiología Celular-UNAM) for technical assistance in the microarray determinations. We thank Msc. Alejandra F. Bray for technical support. The work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT; #201382) and Programa de Apoyo a Proyectos de

Investigación e Innovación Tecnológica (DGAPA-PAPIIT; #IT200313) awarded to K.G.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

R.R.C.: conception and design, collection and assembly of data, data analysis and interpretation, manuscript writing with the input from other two authors; G.R.-M.: collection and assembly of data, data analysis and interpretation, final approval of manuscript; K.G.: project supervision, data analysis and interpretation, provision of study material, final approval of manuscript.

DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST

The authors indicated no potential conflicts of interest.

REFERENCES

- 1 Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861–872.
- 2 Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007;318:1917–1920.
- 3 Hoffding MK, Hyttel P. Ultrastructural visualization of the Mesenchymal-to-Epithelial Transition during reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 2015;14:39–53.
- 4 Samavarchi-Tehrani P, Golipour A, David L et al. Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming. *Cell Stem Cell* 2010;7:64–77.
- 5 Buganim Y, Faddah DA, Jaenisch R. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet* 2013;14:427–439.
- 6 David L, Polo JM. Phases of reprogramming. *Stem Cell Res* 2014;12:754–761.
- 7 Khazaie N, Massumi M, Wee P et al. Involvement of polycomb repressive complex 2 in maturation of induced pluripotent stem cells during reprogramming of mouse and human fibroblasts. *PLoS One* 2016;11:e0150518.
- 8 Marson A, Foreman R, Chevalier B et al. Wnt signaling promotes reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell* 2008;3:132–135.
- 9 Ross J, Busch J, Mintz E et al. A rare human syndrome provides genetic evidence that WNT signaling is required for reprogramming of fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Cell Rep* 2014;9:1770–1780.
- 10 Aulicino F, Theka I, Ombrato L et al. Temporal perturbation of the Wnt signaling pathway in the control of cell reprogramming is modulated by TCF1. *Stem Cell Reports* 2014;2:707–720.
- 11 Ho R, Papp B, Hoffman JA et al. Stage-specific regulation of reprogramming to induced pluripotent stem cells by Wnt signaling and T cell factor proteins. *Cell Rep* 2013;3:2113–2126.
- 12 Kimura M, Nakajima-Koyama M, Lee J et al. Transient expression of WNT2 promotes somatic cell reprogramming by inducing beta-catenin nuclear accumulation. *Stem Cell Reports* 2016;6:834–843.
- 13 Zhang P, Chang WH, Fong B et al. Regulation of induced pluripotent stem (iPS) cell induction by Wnt/beta-catenin signaling. *J Biol Chem* 2014;289:9221–9232.
- 14 Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: History, mechanisms, and applications. *Genes Dev* 2010;24:2239–2263.
- 15 Yamanaka S. Elite and stochastic models for induced pluripotent stem cell generation. *Nature* 2009;460:49–52.
- 16 Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192–1205.
- 17 Gessert S, Kuhl M. The multiple phases and faces of wnt signaling during cardiac differentiation and development. *Circ Res* 2010;107:186–199.
- 18 Naito AT, Shiojima I, Akazawa H et al. Developmental stage-specific biphasic roles of Wnt/beta-catenin signaling in cardiomyogenesis and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:19812–19817.
- 19 Nakamura Y, de Paiva Alves E, Veenstra GJ et al. Tissue- and stage-specific Wnt target gene expression is controlled subsequent to beta-catenin recruitment to cis-regulatory modules. *Development* 2016;143:1914–1925.
- 20 Nostro MC, Sarangi F, Ogawa S et al. Stage-specific signaling through TGFbeta family members and WNT regulates patterning and pancreatic specification of human pluripotent stem cells. *Development* 2011;138:861–871.
- 21 Touboul T, Chen S, To CC et al. Stage-specific regulation of the WNT/beta-catenin pathway enhances differentiation of hESCs into hepatocytes. *J Hepatol* 2016;64:1315–1326.
- 22 Takemaru KI, Moon RT. The transcriptional coactivator CBP interacts with beta-catenin to activate gene expression. *J Cell Biol* 2000;149:249–254.
- 23 Wu CI, Hoffman JA, Shy BR et al. Function of Wnt/beta-catenin in counteracting Tcf3 repression through the Tcf3-beta-catenin interaction. *Development* 2012;139:2118–2129.
- 24 Miki T, Yasuda SY, Kahn M. Wnt/beta-catenin signaling in embryonic stem cell self-renewal and somatic cell reprogramming. *Stem Cell Rev* 2011;7:836–846.
- 25 Sineva GS, Pospelov VA. beta-Catenin in pluripotency: Adhering to self-renewal or Wnting to differentiate? *Int Rev Cell Mol Biol* 2014;312:53–78.
- 26 Watanabe K, Dai X. A WNTer revisit: New faces of beta-catenin and TCFs in pluripotency. *Sci Signal* 2011;4:pe41.
- 27 Sokol SY. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development* 2011;138:4341–4350.
- 28 ten Berge D, Kurek D, Blauwkamp T et al. Embryonic stem cells require Wnt proteins to prevent differentiation to epiblast stem cells. *Nat Cell Biol* 2011;13:1070–1075.
- 29 Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat Cell Biol* 2011;13:838–845.
- 30 Ye S, Zhang D, Cheng F et al. Wnt/beta-catenin and LIF-Stat3 signaling pathways converge on Sp5 to promote mouse embryonic stem cell self-renewal. *J Cell Sci* 2016;129:269–276.
- 31 Pereira L, Yi F, Merrill BJ. Repression of Nanog gene transcription by Tcf3 limits embryonic stem cell self-renewal. *Mol Cell Biol* 2006;26:7479–7491.
- 32 Yi F, Pereira L, Merrill BJ. Tcf3 functions as a steady-state limiter of transcriptional programs of mouse embryonic stem cell self-renewal. *STEM CELLS* 2008;26:1951–1960.
- 33 Yi F, Pereira L, Hoffman JA et al. Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Cell Biol* 2011;13:762–770.
- 34 Kurek D, Neagu A, Tastemel M et al. Endogenous WNT signals mediate BMP-induced and spontaneous differentiation of epiblast stem cells and human embryonic stem cells. *Stem Cell Reports* 2015;4:114–128.
- 35 Tsakiridis A, Huang Y, Blin G et al. Distinct Wnt-driven primitive streak-like

populations reflect in vivo lineage precursors. *Development* 2014;141:1209–1221.

- 36** Davidson KC, Adams AM, Goodson JM et al. Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012;109:4485–4490.
- 37** Frank S, Zhang M, Schöler HR et al. Small molecule-assisted, line-independent maintenance of human pluripotent stem cells in defined conditions. *PLoS One* 2012;7:e41958.
- 38** Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 2007;448:196–199.
- 39** Bray AF, Cevallos RR, Gazarian K et al. Human dental pulp stem cells respond to cues from the rat retina and differentiate to express the retinal neuronal marker rhodopsin. *Neuroscience* 2014;280:142–155.
- 40** Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001;29:e45.
- 41** Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M et al. Induction of pluripotency in human somatic cells via a transient state resembling primitive streak-like mesendoderm. *Nat Commun* 2014;5:3678.
- 42** Chen B, Dodge ME, Tang W et al. Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol* 2009;5:100–107.
- 43** Redmer T, Diecke S, Grigoryan T et al. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep* 2011;12:720–726.
- 44** Plath K, Lowry WE. Progress in understanding reprogramming to the induced pluripotent state. *Nat Rev Genet* 2011;12:253–265.
- 45** Neganova I, Chichagova V, Armstrong L et al. A critical role for p38MAPK signalling pathway during reprogramming of human fibroblasts to iPSCs. *Sci Rep* 2017;7:41693.
- 46** Lin Z, Perez P, Lei D et al. Two-phase analysis of molecular pathways underlying induced pluripotent stem cell induction. *STEM CELLS* 2011;29:1963–1974.
- 47** Zhou Q, Chipperfield H, Melton DA et al. A gene regulatory network in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:16438–16443.
- 48** Anton R, Kestler HA, Kuhl M. Beta-catenin signaling contributes to stemness and regulates early differentiation in murine embryonic stem cells. *FEBS Lett* 2007;581:5247–5254.
- 49** Dravid G, Ye Z, Hammond H et al. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *STEM CELLS* 2005;23:1489–1501.
- 50** Ogawa K, Nishinakamura R, Iwamatsu Y et al. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:159–166.
- 51** Sato H, Amagai K, Shimizukawa R et al. Stable generation of serum- and feeder-free embryonic stem cell-derived mice with full germline-competency by using a GSK3 specific inhibitor. *Genesis* 2009;47:414–422.
- 52** Hoodless PA, Pye M, Chazaud C et al. FoxH1 (Fast) functions to specify the anterior primitive streak in the mouse. *Genes Dev* 2001;15:1257–1271.
- 53** Levine AJ, Brivanlou AH. GDF3, a BMP inhibitor, regulates cell fate in stem cells and early embryos. *Development* 2006;133:209–216.
- 54** Lu CC, Robertson EJ. Multiple roles for Nodal in the epiblast of the mouse embryo in the establishment of anterior-posterior patterning. *Dev Biol* 2004;273:149–159.
- 55** Yamamoto M, Meno C, Sakai Y et al. The transcription factor FoxH1 (FAST) mediates Nodal signaling during anterior-posterior patterning and node formation in the mouse. *Genes Dev* 2001;15:1242–1256.
- 56** Tada S, Era T, Furusawa C et al. Characterization of mesendoderm: A diverging point of the definitive endoderm and mesoderm in embryonic stem cell differentiation culture. *Development* 2005;132:4363–4374.
- 57** Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ et al. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008;22:746–755.
- 58** Tam WL, Lim CY, Han J et al. T-cell factor 3 regulates embryonic stem cell pluripotency and self-renewal by the transcriptional control of multiple lineage pathways. *STEM CELLS* 2008;26:2019–2031.
- 59** Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 2009;4:487–492.



See www.StemCells.com for supporting information available online.