



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS (NEUROBIOLOGÍA)

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

## **IMPACTO DE LA PROLACTINA EN LA PLURIPOTENCIA DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS MURINAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**OMAR MARTINEZ ALARCON**

TUTOR PRINCIPAL:

DR. NĚSTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ    INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DRA. TERESA MORALES GUZMÁN    INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

DR. GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA LORENZO    INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Julio 2020



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.

## RESUMEN

Las células troncales son poblaciones muy peculiares que se han descrito desde el desarrollo embrionario hasta la vida adulta. Se caracterizan por su autorrenovación (capacidad de mantenerse en estado indiferenciado y en proliferación), así como su diferenciación a por lo menos un tipo celular especializado. Debido a esta última particularidad, se pueden dividir en múltiples familias; de ellas, las células pluripotentes ofrecen una valiosa plataforma para estudiar el desarrollo temprano, ya que recapitulan *in vitro* a estadios celulares tanto de la mórula como del blastocito. De esta manera, las células troncales han sido utilizadas para retar a diversas moléculas con una posible intervención durante el desarrollo temprano. La prolactina, por ejemplo, ha sido relacionada con la transición de la mórula hacia el blastocito y postulada como una señal clave en la diapausa (fenómeno donde la población pluripotente del embrión carece de proliferación). En este trabajo se exploró si la hormona era capaz de regular la pluripotencia en células troncales embrionarias de ratón. Como una primera aproximación en este trabajo se demostró que dichas células, ya sea en una identidad “naive” (similar al epiblasto en diapausa) como metaestable (representativa del estadio de preimplantación), presentan el receptor de prolactina, el cual disminuye durante la transición entre dichos estadios. Asimismo, al tratar a dichas células con diversas concentraciones de la prolactina, se logró mantener la presencia de los factores de transcripción involucrados en la pluripotencia Oct4 y Sox2 de forma similar al grupo control. De manera interesante, la hormona fue capaz de resguardar colonias fosfatasa alcalina positivas a largo plazo, en ausencia de LIF (del inglés *Leukemia inhibitor factor*). Estos datos nos sugieren una intervención de la prolactina sobre el circuito de pluripotencia y el mantenimiento indiferenciado de las células troncales embrionarias de ratón, mediante una posible señalización de Stat3 (del inglés *Signal transducer and activator of transcription 3*), la cual es un punto de convergencia entre las vías de LIF y la prolactina, incluyendo sitios de reconocimiento en regiones reguladoras de Oct4.

## ABSTRACT

The stem cells are a very peculiar population present since the embryonic development to adulthood. They are characterized by their self-renewal (ability to stay undifferentiated and proliferating) as well as their differentiation potential to at least one specialized cell type. Due to this last characteristic, stem cells can be divided into multiple families, where the pluripotent stem cells offer a valuable platform to the early development study since they recap cellular stages *in vitro* like morula and blastocyst. Thus, stem cells have been used to challenge several molecules with possible intervention during the early development. Prolactin in fact, has been related to the transition from the morula to the blastocyst. Also, it has been suggested as a critical signal during the diapause (the phenomenon in which the pluripotent population remains without proliferation). In this study, we explored if the hormone was capable of regulating the embryonic stem cell pluripotency of mouse. As a first approach, we demonstrate that embryonic stem cells, either in naïve (like diapause) or metastable (representative of preimplantation stages) conditions present the prolactin receptor, which decreases during the transition between these stages. Also, prolactin treatment reveals the capacity of this hormone to maintain the presence of transcription factors related to the pluripotency like Oct4 and Sox2. Interestingly, prolactin was capable of maintain long-term positive alkaline phosphatase colonies in the absence of LIF (Leukemia inhibitor factor). These data suggest a prolactin intervention on the pluripotency circuit and the maintaining of undifferentiated mouse embryonic stem cells, through the Stat3 (Signal transducer and activator of transcription 3) signaling, a convergence point between LIF and prolactin pathways, including recognition sites in Oct4-regulatory regions.

## **AGRADECIMIENTOS**

CONACYT 272968

INPer 212252-3210-21214-03-16

INB

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

Para todos los que me ayudaron, animaron y siguieron conmigo

GRACIAS

## ABREVIATURAS Y ACRONIMOS

TIDA	Tuberoinfundibulares
1C	1 célula
2C	2 células
2i	Dos inhibidores
2n	Diploide
4n	Tetraploides
Akt	<i>Protein kinase B</i>
Blk	<i>B lymphoide tyrosine kinase</i>
Bmp	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
Brachyury	<i>T Brachyury transcription factor</i>
cAMP	<i>Cyclic adenosine monophosphate</i>
Ccnd1	<i>Cyclin D1</i>
Cer1	<i>Cerberus 1, DAN family Bmp antagonist</i>
Dazl	<i>Deleted In azoospermia like</i>
Dppa3	<i>Developmental Pluripotency Associated 3</i>
Dux	<i>Double Homeobox</i>
EGA	<i>Embryonic genome activation</i>
Eomes	Eomesodermin
Erk1/2	<i>Extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
Esrrb	<i>Estrogen Related Receptor Beta</i>
Fbx15	<i>F-box protein 15</i>
Fgf	<i>Fibroblast growth factor</i>
Foxd3	<i>Forkhead box D3</i>
FTs	Factores transcripcionales
Fyn	<i>FYN proto-Oncogene, Scr Family Tyrosine kinase</i>
GATA	<i>Binding protein 6</i>
Gbx2	<i>Gastrulation Brain Homeobox 2</i>
Gsk3	<i>Glycogen synthase kinase 3</i>
Hck	<i>Hemopoietic cell kinase</i>
ICM	<i>Inner cell mass</i>
iMEFs	<i>Inactivated mouse embryonic fibroblast</i>
iPSC	<i>Induced pluripotent stem cells</i>
Jak	<i>Janus-Associated Kinase</i>
klf2	<i>Kruppel like factor 2</i>
Klf4	<i>Kruppel like factor 4</i>
Klf5	<i>Kruppel like factor 5</i>
KO	Knockout
Lck	<i>Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase</i>
LIF	<i>Leukemia inhibitor factor</i>
Lin28a	<i>Lin-28 homolog A</i>
Lyn	<i>LYN proto-oncogene, Scr Family Tyrosine kinase</i>

MEK	<i>MAPK/ERK Kinase</i>
MERVL	<i>Murine endogenous retrovirus-like MuERV-L</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rampamycin</i>
Nanog	<i>Nanog homeobox</i>
NELFA	<i>Negative elongation factor complex member A</i>
NFκB	<i>Nuclear Factor κB</i>
Nodal	<i>Nodal growth differentiation factor</i>
Oct4	<i>Octamer-Binding Protein 4</i>
Otx2	<i>Orthodenticle homeobox 2</i>
p38Mapk	<i>p38 mitogen-activated protein kinase</i>
Phc1	<i>Polyhomeotic homolog 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide-3-kinase</i>
Pkc	<i>Protein kinase C</i>
Pouf1	<i>POU class 1 homeobox 1</i>
Pouf1	<i>POU class 1 homeobox 1</i>
Prdm1	<i>PR domain containing 1, with ZNF domain</i>
Prdm14	<i>PR/SET domain 14</i>
Raf	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
Rex1	<i>Reduced expression protein 1</i>
S6k/Rsk	<i>Ribosomal protein S6 kinase B1</i>
Scr	<i>Proto-oncogene tyrosine kinase</i>
Sox1	<i>SRY-Box transcription Factor 1</i>
Sox2	<i>SRY-Box transcription factor 2</i>
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
Sox17	<i>SRY-Box TF 17</i>
Tbx3	<i>T-Box transcription factor 3</i>
Tfcp2l1	<i>Transcription factor CP2 like 1</i>
Yes	<i>YES proto-Oncogene 1, Scr Family Tyrosine kinase</i>
Zfp42	<i>Zinc Finger Protein 42 Homolog</i>
ZGA	<i>Zygotic genome activation</i>
Zic2	<i>Zic family member 2</i>
Zscan10	<i>Zinc finger and SCAN domain containing 10</i>
Zscan4	<i>Zinc finger and SCAN domain containing 4</i>



# INDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 Células troncales .....	3
1.1.1 Génesis de la pluripotencia in vivo.....	3
1.1.2 Hacia la captura de la pluripotencia <i>in vitro</i> .....	5
1.1.2.1 Inicio de la exploración: Células troncales del teratocarcinoma .....	6
1.1.2.2 La segunda captura parece la mejor: Células troncales embrionarias .....	6
1.1.2.2.1 mESC y su importancia, incluso cautivas conservan su naturaleza .....	8
1.1.2.2.3 La exploración continua hacia la línea germinal .....	10
1.1.2.2.4 Nuevas rutas para encontrar a la pluripotencia: iPSC.....	10
1.1.2.2.5 Más allá del límite, pluripotencia post-implantación .....	11
1.1.4. Pruebas para caracterizar la pluripotencia .....	11
1.1.4 Diversidad revelada, de “naive” a “primed” .....	13
1.1.5 Circuito de pluripotencia.....	16
1.1.6 Proteínas de membrana involucradas en la pluripotencia de ratón.....	19
1.2 Prolactina .....	19
1.4 Gen y estructura.....	21
1.4 Receptores y vías de señalización .....	22
1.5 Funciones de la prolactina en el desarrollo embrionario .....	24
2 JUSTIFICACION.....	27
3 HIPOTESIS .....	28
4 OBJETIVOS .....	28
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	28
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	28
5 MATERIAL Y MÉTODOS .....	29
5.1 Cultivo celular.....	29
5.1.1 Obtención de MEFs .....	29
5.1.1.1 Inactivación de MEFs.....	29
5.1.2 Cultivo de mESC .....	29
5.1.4 Cultivo de células troncales embrionarias humanas.....	30
5.1.5 Tratamientos con prolactina .....	30
5.1.6 Inmunofluorescencia y cuantificación .....	30
5.1.7 RT y PCR.....	31

5.1.8 Tinción para fosfatasa alcalina .....	32
5.1.9 Ensayo de proliferación.....	32
5.1.10 Análisis estadístico .....	32
6. RESULTADOS .....	33
6.1 Estandarización de las condiciones de cultivo “naive” .....	33
6.2 mESC metaestables y “naive” son positivas para el receptor de PRL .....	38
6.3 La prolactina mantiene a Oct4, Sox2 y FA incluso en ausencia de LIF .....	38
6.4 Posible mecanismo de regulación de la pluripotencia a través de la señalización de PRL y Stat3 .....	40
7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....	42
8 LITERATURA CITADA.....	47
9 ANEXOS .....	58
ANEXO 1 .....	58
ANEXO 2 .....	58
ANEXO 3 .....	59

## 1. INTRODUCCIÓN

La unión del óvulo con el espermatozoide acarrea una serie de eventos determinados por procesos moleculares asociados a factores del microambiente embrionario, con lo cual, en el cigoto haploide comienza una compleja remodelación de la cromatina, regulada en principio por factores maternos almacenados en el citosol del ovocito y las blastómeras de la etapa de dos células. Sin embargo, después de la activación del genoma embrionario dichos factores comienzan a perder protagonismo y son sustituidos por elementos propios del embrión, los cuales interactúan creando redes complejas para mantener su viabilidad y promover su potencial de diferenciación que, conforme avanza el desarrollo, se restringe en linajes específicos. De esta forma, en el cigoto hasta la etapa de 8 células se establece un potencial totipotente (capacidad de una sola célula para crear a un organismo vivo, debido a que puede producir todos los tipos celulares de origen embrionario, incluyendo la línea germinal así como tejidos extraembrionarios), para posteriormente dar lugar a la pluripotencia (habilidad para diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres capas embrionarias) hallada en la mórula tardía y consecutivamente en una pequeña población denominada masa celular interna del blastocito (ICM del inglés *inner cell mass*), que a su vez originará al hipoblasto y el epiblasto, el cual preservará dicho estadio hasta poco después de la implantación (Bedzhov, Graham, Leung, & Zernicka-Goetz, 2014; Johnson & McConnell, 2004; Tarkowski, Suwinska, Czolowska, & Ozdzanski, 2010; Yamanaka, Ralston, Stephenson, & Rossant, 2006; Zhou & Dean, 2015).

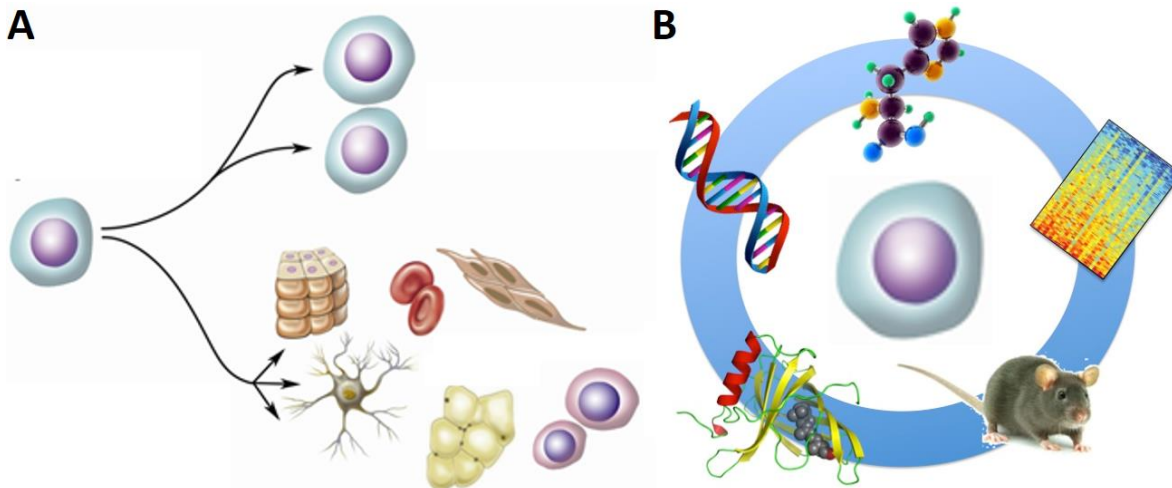
A pesar de lo efímero y complejo del proceso de desarrollo pre- y post-implantación temprano, se ha logrado comprender que la pluripotencia no es un estadio único en la naturaleza de los mamíferos, sino puede ser dividida en diversas fases dependiendo del estado específico de las células (Avila-Gonzalez et al., 2016; Yamanaka et al., 2006; Ying & Smith, 2017). De esta forma, nacen los conceptos de estado “*naive*” y “*primed*”, los cuales van a reflejar poblaciones sumamente especializadas durante el desarrollo que pueden ser trasladados hacia condiciones *in vitro*. La pluripotencia “*naive*” fue obtenida por primera vez al cultivar células de la ICM de blastocitos pre-implantación, mantenidas en medio suplementado con suero fetal bovino (FBS del inglés *fetal bovine serum*) y LIF (factor inhibidor de leucemia del inglés *leukemia inhibitor factor*) sobre una capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados (iMEFs del inglés *inactivated mouse embryonic fibroblast*) (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Con este método, las poblaciones celulares obtenidas son propiamente denominadas células troncales embrionarias de ratón (mESC del inglés *mouse embryonic stem cells*), las cuales presentan la posibilidad de inter conversión entre los estadios pre- y pos-implantación por lo que han sido denominadas metaestables (J. Hanna et al., 2010; J. Hanna et al., 2009; Nichols & Smith, 2012). Sin embargo, el refinamiento de este protocolo pionero ha llevado al establecimiento de conjuntos celulares mucho más homogéneos que reflejan propiedades similares a la ICM, resultando en la obtención del estadio estrictamente “*naive*” (Ying et al., 2008) en contraste con la condición “*primed*”, asociada con el epiblasto post-implantación temprano (denominadas células troncales del epiblasto) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

Como se puede apreciar, la oportunidad que ofrecen las células troncales y los estadios de pluripotencia, otorgan una plataforma para el análisis de factores moleculares importantes en el desarrollo embrionario temprano como las hormonas, el cual es difícil de acceder en los modelos *in vivo*. Particularmente, la prolactina (PRL) resulta interesante ya que ha sido asociada con más de 300 funciones en los vertebrados, entre las cuales destacan la lactancia, la modulación de

comportamientos parentales mediante la neurogénesis, la reproducción, entre otras (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998). Dentro del cuerpo de evidencia que integra la fisiología de la hormona, un alto porcentaje de estudios está enfocado en procesos en el organismo adulto, manteniéndose ampliamente desconocido su posible papel durante el desarrollo embrionario y los mecanismos que pueda activar en procesos evolutivos como la diapausa (estrategia reproductiva reversible que implica el retraso del desarrollo embrionario o de la implantación, debido a la carencia de condiciones ambientales permisibles) (Mead, 1993; Ptak et al., 2012). De manera interesante, Evans y Kaufman en 1981 derivaron las primeras líneas de mESC a partir de embriones en diapausa (Evans & Kaufman, 1981). Asimismo, la PRL ha sido asociada con una mayor eficiencia en la derivación de líneas de células troncales pluripotentes (I. A. Polejaeva, Reed, Bunch, Ellis, & White, 1997) y el incremento de su migración y adhesión, características cruciales para su mantenimiento *in vitro* (Sellers, Bujko, Schneider, Kucia, & Ratajczak, 2018). Tales hallazgos, en adición a que la PRL ha sido sugerida como reguladora importante del desarrollo pre-implantación (Yohkaichiya, Fukaya, Hoshiai, & Yajima, 1988), sugiere una posible participación de esta hormona en la pluripotencia. Sin embargo, esta pregunta ha sido poco explorada hasta el momento y el responderla podría ayudar a revelar mecanismos de mantenimiento de la pluripotencia o inclusive nuevos estadios, así como interacciones con la maquinaria de diapausa, con lo cual se enriquecerá el conocimiento que se tiene sobre las interacciones que promueven la salida del estadio pluripotente y conduce a las células a través de su compromiso y diferenciación.

## 1.1 Células troncales

Las células troncales son tipos celulares sumamente especializados que permanecen durante la vida de un organismo desde el desarrollo embrionario y a través de la vida adulta con un potencial de desarrollo específico; caracterizadas por la capacidad de autorrenovación y diferenciación a por lo menos un tipo celular especializado (Fig. 1A). Con base en esta última propiedad se han agrupado en diversas familias: a) totipotentes, b) pluripotentes, c) multipotentes, con la habilidad de originar células de un único linaje específico, como las células troncales neurales y d) unipotentes, aquellas que solo pueden producir un solo fenotipo determinado, arquetipo, las células troncales del epitelio intestinal (Jaenisch & Young, 2008) (Fig. 2).



**Figura 1. Células troncales y sus aplicaciones en la biomedicina.** A) representación de las propiedades de las células troncales: autorrenovación y diferenciación a por lo menos un tipo celular especializado. B) las mESC ofrecen una plataforma para evaluar diversos procesos moleculares que ocurren en el desarrollo temprano, edición genética, evaluación de drogas entre otras. Modificado de (Shevde, 2012).

Debido a sus características las células troncales ofrecen una alternativa como modelos biológicos empleados en el entendimiento (o estudio) del desarrollo embrionario y fetal, la evaluación de fármacos, la exploración de perturbaciones celulares, el modelado de enfermedades, la posible aplicación en la medicina regenerativa y el cuestionamiento de la esencia biológica fundamental de la pluripotencia (Avila-Gonzalez et al., 2016; Shevde, 2012; Ying & Smith, 2017) (Fig. 1B).

Finalmente, cabe mencionar que las células troncales no solamente se pueden aislar de los diversos estadios durante el desarrollo sino inclusive en tejidos adultos, en donde son fundamentales para el desarrollo adecuado del organismo y su mantenimiento homeostático a lo largo de la vida (Garcia-Prat, Sousa-Victor, & Munoz-Canoves, 2017).

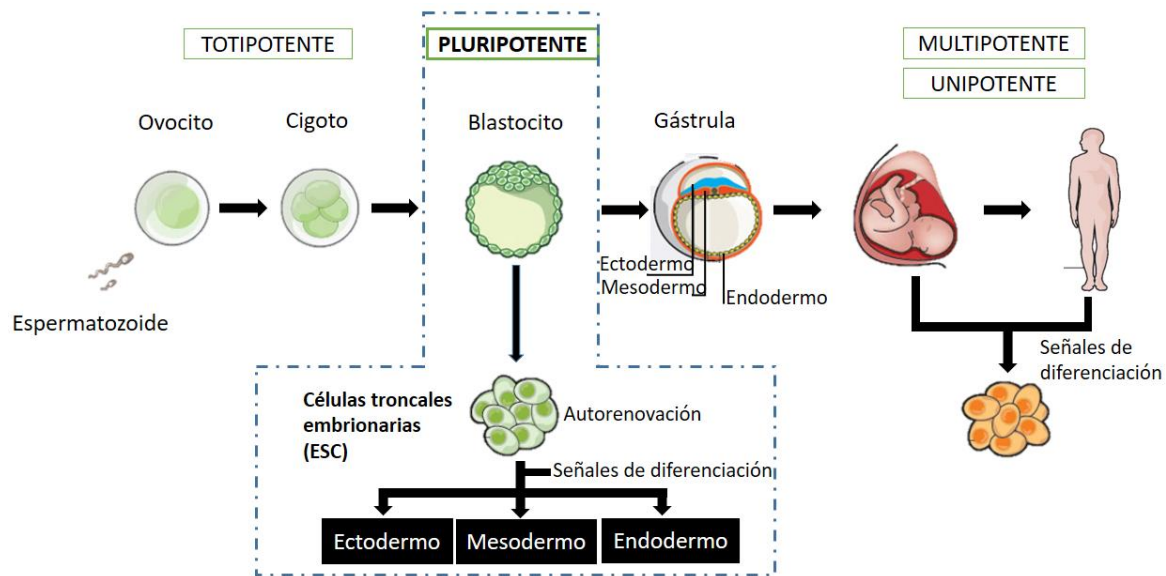
Este proyecto se enfocó en las células troncales pluripotentes, razón por la cual se profundizará en ellas en las siguientes secciones.

### 1.1.1 Génesis de la pluripotencia in vivo

El desarrollo pre-implantación en el ratón involucra una secuencia de divisiones que genera a las blastómeras y tiene como finalidad constituir al blastocito y su población pluripotente (Fig. 2). Posterior a la penetración del espermatozoide al huevo (ambos haploides), se forma una célula

diploide (1C) denominada cigoto, estableciendo inmediatamente después los pronúcleos que mantienen factores de origen materno que regulan el desarrollo hasta la activación del genoma embrionario (EGA del inglés *embryonic genome activation*). La división del embrión formará células progresivamente más pequeñas, partiendo al cigoto en 2 células (2C), etapa en la cual la transcripción incrementa llegando a un pico en la activación del genoma del cigoto (ZGA del inglés *zygotic genome activation*), en donde se promueve la sustitución de los factores maternos por genes de origen embrionario como principales reguladores del desarrollo temprano (Bedzhov et al., 2014; Hu et al., 2020; Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018; Xue et al., 2013). En los eventos posteriores a la fertilización existen múltiples mecanismos dinámicos que regulan el destino del cigoto y su compromiso progresivo a linajes específicos (Bedzhov et al., 2014).

Durante este periodo, los factores maternos almacenados en la célula compensan la carencia de transcripción, promoviendo el establecimiento de un paisaje epigenéticamente distinto al de los padres, esencial durante la EGA. Tal fenómeno de reprogramación epigenética global está caracterizado por una desmetilación transitoria, razón por la cual, la mayoría de las islas CpGs están hipometiladas hasta la ZGA (Hu et al., 2020; Yamanaka et al., 2006). Asimismo, se desencadena la expresión de factores clave para la etapa de dos células como son: *Zscan4* (del inglés *zinc finger and SCAN domain containing 4*), *Dux* (del inglés *Double Homeobox*), *MERVL* (del inglés *Murine endogenous retrovirus-like MuERV-L*) y *NELFA* (del inglés *Negative elongation factor complex member A*), que en conjunto promueven la correcta transición a estadios posteriores durante el desarrollo (Hu et al., 2020). De esta forma y como se ha mencionado, el cigoto adquiere el potencial totipotente (Fig. 2).



**Figura 2. Clasificación de células troncales durante el desarrollo.** Desde el cigoto hasta la etapa de 8 células existe el potencial totipotente. A partir del cual restringe hacia la pluripotencia resguardada en la ICM la cual al ser mantenida en condiciones *in vitro* permite el establecimiento de líneas de mESC. Continuando con el desarrollo durante la mórula se establecen las tres capas germinales. Dando origen a células troncales con potencial continuamente más restringido y especializado como las células troncales multipotentes y las células troncales unipotentes. Modificado de (Shevde, 2012).

Posteriormente, surge la pluripotencia la cual es contenida en la ICM (Fig. 2) y es regulada por factores intrínsecos y extrínsecos, cómplices clave en el desarrollo más allá de la implantación (Bedzhov et al., 2014). Dichos factores interactúan con el paisaje permisivo de la cromatina para inducir la expresión de nuevos programas genéticos, ya sea para dirigir la transición desde el estadio pluripotente hasta la especificación de linaje o su mantenimiento en condiciones *in vitro*. Asimismo, se establecen periodos de estabilidad efímeros en la cromatina que definen el programa transcripcional de las células durante su mantenimiento, compromiso y diferenciación, tanto en la ICM y posteriormente en el epiblasto pre y post implantación (también pluripotentes) como en las mESC (S. H. Yang et al., 2014). No obstante, a pesar de que la ICM puede originar a todos los tejidos de un organismo vivo, es incapaz de producir las 2 membranas extraembrionarias derivadas del trofoectodermo y el endodermo primitivo que juegan papeles de soporte durante el desarrollo embrionario (Baker & Pera, 2018; Nichols & Smith, 2012; Saiz & Plusa, 2013).

La ICM permanece con su potencial pluripotente y expande su población hasta alcanzar un tamaño crítico para continuar con el sofisticado reloj del desarrollo del embrión, el cual está regulado por una refinada interacción célula-célula dependiente de su distribución y de estímulos fisiológicos maternos que en conjunto darán la identidad celular. Así como procesos clave en el desarrollo embrionario como la implantación y diapausa (Baker & Pera, 2018; Ptak et al., 2012). Es importante resaltar que dichos eventos se llevan a cabo sin la intervención de algún organizador, de esta manera las interacciones célula-célula y su posicionamiento tridimensional dentro del embrión producirán microambientes específicos que culminarán en dominios polarizados y finalmente darán una especificación celular (Saiz & Plusa, 2013).

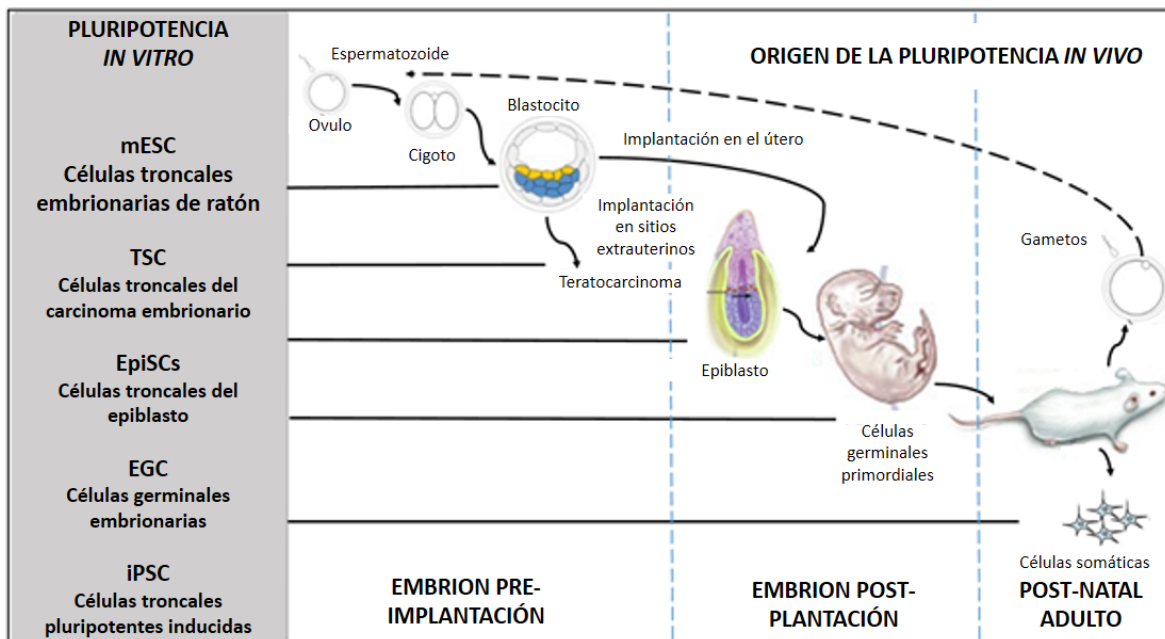
A partir de esta compleja red de interacciones en el día embrionario (E) 3.5, la ICM expresa marcadores como GATA6 (*GATA binding protein 6*) y Nanog (*Nanog homeobox*) en un patrón denominado sal y pimienta, indicando el surgimiento de los precursores de 2 linajes celulares clave: 1) un epitelio superficial denominado endodermo primitivo (Gata6+) y 2) un remanente vestigio de la ICM denominado epiblasto (Nanog+), el cual preserva el potencial pluripotente aun en el blastocito tardío. Entre E4-4.5 se puede distinguir el endodermo primitivo rodeando al epiblasto ambos linajes cubiertos por el trofoectodermo. Otros factores transcripcionales (FTs), han sido identificados durante la especificación de la ICM y el epiblasto, como son: Oct4 (*Octamer-Binding Protein 4*) y Sox2 (*SRY-Box transcription factor 2*) (Bedzhov et al., 2014; Saiz & Plusa, 2013; Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018), los cuales se describirán con mayor profundidad posteriormente.

Finalmente, el blastocito de ratón se implanta en el útero entre E4.75 y E5, iniciando con una serie de reorganizaciones y cambios en la identidad celular. Esto conlleva a que el epiblasto se transforme en un tejido epitelial en forma de copa que rodea a la cavidad amniótica, mientras que el trofoectodermo genera al ectodermo extraembrionario adyacente al epiblasto y contiene a las células troncales del trofoblasto. Dichas células integrarán a la placenta madura permitiendo la interfaz entre el embrión y la madre para continuar con el desarrollo post-implantación y la diferenciación de la población pluripotente presentes en el epiblasto en linajes cada vez más especializados derivados de las tres capas germinales (Shahbazi & Zernicka-Goetz, 2018).

### **1.1.2 Hacia la captura de la pluripotencia *in vitro***

De forma interesante, la esencia pluripotente desde la ICM hasta el epiblasto post-implantación ha podido ser capturada en condiciones *in vitro* (Fig. 3). Sin embargo, este logro requirió un largo

camino marcado por la evaluación de diversas fuentes celulares, factores, condiciones de cultivo, y mecanismos intracelulares que evitan procesos como la senescencia replicativa, para en conjunto mantener este potencial fuera de su nicho natural (Garcia-Prat et al., 2017; Ying & Smith, 2017).



**Figura 3. Origen de las células troncales pluripotentes *in vivo* y su contraparte *in vitro*.** La captura de la pluripotencia en condiciones *in vitro* ha sido compleja, sin embargo, su obtención se ha realizado a partir de diversas fuentes durante el desarrollo embrionario y la vida adulta. Las iPSCs son derivadas a partir de la reprogramación de células somáticas (J. H. Hanna, Saha, & Jaenisch, 2010).

### 1.1.2.1 Inicio de la exploración: Células troncales del teratocarcinoma

Su estudio comienza con la aparición espontánea de teratomas (tumores complejos integrados por derivados celulares de las tres capas germinales, incluyendo estructuras altamente organizadas como dientes, dedos y cabello) en la cepa de ratones 129 (Stevens & Little, 1954). Las primeras líneas derivadas de estos tumores fueron obtenidas en la década de los 70s, producidas por la implantación de un embrión temprano en los testículos de un ratón adulto. Particularmente en el trabajo de Evans, los tumores sólidos fueron disgregados y cultivados sobre una capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón hasta la obtención de colonias redondas multiestratificadas con una alta capacidad proliferativa y que al ser trasplantadas *in vivo* mostraron su capacidad de diferenciación (Evans, 1972; Kahan & Ephrussi, 1970). De esta forma, se originaron las células del carcinoma embrionario o células troncales del teratocarcinoma (TSC del inglés *Teratocarcinoma stem cells*) altamente similares a las células pluripotentes encontradas en el embrión temprano (Fig. 4). Sin embargo, una de sus mayores desventajas fue que al evaluar su cariotipo después de 30 generaciones demostraron una incapacidad de mantenerlo normal debido a la presencia de células tetraploides e incluso la observación de 41 cromosomas (Evans, 1972; Keller, 2005).

### 1.1.2.2 La segunda captura parece la mejor: Células troncales embrionarias

Buscando solventar la incapacidad de retener un cariotipo normal en células del carcinoma embrionario se buscaron otras alternativas hasta lograr derivar a las ESC.



Dichas células son derivadas del epiblasto pre-implantación, las cuales al ser mantenidas en las condiciones de cultivo apropiadas retienen las propiedades de diferenciación del tejido de origen y pueden ser reincorporadas con éxito durante la etapa de mórula y el blastocito para continuar con el desarrollo de un organismo (Bradley, Evans, Kaufman, & Robertson, 1984). Fueron aisladas por 2 grupos de manera independiente en 1981, en Estados Unidos por la doctora Martin y en Inglaterra por los doctores Evans & Kaufman. En este último trabajo, ratonas de la cepa 129 SvE fueron ovariectomizadas en el E2.5, con lo cual se les indujo un proceso de diapausa hormonal, promoviendo la sincronización de los embriones y un incremento en el número de células. Después de 4 a 6 días, los embriones fueron recuperados y cultivados en grupos de seis en gotas de medio durante 4 días. Al adherirse presentaron una estructura de tipo cilindro, la cual fue disociada con tripsina para ser pasada en placas cubiertas con iMEF en medio suplementado con FBS (Evans & Kaufman, 1981). Meses después se publicó el trabajo de la doctora Martin en el cual, embriones de ratonas ICR superovuladas fueron obtenidos 76 horas después de detectar el tapón vaginal y mantenidos en medio suplementado con suero de manera similar al primer reporte. Posteriormente, la ICM fue disecada por inmunocirugía (proceso que involucra la destrucción selectiva de la capa externa del blastocito mediante anticuerpos) y cultivada sobre iMEFS en medio condicionado de células del carcinoma embrionario (Martin, 1981). En ambos trabajos se demostró el establecimiento de colonias con el potencial de diferenciación a derivados de mesodermo, endodermo y ectodermo manteniendo cariotipos normales después de más de treinta pasajes, a las cuales posteriormente se les denominó mESC (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981).

Para que dichas células mantengan su identidad se debe de dar una serie de mecanismos asociados con el ambiente molecular al que están sometidas. De esta forma, la señalización mediante LIF fue clave en el establecimiento de las primeras líneas, ya que eventualmente se descubrió que la capa nodriza podía ser reemplazada por dicha citosina y el suero por Bmps (del inglés *Bone morphogenetic proteins*) estableciendo un medio de cultivo genérico para poblaciones heterogéneas de mESCs (Smith et al., 1988; Ying & Smith, 2017; Ying & Smith, 2003). Se ha descrito un amplio cuerpo de literatura que sustenta la capacidad de LIF para mantener la autorrenovación de mESCs a través de por lo menos 2 vías de señalización paralelas: 1) la heterodimerización de la citocina con 2 receptores de clase I [el receptor de baja afinidad a LIF (LIFr) y el traductor de señales gp130], lo que desencadena la fosforilación de Jak (del inglés *Janus-Associated Kinase*) y la activación de Stat3 (del inglés *Signal transducer and activator of transcription 3*) que fosforilado dimeriza y transloca al núcleo, donde actúa como factor de transcripción culminando en la regulación de una constelación de genes asociados con pluripotencia y desarrollo temprano incluidos Klf4 (del inglés *Kruppel like factor 4*), Tfcp2l1 (del inglés *Transcription factor CP2 like 1*) y Gbx2 (del inglés *Gastrulation Brain Homeobox 2*) y 2) a través del mismo complejo de receptores, se activa la vía de PI3K/Akt (*Phosphoinositide-3-kinase/Protein kinase B*), la cual se transloca al núcleo y activa a Tbx3 (*T-Box transcription factor 3*) que interactúa directamente con Nanog, regulando al circuito de pluripotencia (Martello, Bertone, & Smith, 2013; Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998; Niwa, Ogawa, Shimosato, & Adachi, 2009; Onishi & Zandstra, 2015). No obstante, también se ha reportado que LIF no es esencial para la pluripotencia *in vivo*, únicamente durante la diapausa facultativa (Nichols, Chambers, Taga, & Smith, 2001; Stewart et al., 1992).

Por otra parte, Bmp4 ha sido asociada con la inhibición de la señalización auto inducible de Fgf4/Erk1/2 (del inglés *Fibroblast growth factor 4/ Extracellular signal-regulated kinase 1/2*) y

p38Mapk (del inglés *p38 mitogen-activated protein kinase*) ambas implicadas en inducir la diferenciación y por lo tanto su supresión mantiene la autorrenovación de mESC (Ying et al., 2008). En conjunto, estos trabajos muestran el sinergismo existente entre Bmp4 y LIF para mantener la pluripotencia de las mESC tanto *in vitro* como en su contraparte *in vivo* durante la formación de teratomas y su diferenciación a derivados de las tres capas germinales, a través de un delicado balance de la actividad de Mapk y Stat3 (Niwa et al., 1998; Qi et al., 2004; Ying & Smith, 2003).

Con tan variadas condiciones de señalización, se han descrito diversas naturalezas de las mESC, particularmente la señalización mediante LIF y Bmp4 o el suero establecen un nicho que permite la auto-renovación y la inhibición de proteínas pro-diferenciación, manteniendo así a las células en un estadio *metaestable*, identidad heterogénea y fluctuante causada por la diferenciación autoinducible de Fgf4 a través de ERK, lo cual promueve la presencia de marcadores de diferenciación de linajes tempranos y la expresión fluctuante de FTs como Oct4, Nanog y Sox2 (Chambers et al., 2007; Dietrich & Hiiragi, 2007; Hayashi, de Sousa Lopes, Tang, Lao, & Surani, 2008; Singh, Hamazaki, Hankowski, & Terada, 2007; Toyooka, Shimosato, Murakami, Takahashi, & Niwa, 2008; Ying et al., 2008). En esta condición se ha reportado que las mESC exhiben un grado de similitud con 3 poblaciones del embrión temprano: la ICM del blastocito, las células del epiblasto post-implantación y las células germinales primordiales (Chambers et al., 2003; Chambers & Smith, 2004).

A pesar de esta heterogeneidad poblacional, las mESCs pueden ser descritas como colonias con bordes definidos, creciendo en forma de domo integradas por células estrechamente compactadas con un citoplasma pequeño en relación con su núcleo. A nivel morfológico parecería sencillo caracterizar a las mESCs. Sin embargo, esta descripción es insuficiente para corroborar su identidad. Por ello es necesario, conocer ampliamente la compleja red de elementos moleculares integrada por FTs, regiones genómicas reguladoras de la transcripción, modificación de histonas, proteínas de membrana, moléculas de RNA no codificante, entre otros elementos que serán abordados posteriormente y que en conjunto orquestarán el establecimiento de las mESCs (Jaenisch & Young, 2008; Ng & Surani, 2011). De esta forma, la identificación de dichas moléculas y su dinámica permiten la caracterización de poblaciones de células pluripotentes más allá de su morfología estableciendo marcadores moleculares, mecanismos genéticos y epigenéticos clave en la regulación de la maquinaria activada durante el estadio pluripotente (Hayashi et al., 2008; Konishi, Nakano, & Yamaguchi, 2018; Scadden, 2006; P. Yang et al., 2019).

#### **1.1.2.2.1 mESC y su importancia, incluso cautivas conservan su naturaleza**

La capacidad de las mESC de diferenciarse a derivados de las tres capas germinales ofrece una valiosa herramienta como modelo de estudio de eventos clave durante el desarrollo como la formación de estructuras tan especializadas y complejas como la gástrula o incluso la corteza cerebral. Con lo cual, constituyen una poderosa herramienta capaz de recapitular funciones de un sistema a nivel molecular, celular, tisular, órganos e incluso a nivel de organismo completo. Asimismo, permiten aumentar la accesibilidad de observación y registro de imágenes, manipulación de variables, número de muestras disponibles e incluso la disminución de problemas éticos con el manejo de muestras o tejidos de origen humano, ventajas en comparación con los modelos animales (Beccari et al., 2018; Harrison, Sozen, Christodoulou, Kyprianou, & Zernicka-Goetz, 2017; Warmflash, 2017).

Mientras que los modelos más primitivos explotan las características intrínsecas de las células ofreciendo ciertas ventajas como son: la evaluación de estadios del desarrollo que son recapitulados *in vitro* por una única población celular en condiciones de monocapa o 2D, *vgr*, ICM y epiblasto pre-implantación, estos carecen de interacciones entre diferentes poblaciones celulares, lo cual limita la señalización célula-célula y célula-matriz extracelular. Asimismo, tienden a diferenciarse si no se mantienen las condiciones adecuadas de cultivo. Motivo por el cual, se han desarrollado modelos 3D, capaces de recrear procesos como el establecimiento de las dos poblaciones extraembrionarias y el epiblasto en el blastocito o la subdivisión del epiblasto en las tres capas germinales durante la gastrulación (Yin et al., 2016). De forma interesante, se ha demostrado que agregados tridimensionales (denominados gastruloides) tienen la habilidad de organizar todas las capas germinales embrionarias, simulando estructuras polarizadas relacionadas con el blastocito, debido a la recapitulación de la organización axial y su especificación multilínea, los cuales han revelado los mecanismos que sustentan dicho proceso, como la señalización de Brachyury (*T Brachyury transcription factor*) a través de la interacción de Wnt/ $\beta$ -catenina y nodal (*Nodal growth differentiation factor*) independientemente de la presencia de tejidos extraembrionarios (Turner et al., 2017; van den Brink et al., 2014). Sin embargo, los gastruloides no recapitulaban todas las características de un embrión debido principalmente a la ausencia de tejidos extraembrionarios. Con esta limitante se buscó desarrollar modelos más fieles a lo observado *in vivo*, para ello Magdalena Zernicka-Goetz y su grupo generaron un protocolo para la obtención de estructuras sintéticas que asemejen al embrión basadas en el cultivo de mESC y células troncales del trofoblasto en una matriz de matrigel (matriz extracelular extraída del sarcoma de ratón, rica en laminina, colágeno entre otras). La autoorganización de estas estructuras tridimensionales estableció una arquitectura muy similar a la del blastocito con ambas poblaciones celulares organizadas y con la capacidad de promover procesos morfogénicos similares a lo descrito en la etapa del *egg cylinder* durante la implantación y la progresiva especificación de las capas germinales (Harrison et al., 2017). Este modelo fue refinado por el mismo grupo al co-cultivar mESC, células troncales del trofoblasto y células del endodermo extraembrionario, resultando en estructuras estrechamente similares al embrión de ratón, las cuales contenían los compartimientos embrionarios y extraembrionarios, inclusive describieron el establecimiento de eje anteroposterior y la reproducción de eventos morfogénicos claves antes y durante la gastrulación como la transición epitelio-mesénquima y la especificación de linajes como el mesodermo y el endodermo primitivo (Sozen et al., 2018). No obstante, cabe destacar que el uso de cada modelo ya sea en cuanto al cultivo celular en monocapa o de sistemas 3D es alternativo a los modelos *in vivo*, ya que hasta el momento ningún arquetipo simula todas las características del embrión *in vivo*, pero si permiten la evaluación de características y procesos de particular importancia en el desarrollo temprano de una manera aislada y con mayor control de las variables.

Finalmente, debido a su compleja e interesante naturaleza, las mESC han servido como plataforma en otros campos de investigación. La desestabilización de su credencial molecular ha permitido explorar la trayectoria de la salida del estado pluripotente, así como su diferenciación intrínseca. La posibilidad de manipular estos procesos para dirigir o simular poblaciones de especial interés en biología del desarrollo y su posible aplicación en medicina regenerativa ha sido ampliamente investigada durante los últimos años (Shevde, 2012; Ying & Smith, 2003; Ying et al., 2008). Asimismo, gracias a características esenciales como su estabilidad genética, su potencial manipulación *in vitro* y la capacidad de incorporarse *in vivo* al desarrollo de un organismo completo incluida la línea

germinal sin la formación de tumores ofrecen un vector celular para la generación de animales transgénicos, iniciando con ello la era de la manipulación del genoma del ratón (Bradley et al., 1984; Capecchi, 2005).

### **1.1.2.3 La exploración continua hacia la línea germinal**

Como fruto de los esfuerzos para descubrir nuevos métodos de cultivo y señales esenciales para el mantenimiento de células pluripotentes, surgió la derivación de líneas a partir de células germinales, denominadas células germinales embrionarias (EGC del inglés *embryonic germ cell*). Su historia comienza cuando Matsui y colaboradores demostraron el papel fundamental de LIF para promover la sobrevivencia y proliferación de cultivos primarios de células germinales primordiales (Matsui et al., 1991). Subsiguiente, junto con la adición del factor de crecimiento fibroblástico básico (Fgf2 del inglés *Fibroblast Growth Factor*) promovieron el establecimiento de colonias de células morfológicamente similares a las de las mESCs a partir de células germinales obtenidas del día E8.5, al ser cultivadas sobre una capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón. A pesar de su capacidad de diferenciación en condiciones *in vitro* hacia derivados de las tres capas germinales e *in vivo* mediante la formación de teratomas, los resultados obtenidos demostraron una escasa capacidad para contribuir a la formación de quimeras, lo cual fue atribuido a variabilidad de la impronta genómica de los embriones empleados en su derivación, la inactivación del cromosoma X e incluso la probabilidad de generar anomalías cromosómicas durante el cultivo (Matsui, Zsebo, & Hogan, 1992).

### **1.1.2.4 Nuevas rutas para encontrar a la pluripotencia: iPSC**

Posteriormente en el año 2006 Takahashi y Yamanaka rompieron paradigmas al establecer la primera línea de células troncales pluripotentes inducidas (iPSC del inglés *induced pluripotent stem cells*), trabajo que les haría ganar el premio Nobel de Medicina y Fisiología en el 2012. Para introducir a estas interesantes células habrá que mencionar que en 1998 Thomson y colaboradores derivaron la primera línea de ESC humanas sin embargo, las dificultades éticas referentes a la destrucción de embriones humanos para su obtención y el rechazo de tejidos después de su posible trasplante incentivó a buscar maneras de derivar células troncales pluripotentes directamente de las células somáticas de cada paciente (Shevde, 2012; Thomson et al., 1998). A partir de esta idea, diversos grupos de investigación evaluaron la posibilidad de revertir la identidad de células somáticas a células pluripotentes utilizando como modelo al ratón (Shevde, 2012). Particularmente, Yamanaka y su colaborador evaluaron genes que forzaran a MEF hacia un fenotipo pluripotente. Para ello, probaron 24 candidatos con funciones claves en el mantenimiento e identidad de células troncales pluripotentes, utilizando un sistema de detección basado en la resistencia a G418 (antibiótico ampliamente utilizado como medio de selección genética). Posteriormente, evaluaron a cada gen de manera individual mediante su introducción a la célula somática por retrovirus. De forma interesante, demostraron que ninguno de los candidatos generó colonias pluripotentes por sí solo. No obstante, la transfección de los 24 genes dio lugar a colonias resistentes con morfología y propiedades similares a lo observado en las mESCs, como la activación de los genes Fbx15 (del inglés *F-box protein 15*) y Nanog, contrastando con la inactivación del promotor de Oct4. Posteriormente, realizando distintas combinaciones, al quitar de forma individual cada uno de los FT del cultivo y observar el efecto de su ausencia, obtuvieron un set de 10 genes para finalmente concluir que se podían genera iPSC solo con Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc (del inglés *myelocytomatosis oncogene*). Las

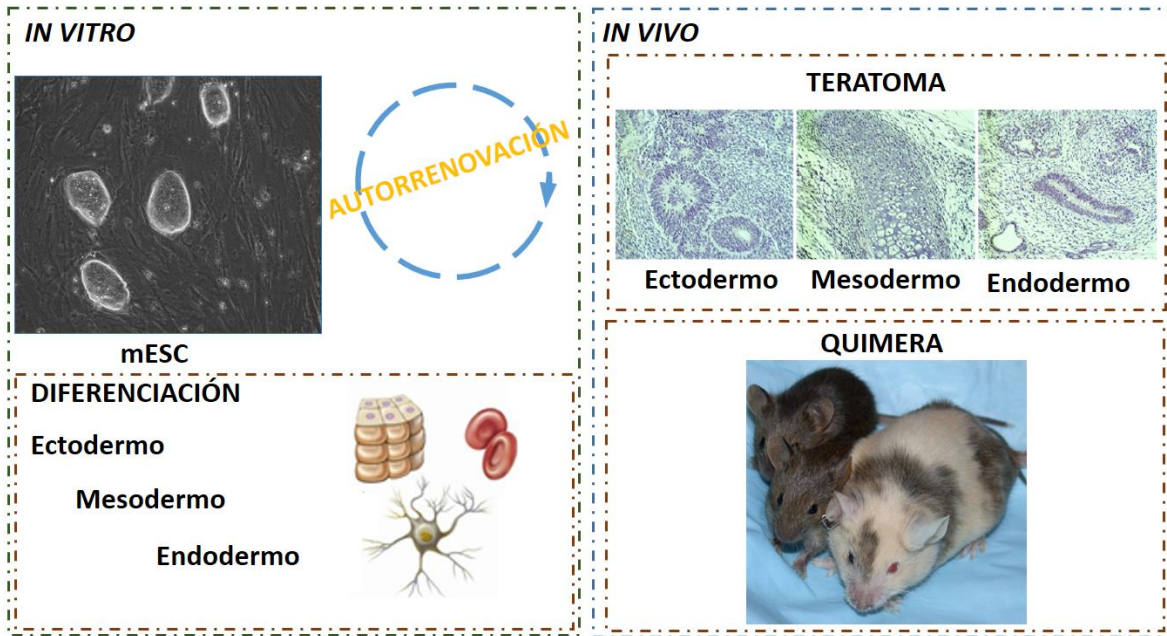
colonias obtenidas presentaron una identidad genética similar a las mESC, con potencial de diferenciación *in vivo* e *in vitro* a derivados de las tres capas germinales a través de ensayos de formación de cuerpos embrionarios, teratomas y quimeras (Takahashi & Yamanaka, 2006).

#### **1.1.2.5 Más allá del límite, pluripotencia post-implantación**

Poco después, en el 2007, dos grupos de manera simultánea e independiente demostraron la obtención de células troncales pluripotentes a partir del epiblasto tardío de embriones post-implantación, al cultivar epiblastos pregastrulación (5.75 días post coito) en medio suplementado con activina y Fgf2 sobre una capa nodriza de iMEF. Reportaron la aparición de colonias epiteliales integradas por células compactas con un núcleo grande con relación al citoplasma y positivas a marcadores de pluripotencia como Oct4, Nanog y SSEA1 (del inglés *stage specific embryonic antigen 1*), las cuales fueron denominadas células troncales del epiblasto (EpiSCs del inglés *epiblast stem cells*). Sin embargo, exhiben características que las diferencian de las mESCs como una escasa resistencia a la disociación a célula única, no pueden ser mantenidas en condiciones de suero y LIF siendo estrictamente dependientes de la señalización de activina/Nodal y la adición de Fgf2 mejora la calidad de los cultivos obtenidos a través del reforzamiento de la señalización de activina. A nivel transcripcional, los genes asociados con ICM como Rex1 (del inglés *reduced expression protein 1*, revisar Zfp42), Pecam1 (del inglés *platelet endothelial cell adhesion molecule*), Tbx3 o Gbx2 se encuentran significativamente disminuidos o incluso ausentes como ocurre con los marcadores germinales Prdm1 (*PR domain containing 1, with ZNF domain*) y Stella (Dppa3 del inglés *Developmental Pluripotency Associated 3*). De manera esperada, presentan genes asociados con el epiblasto como Fgf5 y Nodal. Por otra parte, presentan altos niveles de expresión de genes asociados con el compromiso temprano de las capas germinales como Otx2 (del inglés *Orthodenticle homeobox 2*), Eomes (del inglés Eomesodermin), Brachyury, Gata6, Sox17 (SRY-Box TF 17) y Cer1 (*Cerberus 1, DAN family Bmp antagonist*); mientras que la actividad de fosfatasa alcalina presente en el epiblasto tardío disminuye a niveles indetectables en EpiSCs en cultivo. Sin embargo, mantienen su potencial de diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro*, evaluado mediante la formación de cuerpos embrionarios y teratomas, lo cual contrasta con su baja integración en la formación de quimeras y su nula transmisión a la línea germinal asociada con la asincronía respecto al estadio de desarrollo que presentan estas células ante el embrión pre-implantación. En conclusión, estos datos demuestran que las EpiSCs poseen una identidad distinta a lo observado en poblaciones pluripotentes previamente descritas y que mantienen una firma transcripcional similar a su fuente embrionaria de derivación (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

#### **1.1.4. Pruebas para caracterizar la pluripotencia**

Como se ha mencionado en secciones previas confirmar la identidad de las mESC requiere del cumplimiento de un set amplio de parámetros. Hasta el momento se ha descrito un conjunto de aspectos moleculares que establecen el fenotipo pluripotente. Sin embargo, es necesario retar a las células mediante ensayos funcionales para corroborar su identidad. Para este fin se han desarrollado técnicas como: (1) la diferenciación *in vitro* hacia células somáticas y germinales; (2) la formación de teratomas, (3) la producción de quimeras, (4) transmisión a la línea germinal, (5) formación de quimeras a partir de célula única y (6) complementación tetraploide (Fig. 4) (De Los Angeles et al., 2015).



**Figura 4. Caracterización de la pluripotencia.** La morfología y autorrenovación de las células pluripotentes no son suficientes para evaluar su potencial. Por ello es necesario evaluar su capacidad de diferenciación tanto *in vitro* a través de la diferenciación dirigida hacia derivados de las 3 capas germinales (sección izquierda). E *in vivo* mediante la formación de teratomas o incluso su capacidad de generar un organismo o contribuir a su formación cuando son reincorporadas al embrión (quimeras) (sección derecha).

El reto de diferenciación *in vitro* representa el ensayo menos complejo para revelar la pluripotencia y se basa en la habilidad de las mESC para generar derivados de las 3 capas germinales cuando las condiciones para sostener la pluripotencia son reemplazadas. Estos se pueden dividir en dos métodos: 1) *default* donde moléculas como LIF o dos inhibidores (2i) que mantienen la autorrenovación y están implicados en el mantenimiento del estado indiferenciado son eliminadas del medio de cultivo y 2) cuando la diferenciación es realizada de manera dirigida utilizando cocteles de citosinas, factores de crecimiento, moléculas pequeñas o morfogénos que funcionan como inductores de la diferenciación hacia linajes específicos (De Los Angeles et al., 2015). Por lo que se refiere a la formación de teratomas estos consisten en la inyección de las mESC en regiones altamente irrigadas de ratones inmunosuprimidos para la formación de un tumor heterogéneo integrado por múltiples linajes, los cuales se evalúan mediante técnicas histológicas o de inmunomarcaje realizada por un patólogo. Debido a que estas neoplasias no son generadas a partir de célula única, el ensayo evalúa la potencia de las mESC a nivel poblacional (Buta et al., 2013; De Los Angeles et al., 2015).

El ensayo más robusto para demostrar la pluripotencia es la formación de quimeras, organismos compuestos por dos o más poblaciones celulares genéticamente distintas originadas de diferentes cigotos (incluso de distintas especies). Dicho procedimiento involucra la inyección de células troncales pluripotentes (ya sea de forma individual o una población) entre la etapa de mórula y blastocito (I. Polejaeva & Mitalipov, 2013). Con este ensayo se evalúa el potencial de las mESCs para reingresar al desarrollo normal siendo clave la sincronía temporal en cuanto a la etapa de desarrollo de la estructura aceptora con las células trasplantadas (Cohen, Markoulaki, & Jaenisch, 2018; De Los Angeles et al., 2015). El éxito de estos ensayos recae sobre la introducción sincrónica de las células

dentro del embrión hospedero ya que el trasplante heterocrónico evita la integración funcional de las células para la formación de quimeras (Cohen et al., 2018). La evaluación de la capacidad de formación de quimeras por células troncales es esencial para determinar el potencial de desarrollo y factores que contribuyan a la incorporación, sobrevivencia y crecimiento de células individuales dependientes del estadio del desarrollo (Baker & Pera, 2018).

La transmisión a la línea germinal evalúa el potencial de las células pluripotentes para generar un organismo capaz de reproducirse, demostrando la habilidad de las células trasplantadas para formar gametos funcionales indicando la integridad cromosómica y funcional de la pluripotencia (De Los Angeles et al., 2015; I. Polejaeva & Mitalipov, 2013).

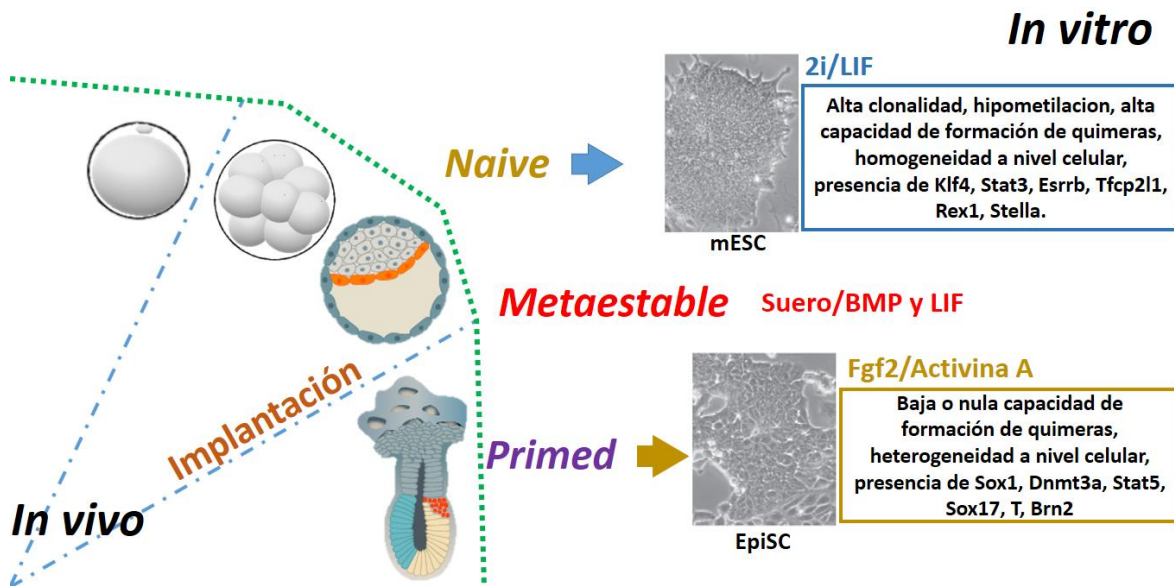
Por lo que se refiere a la complementación tetraploide es un ensayo robusto que demuestra la capacidad de las mESCs (2n) para producir un organismo completo al ser inyectadas en embriones tetraploides (4n), generados por electro fusión al unir 2 blastómeras en una o inhibiendo la mitosis en estadios tempranos. Aprovechando la incapacidad de los embriones tetraploides de desarrollarse más allá del día 15 post-coito (De Los Angeles et al., 2015; Nagy, Rossant, Nagy, Abramow-Newerly, & Roder, 1993; Wen, Saiz, Rosenwaks, Hadjantonakis, & Rafii, 2014). Habitualmente se emplean entre 10 y 15 células para la formación de quimeras en cualquiera de las variantes anteriores. Sin embargo, es posible generar quimeras a partir de una sola célula trasplantada, demostrando la genuina capacidad de pluripotencia en un ensayo clonal *in vivo* (De Los Angeles et al., 2015; Wen et al., 2014).

#### **1.1.4 Diversidad revelada, de “naive” a “primed”**

Desde su captura inicial en 1981, las mESC han sido derivadas en múltiples condiciones de cultivo, empleado diversas combinaciones de citosinas, capas nodrizas, factores de crecimiento, hormonas, sueros, moléculas pequeñas entre otras, demostrando la importancia del ambiente molecular en la derivación y mantenimiento de estas células (Ying & Smith, 2017; Ying et al., 2008). Afortunadamente, el desarrollo de protocolos de cultivo que simulen un ambiente de señalización capaz de soportar la pluripotencia de mESC ha permitido derivar poblaciones celulares homogéneas con características similares a las observadas en diferentes periodos del desarrollo temprano (Baker & Pera, 2018; Ying & Smith, 2017). Con ello se ha postulado que la pluripotencia es un estadio continuo, dinámico y progresivo, sujetado por dos estados fundamentales denominados “naive” y “primed” entre los cuales existen estados intermedios sin fronteras definidas que establecen la transición entre ambos (Fig. 5) (Nichols & Smith, 2009; P. Yang et al., 2019). Aunque estos estados comparten características como la capacidad de diferenciación hacia derivados de las 3 capas germinales, la expresión de la triada de pluripotencia y la autorrenovación; ambos difieren el uno del otro en aspectos que se describirá a continuación (Ghimire et al., 2018).

En un extremo inicial se ubica el estadio “naive” también referido como estadio *Ground*, representa el potencial más puro y menos restringido que existe en el embrión pre-implantación entre el E3.75 a E4.75 (Boroviak, Loos, Bertone, Smith, & Nichols, 2014; Boroviak et al., 2015; Nichols & Smith, 2009; Ying et al., 2008). Dicho estadio fue descubierto a partir de la necesidad de resolver la heterogeneidad observada en las células metaestables. Para ello en el 2008, Smith y su grupo cultivaron a las mESC en condiciones libres de capa nodriza en un medio químicamente definido (sin suero) suplementado con 2i, PD0325901 (inhibidor de MEK acrónimo derivado del inglés *MAPK/ERK Kinase*) para bloquear la vía de ERK y CHIR99021 (inhibidor de Gsk3 del inglés *Glycogen synthase*

*kinase 3*) (Nichols & Smith, 2009; Ying et al., 2008). Con ello, establecieron colonias relativamente esféricas con bordes bien definidos que carecen de células diferenciadas a pesar de la reducida expresión de proteínas inhibidoras de la diferenciación, la proliferación incrementa aun en la ausencia de LIF promoviendo la propagación de las mESC, reteniendo los atributos y potencia del embrión pre-implantación a largo plazo (Hackett & Surani, 2014; Nichols & Smith, 2009; Ying et al., 2008). La adición de LIF al cultivo no es requerida para la autorrenovación en estas condiciones, pero su inclusión en el medio fortalece el estadio “naive” promoviendo la sobreexpresión de FTs como Klf4 y Tfcp2l1 (Martello et al., 2013; S. H. Yang et al., 2014). Asimismo, observaron la expresión homogénea de Oct4, Nanog y Rex1, con niveles mínimos de marcadores de compromiso de linaje como Sox1 (*SRY-Box Transcription Factor 1*) o Brachyury, lo cual favorece a la obtención de un mayor porcentaje de quimeras y su transmisión a la línea germinal (Boroviak et al., 2014; Kalkan et al., 2017).



**Figura 5. Pluripotencia, transición de “naive” a “primed”.** La pluripotencia es una identidad transitoria que en el embrión puede encontrarse desde estadios pre-implantación hasta estadios post-implantación, estableciendo 2 estadios principales denominados “naive” y “primed” respectivamente. Entre los cuales se puede describir a la pluripotencia metaestable. Cada una mantenida en condiciones de cultivo específicas que permite la identificación de características propias para cada identidad.

Asimismo, estas células sobre expresan genes relacionados con la pluripotencia como Tfcp2l1, Tbx3 y Nanog. Este último ha sido postulado como la puerta de entrada a la pluripotencia “naive” y que la homogeneidad en su expresión ha sido señalada como una característica primordial en la adquisición de este estadio (Boroviak et al., 2015; Chambers et al., 2007; Silva et al., 2009). Otros genes específicos de pluripotencia “naive” (Fig. 5) son: Esrrb (del inglés *Estrogen Related Receptor Beta*), Rex1, Pecam1, Nr0b1, Stella, Prdm14 (*PR/SET domain 14*), Fgf4, Tfcp2l1, Klf2 (del inglés *Kruppel like factor 2*), Klf4, Klf5 (del inglés *Kruppel like factor 5*) y Dazl (del inglés *Deleted In azoospermia like*), así como los genes que también se expresan en células germinales primordiales como Prdm14, Prdm1 y Dazl (Altshuler et al., 2018; Boroviak et al., 2015; Ghimire et al., 2018; P. Yang et al., 2019). Debido a esta naturaleza tan primitiva ausente en la condición metaestable, algunas células en condiciones 2i presentan características transcripcionales semejantes a las del embrión de dos células (Ghimire et al., 2018).



Por otra parte, la metilación del DNA constituye el primer estrato del código epigenético, a través de la metilación de citosinas en los dinucleótidos CpG. Este proceso ocurre durante el desarrollo temprano a través de la desmetilación global observada en el cigoto, las blastómeras y más tarde en las células germinales primordiales. Debido a este proceso *in vivo* que impacta a la ICM, las células “naive” presentan un paisaje hipometilado denominado *tabula rasa* regulado principalmente por las enzimas Dnmt3a y Dnmt3b en asociación con Dnmt1 (M. Li, Liu, & Izpisua Belmonte, 2012; Reik, Dean, & Walter, 2001). Esta coreografía desarrollada sobre el DNA va acompañada de diversas modificaciones de histonas, entre ellas, se ha reportado la reducida prevalencia de la marca represora H3k27me3 (del inglés *Histone 3 Lysine 27 trimethylation*), disminuyendo la presencia de dominios bivalentes a sitios restringidos en genes involucrados en procesos del desarrollo. Asimismo, las marcas H3K4me3 (del inglés *Histone 3 Lysine 4 trimethylation*) y H3k36me3 (del inglés *Histone 3 Lysine 36 trimethylation*) posicionadas sobre los promotores y el cuerpo del gen respectivamente están implicadas en el incremento de la expresión de los genes asociados con el estado “naive” (Bernstein et al., 2006; Marks et al., 2012). Además, cabe mencionar que su identidad pre-implantación establece un ambiente epigenético caracterizado por un genoma hipometilado por lo que factores asociados como Tet (*Methylcytosine dioxygenase*) 1 y 2, Prdm14 y Ncoa3 (del inglés *Nuclear receptor coactivator 3*) son predominantes (Boroviak et al., 2015; Ghimire et al., 2018; Nichols & Smith, 2009). La interacción entre estos dos mecanismos epigenéticos permite que en células derivadas de embriones femeninos los dos cromosomas X estén activos, indicando su naturaleza previa al silenciamiento del cromosoma paternal (Bernstein et al., 2006; Nichols & Smith, 2009).

Por lo que se refiere a su estado metabólico, las células “naive” emplean predominantemente procesos de oxidación mitocondrial, recurriendo a la glucólisis en menor proporción y resaltando que el consumo de glucosa es mayor que el de glutamina, ya que la primera es incorporada en rutas como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos y la síntesis de pirimidinas, los cuales parecen tener un papel importante en este estadio al enlazar el epigenoma, el metaboloma y transcriptoma (Chandrasekaran et al., 2017). Dicha interacción ha sido asociada con una mayor capacidad clonal en contraste con estadios más avanzados, demostrando la restructuración celular que toma lugar durante la transición entre los estados de pluripotencia primordiales (Chandrasekaran et al., 2017; Dahan, Lu, Nguyen, Kennedy, & Teitell, 2019).

En conjunto, este ambiente molecular otorga una capacidad de diferenciación más uniforme permitiendo la generación de quimeras con transmisión a la línea germinal en porcentaje mayor a lo observado a partir de células metaestables (Silva et al., 2008). Además de cultivos en donde se pueda explorar eventos tempranos del desarrollo y compromiso de linaje (Altshuler et al., 2018), como podría ser la diapausa, ya que el epiblasto inactivo representativo de este fenómeno mantiene una identidad celular similar a la pluripotencia “naive” tanto a nivel transcripcional como metabólico (Boroviak et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2017).

La transición de “naive” a “primed” está acompañada por cambios agudos y de amplio espectro que impactan a distintos niveles la estabilidad de la identidad celular. Evaluando esta trayectoria se han reportado cambios tempranos en el fosfoproteoma seguidos de ondas ordenadas de modificaciones a nivel epigenético, transcripcional y proteómico. Dentro de los primeros cambios observados están la activación de vías de señalización asociadas con ERK, S6K/RSK (*Ribosomal protein S6 kinase B1*), mTOR (del inglés *mammalian target of rapamycin*), AKT y p38a, posteriormente un incremento

en H3K4me3 genera cambios graduales en el transcriptoma dando lugar a que la identidad “naive” se vaya perdiendo a través de estadios intermedios como la pluripotencia formativa (fase de pluripotencia que implica un remodelamiento global necesario para establecer la habilidad de responder a señales pro-diferenciación) y metaestable hasta alcanzar el siguiente extremo de la pluripotencia denominado “primed” (representativo del epiblasto post-implantación E5.5-E8.25 en el cual la diferenciación de linajes esta lista para llevarse a cabo) (Fig. 5) (P. Yang et al., 2019).

Debido a la implantación del epiblasto, esta estructura se transforma en un epitelio columnar monoestratificado en el cual se da la inactivación del cromosoma X paterno. De esta forma, el ambiente post-implantación es vasto en señalización de Fgf2, Wnt y Bmp lo que determina que las EpiSCs (contraparte *in vitro* del epiblasto post-implantación) respondan a la adición de Fgf y activina para su mantenimiento en condiciones indiferenciadas a largo plazo (Brons et al., 2007; Nichols & Smith, 2009; Tesar et al., 2007). Asimismo, factores como Nodal, Lef1 y Fgf5, así como genes relacionados con el periodo post implantación entre ellos, Stat5, Sox17, Foxd3 (del inglés *Forkhead box D3*), Ccnd1 (*Cyclin D1*), Zscan10 (*Zinc finger and SCAN domain containing 10*), Phc1 (*Polyhomeotic homolog 1*), Otx2, Zic2 (*Zic family member 2*), Lin28a (del inglés *Lin-28 homolog A*) son esenciales para mantener el estadio “primed” (Boroviak et al., 2015; P. Yang et al., 2019) (Fig. 5).

El paisaje epigenético se ve impactado en un inicio por el incremento en los niveles de metiltransferasas *de novo* como Dnmt1, Dnmt3a y Dnmt3b, estableciendo nuevos dominios de metilación en el DNA (Boroviak et al., 2015; P. Yang et al., 2019) y desencadenando que las señales asociadas con el compromiso y determinación de linaje incrementen. De ellas, las modificaciones de histonas son las más estudiadas, ya que se han descrito docenas de ellas, incluidas la acetilación, metilación y fosforilación (Margueron, Trojer, & Reinberg, 2005; Skene & Henikoff, 2013). Los dominios bivalentes de metilación son los más comunes, integrados por regiones ricas en H3k27me3 en las cuales se encuentran pequeños sitios compartimentalizados marcados con H3k4me3 (del inglés *Histone 3 lysine 4 trimethylation*), modificación asociada con la activación transcripcional. Ambas modificaciones son catalizadas por proteínas del grupo Polcomb y Trithorax respectivamente. De forma interesante, el posicionamiento de estas marcas postraduccionales colocaliza con sitios de unión de la triada de pluripotencia principalmente con Oct4 y Nanog (Bernstein et al., 2006).

Asimismo, la transición al estado “primed” conlleva un metabolismo principalmente glucolítico. Simultáneamente la síntesis del folato, metionina, cisteínas y purinas a partir de glucosa toma mayor importancia debido a la activación completa del “one-carbone metabolism”, el cual adquiere protagonismo durante la metilación de histonas que ocurre con el establecimiento de este estado (Chandrasekaran et al., 2017; Shyh-Chang et al., 2013).

### **1.1.5 Circuito de pluripotencia**

El fenotipo en cualquier célula está definido por una combinación particular de genes expresados en una manera incluso dinámica. Lo cual permanece estrechamente ligado a una serie de mecanismos regulatorios influenciados por señales extrínsecas, resultando en modificaciones a nivel transcripcional, topológico y epigenético. Generando, un paisaje molecular capaz de responder apropiadamente a los estímulos externos para regular el estado celular y la expresión genética (Adachi et al., 2018; Ng & Surani, 2011; Niwa, 2018).

A nivel transcripcional, la red de FTs que regulan el balance en la expresión genética son claves en el mantenimiento del fenotipo celular, cooperando entre sí para mantener su expresión. Además, impactan la estructura local de la cromatina al reclutar o repeler enzimas que modifican histonas o el DNA a nivel de los nucleosomas, resultando en el establecimiento de una identidad celular específica a través de la modulación de múltiples genes blanco (Adachi et al., 2018).

En las mESC la triada conformada por Oct4, Sox2 y Nanog orquesta el mantenimiento del potencial pluripotente. Debido al gran número (8794) de enhancer y super-enhancers controlados por Oct4, Sox2 y Nanog han sido denominados como el *core* de pluripotencia, denotando su importancia a lo largo del espectro pluripotente (Niwa, 2018). Entre dichos FTs existen interacciones directas que juegan papeles centrales en el mantenimiento del estado pluripotente, por ejemplo, el heterodímero formado por Oct4 y Sox2 puede reconocer aproximadamente 10,000 sitios de unión en mESC incluyendo sus propios elementos regulatorios distales. No obstante, es necesario un conjunto de genes auxiliares como Esrrb, Klf4, Klf2 entre otros para robustecer la red de pluripotencia (Adachi et al., 2018). Por el contrario, cuando las mESC son diferenciadas, la interacción entre estos FTs cambia progresivamente generando el surgimiento dinámico de redes transcripcionales asociadas con el compromiso de linaje y la diferenciación terminal (Niwa, 2018). A continuación, se mencionarán algunos de los elementos que conforman la red de pluripotencia en el ratón.

Oct4, junto con Nanog y Sox2 forman el *core* de pluripotencia (Nichols & Smith, 2009). Es codificado por Pou5f1 y constituye uno de los FTs más estudiados durante el desarrollo embrionario y el mantenimiento de la pluripotencia, es expresado en el óvulo antes de la fertilización y su transcripción en el cigoto comienza durante la etapa de dos células esparciéndose a todas las blastómeras. Con las primeras asociaciones de linaje su expresión disminuye en el trofoblasto para ser resguardada en la ICM y más tarde en el epiblasto en estadios pre y post implantación, siendo completamente ausente en tejidos extraembrionarios después de la implantación (Palmieri, Peter, Hess, & Scholer, 1994). La expresión de este gen necesita ser regulada puntualmente en la pluripotencia ya que su reducción puede resultar en la diferenciación hacia células del trofoblasto, mientras que su incremento induce la diferenciación hacia endodermo primitivo y mesodermo (Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000). Dicha regulación es diferencial, ya que el enhancer distal es el encargado de su regulación en embriones pre-implantación y células germinales primordiales en migración y post-migratorias. En contraste, el proximal dirige su expresión en el epiblasto y su regulación a la baja durante la gastrulación (Yeom et al., 1996).

Nanog, del gaélico antiguo *Tìr na nÒg* (tierra de la juventud), es una proteína crítica en el mantenimiento de la esencia pluripotente y el desarrollo embrionario (Mitsui et al., 2003; Silva et al., 2009); es expresada por mESC en niveles homogéneos en condiciones 2i contrastando con su heterogeneidad cuando se cultivan en condiciones de suero y LIF, reflejando así su asociación con estadios tempranos del desarrollo como la ICM y el epiblasto pre-implantación (Chazaud, Yamanaka, Pawson, & Rossant, 2006). Asimismo, cuando en las estructuras antes mencionadas se estimula su diferenciación, la expresión de Nanog cae abruptamente (Chambers & Smith, 2004; Singh et al., 2007) y se ha reportado que su sobreexpresión puede mantener a las mESC incluso en ausencia de LIF. En contraste, el KO (del inglés Knockout, referente a un ratón modificado genéticamente en el cual un gen ha sido inactivado) de Nanog o su represión resulta en la diferenciación hacia endodermo primitivo (Chambers & Smith, 2004; Hamazaki, Oka, Yamanaka, & Terada, 2004; Mitsui

et al., 2003). Por otra parte, en células pluripotentes, cuando se encuentra a la baja se ha asociado con deficiencias en la reprogramación ya que su activación y el ensamblaje del circuito de pluripotencia no se realiza adecuadamente (Silva et al., 2008; Takahashi & Yamanaka, 2006); mientras que la selección de iPSCs positivas para Nanog favorece la derivación de quimeras con aporte a la línea germinal, marcas de metilación y sobreexpresión de genes asociados con la identidad de mESCs (Okita, Ichisaka, & Yamanaka, 2007).

Sox2 (del inglés *sex determining Y-box2*) es el último miembro de la triada de pluripotencia perteneciente a la familia de genes Sox (*SRY-related HMG box*). Se clasifica dentro del grupo SoxB1 en conjunto con Sox1 y 3, interactuando con el DNA a través de secuencias motivos  $^{A}/_{T}^{A}/_{T}CAAG$  para la regulación de diversos genes durante el desarrollo (Kamachi, Uchikawa, & Kondoh, 2000; Nichols & Smith, 2012). Asimismo, se ha asociado con el potencial de desarrollo en poblaciones tempranas desde la mórula en E2.5, la ICM y persistiendo en el epiblasto post-implantación (Avilion et al., 2003; S. Zhang & Cui, 2014). Consistentes con estos datos en el embrión pre-implantación, Sox2 es altamente expresado en ESCs (S. Zhang & Cui, 2014); mientras que su ausencia en líneas KO provoca su diferenciación hacia células de trofoectodermo primario, sugiriendo la regulación global de factores del circuito de pluripotencia como Oct4, Nanog y Lefty1 debido a que no se asoció con la activación de los enhancers Oct-Sox (Masui et al., 2007). Para mantener la pluripotencia es necesario mantener niveles finamente regulados de Sox2 ya que tanto su incremento como disminución llevan a la pérdida de la pluripotencia (S. Zhang & Cui, 2014).

Zfp42 (*Zinc Finger Protein 42 Homolog*) también conocido como Rex1, es un marcador de ESC y células del teratocarcinoma. Su expresión es regulada por la triada de pluripotencia y al igual que ellos disminuye en estados pluripotentes conforme son retados a su diferenciación (Shi et al., 2006). Se ha reportado que la presencia de alelos mutados que codifican para Rex1 no tuvo alteraciones en la descendencia, ya que los ratones obtenidos fueron fértiles y viables, demostrando que esta proteína no es indispensable durante el desarrollo (Kalkan et al., 2017). Sin embargo, la diferenciación de células F9 (células troncales del teratocarcinoma) inducida por ácido retinoico reveló la disminución de Rex1 posiblemente dirigida directamente por dicho morfogéno (Hosler, LaRosa, Grippo, & Gudas, 1989). Los resultados reportados por Roger y colaboradores al diferenciar mESCs siguieron la misma secuencia, observando altos niveles del mensajero en estas células así como la ICM, los cuales disminuyeron durante diferenciación (Rogers, Hosler, & Gudas, 1991).

Esrrb es crucial en el mantenimiento de la pluripotencia y la generación de iPSC. Su ausencia compromete la capacidad de autorrenovación de ESC, mostrando disminución en la expresión de Nanog e incrementando la muerte celular. Esrrb, en conjunto con Klf4, Klf2 y Nanog es importante en el establecimiento de la pluripotencia “naive” y durante la reprogramación se une a sitios silenciados por nucleosomas y altos niveles de 5 metil-citosina, los cuales están limitados para otros FTs, permitiendo la reorganización de la cromatina a través del desplazamiento de nucleosomas y desmetilación del DNA (Adachi et al., 2018).

Klf4 fue identificado como un miembro de la familia KLF expresado en el intestino. Se ha destacado su importancia en el desarrollo temprano y embriogénesis debido a que los ratones KO tienden a morir en menos de 15 horas después de su nacimiento por defectos sobre la diferenciación de la epidermis y desarrollo del colon. Sin embargo, su ausencia no afecta el establecimiento de la pluripotencia y desarrollo temprano *in vivo*, pero su sobreexpresión mantiene a las mESC

indiferenciadas durante la formación de cuerpos embrionarios, sugiriendo una importante función sobre la autorrenovación (Katz et al., 2002; Y. Li et al., 2005; Segre, Bauer, & Fuchs, 1999; Shields, Christy, & Yang, 1996). Finalmente, su importancia dentro del circuito de pluripotencia queda demostrada al ser uno de los cuatro factores empleados por Yamanaka durante la reprogramación pluripotente (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Tfap2c (del inglés *transcription factor AP-2 gamma*) pertenece a la familia de *activating enhancer binding protein 2* (AP2) integrada por 5 miembros (Tfap2a-e) caracterizados por la capacidad de unirse a secuencias ricas en GC para regular la activación o represión transcripcional (Eckert, Buhl, Weber, Jager, & Schorle, 2005). Durante el desarrollo temprano del ratón Tfap2c es expresado en ovocitos, posteriormente se restringe al trofoectodermo durante la etapa de blastocito (Winger, Huang, Auman, Lewandoski, & Williams, 2006). En mESC su sobreexpresión regula el establecimiento del trofoectodermo a través de la inhibición de Oct4 (Niwa et al., 2005). Los embriones KO para este FT mueren en E7.5 debido a la carencia de proliferación en el trofoectodermo llevando a la producción de tejidos extraembrionarios aberrantes. A pesar de su importancia en el establecimiento de la identidad “naive” y la determinación del destino de la línea germinal, su papel en el desarrollo temprano permanece poco explorado debido a la presencia de proteínas de la familia AP-2 que enmascaran su papel en periodos previos al blastocito (Kuckenber, Kubaczka, & Schorle, 2012; Schemmer et al., 2013; Werling & Schorle, 2002; P. Yang et al., 2019).

### **1.1.6 Proteínas de membrana involucradas en la pluripotencia de ratón**

Las moléculas de superficie soportan el reconocimiento de ligandos extracelulares y asociaciones célula-célula. Una de las más importantes en el desarrollo temprano es E-cadherina una glucoproteína transmembranal dependiente de calcio encargada de regular las interacciones celulares en tejidos epiteliales y mESC (Larue et al 1996, Bennet & Wang 2012, Oda & Takeichi, 2011). El papel de E-cadherina en dichas células es a través de dos mecanismos principales; el primero involucra la formación y estabilidad membranal del complejo entre LIF y su receptor, promoviendo la activación de Stat3 y la subsecuente activación molecular a nivel nuclear (del Valle et al., 2013). Por otra parte, al interactuar con complejos transcripcionales dependientes de E-cadherina-catenina, la cual al translocarse al núcleo es capaz de regular la vía de señalización canónica de Wnt, crucial en el mantenimiento indiferenciado de las ESC. De esta forma, promueve su diferenciación hacia mesodermo y de manera simultánea a través de la fosforilación de  $\beta$ -catenina y su acumulación en el núcleo; inhibe el desarrollo hacia linaje neural, estableciendo un mecanismo versátil y complejo que regula la decisión de destinos opuestos en ESC (Gadue, Huber, Paddison, & Keller, 2006; Haegle et al., 2003; Hoffmeyer, Junghans, Kanzler, & Kemler, 2017).

Otras proteínas de membrana específicas por estadio de pluripotencia son CD38 (Adp1), CD15 (Eng), CD54 (Icam), CD9, CD146 (Mcam), CD81 y CD205 (Ly75) con una alta expresión en células “naive”. En contraste, CD326(Epcam), CD317(Bst2) y CD90.2 (Thy1.2) se encuentran incrementados en células “primed” (P. Yang et al., 2019). Demostrando una remodelación dinámica en las proteínas de membrana presentes a lo largo del espectro pluripotente.

## **1.2 Prolactina**

El sistema nervioso, el endocrino y el inmune están anatómicamente y funcionalmente interconectados a través de diversas moléculas vgr, esteroides, neuropéptidos, citosinas, hormonas entre otras; las cuáles impactan el desarrollo del embrión y su crecimiento al formar una red molecular que sustenta

la comunicación sistémica y homeostasis entre diversas regiones y procesos (Chesnokova & Melmed, 2002).

Desde la demostración de la importancia de la hormona del crecimiento en el desarrollo embrionario y fetal, los péptidos relacionados con ella han sido investigados y postulados como factores importantes durante estadios tempranos del desarrollo (Karabulut, Layfield, & Pratten, 1999). Especial atención ha sido colocada en la superfamilia de citosinas helicoidales de clase 1 integrada por la hormona del crecimiento, el lactógeno placentario y la PRL. Esta última, también conocida como hormona lactogénica, desde su descubrimiento en 1928 ha demostrado su versatilidad al ser asociada con más de 300 funciones en los vertebrados, número que supera incluso a las funciones descritas para todas las demás hormonas hipofisarias juntas (Fig. 6) (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000; Sinha, 1995). La PRL debe su nombre a la identificación de la secreción denominada “leche de buche” generada en pichones al ser tratados con el extracto obtenido del lóbulo anterior de la hipófisis bovina cerca de noventa años atrás. El mismo extracto que al ser administrado en conejos promovió la lactancia (Freeman et al., 2000).

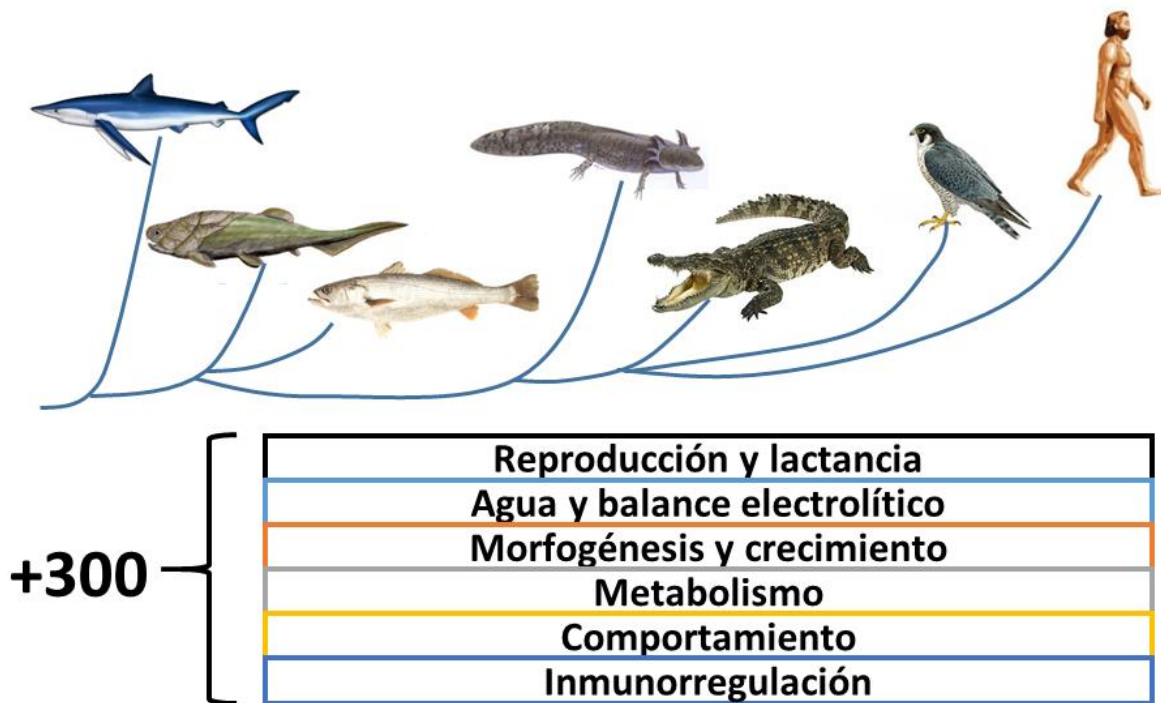


Figura 6. PRL y sus más de 300 funciones dentro de los vertebrados.

A partir de ese momento el cuerpo de evidencias que sustenta el potencial de la PRL se ha ido robusteciendo. Debido a ello sus funciones han sido agrupadas en por lo menos 6 grandes categorías: 1) reproducción y lactancia, 2) agua y balance electrolítico, 3) morfogénesis y crecimiento, 4) regulación endocrina y metabolismo, 5) cerebro y comportamiento, y 6) inmunoregulación (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Gala, 1991). Dichas acciones comienzan con la síntesis y liberación de PRL a partir de diferentes fuentes. La principal de ellas está integrada por los lactotrofos localizados en la adenohipófisis. Sin embargo, existen regiones extrahipofisarias de gran importancia como la decidua, el cerebro, el miometrio, el timo entre otras

en donde también se produce la hormona, lo cual genera su presencia en fluidos como el cerebro espinal, la leche y el sudor. A través del reconocimiento y unión a su receptor activa sitios blancos desencadenando la estimulación de mecanismos moleculares asociados con cascadas de segundos mensajeros y su translocación al núcleo para promover la síntesis de proteínas. Este proceso de formación de complejos moleculares presenta diversas variantes resultado de la combinación de diferentes niveles de síntesis y secreción hormonal, así como modificaciones en la molécula de PRL. En cuanto al receptor existen al menos 3 isoformas que están asociadas con la activación de diferentes cascadas moleculares dependientes de la distribución del receptor y del estado fisiológico del sistema, lo cual genera una compleja red de combinaciones responsable de la extensa cantidad de funciones descritas para la PRL (Brooks, 2012; Freeman et al., 2000).

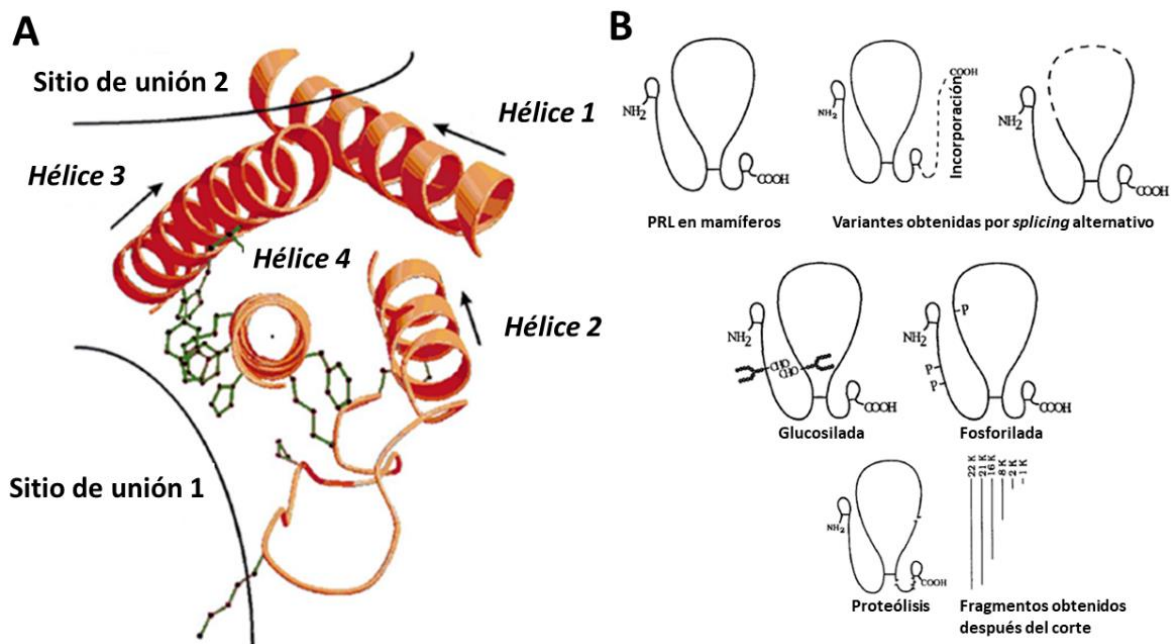
#### **1.4 Gen y estructura**

La estrecha asociación de la PRL con la hormona del crecimiento y el lactógeno placentario puede ser descrita en cuanto a la conservación de su secuencia y estructura molecular (Niall, Hogan, Sauer, Rosenblum, & Greenwood, 1971). Las tres proteínas comparten cerca del 25 al 30% de la secuencia, con considerables variaciones a través de la evolución (Wallis, 2000), sugiriendo que un gen ancestral fue expandido por eventos de duplicación genética (proceso ampliamente descrito durante la diversificación de los vertebrados) (Cooke & Baxter, 1982; Huising, Kruiswijk, & Flik, 2006; Innan & Kondrashov, 2010; Ocampo Daza & Larhammar, 2018) y llevando a la generación de un polipéptido primordial probablemente similar a la PRL en contraste con el lactógeno placentario y la hormona del crecimiento que evolucionaron más tarde en los vertebrados superiores y los mamíferos (Niall et al., 1971). De esta forma, Martial y colaboradores a inicios de la década de los 80s han sugerido que la segregación cromosómica entre hormona del crecimiento y la PRL ocurrió hace aproximadamente 392 millones de años (Cooke & Baxter, 1982; Cooke, Coit, Shine, Baxter, & Martial, 1981).

El gen de la PRL está ubicado en el cromosoma 13 en el ratón, integrado prototípicamente por 5 exones y cuatro intrones con longitud aproximada de 10Kb, el cual genera un péptido de aproximadamente 200 amino ácidos (aa) (Wiemers, Shao, Ain, Dai, & Soares, 2003). Su regulación implica la presencia de dos regiones dependientes del origen tisular de la hormona, ya que el promotor ubicado en el exón 1b estimula su expresión en la adenohipófisis, mientras que en tejidos extrahipofisarios es regulada por el exón no codificante 1a (también conocido como exón 0). La regulación del promotor adenohipofisiario es a través del FT Pit1 sintetizado por el gen Pouf1 (del inglés *POU class 1 homeobox 1*), el complejo del receptor estrógeno-estradiol y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B del inglés Nuclear Factor  $\kappa$ B). Asimismo, cAMP (del inglés *Cyclic adenosine monophosphate*) y Pkc (del inglés *protein kinase C*) han sido sugeridos como posibles reguladores del promotor del exón 1a (Bole-Feysot et al., 1998; Ignacak et al., 2012; Marano & Ben-Jonathan, 2014).

El transcrito de origen extrahipofisiario es 150 nucleótidos más largo que el hipofisiario debido a la presencia del exón no codificante 1a (Hiraoka et al., 1991). En general, su traducción resulta en una pre-hormona de 227 aa, la cual incluye un péptido señal de 28 aa por lo que la proteína madura contiene cerca de 199 aa. Particularmente, en el ratón la PRL es de 197aa y con una masa molecular aproximada de 22.5 kDa (Brooks, 2012). A nivel de su secuencia, presenta una homología dependiente de la divergencia evolutiva, coincide hasta en un 97% entre primates y solo un 56% cuando se comparan con la de roedores (Freeman et al., 2000; Sinha, 1995).

A excepción de la de peces, todas las secuencias identificadas a la fecha contienen 3 cisteínas (Cys4-11, 58-174 y 191-199) que permiten la formación de tres puentes disulfuro intramoleculares y con ello la generación de la estructura clásica de la hormona integrada por 50% de  $\alpha$ -hélices unidas por los antes mencionados puentes; mientras que el remanente se organiza en estructuras tipo bucle (Fig. 7A) (Bewley & Li, 1972; Bole-Feysot et al., 1998). Por otra parte, la gama de procesos regulados por la PRL se ve afectada por las variantes que resultan de *splicing* alternativo o modificaciones pos-traduccionales, proteólisis o incluso polimerización. De forma interesante, las interacciones de estas variables producen cambios en su actividad biológica incrementándola o disminuyéndola (Clapp, Martial, Guzman, Rentier-Delure, & Weiner, 1993; Goffin, Binart, Touraine, & Kelly, 2002; Kinet et al., 2009). A nivel pos-traduccional las modificaciones descritas son diversas, entre ellas fosforilación, glucosilación y desaminación, las cuales regulan la actividad biológica de la PRL, ya sea a nivel estructural, disminuyendo su afinidad por el receptor o modificando su distribución citosólica, resultado de las señales que contenga para su transporte intracelular (Fig. 7B) (Sinha, 1995).



**Figura 7: PRL y sus variantes.** A) representaciones esquemáticas de la estructura tridimensional de la PRL, B) variantes de la PRL generadas por *splicing* o proteólisis (Freeman et al., 2000; Sinha, 1995).

#### 1.4 Receptores y vías de señalización

El receptor de PRL tiene una amplia distribución en diferentes tejidos y su expresión es regulada por múltiples factores, entre ellos el estado fisiológico y el periodo de desarrollo del individuo (Bole-Feysot et al., 1998; Tanaka et al., 2002). Es codificado en el cromosoma 15 por una secuencia integrada de 17 exones y una longitud cercana a los 10,000 nucleótidos. Su expresión ha sido demostrada en tejidos como la glándula mamaria, la hipófisis, la retina, el cerebro, el corazón, el hígado, el riñón, el tejido adiposo, la glándula adrenal, el útero, la próstata, musculo esquelético, la piel, entre otros (Freeman et al., 2000; Huang, Snider, & Cross, 2009; Ling et al., 2003; Rojas-Duran et al., 2015).



El receptor fue identificado en la década de los 70s como una proteína asociada a la membrana con una enorme afinidad por la PRL. Pertenece a la familia de citosinas clase 1, los cuales carecen de actividad cinasa intrínseca por lo que dependen de la asociación con cinasas como Jak para regular las cascadas de señalización. Dicha familia integra a los receptores de la hormona de crecimiento, eritropoyetina, LIF, trombopoyetina, oncostatina, entre otras (Bazan, 1990; Kelly, Djiane, Postel-Vinay, & Edery, 1991). Asimismo, el *splicing* alternativo y la proteólisis pueden generar receptores carentes de regiones necesarias para la asociación con segundos mensajeros lo cual predispone a las vías que pueden ser activadas por cada isoforma.

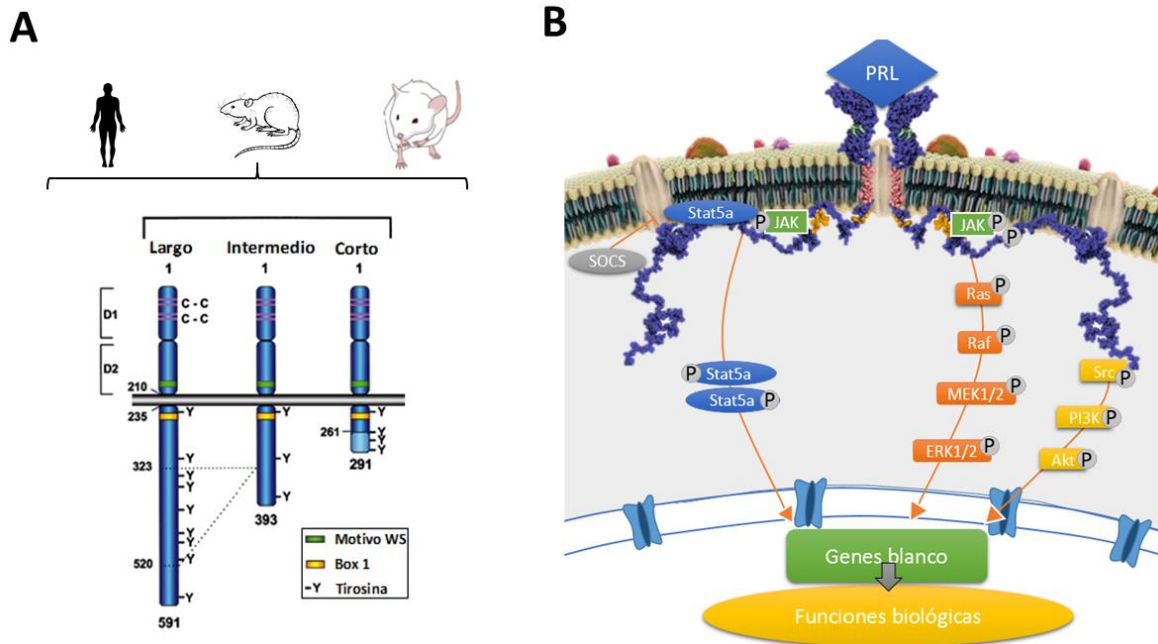
En la literatura se han descrito tres isoformas del receptor, una larga (591aa), una intermedia (393aa) y una corta (291aa) con respecto a su tamaño, las cuales son dependientes de los procesos intrínsecos de cada especie, por ejemplo en roedores el *splicing* del exón 9 al 10 resulta en la generación del mensajero para la forma larga del receptor, mientras que del exón 9 hacia el 11 genera la isoforma corta (Davis & Linzer, 1989; Shirota et al., 1990; Tanaka et al., 2002). Particularmente en el ratón, una isoforma larga y tres cortas han sido identificadas, estas últimas solo difieren en unos cuantos aa en la región citoplasmática (Clarke & Linzer, 1993; Davis & Linzer, 1989).

A nivel estructural, se encuentra una gran conservación de los dominios del receptor partiendo con el extra-membranal (necesario para el reconocimiento y asociación del ligando), es integrado por 2 subdominios de fibronectina tipo III denominados D1 (membrana distal) y D2 (membrana proximal) de aproximadamente 100 aa cada uno (Fig. 8A) (Bazan, 1990; Kelly et al., 1991). Asociado al N-terminal en D1 se encuentran dos pares de cisteínas ligadas a bisulfito y en la región C-terminal en D2 se encuentra el pentapeptido denominado WS (de la secuencia W-S-X-W-S) encargado de la activación del receptor al asociarse con sus ligandos. Ambos son importantes en la función y conformación estructural del receptor (Bole-Feysot et al., 1998; Rozakis-Adcock & Kelly, 1991, 1992).

El siguiente dominio es el transmembranal, con una longitud de aproximadamente 24 aa cuya función es unir a las regiones extra-membranal y citoplasmática. Esta última, es el puerto en el cual los segundos mensajeros se mantienen anclados hasta la obtención de una señal de activación. De forma interesante, es el menos conservado de las tres isoformas, por lo que es el determinante principal para las diferencias funcionales del receptor debido al acoplamiento de proteínas en regiones específicas (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Rozakis-Adcock & Kelly, 1991, 1992). No obstante, presenta dos regiones altamente conservadas nombradas Box1 y Box2. La primera es una región de 8 aa ricos en prolinas y residuos hidrófobos, claves en la asociación del receptor con Jak. Por otro lado, Box2 está integrada por dos dominios, uno de residuos negativos y otro de positivos implicados en la asociación de Jak2. A diferencia de Box1 que se encuentra en todas las isoformas del receptor, Box2 está ausente en las isoformas cortas (Fig. 8A) (Kelly et al., 1991).

Cuando el receptor se asocia con el ligando se produce la fosforilación de los residuos de tirosina en el dominio citoplasmático, activando segundos mensajeros como Stat y Jak. En cuanto a la familia de Stat se ha descrito la activación de los miembros Stat1, 3 y 5 durante la activación del receptor de PRL (Fig. 8B) (Goffin et al., 2002). La estimulación de Stat5b ha sido estrechamente relacionada con la autorregulación que ejerce la hormona sobre su secreción, al estimular a las neuronas TIDA

(tuberoinfundibulares) para la secreción de dopamina (Grattan & Akopian, 2016; Grattan et al., 2001). Asimismo, la activación de Mapk y la subsecuente activación de Raf (*RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase*), seguida de Mek1/2 y finalmente Erk1/2 que al ser fosforilado se transloca al núcleo promoviendo la activación de factores de transcripción que han sido involucrados en crecimiento y proliferación celular (Fig. 8B) (W. Zhang & Liu, 2002).

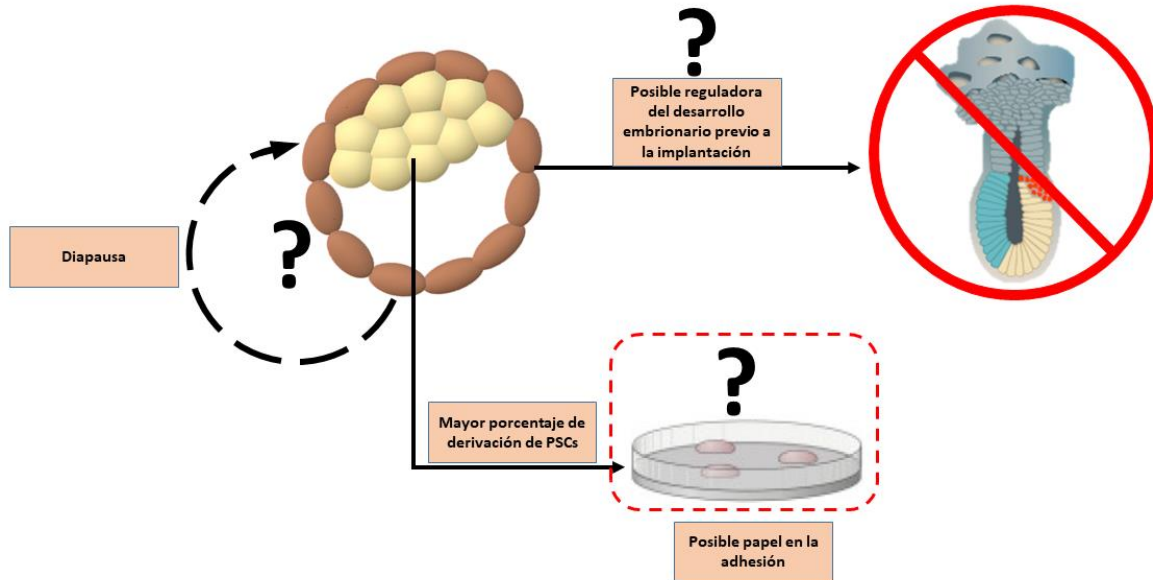


**Figura 8. Receptor de PRL, variables y vías de señalización.** A) receptor de PRL, con sus variantes larga, intermedia y corta. C) Principales vías activadas por este receptor, Jak-Stat, MAP cinasas y SCR (de izquierda a derecha). Imagen modificada de (Bole-Feysot et al., 1998; Bugge et al., 2016; Goffin et al., 2002).

Otra de las vías activadas por el receptor de PRL es la de Scr (*proto-oncogene tyrosine kinase*) (Fig. 8B). Esta familia de tirosinas-cinasas está integrada por 7 miembros: Blk (del inglés *B lymphoide tyrosine kinase*), Fyn (*FYN proto-Oncogene, Scr Family Tyrosine kinase*), Hck (del inglés *Hemopoietic cell kinase*), Lck (del inglés *Lymphocyte cell-specific protein-tyrosine kinase*), Yes (*YES proto-Oncogene 1, Scr Family Tyrosine kinase*) y Lyn (*LYN proto-oncogene, Scr Family Tyrosine kinase*). Todos ellos tienen la capacidad de interactuar y activar proteínas como, PI3k, SHB (*Src homology-2 domain containing protein B*) o Akt. Este último elemento de la vía de señalización tiene la capacidad de entrar al núcleo y regular la activación de promotores genéticos, los cuales han sido asociados con la activación de procesos como crecimiento, proliferación y migración celular (Fresno Vara, Caceres, Silva, & Martin-Perez, 2001; Ignacak et al., 2012; Parsons & Parsons, 2004).

### 1.5 Funciones de la prolactina en el desarrollo embrionario

A continuación, se describirá el papel de la hormona durante el desarrollo embrionario, principalmente cuando se da la pluripotencia, lo cual ha sido poco explorado (Fig. 9).



**Figura 9. La incógnita de la PRL en el desarrollo embrionario y mESC.** El papel de la PRL en procesos como la diapausa, la transición embrionaria en etapas pre implantación y su posible implicación con la derivación y mantenimiento de líneas de células pluripotentes continúa siendo una incógnita, con la necesidad de ser explorada.

El desarrollo de los mamíferos es un proceso complejo de especificación que requiere múltiples señales que instruyan a las células para adquirir fenotipos específicos. Desde la fecundación, el ambiente molecular al cual este expuesto el embrión es clave en la determinación del proceso de desarrollo. Las hormonas adquieren un papel importante en estas señales, entre ellas, la PRL ha sido asociada con problemas en la implantación y el mantenimiento del cuerpo lúteo, ambos procesos necesarios para el adecuado desarrollo (Murphy 1979). No obstante, a pesar de ello poco se sabe de su función durante el desarrollo temprano.

Kiapekou y colaboradores asociaron a la PRL con la maduración de ovocitos primarios de ratón. Mediante el cultivo de ovocitos a los cuales se les dio un tratamiento con la hormona de 12 días, observaron un incremento en su maduración con dosis mayores a 100ng/ml. Este efecto se reflejó incluso después de la fertilización, ya que la formación de cuerpos polares así como la tasa de división celular fue mayor en comparación al grupo control (Kiapekou et al., 2006). De forma similar, el tratamiento con 50ng/ml incrementó la maduración nuclear de ovocitos bovinos promoviendo un incremento en el desarrollo a estadios como la mórula y el blastocito (Kuz'mina, Lebedeva, Torner, & Alm, 2001). Ambos resultados sugieren un papel de la hormona en la maduración citoplasmática del ovocito que resulta en una mejor tasa de desarrollo post-fertilización, lo cual podría ser asociado con los resultados obtenidos por el grupo de Tesarik en donde exploraron la relación entre diversos esteroides, citosinas y hormonas pituitarias en la fertilización del embrión humano después de la inyección intracitoplasmática. La adición de PRL en conjunto con la hormona luteinizante incrementó la tasa de fertilización en embriones humanos así como su progresión hacia estadios post-implantación, sin embargo, no en los niveles observados para la hormona foliculo estimulante y la hormona del crecimiento (Mendoza et al., 1999).

Yoshimura y colaboradores reportaron que la adición de PRL (1 $\mu$ g/ml) a ovocitos de conejo cultivados *in vitro* favoreció su capacidad de desarrollo hacia mórulas y blastocitos. De forma adicional, cuando la hormona (10, 100 y 1000ng/ml) fue administrada en conjunto con 1 $\mu$ g/ml de la hormona luteinizante, folículo estimulante y estradiol, se observó un incremento en la formación de dichas estructuras, en una manera dosis-respuesta (Yoshimura et al., 1989). Tomando en conjunto estos resultados, sugieren la capacidad de la hormona para regular el desarrollo pre-implantación.

Por otro lado, la diapausa consiste en el arresto reversible del embrión pre-implantación en presencia de condiciones adversas para el desarrollo del producto. Asimismo, la PRL ha sido sugerida como una de las señales más importantes para la implantación, ya sea por su relación con la producción de progesterona o mantenimiento del cuerpo lúteo, además de la posibilidad de tener un impacto directo en el embrión (Fenelon, Banerjee, Lefevre, Gratian, & Murphy, 2016; Mead, 1993). De manera interesante, se han reportado fluctuaciones en la cantidad del receptor de PRL durante la diapausa en minks (*Neovison vison*, principal modelo animal de la diapausa), siendo menor su presencia en el útero durante la diapausa e incrementando después de la reactivación del embrión (Fenelon, Lefevre, Banerjee, & Murphy, 2017). Como se mencionó anteriormente, el establecimiento de líneas pluripotentes se logró a partir de embriones en diapausa, sugiriendo que este fenómeno favorece la derivación de estas líneas al sincronizar a los embriones en el estadio “naive” promoviendo el incremento de células en la ICM (Evans & Kaufman, 1981; Nichols & Smith, 2012; Wu & Izpisua Belmonte, 2015). Por otra parte, Polejaeva y colaboradores determinaron que la adición de PRL (5 $\mu$ g) a embriones de mink cultivados *in vitro* durante 10 días indujo un incremento en el número de blastocitos adheridos a la placa resultando en el establecimiento de células de tipo-pluripotentes (I. A. Polejaeva et al., 1997). Finalmente, Sellers y colaboradores reportaron que concentraciones de PRL (0.05 y 0.5 $\mu$ g/ml) administradas en el medio de cultivo de mESC y células troncales embrionarias humanas, indujeron la estimulación de Akt y Mapk favoreciendo la migración y adhesión de estas células (Sellers et al., 2018). Estos datos en conjunto postulan a la PRL como una señal importante durante el progreso del desarrollo temprano, a nivel de la población pluripotente y diapausa.

## **2 JUSTIFICACION**

Durante el desarrollo embrionario y fetal debe existir un equilibrio entre factores que regulen el correcto desarrollo del producto. De esta manera, alteraciones en el microambiente molecular podrían generar consecuencias que impacten el desarrollo del organismo. Dentro de los componentes moleculares que tienen una importante presencia a través del desarrollo embrionario y fetal se encuentran las hormonas que son clave ya que regulan una amplia gama de procesos, desde la implantación hasta maduración de órganos y tejidos particulares. Entre ellas, la PRL destaca notablemente ya que es la hormona con la mayor cantidad de funciones descritas a la fecha. Este aspecto y su abundante presencia durante diversos estadios del desarrollo, principalmente en el líquido amniótico, sugieren un importante papel durante dicho proceso. Sin embargo, el amplio cuerpo de literatura que sustenta las más de 300 funciones de la PRL está concentrado en su mayoría en procesos fisiológicos en el adulto y una minoría está relacionada directamente con aspectos embrionarios y fetales, manteniendo en la incógnita múltiples aspectos, entre ellos el papel de la PRL en la diapausa y su posible impacto en la regulación de la pluripotencia. Por ello, es importante conocer más acerca de esta hormona, su impacto en el desarrollo temprano y sus posibles mecanismos de regulación en células troncales pluripotentes.

### **3 HIPOTESIS**

La PRL regula la pluripotencia de células troncales embrionarias de ratón, manteniendo características morfológicas asociadas con la pluripotencia y moleculares como la triada de Oct4, Sox2 y Nanog así como el potencial de diferenciación aun en ausencia de LIF.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar el papel de la prolactina en la pluripotencia de células troncales embrionarias de ratón.

#### **4.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

Replicar un protocolo en el cual las células troncales embrionarias de ratón sean mantenidas en condiciones “naive”.

Evaluar la expresión del receptor de prolactina en células troncales embrionarias de ratón mantenidas en condiciones *metaestables* y “naive”.

Determinar el efecto de la prolactina en la pluripotencia de células troncales embrionarias de ratón en condiciones *metaestables*.

## 5 MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Cultivo celular

#### 5.1.1 Obtención de MEFs

Los MEFs empleados como capa nodriza fueron obtenidos de embriones del día 13.5. Brevemente, hembras CD-1 en el día 13.5 de gestación fueron sacrificadas por dislocación cervical y rociadas con etanol al 70%, a partir de este momento todo se realizó en la campana de flujo laminar. Para obtener los embriones se realizó un corte en la piel exponiendo la pared abdominal, cortando a través de ella se obtuvo el útero el cual fue colocado inmediatamente en una caja Petri con PBS (Sigma, St. Louis, Missouri USA). A continuación, los embriones fueron transferidos a una nueva caja Petri con PBS (colocando entre 3 y 4 embriones por caja) para cortar la cabeza y retirar tejidos como el corazón e hígado. El resto de cada embrión fue enjuagado con PBS y colocado en una nueva caja Petri con 0.25% de tripsina-EDTA (Gibco, Massachusetts USA), para ser cortado en piezas de 1-2mm. Se pipeteo varias veces y se colocó el contenido de la placa a 37°C durante 10 min, después de la incubación se volvió a pipetear el tejido varias veces y seguido por otro periodo igual de incubación, al terminar se inactivó la tripsina mediante la adición de PBS con FBS (Gibco) al 10%. La suspensión fue colocada en un tubo de 50ml, se dejó reposar 5min y el sobrenadante libre de fragmentos de tejido fue colocado en cajas Petri (volumen equivalente a dos embriones por caja) para su expansión en medio DMEM (Gibco) suplementado con FBS al 10%, aa no esenciales (Gibco) 0.1mM y penicilina/estreptomicina (Gibco) 50U/ml. Cuando la densidad celular es del 100% los MEFs pueden ser congelados o pasados a cajas Petri de 100mm en la siguiente proporción:

Pase	Proporción
2	1:4
3	1:3.5
4	1:3

#### 5.1.1.1 Inactivación de MEFs

Habitualmente en el cuarto pase los MEFs pueden ser inactivados, alcanzado el 100% de confluencia se realizaron dos lavados con PBS de 5min cada uno posteriormente se agregaron 7ml de medio nuevo más mitomicina C (Sigma) para una concentración final de 10µg/ml y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Al terminar la incubación, se realizaron dos lavados con PBS de 5min cada uno seguidos de incubación por 5min con 0.05% de tripsina EDTA (Gibco), e inactivada con PBS más FBS al 10%. Las células fueron disgregadas por pipeteo constante hasta obtener una suspensión de célula única, la suspensión fue recolectada en un tubo de 50ml y se centrifugó durante 5min a 200g. Se retiró el sobrenadante y se resuspendieron las células con medio para MEFs para finalmente congelar aproximadamente  $3 \times 10^6$  células por vial o cultivarlos a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> para utilizarlos como capa nodriza.

#### 5.1.2 Cultivo de mESC

Las células troncales embrionarias de ratón R1 (Nagy et al., 1993) fueron mantenidas en condiciones metaestables (Suero+LIF) o adaptadas a crecer en condiciones “naive”. Brevemente, las células en

condiciones de Suero+LIF fueron mantenidas en cajas de 100mm previamente tratadas con gelatina al 0.1% (Sigma) en medio DMEM KO (Gibco) suplementado con suero fetal bobino al 15%, aa no esenciales 0.1mM, piruvato de sodio (Gibco)1mM, penicilina/estreptomicina 50U/ml, 2-mercaptoetanol 0.1mM (Gibco) y LIF 1000U/ml (Millipore, Massachusetts USA) sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados.

Para el cultivo en condiciones 2i+LIF las células R1 después de cinco días de expansión fueron adaptadas a crecer libres de capa nodriza en placas cubiertas con gelatina al 0.1%. Para ello, se realizó una incubación con tripsina EDTA al 0.5% durante 5min para obtener una suspensión de células únicas. La cual fue colocada en una caja cubierta con gelatina durante una hora para remover los fibroblastos debido a su tamaño y rápida adhesión a la placa de cultivo, mientras que las mESCs permanecieron suspendidas. Como primera aproximación se evaluaron 2 condiciones:

- 1) NB2i: se colocaron  $7.5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en placas de cultivo cubiertas con gelatina al 0.1% + 3µg/ml de laminina (Millipore). Con una mezcla 1:1 de medio neurobasal (Gibco) y DMEM/F12 (Gibco), suplementada con N2 (Gibco) 1X, B27 sin vitamina A (Gibco) 1X, GlutaMAX (Gibco) 2 Mm, penicilina/estreptomicina 50U/ml más 1000U/ml de LIF, 1µM de PD0325901 (Tocris, Bristol Reino Unido) y 3µM de CHIR99021 (Tocris).
- 2) KO2i: el mismo número de células que en la condición anterior fueron colocadas en cajas cubiertas con gelatina al 0.1% en DMEM F12 suplementado con 10% de KOSR (Gibco) (reemplazo de suero KO), 0.1mM de aa no esenciales, 0.1Mm de 2-mercaptoetanol, 50U/ml de penicilina/estreptomicina, 1000U/ml de LIF, 1µM de PD325901 y 3 µM de CHIR99021.
  - a. NOTA: el 10% KOSR fue reducido secuencialmente a partir del tercer pase para que a partir del quinto se colocara únicamente 5% de KOSR.

#### **5.1.4 Cultivo de células troncales embrionarias humanas**

La línea H9 fue mantenida de acuerdo con protocolos establecidos en el laboratorio (Avila-Gonzalez et al., 2015). Brevemente, las células se cultivaron en medio de mantenimiento (DMEMF12, 20% de KOSR, aa no esenciales, L-glutamina, mercaptoetanol y 4ng/ml de FGF2) en condiciones hipóxicas sobre una capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón.

#### **5.1.5 Tratamientos con prolactina**

PRL murina (PreproTech, New Jersey USA) fue reconstituida de acuerdo con las instrucciones del proveedor en PBS + 0.1% de BSA. Las concentraciones evaluadas fueron de 0.2, 0.4, 2.08, 6.24 y 20.8nM de PRL. Para evaluar el efecto de la hormona en la pluripotencia se cultivaron  $1.25 \times 10^3$  ESC/cm<sup>2</sup> durante 5 días en placas de 24 pozos, en condiciones libres de capa nodriza. Los tratamientos recibidos fueron de acuerdo con los siguientes grupos: grupo 1) PRL+LIF, grupo 2) PRL, grupo 3) control y grupo 4) vehículo.

#### **5.1.6 Inmunofluorescencia y cuantificación**

Al finalizar el experimento el medio fue removido y las células lavadas con PBS 2 veces durante 5 minutos y fijadas con paraformaldehido (Sigma) al 4% durante 20 minutos a temperatura ambiente. El paraformaldehido fue removido y las células lavadas con PBS veces durante 5 min cada lavado. La permeabilización se realizó con PBS con tritón (Sigma) al 0.3% y se bloqueó con PBS más 5% BSA



y 0.05% de tween 20 (Sigma). Las células fueron incubadas con los anticuerpos primarios adecuados diluidos en la solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. La dilución de anticuerpos primarios se recuperó y las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 1 hora 45min con anticuerpos secundarios específicos diluidos en la solución de bloqueo. Al finalizar la incubación, se retiró la dilución de anticuerpos secundarios y se hicieron tres lavados con PBS seguidos de una incubación de 5min con DAPI (4',6-diamino-2-fenilindol). Después de retirar DAPI se lavaron las células 3 veces con PBS más azida de sodio antes del montaje final.

La cuantificación fue realizada por duplicado en por lo menos tres experimentos distintos, para ello se empleó un microscopio de epifluorescencia Olympus IX81 y una cámara HAMAMATSU C11440 ORCA-Flash2.8 (Tokio, Japón). Las fotos para cada fenotipo celular fueron tomadas en nueve campos por pozo elegidos de manera aleatoria y empalmadas con el programa (Photoshop CC 2017; EE. UU.). Las células positivas para cada marcador empleado y los núcleos positivos fueron contadas con Image J (NIH).

Tabla 1: Lista de anticuerpos usados en el estudio.

Anticuerpo	Marca	Dilución	Numero de catálogo/clona
Conejo-anti-Oct4	BD	1:250	611202/40 Oct-3
Conejo-anti-Sox2	MILLIPORE	1:200	AB5603
Conejo-anti-Nanog	ABCAM	1:50	AB80892
Ratón-anti-E-cadherina	BD	1:100	610181/36
Raton-anti-SSEA1	GENETEX	1:500	GTX48035/MC-480
Conejo-anti-H3K27ac	Active Motif	1:1000	39133
Conejo-anti-H3K9ac	Cell Signaling	1:400	C5B11, 9649
Conejo-anti-H3K27me3	Millipore	1:500	07-449
Conejo-anti-H3K4me3	Abcam	1:100	AB600
Conejo-anti-receptor de PRL	Abcam	1:100	AB170935

### 5.1.7 RT y PCR

Los ensayos fueron realizados de acuerdo con protocolos establecidos en el laboratorio (Garcia-Castro et al., 2015). Brevemente, se analizó la expresión de los genes de interés (Tabla 1). Para ello, se obtuvo RNA total de las células mediante el método de fenol cloroformo. Para cada muestra, 100µl de TriZol (Invitrogen, California EE. UU.) fue adicionado a los botones celulares obtenidos en cada experimento. Las muestras fueron homogenizadas utilizando un vortex e incubadas durante 15 min a 30°C. Posteriormente, se adiciono 200µL de cloroformo para obtener la fase acuosa, la cual se mezcló con 200µL de isopropanol para precipitar el RNA. El sobrenadante se lavó con etanol al 96% y al 75%. El RNA se dejó secar durante toda la noche y se resuspendió en 40µL de agua. La pureza del RNA será determinada por la relación 260/280nm ( $\geq 1.6$ ) utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop One, Thermo Scientific). Finalmente, la integridad del RNA se evaluó mediante electroforesis en agarosa al 2%.

Para la transcripción reversa cada mezcla de reacción se hizo con 1000ng de RNA, los cuales se mezclaron con 4µL de MgCl<sub>2</sub> 25Mm, 2µL del buffer de la transcriptasa reversa 10x, 2µL de mezcla de dNTPs 10mM, 0.5µL del inhibidor de la ribonucleasa, 0.2µL de la enzima transcriptasa reversa

AMV (Promega, Madison EE. UU.)(15u), 1µL de cebadores y agua libre de nucleasas para un volumen final de 20µL. La reacción se incubo durante 10 min a temperatura ambiente y posteriormente a 42°C durante 40 min, finalmente las reacciones fueron calentadas a 95°C por 5 min y la transcriptasa se inactivo a 4°C.

Para la reacción de PCR punto final cada reacción se preparó con 10µL del flexi Buffer GoTaq 5x (Promega), 4µL de MgCl<sub>2</sub> 25mM (Promega), 1µL de dNTPs 10mM (Promega), 1µL de cada cebador, 0.25µL de DNA polimerasa y el volumen necesario de agua libre de nucleasas para un volumen final de 50µL. Los productos finales se analizaron en un gel de agarosa (Sigma) al 2%. Como gen constitutivo se utilizó actina.

Tabla 2: Lista de primers usados en el estudio.

Gen	Forward	Reverse	pb
Oct4	GTGGAGGAAGCCGACAACAATGA	CAAGCTGATTGGCGATGTGAG	181
Sox2	CATGAGAGCAAGTACTGGCAAG	CCAACGATATCAACCTGCATGG	127
Nanog	AAGATGCGGACTGTGTTCTC	CGCTTGCACTTCATCCTTTG	167
Klf4	CGGGAAGGGAGAAGACACT	GAGTTCCTCACGCCAACG	62
Zfp42	GTGTGCAGAGTGTGGCAAAG	AAAGCTCTTCTCGAGCCAT	205
Esrrb	TTTCTGGAACCCATGGAGAG	AGCCAGCACCTCCTTCTACA	118
Actina	TGGCGCTTTTGACTCAGGAT	GGGATGTTTGCTCCAACCAA	71

### 5.1.8 Tinción para fosfatasa alcalina

El ensayo fue realizado de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Vector Laboratories, California EE. UU.). Brevemente, luego de retirar el medio las células fueron lavadas tres veces con PBS durante 5 minutos cada lavado. Se agregó la solución de trabajo preparada al momento de acuerdo con el proveedor y se dejó incubar en obscuridad durante 40 min. Al finalizar, la solución de trabajo fue retirada y se realizaron dos nuevos lavados con PBS.

### 5.1.9 Ensayo de proliferación

A partir de una suspensión celular de las tres condiciones evaluadas, libre de capa nodriza para el caso de la condición metaestable. En el día cero se cultivaron  $1.25 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> en por lo menos 20 pozos para cada condición. A partir de este momento se despegaron las células de 2 pozos de cada condición las cuales fueron contadas inmediatamente después de ser despegadas durante 7 días.

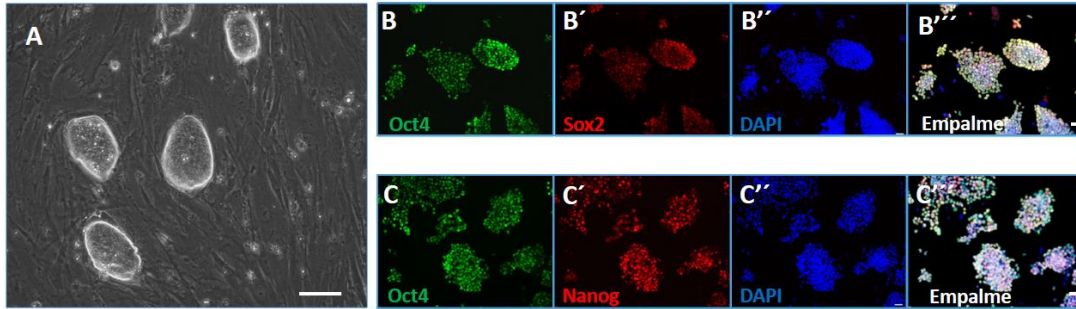
### 5.1.10 Análisis estadístico

Los datos son expresados en media más menos error estándar. La normalidad de los datos fue evaluada por la prueba Kolmogorov-Smirnov. Los análisis fueron realizados por medio de un ANOVA seguido de la prueba Holm-Sidak's (en caso de normalidad de datos). Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad, California EE. UU.).

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Estandarización de las condiciones de cultivo “naive”

Para abordar el objetivo de replicar un protocolo en el cual las mESCs sean mantenidas en condiciones “naive”. mESC R1 fueron mantenidas en una capa nodriza de iMEFs con medio DMEM KO suplementado con FBS y LIF (condición metaestable) durante 5 días. En este periodo surgieron colonias en forma de domo con bordes bien definidos integradas por células muy compactas entre sí, características reportadas en la literatura previamente descrito, asociadas con la condición de cultivo metaestable (Fig.10 A).

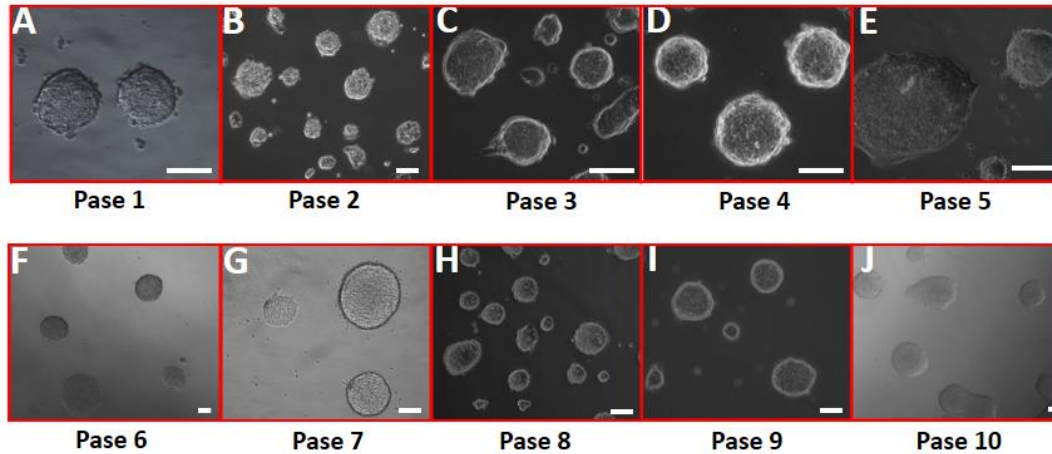


**Figura 10 Caracterización de mESC metaestables.** A) morfología habitual de las colonias al crecer en condiciones metaestables (campo claro). B y C) presencia de Oct4 (verde), en B') Sox2 (rojo) y en C') Nanog (rojo). Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (azul). Así como sus respectivos empalmes en B''' y C''', demostrando la colocalización de los tres FTs de la triada de pluripotencia. Microscopio de epifluorescencia 10x. Escala 25μm.

Para explorar su identidad se evaluaron los marcadores de la triada de pluripotencia mediante la técnica de inmunofluorescencia. Con lo cual se demostró la presencia de Oct4, Sox2 y Nanog en el núcleo de las células (Fig. 10 B y C). De manera adicional, estas células han sido retadas en el laboratorio a ensayos de diferenciación *in vitro* obteniendo poblaciones de origen neural (anexo 1) y cardiomiocitos (anexos, video 1), derivados de ectodermo y mesodermo, respectivamente. Resultados que en conjunto otorgan evidencia de su naturaleza pluripotente.

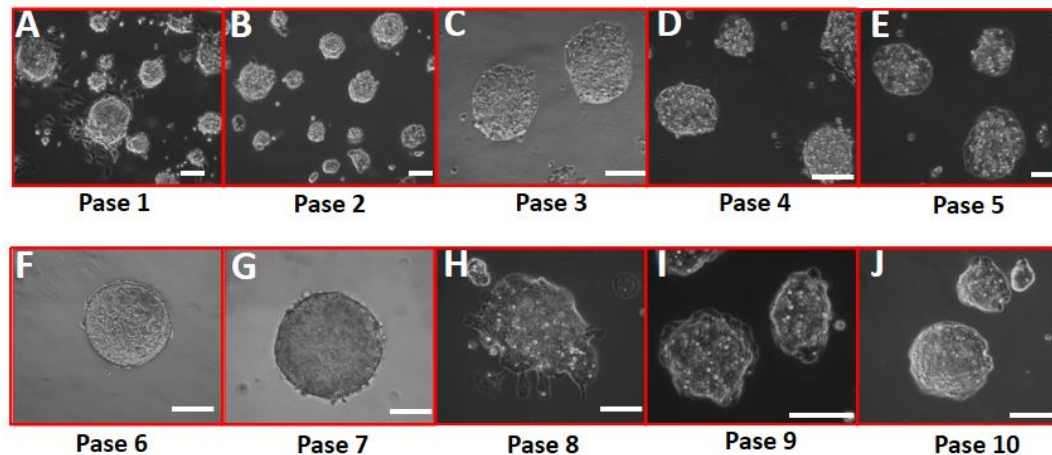
Posteriormente, las células metaestables fueron adaptadas a crecer en condiciones de cultivo “naive”. Como primer acercamiento se evaluaron dos protocolos previamente reportados, el primero de ellos denominado NB2i (Ying et al., 2008) y el segundo llamado KO2i (Guo et al., 2016). Para iniciar el cambio de condiciones de cultivo (metaestables a “naive”) las células fueron liberadas de la capa nodriza, mediante adhesión selectiva, obteniendo así una población enriquecida de mESCs en donde se inició los experimentos en condiciones 2i.

Después de 2 días de cultivo en ambos medios “naive”, se pudieron observar pequeños agregados celulares. En NB2i durante los primeros 5 pases surgieron pequeñas colonias esféricas, de bordes definidos con algunas células muertas en la periferia (Fig. 11 A-E), indicando el proceso de selección y adaptación a las nuevas condiciones de cultivo. A partir del sexto pase las colonias fueron más homogéneas, mostrando forma de cúpula, con bordes redondeados bien definidos y con células muy compactas entre sí (Fig. 11 F-J), similar a lo reportado previamente en la literatura (Ying et al., 2008).



**Figura 11. Morfología de las células en condiciones NB2i durante los diez pases de cultivo.** Obsérvese la presencia de colonias esféricas, de bordes definidos en las microfotografías en campo claro en cada pase (uno a diez). Objetivos 20 y 40x. Escala 25µm.

En contraste, la condición KO2i permitió el establecimiento de colonias aplanadas con bordes ligeramente irregulares, detritos celulares rodeando las colonias y posiblemente células diferenciadas en la periferia, debido a su morfología plana y tendencia a migrar fuera del cúmulo manteniéndose como células únicas (Fig. 12 A-E). De forma adicional, en los pases seis y siete las colonias fueron redondeadas (Fig. 12 F-G), recuperando ligeramente los bordes irregulares en los pases ocho a diez (Fig. 12 H-J). Sin embargo, mantuvieron su morfología aplanada durante los diez pases que permanecieron en cultivo (Fig. 12), resultados muy similares a lo reportado previamente para esta condición (Guo et al., 2016).

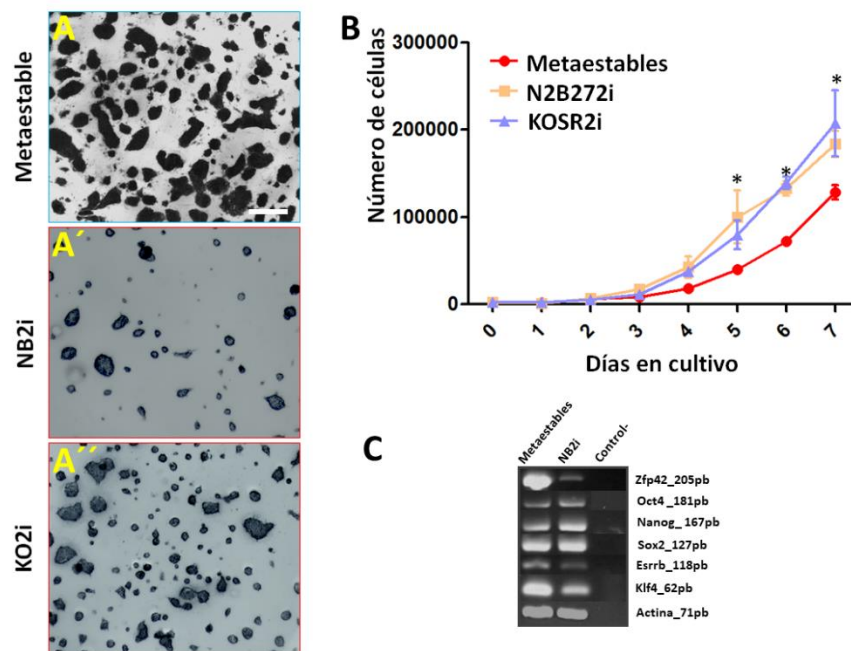


**Figura 12. Morfología de las células en condiciones KO2i durante los diez pases de cultivo.** Obsérvese las colonias aplanadas con bordes ligeramente irregulares en las microfotografías en campo claro en cada pase. Objetivos 20 y 40x. Escala 25µm.

Debido a que la morfología es una característica insuficiente para corroborar la identidad de las células pluripotentes, se evaluaron otras propiedades de la identidad “naive”. Inicialmente, se determinó el marcador clásico FA, encontrándose la presencia de esta enzima en las colonias de las tres condiciones de cultivo evaluadas. Debido a la agresividad del ensayo y la tendencia de las células

NB2i a despegarse, se observó un menor número de células en esta condición al compararse con las otras dos condiciones. No obstante, todas las colonias en los tres grupos fueron positivas a FA. De manera interesante, las células en condiciones “naive” presentaron una intensidad menor en el interior de la colonia que en la periferia, en contraste con la condición metaestable donde FA marcó en un color más oscuro en toda la colonia (Fig. 13 A).

Asimismo, se determinó la clonalidad celular a través de un ensayo de proliferación en las tres condiciones de cultivo a lo largo de 7 días. Los datos arrojados indicaron una mayor capacidad de proliferación en las condiciones “naive” al ser comparadas con la condición metaestable, a partir del día 5 (metaestable  $51,250 \pm 11,614$ , NB2i  $100,000 \pm 16,776$  y KO2i  $79,583 \pm 24,448$ ;  $P=0.0168$  correspondiente al ANOVA). Dicha diferencia se mantuvo hasta el séptimo día (metaestable  $128,125 \pm 14,375$ , NB2i  $184,167 \pm 15,069$  y KO2i  $20,7667 \pm 65,515$ ;  $P=0.0023$  correspondiente al ANOVA) (Fig. 13B). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambas condiciones “naive” durante todo el ensayo.



**Figura 13. Caracterización de las condiciones metaestable vs “naive”.** A) Observamos la presencia de fosfatasa alcalina como una tinción de color azul oscuro y B) cuantificación del ensayo de proliferación en las tres condiciones de cultivo ( $P=0.0168$ ,  $GL=14$ ). C) presencia de los RNAm de los genes de pluripotencia; Zfp42, Oct4, Nanog, Sox2, Esrrb y Klf4. Se utilizó actina (control de carga) en células metaestables y cultivadas en NB2i. Aumento de 6.5x. Escala 100 $\mu$ m. Se realizaron 3 experimentos por duplicado de cada una de las pruebas empleadas.

Por lo que se refiere a su caracterización molecular, se determinó la presencia los tres FTs de la triada de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog en células metaestables y “naive” mediante PCR (Fig. 13 C). De manera adicional, se evaluaron marcadores asociados con el estadio “naive” como Zfp42, Esrrb y Klf4, los cuales estuvieron presentes en ambas condiciones de cultivo (Fig. 13 C) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et al., 2014) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et

al., 2014) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et al., 2014) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et al., 2014) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et al., 2014) (Ghimire et al., 2018; Hackett & Surani, 2014; Kalkan et al., 2017; P. Yang et al., 2019; S. H. Yang et al., 2014).

Asimismo, se corroboró la presencia de la proteína de marcadores de pluripotencia a través de la técnica de inmunofluorescencia. Se encontró una ubicación nuclear de la triada de pluripotencia en las células de los tres protocolos evaluados. No obstante, para la condición metaestable fue una distribución a manera de sal y pimienta; mientras que para las condiciones “naive” fue más uniforme para todos los FT evaluados (Fig. 14A, B). Cabe destacar la distribución homogénea de Nanog en las condiciones “naive”, ya que su presencia fue la más uniforme (Fig. 14B).

De manera adicional, los marcadores asociados con pluripotencia “naive”, Tfp2c y Klf4 fueron observados escasamente en las tres condiciones de cultivo, como una marca nuclear y citoplasmática/nuclear, respectivamente. De forma particular en las condiciones metaestables se observó un menor número de células positivas para estos marcadores, las cuales se encontraron ubicadas principalmente en el centro de la colonia; mientras que en la condición KO2i se observaron algunas colonias con marca difusa principalmente para Tfp2c y algunas células positivas para Klf4. De manera interesante, la condición NB2i fue capaz de presentar múltiples colonias positivas para ambos FTs con marcas nucleares en el caso de Tfp2c. No obstante, la señal positiva de Klf4 se mantuvo difusa, aun en colonias que es su totalidad fueron positivas a este FT (Fig. 14C). Dichas colonias no pudieron ser observadas en ninguna de las otras dos condiciones de cultivo.

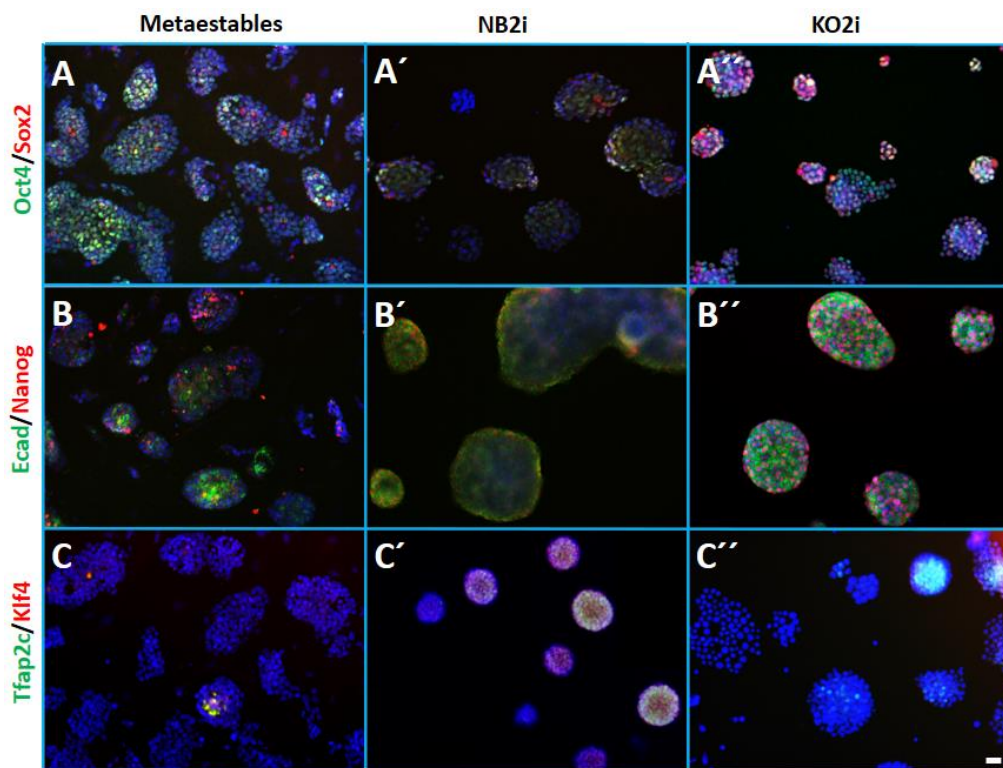
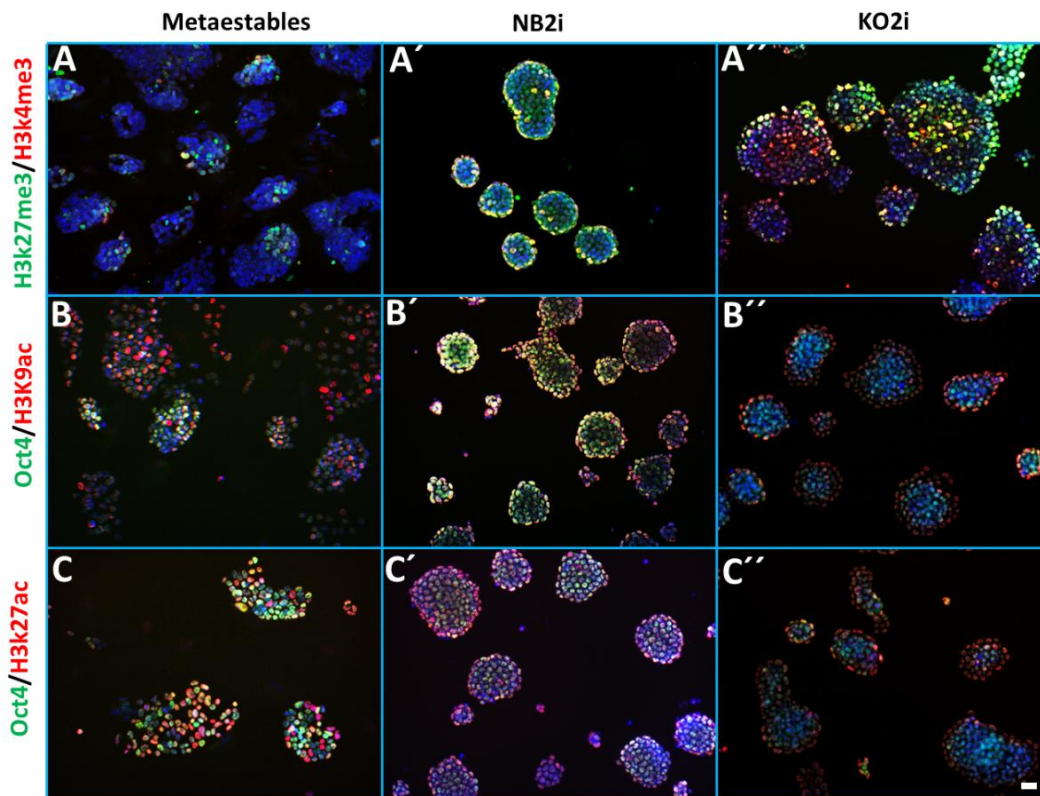


Figura 14. Presencia de marcadores de pluripotencia en células mESC en condiciones metaestables y “naive”. Se muestran las marcas positivas en A) de Oct4 y Sox2 como marcas nucleares en verde y rojo

respectivamente. B) E-cadherina como una marca citoplasmática/mebranal en verde, así como Nanog en el núcleo de color rojo. C) Tfp2c (verde) y Klf4 (rojo) ambas marcas nucleares. Todos ellos analizados en las 3 condiciones de cultivo. Se utilizó a DAPI (azul) para la identificación de los núcleos. Microscopio de epifluorescencia 20x. Escala 25µm.

Como primer acercamiento para conocer el paisaje epigenético generado por nuestros protocolos de cultivo, se evaluó la presencia de modificaciones de histonas relacionadas con la pluripotencia (H3k27me3 y H3k4me3), las cuales se encontraron en el núcleo de las células de las tres condiciones evaluadas. Sin embargo, se observó en la condición metaestable que la marca fue menos uniforme en comparación a las condiciones “naive”. Asimismo, se encontró una mayor colocación de ambas marcas en la periferia de las colonias NB2i, en contraste con un patrón de gradiente en KO2i (Fig. 15 A). Cuando se evaluó H3k9ac (Fig. 15 B) y H3k27ac (Fig. 15 C) se identificó un patrón similar a lo ocurrido con las marcas bivalentes. En las señales de acetilación se observó un patrón aleatorio en las células metaestables, de las cuales la gran mayoría presento alguna de las dos señales evaluadas en colocación con Oct4 (indicando su naturaleza pluripotente). En contraste, las células “naive” conservaron ambas marcas localizadas predominantemente en la periferia de las colonias (Fig. 15 B y C) con una distribución más homogénea en la condición NB2i.

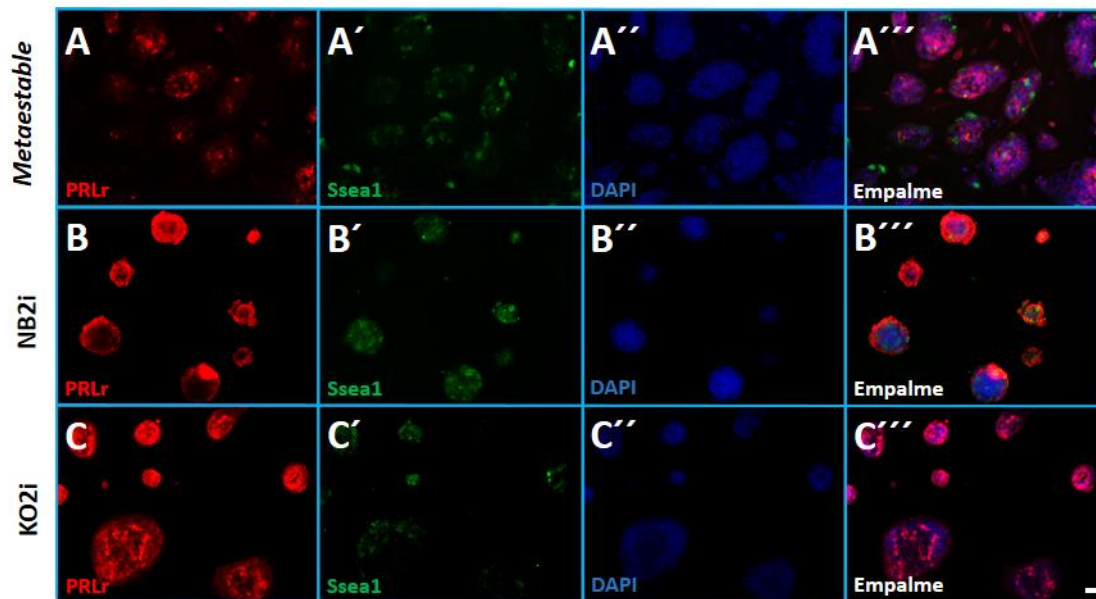


**Figura 15. Modificaciones de histonas en mESCs en condiciones metaestables y “naive”.** Se muestra en A) las marcas bivalentes integradas por H3k4me3 y H3k27me3 ambas como señales nucleares en rojo y verde respectivamente. Además, las marcas C) H3k9ac y D) H3k27ac ambas con una distribución nuclear en rojo colocalizando con la señal nuclear de Oct4 en verde. Se utilizó a DAPI como contraindicación de color azul. Todas las marcas son nucleares y su distribución es específica para cada condición. Objetivo 20x. Escala 25µm.

## 6.2 mESC metaestables y “naive” son positivas para el receptor de PRL

Debido a la poca evidencia del papel de la PRL y su receptor en el desarrollo temprano, decidimos evaluar la presencia de este último tanto en condiciones metaestables como “naive”, a través de la técnica de inmunofluorescencia de acuerdo con lo indicado en el segundo objetivo específico. Con ello se encontró que los tres grupos evaluados eran positivos para el receptor, obteniendo una marca membranal/citoplasmática positiva, la cual co-localizó con SSEA1 indicando su presencia en células pluripotentes (Fig. 16). De manera interesante, en células “naive” la marca fue más uniforme (Fig. 16 B y C), en contraste con la condición metaestable en donde incluso algunas células fueron negativas (Fig. 16 A).

Para aportar más información en cuanto a la caracterización del receptor de PRL en la pluripotencia desde estadios pre hasta post-implantación decidimos evaluar su presencia en células “primed”. Debido a que en el laboratorio no contamos con líneas de EpiSCs, elegimos como punto de referencia a las células embrionarias humanas H9 las cuales simulan estadios post-implantación al igual que las EpiSCs de ratón, encontrando que en células “primed” el receptor de PRL está ausente (anexo 3).



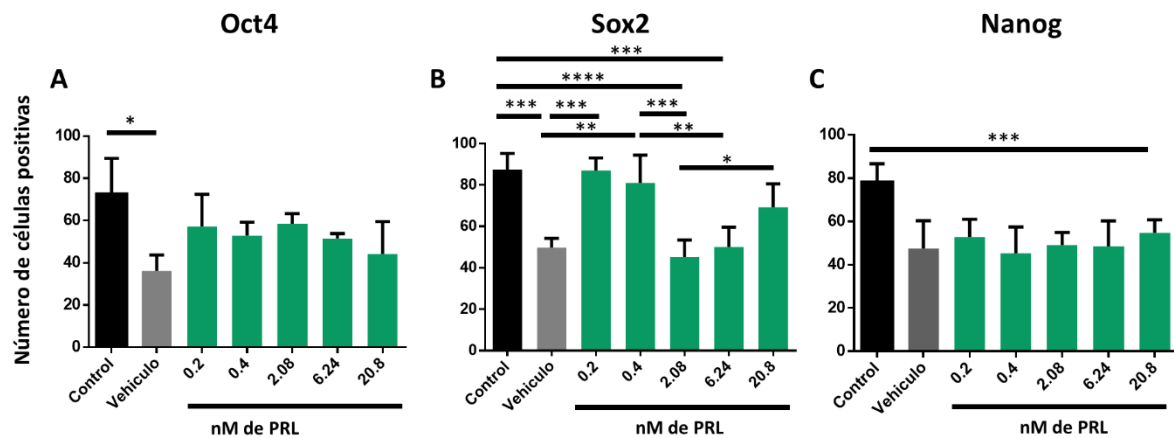
**Figura 16. Presencia de receptor de PRL en la pluripotencia metaestable y “naive”.** Obsérvese el receptor de PRL en rojo que co-localiza con el marcador de pluripotencia SSEA1 (verde) en células A) metaestables, B) cultivadas en NB2i y C) en KO2i. Ambas marcas se observan con un patrón citoplasmático membranal. Microscopía de epifluorescencia 20x. Escala 25µm.

## 6.3 La prolactina mantiene a Oct4, Sox2 y FA incluso en ausencia de LIF

Una vez que se determinó la presencia del receptor de PRL, se abordó el objetivo de determinar el efecto de la PRL en la pluripotencia de mESC. Para ello se realizaron tratamientos *in vitro* con la hormona a diferentes concentraciones en células en condiciones metaestables durante cinco días de cultivo, para explorar el papel de la hormona sobre la triada de pluripotencia. De manera interesante, ninguna de las concentraciones evaluadas de la hormona alteró significativamente el número total de células Oct4+ con relación al control, en el cual si se observó una diferencia significativa con respecto al grupo con vehículo (control  $72.65 \pm 9.70$ ; vehículo  $36.11 \pm 4.39$ ; 0.2nM;

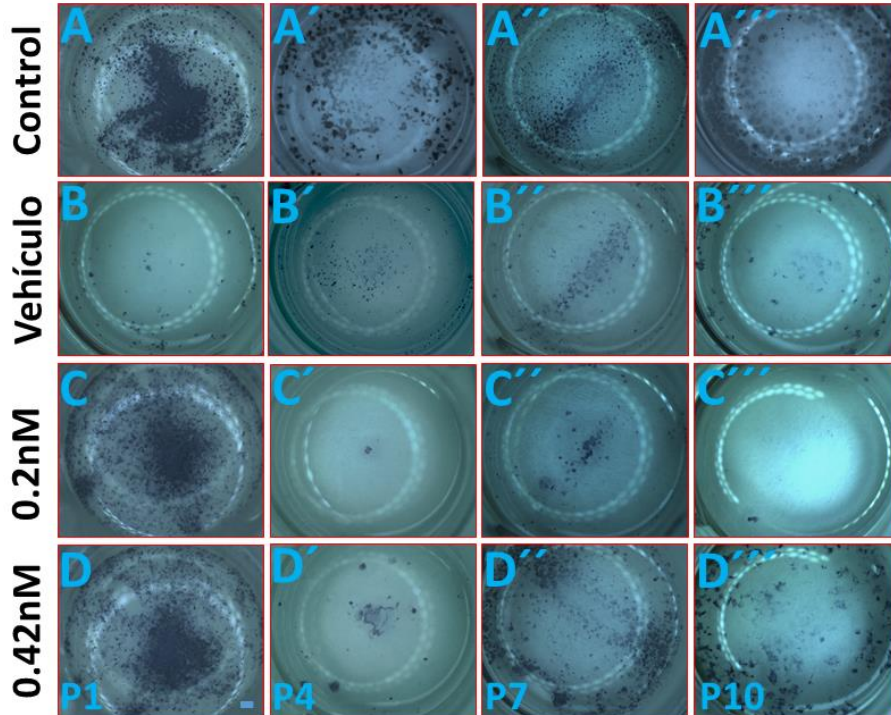


7.17 ± 8.84; 0.4nM 52.98 ± 3.62; 2.08nM 58.43 ± 2.82; 6.24nM 51.46 ± 2.42; 20.8nM 44.13 ± 8.91; ANOVA  $F_{(6,14)}=3.169$ ,  $p=0.035$ ) (Fig. 17A). En cuanto al número de células Sox2+ el tratamiento con el vehículo (49.75 ± 2.25) generó una disminución significativa con respecto al control (87.5 ± 3.88), similar a lo ocurrido con los tratamientos de 2.08nM (45.25 ± 4.11) y 6.24nM (50 ± 4.79) de PRL (ANOVA  $F_{(6,21)}=16$ ,  $p<0.0001$ ) (Fig. 17B). De manera interesante, la administración de 0.2nM (87 ± 3.08) y 0.42pM (81 ± 6.72) se mantuvieron en niveles similares al control comportándose de manera prácticamente idéntica al ser comparados con los demás tratamientos incluido el vehículo. Finalmente, en el caso de Nanog, el vehículo (47.5 ± 6.44) provocó una disminución de cerca del 50% en la población positiva para este FT en comparación con el control (78.3 ± 4.23). Asimismo, las células positivas obtenidas con todos los tratamientos de PRL (0.2nM 52.75 ± 4.13; 0.4nM 45.25 ± 6.1, 2.08nM 49 ± 3.0, 6.24nM 48.5 ± 6.0 y 20.8nM 54.75 ± 3.04) disminuyeron a niveles similares a lo observado con el vehículo (ANOVA  $F_{(6,21)}=5.34$ ,  $p=.0017$ ) (Fig. 17C), siendo incapaces de mantener a Nanog como ocurrió con Oct4 y Sox2 (Fig. 17).



**Figura 17. Impacto de la PRL en la triada de pluripotencia.** Se muestran las gráficas del número total de células positivas para Oct4  $p=0.0353$  (A), Sox2  $p<0.05$  (B) y Nanog  $p=0.0017$  (C).  $p<0.05$  (\*),  $p<0.01$  (\*\*) y  $p<0.001$  (\*\*\*).

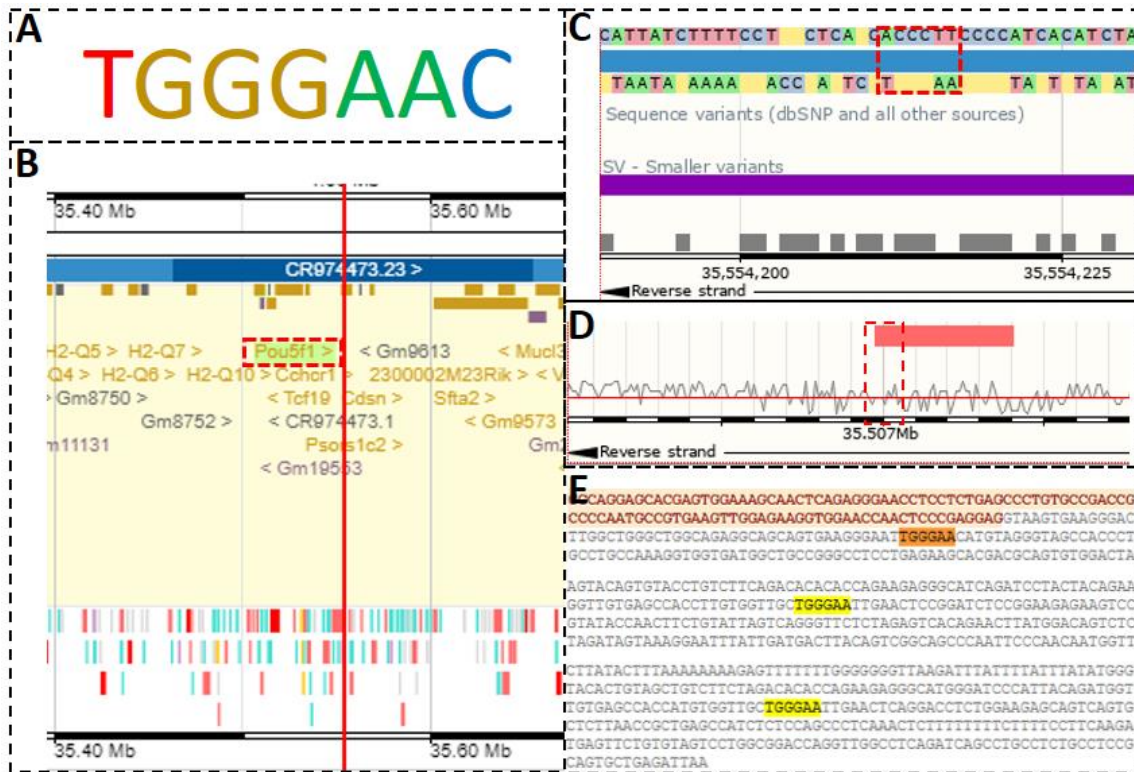
A partir de los resultados anteriores, se evaluó la capacidad de la hormona para mantener a largo plazo el cultivo de células metaestables. Para ello las concentraciones de 0.2nM y 0.4nM, que demostraron mantener a Oct4 y Sox2 en niveles similares al control (Fig. 17 A y B), fueron administradas durante diez pases, en donde se evaluó la presencia de FA. Por lo que se refiere al grupo control y de forma esperada mantuvo la marca de dicha enzima a lo largo de los diez pases (pases uno, cuatro, siete y diez son mostrados como representativos) (Fig. 18 A). En contraste, en el grupo vehículo la tinción para FA disminuyó desde el primer pase, permaneciendo así hasta el final del experimento (Fig. 18 B). Por otra parte, la administración de 2.08mM de PRL mantuvo a las colonias de mESC positivas para esta marca en el primer pase (Fig. 18 C), disminuyendo gradualmente hasta el pase cuatro (Fig. 18 C') con una apreciable recuperación de la población positiva para el séptimo pase (Fig. 18 C''). No obstante, en el décimo pase (Fig. 18 C''') no se apreció diferencia con el vehículo debido a la baja prevalencia de colonias FA+. El tratamiento con 2.08mM generó un efecto similar a 416pM desde el primero al cuarto (Fig. 18 D, D'). De manera interesante, hubo una recuperación en el séptimo pase (Fig. 18 D'') que fue similar a la condición control en el décimo pase (Fig. 18 D''').



**Figura 18. Mantenimiento de FA en ausencia de LIF.** Se muestran fotografías representativas de las colonias FA (fosfatasa alcalina) + obtenidas mediante el microscopio estereoscópico con un aumento de 1.6x en los pases (P) uno, cuatro, siete y diez para las siguientes condiciones A) control, B) vehículo, C) 20.8pM de PRL y D) 416pM de PRL. Análisis realizado durante diez pases en cultivo.

#### 6.4 Posible mecanismo de regulación de la pluripotencia a través de la señalización de PRL y Stat3

Como punto de partida para determinar el mecanismo por el cual la PRL podría estar impactando a la pluripotencia, se evaluaron las vías de señalización compartidas entre LIF y la hormona. Para ello, se exploraron mecanismos de regulación sobre el circuito de pluripotencia realizados por Stat3, debido a que es un punto de convergencia entre ambas vías de señalización. De acuerdo con los resultados de Tripathi y colaboradores, Stat3 reconoce la secuencia constituida por TGGGAAC durante la activación de diversos genes blanco (Fig. 19 A) (Tripathi et al., 2017). De esta forma, se realizó la búsqueda de dicho motivo de reconocimiento en la secuencia de Oct4 (50,000pb río arriba y río abajo flanqueando al gen) con la finalidad de explorar secuencias como *enhancers* y promotores (Fig. 19B) por medio de la plataforma *Ensembl*, Mouse (GRCm38.p6) ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)). Se encontraron tres regiones asociadas con dicho gen, posiblemente reguladas por Stat3. El primero de estos motivos de reconocimiento se ubicó en una zona asociada con un *enhancer* de Oct4 (Fig. 19C), la segunda secuencia se localizó en la primera sección del promotor de este gen (Fig. 19D) Ambas ubicadas dentro aproximadamente 50,000pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción de Oct4 y la última ubicada en la proximidad del primer exón (Fig. 19E). Adicional a estas tres secuencias blanco, se identificaron otras dos en regiones intrónicas que no son 100% idénticas, pero posiblemente podrían ser reconocidas por Stat3 (Fig. 19E).



**Figura 19. Ubicación de secuencias de reconocimiento para Stat3 en Oct4.** A) Secuencia motivo para Stat3. B) Ubicación aproximada de Oct4 en el genoma del ratón. La secuencia motivo de Stat3 fue ubicada en: C) el *enhancer* de Oct4, D) la región promotora, en ambos esquemas la ubicación real o aproximada esta resaltada con una línea punteada. En E) se muestran en naranja la secuencia motivo para Stat3 cercana al primer exón de Oct4. De manera adicional se muestran en amarillo dos secuencias en regiones intrónicas candidatas a ser reconocidas por Stat3.

## 7 DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En este trabajo se determinó el posible papel de la PRL en la pluripotencia en mESC en distintas condiciones de cultivo, con la finalidad de explorar las señales que regulan la transición entre los diversos estadios de pluripotencia (Chandrasekaran et al., 2017; Dahan et al., 2019; M. Li et al., 2012; P. Yang et al., 2019; Ying & Smith, 2017).

Desde su descubrimiento, las mESC han demostrado su capacidad de mimetizar identidades de pluripotencia similares a lo observado desde el periodo pre- hasta post-implantación, ofreciendo una alternativa extraordinaria de modelaje embrionario (Beccari et al., 2018; Harrison et al., 2017; Nichols & Smith, 2009; Warmflash, 2017). Por otra parte, el posible impacto de la PRL durante el desarrollo embrionario ha sido poco estudiado. No obstante, se le ha asociado con la progresión de la etapa de dos células hacia la generación del blastocito en ratón, la regulación de la pluripotencia de *N. vison* y *M. musculus* así como ser un factor clave en la diapausa, proceso que involucra la inmersión de las células pluripotentes a un estadio inactivado (I. A. Polejaeva et al., 1997; Sellers et al., 2018; Yohkaichiya et al., 1988).

La pluripotencia “naive” ha sido estrechamente relacionada a nivel molecular con el epiblasto inactivo durante la diapausa (Boroviak et al., 2015; Chandrasekaran et al., 2017; Hackett & Surani, 2014). De esta forma, como un primer objetivo, se establecieron las condiciones de cultivo para mantener a las mESC en dicha identidad. Para ello, la línea R1 se cultivó en condiciones metaestables (estadio de pluripotencia de partida), la cual presentó marcas nucleares positivas para la triada de pluripotencia y una capacidad de diferenciación multilínea. Características que en conjunto sugieren la presencia de células pluripotentes aptas para el cambio hacia la identidad “naive” (Fig. 10).

Las células al ser adaptadas a la condición 2i adquirieron una morfología semiesférica, con bordes bien definidos, propiedades que han sido empleadas como un primer indicador de la identidad “naive” (Fig. 11 y 12). No obstante, la morfología es insuficiente para caracterizar poblaciones pluripotentes. Por ello, se realizaron distintas evaluaciones a nivel molecular y funcional que permitieran profundizar en su caracterización (Nichols & Smith, 2009; Ying et al., 2008). Inicialmente, se determinó el mantenimiento de la triada de pluripotencia, tanto a nivel de RNA como de proteína y la presencia de FA en condiciones NB2i y KO2i (Fig. 13C y 14 A-B). Asimismo, se observó una mayor proliferación celular en comparación con estadios de pluripotencia posteriores (Fig. 13B). Dicho hallazgo concuerda con los requerimientos metabólicos durante etapas como la mórula y el blastocito, en donde se da la expansión de la población pluripotente en cortos periodos de tiempo (Chandrasekaran et al., 2017; Dahan et al., 2019; Nichols & Smith, 2009; Ying et al., 2008).

De manera adicional, observamos una uniformidad para la marca de Nanog (acompañado de E-cadherina en la membrana celular) en nuestros experimentos, ya sea tanto en las condiciones NB2i como KO2i (Fig. 14B), lo que sugiere el cambio de identidad requerido para el establecimiento de la condición “naive” (Silva et al., 2009; P. Yang et al., 2019). Característica de gran importancia reportada en la literatura, ya que niveles altos de esta proteína están asociados con el remodelamiento de la cromatina y el paisaje epigenético necesarios para el estadio de pluripotencia más primitivo descrito hasta el momento. Dato que contrasta drásticamente con la heterogeneidad que se observa en mESCs en condición metaestable (Fig. 14), en donde no encontramos una sincronía y homogeneidad en la expresión de genes asociados con la pluripotencia, sugiriendo una

fluctuación constante en las redes moleculares que la mantienen y haciéndolas más propensas a diferenciarse de manera espontánea (Munoz Descalzo, Rue, Garcia-Ojalvo, & Martinez Arias, 2012; Silva et al., 2009; P. Yang et al., 2019). Asimismo, en nuestros cultivos observamos la existencia de múltiples colonias positivas para Klf4 y Tfap2c (Fig. 14C), marcadores asociadas con la ICM y la pluripotencia “naive” (Macfarlan et al., 2012; Silva et al., 2008; Silva et al., 2009; P. Yang et al., 2019). Dichas marcas fueron más frecuentes en la condición NB2i contrastando con la escasa marca en la condición KO2i y casi ausente en la metaestable (Fig. 14C). Dichos hallazgos demuestran la capacidad de la condición NB2i para mantener un estadio “naive”, lo cual concuerda a lo reportado en trabajos previos (Silva et al., 2009; P. Yang et al., 2019; Ying et al., 2008). Cabe mencionar que la conversión entre identidades pluripotentes (desde “naive” a “primed”) es posible debido a la plasticidad e inexistencia de fronteras entre ellas.

Como se ha descrito, la pluripotencia es un periodo efímero y transitorio en el cual el paisaje epigenético juega un papel clave en el establecimiento de los estadios de pluripotencia (Jaenisch & Young, 2008; M. Li et al., 2012; P. Yang et al., 2019). Después de la activación del ZGA durante el desarrollo en el ratón, la desacetilación y metilación de histonas conlleva a la formación de una cromatina represiva que limita la transcripción durante la etapa de 2C (Ma, Svoboda, Schultz, & Stein, 2001; Wiekowski, Miranda, Nothias, & DePamphilis, 1997), en donde se han reportado altos niveles de H3K4me3 y acetilaciones en H3 y H4 (Macfarlan et al., 2012). Dicho ambiente, fue similar a lo que encontramos en nuestras condiciones “naive” para H3k4me3, H3K27me3, H3k9ac y H3k27ac, las cuales presentaron una distribución uniforme y mayor intensidad que lo observado en células metaestables (Fig. 15). Estos datos sugieren la existencia de diversos códigos de histonas entre las identidades celulares establecidas, característica que podría ser responsable de una regulación molecular y por lo tanto funcional entre las condiciones “naive” y metaestable, lo cual podría estar asociado con la obtención *in vitro* de identidades epigenéticas específicas de los estadios tempranos del desarrollo capaces de recapitular eventos similares a lo observado durante la ZGA en la etapa de 2C.

Con los resultados obtenidos se puede sugerir el establecimiento de un protocolo de cultivo basado en reportes previos, capaz de mantener a las mESC en condiciones “naive”. Corroborado por las características morfológicas, moleculares y funcionales descritas previamente. Sin embargo, es necesario destacar que la evaluación de RNAm de factores involucrados en la pluripotencia se realizó solo en la condición NB2i (Fig. 13C), ya que a lo largo del estudio mostró tener una mayor reproducibilidad y ser más similar a lo reportado previamente en la literatura en comparación a la condición con KOSR2i, sugiriendo ser un mejor protocolo para replicar la identidad pre-implantación. Asimismo, para confirmar la identidad de las células obtenidas en ambos protocolos es necesario realizar ensayos a futuro como la formación de teratomas y quimeras, lo cual arrojará evidencia de su funcionalidad, ya que las células “naive” presentan un mayor porcentaje de formación de quimeras y mayor homogeneidad en su diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro* (Alsanie et al., 2017; Cohen et al., 2018; Lee et al., 2017).

Por lo que se refiere al receptor de PRL, no se encuentra bien caracterizado durante el desarrollo embrionario y, en células pluripotentes, se desconoce su presencia. En este estudio se mostró que las células metaestables y “naive” son positivas a dicho receptor, presentando una distribución más homogénea y definida en la última condición (Fig. 16), lo cual alude a un papel en el establecimiento de la esencia “naive”, posiblemente mediante la regulación de señales externas generadas por

diversas citosinas como LIF e incluso proteínas de la familia lactogénica (Nichols et al., 2001; Sinha, 1995; Weinberger, Ayyash, Novershtern, & Hanna, 2016; Ying & Smith, 2017). Asimismo, sugiere que la PRL no solo regula aspectos asociados con la implantación del blastocito como se ha reportado previamente (Mead, 1993; Murphy, 1979; Murphy, Concannon, Travis, & Hansel, 1981; Ptak et al., 2012), sino que también tendría implicaciones directas en la regulación del estadio pluripotente. De esta forma, resulta interesante evaluar a mayor detalle, el mecanismo por el cual participa durante el establecimiento de la diapausa, no a nivel de útero e implantación, si no a nivel del embrión y su población pluripotente.

Por otra parte, la necesidad de identificar moléculas específicas de cada estadio de pluripotencia es importante para establecer marcadores de identidad. Determinar tales factores permitirá caracterizar la exclusividad que se puede observar en el estadio “*naive*”, naturalmente presente en el ratón en contraste con el humano, en el cual se necesita de cocteles moleculares complejos para su establecimiento controversial (Avila-Gonzalez et al., 2016; Warrier, Popovic, Van der Jeught, & Heindryckx, 2016). Nosotros mostramos que las células “*naive*” adquieren una gran homogeneidad en cuanto al receptor de PRL. En contraste, algunas células metaestables fueron negativas (Fig. 16) y de forma interesante, las ESC humanas H9, representativas de un estadio “*primed*”, no presentan el receptor (Anexo 3). Estos hallazgos sugieren un gradiente del receptor progresivamente menor conforme avanza la diferenciación. Además, surge la cuestión de un posible papel especie-específico del complejo formado por la hormona y su receptor durante el desarrollo embrionario temprano, que podría estar asociado con la adquisición y/o mantenimiento de la pluripotencia “*naive*”, insinuando mecanismos evolutivos particulares de cada especie que sustentan el desarrollo embrionario y por lo tanto el establecimiento de poblaciones transitorias específicas (Boroviak & Nichols, 2017). Hipótesis que deben de ser resueltas en estudios futuros.

Asimismo, la presencia del receptor cimienta las bases para una posible interacción de la PRL con estadios embrionarios tempranos. Razón por la cual, se evaluó el efecto de la hormona en la triada de pluripotencia. De forma interesante, observamos que después de cinco días de tratamiento en ausencia de LIF, la PRL fue capaz de mantener niveles de Oct4 y Sox2 similares al control (Fig. 17). Ambos FT son claves en la pluripotencia y su regulación diferencial puede desencadenar que el circuito pierda estabilidad y culmine en la diferenciación celular (Masui et al., 2007; Nakatake et al., 2006; Niwa et al., 2000; Palmieri et al., 1994; S. Zhang & Cui, 2014). Los datos obtenidos en este estudio sugieren un posible papel de la hormona sobre el circuito de pluripotencia. Dicha hipótesis fue reforzada por los datos de los análisis clonales y la tinción con la enzima FA. Debido a que la dinámica de pérdida y recuperación de las colonias FA + con los tratamientos de PRL (0.2nM y 0.4nM) a lo largo de diez pases (Fig.18), podría estar asociada con un mecanismo similar a la diapausa, al activar ciertas colonias (Oct4 y Sox2 positivas) capaces de responder a la estimulación con la hormona en la población metaestable (Chandrasekaran et al., 2017; J. Hanna et al., 2009; P. Yang et al., 2019).

Finalmente, la existencia de mecanismos comunes río abajo del receptor de PRL y LIF dio las bases para iniciar a explorar la maquinaria molecular que posiblemente regule el impacto de la PRL sobre la pluripotencia. Como punto de partida se eligió a Stat3 (proteína con actividad de FT), ampliamente conocida por su papel crucial en el mantenimiento de la pluripotencia mediante LIF, además de ser un blanco principal de la PRL en múltiples procesos; con lo cual se obtuvo un punto de convergencia entre la señalización de LIF y de la hormona (Bole-Feysot et al., 1998; Martello et

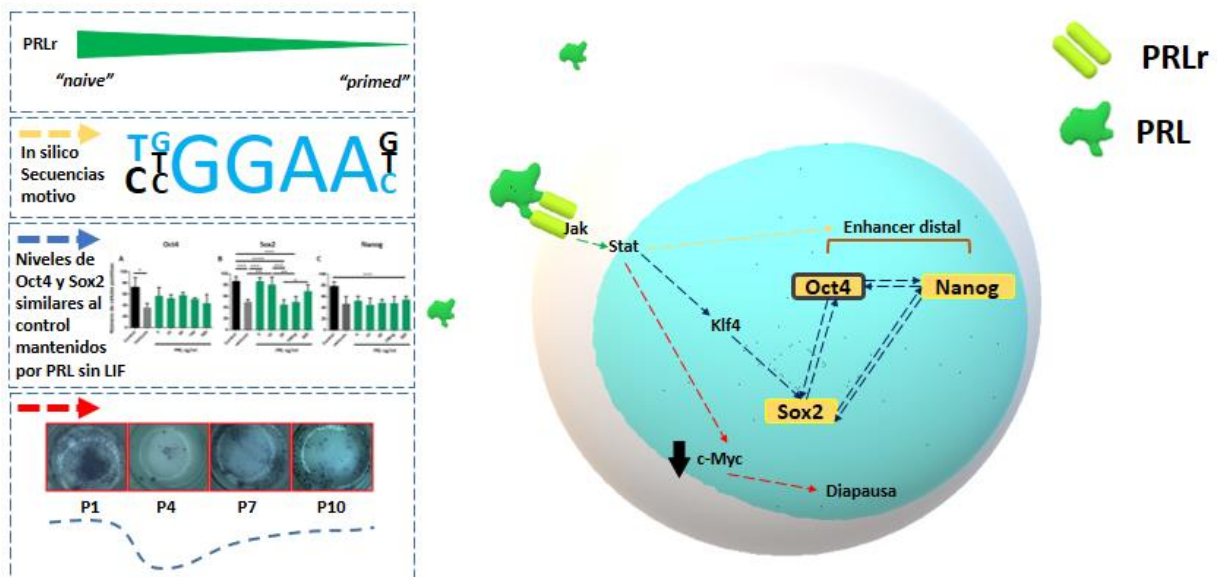
al., 2013; Niwa et al., 1998; Niwa et al., 2009). De forma atrayente, Stat3 presentó sitios probables de interacción con la secuencia de Oct4 en el *enhancer*, promotor y regiones intergénicas asociadas con intrones (Fig. 19), sugiriendo regiones capaces de responder a la estimulación de Stat3 después de la activación del complejo formado por la PLR y su receptor. Dicha secuencia de reconocimiento (TGGGAAC) fue corroborada experimentalmente mediante ChIP-seq al determinar los motivos de unión de Stat3 en células Th17 durante su diferenciación. Dentro de los múltiples motivos reportados, se encontró dicha secuencia de reconocimiento, además de dos motivos similares a las dos secuencias intrónicas que fueron candidatas para la asociación con Stat3 (Tripathi et al., 2017). De acuerdo con nuestros resultados, Do y colaboradores (2013) demostraron que la activación del receptor de LIF activa a Jak1, el cual a su vez promueve la activación de Stat3 y su translocación al núcleo en donde activa a los *enhancers* distales de Oct4 y Nanog (Fig. 20), regulando de esta forma el mantenimiento de la pluripotencia *in vitro* en mESC, iPSCs e inclusive en el embrión pre-implantación (Do et al., 2013).

Por otra parte, se ha reportado que la estimulación de Stat3 conlleva a una activación de Klf4 (Fig. 20) con lo cual incrementa la capacidad clonal y el mantenimiento indiferenciado de mESC, así como su capacidad de reprogramación al estadio “*naive*” debido a su interacción con el *core* de pluripotencia a través de Oct4 y Sox2 (Hall et al., 2009; Nakatake et al., 2006). Dichos mecanismos podrían ser los responsables del efecto observado de la PRL en nuestras condiciones, regulando la estabilidad del circuito de pluripotencia y promoviendo el mantenimiento de esta propiedad en ausencia de LIF (Fig. 20). Asimismo, la interacción de Stat3 con c-Myc ha sido asociada con el establecimiento de la diapausa (Fig. 20), mediante el bloqueo de este último. Debido a que la disminución del oncogén ha sido relacionada con el establecimiento de una identidad pluripotente sin proliferación, la cual asemeja al epiblasto pre-implantación de embriones en diapausa. Finalmente, el KO de c-Myc permitió simular el establecimiento de la diapausa *in vitro* (Scognamiglio et al., 2016). A pesar de la obtención de estos resultados prometedores, es necesario realizar una caracterización molecular más profunda a través de técnicas como ATAC-seq, ChIP-seq, RNA-seq entre otras, las cuales nos revelarían información más detallada del posible mecanismo por el cual la PRL podría regular la pluripotencia tanto *in vivo* como *in vitro*.

Tomando en cuenta estos datos, más la evidencia de que LIF no es necesario en la pluripotencia *in vivo*, así como el papel de la PRL en el mantenimiento de la diapausa (fenómeno en el cual existe una pluripotencia en donde la proliferación es casi nula o escasa) (Nichols et al., 2001; Shu & Pei, 2016; Stewart et al., 1992), se podría sugerir a la PRL como una molécula suplementaria en los cocteles moleculares necesarios para mantener a las células pluripotentes en un nicho más similar al presente en el periodo del cual hayan sido derivadas, ya sea como sustituto de LIF en condiciones “*naive*” y metaestables, o como candidata para determinar el mecanismo que regula la suspensión biosintética que existe en la diapausa y su relación con el mantenimiento de la pluripotencia *in vitro*.

Los datos obtenidos en este estudio proponen una posible función de la PRL en la pluripotencia de mESC a corto y largo plazo. Probablemente asociado a la señalización de Stat3 en el mantenimiento de FA y la triada de pluripotencia a través de la activación de *enhancers* y promotores de dichos FTs. El protocolo “*naive*” adaptado en el laboratorio nos permitió abordar la presencia del receptor de PRL a través del periodo pluripotente desde “*naive*” a “*primed*” montando el escenario para que se explore con mayor profundidad el efecto de hormonas lactogénicas en el desarrollo embrionario temprano y la pluripotencia *in vivo* en *in vitro*. Si bien los resultados resumidos en la Fig. 20 son

prometedores y sugieren un efecto de la hormona en la pluripotencia, es necesario expandir nuestra caracterización hacia pruebas funcionales y determinar el mecanismo preciso de regulación que la PRL ejerza.



**Figura 20. Efecto de la PRL en la pluripotencia y su posible mecanismo.** Representación esquemática del efecto de la PRL en la pluripotencia a través de la regulación de Oct4 y Sox2 así como FA y los posibles mecanismos mediados por Stat3.



## 8 LITERATURA CITADA

- Adachi, K., Kopp, W., Wu, G., Heising, S., Greber, B., Stehling, M., . . . Scholer, H. R. (2018). Esrrb Unlocks Silenced Enhancers for Reprogramming to Naive Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 23(6), 900-904. doi:10.1016/j.stem.2018.11.009
- Alsanie, W. F., Niclis, J. C., Hunt, C. P., De Luzy, I. R., Penna, V., Bye, C. R., . . . Parish, C. L. (2017). Specification of murine ground state pluripotent stem cells to regional neuronal populations. *Sci Rep*, 7(1), 16001. doi:10.1038/s41598-017-16248-x
- Altshuler, A., Verbuk, M., Bhattacharya, S., Abramovich, I., Haklai, R., Hanna, J. H., . . . Shalom-Feuerstein, R. (2018). RAS Regulates the Transition from Naive to Primed Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 10(3), 1088-1101. doi:10.1016/j.stemcr.2018.01.004
- Avila-Gonzalez, D., Garcia-Lopez, G., Garcia-Castro, I. L., Flores-Herrera, H., Molina-Hernandez, A., Portillo, W., & Diaz, N. F. (2016). Capturing the ephemeral human pluripotent state. *Dev Dyn*, 245(7), 762-773. doi:10.1002/dvdy.24405
- Avila-Gonzalez, D., Vega-Hernandez, E., Regalado-Hernandez, J. C., De la Jara-Diaz, J. F., Garcia-Castro, I. L., Molina-Hernandez, A., . . . Diaz, N. F. (2015). Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos. *Stem Cell Res*, 15(2), 322-324. doi:10.1016/j.scr.2015.07.006
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17(1), 126-140. doi:10.1101/gad.224503
- Baker, C. L., & Pera, M. F. (2018). Capturing Totipotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 22(1), 25-34. doi:10.1016/j.stem.2017.12.011
- Bazan, J. F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18), 6934-6938. doi:10.1073/pnas.87.18.6934
- Beccari, L., Moris, N., Girgin, M., Turner, D. A., Baillie-Johnson, P., Cossy, A. C., . . . Arias, A. M. (2018). Multi-axial self-organization properties of mouse embryonic stem cells into gastruloids. *Nature*, 562(7726), 272-276. doi:10.1038/s41586-018-0578-0
- Bedzhov, I., Graham, S. J., Leung, C. Y., & Zernicka-Goetz, M. (2014). Developmental plasticity, cell fate specification and morphogenesis in the early mouse embryo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369(1657). doi:10.1098/rstb.2013.0538
- Bernstein, B. E., Mikkelsen, T. S., Xie, X., Kamal, M., Huebert, D. J., Cuff, J., . . . Lander, E. S. (2006). A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 125(2), 315-326. doi:10.1016/j.cell.2006.02.041
- Bewley, T. A., & Li, C. H. (1972). Circular dichroism studies on human pituitary growth hormone and ovine pituitary lactogenic hormone. *Biochemistry*, 11(5), 884-888. doi:10.1021/bi00755a030
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev*, 19(3), 225-268. doi:10.1210/edrv.19.3.0334
- Boroviak, T., Loos, R., Bertone, P., Smith, A., & Nichols, J. (2014). The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol*, 16(6), 516-528. doi:10.1038/ncb2965
- Boroviak, T., Loos, R., Lombard, P., Okahara, J., Behr, R., Sasaki, E., . . . Bertone, P. (2015). Lineage-Specific Profiling Delineates the Emergence and Progression of Naive Pluripotency in Mammalian Embryogenesis. *Dev Cell*, 35(3), 366-382. doi:10.1016/j.devcel.2015.10.011
- Boroviak, T., & Nichols, J. (2017). Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naive pluripotency. *Development*, 144(2), 175-186. doi:10.1242/dev.145177

- Bradley, A., Evans, M., Kaufman, M. H., & Robertson, E. (1984). Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, *309*(5965), 255-256. doi:10.1038/309255a0
- Brons, I. G., Smithers, L. E., Trotter, M. W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., . . . Vallier, L. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, *448*(7150), 191-195. doi:10.1038/nature05950
- Brooks, C. L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr Rev*, *33*(4), 504-525. doi:10.1210/er.2011-1040
- Bugge, K., Papaleo, E., Haxholm, G. W., Hopper, J. T., Robinson, C. V., Olsen, J. G., . . . Kragelund, B. B. (2016). A combined computational and structural model of the full-length human prolactin receptor. *Nat Commun*, *7*, 11578. doi:10.1038/ncomms11578
- Buta, C., David, R., Dressel, R., Emgard, M., Fuchs, C., Gross, U., . . . Weitzer, G. (2013). Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res*, *11*(1), 552-562. doi:10.1016/j.scr.2013.03.001
- Capecchi, M. R. (2005). Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. *Nat Rev Genet*, *6*(6), 507-512. doi:10.1038/nrg1619
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*, *113*(5), 643-655. doi:10.1016/s0092-8674(03)00392-1
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., . . . Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, *450*(7173), 1230-1234. doi:10.1038/nature06403
- Chambers, I., & Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene*, *23*(43), 7150-7160. doi:10.1038/sj.onc.1207930
- Chandrasekaran, S., Zhang, J., Sun, Z., Zhang, L., Ross, C. A., Huang, Y. C., . . . Collins, J. J. (2017). Comprehensive Mapping of Pluripotent Stem Cell Metabolism Using Dynamic Genome-Scale Network Modeling. *Cell Rep*, *21*(10), 2965-2977. doi:10.1016/j.celrep.2017.07.048
- Chazaud, C., Yamanaka, Y., Pawson, T., & Rossant, J. (2006). Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell*, *10*(5), 615-624. doi:10.1016/j.devcel.2006.02.020
- Chesnokova, V., & Melmed, S. (2002). Minireview: Neuro-immuno-endocrine modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis by gp130 signaling molecules. *Endocrinology*, *143*(5), 1571-1574. doi:10.1210/endo.143.5.8861
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F., & Weiner, R. I. (1993). The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*, *133*(3), 1292-1299. doi:10.1210/endo.133.3.7689950
- Clarke, D. L., & Linzer, D. I. (1993). Changes in prolactin receptor expression during pregnancy in the mouse ovary. *Endocrinology*, *133*(1), 224-232. doi:10.1210/endo.133.1.8319571
- Cohen, M. A., Markoulaki, S., & Jaenisch, R. (2018). Matched Developmental Timing of Donor Cells with the Host Is Crucial for Chimera Formation. *Stem Cell Reports*, *10*(5), 1445-1452. doi:10.1016/j.stemcr.2018.03.004
- Cooke, N. E., & Baxter, J. D. (1982). Structural analysis of the prolactin gene suggests a separate origin for its 5' end. *Nature*, *297*(5867), 603-606. doi:10.1038/297603a0
- Cooke, N. E., Coit, D., Shine, J., Baxter, J. D., & Martial, J. A. (1981). Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem*, *256*(8), 4007-4016.
- Dahan, P., Lu, V., Nguyen, R. M. T., Kennedy, S. A. L., & Teitell, M. A. (2019). Metabolism in pluripotency: Both driver and passenger? *J Biol Chem*, *294*(14), 5420-5429. doi:10.1074/jbc.TM117.000832

- Davis, J. A., & Linzer, D. I. (1989). Expression of multiple forms of the prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol*, 3(4), 674-680. doi:10.1210/mend-3-4-674
- De Los Angeles, A., Ferrari, F., Xi, R., Fujiwara, Y., Benvenisty, N., Deng, H., . . . Daley, G. Q. (2015). Hallmarks of pluripotency. *Nature*, 525(7570), 469-478. doi:10.1038/nature15515
- del Valle, I., Rudloff, S., Carles, A., Li, Y., Liszewska, E., Vogt, R., & Kemler, R. (2013). E-cadherin is required for the proper activation of the Lifr/Gp130 signaling pathway in mouse embryonic stem cells. *Development*, 140(8), 1684-1692. doi:10.1242/dev.088690
- Dietrich, J. E., & Hiiragi, T. (2007). Stochastic patterning in the mouse pre-implantation embryo. *Development*, 134(23), 4219-4231. doi:10.1242/dev.003798
- Do, D. V., Ueda, J., Messerschmidt, D. M., Lorthongpanich, C., Zhou, Y., Feng, B., . . . Fu, X. Y. (2013). A genetic and developmental pathway from STAT3 to the OCT4-NANOG circuit is essential for maintenance of ICM lineages in vivo. *Genes Dev*, 27(12), 1378-1390. doi:10.1101/gad.221176.113
- Eckert, D., Buhl, S., Weber, S., Jager, R., & Schorle, H. (2005). The AP-2 family of transcription factors. *Genome Biol*, 6(13), 246. doi:10.1186/gb-2005-6-13-246
- Evans, M. J. (1972). The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol*, 28(1), 163-176.
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154-156.
- Fenelon, J. C., Banerjee, A., Lefevre, P., Gratian, F., & Murphy, B. D. (2016). Polyamine-Mediated Effects of Prolactin Dictate Emergence from Mink Obligate Embryonic Diapause. *Biol Reprod*, 95(1), 6. doi:10.1095/biolreprod.116.139204
- Fenelon, J. C., Lefevre, P. L., Banerjee, A., & Murphy, B. D. (2017). Regulation of diapause in carnivores. *Reprod Domest Anim*, 52 Suppl 2, 12-17. doi:10.1111/rda.12835
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev*, 80(4), 1523-1631. doi:10.1152/physrev.2000.80.4.1523
- Fresno Vara, J. A., Caceres, M. A., Silva, A., & Martin-Perez, J. (2001). Src family kinases are required for prolactin induction of cell proliferation. *Mol Biol Cell*, 12(7), 2171-2183. doi:10.1091/mbc.12.7.2171
- Gadue, P., Huber, T. L., Paddison, P. J., & Keller, G. M. (2006). 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*, 103(45), 16806-16811. doi:10.1073/pnas.0603916103
- Gala, R. R. (1991). Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med*, 198(1), 513-527.
- Garcia-Castro, I. L., Garcia-Lopez, G., Avila-Gonzalez, D., Flores-Herrera, H., Molina-Hernandez, A., Portillo, W., . . . Diaz, N. F. (2015). Markers of Pluripotency in Human Amniotic Epithelial Cells and Their Differentiation to Progenitor of Cortical Neurons. *PLoS One*, 10(12), e0146082. doi:10.1371/journal.pone.0146082
- Garcia-Prat, L., Sousa-Victor, P., & Munoz-Canoves, P. (2017). Proteostatic and Metabolic Control of Stemness. *Cell Stem Cell*, 20(5), 593-608. doi:10.1016/j.stem.2017.04.011
- Ghimire, S., Van der Jeught, M., Neupane, J., Roost, M. S., Anckaert, J., Popovic, M., . . . Heindryckx, B. (2018). Comparative analysis of naive, primed and ground state pluripotency in mouse embryonic stem cells originating from the same genetic background. *Sci Rep*, 8(1), 5884. doi:10.1038/s41598-018-24051-5
- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P., & Kelly, P. A. (2002). Prolactin: the new biology of an old hormone. *Annu Rev Physiol*, 64, 47-67. doi:10.1146/annurev.physiol.64.081501.131049

- Grattan, D. R., & Akopian, A. N. (2016). Oscillating from Neurosecretion to Multitasking Dopamine Neurons. *Cell Rep*, *15*(4), 681-682. doi:10.1016/j.celrep.2016.04.013
- Grattan, D. R., Xu, J., McLachlan, M. J., Kokay, I. C., Bunn, S. J., Hovey, R. C., & Davey, H. W. (2001). Feedback regulation of PRL secretion is mediated by the transcription factor, signal transducer, and activator of transcription 5b. *Endocrinology*, *142*(9), 3935-3940. doi:10.1210/endo.142.9.8385
- Guo, G., Pinello, L., Han, X., Lai, S., Shen, L., Lin, T. W., . . . Orkin, S. H. (2016). Serum-Based Culture Conditions Provoke Gene Expression Variability in Mouse Embryonic Stem Cells as Revealed by Single-Cell Analysis. *Cell Rep*, *14*(4), 956-965. doi:10.1016/j.celrep.2015.12.089
- Hackett, J. A., & Surani, M. A. (2014). Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*, *15*(4), 416-430. doi:10.1016/j.stem.2014.09.015
- Haeghele, L., Ingold, B., Naumann, H., Tabatabai, G., Ledermann, B., & Brandner, S. (2003). Wnt signalling inhibits neural differentiation of embryonic stem cells by controlling bone morphogenetic protein expression. *Mol Cell Neurosci*, *24*(3), 696-708. doi:10.1016/s1044-7431(03)00232-x
- Hall, J., Guo, G., Wray, J., Eyres, I., Nichols, J., Grotewold, L., . . . Smith, A. (2009). Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Kruppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, *5*(6), 597-609. doi:10.1016/j.stem.2009.11.003
- Hamazaki, T., Oka, M., Yamanaka, S., & Terada, N. (2004). Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation. *J Cell Sci*, *117*(Pt 23), 5681-5686. doi:10.1242/jcs.01489
- Hanna, J., Cheng, A. W., Saha, K., Kim, J., Lengner, C. J., Soldner, F., . . . Jaenisch, R. (2010). Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(20), 9222-9227. doi:10.1073/pnas.1004584107
- Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A. W., Cassady, J. P., Staerk, J., . . . Jaenisch, R. (2009). Metastable pluripotent states in NOD-mouse-derived ESCs. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 513-524. doi:10.1016/j.stem.2009.04.015
- Hanna, J. H., Saha, K., & Jaenisch, R. (2010). Pluripotency and cellular reprogramming: facts, hypotheses, unresolved issues. *Cell*, *143*(4), 508-525. doi:10.1016/j.cell.2010.10.008
- Harrison, S. E., Sozen, B., Christodoulou, N., Kyprianou, C., & Zernicka-Goetz, M. (2017). Assembly of embryonic and extraembryonic stem cells to mimic embryogenesis in vitro. *Science*, *356*(6334). doi:10.1126/science.aal1810
- Hayashi, K., de Sousa Lopes, S. M. C., Tang, F., Lao, K., & Surani, M. A. (2008). Dynamic equilibrium and heterogeneity of mouse pluripotent stem cells with distinct functional and epigenetic states. *Cell Stem Cell*, *3*(4), 391-401. doi:10.1016/j.stem.2008.07.027
- Hiraoka, Y., Tatsumi, K., Shiozawa, M., Aiso, S., Fukasawa, T., Yasuda, K., & Miyai, K. (1991). A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Mol Cell Endocrinol*, *75*(1), 71-80. doi:10.1016/0303-7207(91)90247-p
- Hoffmeyer, K., Junghans, D., Kanzler, B., & Kemler, R. (2017). Trimethylation and Acetylation of beta-Catenin at Lysine 49 Represent Key Elements in ESC Pluripotency. *Cell Rep*, *18*(12), 2815-2824. doi:10.1016/j.celrep.2017.02.076
- Hosler, B. A., LaRosa, G. J., Grippo, J. F., & Gudas, L. J. (1989). Expression of REX-1, a gene containing zinc finger motifs, is rapidly reduced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, *9*(12), 5623-5629. doi:10.1128/mcb.9.12.5623
- Hu, Z., Tan, D. E. K., Chia, G., Tan, H., Leong, H. F., Chen, B. J., . . . Tee, W. W. (2020). Maternal factor NELFA drives a 2C-like state in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, *22*(2), 175-186. doi:10.1038/s41556-019-0453-8

- Huang, C., Snider, F., & Cross, J. C. (2009). Prolactin receptor is required for normal glucose homeostasis and modulation of beta-cell mass during pregnancy. *Endocrinology*, *150*(4), 1618-1626. doi:10.1210/en.2008-1003
- Huising, M. O., Kruiswijk, C. P., & Flik, G. (2006). Phylogeny and evolution of class-I helical cytokines. *J Endocrinol*, *189*(1), 1-25. doi:10.1677/joe.1.06591
- Ignacak, A., Kasztelnik, M., Sliwa, T., Korbut, R. A., Rajda, K., & Guzik, T. J. (2012). Prolactin--not only lactotrophin. A "new" view of the "old" hormone. *J Physiol Pharmacol*, *63*(5), 435-443.
- Innan, H., & Kondrashov, F. (2010). The evolution of gene duplications: classifying and distinguishing between models. *Nat Rev Genet*, *11*(2), 97-108. doi:10.1038/nrg2689
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, *132*(4), 567-582. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015
- Johnson, M. H., & McConnell, J. M. (2004). Lineage allocation and cell polarity during mouse embryogenesis. *Semin Cell Dev Biol*, *15*(5), 583-597. doi:10.1016/j.semcdb.2004.04.002
- Kahan, B. W., & Ephrussi, B. (1970). Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst*, *44*(5), 1015-1036.
- Kalkan, T., Olova, N., Roode, M., Mulas, C., Lee, H. J., Nett, I., . . . Smith, A. (2017). Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development*, *144*(7), 1221-1234. doi:10.1242/dev.142711
- Kamachi, Y., Uchikawa, M., & Kondoh, H. (2000). Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*, *16*(4), 182-187. doi:10.1016/s0168-9525(99)01955-1
- Karabulut, A. K., Layfield, R., & Pratten, M. K. (1999). The mechanism of growth-promoting effects of prolactin in embryogenesis--links to growth factors. *Cells Tissues Organs*, *164*(1), 2-13. doi:10.1159/000016637
- Katz, J. P., Perreault, N., Goldstein, B. G., Lee, C. S., Labosky, P. A., Yang, V. W., & Kaestner, K. H. (2002). The zinc-finger transcription factor Klf4 is required for terminal differentiation of goblet cells in the colon. *Development*, *129*(11), 2619-2628.
- Keller, G. (2005). Embryonic stem cell differentiation: emergence of a new era in biology and medicine. *Genes Dev*, *19*(10), 1129-1155. doi:10.1101/gad.1303605
- Kelly, P. A., Djiane, J., Postel-Vinay, M. C., & Edery, M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev*, *12*(3), 235-251. doi:10.1210/edrv-12-3-235
- Kiapekou, E., Zapanti, E., Mastorakos, G., Beretsos, P., Bletsas, R., Drakakis, P., . . . Antsaklis, A. (2006). Effect of prolactin in the absence of hCG on maturation, fertilization, and embryonic development of in vitro matured mouse oocytes. *Ann N Y Acad Sci*, *1092*, 450-459. doi:10.1196/annals.1365.044
- Kinet, V., Nguyen, N. Q., Sabatel, C., Blacher, S., Noel, A., Martial, J. A., & Struman, I. (2009). Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth. *Cancer Lett*, *284*(2), 222-228. doi:10.1016/j.canlet.2009.04.030
- Konishi, R., Nakano, T., & Yamaguchi, S. (2018). Distinct requirements for the maintenance and establishment of mouse embryonic stem cells. *Stem Cell Res*, *31*, 55-61. doi:10.1016/j.scr.2018.07.005
- Kuckenbergh, P., Kubaczka, C., & Schorle, H. (2012). The role of transcription factor Tcfap2c/TFAP2C in trophoblast development. *Reprod Biomed Online*, *25*(1), 12-20. doi:10.1016/j.rbmo.2012.02.015
- Kuz'mina, T. I., Lebedeva, I., Torner, H., & Alm, H. (2001). [Effect of prolactin in different culture systems on maturation of bovine oocytes and their ability for further development]. *Ontogenez*, *32*(2), 140-147.

- Lee, J. H., Laronde, S., Collins, T. J., Shapovalova, Z., Tanasijevic, B., McNicol, J. D., . . . Bhatia, M. (2017). Lineage-Specific Differentiation Is Influenced by State of Human Pluripotency. *Cell Rep*, *19*(1), 20-35. doi:10.1016/j.celrep.2017.03.036
- Li, M., Liu, G. H., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *13*(8), 524-535. doi:10.1038/nrm3393
- Li, Y., McClintick, J., Zhong, L., Edenberg, H. J., Yoder, M. C., & Chan, R. J. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOCS-3 and inhibited by the zinc finger transcription factor Klf4. *Blood*, *105*(2), 635-637. doi:10.1182/blood-2004-07-2681
- Ling, C., Svensson, L., Oden, B., Weijdegard, B., Eden, B., Eden, S., & Billig, H. (2003). Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab*, *88*(4), 1804-1808. doi:10.1210/jc.2002-021137
- Ma, J., Svoboda, P., Schultz, R. M., & Stein, P. (2001). Regulation of zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo: global activation and repression of gene expression. *Biol Reprod*, *64*(6), 1713-1721. doi:10.1095/biolreprod64.6.1713
- Macfarlan, T. S., Gifford, W. D., Driscoll, S., Lettieri, K., Rowe, H. M., Bonanomi, D., . . . Pfaff, S. L. (2012). Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature*, *487*(7405), 57-63. doi:10.1038/nature11244
- Marano, R. J., & Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol Endocrinol*, *28*(5), 622-633. doi:10.1210/me.2013-1349
- Margueron, R., Trojer, P., & Reinberg, D. (2005). The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*, *15*(2), 163-176. doi:10.1016/j.gde.2005.01.005
- Marks, H., Kalkan, T., Menafra, R., Denissov, S., Jones, K., Hofemeister, H., . . . Stunnenberg, H. G. (2012). The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell*, *149*(3), 590-604. doi:10.1016/j.cell.2012.03.026
- Martello, G., Bertone, P., & Smith, A. (2013). Identification of the missing pluripotency mediator downstream of leukaemia inhibitory factor. *EMBO J*, *32*(19), 2561-2574. doi:10.1038/emboj.2013.177
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *78*(12), 7634-7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., . . . Niwa, H. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, *9*(6), 625-635. doi:10.1038/ncb1589
- Matsui, Y., Toksoz, D., Nishikawa, S., Nishikawa, S., Williams, D., Zsebo, K., & Hogan, B. L. (1991). Effect of Steel factor and leukaemia inhibitory factor on murine primordial germ cells in culture. *Nature*, *353*(6346), 750-752. doi:10.1038/353750a0
- Matsui, Y., Zsebo, K., & Hogan, B. L. (1992). Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, *70*(5), 841-847. doi:10.1016/0092-8674(92)90317-6
- Mead, R. A. (1993). Embryonic diapause in vertebrates. *J Exp Zool*, *266*(6), 629-641. doi:10.1002/jez.1402660611
- Mendoza, C., Cremades, N., Ruiz-Requena, E., Martinez, F., Ortega, E., Bernabeu, S., & Tesarik, J. (1999). Relationship between fertilization results after intracytoplasmic sperm injection, and intrafollicular steroid, pituitary hormone and cytokine concentrations. *Hum Reprod*, *14*(3), 628-635.

- Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., . . . Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*, *113*(5), 631-642. doi:10.1016/s0092-8674(03)00393-3
- Munoz Descalzo, S., Rue, P., Garcia-Ojalvo, J., & Martinez Arias, A. (2012). Correlations between the levels of Oct4 and Nanog as a signature for naive pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*, *30*(12), 2683-2691. doi:10.1002/stem.1230
- Murphy, B. D. (1979). The role of prolactin in implantation and luteal maintenance in the ferret. *Biol Reprod*, *21*(2), 517-521. doi:10.1095/biolreprod21.2.517
- Murphy, B. D., Concannon, P. W., Travis, H. F., & Hansel, W. (1981). Prolactin: the hypophyseal factor that terminates embryonic diapause in mink. *Biol Reprod*, *25*(3), 487-491. doi:10.1095/biolreprod25.3.487
- Nagy, A., Rossant, J., Nagy, R., Abramow-Newerly, W., & Roder, J. C. (1993). Derivation of completely cell culture-derived mice from early-passage embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(18), 8424-8428.
- Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., . . . Niwa, H. (2006). Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, *26*(20), 7772-7782. doi:10.1128/MCB.00468-06
- Ng, H. H., & Surani, M. A. (2011). The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol*, *13*(5), 490-496. doi:10.1038/ncb0511-490
- Niall, H. D., Hogan, M. L., Sauer, R., Rosenblum, I. Y., & Greenwood, F. C. (1971). Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68*(4), 866-870.
- Nichols, J., Chambers, I., Taga, T., & Smith, A. (2001). Physiological rationale for responsiveness of mouse embryonic stem cells to gp130 cytokines. *Development*, *128*(12), 2333-2339.
- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, *4*(6), 487-492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015
- Nichols, J., & Smith, A. (2012). Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *4*(8), a008128. doi:10.1101/cshperspect.a008128
- Niwa, H. (2018). The principles that govern transcription factor network functions in stem cells. *Development*, *145*(6). doi:10.1242/dev.157420
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, *12*(13), 2048-2060. doi:10.1101/gad.12.13.2048
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, *24*(4), 372-376. doi:10.1038/74199
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, *460*(7251), 118-122. doi:10.1038/nature08113
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. (2005). Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. *Cell*, *123*(5), 917-929. doi:10.1016/j.cell.2005.08.040
- Ocampo Daza, D., & Larhammar, D. (2018). Evolution of the growth hormone, prolactin, prolactin 2 and somatolactin family. *Gen Comp Endocrinol*, *264*, 94-112. doi:10.1016/j.ygcen.2018.01.007
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, *448*(7151), 313-317. doi:10.1038/nature05934

- Onishi, K., & Zandstra, P. W. (2015). LIF signaling in stem cells and development. *Development*, *142*(13), 2230-2236. doi:10.1242/dev.117598
- Palmieri, S. L., Peter, W., Hess, H., & Scholer, H. R. (1994). Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*, *166*(1), 259-267. doi:10.1006/dbio.1994.1312
- Parsons, S. J., & Parsons, J. T. (2004). Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*, *23*(48), 7906-7909. doi:10.1038/sj.onc.1208160
- Polejaeva, I., & Mitalipov, S. (2013). Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms. *Reproduction*, *145*(3), R81-88. doi:10.1530/REP-12-0396
- Polejaeva, I. A., Reed, W. A., Bunch, T. D., Ellis, L. C., & White, K. L. (1997). Prolactin-induced termination of obligate diapause of mink (*Mustela vison*) blastocysts in vitro and subsequent establishment of embryonic stem-like cells. *J Reprod Fertil*, *109*(2), 229-236.
- Ptak, G. E., Tacconi, E., Czernik, M., Toschi, P., Modlinski, J. A., & Loi, P. (2012). Embryonic diapause is conserved across mammals. *PLoS One*, *7*(3), e33027. doi:10.1371/journal.pone.0033027
- Qi, X., Li, T. G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., . . . Zhao, G. Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(16), 6027-6032. doi:10.1073/pnas.0401367101
- Reik, W., Dean, W., & Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, *293*(5532), 1089-1093. doi:10.1126/science.1063443
- Rogers, M. B., Hosler, B. A., & Gudas, L. J. (1991). Specific expression of a retinoic acid-regulated, zinc-finger gene, Rex-1, in preimplantation embryos, trophoblast and spermatocytes. *Development*, *113*(3), 815-824.
- Rojas-Duran, F., Pascual-Mathey, L. I., Serrano, K., Aranda-Abreu, G. E., Manzo, J., Soto-Cid, A. H., & Hernandez, M. E. (2015). Correlation of prolactin levels and PRL-receptor expression with Stat and Mapk cell signaling in the prostate of long-term sexually active rats. *Physiol Behav*, *138*, 188-192. doi:10.1016/j.physbeh.2014.10.036
- Rozakis-Adcock, M., & Kelly, P. A. (1991). Mutational analysis of the ligand-binding domain of the prolactin receptor. *J Biol Chem*, *266*(25), 16472-16477.
- Rozakis-Adcock, M., & Kelly, P. A. (1992). Identification of ligand binding determinants of the prolactin receptor. *J Biol Chem*, *267*(11), 7428-7433.
- Saiz, N., & Plusa, B. (2013). Early cell fate decisions in the mouse embryo. *Reproduction*, *145*(3), R65-80. doi:10.1530/REP-12-0381
- Scadden, D. T. (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*, *441*(7097), 1075-1079. doi:10.1038/nature04957
- Schemmer, J., Arauzo-Bravo, M. J., Haas, N., Schafer, S., Weber, S. N., Becker, A., . . . Schorle, H. (2013). Transcription factor TFAP2C regulates major programs required for murine fetal germ cell maintenance and haploinsufficiency predisposes to teratomas in male mice. *PLoS One*, *8*(8), e71113. doi:10.1371/journal.pone.0071113
- Scognamiglio, R., Cabezas-Wallscheid, N., Thier, M. C., Altamura, S., Reyes, A., Prendergast, A. M., . . . Trumpp, A. (2016). Myc Depletion Induces a Pluripotent Dormant State Mimicking Diapause. *Cell*, *164*(4), 668-680. doi:10.1016/j.cell.2015.12.033
- Segre, J. A., Bauer, C., & Fuchs, E. (1999). Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet*, *22*(4), 356-360. doi:10.1038/11926
- Sellers, Z. P., Bujko, K., Schneider, G., Kucia, M., & Ratajczak, M. Z. (2018). Novel evidence that pituitary sex hormones regulate migration, adhesion, and proliferation of embryonic stem cells and teratocarcinoma cells. *Oncol Rep*, *39*(2), 851-859. doi:10.3892/or.2017.6108
- Shahbazi, M. N., & Zernicka-Goetz, M. (2018). Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo. *Nat Cell Biol*, *20*(8), 878-887. doi:10.1038/s41556-018-0144-x



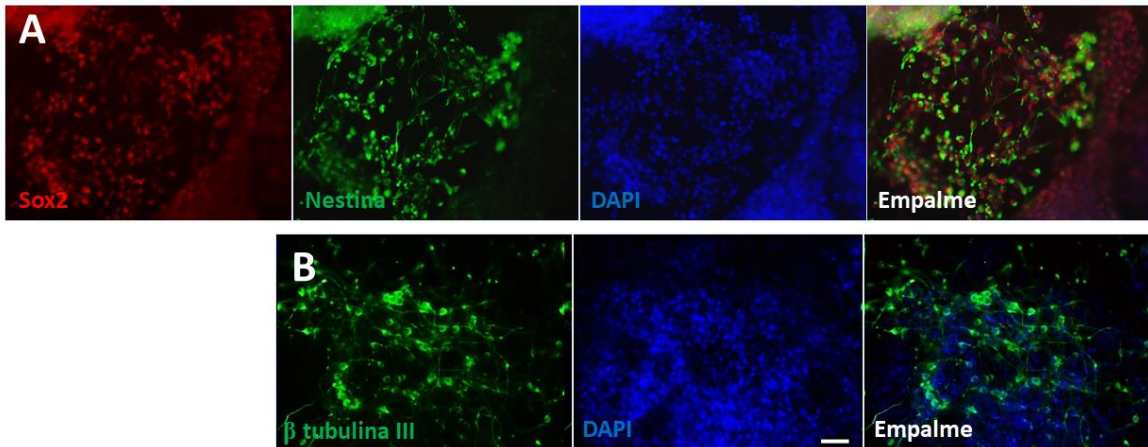
- Shevde, N. (2012). Stem Cells: Flexible friends. *Nature*, *483*(7387), S22-26. doi:10.1038/483S22a
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y., & Pei, D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem*, *281*(33), 23319-23325. doi:10.1074/jbc.M601811200
- Shields, J. M., Christy, R. J., & Yang, V. W. (1996). Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem*, *271*(33), 20009-20017. doi:10.1074/jbc.271.33.20009
- Shirota, M., Banville, D., Ali, S., Jolicoeur, C., Boutin, J. M., Edery, M., . . . Kelly, P. A. (1990). Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol Endocrinol*, *4*(8), 1136-1143. doi:10.1210/mend-4-8-1136
- Shu, X., & Pei, D. (2016). Pluripotency without Proliferation. *Cell*, *164*(4), 595-597. doi:10.1016/j.cell.2016.01.050
- Shyh-Chang, N., Locasale, J. W., Lyssiotis, C. A., Zheng, Y., Teo, R. Y., Ratanasirintrao, S., . . . Cantley, L. C. (2013). Influence of threonine metabolism on S-adenosylmethionine and histone methylation. *Science*, *339*(6116), 222-226. doi:10.1126/science.1226603
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T. W., & Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol*, *6*(10), e253. doi:10.1371/journal.pbio.0060253
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., . . . Smith, A. (2009). Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, *138*(4), 722-737. doi:10.1016/j.cell.2009.07.039
- Singh, A. M., Hamazaki, T., Hankowski, K. E., & Terada, N. (2007). A heterogeneous expression pattern for Nanog in embryonic stem cells. *Stem Cells*, *25*(10), 2534-2542. doi:10.1634/stemcells.2007-0126
- Sinha, Y. N. (1995). Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev*, *16*(3), 354-369. doi:10.1210/edrv-16-3-354
- Skene, P. J., & Henikoff, S. (2013). Histone variants in pluripotency and disease. *Development*, *140*(12), 2513-2524. doi:10.1242/dev.091439
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, *336*(6200), 688-690. doi:10.1038/336688a0
- Sozen, B., Amadei, G., Cox, A., Wang, R., Na, E., Czukiewska, S., . . . Zernicka-Goetz, M. (2018). Self-assembly of embryonic and two extra-embryonic stem cell types into gastrulating embryo-like structures. *Nat Cell Biol*, *20*(8), 979-989. doi:10.1038/s41556-018-0147-7
- Stevens, L. C., & Little, C. C. (1954). Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *40*(11), 1080-1087. doi:10.1073/pnas.40.11.1080
- Stewart, C. L., Kaspar, P., Brunet, L. J., Bhatt, H., Gadi, I., Kontgen, F., & Abbondanzo, S. J. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*, *359*(6390), 76-79. doi:10.1038/359076a0
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tanaka, M., Hayashida, Y., Iguchi, T., Nakao, N., Suzuki, M., Nakai, N., & Nakashima, K. (2002). Identification of a novel first exon of prolactin receptor gene expressed in the rat brain. *Endocrinology*, *143*(6), 2080-2084. doi:10.1210/endo.143.6.8826
- Tarkowski, A. K., Suwinska, A., Czolowska, R., & Ozdzinski, W. (2010). Individual blastomeres of 16- and 32-cell mouse embryos are able to develop into fetuses and mice. *Dev Biol*, *348*(2), 190-198. doi:10.1016/j.ydbio.2010.09.022

- Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., . . . McKay, R. D. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, *448*(7150), 196-199. doi:10.1038/nature05972
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *282*(5391), 1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
- Toyooka, Y., Shimosato, D., Murakami, K., Takahashi, K., & Niwa, H. (2008). Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development*, *135*(5), 909-918. doi:10.1242/dev.017400
- Tripathi, S. K., Chen, Z., Larjo, A., Kanduri, K., Nousiainen, K., Aijo, T., . . . Lahesmaa, R. (2017). Genome-wide Analysis of STAT3-Mediated Transcription during Early Human Th17 Cell Differentiation. *Cell Rep*, *19*(9), 1888-1901. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.013
- Turner, D. A., Girgin, M., Alonso-Crisostomo, L., Trivedi, V., Baillie-Johnson, P., Glodowski, C. R., . . . Arias, A. M. (2017). Anteroposterior polarity and elongation in the absence of extra-embryonic tissues and of spatially localised signalling in gastruloids: mammalian embryonic organoids. *Development*, *144*(21), 3894-3906. doi:10.1242/dev.150391
- van den Brink, S. C., Baillie-Johnson, P., Balayo, T., Hadjantonakis, A. K., Nowotschin, S., Turner, D. A., & Martinez Arias, A. (2014). Symmetry breaking, germ layer specification and axial organisation in aggregates of mouse embryonic stem cells. *Development*, *141*(22), 4231-4242. doi:10.1242/dev.113001
- Wallis, M. (2000). Episodic evolution of protein hormones: molecular evolution of pituitary prolactin. *J Mol Evol*, *50*(5), 465-473. doi:10.1007/s002390010049
- Warmflash, A. (2017). Synthetic Embryos: Windows into Mammalian Development. *Cell Stem Cell*, *20*(5), 581-582. doi:10.1016/j.stem.2017.04.001
- Warrier, S., Popovic, M., Van der Jeught, M., & Heindryckx, B. (2016). Establishment and Characterization of Naive Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*, *1516*, 13-46. doi:10.1007/7651\_2016\_347
- Weinberger, L., Ayyash, M., Novershtern, N., & Hanna, J. H. (2016). Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *17*(3), 155-169. doi:10.1038/nrm.2015.28
- Wen, D., Saiz, N., Rosenwaks, Z., Hadjantonakis, A. K., & Rafii, S. (2014). Completely ES cell-derived mice produced by tetraploid complementation using inner cell mass (ICM) deficient blastocysts. *PLoS One*, *9*(4), e94730. doi:10.1371/journal.pone.0094730
- Werling, U., & Schorle, H. (2002). Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development. *Mol Cell Biol*, *22*(9), 3149-3156. doi:10.1128/mcb.22.9.3149-3156.2002
- Wiekowski, M., Miranda, M., Nothias, J. Y., & DePamphilis, M. L. (1997). Changes in histone synthesis and modification at the beginning of mouse development correlate with the establishment of chromatin mediated repression of transcription. *J Cell Sci*, *110* ( Pt 10), 1147-1158.
- Wiemers, D. O., Shao, L. J., Ain, R., Dai, G., & Soares, M. J. (2003). The mouse prolactin gene family locus. *Endocrinology*, *144*(1), 313-325. doi:10.1210/en.2002-220724
- Winger, Q., Huang, J., Auman, H. J., Lewandoski, M., & Williams, T. (2006). Analysis of transcription factor AP-2 expression and function during mouse preimplantation development. *Biol Reprod*, *75*(3), 324-333. doi:10.1095/biolreprod.106.052407
- Wu, J., & Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Dynamic Pluripotent Stem Cell States and Their Applications. *Cell Stem Cell*, *17*(5), 509-525. doi:10.1016/j.stem.2015.10.009

- Xue, Z., Huang, K., Cai, C., Cai, L., Jiang, C. Y., Feng, Y., . . . Fan, G. (2013). Genetic programs in human and mouse early embryos revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature*, *500*(7464), 593-597. doi:10.1038/nature12364
- Yamanaka, Y., Ralston, A., Stephenson, R. O., & Rossant, J. (2006). Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*, *235*(9), 2301-2314. doi:10.1002/dvdy.20844
- Yang, P., Humphrey, S. J., Cinghu, S., Pathania, R., Oldfield, A. J., Kumar, D., . . . Jothi, R. (2019). Multi-omic Profiling Reveals Dynamics of the Phased Progression of Pluripotency. *Cell Syst*, *8*(5), 427-445 e410. doi:10.1016/j.cels.2019.03.012
- Yang, S. H., Kalkan, T., Morissroe, C., Marks, H., Stunnenberg, H., Smith, A., & Sharrocks, A. D. (2014). Otx2 and Oct4 drive early enhancer activation during embryonic stem cell transition from naive pluripotency. *Cell Rep*, *7*(6), 1968-1981. doi:10.1016/j.celrep.2014.05.037
- Yeom, Y. I., Fuhrmann, G., Ovitt, C. E., Brehm, A., Ohbo, K., Gross, M., . . . Scholer, H. R. (1996). Germline regulatory element of Oct-4 specific for the totipotent cycle of embryonal cells. *Development*, *122*(3), 881-894.
- Yin, X., Mead, B. E., Safaee, H., Langer, R., Karp, J. M., & Levy, O. (2016). Engineering Stem Cell Organoids. *Cell Stem Cell*, *18*(1), 25-38. doi:10.1016/j.stem.2015.12.005
- Ying, Q. L., & Smith, A. (2017). The Art of Capturing Pluripotency: Creating the Right Culture. *Stem Cell Reports*, *8*(6), 1457-1464. doi:10.1016/j.stemcr.2017.05.020
- Ying, Q. L., & Smith, A. G. (2003). Defined conditions for neural commitment and differentiation. *Methods Enzymol*, *365*, 327-341. doi:10.1016/s0076-6879(03)65023-8
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., . . . Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, *453*(7194), 519-523. doi:10.1038/nature06968
- Yohkaichiya, T., Fukaya, T., Hoshiai, H., & Yajima, A. (1988). Improvement of mouse embryo development in vitro by prolactin. *Tohoku J Exp Med*, *155*(3), 241-246. doi:10.1620/tjem.155.241
- Yoshimura, Y., Hosoi, Y., Iritani, A., Nakamura, Y., Atlas, S. J., & Wallach, E. E. (1989). Developmental potential of rabbit oocyte matured in vitro: the possible contribution of prolactin. *Biol Reprod*, *41*(1), 26-33. doi:10.1095/biolreprod41.1.26
- Zhang, S., & Cui, W. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World J Stem Cells*, *6*(3), 305-311. doi:10.4252/wjsc.v6.i3.305
- Zhang, W., & Liu, H. T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res*, *12*(1), 9-18. doi:10.1038/sj.cr.7290105
- Zhou, L. Q., & Dean, J. (2015). Reprogramming the genome to totipotency in mouse embryos. *Trends Cell Biol*, *25*(2), 82-91. doi:10.1016/j.tcb.2014.09.006

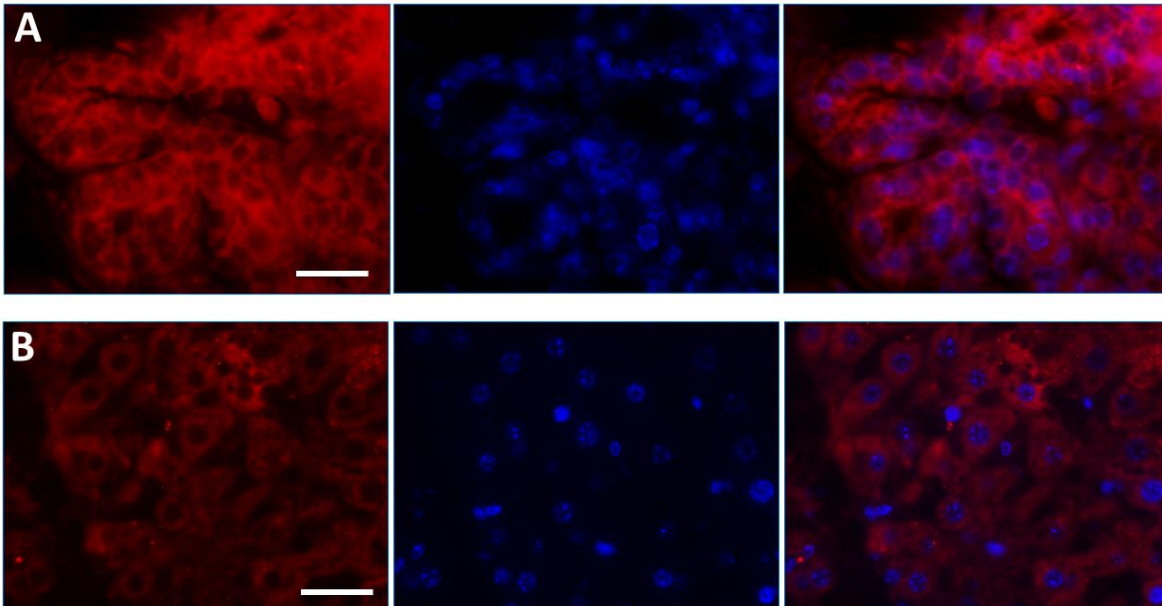
## 9 ANEXOS

### ANEXO 1



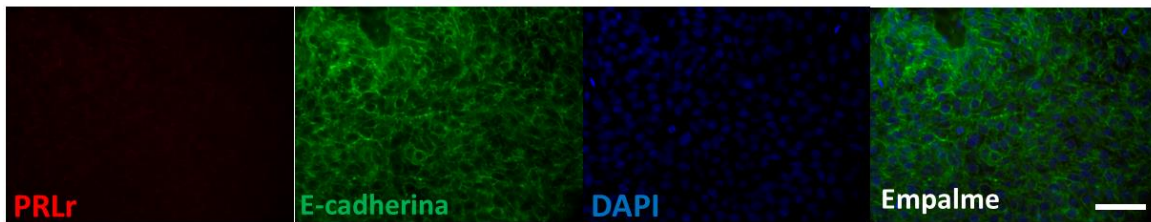
**Diferenciación de mESC hacia linaje neural.** Se observa la presencia de marcadores neurales después de que las mESC fueron sometidas a 12 días de diferenciación. (A) presenta los marcadores Sox2 como una marca nuclear en rojo y Nestina en verde distribuida en el citoplasma. El empalme sugiere la presencia de células trocales neurales. (B) en verde se observa  $\beta$ -tubulina III (marca citoplasmática en verde) expresada en neuronas inmaduras. Se empleó DAPI (azul) para teñir los núcleos. Microscopía de epifluorescencia 10X. escala 25 $\mu$ m

### ANEXO 2



**Validación del anti- receptor de PRL** marca citoplasmática en rojo en (A) glándula mamaria y (B) hígado. Los núcleos fueron teñidos con DAPI en color azul. Epifluorescencia 40 X. escala 25 $\mu$ m.

### ANEXO 3



**Las células troncales embrionarias humanas no presentan el receptor de PRL.** No se observó marca positiva para el receptor de PRL (rojo), el cual se esperaba colocalizando con E-cadherina (marca membranal en color verde).

[Video 1 Contracción espontanea de cardiomiocitos obtenidos a partir de mESC](#)