



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

CONTRIBUCIÓN DE LOS ONCOGENES E6 Y E7 A LA REPROGRAMACIÓN
INDUCIDA POR MKOS DE CÉLULAS POSMITÓTICAS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:
LÍAN MISHEL SÁNCHEZ CÁZARES

TUTOR PRINCIPAL:
DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
DRA. DEHNI SCHNABEL PERAZA
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)
DR. VÍCTOR JULIÁN VALDÉS RODRÍGUEZ
[Instituto de Fisiología Celular, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Septiembre de 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.

El presente trabajo fue realizado en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM), en el Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, en el Laboratorio sobre Plasticidad Celular a cargo del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.

El proyecto fue financiado por la beca para estudios de posgrado número 632428, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), así como por los donativos de los proyectos FOINS1723 y I000/781/2016.

Jurado de tesis

Dr. Mario Enrique Zurita Ortega (IBt, UNAM).

Dr. Tomás David López Díaz (IBt, UNAM).

Dr. Genaro Vázquez Victorio (Facultad de Ciencias, UNAM).

Dr. Víctor Hugo Bermúdez Morales (Instituto Nacional de Salud Pública)

Dr. Adán Oswaldo Guerrero Cárdenas (IBt, UNAM).

Agradecimientos

Al Dr. Luis por darme la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación. Por transmitir un poco de sus conocimientos conmigo, por su confianza, su apoyo, y sobre todo por sus tantas pláticas motivaciones (regañón).

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Dehni Schnabel y el Dr. Julián Valdés por sus acertadas y valiosas aportaciones a este trabajo.

A los miembros de mi jurado de tesis, los Dres. Mario Zurita, Tomás López, Genaro Vázquez, Víctor Bermúdez y Adán Guerrero por sus sugerencias y comentarios hacia mi trabajo; discutir mi trabajo con cada uno de ustedes fue muy enriquecedor para mí, muchas gracias.

A la Dra. Celina García por sus asesorías, sus comentarios, su tiempo y su amistad.

A la M. en C. Concepción Valencia, la Dra. Gilda Guerrero, el Dr. David Hernández y la Dra. Mariana Gutiérrez, por el apoyo técnico y la asesoría durante el desarrollo de este proyecto; por sus valiosas aportaciones a mi trabajo y por compartir con entusiasmo todos sus conocimientos conmigo.

A Verónica y Gonzalo, gracias por ser los mejores padres, por la confianza y libertad con la que me han criado, por ser siempre mi norte, mi brújula, mi guía, mi motivación, mi lugar feliz. Gracias por impulsarme y frenarme cada que es necesario, por confiar en mí, aún cuando ni yo creo en mí, les amo infinitamente amigos ♥.

A Alexis, por ser lo mejor que tengo en este mundo. Tenerte me hace muy feliz ♥. Gracias por ser mi ejemplo de fortaleza, de valentía, de sabiduría; por toda la alegría y diversión que traes a mi vida. Pensar en abrazarte los viernes siempre fue mi motivación para seguir. Gracias por ser siempre la otra mitad de mi cerebro, te amo hermano.

A mis abuelos y tías, gracias por preocuparse siempre por mí, por siempre querer alimentar a la foránea, por estar cerca de mí aún en la distancia, por sus llamadas y mensajes de aliento, sobre todo en los momentos de desastre (temblores, inundaciones y pandemia).

A los amigos que la maestría me dejó:

- Vero y Javier, gracias por el todo el tiempo compartido, por su amistad, por el bullying, las risas, las largas pláticas, las múltiples salidas (tan necesarias para mantener la cordura durante el posgrado), y por todas las margaritas ☺, espero que aún podamos tomar muchas más juntos.
- A Marco, gracias por tu tiempo, tus consejos, tu apoyo, tus videos graciosos y por tus pasteles, espero que el negocio vaya de lo mejor; mejor compañero de escritorio no pudo tocarme ♥.
- A Alán, por tu apoyo, compañerismo, por tus valiosas aportaciones a mi trabajo; te agradezco por motivarme siempre a hacer mejores experimentos gracias a tus eficiencias de 10% ☺, por cierto, si lees esto, cómo va la tesis?

- A Davis, por motivarme siempre con tu buena energía y tu música, gracias por tu ayuda en mi trabajo, por las risas y por las pláticas filosóficas y motivacionales.
- A Raquel, conocerte fue de las cosas más bonitas de la maestría, gracias por tu apoyo, por la buena onda que transmites siempre a todos, por las risas, las largas pláticas, los consejos; valoro mucho tu amistad y espero compartir muchas más cosas contigo (también aplican las margaritas de arriba 😊).

Amigos, infinitas gracias a todos ustedes por las experiencias vividas, por sus enseñanzas, por hacer más llevadera la vida en Cuernavaca y por siempre estar, en los tiempos buenos, en los malos y sobre todo en los momentos de crisis. Los quiero amix ♥♥, y los quiero ver triunfar 😊.

A Brenda y Samara, por ser las mejores amigas desde siempre. Gracias por ser incondicionales; crecer junto a ustedes ha sido de las mejores experiencias en mi vida.

Agradezco especialmente a la Dra. Phaedra Silva por ser una gran motivación para seguir en este mundo de la ciencia, este trabajo surgió gracias a su invitación a formar parte de su grupo de investigación, eso no ocurrió, pero espero que pronto podamos colaborar; mucho de lo que soy hoy como profesionista se lo debo a usted, gracias.

A la Dra. Laura Guzmán por ser una inspiración en el mundo científico, por su amistad y gran calidez, por mantenerse cerca de mi aún cuando nuestras líneas de investigación se separaron.

Gracias a todos, por tanto.

Mishel ♥

índice

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
2.1. Células troncales y diferenciación celular	2
2.2. Estados de potencialidad celular	3
2.3. Autorrenovación y ciclo celular	5
2.4. Ciclo celular y las oncoproteínas E6 y E7.....	9
2.5. Reprogramación celular.....	12
2.6. Factores de transcripción c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2 y el proceso de reprogramación celular	14
2.7. Proteínas YAP/TAZ y la vía de señalización Hippo.....	19
2.8. Interacción entre YAP/TAZ y las vías de señalización Notch y Sonic Hedgehog	23
2.9. Interacción entre YAP/TAZ y la oncoproteína E6	25
3. Antecedentes	27
3.1. Construcción del vector de reprogramación MKOS	27
3.2. Inducción de la reprogramación con el vector MKOS.....	28
3.3. Construcción del vector E6/E7.....	29
3.4. Inducción de la reprogramación con los vectores MKOS-booster Y E6/E7.....	31
4. Planteamiento del proyecto	32
5. Hipótesis.....	33
6. Objetivo principal.....	33
6.1. Objetivos particulares.....	33
7. Materiales y métodos.....	34
7.1. Reactivos	34
7.1.1. Medio DMEM	34
7.1.2. Medio M10	34
7.1.3. Medio M15	34
7.1.4. Medio 2i.....	34
7.1.5. Medio de congelación.....	35
7.1.6. PBS	35
7.1.7. Gelatina 0.1%	35
7.1.8. Lif	35
7.1.9. Tripsina 0.25%.....	35
7.1.10. Mitomicina C	35
7.1.11. Paraformaldehído 4%.....	36
7.1.12. TAE (Tris Acetato EDTA) 10X.....	36
7.2. Métodos de rutina	36
7.2.1. Cultivo celular	36
7.2.2. Pases celulares	36
7.2.3. Conteo celular	37
7.2.4. Generación de feeders	37
7.2.5. Cuantificación de la tasa de proliferación	37
7.2.6. Tinción con fosfatasa alcalina	38
7.2.7. Inmunocitoquímica	38
7.2.8. Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes.....	38
7.2.9. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP.....	39

7.2.10. Análisis estadístico.....	39
7.3. Protocolos principales	39
7.3.1. Construcción de vectores E6 y E7	39
I. PCR para amplificación de vectores	39
II. Purificación de productos de PCR por Miniprep	40
III. Digestión de vectores	40
IV. Purificación de bandas de DNA.....	40
V. Ligación de fragmentos	41
VI. Transformación de bacterias.....	41
7.3.2. Purificación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)	42
7.3.3. Transfección de células mediante electroporación.....	42
7.3.4. Ensayo de reprogramación celular	43
I. Cuantificación de la eficiencia de reprogramación.....	44
8. Resultados	46
8.1. Los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 inducen un aumento en la proliferación celular	46
8.2. Los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 producen un efecto positivo en la reprogramación celular inducida por MKOS y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular de MEFs posmitóticos.....	50
8.3. Reprogramación de MEFs C57 al T1 en presencia de inhibidores/promotores de la proteína YAP	64
9. Discusión	72
10. Conclusiones	79
11. Perspectivas	79
12. Anexos.....	80
13. Bibliografía.....	87

Índice de figuras

Figura 1)	Estados de potencialidad celular a lo largo del desarrollo embrionario temprano de ratón	4
Figura 2)	Ciclo celular	7
Figura 3)	Mecanismo de regulación del ciclo celular mediado por la proteína RB	8
Figura 4)	Mecanismo de regulación del ciclo celular mediado por la proteína p53	9
Figura 5)	Mecanismo de inactivación de la proteína RB mediado por la oncoproteína E7	10
Figura 6)	Mecanismo de inactivación de la proteína p53 mediado por la oncoproteína E6....	11
Figura 7)	Eventos moleculares y procesos biológicos que ocurren durante la reprogramación celular hacia un estado pluripotente	17
Figura 8)	Vía de señalización Hippo y la regulación de YAP/TAZ	20
Figura 9)	Señales implicadas en la regulación de la vía Hippo	21
Figura 10)	Modelo de acción de receptores acoplados a proteínas G y su efecto en la regulación de la vía Hippo	22
Figura 11)	Posibles mecanismos de interacción entre YAP/TAZ y la vía de señalización Notch	24
Figura 12)	Esquema que muestra la relación entre las vías de señalización de HPV, Hippo y EGFR en el cáncer de cuello uterino	26
Figura 13)	Esquema del vector policistrónico MKOS-booster	28
Figura 14)	Proceso de reprogramación de MEFs hacia iPSCs mediado por el vector MKOS-booster.....	29
Figura 15)	Esquema del vector policistrónico E6/E7	30
Figura 16)	Metodología seguida en los experimentos de reprogramación celular a los diferentes tiempos	45
Figura 17)	Vectores que codifican los oncogenes E6 y E7	46
Figura 18)	La expresión de los oncogenes E6 y E7 promueven la proliferación celular en MEFs CD1	47
Figura 19)	La expresión de los oncogenes E6 y E7 promueven la proliferación celular en MEFs C57 y estimula la aparición de colonias tipo iPSC	48
Figura 20)	Las colonias tipo iPSC derivadas de la inducción de los oncogenes E6 y E7 en MEFs C57, degeneran después del pase celular	49
Figura 21)	Los vectores que inducen la expresión de MKOS y E6/E7 se mantienen apagados en ausencia de inducción con dioxibicina	50
Figura 22)	Cuantificación de la tasa de duplicación de MEFs CD1 para el establecimiento de los tiempos de reprogramación celular	52
Figura 23)	Cuantificación de la tasa de duplicación de MEFs C57 para el establecimiento de los tiempos de reprogramación celular	53
Figura 24)	Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 aceleran el tiempo de obtención de iPSCs a partir de MEFs CD1, y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular en MEFs posmitóticos	56
Figura 25)	El efecto de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 contribuye de manera independiente en la derivación de iPSCs a partir de MEFs CD1 posmitóticos.....	57

Figura 26)	Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 aceleran el tiempo de obtención de iPSCs a partir de MEFs C57, y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular en MEFs posmitóticos	58
Figura 27)	El efecto de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 contribuye de manera independiente en la derivación de iPSCs a partir de MEFs C57 posmitóticos	59
Figura 28)	Eficiencia de reprogramación de iPSCs derivadas a partir de MEFs CD1, inducidos con doxiciplina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL	60
Figura 29)	Eficiencia de reprogramación de iPSCs derivadas a partir de MEFs C57, inducidos con doxiciplina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL	61
Figura 30)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs CD1 en el T1 de reprogramación	62
Figura 31)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 en el T1 de reprogramación	62
Figura 32)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs CD1 en el T3 de reprogramación	63
Figura 33)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 en el T4 de reprogramación	63
Figura 34)	Intensidad de fluorescencia de la proteína YAP en MEFs C57 inducidos por 48h con fármacos promotores o inhibidores de YAP	65
Figura 35)	El ácido lisofosfatídico (LPA) y la Ciclopamina (CIC) producen un aumento en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP nuclear, en MEFs C57 inducidos por 48h con fármacos promotores e inhibidores de YAP	66
Figura 36)	La inhibición o promoción en la actividad de la proteína YAP, mediada por fármacos, no interfiere en la derivación de iPSCs a partir de MEFs C57 transfectados con MKOS más los oncogenes E6 y E7 de VPH-16	68
Figura 37)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 inducidos con fármacos promotores e inhibidores de la proteína YAP	69
Figura 38)	Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 inducidos con fármacos promotores e inhibidores de la proteína YAP	70
Figura 39)	Eficiencia de reprogramación de iPSCs derivadas a partir de MEFs C57, inducidos con doxiciplina 1.5 µg/mL más fármacos promotores o inhibidores de la proteína YAP	71
Anexo1)	Mapa del vector que codifica al oncogén E6	80
Anexo2)	Mapa del vector que codifica al oncogén E7	81
Anexo3)	Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs CD1	82
Anexo4)	Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs C57	83
Anexo5)	Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 en estado basal e inducidos con doxiciplina 1.5 µg/mL por 48h	84
Anexo6)	Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 inducidos por 48h con doxiciplina 1.5 µg/mL más LPA 10 µM o DMSO 0.17%.....	85
Anexo7)	Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 inducidos por 48h con doxiciplina 1.5 µg/mL más DAPT 10 µM o Ciclopamina 20 µM	86

Abreviaturas

2i	Combinación de los inhibidores PD0325901 y CHIR99021 (inhibidores de las vías MEK y GSK3, respectivamente)
AREG	Anfiregulina
BMP	Proteína morfógena de hueso
BrdU	Bromodesoxiuridina (nucleótido sintético análogo a timidina)
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
DMEM	Medio esencial de cultivo Dulbecco Modified Eagles Minimal (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E6AP	Enzima ubiquitina-proteína ligasa, también conocida como UBE3A
ECM	Matriz extracelular
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGC	Células Germinales Embrionarias
EGFR	Receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico (EGF)
EpiSC	Células Troncales del Epiblasto
ESC	Células Troncales Embrionarias
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GPCR	Receptores acoplados a proteínas G
GSK3	Glucógeno sintasa cinasa 3
H3	Histona 3
H3K27me2/3	Di y tri metilación en la lisina 27 de la histona 3
H3K4me3	Tri metilación de la lisina 4 de la histona 3
H3K9me2/3	Di y tri metilación en la lisina 9 de la histona 3
Hh	Factor Hedgehog
HP1	Proteína 1 de heterocromatina
iPSC	Células troncales pluripotentes inducidas
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma que permite la iniciación de la síntesis proteica
K27	Lisina en la posición 27
K4	Lisina en la posición 4
K9	Lisina en la posición 9
Ki67	Antígeno KI-67, proteína nuclear asociada con la proliferación celular
LIF	Factor inhibidor de leucemia
LPA	Ácido lisofosfatídico
MEF	Fibroblastos embrionarios murinos
MEK	Proteína cinasa activada por mitógeno, participa en la vía de las MAP cinasas
MET	Transición mesenquima-epitelio
MKOS	Factores de transcripción c-Myc, Klf4, Oct3/4 y Sox2
MSC	Células troncales mesenquimales
NICD	Dominio intracelular de Notch transcripcionalmente activo
PA	Ácido fosfatídico
PBM	Dominio de unión a PDZ
PBS	Buffer Salino de Fosfatos
PDZ	Dominio estructural de algunas proteínas
PFA	Paraformaldehído
PGK	Promotor de tipo constitutivo
Pou5f1	Gen Oct3/4
RB	Proteína del retinoblastoma
RNA	Ácido ribonucleico

rtTA	Transactivador reverso de unión a tetraciclina
S1P	Lisofosfolípidos esfingosina 1-fosfato
SFB	Suero Bovino Fetal
SHh	Vía de señalización Sonic Hedgehog
SSEA1	Antígeno embrionario específico del estadio 1
T	Tiempo
TAE	Tris Acetato EDTA
TAZ	Factor de transcripción co-activador con union a dominio PDZ
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa

1. Resumen

Las células terminalmente diferenciadas derivan de células precursoras que progresivamente van perdiendo su plasticidad hasta que se comprometen hacia un fenotipo específico. Estas células comúnmente dejan de dividirse (células posmitóticas) y solo se recambian en aquellos tejidos en donde hay renovación. Tejidos como el cerebro, el músculo y el hígado esencialmente están compuestos por células posmitóticas diferenciadas, pero también contienen células troncales somáticas con capacidad de proliferación que se activan bajo ciertas circunstancias, frecuentemente asociadas a daño, a partir de las cuales se pueden generar los tipos celulares correspondientes al tejido específico (Flores-Figueroa *et al.*, 2006).

Las células troncales pluripotentes son un grupo específico de células indiferenciadas que tienen un potencial proliferativo elevado y que presentan dos características fundamentales: son capaces de autorrenovarse, es decir, de formar células idénticas a las células de origen, y tienen la capacidad de diferenciar a todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias que forman al organismo adulto (Flores-Figueroa *et al.*, 2006; Martello y Smith, 2014). Anteriormente se conocían únicamente dos fuentes de obtención de estas células: la primera a partir de embriones en etapa de blastocisto que derivan en las denominadas células troncales embrionarias (ESC), o a partir de células germinales que derivan en las denominadas células germinales embrionarias (EGC).

Actualmente, células troncales pluripotentes, que comparten muchas características con las ESC, pueden derivarse experimentalmente a partir de células somáticas diferenciadas como los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs), mediante la incorporación e inducción de la expresión de cuatro factores reprogramadores: c-Myc, Klf4, Oct3/4 y Sox2 (MKOS). Estos factores posibilitan la reprogramación de las células somáticas a células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

En el presente trabajo se evaluó la influencia de los oncogenes E6 y E7 del Virus de Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16), en la dinámica y en la eficiencia de derivación de células iPSC a partir de MEFs, utilizando un sistema MKOS inducible por doxiciclina. Se observó que MEFs con proliferación activa (con duplicación de 0.7-0.8 días) transfectados con MKOS + E6/E7 fueron reprogramados con una eficiencia 10 – 20 veces mayor ($3.37 \pm 1.26\%$) que los transfectados solo con MKOS ($0.49 \pm 0.30\%$); también se observó que MKOS + E6 y MKOS + E7 produjeron un aumento en la eficiencia de reprogramación ($1.19 \pm 0.55\%$ y $2.11 \pm 2.79\%$ respectivamente).

Se pudo conocer que MKOS más la presencia de los oncogenes E6 y E7 aceleran el proceso de reprogramación y acortan el tiempo de obtención de células iPSC, comparado con células en las que solo se transfecta MKOS (7 días post-doxiciclina vs. 11 días post-doxiciclina), alcanzando el compromiso de pluripotencia 12 días después de la inducción con doxiciclina.

La eficiencia de reprogramación de MEFs con proliferación reducida (duplicación superior a 2.2 días) disminuye significativamente en células MKOS ($<0.05\%$) pero en presencia de los oncogenes E6/E7, E6 y E7, las células reingresan al ciclo celular y se obtiene una eficiencia de reprogramación alta ($1.26 \pm 0.18\%$, $0.61 \pm 0.19\%$ y $1.45 \pm 0.11\%$ respectivamente). Por lo que se concluye que los oncogenes E6 y E7 de VPH-16, en presencia de MKOS, promueven una alta eficiencia de reprogramación celular, logrando la derivación de iPSCs aún partiendo de células que ya no se encuentran en división.

2. Introducción

2.1. Células troncales y diferenciación celular

Nuestros tejidos y órganos están compuestos por células terminalmente diferenciadas derivadas de células precursoras que progresivamente van perdiendo su plasticidad hasta que se comprometen hacia un fenotipo específico. Estas células comúnmente dejan de dividirse (células posmitóticas) y sólo se recambian en aquellos tejidos donde hay renovación, este proceso mantiene la homeostasis celular y permite el mantenimiento del tamaño y función de los órganos debido al recambio de las células muertas. Estas células son reemplazadas por células diferenciadas que surgen a partir de células con características especiales, llamadas células troncales (Chávez-González *et al.*, 2017).

Tejidos como el cerebro, el intestino, el músculo y el hígado, así como la sangre, esencialmente están compuestos por células posmitóticas diferenciadas, pero también contienen células troncales adultas o somáticas con capacidad de proliferación que se activan bajo ciertas circunstancias, frecuentemente asociadas a daño, a partir de las cuales se pueden generar todos los tipos celulares dentro de un tejido específico (Flores-Figueroa *et al.*, 2006; Chagastelles y Nardi, 2011). Mantener la estabilidad de una célula diferenciada es fundamental para que esta pueda llevar a cabo sus funciones en el organismo, además de evitar ser fuente de procesos cancerosos.

Las células troncales son un grupo específico de células que tienen la capacidad de generar células diferenciadas que suplen a las células muertas y por otro lado mantienen la población original de células indiferenciadas. Las células troncales tienen un potencial proliferativo elevado y presentan dos características fundamentales: son capaces de *autorrenovarse*, es decir, de formar células idénticas a las células de origen que mantienen su potencialidad y su estado inicial indiferenciado, y tienen el potencial de *diferenciarse* y generar uno o más tipos celulares que desempeñen funciones especializadas en el organismo (Flores-Figueroa *et al.*, 2006; Ramalho-Santos y Willenbring, 2007; Martello y Smith, 2014; Chávez-González *et al.*, 2017). Solo en cultivos *in vitro* es posible clasificar a las células de acuerdo con este concepto operacional ya que existe una dificultad para identificar a las células troncales *in situ* (Chagastelles y Nardi, 2011).

Anteriormente se conocían únicamente dos fuentes de obtención de estas células: la primera a partir de embriones en etapa de blastocisto que derivan en las denominadas células troncales embrionarias (ESC), y la segunda a partir de células germinales primordiales que derivan en las denominadas células germinales embrionarias (EGC). También existen células troncales mesenquimales (MSC) de origen estromal que pueden aislarse de prácticamente cualquier tejido del organismo (Chagastelles y Nardi, 2011), sin embargo, la característica de pluripotencia asociada a este linaje es controversial y solo parcialmente podrían considerarse pluripotentes.

Actualmente, células troncales pluripotentes, que comparten características con las ESC, como la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales, alta proliferación en cultivo, capacidad de mantenerse en estado indiferenciado por cientos de pasajes y, el mantenimiento de la composición cromosómica normal (Chagastelles y Nardi, 2011), pueden derivarse experimentalmente a partir de células somáticas diferenciadas como los MEFs, mediante la incorporación e inducción de la expresión de cuatro factores de transcripción: c-Myc, Klf4, Oct3/4 y Sox2 (MKOS). Estos factores posibilitan la reprogramación de las células somáticas a células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

2.2. Estados de potencialidad celular

Se conoce como potencialidad a la capacidad de diferenciación de una célula; esta propiedad depende de su origen embrionario y de su especificación a lo largo del desarrollo (**Figura 1**) (Geoghegan y Byrnes, 2008; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017). Las células troncales, dependiendo de su capacidad para generar distintos linajes celulares, se dividen en: totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes.

El cigoto es la única célula totipotente, la cual da origen a todos los tipos celulares del organismo, incluido el tejido extraembrionario. Varias divisiones celulares sucesivas posteriores generan la mórula, que también contiene células totipotentes capaces de formar a un individuo completo. En la siguiente etapa se desarrolla el blastocisto que contiene dos tipos de células pluripotentes: las células del trofoblasto que se encuentran en la periferia y que dan origen a las membranas extraembrionarias y a la placenta, y las células de la masa celular interna que dan origen a un segundo linaje extraembrionario, el hipoblasto (o endodermo primitivo), que formará el saco vitelino; simultáneamente, las células restantes pasan al epiblasto que genera las tres capas embrionarias (ectodermo, endodermo, mesodermo) que original al embrión (Chagastelles y Nardi, 2011; Dejosez y Zwaka, 2012; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

Las ESC son un tipo de células pluripotentes que se obtienen del aislamiento y cultivo *in vitro* de las células de la masa interna celular en el estado de blastocisto, estas pueden diferenciarse a todos los tipos celulares de las tres capas germinales embrionarias que forman al organismo adulto (Takahashi y Yamanaka, 2006; Chagastelles y Nardi, 2011; Dejosez y Zwaka, 2012; Niakan *et al.*, 2013; Martello y Smith, 2014). Las ESC están bien caracterizadas molecularmente, se sabe que expresan los marcadores de superficie CD9 y CD24, son positivas a fosfatasa alcalina y expresan los genes Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, LIN28 y SSEA3/4, además expresan altos niveles de telomerasa, lo que corresponde con su inmortalidad en cultivo (Chagastelles y Nardi, 2011).

Las capas embrionarias son el resultado de las primeras etapas de compromiso celular que restringen la potencialidad de las células de un estado pluripotente a uno multipotente. El ectodermo da origen al sistema nervioso y a la piel; el mesodermo genera los músculos, los riñones, el corazón, la sangre y el esqueleto; finalmente el endodermo genera los pulmones, el hígado, el páncreas y todo el sistema digestivo (Gilbert y Barresi, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

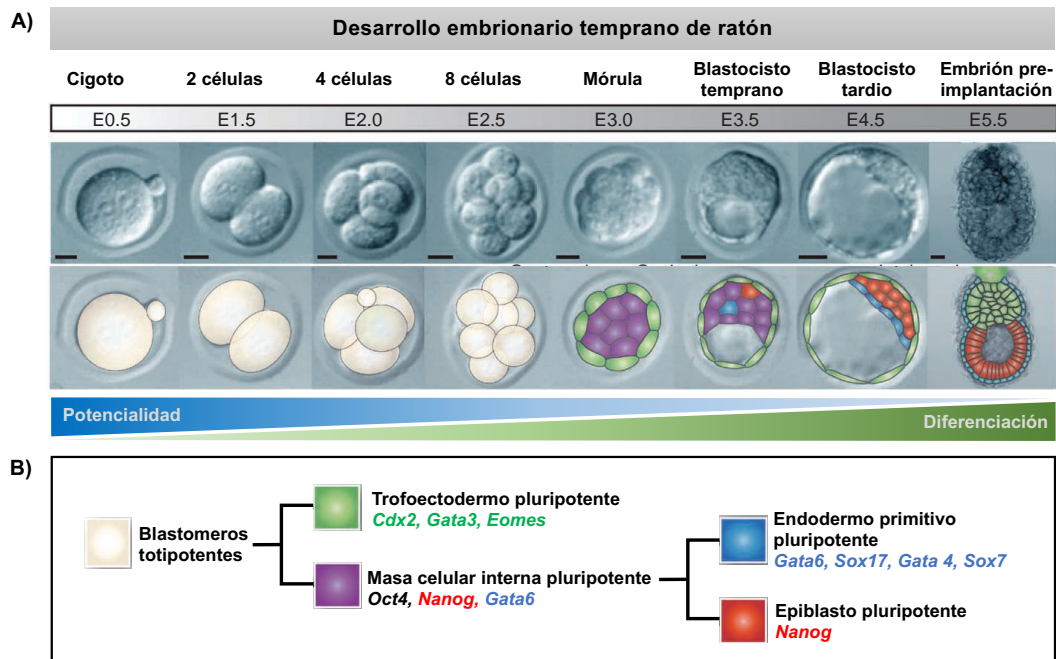


Fig. 1 Estados de potencialidad celular a lo largo del desarrollo embrionario temprano de ratón. **A)** El desarrollo embrionario temprano de ratón comienza con la formación del cigoto durante la fertilización, y se extiende hasta la formación del embrión pre-implantación al día 5.5 del desarrollo. Durante este tiempo existen dos segregaciones en el linaje troncal que determinan la especificación del destino celular, la primera da lugar a la bástula que forma el trofoectodermo y la masa celular interna, y la segunda que conduce al desarrollo del endodermo primitivo y del epiblasto. Se ilustra como la potencialidad de las células (barra azul) va disminuyendo conforme transcurre el desarrollo y las células van adquiriendo compromisos de linaje hacia la diferenciación (barra verde). **B)** Expresión génica asociada a cada linaje celular, cada recuadro de color representa una célula con estado de potencialidad diferente durante el desarrollo embrionario. E: día embrionario. Barras de escala, 50 μ m. (modificado de Niakan *et al.*, 2013).

Por su parte, las células troncales somáticas, son consideradas células “raras”, ya que son células troncales multipotentes que se mantienen mayormente en estado de quiescencia, pero poseen capacidad de autorrenovación y diferenciación limitadas; estas células solo pueden diferenciarse a linajes de una misma capa germinal, propia de un órgano o tejido al que pertenecen. *In situ*, estas células no muestran una morfología característica que las haga diferenciarse del resto de las células, pero si expresan marcadores de superficie que las distingue de las células terminalmente diferenciadas. Como los marcadores de superficie no son muy específicos, en general, no pueden ser

aisladas fácilmente a partir del tejido de origen (Jaenisch y Young, 2008; Hochedlinger y Plath, 2009; Chagastelles y Nardi, 2011; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017). Las células troncales somáticas que abandonan la troncalidad se diferencian hacia un linaje específico y se dividen para amplificar la población celular en los tejidos en constante renovación o bien para reparar algún daño en el tejido.

Las células troncales pluripotentes pueden ser clasificadas en dos estados fundamentales: *naive* (que es un estado basal de pluripotencia) y *primed* (que es un estado más avanzado y propenso a la diferenciación). Estos estados celulares expresan marcadores específicos y poseen una morfología característica. Las células *naive* comúnmente se derivan del epiblasto del embrión preimplantación dando lugar a las ESC; estas células pueden dar lugar a todos los linajes embrionarios y al ser introducidas en embriones preimplantación se incorporarán fácilmente al desarrollo normal, dando como resultado animales quiméricos con alta eficiencia, además de contribuir a la línea germinal. Expresan altos niveles de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog, así como otros marcadores de pluripotencia como ESRRB, Klf2, Klf4, REX1, STELLA, TFCP2L1, entre otros. En este estado celular el DNA se mantiene desmetilado en los promotores de los genes de pluripotencia, y las células que provienen de embriones con cromosomas XX mantienen los dos cromosomas X activos (Nichols y Smith, 2009; Theunissen *et al.*, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017; Du, *et al.*, 2018). Por su parte, las células *primed* derivan del embrión post-implantación y son conocidas como células troncales epiblasticas (EpiSC); en este estado las células poseen morfología de epitelio columnar, son capaces de diferenciarse en múltiples linajes, pero no son capaces de generar quimeras. Expresan bajos niveles de los factores Nanog, Klf2, Klf4, REX1, STELLA, típicos de las ESC, pero expresan además los factores POU3F1, FGF5, FGF15, Sox3, MYB, entre otros. Presentan metilación elevada del DNA en los promotores de pluripotencia y, en los derivados de embriones XX, uno de los cromosomas X sufre una inactivación aleatoria (Weinberger *et al.*, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017; Du, *et al.*, 2018).

Se sabe que las células troncales pluripotentes sufren un cambio en la respiración celular, pues las ESC en el estado *naive* presentan una respiración bivalente (anaeróbica y aeróbica) que se ve modificada en las células EpiSC del estado *primed*. Posterior a la implantación del blastocisto, las células epiblasticas cambian a ser exclusivamente anaeróbicas dependientes en gran medida de la glucólisis (Wu y Izpisua-Belmonte, 2015; Theunissen *et al.*, 2016).

2.3. Autorrenovación y ciclo celular

La *autorrenovación* es la capacidad que tienen las células troncales para duplicarse a sí mismas por largos periodos de tiempo y mantenerse en estado quiescente indiferenciado. Existen dos estrategias posibles de división que las células troncales pueden adoptar para mantener el balance en el número

de células troncales y su progenie. La primera es la *división asimétrica*, en donde cada célula troncal al dividirse genera una célula hija con sus mismas características y otra célula hija destinada a diferenciarse. La segunda es la *división simétrica*, en la cual la célula troncal se divide generando dos células hijas con las mismas características de troncalidad o dos células destinadas a diferenciarse (Gilbert y Barresi, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

Es importante destacar que la autorrenovación no es lo mismo que la proliferación, aunque en ambos procesos existe la división celular. La proliferación incluye la división de todos los tipos de células, tanto las células troncales como las células somáticas, mientras que la autorrenovación requiere del control del ciclo celular y del mantenimiento de la potencialidad.

Existen diversos mecanismos que controlan la autorrenovación, estos pueden ser regulados por factores intrínsecos y extrínsecos. Dentro de los primeros encontramos factores de transcripción, reguladores epigenéticos como Polcomb y Thrtorax, y la actividad de la telomerasa. Estos factores intrínsecos son regulados por señales extrínsecas provenientes del nicho como lo son los factores de crecimiento TGF β (Transforming Growth Factor beta), WNT (Wingless y proteínas relacionadas a ITN), BMP (Bone Morphogenetic Proteín) y FGFs (Fibroblast Growth Factors). Se han descrito reguladores intrínsecos clave del mantenimiento de la potencialidad de las ESC, como lo son Sox2, Oct4 y Nanog (Chagastelles y Nardi, 2011; Gilbert y Barresi, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

El control del ciclo celular es un evento importante en el mantenimiento de la troncalidad. Las células troncales del adulto, aunque tienen gran capacidad para autorrenovarse, su capacidad proliferativa en realidad es baja. En los tejidos se encuentran en una fase de quiescencia, lo que se refiere a que se encuentran en la fase G0. La importancia de que las células troncales se mantengan en estado de quiescencia es debido a que, si toda la población de células troncales sale de ese estado al mismo tiempo, puede llevar a un agotamiento de la población, por lo cual es una buena estrategia para mantener por largos tiempos el reservorio de células troncales en los tejidos. Las células troncales tienen la capacidad de mantenerse en esta etapa o bien de entrar al ciclo celular en el proceso de autorrenovación y diferenciación.

El *ciclo celular* se divide en 4 fases (**Figura 2**): G1, en donde la célula crece y puede responder al efecto de factores promotores o inhibidores de la proliferación; la fase S, en donde las células duplican el DNA; la fase G2, en donde las células continúan creciendo y se preparan para la mitosis; y la fase M, en donde la célula se divide. Existe una fase fuera del ciclo celular llamada G0 en donde las células se encuentran en un estado quiescente no proliferativo. La progresión del ciclo celular está controlada por múltiples factores de crecimiento, además, existen dos puntos de control: el primero entre las fases G1 y S, y el segundo entre las fases G2 y M; existe también un punto de restricción en

la fase G1 que determina el comportamiento de la célula, incluyendo la decisión de crecer, diferenciarse, morir por apoptosis o arrestarse en la fase G0.

El ciclo celular está regulado positivamente por las proteínas ciclinas que son la subunidad reguladora de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Estos complejos ciclina-CDK son los reguladores clave para la transición de una fase a otra en el ciclo celular. Cuando las células salen del estado quiescente y entran a la fase G1, se induce la expresión de las ciclinas del tipo D y E. Al inicio de la síntesis del DNA en la fase S, se sintetiza la ciclina A seguida por la síntesis de la B, que ocurre durante el intervalo entre la fase S y la fase G2, degradándose ambas al final de la mitosis (López-Marure, 2003; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

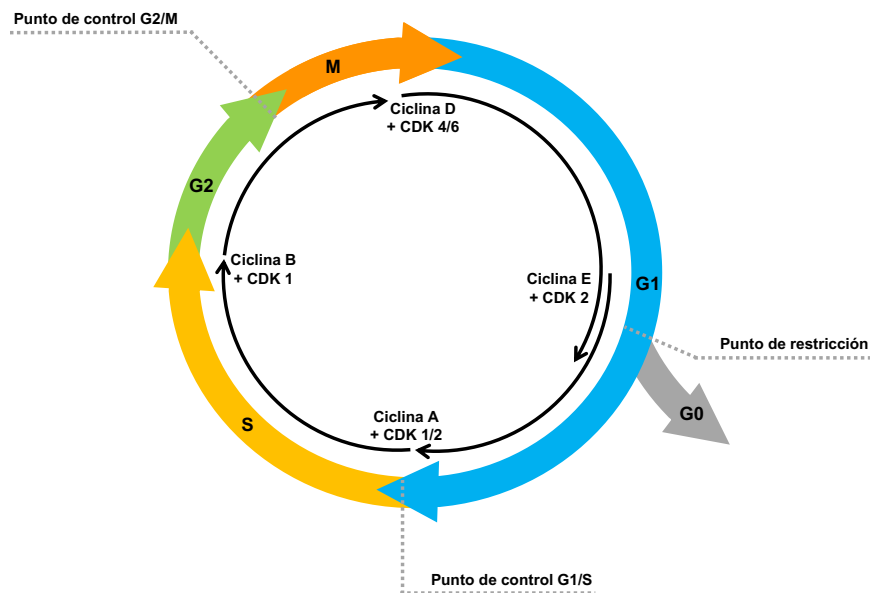


Fig. 2 Ciclo celular. Se divide en 4 fases: G1, de crecimiento celular; S, donde la célula replica su DNA; G2, en donde la célula continúa creciendo; y M, de división celular por mitosis. Existe también una fase fuera del ciclo, llamada G0, en donde las células se encuentran en un estado quiescente. La progresión del ciclo celular está regulada por proteínas ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas (CDK) que actúan en diferentes puntos del ciclo; además existen dos puntos de control en G1/S y G2/M, y un punto de restricción en la fase G1 que determinan el comportamiento de la célula.

Por otro lado, las proteínas supresoras de tumores como la codificada por el gen del retinoblastoma (RB) y la familia de las proteínas p53, actúan en la fase G1 regulándola de manera importante. La proteína RB tiene como función principal inhibir la transición de la fase G1 a S. Su actividad depende de su estado de fosforilación: cuando RB se encuentra desfosforilada se mantiene activa y unida al factor de transcripción E2F, evitándose así la transcripción de sus genes blanco; cuando RB se fosforila, por complejos ciclina-CDK, el factor E2F es liberado del complejo RB-E2F y, de esta

manera, pueden activar la transcripción de sus genes blanco (**Figura 3**). Se sabe que este mecanismo de fosforilación puede ser alterado por la oncoproteína E7 del Virus del Papiloma Humano tipo 16 (VPH-16) (López-Marure, 2003; Tsuruga *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2013).

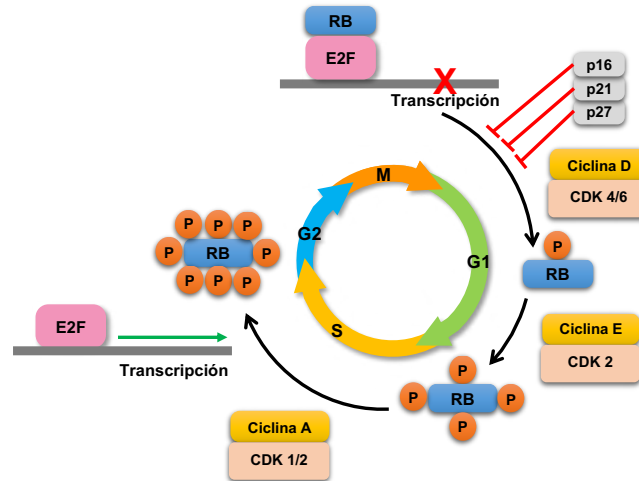


Fig. 3 Mecanismo de regulación del ciclo celular mediado por la proteína RB. La proteína supresora de tumores RB actúa regulando el ciclo negativamente. Su función es inhibir la transición de la fase G1 a S por medio de su estado de fosforilación: cuando la proteína está desfosforilada se mantiene unida al factor de transcripción E2F, evitando así la transcripción de sus genes blanco; por el contrario, cuando RB se fosforila, por acción de complejos ciclina-CDK, el E2F se libera del complejo RB-E2F y se activa la transcripción de sus genes blanco. Las proteínas p16, p21 y p27 actúan evitando que RB se fosforele.

De manera similar, la *proteína p53* participa en la regulación de puntos clave del ciclo celular; actúa como un sensor de daño, de modo que cuando detecta que el daño no es tan grave, activa las enzimas de reparación del DNA e induce su reparación, lo que permite continuar con el ciclo celular. Por el contrario, cuando detecta que el daño es mayor, p53 induce la muerte celular programada o la apoptosis, aunque también puede detener el ciclo celular y causar senescencia celular en las células que se dividen rápidamente (López-Marure, 2003; Gilbert y Barresi, 2016). La actividad de la p53 se incrementa en respuesta a eventos que dan lugar a una proliferación anormal de las células, tales como daño al DNA, oncogenes activados y en respuesta a ciertas señales de estrés. Si p53 presenta mutaciones o no se encuentra en la célula, estas funciones no pueden llevarse a cabo, lo que representa un factor promotor del desarrollo de cáncer en muchos tejidos (Salamanca-Gómez, 2009).

La p53 puede ser inactivada por diversos factores como su unión al antígeno T del virus SV40, degradación inducida por la oncoproteína E6 del VPH-16 (Tsuruga *et al.*, 2008), o por mutaciones puntuales espontáneas. La p53 es fosforilada por complejos ciclina-CDK de las fases S, G2 y M. Se ha identificado a la proteína Mdm2 como una proteína que interactúa con p53 y reprime su actividad transcripcional. Mdm2 lleva a cabo esta represión mediante la unión y bloqueo del dominio de trans-

activación N-terminal de p53. Mdm2 también actúa como una ubiquitina ligasa E3, marcando tanto a sí misma como a p53 para ser degradadas por el proteasoma (**Figura 4**) (López-Marure, 2003; Jung *et al.*, 2013).

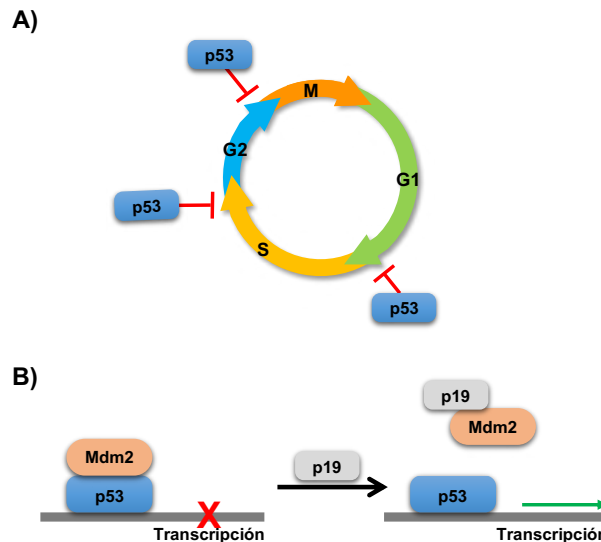


Fig. 4 Mecanismo de regulación del ciclo celular mediado por la proteína p53. A) La actividad de la p53 se incrementa en respuesta al daño en el DNA, actividad de oncogenes y en respuesta a ciertas señales de estrés; es fosforilada por complejos ciclina-CDK y regula la transición en las fases S, G2 y M del ciclo celular. B) La proteína Mdm2 interacciona con p53 y reprime su actividad transcripcional; esta interacción se rompe por acción de la proteína p19 que se une a Mdm2 y provoca la activación de p53.

2.4. Ciclo celular y las oncoproteínas E6 y E7

Las oncoproteínas E6 y E7 se encuentran codificadas en el genoma de varios tipos de Virus del Papiloma Humano (VPH). Estos virus pertenecen a una familia compleja y variada (*Papillomaviridae*) encontrados en diferentes especies animales como los reptiles, aves y marsupiales, así como en más de veinte especies de mamíferos. Los VPH son virus pequeños de DNA bicatenario no envueltos, de 55 nm de diámetro, con forma circular superenrollada compuesto por 7096 pares de bases (pb). Tienen la particularidad, en su gran mayoría, de ser agentes epiteliotropos estrictos que infectan casi con exclusividad la piel y/o las mucosas del epitelio poliestratificado y causan lesiones hiperproliferativas. Se han caracterizado más de 150 genotipos diferentes, de los cuales aproximadamente 40 están asociados con infecciones de epitelios de la mucosa y se clasifican en grupos de “alto” y “bajo” riesgo según el potencial para desarrollar cáncer (Mendoza *et al.*, 2007; Hellner *et al.*, 2009; You, 2010).

Los VPH de bajo riesgo, como el VPH-6 y VPH-11, causan verrugas genitales benignas, mientras que los VPH de alto riesgo, como el VPH-16 y VPH-18, causan neoplasias intraepiteliales escamosas premalignas que pueden progresar a carcinomas cervicales (Hawley-Nelson *et al.*, 1989).

La integración del genoma de VPH de alto riesgo en un cromosoma de la célula huésped es un sello distintivo frecuente de progresión maligna y conduce a la expresión persistente y no regulada de las oncoproteínas E6 y E7 (Hellner *et al.*, 2009).

Las oncoproteínas E6 y E7 no tienen actividad de unión al DNA, ni capacidad enzimática específica, más bien funcionan a través de alterar las redes reguladoras celulares del huésped. Como se mencionó anteriormente, E6 y E7 actúan en diferentes puntos de control del ciclo celular y hacen que las células escapen de la senescencia celular al inactivar la vía p16/RB y la vía de p53 (Liu *et al.*, 2008; Tsuruga *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2013).

La oncoproteína E7 estimula el ciclo celular a través de la unión a la proteína RB supresora de tumores. Como se mencionó anteriormente, una de las principales funciones de RB es unirse a los factores de transcripción de la familia E2F y reprimir la transcripción de los genes blanco. E7 interrumpe la interacción en el complejo RB-E2F, lo que resulta en la fosforilación e inactivación de RB y en la liberación del factor E2F en su forma transcripcionalmente activa, con lo cual se produce la transcripción de sus genes blanco y en consecuencia se induce proliferación celular (**Figura 5**) (Yim y Park, 2005; Tsuruga *et al.*, 2008; Hellner *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2013; Vallejo-Ruiz, *et al.*, 2015).

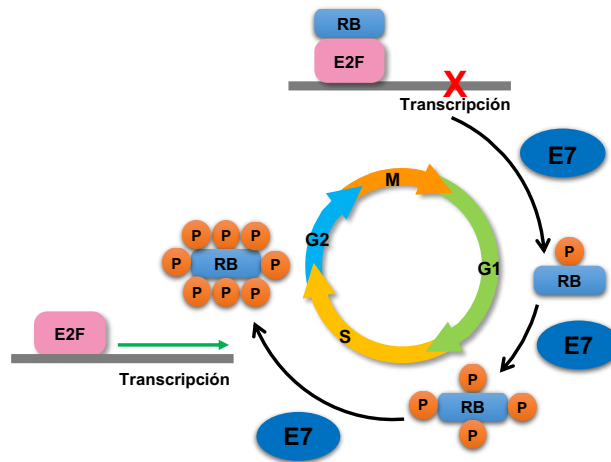


Fig. 5 Mecanismo de inactivación de la proteína RB mediado por la oncoproteína E7. La oncoproteína E7 interrumpe la interacción entre RB y E2F, lo que resulta en la fosforilación e inactivación de RB y en la liberación del factor E2F en su forma transcripcionalmente activa, con lo cual se induce la transcripción de sus genes blanco y en consecuencia se induce la proliferación celular.

Por su parte, la oncoproteína E6 actúa promoviendo la degradación de la proteína p53 supresora de tumores mediante la formación de un complejo trimérico que comprende E6, p53 y la enzima de ubiquitinación celular E6-AP (**Figura 6**). La degradación estimulada por E6 interfiere con las funciones biológicas de p53, por lo tanto, perturba el control de la progresión del ciclo celular, lo que finalmente conduce a una mayor proliferación de las células; además, E6 tiene otras funciones

importantes como la activación de la telomerasa debido a la activación transcripcional de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) que mantiene la longitud de los telómeros, permitiendo que las células eviten la senescencia replicativa y se vuelvan inmortales. El promotor de hTERT es activado por E6 en asociación con la acetilación de la histona H3 en el promotor de hTERT, y es dependiente de E6-AP (James *et al.*, 2006). E6 también posee asociación con proteínas con dominio de unión a PDZ y otras proteínas diana celulares que favorecen la immortalización celular, manteniendo así la longitud de los telómeros y promoviendo la proliferación celular (Yim y Park, 2005; Liu *et al.*, 2008; Tsuruga *et al.*, 2008; Hellner *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2013).

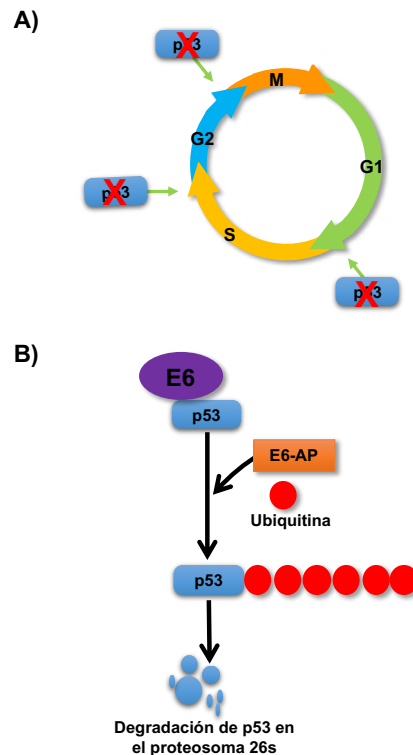


Fig. 6 Mecanismo de inactivación de la proteína p53 mediado por la oncoproteína E6.
A) La degradación de p53 promueve la progresión de las fases S, G2 y M en el ciclo celular.
B) E6 actúa promoviendo la degradación de la proteína p53 mediante la formación de un complejo trimérico que comprende a E6, p53 y a la enzima de ubiquitinación celular E6-AP, este complejo ubiquitina a p53 y promueve su degradación en el proteosoma, perturbando así el control de la progresión del ciclo celular, lo que finalmente conduce a una mayor proliferación celular.

En ensayos *in vitro* para evaluar el efecto de las oncoproteínas E6 y E7 sobre el ciclo celular, se ha observado que al transfectar solo a E7, puede inducir una proliferación elevada, pero las células eventualmente senescen; por el contrario, cuando E6 es transfectado solo, éste no exhibe actividad sobre el ciclo celular. Por lo tanto, la transformación e immortalización eficiente de las células infectadas se basa en la actividad cooperativa de estos dos oncogenes virales, E7 solo puede inducir

hiperproliferación, pero también se requiere E6 para extender la vida de las células indefinidamente (Hawley-Nelson *et al.*, 1989; Liu *et al.*, 2008; Hellner *et al.*, 2009).

2.5. Reprogramación celular

La reprogramación celular es una técnica mediante la que se consigue que el perfil de expresión génica de un determinado tipo de células se altere y pueda ser modificado; en las células terminalmente diferenciadas se logra que los genes que dejaron de expresarse en etapas tempranas del desarrollo, vuelvan a expresarse, a la vez que los genes que determinan la diferenciación de la célula dejen de expresarse, de esta forma, las células reprogramadas adquieren un nuevo perfil de expresión génica y las remodelaciones epigenéticas necesarias para revertir el proceso de diferenciación y regresar a la célula a un estado troncal pluripotente.

Experimentalmente, se ha logrado la reprogramación de células somáticas a células pluripotentes mediante procesos que incluyen: la transferencia nuclear, la fusión celular y la reprogramación directa mediante el uso de factores de transcripción.

En la transferencia nuclear, el núcleo de una célula somática se inyecta en un ovocito enucleado, dando lugar a un embrión clonado. Cuando se transfiere a una hembra receptora, el embrión clonado puede convertirse en un animal vivo. Los embriones preimplantación clonados por esta técnica, cuando se explantan *in vitro*, pueden derivar en cultivos de ESC (Maherali y Hochedlinger, 2008; Yamanaka y Blau, 2010; Gilbert y Barresi, 2016). Un ejemplo muy conocido de este proceso es la oveja Dolly.

Un enfoque alternativo para estudiar la reprogramación es la fusión celular, que implica la fusión de células somáticas con células ES, generando híbridos pluripotentes en los que el genoma somático adquiere marcas epigenéticas de las células ES. Sin embargo, esta técnica no es viable en la terapia celular porque los genomas de dos individuos diferentes se combinan en las células híbridas, lo que resulta en células tetraploides que son propensas a anomalías cromosómicas (Geoghegan y Byrnes, 2008; Maherali y Hochedlinger, 2008; Yamanaka y Blau, 2010). Dichos experimentos mostraron que tanto las células ES como los ovocitos, deben contener factores que median la reprogramación de células somáticas hacia un estado pluripotente. Esta noción llevó a Takahashi y Yamanaka en 2006 a probar el efecto de genes que se expresan predominantemente en células ES mediante su sobreexpresión en células somáticas. Fue así como identificaron cuatro factores de transcripción: c-Myc, Klf4, Oct3/4 y Sox2 (MKOS), de un grupo inicial de 24 genes candidatos, que cuando se sobreexpresaron en fibroblastos, dieron lugar a células troncales pluripotentes inducidas, las llamadas iPSCs (por sus siglas en inglés induced Pluripotent Stem Cells) (Takahashi y Yamanaka 2006; Geoghegan y Byrnes, 2008; Maherali y Hochedlinger, 2008; Yamanaka y Blau, 2010). Dichas células

presentan las mismas propiedades fundamentalmente de las ESC, ya que poseen similitud morfológica, pueden autorrenovarse en estado indiferenciado y diferenciarse a derivados de las tres capas germinales, siendo así que al ser inyectadas en blastocistos contribuyen eficientemente al desarrollo embrionario de ratones quiméricos; además expresan fosfatasa alcalina, son positivas al antígeno embrionario específico del estadio 1 (SSEA1), y expresan altos niveles de Oct4 (Woltjen *et al.*, 2009; Dejosez y Zwaka, 2012; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

A partir del trabajo de Takahashi y Yamanaka para generar iPSCs, que muestra que con sólo cuatro genes es posible reprogramar células adultas, se abrió la posibilidad de desarrollar métodos alternativos que permitan acelerar la reprogramación de las células. El método original de generación de iPSCs utiliza vectores retrovirales que integran los factores de reprogramación en el genoma del huésped, sin embargo, el uso de retrovirus y lentivirus que incorporan las construcciones de DNA y/o genes ectópicos al azar, alteran la construcción genómica del huésped y hacen posible la aparición de mutaciones insercionales que pueden provocar la formación de tumores (Careya *et al.*, 2009; Okita *et al.*, 2010; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017). Es por ello que se han desarrollado nuevos vectores de transfección que permiten la expresión transitoria de los factores de reprogramación; tal es el caso de los vectores adenovirales, los plásmidos o el suministro directo de las proteínas de reprogramación (Woltjen *et al.*, 2009; Okita *et al.*, 2010).

Por otro lado, en la búsqueda de métodos alternativos que promuevan la desdiferenciación celular, recientemente se demostró que la activación ectópica transitoria de las proteínas YAP/TAZ, principales efectores de la vía de señalización de Hippo, pueden convertir un rango de células diferenciadas en células troncales somáticas del mismo tejido, respetando las restricciones de linaje. Se demostró que células diferenciadas de glándula mamaria, neuronas fetales y células de páncreas, se convierten de manera eficiente en células proliferantes con propiedades de células troncales/progenitoras de sus respectivos tejidos, después de ser inducidas transitoriamente con YAP exógeno (Panciera *et al.*, 2016).

Aunque hoy en día se sabe que los métodos desarrollados permiten la reprogramación de las células, las eficiencias de reprogramación descritas siguen siendo muy bajas, menores al 1%. Esto se debe a que existen frenos en la reprogramación de las células somáticas hacia un estado pluripotencial, siendo la proteína p53 uno de los principales obstáculos para que se lleve a cabo la reprogramación eficientemente (Banito y Gil, 2010), pues se ha demostrado que al reducir o eliminar por completo la señalización de p53, aumenta la eficiencia de reprogramación (Kawamura *et al.*, 2009). Se sabe también que el supresor tumoral RB inhibe la reprogramación de fibroblastos hacia iPSCs. De igual forma, se ha descrito que las células que se dividen más rápidamente tienen una mayor propensión para reprogramarse (Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Banito y Gil, 2010; Karetta *et al.*,

2015;). De este modo, se propone que al obtener cultivos proliferativos a consecuencia de la ausencia de p53 y RB, se facilitaría la reprogramación de células y podría aumentarse la eficiencia.

2.6. Factores de transcripción c-Myc, Klf4, Oct3/4, Sox2 y el proceso de reprogramación celular

La reprogramación de las células hacia un estado pluripotente se alcanza a través de la interacción de vías de señalización que conducen a modificaciones en la cromatina y la acción de factores de transcripción. Los factores de transcripción son proteínas que contienen dominios de interacción con el DNA y que reclutan a proteínas que promueven o reprimen la expresión génica (Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

En la reprogramación inducida por la expresión transitoria de factores de transcripción, se emplean los factores exógenos: c-Myc, Klf4, Oct3/4 (también conocido como Pou5f1) y Sox2, siendo estos dos últimos, junto con NANOG endógeno, los tres de importancia central. Cada factor de transcripción cumple con funciones bien caracterizadas dentro de la célula, que contribuyen a la reprogramación:

- *c-Myc* es un factor básico de transcripción que interviene en el crecimiento celular, la diferenciación y la proliferación. Acelera el ciclo celular al activar la transcripción de ciclina-E, que promueve la transición de la fase G1 a la fase S, por lo que puede contrarrestar el efecto antiproliferativo causado por Klf4. Es un objetivo importante río debajo de dos vías que intervienen en el mantenimiento de la pluripotencia, la cascada de señalización LIF/STAT3 y la cascada de señalización Wnt. La cascada de señalización inducida por LIF resulta en la activación y translocación al núcleo de STAT3, mismo que induce la activación de la transcripción de c-Myc. Por otro lado, la cascada de señalización de Wnt promueve la autorrenovación de las ESC al inhibir a GSK3 β ; En ausencia de LIF, GSK3 β fosforila a c-Myc, promoviendo su degradación proteosómica. En las ESC, la señalización de Wnt puede inhibir GSK3 β y, por lo tanto, mantener un mayor nivel de c-Myc en las células (Zeineddine *et al.*, 2014; Onishi y Zandstra, 2015; Takahashi y Yamanaka 2016). C-Myc posee hasta 25,000 sitios de unión en el genoma, por lo que puede unirse a numerosos sitios y reclutar complejos de histona acetilasa, sin embargo, también es un protooncogén y juega un papel importante en la mayoría de los cánceres humanos (Geoghegan y Byrnes, 2008; Werdig *et al.*, 2008; Apostolou y Stadtfeld, 2018).
- *Klf4* es un factor de transcripción que puede actuar como un supresor de tumores porque activa p21 e inhibe la proliferación, o como un oncogén ya que también regula a la baja p53, promoviendo así la proliferación celular, por lo tanto, en ausencia de p21 estable, Klf4 cambia

de un supresor tumoral a un oncogén. La sobreexpresión de Klf4 inhibe la diferenciación de las ESC, y coopera con Oct3/4 y Sox2 para crear una red regulatoria que controla el estado de autorrenovación y pluripotencia de las células, además, Klf4 promueve la regulación positiva de NANOG (Geoghegan y Byrnes, 2008; Chronis *et al.*, 2017).

- *Oct3/4* (Pou5f1) es un factor de transcripción considerado como el gen maestro que regula el mantenimiento y la autorrenovación de las células pluripotentes en el embrión, así como la autorrenovación de las ESC. Se expresa específicamente en este tipo de células y se ha demostrado que Oct3/4 tiene una gran cantidad de genes diana, muchos de los cuales también poseen elementos reguladores para Sox2 y NANOG (Takahashi y Yamanaka 2016). Oct3/4 también es importante para promover la diferenciación, ya que si se sobreexpresa más de 50% en relación con Sox2, da como resultado la diferenciación de las ESC en mesodermo, es por ello que se requiere una regulación muy estricta entre estos dos factores para mantener la pluripotencia en las ESC (Geoghegan y Byrnes, 2008; Zeineddine *et al.*, 2014; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).
- *Sox2* es un factor de transcripción que comparte el motivo de unión al DNA de la caja HMG con numerosas proteínas. Juega un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia en las ESC. La regulación a la baja de Sox2 en las ESC promueve la diferenciación en ectodermo, lo que demuestra claramente su importancia en el mantenimiento de la pluripotencia (Geoghegan y Byrnes, 2008; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).
- La expresión endógena de *NANOG* en las ESC inhibe la diferenciación celular, contribuyendo en el mantenimiento de la pluripotencia, pero es prescindible para el inicio de la reprogramación de células somáticas. NANOG funciona como una puerta de enlace que induce a los pre-iPSC a adquirir el estado de maduración de la pluripotencia y ha sido identificado como un componente central, en conjunto con Oct4 y Sox2, que se expresa en las células de la masa celular interna del blastocisto (Maherali y Hochedlinger, 2008; Wang *et al.*, 2013; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

La comprensión de las funciones clave de cada uno de los cuatro factores de reprogramación permite sugerir un modelo de cómo actúan en conjunto para inducir el estado de pluripotencia. En primer lugar, c-Myc promueve numerosos aspectos de la transformación y actúa induciendo la inmortalización de las células, sin embargo, también induce apoptosis dependiente de p53. Klf4 actúa contrarrestando el efecto pro-apoptótico. C-Myc también induce la modificación de la cromatina al unirse a numerosos sitios y reclutando complejos de histona acetilasa que promueven el relajamiento de la estructura de la cromatina, es por eso que al introducir solo c-Myc y Klf4 se pueden inducir

células tumorales y no células iPSCs. Una vez obtenida una estructura de cromatina abierta y accesible, Oct3/4 y Sox2 actúan mediante la formación de un heterodímero que regula a NANOG, y en conjunto, estos tres genes actúan creando una red regulatoria que promueve la transcripción de genes necesarios para la inducción de la pluripotencia (Geoghegan y Byrnes, 2008; Takahashi y Yamanaka 2016; Chronis *et al.*, 2017; Li y Izpisua-Belmonte, 2018). Por otro lado, se ha reportado que Oct4 puede unirse a sus secuencias diana a pesar del impedimento por la cromatina compacta, esta unión implica su capacidad para alterar la estructura local de la cromatina y facilitar la unión de los demás factores de transcripción, promoviéndose así la remodelación de la cromatina para inactivar genes somáticos y activar la transcripción de genes requeridos en el estado pluripotente (Li *et al.*, 2017; Li y Izpisua-Belmonte, 2018), sin embargo, el mecanismo exacto de cómo ocurre la remodelación de la cromatina producida por dichos factores es incierta.

En 2017, Chronis y colaboradores estudiaron un modelo de accesibilidad de la cromatina que explica como se lleva a cabo la reprogramación celular con los factores de Yamanaka, ellos descubrieron que Oct3/4, Sox2 y Klf4 se unen predominantemente a los enhancers somáticos activos al inicio de la reprogramación e inmediatamente inducen su inactivación en todo el genoma, induciendo también un recambio de los factores de transcripción somáticos. El recambio de enhancers somáticos por los enhancers de pluripotencia Oct3/4 y Sox2, induce el reclutamiento de factores de transcripción característicos de la pluripotencia, impulsando así la reprogramación de las células.

De un modo similar, el grupo de Pei también en 2017 describió una dinámica de accesibilidad a la cromatina durante la reprogramación, en donde Oct4, Sox2 y Klf4 al unirse a sitios de la cromatina compuestos principalmente por genes asociados con un destino somático, inducen cambios dinámicos en la cromatina de un estado abierto a un estado cerrado y posteriormente se induce un cambio en la cromatina de un estado cerrado a un estado abierto, mismo que ocurre acompañado de un recambio de loci asociados con la pluripotencia.

Hoy sabemos que además de los factores de transcripción, la vía de señalización LIF/STAT3, junto con la proteína morfógena de hueso (BMP), son críticas para el mantenimiento de la pluripotencia en las ESC de ratón, ya que promueven la proliferación y evitan la diferenciación (Geoghegan y Byrnes, 2008; Zeineddine *et al.*, 2014; Onishi y Zandstra, 2015). De igual forma, se ha descubierto un papel destacado de las vías de señalización de la proteína cinasa activada por mitógeno (MEK) y la glucógeno sintasa cinasa 3 (GSK3) en las ESC de ratón, las cuales pueden ser inhibidas por el tratamiento con la combinación de 2i (inhibidor de MEK PD0325901 e inhibidor de GSK3 CHIR99021) que contribuyen en el mantenimiento de la pluripotencia celular (Feng *et al.*, 2009).

En base a evidencia experimental, se ha propuesto una secuencia de eventos moleculares y procesos biológicos que ocurren durante la reprogramación celular hacia un estado pluripotente. Este proceso ha sido dividido en tres fases: iniciación, fase intermedia y maduración, de acuerdo con eventos de regulación negativa de marcadores de superficie específicos de fibroblastos y regulación positiva de genes asociados con la red de pluripotencia (**Figura 7**) (Maherali y Hochedlinger, 2008; David y Polo, 2014; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Apostolou y Stadtfeld, 2018).

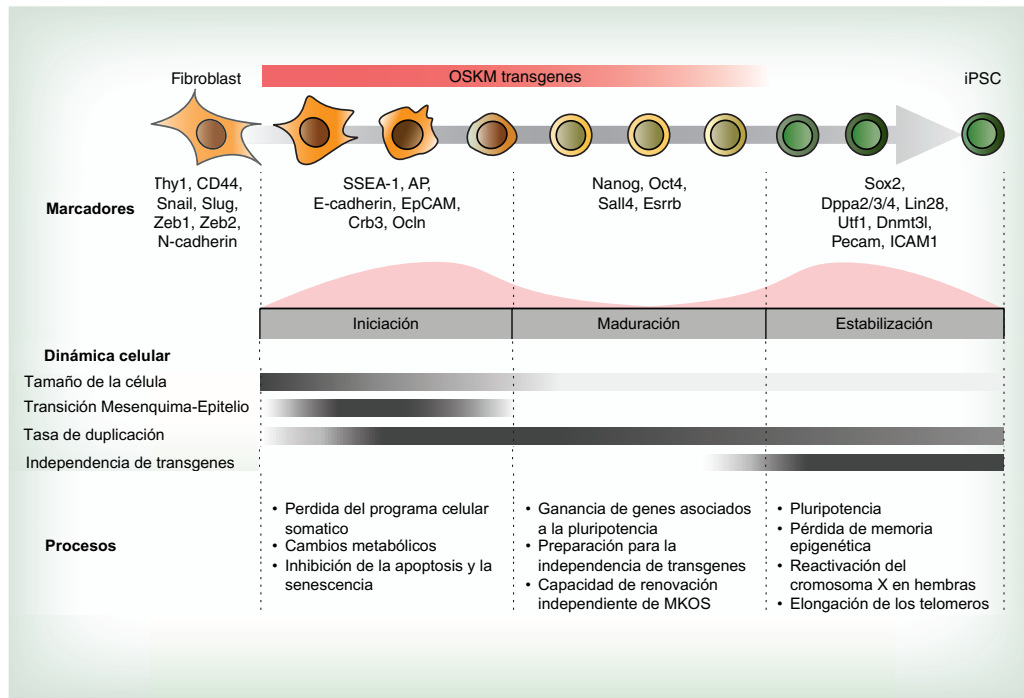


Fig. 7 Eventos moleculares y procesos biológicos que ocurren durante la reprogramación celular hacia un estado pluripotente. En el esquema se muestra el proceso de reprogramación, mismo que se lleva a cabo mediante dos olas de eventos celulares y moleculares ilustrados en color rosa. El proceso también está dividido en tres fases: iniciación, maduración y estabilización, cada una bien caracterizada por marcadores celulares y procesos biológicos que ocurren en cada etapa de la reprogramación de células hacia iPSCs pluripotentes (Modificado de Van den Hurk *et al.*, 2016).

Se ha propuesto también que el proceso se lleva a cabo mediante dos “olas” principales de eventos celulares y moleculares. (Polo *et al.*, 2012; Sancho-Martinez y Izpisua Belmonte, 2013; David y Polo, 2014). La primera ola está impulsada por c-Myc y Klf4, y se caracteriza por la expresión de genes involucrados en la división celular, la replicación del ADN y la transición de un fenotipo mesenquimal a un fenotipo epitelial (MET); durante esta fase las células diferenciadas experimentan cambios en el transcriptoma y la cromatina, mismos que conducen a la eliminación de la identidad de las células diferenciadas y facilitan la adquisición de la pluripotencia. La segunda ola está impulsada por Oct4, Sox2 y Klf4, y es en este tiempo donde las células aumentan la expresión de genes que participan en

el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencia. Las dos olas están separadas por una fase intermedia de cambios graduales que conducen a una mayor expresión de genes involucrados en la transición a la pluripotencia (Polo *et al.*, 2012; Sancho-Martinez y Izpisua Belmonte, 2013; David y Polo, 2014).

En cuanto a las tres fases de reprogramación, el primer evento de la *fase de iniciación* está relacionado a cambios en la morfología, de modo que los fibroblastos experimentan una transición mesenquimatosa a epitelial (MET) (Li *et al.*, 2017). En esta fase las células aumentan la proliferación, adquieren resistencia a la apoptosis y a la senescencia inducidas por el proceso de reprogramación. Molecularmente, esta fase se caracteriza por la pérdida de marcadores somáticos como Snai1/2, Zeb1/2, Thy1 y CD44, y la ganancia de marcadores epiteliales como la expresión de Cdh1, Epcam o la familia miRNA-200 asociada al epitelio, al mismo tiempo que se obtiene la expresión de los marcadores de pluripotencia fosfatasa alcalina y SSEA1 (David y Polo, 2014; Ruetz y Kaji, 2014). Se ha observado que la gran mayoría de las células inician la reprogramación, sin embargo, muchas se vuelven refractarias a ésta y son pocas las células que continúan con las siguientes fases del proceso de reprogramación. Una posible explicación de por qué no todas las células se reprograman podría ser la “inmunidad innata” que desencadena la degradación de proteínas, lo cual puede rescatarse mediante una sobreexpresión adicional de los factores de Yamanaka (Polo *et al.*, 2012).

La *fase de maduración* incluye cambios transcripcionales importantes y está marcada por la aparición de los primeros genes asociados a la pluripotencia. Se ha demostrado que las células adquieren marcadores de pluripotencia de forma secuencial, algunos de los primeros marcadores que se detectan son Fbxo15, Sall4 y Oct4 endógeno, seguidos de Nanog y Esrrb. Una característica importante del evento de reprogramación tardía es la capacidad de las iPSCs para renovarse independientemente de los factores de Yamanaka (David y Polo, 2014; Ruetz y Kaji, 2014).

La *fase de estabilización* abarca los cambios que ocurren en los iPSCs después de que hayan adquirido la pluripotencia. En esta fase es posible detectar Sox2 y Dppa4. Una vez que las células en reprogramación expresan los primeros genes asociados a la pluripotencia, en la fase de maduración, permanecen preparadas y pueden transitar con éxito a la fase de estabilización y adquirir la pluripotencia completa. Por último, en este punto se producen importantes cambios epigenéticos como el alargamiento de los telómeros y la reactivación del cromosoma X inactivo en células de ratones hembra. Claramente, los cambios en los perfiles de metilación del DNA que comenzaron en la fase de maduración tardía continúan durante toda la fase de estabilización y es probable que sean responsables de los eventos asociados con esta fase. (Maherali y Hochedlinger, 2008; David y Polo, 2014).

2.7. Proteínas YAP/TAZ y la vía de señalización Hippo

La vía de señalización Hippo está involucrada en procesos biológicos que promueven la homeostasis en los tejidos, la proliferación celular, la muerte celular y el control en el tamaño de los órganos. Los principales efectores de la vía Hippo son la proteína YAP (Yes-Associated Protein), que posee un motivo de unión a PDZ, y su coactivador transcripcional TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif), que también posee un motivo de unión a PDZ por medio del que se une a YAP (Varelas, 2014).

Biológicamente, YAP/TAZ no son necesarios para la fisiología normal de la mayoría de los órganos adultos, pero desempeñan funciones esenciales en el crecimiento de órganos durante el desarrollo embrionario; promueven la reparación de tejidos después de una lesión en tejidos adultos por medio de la promoción de la proliferación, la supervivencia, el destino celular, la migración celular y el mantenimiento de las células troncales. Dichos procesos desempeñan funciones esenciales para el mantenimiento, la reparación y la homeostasis de los órganos, aunque la desregulación de YAP/TAZ contribuye en una variedad de fenotipos patológicos, especialmente en las características oncogénicas asociadas con cáncer en una amplia gama de tejidos (Lian *et al.*, 2010; Xie *et al.*, 2013; Piccolo *et al.*, 2014; Fu *et al.*, 2017; Kim *et al.*, 2017; Misra y Irvine, 2018; Stampouloglou y Varelas, 2018; Totaro *et al.*, 2018). Se sabe que YAP/TAZ controlan indirectamente la proliferación celular a través de la expresión de genes directamente involucrados en el ciclo celular, así como de las proteínas involucradas en la replicación y reparación del DNA, las ciclinas y sus reguladores, las cinasas mitóticas y los factores necesarios para completar la mitosis (Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018).

La vía Hippo fue descubierta inicialmente en *Drosophila melanogaster* y está compuesta por un conjunto conservado de señales que activan una cascada de residuos de serina y treonina (Yu, Zhao y Guan, 2015; Stampouloglou y Varelas, 2018). En mamíferos, cuando la vía Hippo está activa, las cinasas MST1 y MST2, en complejo con SAV1, fosforilan y activan los supresores tumorales LATS1 y LATS2, que a su vez, ayudadas por el cofactor MOB1, fosforilan directamente a YAP/TAZ, causando así la inhibición de su actividad a través de su retención en el citoplasma mediada por la proteína 14-3-3 y/o la degradación citoplasmática de las proteínas YAP/TAZ (**Figura 8A**). Alternativamente a la vía MST1/2, miembros de la familia de cinasas activadas por mitógeno MAPK4K, fosforilan las proteínas cinasas y activan LATS, lo que resulta en la inhibición de YAP/TAZ. Cuando la vía Hippo está inactiva, YAP/TAZ se translocan al núcleo celular y se unen físicamente al factor de transcripción TEAD, mismo que se une al DNA y promueve la transcripción de sus genes blanco (**Figura 8B**). (Xie *et al.*, 2013; Piccolo *et al.*, 2014; Yu, Zhao y Guan, 2015; Fu *et al.*, 2017; Stampouloglou y Varelas, 2018; Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018).

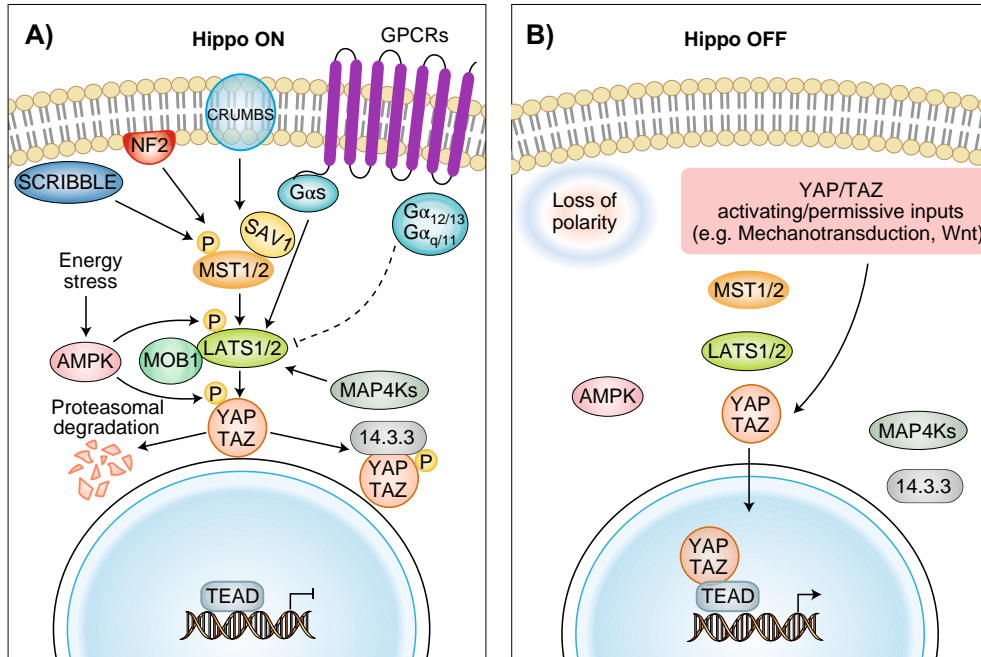


Fig. 8 Vía de señalización Hippo y la regulación de las proteínas YAP/TAZ. Representación esquemática de los componentes ascendentes que activan el módulo central de la vía Hippo, compuesta por las cinasas MST1/2 y LATS1/2. **A)** En el estado “Hippo ON” la vía Hippo se mantiene encendida y promueve la fosforilación de YAP/TAZ, causando su degradación en el proteosoma y/o el secuestro citoplasmático de las proteínas. **B)** En el estado “Hippo OFF”, la vía Hippo se mantiene apagada y YAP/TAZ es liberada de fosforilaciones inhibitorias y puede translocarse al núcleo para llevar a cabo su función de factor de transcripción en unión a TEAD (imagen tomada de Totaro, Panciera y Picolo, 2018).

Como se mencionó antes, la proteína YAP necesita de la unión a su coactivador TAZ para poder ser translocada al núcleo; esta unión se lleva a cabo mediante un dominio de unión a PDZ que ambas proteínas tienen en la región C-terminal. El complejo de proteínas YAP/TAZ en sí no tiene capacidad de unión al DNA, por lo tanto, debe unirse a los factores de transcripción de la familia TEAD que se unen al DNA para estimular la expresión génica (Lian *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010; Piccolo *et al.*, 2014; Varelas, 2014).

Existen diversas señales que se encargan de regular a la vía Hippo, entre las que se encuentran la polaridad celular y las uniones célula-célula, la mecanotransducción dependiente del esqueleto de actina, factores solubles y ligandos de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), el estado metabólico de la célula, así como muchas proteínas que pueden regular las actividades de diferentes componentes de la vía (**Figura 9**) (Yu, Zhao y Guan, 2015; Maugeri-Saccà y De Maria, 2018).

como resultado la activación de YAP/TAZ a través de la remodelación en el citoesqueleto de actina regulado por RhoGTPasas, que inducen la inhibición de las cinasas LATS1/2. Por el contrario, la señalización de GPCR acoplada a G_s provocada por glucagón y epinefrina, o por fármacos como el Dasatinib, la Fluvastatina, el Pazopanib y el Thiazovivin, reprimen la actividad de YAP/TAZ mediante la inhibición dependiente de cAMP/PKA de RhoA-GTPasas que aumentan la actividad de las cinasas LATS1/2 y promueven la fosforilación de YAP/TAZ y su posterior degradación en el proteosoma (Yu *et al.*, 2012; Oku *et al.*, 2015; Yu, Zhao y Guan, 2015; Qin *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018; Stampoulouglou y Varelas, 2018; Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018).

También se sabe que YAP/TAZ están interconectadas con vías de señalización iniciadas por factores de crecimiento solubles, a través de mecanismos recíprocos de regulación que sugieren la existencia de efectores secundarios que integren estas vías de manera autocrina o paracrina, lo cual concuerda con el hecho de que entre los blancos de transcripción de YAP/TAZ se encuentran algunos factores de transcripción como el TGF- α y TGF- β , BMP, EGFR, EGF, la Amfirregulina (AREG) y el Hedgehog (Hh) que participan en la activación de otras vías de señalización (Tschahatganeh *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2017; Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018).

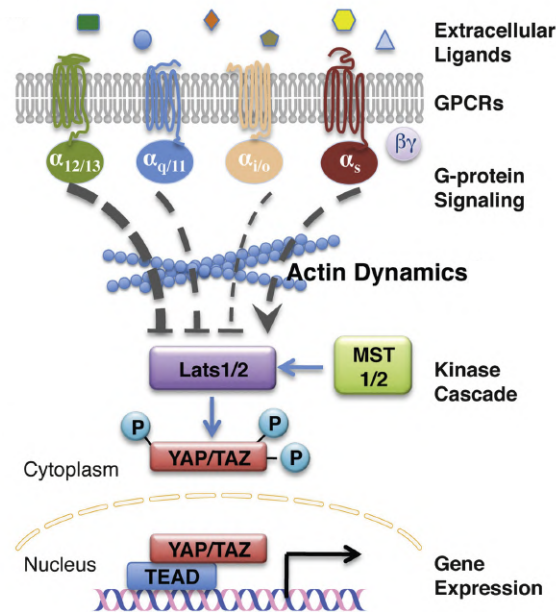


Fig. 10 Modelo de acción de receptores acoplados a proteínas G y su efecto en la regulación de la vía Hippo. La estimulación de los receptores acoplados a $G_{12/13}$, $G_{q/11}$ o $G_{i/o}$ por múltiples ligandos, dan como resultado la activación de YAP/TAZ a través de la remodelación en el citoesqueleto de actina que induce la inhibición de las cinasas LATS1/2. Por el contrario, la señalización acoplada a G_s reprime la actividad YAP/TAZ mediante el aumento en la actividad de las cinasas LATS1/2 (tomado de Yu *et al.*, 2012).

2.8. Interacción entre YAP/TAZ y las vías de señalización Notch y Sonic Hedgehog

Se sabe que la vía de señalización Hippo tiene relación con una red amplia de vías de señalización mediante cross-talk directo o activación secuencial de genes diana, entre las que se incluyen las vías Notch y Sonic Hedgehog (SHh), siendo éstas un posible blanco para el estudio de la activación o inhibición de la proteína YAP endógena.

Por su parte, la vía de señalización Notch está involucrada en el desarrollo de múltiples tejidos, y regula eventos celulares como la proliferación, la migración, la supervivencia, la diferenciación, la muerte celular programada (apoptosis) y el mantenimiento de células troncales (Kim *et al.*, 2017; Totaro *et al.*, 2018); de modo que entre Hippo y Notch existe una relación debido a que ambas vías están implicadas en los mismos procesos celulares. Existen dos modalidades principales por las cuales se ha informado que las cascadas de señalización de YAP/TAZ y Notch interactúan: la primera describe la regulación mediada por YAP/TAZ de ligandos y receptores Notch, esto debido a que la activación de YAP/TAZ puede inducir la expresión génica de los receptores y/o ligandos de Notch, de modo que la célula que mantiene activos a YAP/TAZ también mantiene altos niveles de receptores y ligandos, lo que desencadena la activación de la señalización de Notch en las células vecinas y a la vez protege a la misma célula que posee altos niveles de YAP/TAZ de recibir la señalización de Notch (**Figura 11A**) (Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018; Totaro *et al.*, 2018).

La segunda modalidad plantea la activación simultánea de la señalización de YAP/TAZ y de Notch, lo que induce la translocación nuclear de YAP/TAZ y del dominio intracelular de Notch (NICD), que en conjunto, regulan la expresión de genes diana comunes (**Figura 11B**) (Totaro *et al.*, 2018). Además, existen estudios que demuestran que la activación nuclear de YAP/TAZ regula positivamente la expresión de NICD, el ligando Jagged-1 y la activación de genes diana típicos de Notch que desencadenan en la activación de la señalización de Notch *in vitro* e *in vivo* (Tschaharganeh *et al.*, 2013), y que la activación secuencial anormal de la señalización de YAP y Notch forman un circuito de retroalimentación positiva que promueve la hepatomegalia y el inicio rápido de tumores en cancer hepatocelular (Tschaharganeh *et al.*, 2013; Kim, *et al.*, 2017).

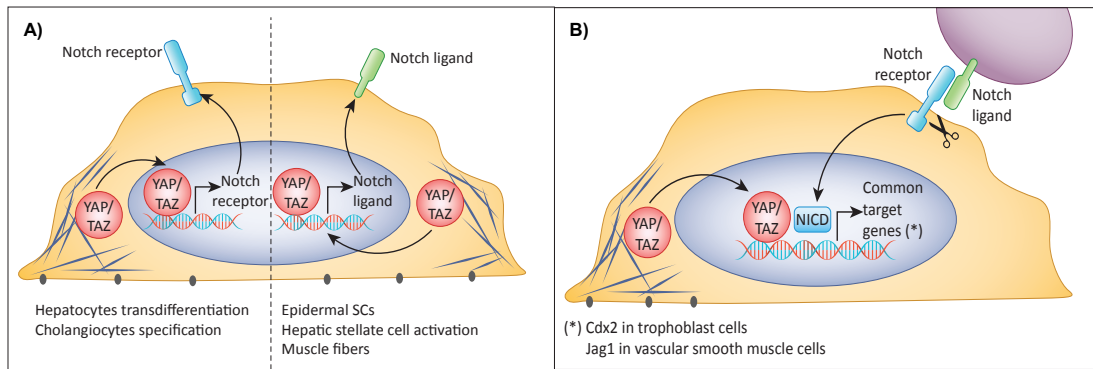


Fig. 11 Posibles mecanismos de interacción entre YAP/TAZ y la vía de señalización Notch.

A) Cuando se activan YAP/TAZ (rojo), se translocan al núcleo, donde pueden inducir la expresión génica de los receptores Notch (azul, lado izquierdo) y/o ligandos de Notch (verde, lado derecho) para regular la señalización de Notch. **B)** La activación simultánea de YAP/TAZ y la señalización de Notch induce la translocación nuclear de YAP/TAZ y del dominio intracelular de Notch (NICD), regulando así de forma cooperativa la expresión de genes diana comunes (tomado de Totaro *et al.*, 2018).

Por su parte, la vía de señalización Sonic Hedgehog es una ruta clave en el desarrollo y diseño de patrones embrionarios, y es extremadamente importante en el diseño y diferenciación de extremidades en vertebrados, la diferenciación neural, el desarrollo de la retina y el páncreas, y la morfogénesis craneofacial, entre muchos otros procesos (Gilbert y Barresi, 2016). Es bien sabido que el control de la densidad celular es de suma importancia para el desarrollo embrionario adecuado y para la determinación del tamaño de los órganos. Así, se sabe que, en cultivo celular, la señalización de SHh depende de los contactos de célula a célula y la actividad de la vía de SHh solo se puede lograr en condiciones de confluencia.

Al igual que la vía Hippo, SHh está controlada por la densidad celular y la inhibición por contacto, es por ello que existe una interferencia entre las dos vías, de manera que cuando existe una alta densidad celular, la vía SHh se mantiene encendida, al igual que la vía Hippo, lo que resulta en la inactivación de YAP/TAZ, por el contrario, cuando existe una baja densidad celular, ambas vías se apagan y YAP/TAZ puede activarse (Tariki, *et al.*, 2014). Existen reportes que indican que la supresión de la señalización de SHh en ausencia de contactos celulares esta mediada por YAP, y que la sobreexpresión de YAP bloquea la señalización de SHh; mientras que la eliminación de YAP mediada por interferencia de ARN aumenta la actividad de SHh. A pesar de ésta regulación negativa, la señalización SHh promueve la actividad de YAP a través de mecanismos postranscripcionales, lo que resulta en un circuito de retroalimentación negativa (Tariki, *et al.*, 2014).

Se ha reportado que la expresión del protooncogén Bmi1 conduce a la transdiferenciación de MEFs en células similares a células troncales neurales; además, en combinación con Oct3/4, Bmi1 puede reemplazar a Sox2, Klf4 y c-Myc durante la reprogramación de fibroblastos en iPSCs. Se sabe

también que SHh induce la activación de Bmi1, por lo que la activación de la señalización de SHh compensa los efectos de Bmi1 y, en combinación con Oct4, es capaz de reprogramar fibroblastos embrionarios y adultos de ratón en células iPSC (Moon *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2014).

Debido a los reportes anteriores, se sugiere que estudiar a las vías de señalización de Notch y/o SHh brinda una forma alternativa para estudiar la activación o inhibición de YAP/TAZ, y permiten el estudio del papel que juega YAP durante el proceso de reprogramación celular.

2.9. Interacción entre YAP/TAZ y la oncoproteína E6

Diferentes reportes sugieren que altos niveles de YAP/TAZ están asociados con un mal pronóstico de cáncer y que HPV-16 E6 estabiliza y regula positivamente a YAP al prevenir su degradación. Esto sugiere que la desregulación mediada por E6 de la vía Hippo juega un papel importante en la carcinogénesis inducida por el VPH (He, *et al.*, 2015). Se sabe que las oncoproteínas E6 de VPH-16 tienen un dominio de unión a PDZ (PBM) en el extremo carboxilo terminal, por lo que pueden interactuar con proteínas que poseen un dominio PDZ en su estructura. Recientemente se ha implicado a los PBM de E6 en la activación y la translocación nuclear de los coactivadores transcripcionales YAP y TAZ (Choi *et al.*, 2014; Strickland *et al.*, 2018).

Se ha reportado que el factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la anfiregulina (AREG), a través del receptor membranal EGFR, inhiben la vía de señalización de Hippo por medio de la inactivación de LAT1/2 y activan YAP para inducir la proliferación y migración de células de cáncer de cuello uterino (**Figura 12**). Se ha descubierto también, que E6 mantiene altos niveles de proteína YAP en las células de cáncer cervical al prevenir la degradación de YAP dependiente de proteosoma, además, por medio del dominio PBM puede unirse a YAP en su dominio PDZ y translocarlo al núcleo en un proceso independiente de TAZ, resultando en la transcripción de TGF- α , AREG y EGFR, y formando un circuito de señalización positivo para promover la proliferación de células de cáncer de cuello uterino (He *et al.*, 2015).

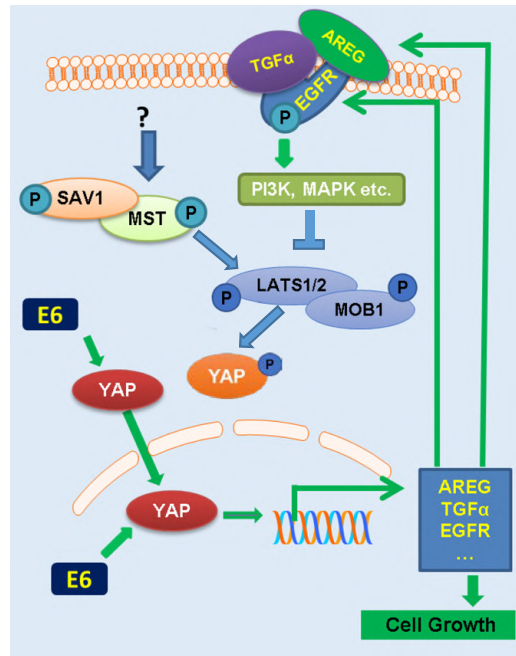


Fig. 12 Esquema que muestra la relación entre las vías de señalización de HPV, Hippo y EGF en el cáncer de cuello uterino. El factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la anfiregulina (AREG), a través del receptor membranal EGFR, inhiben la vía de señalización de Hippo por medio de la inactivación de LAT1/2, en consecuencia, activan a YAP para ser translocado al núcleo. E6 puede unirse a YAP por medio de su dominio PDZ y translocarlo al núcleo en donde induce la transcripción de TGF- α , AREG y EGFR, formando un circuito de señalización positivo para promover la proliferación y migración de las células (tomado de He *et al.*, 2015).

3. Antecedentes

3.1. Construcción del vector de reprogramación MKOS

Martínez Sarmiento (2016) en su tesis de maestría desarrollo un nuevo vector de reprogramación celular con el que se obtuvieron eficiencias de reprogramación mayores a las reportadas anteriormente. Martínez Sarmiento construyó un vector policistrónico que expresa MKOS en respuesta a la inducción con doxiciclina, mismo que se conoce como MKOS-booster (Covarrubias, 2020).

El vector MKOS-booster es un transposón piggyBac que está compuesto por las secuencias TRE-MKOS-PGK-VENUS-IRES-rtTA (**Figura 13**) y está basado en una construcción reportada anteriormente denominada TtRMPVIR, la cual contiene la secuencia PGK-VENUS-IRES-rtTA (Zuber *et al.*, 2011). Ambos vectores utilizan el sistema de inducción Tet-On en el cual la expresión del transactivador reverso de tetraciclina (rtTA), se activa en respuesta a doxiciclina y activa la expresión de los genes asociados al promotor dependiente del elemento de respuesta a tetraciclina (TRE); activando así, la expresión de los genes reprogramadores codificados en el cassette policistrónico del vector MKOS-booster, que contiene la secuencia c-Myc-F2A-Klf4-T2A-Oct4-E2A-Sox2, tomada del vector PB-TAP-Insx2attP2LMKOSimO generado por Kaji y colaboradores en 2009. En la secuencia, los genes reprogramadores están intercalados por los pequeños péptidos de auto escisión F2A, T2A y E2A, encargados de realizar un corte en la secuencia entre los genes río arriba y río abajo del péptido 2^a, posterior a la transcripción de la secuencia.

El vector MKOS-booster expresa constitutivamente a la proteína fluorescente Venus y al rtTA, dirigidos por el promotor de expresión ubicua pGK en ausencia de inducción. Al añadir doxiciclina, se forma el complejo doxiciclina-rtTA que se une al promotor TRE y activa la expresión de los genes reprogramadores.

El vector posee un único sitio poli-A ubicado hacia el final del vector, por lo que se genera un transcrito largo que interrumpe la expresión dirigida por el promotor PGK y termina con la transcripción. El complejo doxiciclina-rtTA produce la generación de un bucle de retroalimentación positiva que produce más rtTA en presencia de doxiciclina, al unirse el complejo con el promotor TRE se genera un transcrito largo (MKOS-pGK-VENUS-IRES-rtTA) que provoca la expresión elevada de los genes reprogramadores y a la vez, interrumpe la expresión del módulo dirigido por el promotor PGK, teniendo como consecuencia la atenuación de la fluorescencia debido a la disminución de la expresión de Venus.

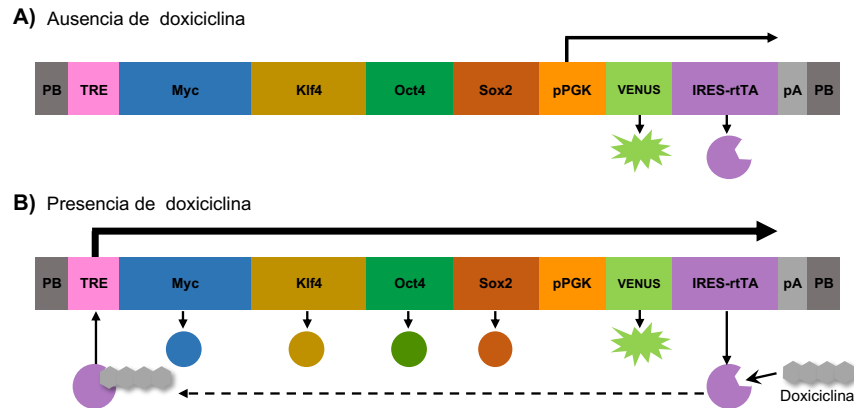


Fig. 13 Esquema del vector policistrónico MKOS-booster. El vector está codificado dentro de un transposón piggyBag (PB). **A)** En ausencia de doxiciclina, el promotor pPGK induce la traducción de la proteína fluorescente VENUS y del transactivador rtTA. **B)** En presencia de doxiciclina, ésta se une al rtTA formando un complejo activador que se une al promotor TRE e induce la traducción de los genes Myc, Klf4, Oct4 y Sox2. En ambos mecanismos la traducción termina por el sitio poli-A (PA) que se encuentra al final del vector.

El vector presenta varias ventajas frente a otro tipo de vectores:

- I. El transposón policistrónico evita las complicaciones de utilizar varios vectores a la vez ya que los cuatro genes reprogramadores y el transactivador se encuentran codificados en el mismo vector.
- II. Al ser un vector inducible con doxiciclina, se genera un efecto de auto-regulación positiva y permite tener una expresión controlada de los factores reprogramadores.
- III. No depende del uso de una línea celular específica.
- IV. Es más seguro, pues el uso de oncogenes en vectores virales implica riesgos para el usuario.

3.2. Inducción de la reprogramación con el vector MKOS

En 2016, Martínez Sarmiento evaluó la capacidad del sistema autoinducible MKOS-booster para inducir reprogramación celular en fibroblastos murinos embrionarios (MEFs) de la cepa CD1 y estableció el protocolo de reprogramación usado en el laboratorio (**Figura 14A**).

Como consecuencia de la inducción de los transgenes MKOS, se observó el surgimiento de cúmulos de fibroblastos en proliferación rápida que se caracterizan por ser de menor tamaño que el resto de los fibroblastos, estos cúmulos aparecieron alrededor de los 4 días de inducción. Posterior a ello se observa que la mayoría degeneran, mientras que los restantes son aquellos que transitan hasta formar colonias tipo iPSC, las cuales maduran después de los 10 días de inducción con doxiciclina

(Figura 14B), estas colonias presentan la morfología típica de las células iPSC y son positivas para la actividad de fosfatasa alcalina, un marcador de pluripotencia.

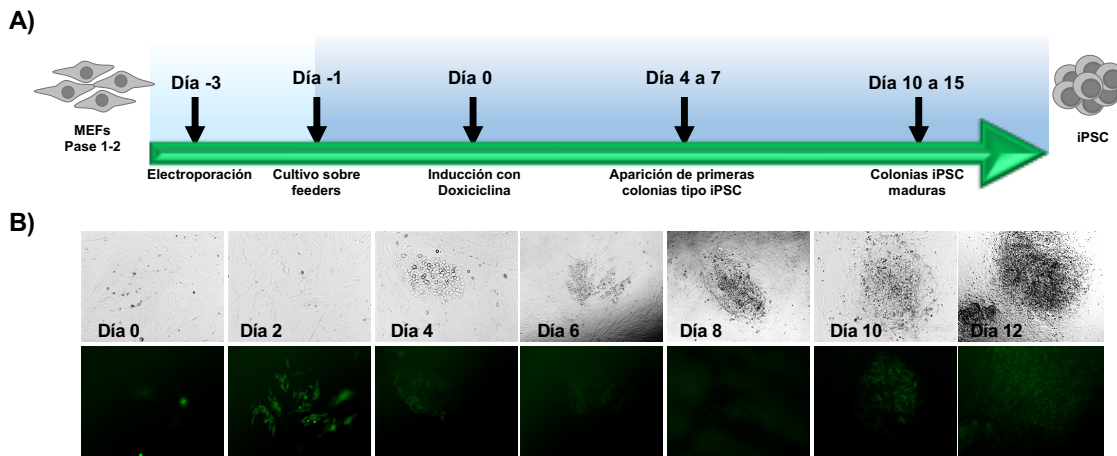


Fig. 14 Proceso de reprogramación de MEFs hacia iPSCs mediado por el vector MKOS-booster. A) Proceso general de reprogramación: MEFs son transfectadas mediante electroporación con el vector MKOS-booster y se mantienen en cultivo por 2 días, posteriormente, se siembran sobre una monocapa de células alimentadoras. Al día siguiente, el cultivo es complementado con Lif 10 ng/mL y las células son inducidas con doxyciclina a la concentración 150 ng/mL o 1.5 µg/mL. Al día 4 de inducción con doxyciclina comienzan a aparecer agrupaciones con potencial de formar colonias tipo iPSC, las cuales comienzan a formarse del día 4 al 7 y para el día 10-15 forman colonias iPSC maduras. B) Dinámica de reprogramación: las células transfectadas con MKOS-booster presentan expresión ubicua de la proteína verde fluorescente Venus que permite monitorear el proceso de reprogramación a lo largo del tiempo. Las células son inducidas con doxyciclina al día 0 y para el día 4 de inducción se observa la aparición de las primeras colonias tipo iPSC, mismas que maduran al día 12 de inducción.

Fueron evaluadas dos concentraciones de doxyciclina: 150 ng/mL y 1.5 µg/mL, con el objetivo de encontrar la dosis óptima de inducción para generar colonias iPSCs y se observó que la respuesta a la inducción con doxyciclina es similar a ambas concentraciones. Las eficiencias de reprogramación obtenidas fueron de 0.31% a la concentración de 150 ng/mL y de 0.48% a la concentración 1.5 µg/mL, lo cual sugiere que el porcentaje de células reprogramadas por el sistema MKOS-booster a partir de fibroblastos no aumenta drásticamente frente a lo reportado con otros vectores, sin embargo, el uso de este vector facilita la transfección de las células y permite que el uso de los genes reprogramadores sea controlado.

3.3. Construcción del vector E6/E7

Como se mencionó anteriormente, los oncogenes E6 y E7 de HPV actúan en diferentes puntos de control del ciclo celular. En 2008, Valencia y colaboradores trabajaron con ratones de la línea transgénica Tg(bK6-E6/E7), que expresa transitoriamente en la capa supra basal de la epidermis, los

3.4. Inducción de la reprogramación con los vectores MKOS-booster y E6/E7

Debido a que los oncogenes E6/E7 inducen la reentrada al ciclo celular y degradan las proteínas P53 y RB, respectivamente, se planteó la posibilidad de aumentar la eficiencia de reprogramación al combinar E6/E7 con los genes reprogramadores MKOS. Para probarlo, Valencia y Cortés realizaron pruebas preliminares en donde transfectaron MEFs de las cepas CD1 y C57BL/6, con ambos plásmidos, y los reprogramaron hacia células iPSC mediante la inducción con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/m, observando que s eficiencias se ven aumentadas, comparado con los resultados obtenidos al reprogramar únicamente con los genes MKOS y con los datos reportados anteriormente. Lo anterior indica que la combinación de ambos vectores mejora la eficiencia de reprogramación, sin embargo, esta sigue siendo menor al 10%, por lo cual, aun quedan mejoras que realizar en el sistema para lograr obtener una eficiencia de reprogramación mayor.

4. Planteamiento del proyecto

Debido a los antecedentes preliminares obtenidos en el laboratorio, los cuales nos indican que la combinación entre los genes reprogramadores *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, y los oncogenes E6/E7 de VPH-16 aumentan la eficiencia de reprogramación de MEFs hacia células iPSC. Además de la actividad de los oncogenes que aporta efectos positivos que contrarrestan los dos principales frenos en la reprogramación, por un lado, E6 estimula la degradación de la proteína p53, y a la vez, E7 estimula la replicación y la división celular por medio de la unión e inactivación de la proteína RB (Yim y Park, 2005; Vallejo-Ruiz *et al.*, 2014).

Se propone que el uso de una combinación de factores que promuevan la reentrada al ciclo celular, junto con la acción de los genes reprogramadores MKOS, pueden facilitar la reprogramación, desdiferenciación y/o transdiferenciación de las células. Es por ello que en este proyecto se planea determinar la capacidad de los oncogenes E6 y E7 para promover la reprogramación hacia células iPSC tanto de células en proliferación como de células posmitóticas mediada por MKOS. También se plantea el estudio de la posible participación de la proteína YAP inducida por acción de E6 y E7 sobre la reprogramación celular.

5. Hipótesis

Los oncogenes E6 y/o E7 de VPH-16 potenciarán la reprogramación mediada por MKOS en células senescentes.

6. Objetivo principal

Determinar la capacidad de los oncogenes E6 y E7 de VPH para promover la reprogramación mediada por MKOS hacia iPSCs en células senescentes y valorar la posible participación de la proteína YAP.

6.1. Objetivos particulares

- 1) Construir dos vectores que expresen por separado los oncogenes E6 y E7 de VPH-16, con el fin de estudiar por separado los efectos que cada oncogén produce sobre el proceso de reprogramación celular.
- 2) Determinar la eficiencia de reprogramación de fibroblastos en fase de proliferación y posmitóticos.
- 3) Comparar la eficiencia de reprogramación de los fibroblastos en presencia de los oncogenes E6/E7, E6 y E7, mediados por MKOS.
- 4) Evaluar la contribución de YAP a los efectos de E6 y E7, y sobre la reprogramación celular.

7. Materiales y métodos

7.1. Reactivos

7.1.1. Medio DMEM

(Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO).

- I. Disolver el contenido del sobre en 900 mL de agua MilliQ.
- II. Añadir 3.7 g de bicarbonato de sodio y disolver.
- III. Ajustar pH a 6.9 con ácido clorhídrico 1N.
- IV. Aforar a 1L con agua MilliQ y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 μm .

7.1.2. Medio M10

(Empleado para el cultivo regular de células).

- I. Medio DMEM suplementado con los siguientes reactivos:
- II. 10% Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO).
- III. 1% GPS 1X (Glutamax, Penicillin and Streptomycin, GIBCO, Stock 100X).
- IV. 1% Aminoácidos no esenciales 1X (GIBCO, Stock 10X).
- V. 1% Piruvato de sodio 1X (GIBCO, Stock 10X).

7.1.3. Medio M15

(Empleado para el cultivo de células en reprogramación y células iPSCs)

- I. Medio DMEM suplementado con los siguientes reactivos:
- II. 15% Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO).
- III. 1% GPS 1X (Glutamax, Penicillin and Streptomycin, GIBCO, Stock 100X).
- IV. 1% Aminoácidos no esenciales 1X (GIBCO, Stock 10X).
- V. 1% Piruvato de sodio 1X (GIBCO, Stock 10X).
- VI. Añadir 180 μL de β -mercaptoetanol (GIBCO) por cada 100 mL de medio a preparar (concentración final 100 μM).

Al momento de inducir la reprogramación suplementar con:

- VII. Lif 10 ng/mL (Leukemia Inhibitory Factor, Millipore).
- VIII. Doxiciclina 150 ng/mL o 1.5 $\mu\text{g/mL}$

7.1.4. Medio 2i

(Para cultivo de células ESC)

- I. Medio M15 suplementado con:
- II. Lif 10 ng/mL (Leukemia Inhibitory Factor, Millipore).
- III. PD03259010 (1 mM) 480 $\mu\text{g/mL}$
- IV. CHIR99021 (3 mM) 1.39 mg/mL

7.1.5. Medio de congelación

(Para la conservación de células y líneas celulares).

- I. 60% Medio DMEM
- II. 20% Suero Bovino Fetal (SBF, GIBCO).
- III. 20% DMSO (Dimethyl sulphoxide, SIGMA).

7.1.6. PBS

(Phosphate Buffered Saline, 10X).

- I. 8 g de NaCl
- II. 0.2 g de KCl
- III. 1.44 g de Na₂HPO₄
- IV. 0.2 g de KH₂PO₄
- V. Disolver en 900 mL de agua MilliQ, aforar a 1L y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.
- VI. Para usar en cultivo a 1X se hace una dilución 1:10 con agua MilliQ.

7.1.7. Gelatina 0.1%

(Para recubrir las cajas de cultivo celular).

- I. Disolver 1 g de gelatina (Gelatin from porcine skin, type A, SIGMA) en agua MilliQ mediante calentamiento en el horno de microondas para obtener un stock al 1%.
- II. Esterilizar en autoclave.
- III. Para usar en cultivo a 0.1% hacer una dilución 1:10 con agua MilliQ.

7.1.8. LIF

(Leukemia Inhibitory Factor, Millipore).

- I. Disolver en 1 mL de BSA 1% (en PBS 1X), concentración final es de 1000 U/mL.
- II. Utilizar a una concentración final de 10 ng/mL.

7.1.9. Tripsina 0.25%

- I. Trypsin (GIBCO, stock 2.5%), diluir 1:10 con Verseno (GIBCO) para obtener una concentración final 0.25% para usar en cultivo.

7.1.10. Mitomicina C

(Mitomycin C, ROCHE).

- I. Disolver el contenido del vial (2 mg) en 4 mL de PBS 1X estéril, mantener protegido de la luz.
- II. Utilizar a una concentración final de 10 µg de mitomicina por cada 1 mL de medio.

7.1.11. Paraformaldehído 4%

- 1) Para preparar 100 mL de PFA: pesar 4 g de paraformaldehído (SIGMA) y disolver en 50 mL de agua DPEC caliente, aproximadamente a 60°C, y en la campana de extracción, ya que es muy irritante.
- 2) Agregar de 5 a 10 µL de NaOH 5N y dejar agitando hasta que se aclare.
- 3) Añadir 50 mL de PBS 2X.
- 4) Ajustar pH a 7.4
- 5) Dejar enfriar y esterilizar por filtración, NO autoclavar.
- 6) Hacer alícuotas y guardar a -20°C.

7.1.12. TAE (Tris Acetato EDTA) 10X

(Tris Acetato EDTA) 10X, 1L.

- 1) 48.5 g de Tris base
- 2) 11.42 mL de ácido acético glacial
- 3) 20 mL de EDTA 0.5M pH 8.0
- 4) Mezclar y aforar a 1L con agua MilliQ.

7.2. Métodos de rutina

7.2.1. Cultivo celular

- 1) Descongelar un vial de MEFs colocándolo en un baño a 37°C hasta que la mayor parte esté descongelada.
- 2) Transferir la suspensión celular a un tubo de 15 mL estéril y adicionar 5 mL de medio M10.
- 3) Resuspender y disgregar las células, tomar 10 µL de la suspensión para el conteo celular.
- 4) Centrifugar las células a 1200 rpm durante 5 min.
- 5) Aspirar el sobrenadante y resuspender las células en 1mL de M10, sembrar 1×10^6 de células en caja de 10 cm.
- 6) Incubar las células a 37°C y 5% de CO₂.

7.2.2. Pases celulares

- 1) Retirar el medio de cultivo.
- 2) Lavar 2 veces con PBS 1X.
- 3) Agregar 1 mL de tripsina-EDTA al 0.25% en una caja de 10 cm.
- 4) Incubar a 37°C y 5% de CO₂ de 3-5 min, al finalizar se dan golpes suaves alrededor de la caja.
- 5) Inactivar la tripsina con un volumen igual de medio de cultivo adicionado con SFB 10%.
- 6) Resuspender y disgregar las células, tomar 10 µL de la suspensión para el conteo celular.
- 7) Centrifugar las células a 1200 rpm durante 5 min.
- 8) Resuspender las células y sembrar.

7.2.3. Conteo celular

- 1) Realizar una mezcla con 10 μL de azul de tripano y 10 μL de la suspensión celular.
- 2) Cargar ambas gradillas de la cámara de Neubauer y observar al microscopio.
- 3) Contar las células contenidas en los cuatro cuadrantes de ambas gradillas, descartando las células teñidas de color azul.
- 4) El número total de células en suspensión se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$X * 2 * 10,00 * Y = \text{Total de células en suspensión}$$

En donde:

X: Número total de células observadas por cuadrante en la cámara de Neubauer.

2: Factor incluido por la disolución 1:1 con azul de tripano.

10,000: Constante de la cámara de Neubauer.

Y: Volumen de medio en el que se resuspendió el botón celular.

7.2.4. Generación de feeders

- 1) Descongelar un vial de MEFs en dos cajas de 10 cm y dejar que llegue a confluencia.
- 2) Mitomizar añadiendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de Mitomicina C en medio DMEM 10%, dejar en incubación a 37°C y 5% de CO_2 durante 4 horas.
- 3) Pasado el tiempo lavar 3 veces con PBS 1X para eliminar Mitomicina.
- 4) Tripsinizar y sembrar las células sobre cajas recubiertas de gelatina 0.1% a una densidad de 15,000 células/ cm^2 o congelar en crioviales.
- 5) Mantener las células en medio DMEM 10% hasta el momento de su uso.

7.2.5. Cuantificación de la tasa de proliferación

Para calcular el número de divisiones celulares por unidad de tiempo se utilizó la siguiente fórmula:

$$N_t = N_0 2^{tf}$$

En donde:

N_t : Número de células en el tiempo t

N_0 : Número inicial de células

t : tiempo en días

f : frecuencia de ciclos celulares por unidad de tiempo (1/día)

De esta ecuación se despeja **f** para obtener el número de divisiones por unidad de tiempo:

$$f = \frac{\log_2 \left(\frac{N_t}{N_0} \right)}{t}$$

7.2.6. Tinción con fosfatasa alcalina

SIGMA-ALDRICH alkaline phosphatase 86R-1KT Leukocyte kit

- I. Fijar células con PFA 4%.
- II. Lavar las células con agua destilada.
- III. Mezclar 100 μ L de solución de Nitrito de Sodio y 100 μ L de la solución de FRV-Alkaline proveída en el kit, invirtiendo los tubos e incubando por 2 mL.
- IV. Mezclar 4.5 mL de agua destilada y 100 μ L de solución Alcalina Naftol AS-BI.
- V. Mezclar las soluciones preparadas en los puntos 3 y 4.
- VI. Después de lavar las células, añadir la solución preparada en el punto 5 e incubar a temperatura ambiente por 15 min.
- VII. Retirar la solución y lavar las células con agua destilada. Retirar el agua y agregar agua destilada fresca e incubar por 2 min. Después de agitar gentilmente, secar las células.

NOTA: Las colonias positivas a fosfatasa alcalina serán teñidas rojo/violeta, mientras que las colonias no reprogramadas o diferenciadas mostrarán una tinción débil o en mosaico.

7.2.7. Inmunocitoquímica

Tomada del protocolo de Abcam

- 1) Retirar el medio de cultivo.
- 2) Lavar 2 veces con PBS.
- 3) Fijar las células con PFA 4% en PBS pH 7.4 por 15 min.
- 4) Realizar 2 lavados con PBS por 5 min c/uno.
- 5) Permeabilizar con Tritón 100X al 0.3% en PBS por 10 min.
- 6) Lavar una vez con PBS por 5 min.
- 7) Incubar con solución de bloqueo (Suero al 5% y Tritón 100X al 0.1% en PBS) durante 30 min a 4°C.
- 8) Incubar las células con el Anticuerpo Primario (Suero al 1% y Tritón 100X al 0.1% en PBS) en cámara húmeda O/N a 4°C.
- 9) Lavar 2 veces con PBS por 5 min c/uno.
- 10) Incubar con el Anticuerpo Secundario (Suero al 2% y Tritón 100X al 1%) durante 2 horas a T/A.
- 11) Lavar 2 veces con PBS por 5 min c/uno.
- 12) Teñir núcleos con DAPI a la concentración 1:15,000 por 2 min.
- 13) Si se pretende conservar la inmunocitoquímica por varios días se recomienda lavar con PBS y agregar unas gotas de Anticongelante.

7.2.8. Microscopía de fluorescencia y adquisición de imágenes

Las imágenes fueron obtenidas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss Axio Observer.Z1 usando la cámara AxioCamMR3. Se utilizó el objetivo EC Plan-Neofluar 10X/0.30 y el software AxioVision LE.

Se utilizaron los siguientes filtros:

- 02 Dapi: Filtro de excitación G 365 nm; Espejo dicróico FT 395 nm; Filtro de emisión LP 420 nm.
- 20 Rhodamine: Filtro de excitación BP 546/12 nm; Espejo dicróico FT 560 nm; Filtro de emisión BP 575-640 nm.
- 46 Yellow Fluorescent Protein: Filtro de excitación BP 500/20 nm; Espejo dicróico 515 nm; Filtro de emisión 535-30 nm.
- 50 Cy5: Filtro de excitación BP 640/30 nm; Espejo dicróico FT 660 nm; Filtro de emisión 690/50 nm.

7.2.9. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP

Se cuantificó la intensidad de la fluorescencia (IF) de la proteína YAP, en la región nuclear y citoplasmática de MEFs transfectados con las cuatro combinaciones de plásmidos evaluados (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), inducidos durante 48 h con doxiciclina 1.5 µg/mL más inhibidores o promotores de la actividad de la proteína YAP (LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%). La IF se cuantificó a partir de imágenes de epifluorescencia como una aproximación de la abundancia de la proteína, al realizar una inmunocitoquímica contra la proteína YAP; para ello se seleccionaron cuadrados de 20 x 20 µm que cubren una región de interés dentro de la región citoplasmática o nuclear, de diferentes células bajo cada tratamiento evaluado (hasta 20 células por tratamiento experimental). Las mediciones de la IF reportadas corresponden a la intensidad de fluorescencia promedio, de la diferencia entre la región nuclear y la citoplasmática analizados, calculados con el software image J. Los análisis estadísticos se realizaron con prueba de comparación múltiple, después por Tukey. Las diferencias con un valor de P <0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

7.2.10. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron analizados con el Software Prisma (Graph Pad Prism5 Software Inc., USA). Los resultados obtenidos fueron presentados como la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes (n=3). El valor p fue analizado por ANOVA y posteriormente por la prueba Tukey. Las diferencias con un valor de p < 0.05 se consideraron estadísticamente significativas.

7.3. Protocolos principales

7.3.1. Construcción de los vectores E6 y E7

(Para ver los mapas de los plásmidos consultar los **Anexos 1 y 2**)

I. PCR para amplificación de vectores

Mix Primers (fwr + rvr)	0.3 µL
Buffer de Mg ²⁺	1.5 µL
Mix dNTPs	0.3 µL
Taq DNA polimerasa	0.06 µL
Templado DNA	1.5 µL

- 2) Incubar la mezcla del gel a 50-60°C por 10 min hasta que el gel esté completamente disuelto. Mezclar el tubo por inversión y vortexear brevemente. Checar el color de la muestra, amarillo indica pH óptimo para la obtención de DNA, color naranja o violeta, añadir 10 µL de acetato de sodio 3M pH 5.2 y mezclar, el color debe cambiar a amarillo.
- 3) Transferir la mezcla completa o hasta 800 µL, a una columna de purificación GeneJET y centrifugar 1 min a 5,000 rpm. Decantar el sobrenadante.
- 4) Añadir 700 µL de Wash Buffer a la columna GeneJET y centrifugar 1 min a 5,000 rpm. Decantar el sobrenadante.
- 5) Centrifugar la columna vacía una vez más por 1 min a 10,000 rpm, para remover por completo los residuos.
- 6) Transferir la columna GeneJET a un tubo eppendorf de 1.5 mL limpio. Añadir 50 µL de Elution Buffer a la columna, justo en el centro, esperar 1 min y centrifugar 2 veces por 1 min a 10,000 rpm.
- 7) Descartar la columna GeneJET y almacenar DNA a -20°C.
- 8) Medir concentración de DNA.

V. Ligación de fragmentos

- 1) Concentrar los fragmentos de DNA (vector e inserto) digeridos con enzimas de restricción a 100-200 ng/µL en H₂O.

Mezcla de ligación (relación 2:1 o 4:1 Vector:Inserto)

Vector 100-200 ng/µL

Inserto 20-40 ng/µL

Buffer de ligación 10X 1 µL

Enzima ligasa 0.2 µL

H₂O Llevar a 10 µL

- 2) Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- 3) Pasado el tiempo, inactivar la ligasa a 65°C por 10 min a 70°C por 5 min.
- 4) Purificar DNA usando el kit de purificación de PCR GeneJET.

VI. Transformación de bacterias

- 1) Descongelar vial de bacterias electrocompetentes.
- 2) Adicionar 1-5 ng de DNA superenrollado a las bacterias.
- 3) Añadir a una celda de electroporación y dar un pulso de 1.8 milivolts en el electroporador.
- 4) Inmediatamente añadir 1 mL de medio LB + 10 µL de glucosa 2m + 10 µL de Mg²⁺ 2M.
- 5) Incubar en agitación a 37°C por 1 hora.
- 6) Pasado el tiempo, sembrar sobre placa solida de medio LB + ampicilina
- 7) Incubar O/N a 37°C.
- 8) Al día siguiente, si crecieron colonias, picar algunas y poner a crecer por 6 horas en medio LB + ampicilina a 37°C.
- 9) Pasado el tiempo extraer plásmido con kit Miniprep.

7.3.2. Purificación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

Tomado del protocolo del laboratorio de la Doctora Diana Escalante

- 1) Disectar en PBS embriones de 12.5-14.5 días de desarrollo, cuidando de enjuagarlos bien para evitar contaminación proveniente de la hembra.
- 2) Eliminar patas, cola, cabeza y órganos internos, el resto del cuerpo colocarlo en hielo.
- 3) Colocar 5 cadáveres por tubo falcón de 15 ml.
- 4) Lavar 3 veces con 5 ml de PBS.
- 5) Dejarlos en 3 ml de PBS.
- 6) Pasar los cadáveres por una jeringa de 5 ml con aguja, añadiéndolos a una caja de 10 cm recubierta previamente con gelatina. Al pasarlos por la aguja no hacerlo muy fuerte, de lo contrario los MEFs se lisan.
- 7) Adicionar 10 ml de medio DMEM 10% para la caja de 10 cm.
- 8) Al día siguiente debe de observarse los MEFs saliendo de los pequeños fragmentos de tejido. Si aun no han salido bien, lavar con PBS dos veces y adicionar medio DMEM 10% fresco y esperar otro día mas.
- 9) Subcultivar al doble de cajas de las originales (de 5 cadáveres, salen 3 de 10 cm, entonces se subcultivan en 6 cajas de 10 cm).
- 10) Cuando llegue a confluencia el subcultivo, congelar los MEFs de 6 cajas de 10 cm en 10 crioviales.

7.3.3. Transfección de células mediante electroporación

Electroporación de MEFs. Para cada evento se utilizan 500,000 células y 2-5 μg de DNA total. El plásmido linealizado debe estar a una concentración de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en agua o TE 0.1X estéril y libre de compuestos orgánicos y sales.

- 1) Tripsinizar y contar células; colocar 5×10^5 en un tubo eppendorf de 0.5 mL.
 - 2) Centrifugar por 5 min a 2500 rpm, reservar.
 - 3) Por otro lado, colocar 100 μL de la solución de electroporación (BTX o MIRUS) en tubos eppendorf de 0.5 mL, se recomienda utilizar la mezcla BTX atemperada.
 - 4) Añadir la cantidad de DNA requerida a la solución y mezclar de manera suave pero homogénea, evitando hacer burbujas.
 - a. Se deben añadir 2-5 μg de DNA total por cada 100 μL . La relación transposasa/transposon 1:5 utilizando 5 μg de DNA total.
- NOTA: es recomendable que el DNA a utilizar no esté muy diluido ya que esto diluye la solución de electroporación y reduce la eficiencia de electroporación. Muy concentrado, tampoco es recomendable, ya que el DNA no se alcanza a disolver bien.
- 5) Resuspender suavemente pero bien el pellet celular con la solución de electroporación (BTX), evitar hacer burbujas.
 - 6) Con una pipeta de 200 μL transferir el contenido a una celda.
 - 7) Llevar al electroporador, la configuración a utilizar es: 1 pulso de 170 v de 20 milisegundos.
 - 8) Agregar 100 μL de medio DMEM con 15% de SBF, sin resuspender.
 - 9) Inmediatamente transferir el contenido de la celda utilizando el dispensador hacia el tubo eppendorf (evitar hacer burbujas) y centrifugar el tubo en una microcentrífuga a 12,000 rpm durante 45 segundos, a continuación quitar el sobrenadante y añadir

- 100 μ L de medio DMEM con 15% de SBF, resuspender el pellet en el medio y colocar en la incubadora por 20 min.
- 10) Después de los 20 min, resuspender el pellet y colocar en la caja de cultivo. Utilizar medio DMEM con 15% de SBF e incubar las células a 37°C y 5% de CO₂.
 - 11) Al día siguiente cambiar medio por DMEM con 10% de SBF.
 - 12) A las 48 horas de transfección, cuantificar la eficiencia de electroporación; tomar +/- 4 imágenes en 10X y contar las células que presenten fluorescencia.
 - 13) Tripsinizar y sembrar sobre feeders en cajas de cultivo con medio DMEM con 15% de SBF y suplementar con LIF (10 ng/mL) y añadir doxiciclina (dosis 150 ng/mL o 1.5 μ g/mL).

7.3.4. Ensayo de reprogramación celular

- 1) Se descongelo un vial de MEFs y se mantuvo en cultivo hasta subconfluencia.
- 2) Se realizo un pase de células para comprobar que estuvieran mitóticamente activas.
- 3) Al llegar a subconfluencia, las células se tripsinizaron y se dividieron en 4 tubos eppendorf.
- 4) Las células se transfectaron mediante electroporación de acuerdo con el protocolo, con cuatro combinaciones de transposones:
 - a. MKOS + rtTA (vector vacío)
 - b. MKOS + E6/E7
 - c. MKOS + E6
 - d. MKOS + E7
- 5) A las 48 horas de transfección, se tomaron fotos de 4 campos por condición, se contó el total de células y el número de células fluorescentes por campo para calcular la eficiencia de transfección:

$$\% = \frac{N_f * 100}{N_t}$$

En donde:

% : eficiencia de transfección

N_f : Número total de células venus fluorescentes en los 4campos

100: constante para calcular el porcentaje

N_t : Número total de células en los 4 campos

- 6) Posteriormente las células se tripsinizaron y se sembraron en medio M10, sobre feeders a una densidad de 500 células venus positivas por cm², para calcular el número de células a sembrar se empleo la siguiente formula:

$$X = \left(\frac{500 * 100}{\%} \right) (Y)$$

En donde:

X : número de células a sembrar
% : eficiencia de transfección
500: células venus positivas que se sembrarán por cm²
100: constante para calcular el porcentaje
Y: área total en cm² donde se sembrarán las células

- 7) Al día siguiente se cambio el medio por M15 complementado con LIF 10 ng/mL y se indujeron con doxyciclina a la concentración de 150 ng/mL y 1.5 µg/mL.
- 8) Las células se indujeron por 10 días con doxyciclina y se realizó cambio de medio cada dos días.
- 9) Se tomaron fotos en campo claro y en fluorescencia a diferentes días de inducción para observar la aparición y progreso de colonias iPSC.
- 10) Se contó el número de colonias iPSC maduras al día 10 para calcular la eficiencia de reprogramación.

De las mismas células electroporadas se desprendieron 4 reprogramaciones a diferentes pases celulares (tiempos) (**Figura 16**), de acuerdo con las condiciones de proliferación celular y con el objetivo de evaluar la eficiencia de reprogramación en células posmitóticas.

I. Cuantificación de la eficiencia de reprogramación

Para calcular la eficiencia de reprogramación obtenida a partir del número total de células transfectadas, inducidas con doxyciclina, se utilizó la siguiente formula:

$$E = \frac{N_C * 100}{\frac{X * \%}{100}}$$

En donde:

E : eficiencia de reprogramación

N_C : Número de colonias iPSC obtenidas por área

% : eficiencia de transfección (revisar arriba)

X : número total de células que fueron sembradas (revisar arriba)

100: constante para calcular el porcentaje

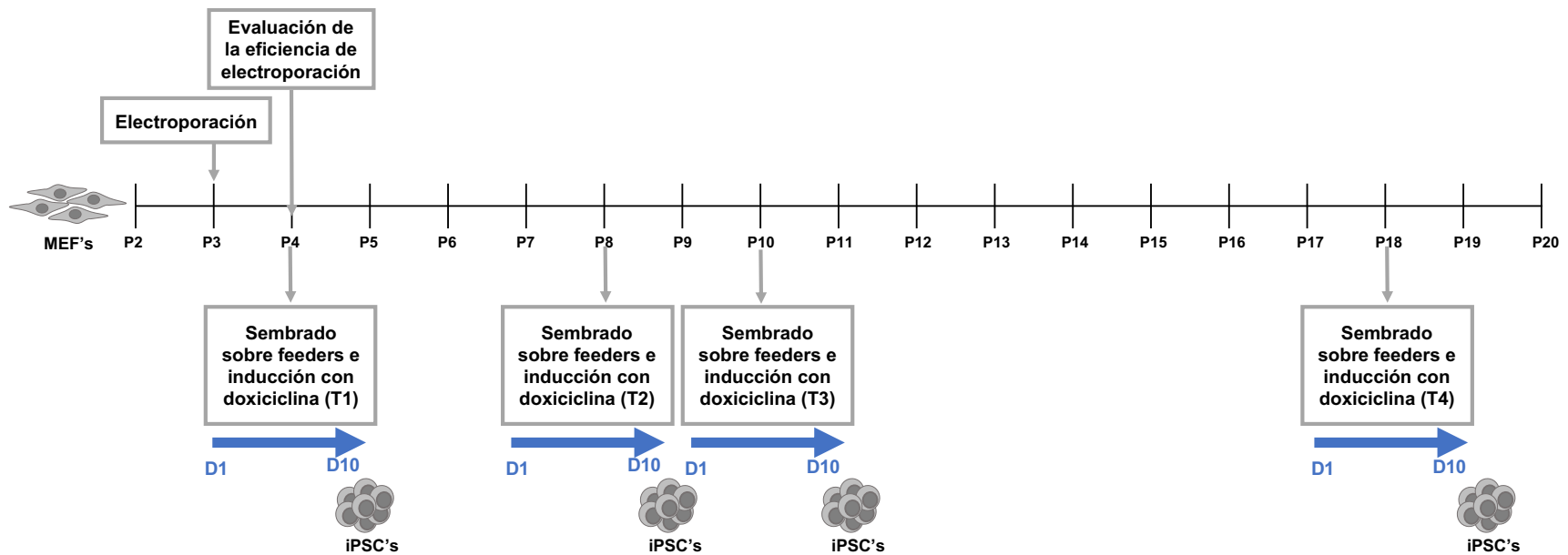


Fig. 16 Metodología seguida en los experimentos de reprogramación celular a los diferentes tiempos. Se transfectaron por electroporación, MEFs en cultivo primario de las cepas CD1 y C57; a las 48 horas de la transfección, se cuantificó la eficiencia de electroporación. Las células se mantuvieron en cultivo sin inducción y en cada pase se evaluó la proliferación celular por medio de la cuantificación de la incorporación de BrdU y la expresión de Ki67, valores a partir de los cuales se determinaron cuatro tiempos (T) de reprogramación. Para los experimentos de reprogramación a los cuatro tiempos, se tomó una fracción de las células para inducir con doxiciplina a los pases P4, P8, P10 y P18, mientras el resto de las células se mantuvo en cultivo hasta que las células dejaron de proliferar. Cada flecha azul indica una reprogramación a diferente tiempo; en cada reprogramación se tomaron fotos a diferente tiempo de inducción con doxiciplina y al día 10 se cuantificó el número de colonias iPSC obtenidas para medir la eficiencia de reprogramación.

8. Resultados

8.1. Los oncogenes E6 y E7 del VPH-16 inducen un aumento en la proliferación celular

Con el propósito de estudiar por separado el efecto de las oncoproteínas E6 y E7, y su contribución en la reprogramación celular de MEFs hacia iPSCs, fueron construidos dos vectores que expresan por separado cada una de las proteínas. Los vectores construidos son transposones piggyBac que utilizan un sistema de inducción Tet-On, y están compuestos por las secuencias TRE-E6E7TTL-PGK-VENUS-IRES-rtTA para el vector que codifica a E6 (**Figura 17A y 17B**; para más detalle consultar el **anexo 1**) y TRE-E6TTL7-PGK-VENUS-IRES-rtTA para el vector que codifica a E7 (**Figura 17C y 17D**; para más detalle consultar el **anexo 2**), mismos que están basados en las construcciones fabricadas anteriormente en el laboratorio para los transposones MKOS-booster y PB-E6/E7 (Martínez-Sarmiento, 2016; López-Hernández, 2018).

Las secuencias E6E7TTL y E6TTL7 codificadas por los vectores construidos, fueron tomadas de construcciones fabricadas por Münger y colaboradores en 1989; dichas secuencias fueron clonadas a partir de VPH-16 y modificadas mediante la inserción de un oligonucleótido TTL autocomplementario (TTAGTAACTAA) en las secuencias de los marcos de lectura abierta (ORFs) de cada proteína, obteniendo con ello la interrupción en la traducción del RNAm que codifica para la proteína E6 o E7, según la ubicación del TTL. De esta forma, se obtiene la expresión de solo una de las proteínas.

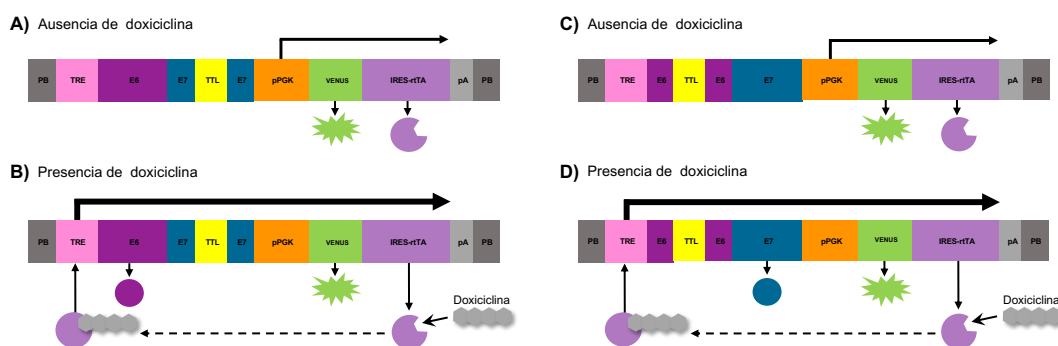


Fig. 17 Vectores que codifican los oncogenes E6 y E7. A) El vector E6 en ausencia de doxiciclina induce la traducción de la proteína reportera VENUS y el rtTA que se mantiene inactivo. **B)** En presencia de doxiciclina, se activa el rtTA por medio de la unión a ésta y se induce la activación del promotor TRE, de esta forma se promueve la traducción del oncogén E6. **C)** El vector E7 en ausencia de doxiciclina induce la traducción de la proteína reportera VENUS y el rtTA, mismo que se mantiene inactivo. **D)** En presencia de doxiciclina se activa el

rtTA por medio de la unión a ésta y se produce la activación del promotor TRE, promoviendo así la traducción del oncogén E7.

Los vectores que expresan a E6 y E7, al igual que el vector que expresa E6/E7, fueron transfectados en MEFs aislados de ratones de las cepas CD1 y C57BL/6 (para fines prácticos serán denominados MEFs CD1 y MEFs C57). Las células transfectadas fueron sembradas sobre una cama de células alimentadoras (feeders), se mantuvieron por 12 días en cultivo con medio M15 y en inducción con doxiciclina a las concentraciones 150 ng/mL y 1.5 µg/mL.

En los MEFs CD1 se observó que la expresión de los oncogenes E6 y E7 contribuyen al aumento en la proliferación celular, aun cuando son transfectados por separado (**Figura 18**); se comprobó que por sí solos, en ausencia de la expresión de los factores de transcripción MKOS, los oncogenes no inducen la reprogramación de los MEFs hacia iPSCs.

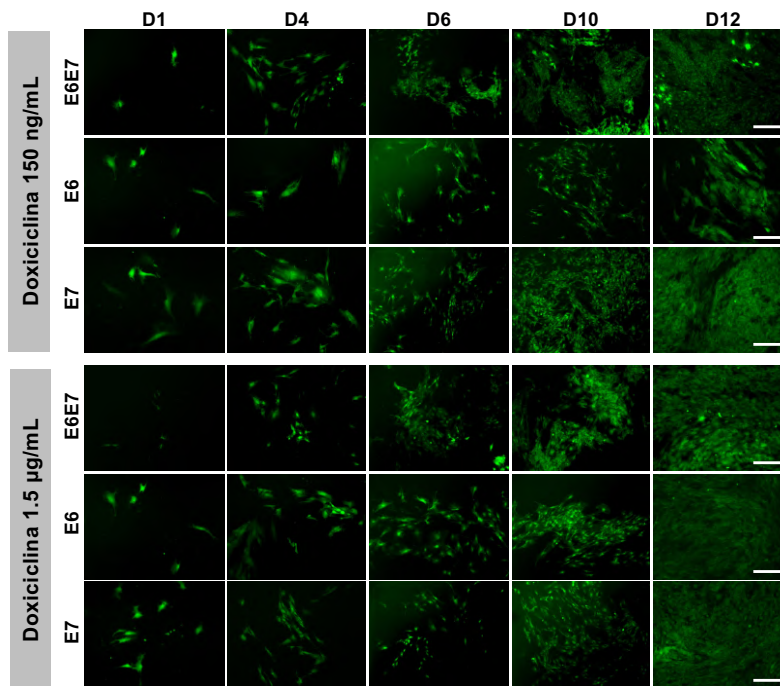


Fig. 18 La expresión de los oncogenes E6 y E7 promueven la proliferación celular en MEFs CD1. Se indujo la expresión de los oncogenes E6, E7 y E6/E7 en MEFs CD1 transfectados, por medio de la inducción con doxiciclina a las concentraciones 150 ng/mL y 1.5 µg/mL; en todas las condiciones se observó que los oncogenes promueven la proliferación de las células al paso de los días (D). Barra de escala representa 200 µm.

En MEFs C57 cultivados bajo las mismas condiciones, también se observó el aumento en la proliferación de las células al paso de los días, debido a la expresión de los oncogenes E6 y

E7; sorpresivamente, en estas células se observó la aparición de colonias tipo iPSC en las células en donde se indujo la expresión de E7 a la concentración de 150 ng/mL y en las células que expresaron E6/E7 y E7 a la concentración 1.5 µg/mL (**Figura 19**). Las colonias obtenidas por la inducción de doxíciclina a la concentración de 1.5 µg/mL fueron pasadas a un nuevo cultivo sobre feeders para observar si formaban clonas de colonias iPSCs, sin embargo, posterior al pase, las células solo proliferaron y las colonias degeneraron (**Figura 20**), hecho que indica que las células no eran células iPSC o no estaban totalmente reprogramadas al tiempo de ser pasadas.

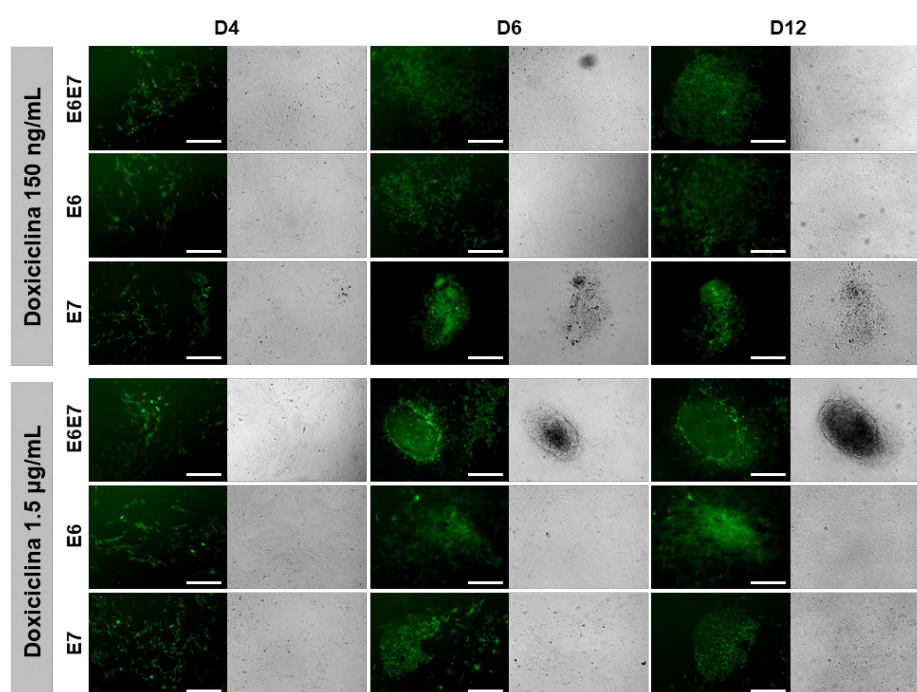


Fig. 19 La expresión de los oncogenes E6 y E7 promueven la proliferación celular en MEFs C57 y estimulan la aparición de colonias tipo iPSC. Se indujo la expresión de los oncogenes E6, E7 y E6/E7 por medio de la inducción con doxíciclina a las concentraciones 150 ng/mL y 1.5 µg/mL, en MEFs C57 transfectados; se observó que los oncogenes promueven la proliferación de las células y, en las condiciones E6/E7 a la concentración 1.5 µg/mL y E7 a ambas concentraciones de doxíciclina, se indujo la formación de colonias tipo iPSC. D: días. Barra de escala representa 200 µm.

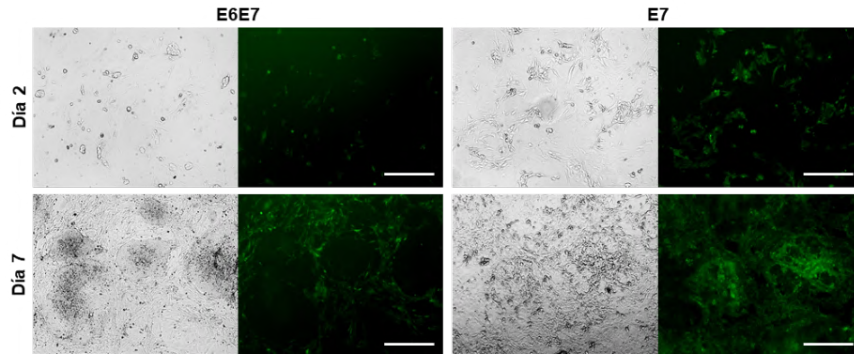


Fig. 20 Las colonias tipo iPSC derivadas de la inducción de los oncogenes E6 y E7 en MEFs C57, degeneran después del pase celular. Las colonias tipo iPSC derivadas a partir de la expresión de los oncogenes E6/E7 y E7 en MEFs C57, fueron pasadas sobre una cama de feeders y cultivadas en medio M15 adicionado con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se observó que las colonias degeneran posterior al primer pase celular; se observa que las células proliferan pero no hay formación *de novo* de colonias tipo iPSC. Barra de escala representa 200 μm .

En un experimento posterior, se transfectaron MEFs CD1 y C57 con los vectores E6, E7 y E6/E7 acompañados del vector MKOS-booster (para fines prácticos nombrado solo MKOS); en el experimento se incluyó una condición en donde se transfectó el vector MKOS en compañía de un vector que solo expresa rtTA. Células de las cuatro condiciones transfectadas se sembraron sobre feeders y se mantuvieron por 10 días en cultivo con medio M15, en ausencia de inducción con doxiciclina. En ambas cepas celulares se observó que los vectores se mantienen apagados en ausencia de inducción y no se induce un aumento en la proliferación celular, ni la reprogramación de las células hacia colonias iPSC (**Figura 21**).

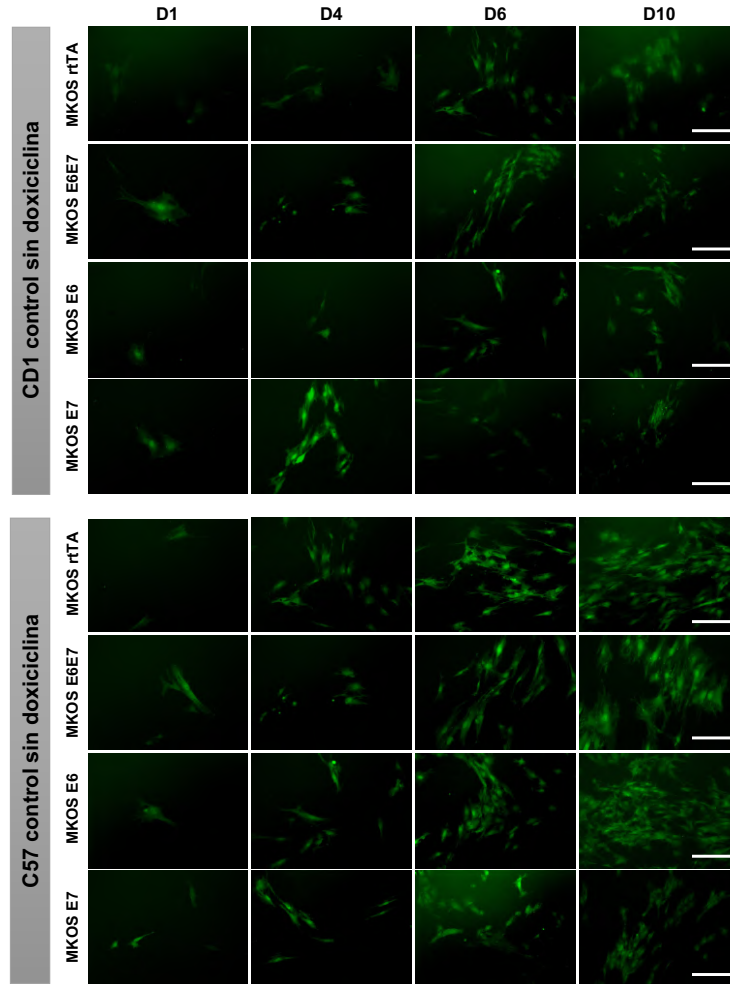


Fig. 21 Los vectores que inducen la expresión de MKOS y E6/E7 se mantienen apagados en ausencia de inducción con doxiciclina. MEFs CD1 y C57 transfectados con cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), fueron sembrados sobre feeders y cultivados por 10 días (D) con medio M15, en ausencia de inducción con doxiciclina. Se observa la proliferación normal de los MEFs que expresan la proteína reportera verde fluorescente venus. No se observa un aumento en la proliferación ni la inducción de la reprogramación hacia iPSCs debido a que los vectores se mantienen apagados por la ausencia de inducción con doxiciclina. Barra de escala equivale a 200 μ m.

8.2. Los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 producen un efecto positivo en la reprogramación celular inducida por MKOS y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular de MEFs posmitóticos

MEFs en cultivo primario de las cepas CD1 y C57 fueron transfectados mediante electroporación con cuatro combinaciones de vectores: MKOS +rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7. Las células transfectadas se mantuvieron en cultivo con medio M10 y en ausencia de inducción con doxiciclina; a las células se les dieron pases celulares hasta obtener cultivos de células posmitóticas

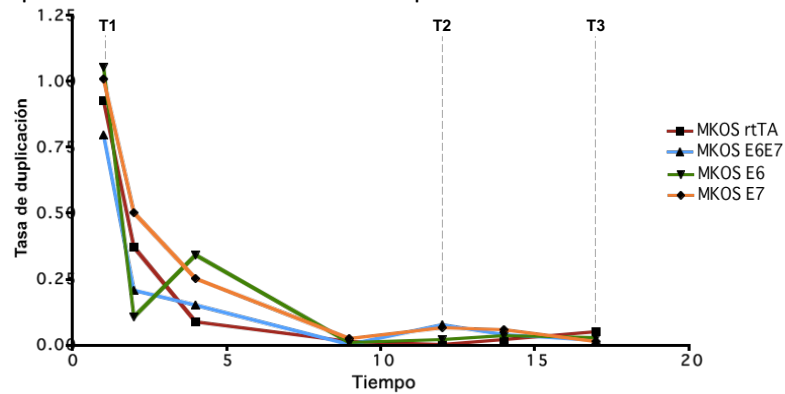
(i.e., senescentes), en cada pase celular se cuantificó la tasa de duplicación (formula descrita en el punto 7.2.5 de la metodología), el porcentaje de expresión de Ki67 y el porcentaje de incorporación de BrdU en un periodo de 3h.

Los MEFs CD1 proliferaron hasta el pase 10, en la **figura 22A** se observa la tasa de duplicación de las células a lo largo del tiempo en días. Se observó que los MEFs CD1 redujeron la tasa de duplicación al 0.5 en el pase 6, para el pase 8 la tasa de duplicación fue menor al 0.1 y dejaron de dividirse en el pase 10. En el pase 4 más del 85% de los MEFs presentaron expresión de Ki67, mismo que se redujo a menos de 50% en el pase 8 y a menos de 15% en el pase 10. La incorporación de BrdU fue menor al 25% en todos los pases celulares y en todas las condiciones transfectadas (**Figura 22B, Anexo 3**).

A partir de las cuantificaciones de la tasa de duplicación de las células, se establecieron tres tiempos de reprogramación de acuerdo con la capacidad proliferativa de las células: el primero al pase 4 (T1) donde las células se encontraban en división activa, el segundo al pase 8 (T2) donde las células se encontraban poco proliferativas, y el último al pase 10 (T3) en donde las células habían dejado de proliferar (**Figura 22A**). Durante estos pases celulares, se tomó una alícuota de las células transfectadas (de acuerdo con la fórmula empleada para conocer el número de células a sembrar), se sembraron sobre feeders, con medio M15 y se indujo la reprogramación mediante la inducción con doxiciclina a las concentraciones 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El resto de las células se mantuvo en cultivo con medio M10 y en ausencia de inducción para obtener cultivos posmitóticos.

A diferencia de los MEFs CD1, los MEFs C57 proliferaron hasta el pase 18, en la **figura 23A** se observa la tasa de duplicación de las células a lo largo de los días que se mantuvieron en cultivo. Se observó que los MEFs C57 redujeron la tasa de duplicación a menos de la mitad en el pase 8, para el pase 10 la tasa de duplicación fue menor al 0.1 y dejaron de dividirse en el pase 18. En el pase 4 se observó una expresión de Ki67 mayor al 60%, se redujo a 50% en el pase 8, fue menor al 10% en el pase 10 y no se detectó expresión de Ki67 en el pase 18. En cuanto a la incorporación de BrdU por un periodo de 3h, fue de 30% en el pase 4, aumentó a 40 en el pase 8, fue menor al 10% en el pase 10 e inesperadamente aumentó a más del 15% en el pase 18 (**Figura 23B, Anexo 4**). En estas células se establecieron cuatro tiempos de reprogramación, de acuerdo con la capacidad proliferativa de las células: el primero al pase 4 (T1), el segundo al pase 8 (T2), el tercero al pase 10 (T3) y el último al pase 18 (T4) (**Figura 23A**). Se siguió el mismo procedimiento que en los MEFs CD1 y en cada pase solo fue tomada una alícuota de las células transfectadas para inducir la reprogramación mediante la inducción de doxiciclina a las concentraciones 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De manera similar, el resto de las células se mantuvo en cultivo con medio M10 y en ausencia de inducción para obtener cultivos posmitóticos.

A) Tasa de duplicación de MEF's CD1 en el tiempo



B) Porcentaje de expresión de Ki67 e incorporación de BrdU en MEF's CD1

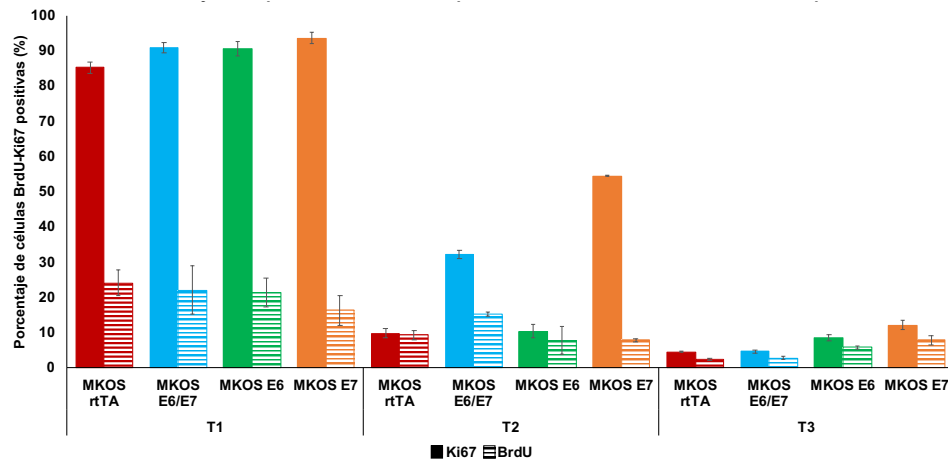
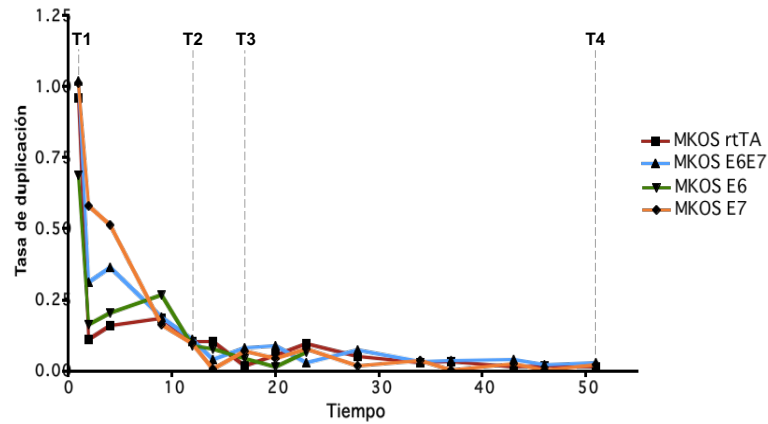


Fig. 22 Cuantificación de la tasa de duplicación de MEFs CD1 para el establecimiento de los tiempos de reprogramación celular. A) Curva de proliferación celular que muestra la tasa de duplicación de las células transfectadas con las cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), a lo largo del tiempo (días de cultivo). Se marcan con líneas punteadas los tiempos de reprogramación (T) a los cuales fueron tomadas alícuotas de células para inducir la reprogramación. **B)** Porcentaje de expresión de Ki67 (barras sólidas) y de incorporación de BrdU por un periodo de 3h (barras con trama), cuantificado en cada tiempo de reprogramación, de las células transfectadas y en ausencia de inducción con doxiciclina.

A) Tasa de duplicación de MEF's C57 en el tiempo



B) Porcentaje de expresión de Ki67 e incorporación de BrdU en MEF's C57

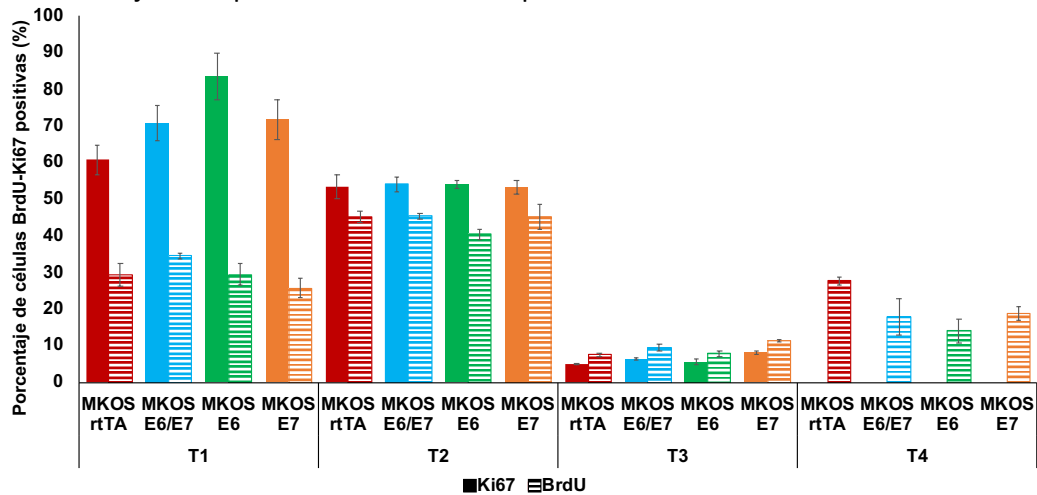


Fig. 23 Cuantificación de la tasa de duplicación de MEFs C57 para el establecimiento de los tiempos de reprogramación celular. **A)** Curva de proliferación celular que muestra la tasa de duplicación de las células transfectadas con las cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), a lo largo del tiempo (días de cultivo). Se marcan con líneas punteadas los tiempos de reprogramación (T) a los cuales fueron tomadas alícuotas de células para inducir la reprogramación. **B)** Porcentaje de expresión de Ki67 (barras sólidas) y de incorporación de BrdU por un periodo de 3h (barras con trama), cuantificado en cada tiempo de reprogramación, de las células transfectadas y en ausencia de inducción con doxiciclina.

Tanto en los MEFs CD1, a los tres tiempos de reprogramación, como en los MEFs C57, a los cuatro tiempos de reprogramación evaluados, se cuantificó la eficiencia de reprogramación (ver punto 7.3.4-I de la metodología) al día 12 de inducción con doxiciclina.

Se observó que los MEFs transfectados con los oncogenes E6 y E7, en combinación con MKOS, contribuyen a la derivación de colonias tipo iPSC en un menor tiempo, además, aumentan la eficiencia de reprogramación, comparado con los MEFs transfectados solo con MKOS. En ambas cepas, en los MEFs transfectados con MKOS + E6/E7 se observó un adelanto en la formación de colonias tipo iPSC, en comparación con los transfectados con MKOS + rtTA. Se observó la aparición de colonias al día 4 de inducción, y la maduración de estas al día 10 de inducción con doxiciclina, tanto en MEFs con proliferación activa, como en MEFs que presentaban una proliferación disminuida. Sorprendentemente, únicamente los MEFs transfectados con los oncogenes E6/E7 lograron la derivación de iPSCs en MEFs que habían dejado de proliferar (**Figuras 24 y 26**); hecho que se reproduce aún cuando los oncogenes E6 y E7 son transfectados por separado, y solo cuando se encuentran en combinación de MKOS (**Figuras 25 y 27**).

El análisis estadístico de las eficiencias obtenidas a partir de los MEFs CD1 inducidos con doxiciclina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, reveló que existe una diferencia significativa a $p < 0.05$ entre las eficiencias obtenidas en los MEFs MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + rtTA, al T1 de reprogramación. Al T2 y T3 de reprogramación, resultaron significativas las diferencias entre las eficiencias obtenidas en MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + E6 y MKOS + E7. A esta concentración de doxiciclina también resulta significativa la diferencia entre las eficiencias obtenidas con MKOS + E6/E7 en el T1 y el T3 de reprogramación. En la inducción con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observó una diferencia significativa a $p < 0.05$ entre la eficiencia obtenida en los MEFs MKOS + rtTA con respecto a todas las demás condiciones evaluadas (MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), en el T1 de reprogramación. Al T2 se observó una diferencia significativa entre la eficiencia obtenida con MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + E6; y al T3 una diferencia significativa entre las eficiencias de MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + E6 y MKOS + E7. En la comparación de los tiempos de reprogramación, a esta concentración de doxiciclina resulta significativa la diferencia en la eficiencia de reprogramación obtenida en los MEFs MKOS + E6/E7 del T3, con respecto a la eficiencia obtenida en el T1 y el T2 (**Figura 28**).

En los MEFs C57, inducidos con doxiciclina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, el análisis estadístico mostró que existe una diferencia significativa a $p < 0.05$ entre las eficiencias obtenidas en los MEFs MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + rtTA y MKOS + E6, en el T1 de reprogramación. En el T2 se observó una diferencia significativa entre MKOS + rtTA con respecto a MKOS + E6/E7 y MKOS + E7. Al T4 de reprogramación se observó una diferencia significativa entre MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + E6 y MKOS + E7, al igual que en la eficiencia obtenida entre MKOS + E6/E7 inducida con doxiciclina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con respecto a la obtenida en inducción con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En los MEFs inducidos con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se observaron las mismas significancias que con

doxyciclina 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, a esta concentración también resulto significativa a $p < 0.05$ la diferencia entre MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + E6 obtenidas en el T3 de reprogramación; al igual que la eficiencia obtenida con MKOS + E6/E7 en el T4 con respecto a la obtenida en el T1 (**Figura 29**).

Para comprobar la identidad de las iPSCs obtenidas, se caracterizaron las colonias iPSC derivadas de MEFs CD1 y C57 al T1, donde los MEFs estaban activamente proliferativos, y de MEFs CD1 al T3 y C57 al T4, donde los MEFs habían dejado de dividirse. Los iPSCs derivados de CD1 y C57 al T1 fueron pasados al día 12 de inducción con doxyciclina, a medio 2i carente de doxyciclina; el pase de células derivó en clonas de iPSCs, con lo que se demostró la independencia de las iPSCs a la inducción con doxyciclina (**Figura 30B y Figura 31C**); en una prueba posterior, las colonias iPSC fueron teñidas con fosfatasa alcalina (**Figura 30A y Figura 31A**), que es un marcador de células troncales, demostrando que las iPSCs obtenidas poseen características similares a las células ESC. Adicionalmente, las iPSCs derivadas de C57 al T1, al día 12 de reprogramación fueron pasadas y sembradas sobre nuevos feeders, cultivadas nuevamente con medio M15 y se continuó con la inducción de doxyciclina, obteniendo clonas de colonias iPSC terminalmente reprogramadas (**Figura 31B**).

Se realizó tinción con fosfatasa alcalina en las iPSCs derivadas de MEFs CD1 al T3 (**Figura 32A**). En un experimento posterior, al día 12 de reprogramación, las colonias iPSC derivadas fueron pasadas sobre feeders y cultivadas con medio M15 y doxyciclina, derivandose así clonas de colonias iPSC terminalmente reprogramadas (**Figura 32B**), caracterización que fue realizada también en las iPSC derivadas de los MEFs C57 al T4 (**Figura 33A**); en estas iPSCs se comprobó la independencia a la inducción con doxyciclina al derivar clonas de iPSC en medio 2i (**Figura 33B**).

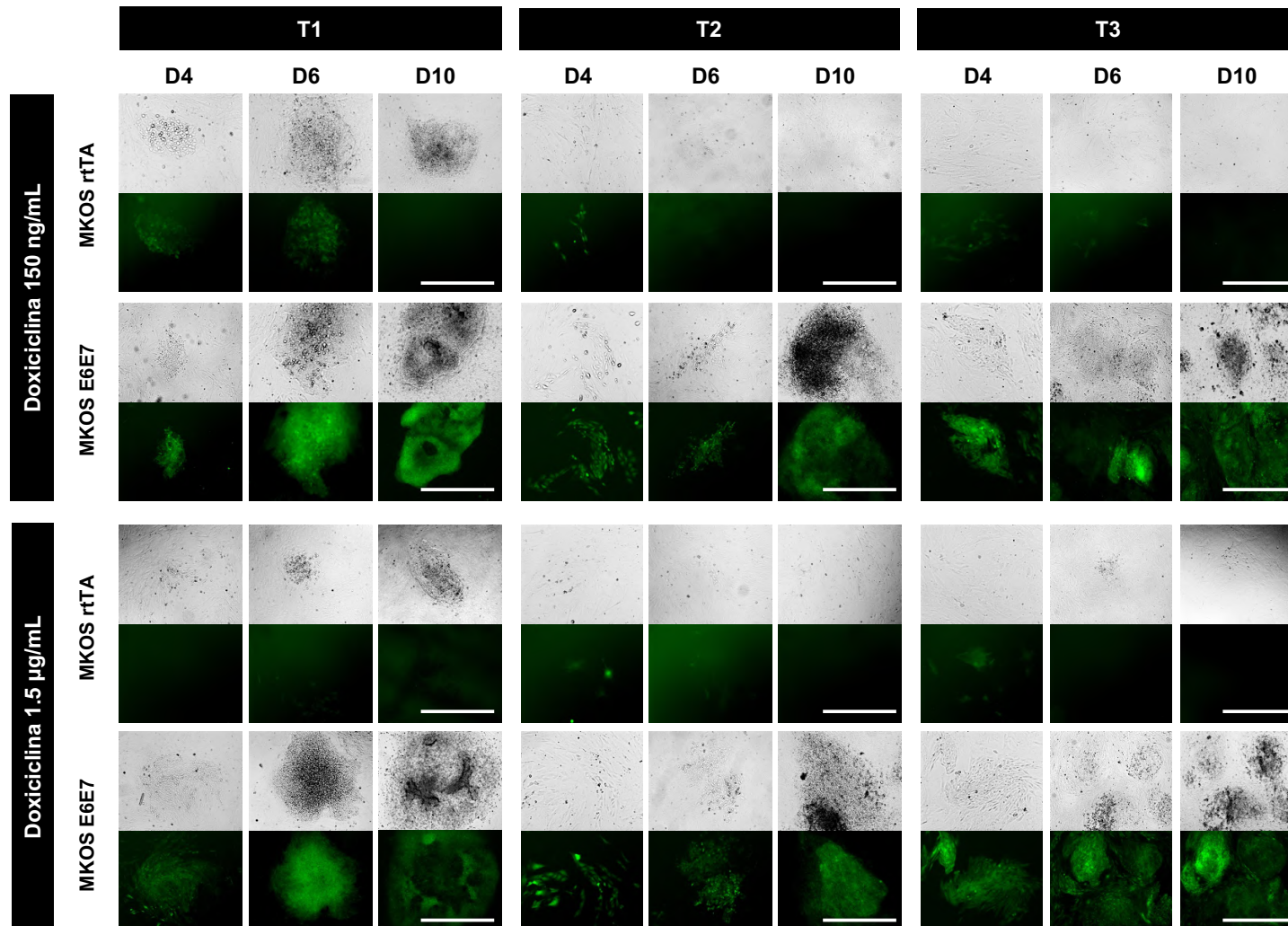


Fig. 24 Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 aceleran el tiempo de obtención de iPSCs a partir de MEFs CD1, y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular en MEFs posmitóticos. La derivación de colonias iPSC a partir de MEFs CD1 transfectados con MKOS + E6/E7, e inducidos con doxyciclina 150 µg/mL y 1.5 µg/mL, muestra una aceleración en el tiempo de obtención de iPSCs, comparado con los MEFs transfectados con MKOS + rtTA. En la imagen se observa la aparición de agregados celulares al día 4 (D4) de inducción con doxyciclina, a las dos concentraciones, y la maduración de las colonias en el día 10 (D10) de inducción. Al tiempo 1 (T1), donde los MEFs estaban activamente proliferativos, se observa la aparición de iPSCs en todas las condiciones transfectadas, lo cual cambia en el T2 y T3, en donde los MEFs habían dejado de proliferar y solo se observa aparición de iPSCs en presencia de los oncogenes E6 y E7. Barra de escala equivale a 500 µm.

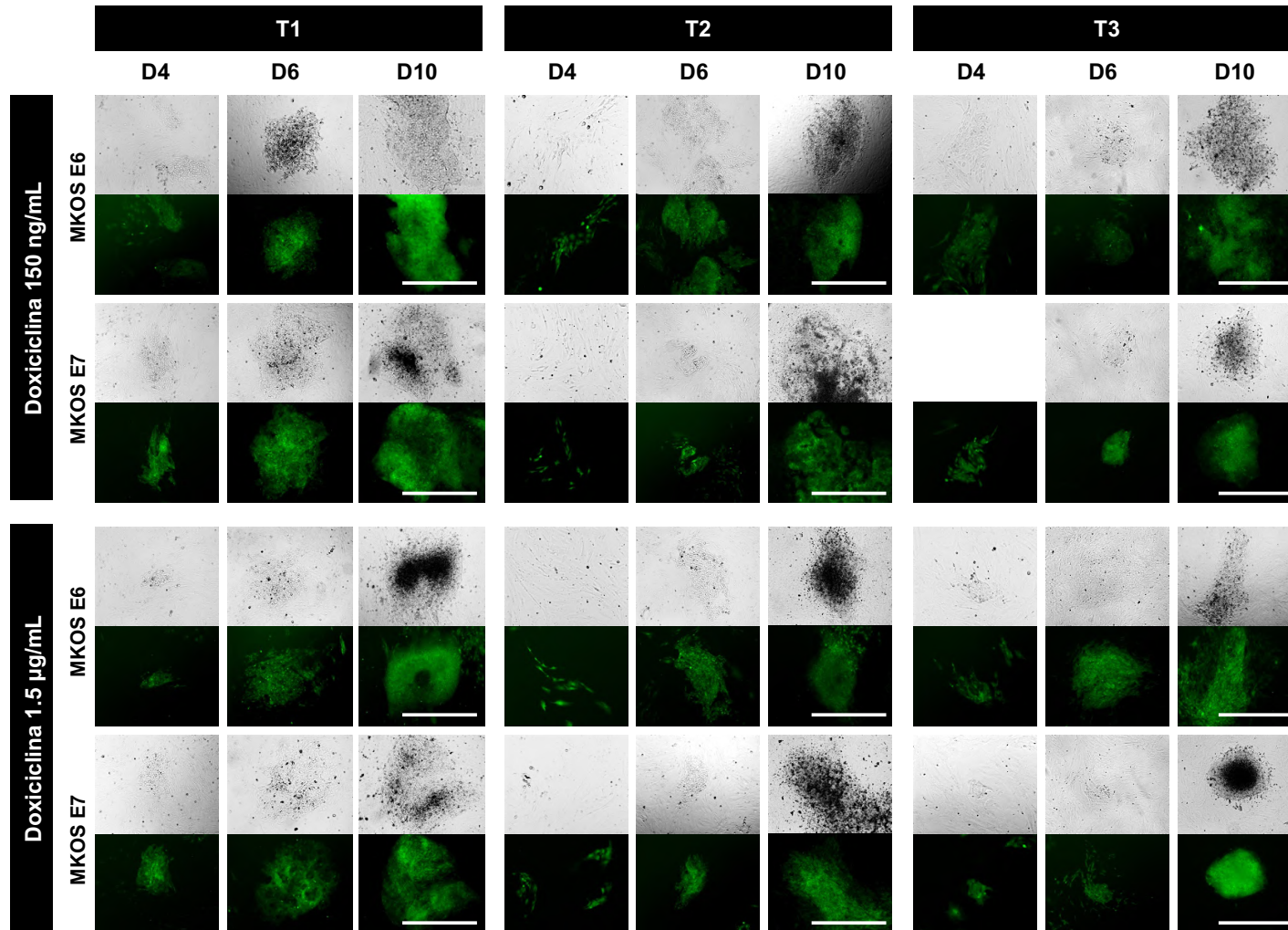


Fig. 25 El efecto de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 contribuye de manera independiente en la derivación de iPSCs a partir de MEFs CD1 posmitóticos. La transfección por separado de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16, en adición de los factores de transcripción MKOS, contribuye a la derivación de iPSCs, incluso a partir de MEFs posmitóticos inducidos con doxiciclina 150 µg/mL y 1.5 µg/mL. En la imagen se observa la aparición de agregados celulares al día 4 (D4) de inducción con doxiciclina, a las dos concentraciones, así como la maduración de las colonias en el día 10 (D10) de inducción. En los tres tiempos (T) de reprogramación, se observa la derivación de colonias iPSC aún al expresar solo uno de los oncogenes, E6 o E7. Barra de escala equivale a 500 µm.

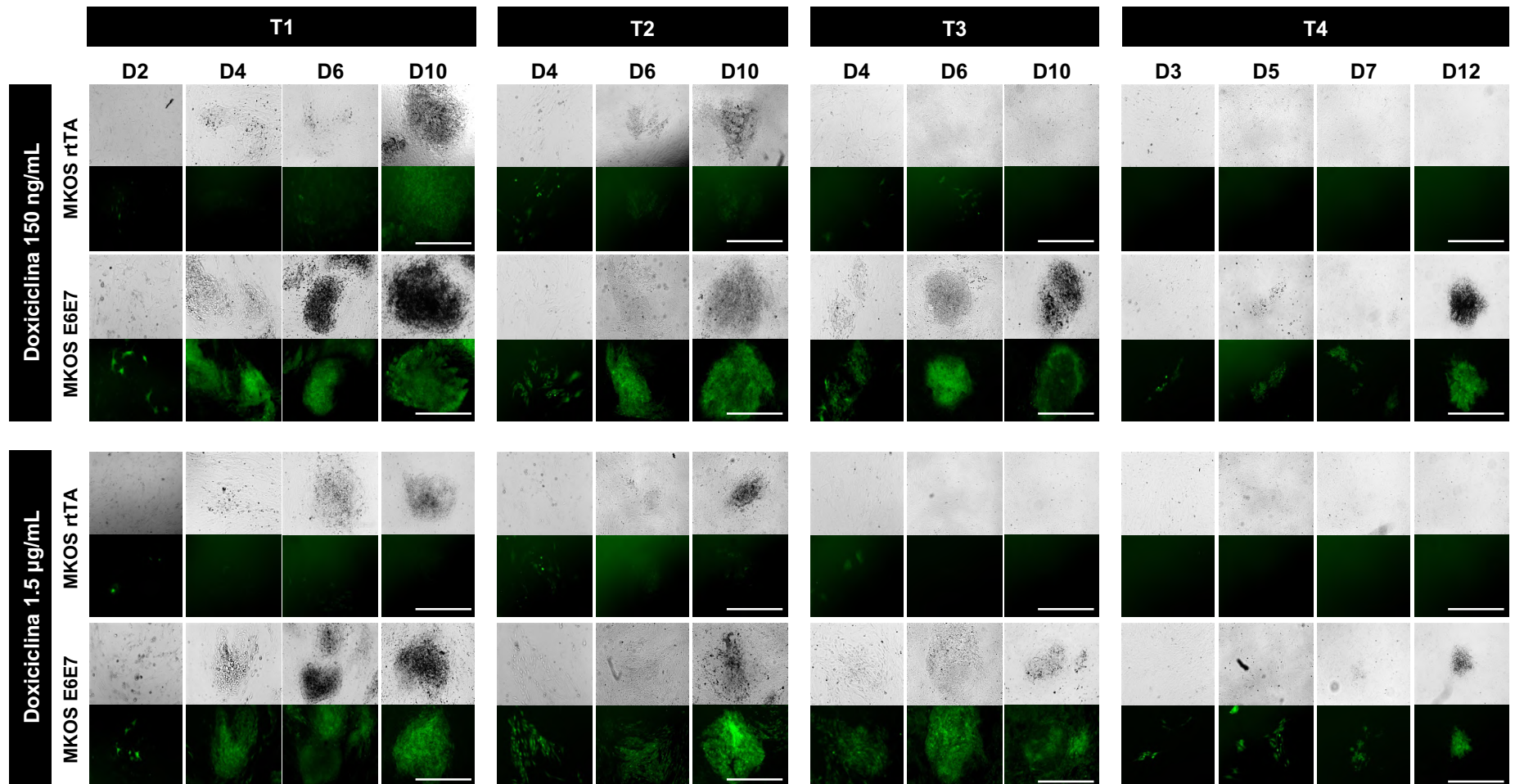


Fig. 26 Los oncogenes E6/E7 de VPH-16 aceleran el tiempo de obtención de iPSCs a partir de MEFs C57, y contribuyen a la reentrada en el ciclo celular en MEFs posmitóticos. La derivación de colonias iPSC a partir de MEFs C57 transfectados con MKOS + E6/E7, e inducidos con doxiciclina 150 µg/mL y 1.5 µg/mL, muestra una aceleración en el tiempo de obtención de iPSCs, comparado con los MEFs transfectados con MKOS + rtTA. A los tiempos 1 y 2 (T1 y T2) de reprogramación, donde los MEFs estaban activamente proliferativos, se observó la aparición de agregados celulares al día 4 (D4) de inducción con doxiciclina, a las dos concentraciones, y la maduración de las colonias en el día 10 (D10) de inducción. En el T3 y T4 de reprogramación, donde los MEFs habían dejado de proliferar, solo se observó derivación de iPSCs en presencia de los oncogenes E6 y E7. Barra de escala equivale a 500 µm.

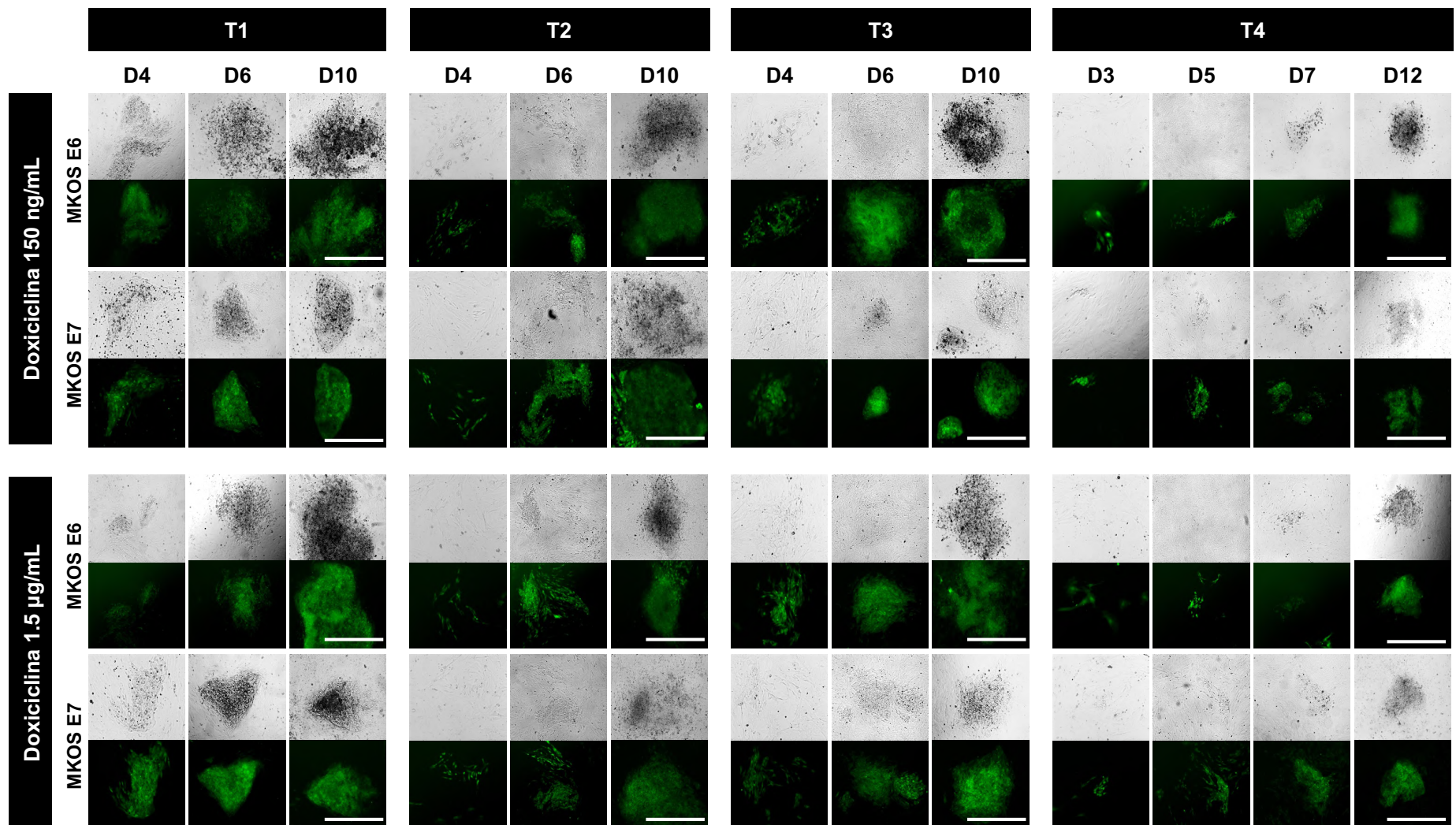
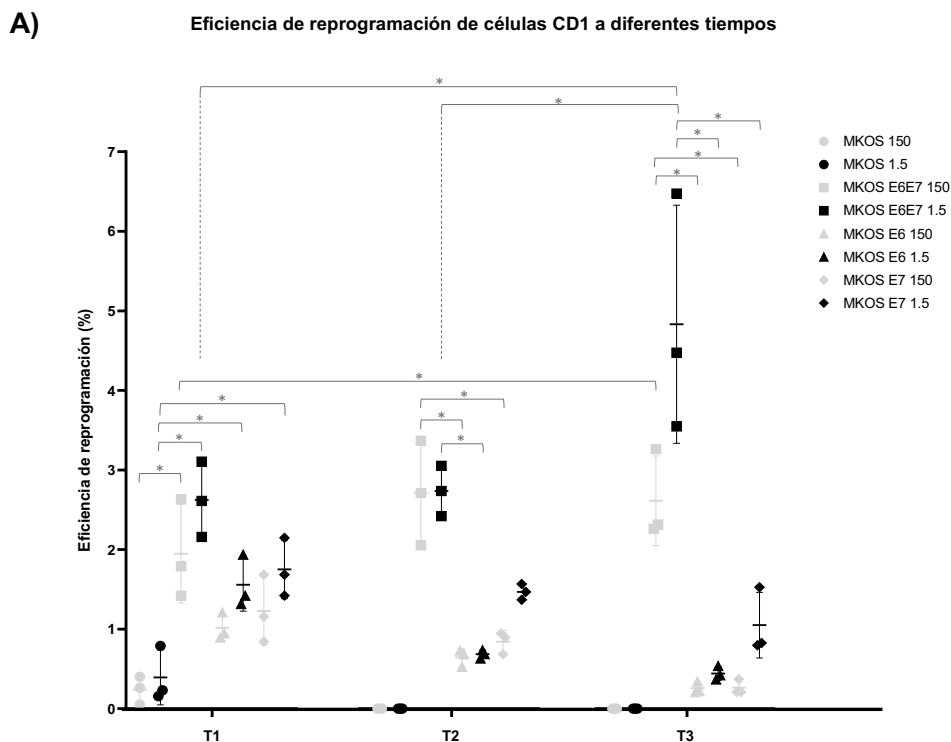


Fig. 27 El efecto de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 contribuye de manera independiente en la derivación de iPSCs a partir de MEFs C57 posmitóticos. La transfección por separado de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16, en adición de los factores de transcripción MKOS, contribuye a la derivación de iPSCs, incluso a partir de MEFs posmitóticos inducidos con doxiciclina 150 µg/mL y 1.5 µg/mL. En la imagen se observa la aparición de agregados celulares al día 4 (D4) de inducción con doxiciclina, a las dos concentraciones, así como la maduración de las colonias en el día 10 (D10) de inducción. En los tres tiempos (T) de reprogramación, se observa la derivación de colonias iPSC aún al expresar solo uno de los oncogenes, E6 o E7. Barra de escala equivale a 500 µm.

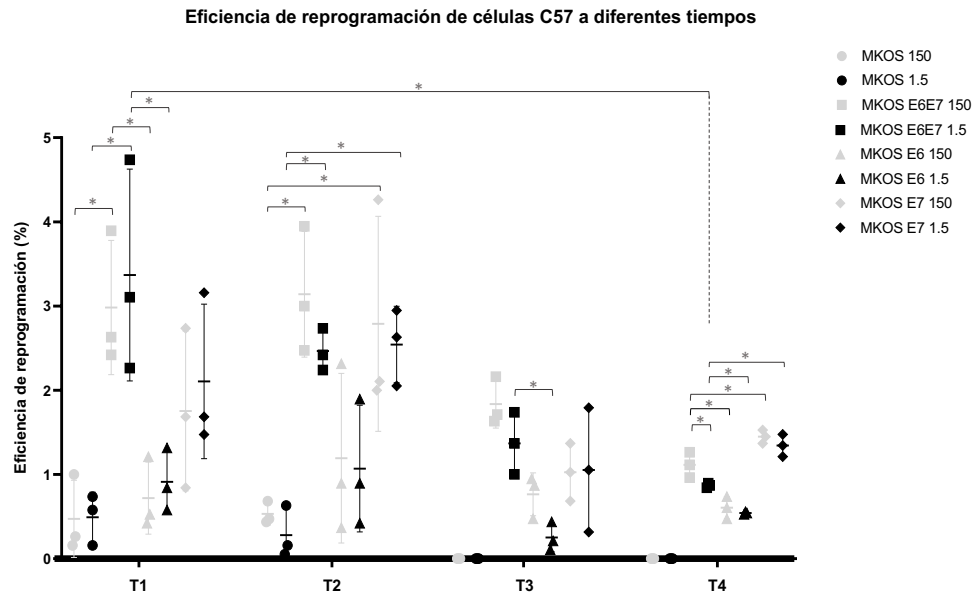


B)

Doxiciclina	MEFs CD1					
	T1		T2		T3	
	150 ng/mL	1.5 µg/mL	150 ng/mL	1.5 µg/mL	150 ng/mL	1.5 µg/mL
MKOS + rtTA	0.24 ± 0.17	0.39 ± 0.35	0	0	0	0
MKOS + E6/E7	1.95 ± 0.62	2.62 ± 0.47	2.71 ± 0.93	2.74 ± 0.45	2.34 ± 0.80	4.37 ± 1.24
MKOS + E6	1.02 ± 0.17	1.56 ± 0.33	0.26 ± 0.37	0.75 ± 0.02	0.21 ± 0.21	0.37 ± 0.37
MKOS + E7	1.23 ± 0.43	1.75 ± 0.37	0.82 ± 0.19	1.47 ± 0.12	0.29 ± 0.08	1.16 ± 0.37

Fig. 28 Eficiencias de reprogramación de iPSCs derivadas a partir de MEFs CD1, inducidos con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL. **A)** La figura muestra la eficiencia de reprogramación (%) de colonias iPSC obtenidas a partir de MEFs CD1 transfectados con cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), inducidos con doxiciclina 150 µg/mL (barras color gris) y 1.5 µg/mL (barras color negro); se comparan las eficiencias obtenidas durante los tres tiempos de reprogramación (T). La cuantificación de las colonias iPSC derivadas se realizó al día 12 de inducción con doxiciclina. Cada barra muestra los valores de tres experimentos diferentes y se grafica la media ± SD. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control MKOS + rtTA. **B)** Tabla que muestra las medias ± SD de las eficiencias de reprogramación (en porcentaje %) obtenidas con cada combinación de vectores, a los tres tiempos de reprogramación evaluados (T).

A)



B)

Doxiciclina	MEFs C57							
	T1		T2		T3		T4	
	150 ng/mL	1.5 µg/mL	150 ng/mL	1.5 µg/mL	150 ng/mL	1.5 µg/mL	150 ng/mL	1.5 µg/mL
MKOS + rtTA	0.47 ± 0.46	0.49 ± 0.30	0.54 ± 0.12	0.28 ± 0.31	0	0	0	0
MKOS + E6/E7	2.98 ± 0.80	3.37 ± 1.26	3.14 ± 0.75	2.53 ± 0.18	1.71 ± 0.63	1.37 ± 0.52	1.26 ± 0.18	0.87 ± 0.04
MKOS + E6	0.72 ± 0.43	0.91 ± 0.37	1.19 ± 0.55	1.07 ± 0.75	0.47 ± 0.67	0.11 ± 0.15	0.61 ± 0.19	0.53 ± 0.02
MKOS + E7	1.75 ± 0.95	2.11 ± 0.92	2.79 ± 1.28	2.54 ± 0.45	1.03 ± 0.48	1.05 ± 1.04	1.45 ± 0.11	1.34 ± 0.23

Fig. 29 Eficiencias de reprogramación de iPSCs derivados a partir de MEFs C57, inducidos con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL. **A)** La figura muestra la eficiencia de reprogramación (%) de colonias iPSC obtenidas a partir de MEFs C57 transfectados con cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7), inducidos con doxiciclina 150 µg/mL (barras color gris) y 1.5 µg/mL (barras color negro); se comparan las eficiencias obtenidas durante los cuatro tiempos de reprogramación (T). La cuantificación de las colonias iPSC derivadas se realizó al día 12 de inducción con doxiciclina. Cada barra muestra los valores de tres experimentos diferentes y se grafica la media ± SD. * Diferencia significativa ($p < 0.05$) con respecto al control MKOS + rtTA. **B)** Tabla que muestra las medias ± SD de las eficiencias de reprogramación (en porcentaje %) obtenidas con cada combinación de vectores, a los cuatro tiempos de reprogramación evaluados (T).

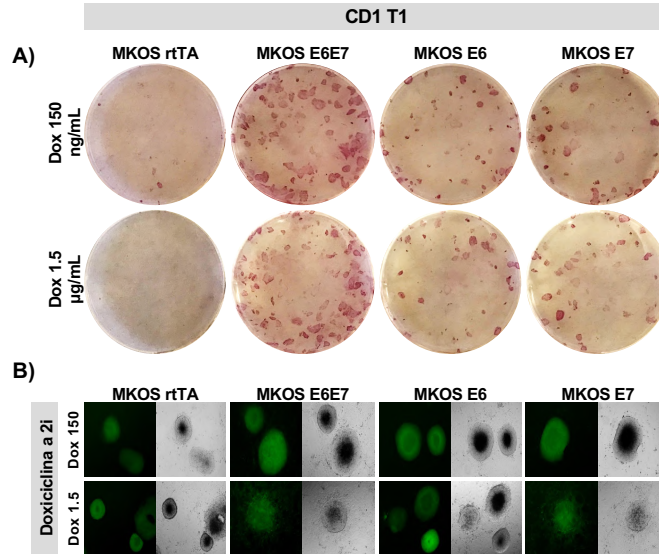


Fig. 30 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs CD1 en el T1 de reprogramación. **A)** Tinción con fosfatasa alcalina de colonias iPSC al día 12 de inducción con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL; las colonias totalmente reprogramadas se observan teñidas de color rojo/violeta. **B)** Clonas de iPSCs cultivadas en medio 2i que comprueba su independencia a la inducción con doxiciclina.

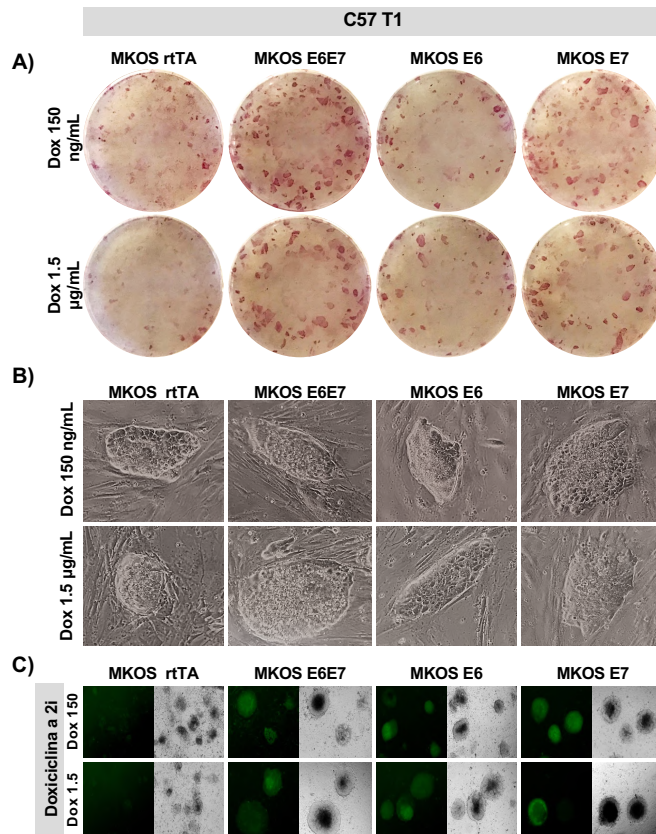


Fig. 31 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 en el T1 de reprogramación. **A)** Tinción con fosfatasa alcalina de colonias iPSC al día 12 de inducción con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL; las colonias totalmente reprogramadas se observan teñidas de color rojo/violeta. **B)** Expansión de clonas de iPSC obtenidas después de un pase celular; las

clonas se expandieron sobre una cama de feeders, cultivadas con medio M15 e inducidas con doxiciclina. C) Clonas de iPSCs cultivadas en medio 2i, lo que comprueba su independencia a la inducción con doxiciclina.

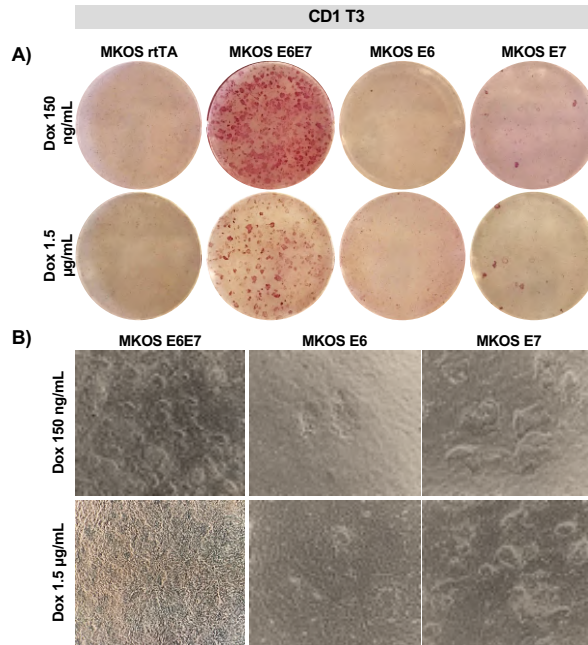


Fig. 32 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs CD1 en el T3 de reprogramación. A) Tinción con fosfatasa alcalina de colonias iPSC al día 12 de inducción con doxiciclina 150 ng/mL y 1.5 µg/mL; las colonias totalmente reprogramadas se observan teñidas de color rojo/violeta. **B)** Expansión de clonas de iPSC obtenidas después de un pase celular; las clonas se expandieron sobre una cama de feeders, cultivadas con medio M15 e inducidas con doxiciclina.

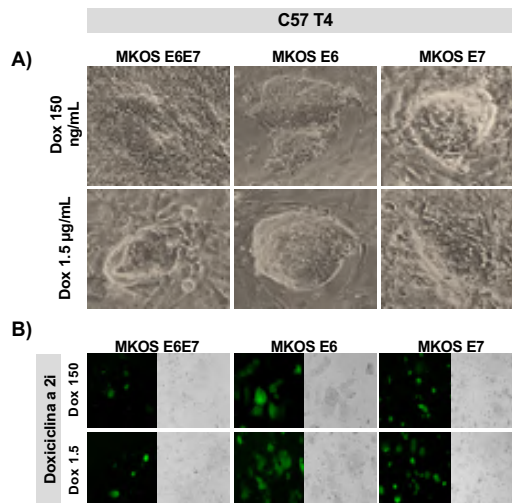


Fig. 33 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 en el T4 de reprogramación. A) Expansión de clonas de iPSC derivadas de MEFs C57 al T4 de reprogramación; las clonas fueron obtenidas después de un pase celular, las iPSCs se expandieron sobre una cama de feeders, cultivadas con medio M15 e inducidas con doxiciclina. **B)** Clonas de iPSCs cultivadas en medio 2i, lo que comprueba su independencia a la inducción con doxiciclina.

8.3. Reprogramación de MEFs C57 al T1 en presencia de inhibidores/promotores de la proteína YAP

En los ensayos fueron empleados MEFs C57 del T1, transfectados con las cuatro combinaciones de vectores: MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7. Los MEFs fueron sembrados sobre feeders (de acuerdo con la fórmula empleada para conocer el número de células a sembrar), con medio M15 y se indujo la reprogramación mediante la inducción con doxiciclina a la concentración de 1.5 µg/mL más la adición de algún fármaco que promueva o inhiba la actividad de la proteína YAP (LPA 10 µM, DAPT 10 µM y Ciclopamina 20 µM). Adicionalmente, se realizó una reprogramación con doxiciclina 1.5 µg/mL más DMSO al 0.17%, mismo que fungió como control debido a que fue el vehículo en el que fueron aplicaron los fármacos.

Adicionalmente, se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia (IF) de la proteína YAP en la región citoplasmática y nuclear de MEFs inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 µg/mL más los inhibidores y promotores de la actividad de la proteína (ver punto 7.2.9 de la metodología) (**Figura 34**). El análisis estadístico se realizó a partir de las medias producto de la diferencia en la IF nuclear menos la IF citoplasmática (**Figura 35**), en donde se observó que la inducción por 48h con doxiciclina 1.5 µg/mL no produce modificaciones en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP en la región nuclear, con respecto a los valores basales obtenidos en MEFs C57 al T1 sin inducir. De manera similar, la inducción de los MEFs con el control del vehículo de aplicación de los fármacos, DMSO 0.17% más doxiciclina 1.5 µg/mL, no produce modificaciones significativas en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP en la región nuclear, con respecto a los valores basales de los MEFs en ausencia y en inducción con doxiciclina 1.5 µg/mL.

Se observó un aumento significativo a $p < 0.05$, en la IF de la proteína YAP, en la región nuclear de MEFs inducidos con LPA 10 µM + doxiciclina 1.5 µg/mL; el aumento fue significativo en cada grupo de MEFs trasfectados (cada combinación de vectores) inducidos con LPA, con respecto al mismo grupo de MEFs en ausencia de LPA. Se observó también un aumento significativo en todos los grupos de MEFs inducidos con LPA, con respecto a los MEFs MKOS + rtTA inducidos solo con doxiciclina 1.5 µg/mL.

Los MEFs MKOS + E6, MKOS + E7 y MKOS + E6/E7, inducidos con Ciclopamina 20 µM + doxiciclina 1.5 µg/mL, mostraron un aumento significativo a $p < 0.05$ en la IF de la proteína YAP en la región nuclear, con respecto a los valores obtenidos en los MEFs inducidos con el control del vehículo, DMSO 0.17% + doxiciclina 1.5 µg/mL. Existe también un aumento significativo en la IF

de YAP, en los MEFs MKOS + E6/E7 inducidos con Ciclopamina 20 μ M, con respecto a los MEFs que fueron inducidos con DAPT 10 μ M.

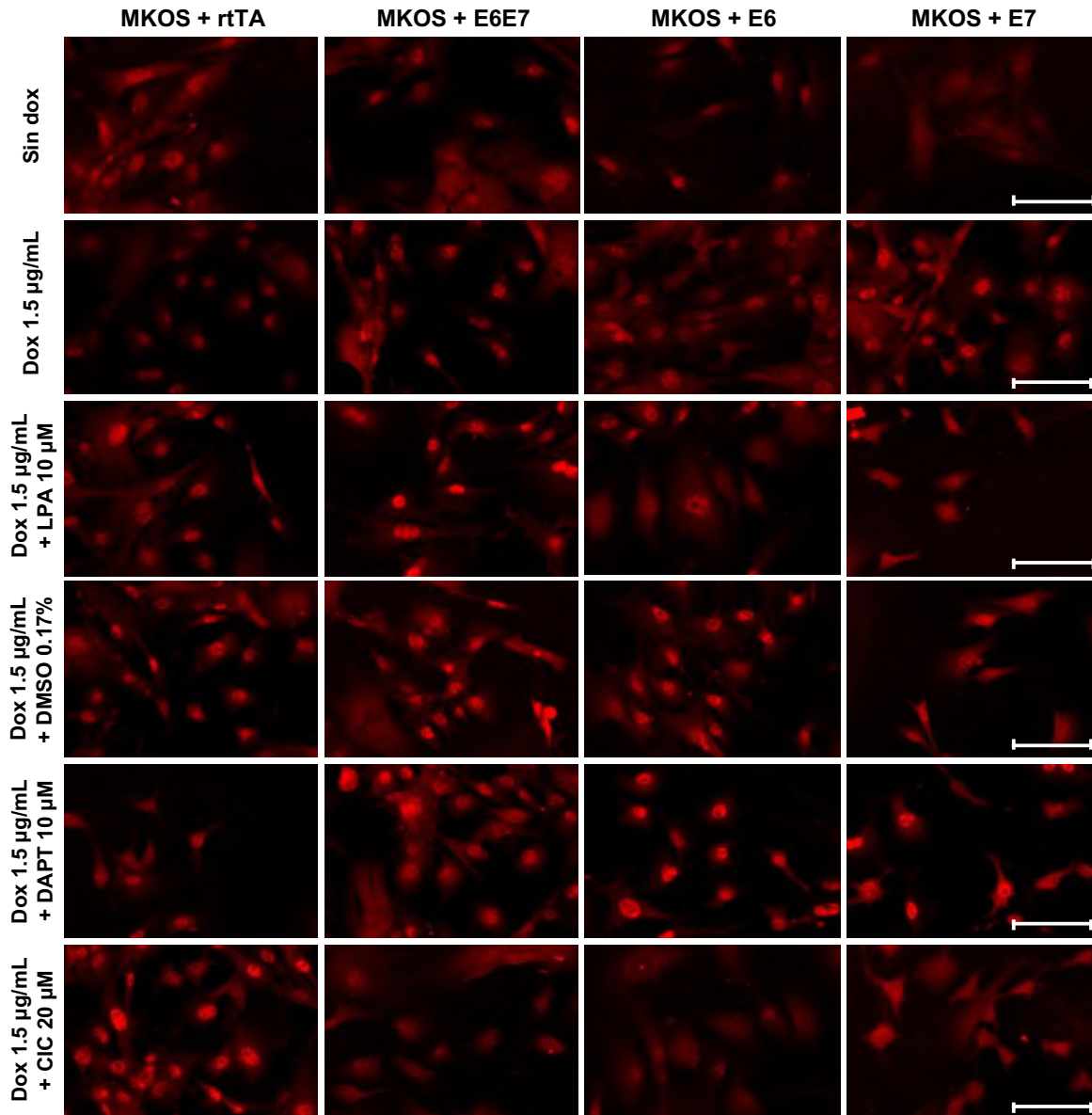


Fig. 34 Intensidad de fluorescencia de la proteína YAP en MEFs C57 inducidos por 48h con fármacos promotores o inhibidores de YAP. Se realizó una inmunocitoquímica contra la proteína YAP (en color rojo), en MEFs C57 transfectados con MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 μ g/mL más inhibidores o promotores de la actividad de la proteína YAP (LPA 10 μ M, DAPT 10 μ M, Ciclopamina 20 μ M o un control de DMSO al 0.17%). Posteriormente se cuantificó la intensidad de fluorescencia de la proteína, en regiones de 20 x 20 μ m que abarcan la zona nuclear y citoplasmática de las células tratadas. Barra de escala equivale a 100 μ m. (Para más detalle revisar los **anexos 5-7**).

Intensidad diferencial de fluorescencia de la proteína YAP, entre la región citoplasmática y nuclear de MEFs C57 al T1

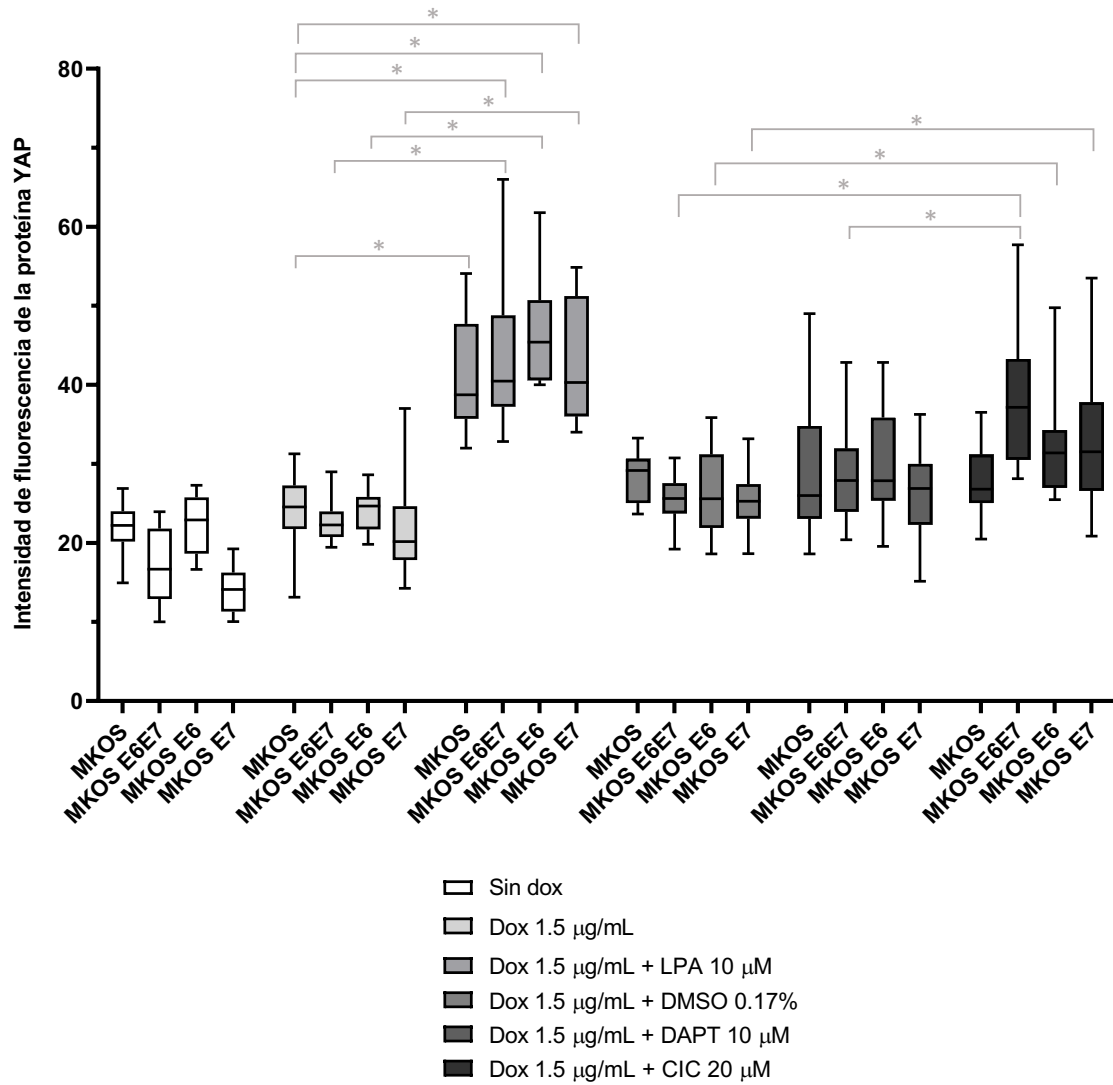


Fig. 35 El ácido lisofosfatídico (LPA) y la Ciclopamina (CIC) producen un aumento en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP nuclear, en MEFs C57 inducidos por 48h con fármacos promotores e inhibidores de YAP. Se realizó la cuantificación de la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP, en regiones de 20 x 20 µm que abarcan la zona nuclear y citoplasmática, de células inducidas por 48h con doxiciplina 1.5 µg/mL más inhibidores y promotores de la actividad de la proteína YAP (LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%). La cuantificación se realizó a partir de imágenes de epifluorescencia obtenidas al realizar una inmunocitoquímica contra la proteína YAP en las células tratadas. Se observó que el LPA y la Ciclopamina producen un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP nuclear de las células tratadas con dichos fármacos. Cada barra muestra la diferencia entre la intensidad de fluorescencia nuclear menos la intensidad de fluorescencia citoplasmática de veinte células analizadas, se grafica la media ± SD. * Diferencia significativa (p<0.05).

En la reprogramación de las células en presencia de fármacos promotores e inhibidores de la proteína YAP, se observó que la inducción con LPA 10 μM + doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produce un retraso en el comienzo de la reprogramación, los agregados celulares comenzaron a aparecer en el día 6 de inducción, pero presentaron un desarrollo adelantado, comparado con las agrupaciones obtenidas solo con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, lo que indica que aunque el inicio de la reprogramación ocurrió después, su desarrollo fue más rápido y para el día 10 de inducción todas las condiciones formaron colonias tipo iPSC maduras (**Figura 36B**).

Los fármacos DAPT y Ciclopamina fueron aplicados mediante dilución en DMSO, debido a ello, se realizó la reprogramación de MEFs en presencia de DMSO, para comprobar que por sí solo el vehículo no tiene efectos sobre la reprogramación; los MEFs fueron inducidos con DMSO a la concentración de 1.7 $\mu\text{L}/\text{mL}$, lo que corresponde al 0.17%, que fue la dosis de aplicación más alta que se empleó, más doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No se observaron diferencias significativas en la reprogramación de las células, comparado con las células reprogramadas solo con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 36C**).

La reprogramación de los MEFs inducidos por doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más DAPT 10 μM ocurrió de manera similar que en el control reprogramado con DMSO 0.17%. La aparición de las agrupaciones celulares ocurrió al día 4 de inducción y al día 10 se obtuvieron colonias iPSCs terminalmente reprogramadas. Se observó que las colonias obtenidas en presencia de DAPT presentan morfologías asimétricas y con bordes no definidos, no típicas de las colonias iPSCs obtenidas en experimentos anteriores; también se observó que las agrupaciones celulares obtenidas en los primeros días de inducción, son más pequeñas que las obtenidas con el control de DMSO (**Figura 36D**).

En los MEFs reprogramados con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más Ciclopamina 10 μM , se observó la aparición de las agrupaciones al día 4 y la derivación de iPSCs al día 10 de inducción. En el día 7 de inducción se observó un desarrollo más acelerado en las condiciones MKOS + E6/E7 y MKOS + E7, comparado con las otras condiciones y con respecto al control de DMSO (**Figura 36E**).

La identidad de las colonias iPSC obtenidas bajo la inducción de los fármacos, se comprobó al realizar una tinción con fosfatasa alcalina y observarse la tinción rojiza de las colonias, característica de las células troncales (**Figura 37**); de manera similar se realizó un pase de las colonias obtenidas para comprobar que se encontraran totalmente reprogramadas, y se observó la formación de clones de colonias iPSC que presentaron la morfología típica de las células ESC (**Figura 38**), lo que demuestra que las iPSC obtenidas estaban terminalmente reprogramadas.

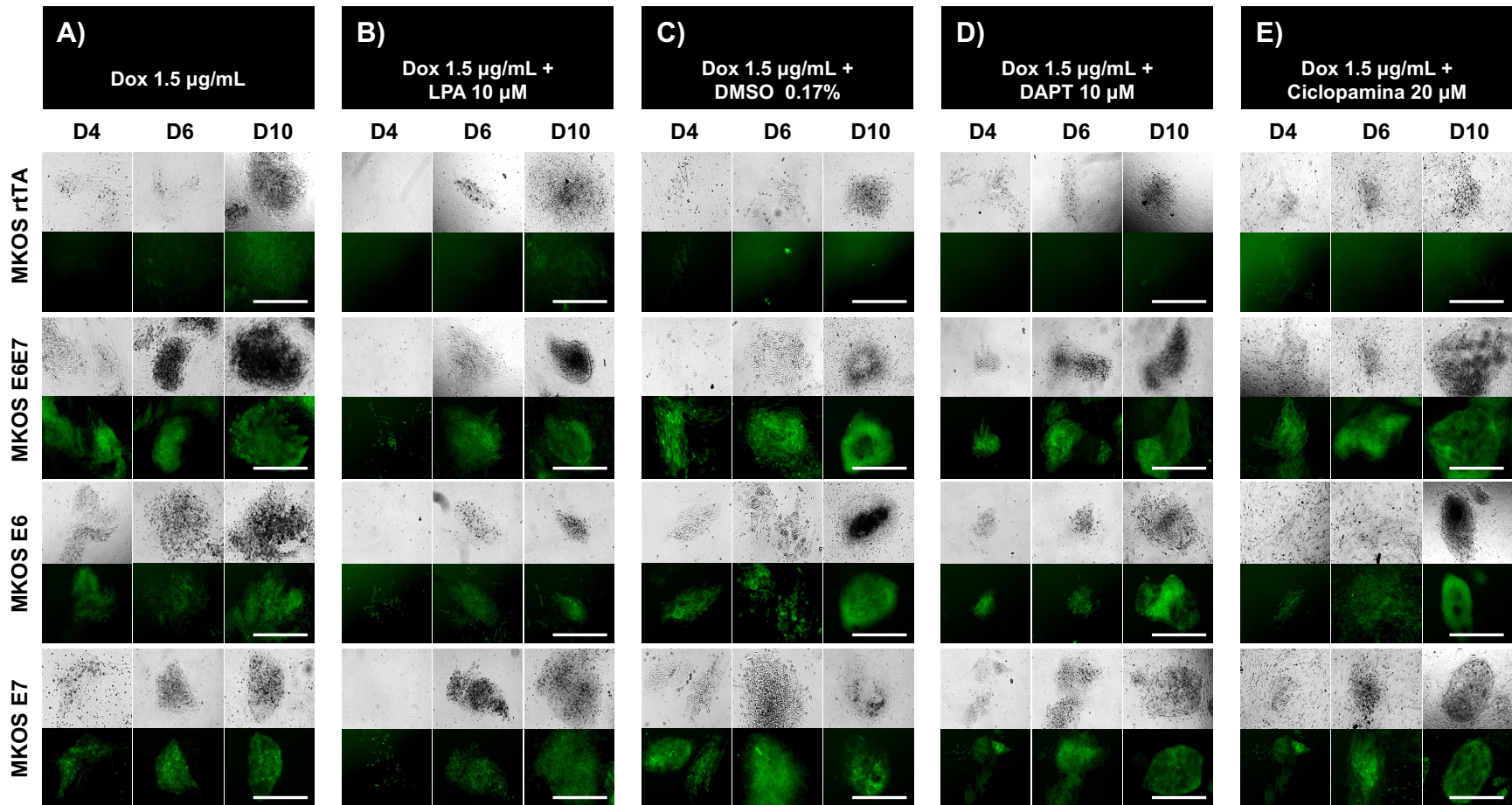


Fig. 36 La inhibición o promoción en la actividad de la proteína YAP, mediada por fármacos, no interfiere en la derivación de iPSCs a partir de MEFs C57 transfectados con MKOS más los oncogenes E6 y E7 de VPH-16. Se realizaron ensayos de reprogramación celular de MEFs C57 al T1, transfectados con MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 µg/mL más inhibidores y promotores de la actividad de la proteína YAP (LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%). La reprogramación de los MEFs en presencia de los fármacos promotores e inhibidores de YAP no afecta la derivación de iPSCs. En las imágenes se observa la aparición de agregados celulares al día 4 (D4) de inducción con doxiciclina, y la maduración de las colonias en el día 10 (D10) de inducción. Barra de escala equivale a 500 µm.

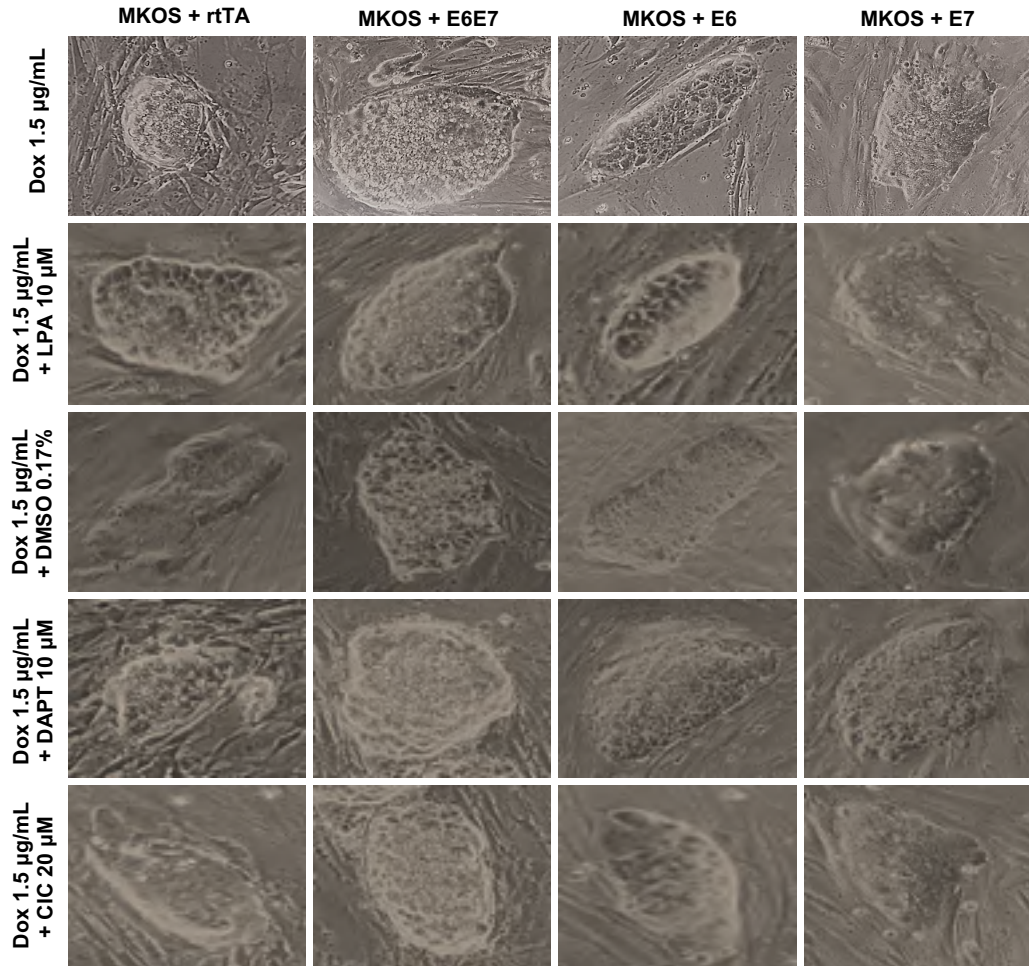


Fig. 37 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 inducidos con fármacos promotores e inhibidores de la proteína YAP. Expansión de clonas de iPSC derivadas de MEFs C57 inducidas con doxiciclina 1.5 µg/mL más los fármacos LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%; las clonas fueron obtenidas después de un pase celular, al ser expandidas sobre una cama de feeders, cultivadas con medio M15 e inducidas bajo las mismas condiciones en las que fueron derivadas las iPSCs.

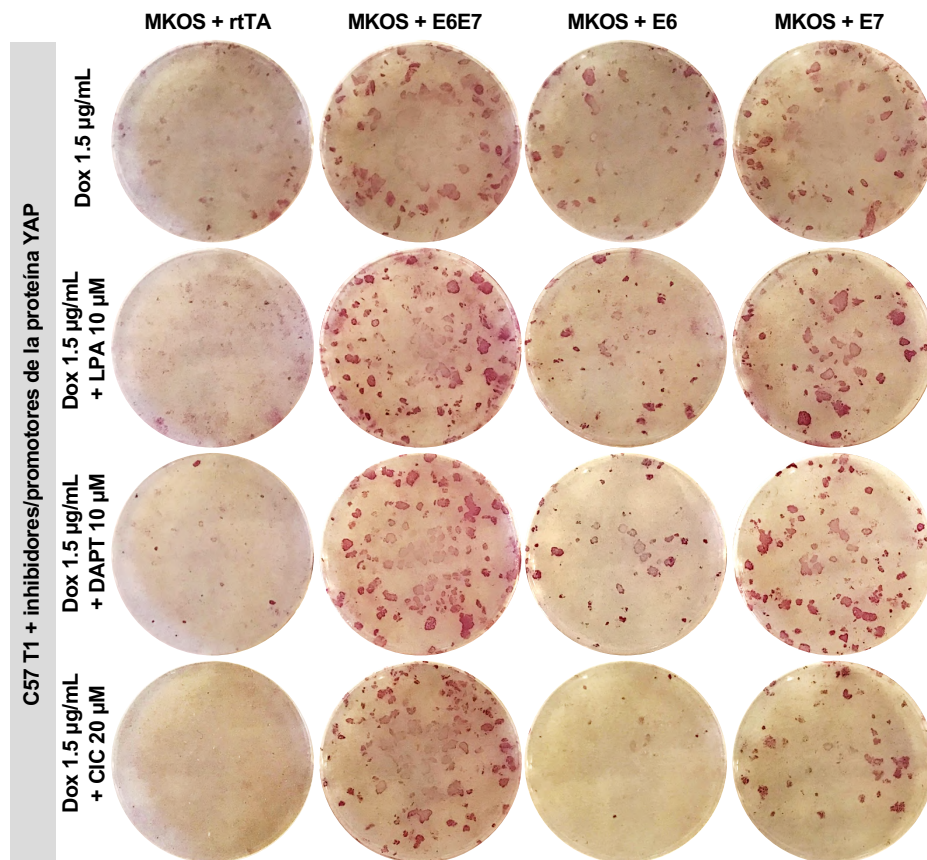


Fig. 38 Caracterización de colonias iPSC derivadas a partir de MEFs C57 inducidos con fármacos promotores e inhibidores de la proteína YAP. Tinción con fosfatasa alcalina de colonias iPSC al día 12 de inducción con doxiciclina 1.5 µg/mL más los fármacos LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%; las colonias totalmente reprogramadas se observan teñidas de color rojo/violeta.

El análisis estadístico de las eficiencias obtenidas a partir de los MEFs reprogramados en presencia de los fármacos (**Figura 39**), reveló que existe una diferencia significativa a $p < 0.05$ entre la eficiencia obtenida en los MEFs MKOS + E6/E7 inducidos con doxiciclina 1.5 µg/mL y LPA 10 µM, con respecto a MKOS + rtTA, MKOS + E6 y MKOS + E7 inducidos bajo las mismas condiciones, e incluso con las condiciones control inducidas solo con doxiciclina 1.5 µg/mL.

La reprogramación de los MEFs en presencia de DMSO 0.17% no se ve afectada ni produce efectos significativos con respecto a la reprogramación inducida solo con doxiciclina 1.5 µg/mL.

En las células inducidas con DAPT 10 µM y Ciclopamina 20 µM, más doxiciclina 1.5 µg/mL, se observó un aumento significativo a $p < 0.05$ en MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + rtTA, MKOS + E6 y MKOS + E7 inducidos bajo las mismas condiciones. En comparación con las eficiencias obtenidas en la reprogramación con DMSO 0.17%, al reprogramar en presencia de DAPT

se observó que MKOS + E6/E7 presenta un aumento significativo a $p < 0.05$ con respecto a MKOS + rtTA y MKOS + E6/E7 inducidos con el control de DMSO; MKOS + E7 inducido con DAPT también presentó un aumento significativo comparado con los MEFs inducidos con DMSO. En la inducción con Ciclopamina se observó un aumento significativo en MKOS + E6/E7 con respecto a MKOS + rtTA reprogramado con el control de DMSO.

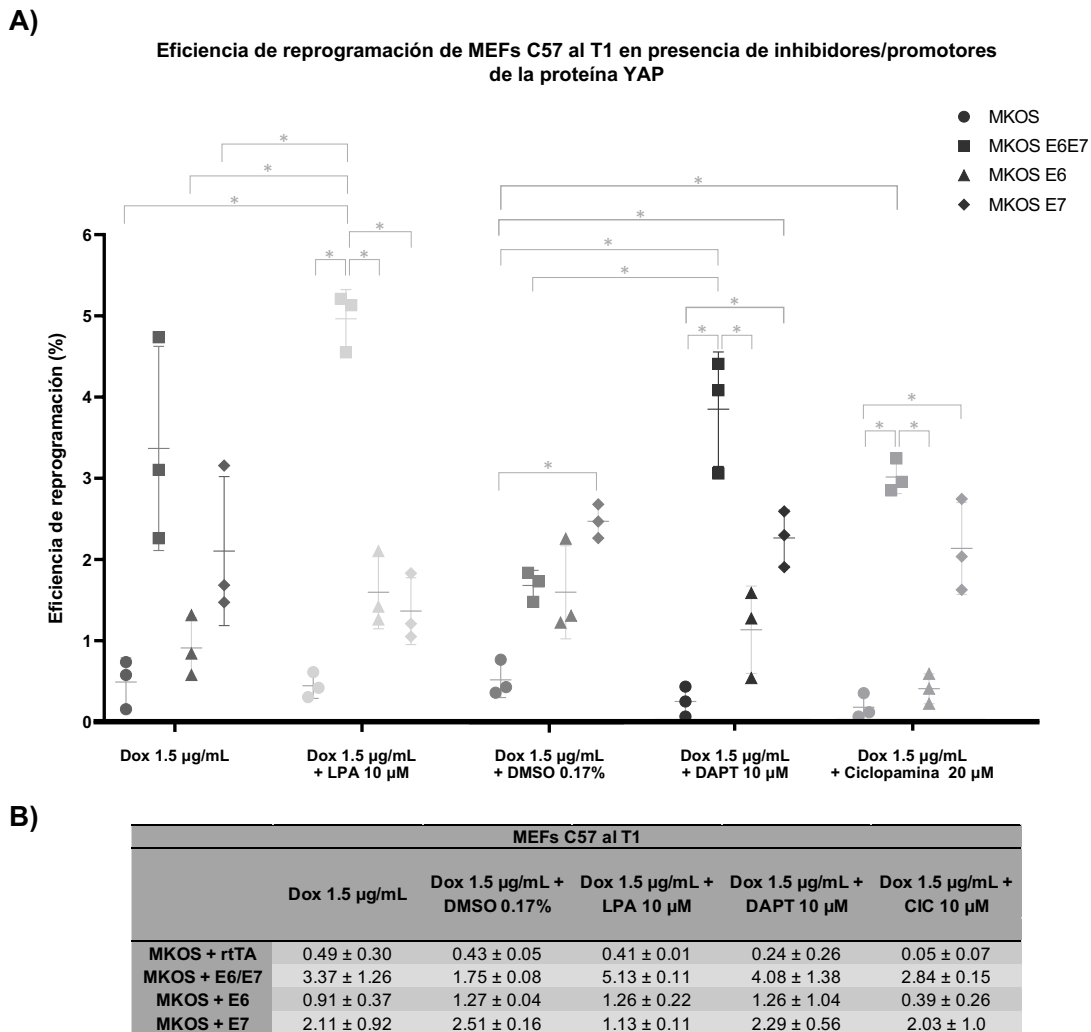


Fig. 39 Eficiencias de reprogramación de iPSCs derivados a partir de MEFs C57, inducidos con doxiciplina 1.5 µg/mL más fármacos promotores o inhibidores de la proteína YAP. **A)** La figura muestra la eficiencia de reprogramación (%) de colonias iPSC obtenidas a partir de MEFs C57 transfectados con cuatro combinaciones de vectores MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, inducidos con doxiciplina 1.5 µg/mL más inhibidores y promotores de la actividad de la proteína YAP (LPA 10 µM, DAPT 10 µM, Ciclopamina 20 µM o un control de DMSO al 0.17%). La cuantificación de las colonias iPSC derivadas se realizó al día 12 de inducción con doxiciplina. Cada barra muestra los valores de tres experimentos diferentes y se grafica la media ± SD. * Diferencia significativa de $p < 0.05$. **B)** Tabla que muestra las medias ± SD de las eficiencias de reprogramación (en porcentaje %) obtenidas con cada combinación de vectores, en todas las condiciones evaluadas.

9. Discusión

Desde el año 2006 en el que Takahashi y Yamanaka demostraron la posibilidad de derivar células troncales pluripotentes inducidas experimentalmente a partir de células somáticas diferenciadas, mediante la inducción exógena de los factores reprogramadores MKOS, el estudio de estas células ha cobrado gran importancia. En nuestro grupo de trabajo se han derivado iPSC utilizando un vector inducible por doxiciclina que contiene los genes reprogramadores MKOS (Covarrubias, 2020), y en el presente trabajo se logró la obtención de células iPSCs derivadas de MEFs con proliferación activa (duplicación de 0.7-0.8 días), obteniendo una eficiencia de reprogramación de $0.49 \pm 0.30\%$ que resultó significativamente más eficiente en comparación a las reportadas anteriormente.

La reducción de la proliferación como barrera para la reprogramación celular

Un gran número de publicaciones demuestra que la proliferación activa es un proceso celular necesario para la reprogramación eficiente. Así, una disminución en la tasa de proliferación provocado por pases sucesivos de células primarias tiene un efecto negativo en la reprogramación (Banito *et al.*, 2009; Banito y Gil, 2010; Zuber *et al.*, 2011; Polo *et al.*, 2012; Takahashi y Yamanaka, 2016; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017). No es inesperado que se haya demostrado que entre las moléculas principales que frenan el proceso de reprogramación se encuentren proteínas supresoras tumores como las codificadas por los genes RB y p53, que actúan en la fase G1 del ciclo celular, regulándolo negativamente de manera importante (López-Marure, 2003; Banito *et al.*, 2009; Banito y Gil, 2010; Gilbert y Barresi, 2016); se ha comprobado que la disminución en la expresión de estos supresores oncogénicos tiene un efecto positivo en la reprogramación (Banito *et al.*, 2009; Hong *et al.*, 2009; Kawamura *et al.*, 2009; Kareta *et al.*, 2015). Por otro lado, es interesante que los mismos genes reprogramadores MKOS provocan que las células inicien un proceso de senescencia celular que actúa como una barrera inicial que limita el proceso de reprogramación (Banito *et al.*, 2009; Banito y Gil, 2010; Mosteiro *et al.*, 2016), de tal forma que solo las células que escapan a este proceso son capaces de reprogramar y derivar en iPSCs. Este proceso de inducción de la senescencia se debe a que MKOS regula a la alza las proteínas p53, p16 y p21, sin embargo, se ha demostrado que la adición de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 en células que expresan MKOS, contrarresta el proceso de senescencia inducido por los factores de reprogramación y favorece el aumento en la proliferación celular (Banito *et al.*, 2009).

Es bien sabido que los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 median su efecto en diferentes puntos de control del ciclo celular y logran que las células que ya no se dividen puedan reingresar al ciclo

mediante la inhibición de p53 y RB, respectivamente (Liu *et al.*, 2008; Tsuruga *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2013). Hecho que se comprobó en el presente trabajo en los cultivos de MEFs CD1 y C57, pues al ser inducidos con doxiciclina, los MEFs transfectados con los oncogenes E6 y E7 aumentaron su tasa de proliferación celular, incluso, los cultivos de MEFs posmitóticos empleados lograron reingresar al ciclo celular y contribuir exitosamente en la reprogramación hacia iPSCs.

Las distintas técnicas de obtención de iPSCs a partir de células diferenciadas que han sido publicadas, en su mayoría emplean células que se encuentran activamente proliferando, lo cual es coincidente con el hecho de que no han alcanzado la diferenciación terminal. Solo en muy pocos casos se ha demostrado la reprogramación celular al estado de pluripotencia a partir de células posmitóticas (Emili *et al.*, 2008). Hecho que enriquece el trabajo realizado ya que se logró la derivación de iPSCs terminalmente reprogramadas, derivadas a partir de cultivos de MEFs posmitóticos. Por otro lado, se ha observado que la inclusión de oncogenes facilita la reprogramación, aunque no es raro que las iPSC derivadas presenten alteraciones cromosómicas (Utikal *et al.*, 2009). Resulta interesante que un estudio reciente sugiere que una de las funciones primarias de Oct4 muy al principio de la reprogramación es promover proliferación celular (Velychko *et al.*, 2019), hecho que refuerza nuestra hipótesis de que el añadir promotores de la proliferación celular, como los oncogenes E6 y E7 de VPH-16, contribuye exitosamente con la reprogramación celular mediada por MKOS.

La reprogramación celular se ve favorecida en presencia de los oncogenes E6 y E7 de VPH-16

En el presente trabajo se estudió el efecto que producen los oncogenes E6 y E7 de VPH-16 sobre la dinámica de reprogramación y su contribución en la eficiencia de derivación de iPSCs. Para ello, se evaluó la eficiencia de reprogramación de MEFs con proliferación activa que expresan la combinación de los oncogenes E6/E7, más los factores reprogramadores MKOS; en MEFs CD1 del T1, y MEFs C57 del T1 y T2, se comprobó que el uso de una combinación de MKOS + E6/E7 aumenta la eficiencia de reprogramación de 10 a 20 veces más que al usar solo MKOS, obteniendo con esta combinación una eficiencia de hasta $3.37 \pm 1.26\%$. Interesantemente, se observó que las colonias iPSC aparecen en menor tiempo y adquieren el compromiso de pluripotencia 12 días después de la inducción con doxiciclina, lo cual resulta significativamente más eficiente en comparación a lo reportado anteriormente en los MEFs que solo expresan MKOS, ya que en estos se necesitan de 12 a 15 días para obtener iPSCs terminalmente reprogramadas y la eficiencia de reprogramación es de $0.49 \pm 0.30\%$.

En el laboratorio se logró la derivación de MEFs CD1 (T2 y T3) y C57 (T3 y T4) posmitóticos que contienen los vectores MKOS y E6/E7, a partir de los cuales se demostró que la presencia de los

oncogenes que promueven la proliferación celular y la reentrada en el ciclo celular posibilitan la reprogramación de MEFs hacia iPSCs. En MEFs con proliferación reducida (tasas de duplicación superiores a 2.2 días) se logró la derivación de iPSCs, obteniéndose una eficiencia de hasta $2.74 \pm 0.45\%$, mientras que en MEFs posmitóticos, se obtuvo una eficiencia de reprogramación de hasta $1.26 \pm 0.18\%$, efecto que se replica en astrocitos posmitóticos (Tesis de Maestría de Cortes-Servin), lo cual no se logra al emplear sólo los genes MKOS. Las iPSC derivadas por esta combinación muestran las características típicas de las iPSCs y comparten características con las células ES, incluyendo la capacidad para generar embriones quiméricos con alta eficiencia (Tesis de Cortes-Servin). Por tanto, el sistema nos brinda la posibilidad de emplear esta combinación de genes en la reprogramación de células posmitóticas diferenciadas provenientes de tejidos en donde no hay renovación celular.

Posteriormente, se planteó la posibilidad de estudiar por separado el efecto de cada oncogén, y comprobar si E6 y E7 poseen efectos en la reprogramación al inducirse de manera individual. Para ello, se construyeron dos vectores que expresan por separado a los oncogenes E6 y E7, comprobándose que en MEFs con proliferación activa (T1 y T2 de C57, y T1 de CD1), transfectados con las combinaciones MKOS + E6 y MKOS +E7, sí se logra la derivación de colonias iPSCs, además de que estas condiciones también promueven un aumento significativo en la eficiencia de reprogramación, alcanzando valores de hasta $1.19 \pm 0.55\%$ y $2.79 \pm 1.28\%$, respectivamente. Por otro lado, el efecto producido por la combinación de los oncogenes E6 y E7, para facilitar la reprogramación de células posmitóticas mediante MKOS, también se observó cuando se utilizó exclusivamente E6 o E7, obteniéndose eficiencias relativamente altas ($0.61 \pm 0.19\%$, $1.45 \pm 0.11\%$, respectivamente), sobretodo considerando que la eficiencia en ausencia de los oncogenes es $<0.05\%$. Con estos resultados queda demostrando que los oncogenes logran que las células reingresen al ciclo y por acción los genes MKOS, se produzca la reprogramación al estado de pluripotencia a partir de células posmitóticas.

Posibles efectos de la proliferación en la remodelación de la cromatina durante la reprogramación celular

Se ha demostrado que el proceso de reprogramación hacia un estado pluripotente se alcanza a través de la interacción entre vías de señalización que conducen a modificaciones en la cromatina y a la acción de los factores de transcripción que promueven la pluripotencia (Jaenisch y Young, 2008; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017). Se ha descrito que el proceso de reprogramación se lleva a cabo mediante dos ondas transcripcionales: la primera impulsada por c-Myc/Klf4, y la segunda onda impulsada por Oct4/Sox2/Klf4 (Polo *et al.*, 2012; David y Polo, 2014), siendo ésta última la de mayor

importancia para el establecimiento de la pluripotencia. Este modelo propuesto, si bien es un buen referente de los cambios celulares que ocurren durante la reprogramación, puede ser impreciso en cuanto a la contribución de los genes reprogramantes, por ejemplo, recientemente se mostraron evidencias que indican que una de las primeras acciones de Oct4 en la reprogramación es promover la proliferación celular (Velychko *et al.*, 2019). Otro esquema, propone que la sobreexpresión de los genes de reprogramación promueve la diferenciación a diferentes linajes embrionarios (e.g., Oct4 a mesodérmicos, Sox2 a ectodérmicos), de tal forma que pueden ser sustituidos por otros genes maestros que especifiquen los mismos linajes (Takahashi y Yamanaka, 2016).

Sin importar el mecanismo preciso de acción de los genes reprogramantes, el proceso de reprogramación obligadamente se caracteriza por cambios en la cromatina. Algunos autores han propuesto dos fases prominentes de modificación de la cromatina que ocurren durante la reprogramación: una fase inicial, definida por un cierre masivo de cromatina somática, y otra, antes del establecimiento de la pluripotencia, donde la cromatina pasa a un estado abierto, existiendo un recambio de factores de transcripción somáticos por factores promotores de la pluripotencia (Chronis *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017). Desde otro punto de vista, se ha mostrado que muy al inicio de la reprogramación, la heterocromatina se desestabiliza dando oportunidad a la remodelación de la cromatina acorde a influencias intrínsecas (e.g., genes reprogramantes) o extrínsecas (e.g., condiciones de cultivo) (Jaenisch y Young, 2008; Buganim, Faddah, y Jaenisch, 2013; Chávez-Gonzalez *et al.*, 2017).

En este sentido, en el proceso de represión transcripcional participa la proteína 1 de heterocromatina (HP1), que es un marcador característico de la heterocromatina (Hathaway *et al.*, 2012). Interesantemente, al realizar el seguimiento de la distribución nuclear de la proteína HP1 durante la reprogramación de MEFs, se ha observado que Oct4 induce cambios en la heterocromatina en los primeros 3 días de reprogramación, lo cual sugiere que Oct4 es responsable del aflojamiento de la heterocromatina en las etapas iniciales de la reprogramación (Chen *et al.*, 2020). Por lo tanto, es interesante preguntarse si estos cambios representan una función específica de Oct4, o bien, resultan de los efectos proliferativos promovidos por este factor transcripcional (Velychko *et al.*, 2019), de ser así, los oncogenes E6 y E7 de VPH pudieran también promover este relajamiento de la cromatina. En este sentido, nuestros resultados concuerdan con esta posibilidad, inclusive en la reprogramación de células posmitóticas, por lo que se vuelve relevante explorar hasta que punto los oncogenes immortalizantes, no solo promueven proliferación celular, sino también incrementan la plasticidad de la cromatina durante la reprogramación celular.

Un punto que no debemos de dejar a un lado es la preocupación que existe al usar oncogenes durante el proceso de reprogramación, pues es bien sabido que su actividad podría promover la

formación de tumores (Okita *et al.*, 2010). Sin embargo, los vectores TET-On generados en el laboratorio permiten estudiar de manera controlada la expresión de los oncogenes E6/E7 de VPH-16, es decir, la activación de la transcripción de E6 y E7 solo se produce en presencia de tetraciclina (doxiciclina). En general, los vectores diseñados en el laboratorio resultan muy eficientes y producen altos niveles de inducción (Covarrubias, 2020), además, una ventaja extra sobre otros vectores existentes, es que al ser un transposón piggyBac, su inserción durante la transgénesis de las secuencias se lleva a cabo preferentemente en secuencias intergénicas y en intrones (Li *et al.*, 2016), lo que favorece el silenciamiento de los transgenes en ausencia de doxiciclina e incrementa la seguridad a la hora de generar iPSCs de alta calidad.

Contribución de YAP/TAZ en la reprogramación celular

Entre los pocos casos de derivación de células troncales a partir de células somáticas terminalmente diferenciadas encontramos un reporte que muestra que la activación ectópica y transitoria de las proteínas YAP/TAZ es capaz de reactivar el ciclo celular y provocar un fenómeno de desdiferenciación que culmina en la derivación de células troncales que retienen las restricciones de linaje del tejido de origen, es decir, poseen características similares a las de las células troncales somáticas adultas. En particular, se ha demostrado que células diferenciadas de la glándula mamaria, neuronas y células acino-pancreáticas, se convierten de manera eficiente en células proliferantes con propiedades de células troncales/progenitoras de sus respectivos tejidos, después de ser inducidas con un vector que expresa a YAP (Panciera *et al.*, 2016). Además, existen algunos reportes que indican que la oncoproteína E6 estabiliza y regula positivamente a la proteína YAP, evitando su degradación y facilitando su translocación al núcleo por medio de un dominio de unión a PDZ en el extremo carboxilo terminal de ambas proteínas (Choi *et al.*, 2014; He, *et al.*, 2015; Strickland *et al.*, 2018). Por lo tanto, los efectos de E6 pudieran ser mediados por la proteína YAP.

En la literatura se encuentran numerosos reportes que indican la existencia de diversas señales que se encargan de regular a la vía Hippo, y en consecuencia a la proteína YAP, entre las que podemos encontrar la polaridad celular y las uniones célula-célula, la mecanotransducción dependiente del esqueleto de actina, factores solubles y ligandos de receptores acoplados a proteínas G, así como muchas proteínas que pueden regular las actividades de diferentes componentes de la vía (Yu *et al.*, 2012; Oku *et al.*, 2015; Yu, Zhao y Guan, 2015; Qin *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2018; Stampouloglou y Varelas, 2018; Totaro, Panciera, y Piccolo, 2018). Además, se sabe que la actividad de la proteína YAP esta interconectada con las vías de señalización Sonic Hedgehog (SHh) y Notch (Tschaharganeh *et al.*, 2013; Tariki, *et al.*, 2014; Kim, *et al.*, 2017; Totaro *et al.*, 2018), las cuales podrían ser un blanco directo para el estudio de la proteína YAP.

La peculiaridad de YAP para reiniciar el ciclo celular y promover desdiferenciación fue la razón por la que cobró importancia dentro del contexto de reprogramación. Inicialmente, se planteó valorar la eficiencia de reprogramación cuando YAP es provisto exógenamente, sin embargo, no se logró obtener a tiempo la construcción que permitiera realizar este experimento. Por lo tanto, se decidió realizar ensayos de reprogramación en presencia de fármacos que promovieran o inhibieran la actividad de la proteína YAP, y así inferir la posible contribución de esta proteína al proceso de reprogramación y su relación con el efecto que produce sobre los oncogenes E6 y E7.

El ácido lisofosfatídico o LPA es una molécula capaz de promover la activación de YAP endógena al inducir su translocación al núcleo por medio de la inhibición de las cinasas LATS1/2, además, esta molécula es capaz de promover el estado naive de las ESC e iPSCs humanas cuando se añade al medio de cultivo (Qin *et al.*, 2016). Con esta base, se exploró la posibilidad de que el LPA aumentara la reprogramación celular de MEFs con proliferación activa. Se observó que al inducir MEFs con LPA, existe un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP nuclear, lo cual concuerda con los reportes anteriores que indican que el LPA promueve la activación de YAP endógeno e induce su translocación al núcleo. Adicionalmente, se observó un aumento significativo en la eficiencia de reprogramación en los MEFs MKOS + E6/E7 inducidos con LPA, el cual corresponde a $5.13 \pm 0.11\%$, siendo este valor el más alto obtenido en todos los ensayos de reprogramación realizados, resultado que concuerda con datos publicados en los que se ha observado que la adición de YAP incrementa la eficiencia de reprogramación de fibroblastos hacia iPSCs, comparado con células inducidas solo con MKOS, además de que resulta en una mayor expresión de los genes endógenos de pluripotencia Oct4, Sox2 y Klf4 (Lian *et al.*, 2010), datos que respaldan que YAP contribuye positivamente a la pluripotencia de iPSCs durante el proceso de reprogramación. Las colonias iPSC obtenidas con la inducción de LPA presentaron una morfología más compacta y simétrica que en las células reprogramadas solo con doxiciclina, lo que puede deberse al efecto que produce YAP en la promoción del estado naive en las células pluripotentes (Qin *et al.*, 2016). Estos resultados son preliminares y si bien concuerdan con la contribución de YAP en la reprogramación, este efecto debe analizarse desde el punto de vista de las acciones de los oncogenes, pues en su ausencia no se observó un efecto similar. En este sentido, YAP pudiera contribuir al aumento en la proliferación celular junto con los oncogenes E6 y E7 mediante la activación de la transcripción de genes directamente relacionados con el ciclo celular, como son las ciclinas A, B y C, y CDK1 (Totaro *et al.*, 2018), o la transcripción de los genes de pluripotencia Myc, Sox2, Klf4 y NANOG (Moya y Halder, 2019) que se encuentran dentro de los genes blanco de YAP.

Con el fin de explorar el efecto contrario, es decir el requerimiento de YAP en la reprogramación celular, se tomó como premisa que las vías de señalización de Notch y SHh están activas en los MEFs

en reprogramación y que, por tanto, la inhibición de las vías de señalización provocan la inactivación de YAP (Tschaharganeh *et al.*, 2013; Tariki *et al.*, 2014. Kim *et al.*, 2017. Totaro *et al.*, 2018). Se realizaron ensayos de reprogramación de MEFs con proliferación activa en presencia de DAPT, un inhibidor de la vía Notch, o en presencia de Ciclopamina, un inhibidor de la vía de SHh, y se evaluó la eficiencia de reprogramación inducida por MKOS en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y/o E7. En la inducción de los MEFs con DAPT o Ciclopamina se observó un efecto similar, el cual corresponde a un ligero aumento en la intensidad de fluorescencia de la proteína YAP nuclear, mismo que solo resulta significativo en la inducción con Ciclopamina, lo cual, contrario a lo esperado, muestra que los inhibidores de las vías Notch y SHh no poseen efecto en la inhibición de la actividad de la proteína YAP.

En cuanto a la reprogramación de los MEFs inducidos con DAPT o Ciclopamina, ocurrió un efecto similar, es decir, con los dos tratamientos se observó una disminución en la eficiencia de reprogramación, la cual fue contrarrestada cuando se combinó MKOS con E6/E7 o solo con E7, observación que fue más evidente en la presencia de Ciclopamina. Si bien estos datos deben considerarse preliminares, las observaciones son coincidentes con la posibilidad de que YAP y E6/E7 son dos mecanismos que, quizá por vías diferentes, pueden promover el reingreso al ciclo celular y así facilitar la reprogramación celular por MKOS. Será necesario realizar más ensayos que permitan obtener resultados conclusivos sobre la participación de la proteína YAP en la reprogramación y la relación que esta proteína mantiene con los oncogenes E6 y E7.

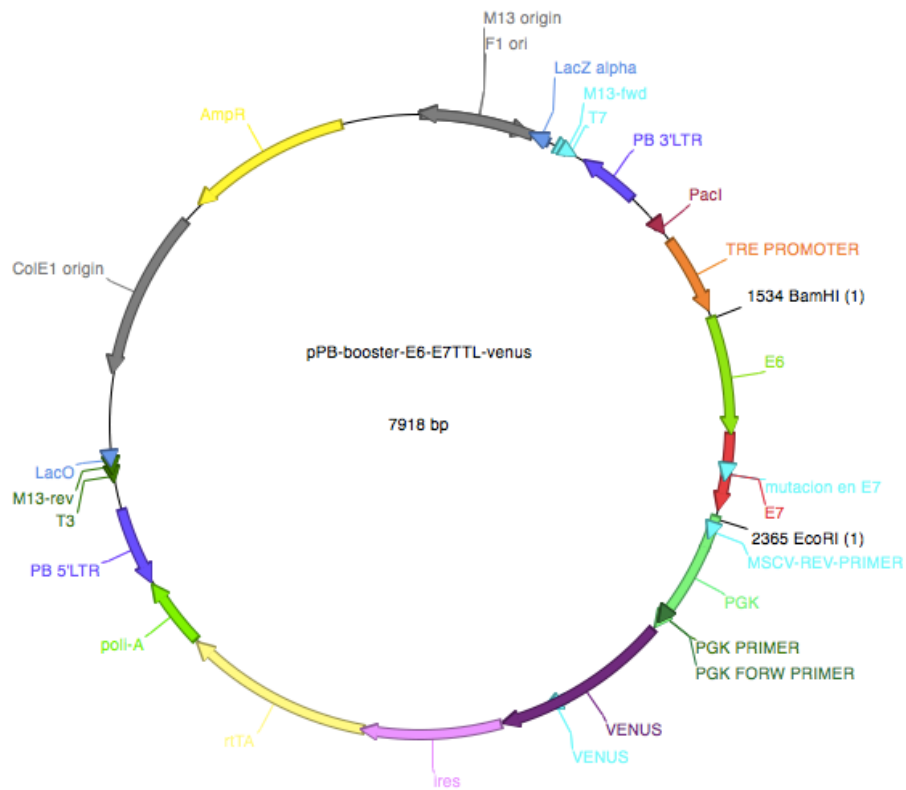
10. Conclusiones

- Los oncogenes E6 y/ E7 contribuyen en el aumento de la eficiencia de reprogramación mediada por MKOS, acelerando el proceso e incrementando la generación de iPSC.
- El incremento en la reprogramación por MKOS puede ser promovido por uno solo de los oncogenes, E6 o E7, sin embargo, la acción conjunta de ambos oncogenes mejora significativamente la eficiencia de reprogramación.
- E6 y/o E7 induce la reentrada al ciclo celular en células con proliferación disminuida o células posmitóticas y, en consecuencia, permite la reprogramación mediada por MKOS.
- YAP pudiera contribuir a la reprogramación inducida por MKOS, e inclusive ser requerido, en convergencia con vías de señalización (e.g., LPA, Notch, SHh) que regulan la vía Hippo.

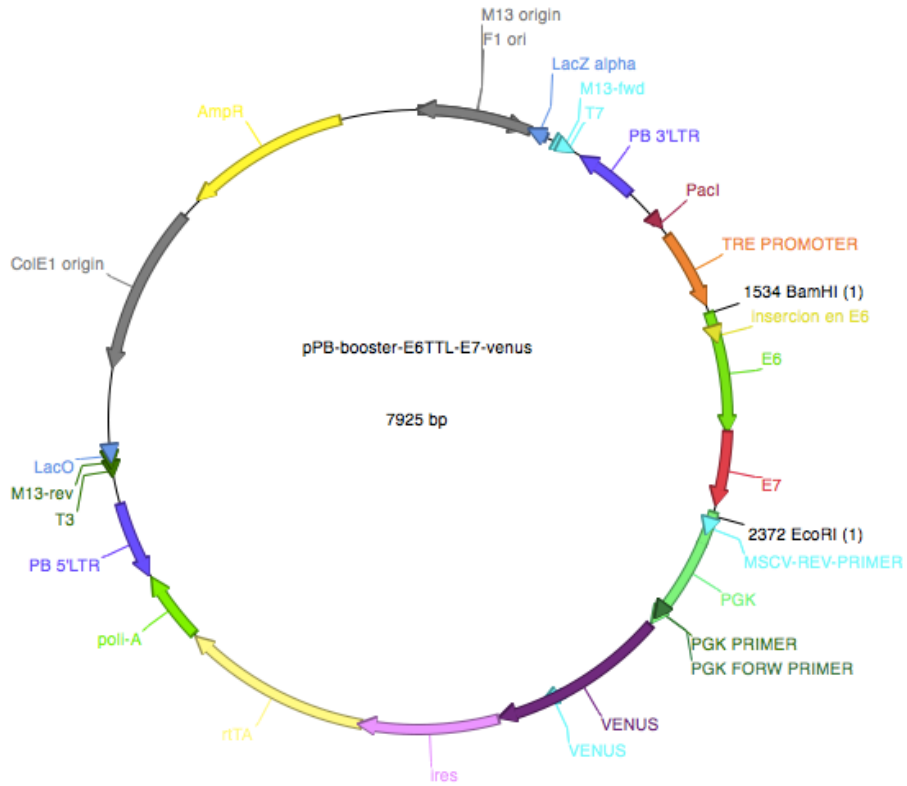
11. Perspectivas

- Realizar la reprogramación de células en presencia de los inhibidores/promotores directos de la proteína YAP en células posmitóticas.
- Construir vectores que sobreexpresen a la proteína YAP, para estudiar con detalle los efectos producidos en la reprogramación celular y la contribución a la actividad de las oncoproteínas E6 y/o E7.
- Explorar más a fondo la participación de la vía SHh en la reprogramación de MEFs.
- Reprogramar células humanas con los vectores MKOS y E6/E7.

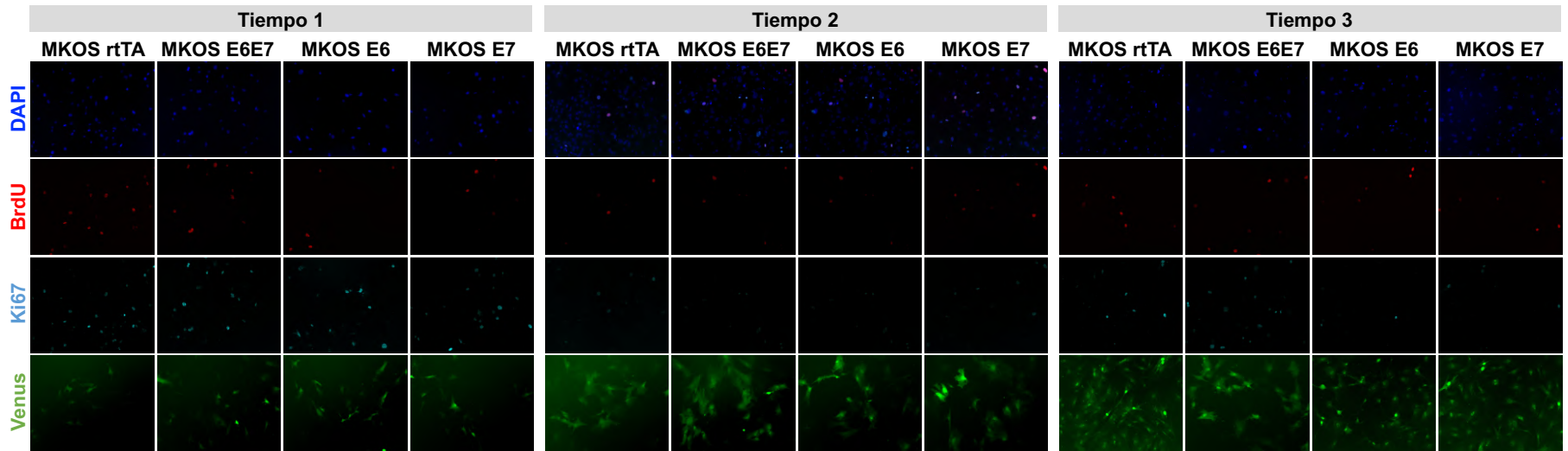
12. Anexos



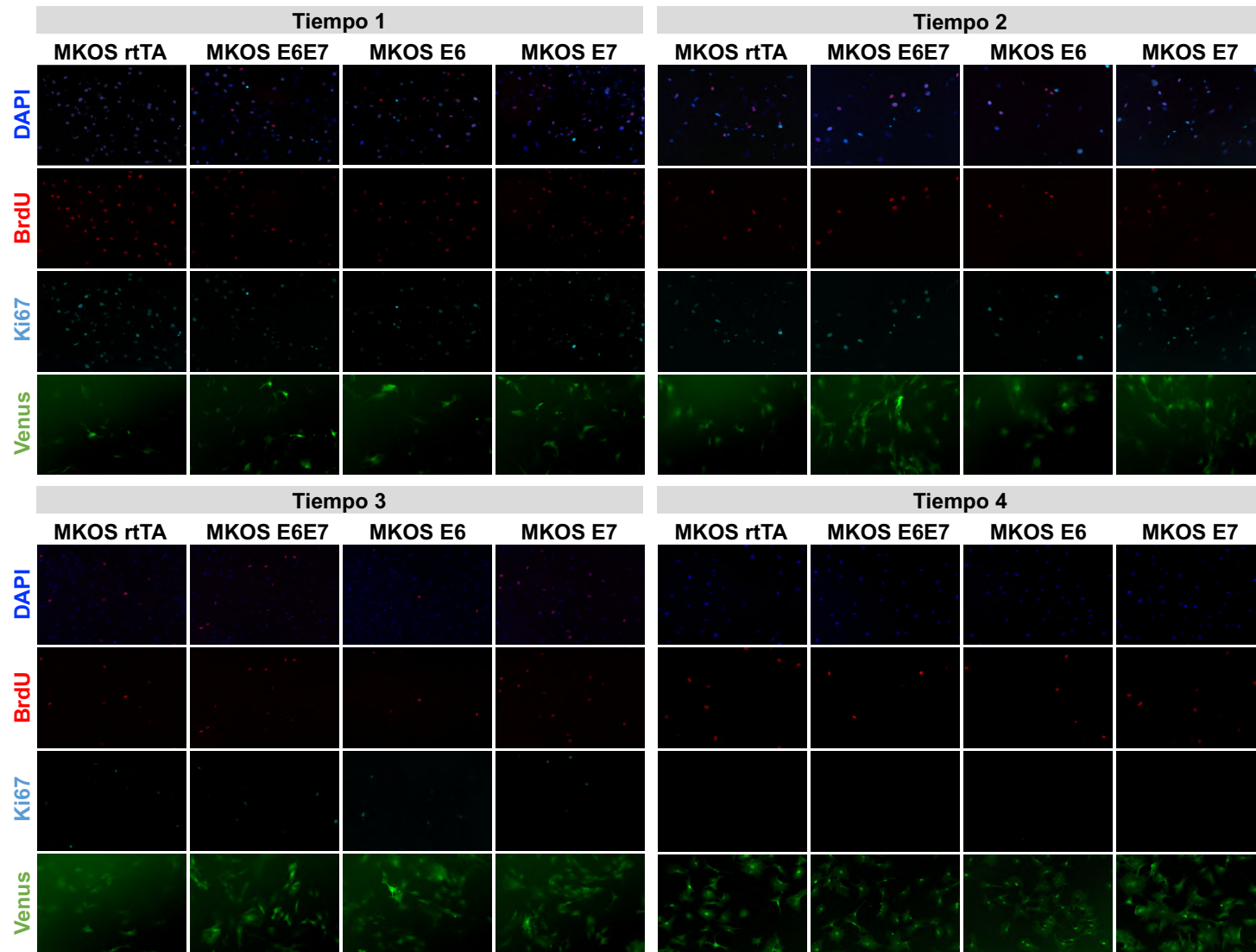
Anexo 1. Mapa del vector que codifican al oncogén E6 . El vector está codificado dentro de un transposon piggyBac y posee un sistema de inducción Tet-On en respuesta a doxiciclina. Esta compuesto por la secuencia TRE-E6E7TTL-PGK-VENUS-IRES-rtTA.



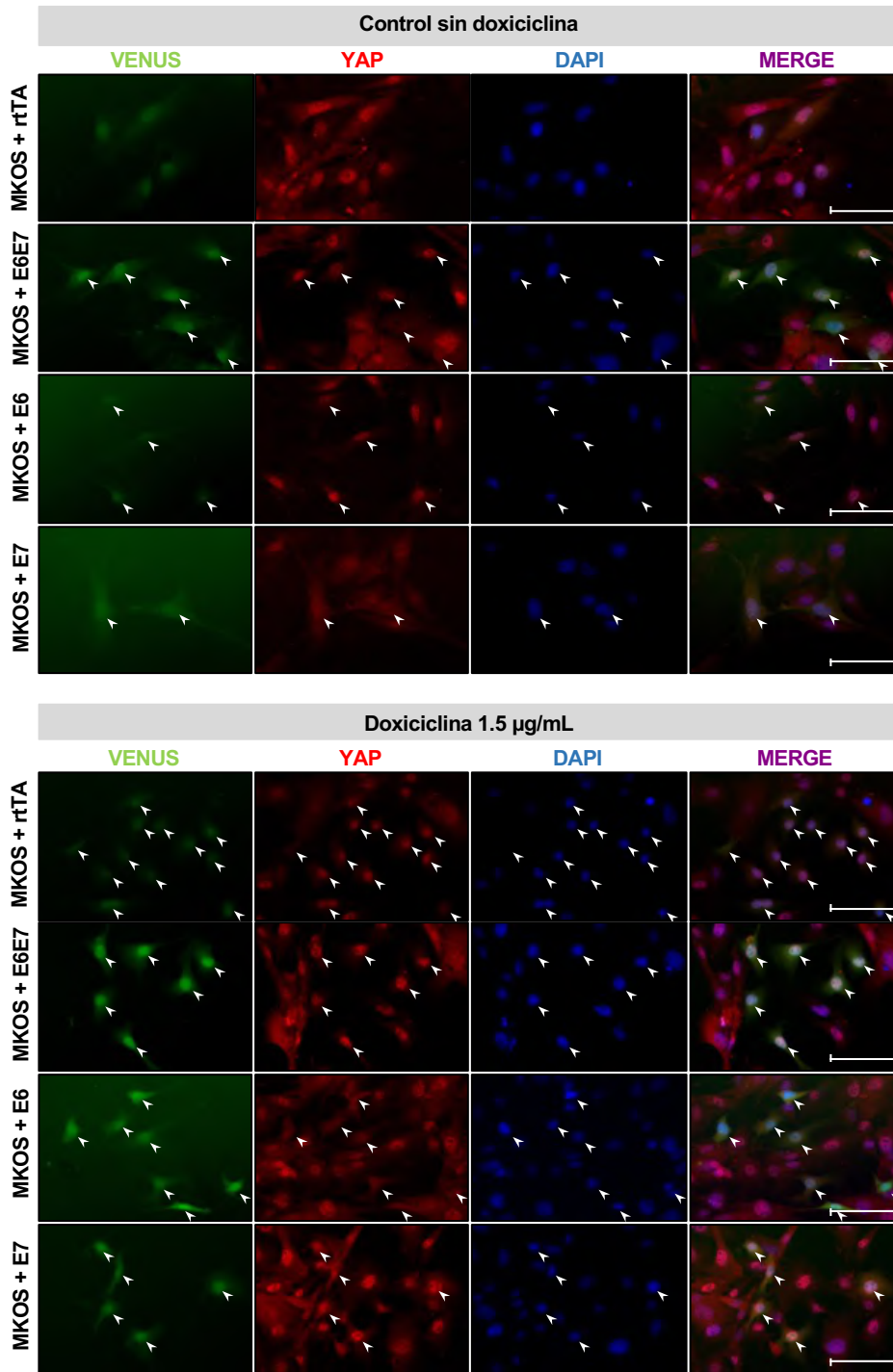
Anexo 2. Mapa del vector que codifican al oncogén E7 . El vector está codificado dentro de un transposon piggyBac y posee un sistema de inducción Tet-On en respuesta a doxiciclina. Esta compuesto por la secuencia TRE-E6TTL-E7-PGK-VENUS-IRES-rtTA.



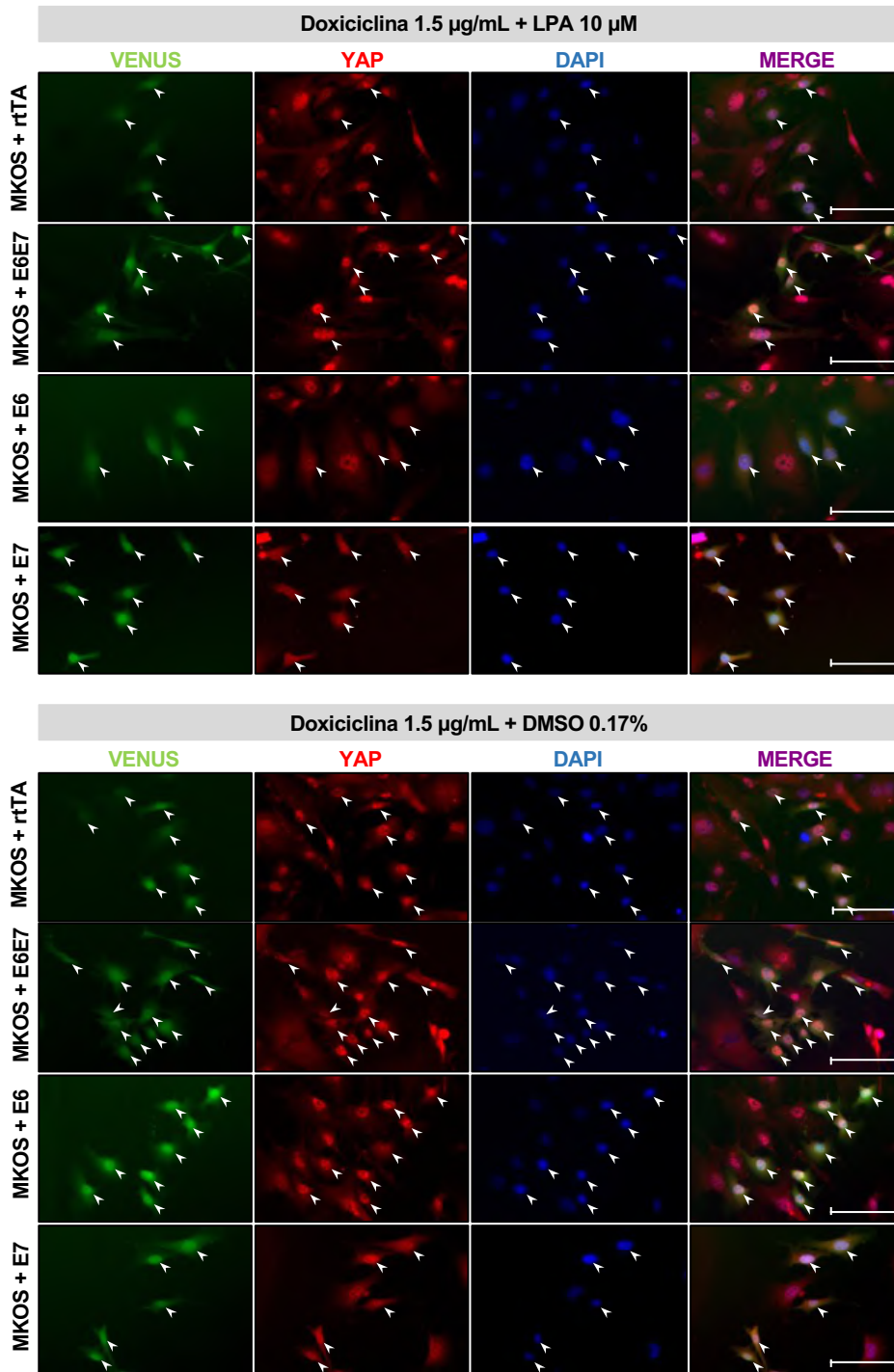
Anexo 3. Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs CD1. Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs CD1 transfectados con las cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7) y cultivados en ausencia de inducción con doxiciclina. Se realizó la inmunocitoquímica contra ambas proteínas para cuantificar el porcentaje de incorporación de BrdU y de expresión de Ki67, en los MEFs a los diferentes tiempos de reprogramación evaluados.



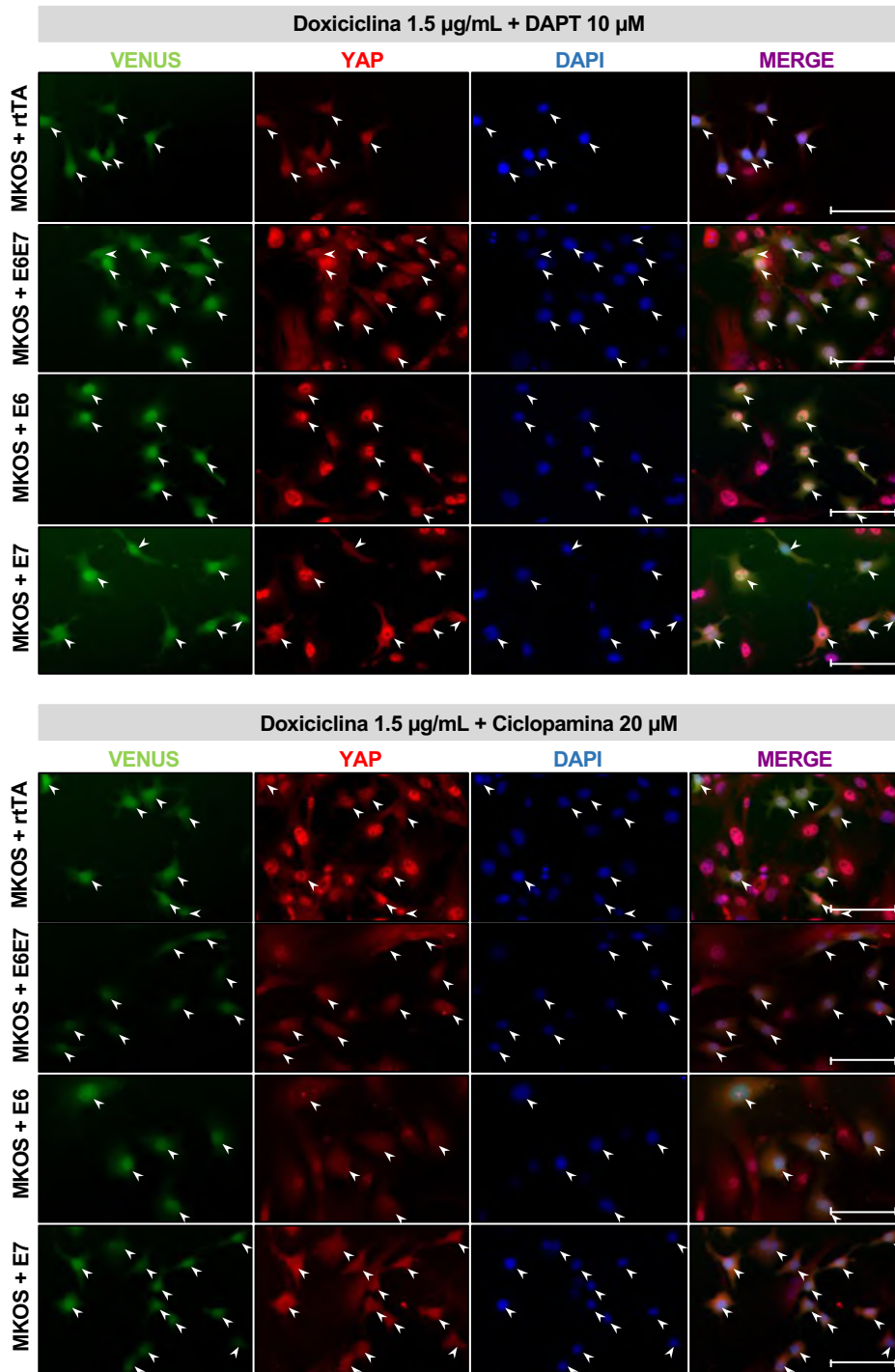
Anexo 4. Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs C57. Inmunocitoquímica contra BrdU y Ki67, en MEFs C57 transfectados con las cuatro combinaciones de vectores (MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7) y cultivados en ausencia de inducción con doxiciclina. Se realizó la inmunocitoquímica contra ambas proteínas para cuantificar el porcentaje de incorporación de BrdU y de expresión de Ki67, en los MEFs a los diferentes tiempos de reprogramación evaluados.



Anexo 5. Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 en estado basal e inducidos con doxiciclina 1.5 µg/mL por 48h. Se realizó la inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 transfectados con MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, en estado basal sin inducción e inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 µg/mL. Se muestra en color verde a los MEFs transfectados que expresan a la proteína reportera venus, en color rojo la proteína YAP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. La punta de flecha indica los MEFs transfectados en los que se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática. Barra de escala equivale a 100 µm.



Anexo 6. Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más LPA 10 μM o DMSO 0.17%. Se realizó la inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 transfectados con MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más LPA 10 μM o DMSO 0.17%. Se muestra en color verde a los MEFs transfectados que expresan a la proteína reportera venus, en color rojo la proteína YAP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. La punta de flecha indica los MEFs transfectados en los que se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática. Barra de escala equivale a 100 μm .



Anexo 7. Inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más DAPT 10 μM o Ciclopamina 20 μM . Se realizó la inmunocitoquímica contra la proteína YAP, en MEFs C57 transfectados con MKOS + rtTA, MKOS + E6/E7, MKOS + E6 y MKOS + E7, inducidos por 48h con doxiciclina 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ más DAPT 10 μM o ciclopamina 20 μM . Se muestra en color verde a los MEFs transfectados que expresan a la proteína reportera venus, en color rojo la proteína YAP y en azul los núcleos teñidos con DAPI. La punta de flecha indica los MEFs transfectados en los que se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática. Barra de escala equivale a 100 μm .

13. Bibliografía

- Apostolou, E. and Stadtfeld, M. (2018). Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC. reprogramming. *Curr Opin Genet Dev.* 52:77-85. doi: 10.1016/j.gde.2018.06.002.
- Banito, A. and Gil, J. (2010). Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO reports* 11(5):353-359.
- Banito, A. Rashid, ST. Acosta, JC. Li, SD. Pereira, CF. Geti, I. Pinho, S. Silva, JC. Azuara, V. Walsh, M. Vallier, L. and Gil, J. (2009). Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes & Dev.* 23:2134–2139
- Buganim, Y. Faddah, D.A. and Jaenisch R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nat Rev Genet.* 14:427-439. doi:10.1038/nrg3473
- Careya, BW. Markoulakia, S. Hannaa, J. Sahaa, K. Gaoa, Q. Mitalipovaa, M. and Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *PNAS* 106(1):157–162.
- Chagastelles, PC. and Nandi, NB. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney Inter. Suppl.* 1:63-67. DOI: 10.1038/kisup.2011.15
- Chávez-Gonzalez, María Antonieta. Chimal-Monroy, Jesús. Flores-Figueroa, Eugenia. y Lamas, Mónica. (2017). *Células troncales: biología y aplicación en biomedicina*. Ciudad de México, México. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Chen, K. Long, Q. Xing, G. Wang, T. Wu, Y. Li, L. Qi, J. Zhou, Y. Ma, B. Schöler, H.R. Nie, J. Pei, D. and Liu, X. (2020). Heterochromatin loosening by the Oct4 linker region facilitates Klf4 binding and iPSC reprogramming. *The EMBO Journal* 39:e99165.
- Choi, M. Lee, S. Choi, T. Lee, C. (2014). Roles of the PDZ domain-binding motif of the human papillomavirus type 16 E6 on the immortalization and differentiation of primary human foreskin keratinocytes. *Virus Genes* 48:224–232 DOI 10.1007/s11262-013-1017-9
- Chronis, C. Fiziev, P. Papp, B. Butz, S. Bonora, G. Sabri, S. Ernst, J. and Plath, K. (2017). Cooperative Binding of Transcription Factors Orchestrates Reprogramming. *Cell* 168:442–459.
- Covarrubias, L. Martínez-Sarmiento, J.A. Valencia, C. Nagy, A. and Hernández-García, D. (2020). The level of reprogramming factors influences the induction and maintenance of pluripotency: the case of CD1 mouse strain cells.
- David, L. and Polo JM. (2014). Phases of reprogramming. *Stem Cell Research* 12:754–761.

- Dejosez, M. and Zwaka, P.T. (2012). Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Annu. Rev. Biochem* 81:737-765.
- Du, P. Pirouz, M. Choi, J. Huebner, A. Clement, K. Meissner, A. Hochedlinger, K. and Gregory, R. (2018). An Intermediate Pluripotent State Controlled by MicroRNAs Is Required for the Naive-to-Primed Stem Cell Transition. *Cell Stem Cell* 22(6):851-864.
- Emili, S. Utikal, J. Arnold, K. Jaenish, R. and Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of Neural Progenitor Cells into Induced Pluripotent Stem Cells in the Absence of Exogenous Sox2 Expression. *Stem Cells* 26:2467-2474.
- Feng, B. Ng, JH. Heng, JCD. and Ng, HH. (2009). Molecules that Promote or Enhance Reprogramming of Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 4:301-312.
- Flores-Figueroa, E. Montesinos, J. and Mayani, H. (2006) Células troncales mesenquimales: historia, biología y aplicación clínica. *Revista de Investigación Clínica* 58(5):498-511.
- Fu, V. Plouffe, S. and Guan, K-L. (2017). The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Curr Opin Cell Biol* 49:99–107.
- Gilbert, SF. and Barresi, MJF. (2016). *Developmental Biology*, Eleventh Edition ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Geoghegan, E. and Byrnes, L. (2008). Mouse induced pluripotent stem cells. *Int. J. Dev. Biol.* 52:1015-1022.
- Han, H. Qi, R. Zhou, JJ. Ta, AP. Yang, B. Nakaoka, HJ. Seo, G. Guan, KL. Luo, R. and Wang, W. (2018). Regulation of the Hippo Pathway by Phosphatidic Acid-Mediated Lipid-Protein Interaction. *Molecular Cell* 72:328–340.
- Hathaway, N.A. Bell, O. Hodges, C. Miller, E.L. Neel, D.S. and Crabtree, G.R. (2012). Dynamics and Memory of Heterochromatin in Living Cells. *Cell* 149:1447–1460.
- Hawley-Nelson, P. Vousden, KH. Hubbert, NL. Lowy, DR. and Schiller, JT. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO Journal* 8(12):3905-3910.
- He, C. Mao, D. Hua, G. Lv, X. Chen, X. Angeletti, P.C. Dong, I. Remmenga, S.W. Rodabaugh, K.J. Zhou, J. Lambert, P.F. Yang, P. Davis, J.S. and Wang, C. (2015). The Hippo/YAP pathway interacts with EGFR signaling and HPV oncoproteins to regulate cervical cancer progression. *EMBO Molecular Medicine* 7(11):1426-1449.
- Hellner, K. Mar, J. Fang, F. Quackenbush, J. and Münger, K. (2009). HPV16 E7 oncogene expression in normal human epithelial cells causes molecular changes indicative of an epithelial to mesenchymal transition. *Virology* 391:57–63.

- Hochedlinger, K. and Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development* 136(4):509-523.
- Hong, H. Takahashi, K. Ichisaka, T. Aoi, T. Kanagawa, O. akagawa, M. Okita, K. and Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53–p21 pathway. *Nature* 460:1132-1135 doi:10.1038
- Jaenish, R. and Young, R. (2008). Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* 132(4):567-582.
- James, M.A. Lee, J.H. and Klingelutz, A.J. (2006). HPV16-E6 associated hTERT promoter acetylation is E6AP dependent, increased in later passage cells and enhanced by loss of p300. *Int J Cancer* 119(8): 1878–1885.
- Jung, YS. Kato, I. and Kim, C.H-R. (2013). A novel function of HPV16-E6/E7 in epithelial–mesenchymal transition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 435:339–344.
- Kang, P.J. Moon, JH. Yoon, BS. Hyeon, S. Jun, EK. Park, G. Yun, W. Park, J. Park, M. Kim, A. Whang, KY. Koh, GY. Oh, S. and You, S. (2014). Reprogramming of mouse somatic cells into pluripotent stem-like cells using a combination of small molecules. *Biomaterials* 35:7336-7345.
- Kareta, MS. Gorges, LL.Hafeez, S. Benayoun, BA. Marro, S. Zmoos, AF. Cecchini, MJ. Spacek, D. Batista, LFZ. O’Brien, M. Ng, YH. Ang, CE. Vaka, D. Artandi, SE. A. Dick, FA. Brunet, A. Sage, J. and Wernig, M. (2015). Inhibition of Pluripotency Networks by the Rb Tumor Suppressor Restricts Reprogramming and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell* 16:39–50. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.10.019>
- Kaji, K. Norrby, K. Paca, A. Mileikovsky, M. Mohseni, P. and Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*. 458 (7239): 771-775.
- Kawamura, T. Suzuki, J. Wang, YV. Menendez, S. Morera, LB. Raya, A. Wahl, GM. And Izpisua-Belmonte, JC. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature* 460. doi:10.1038
- Kim, W. Khan, SK. Gvozdenovic-Jeremic, J.Kim, Y. Dahlman, J. Kim, H. Park, O. Ishitani, T. Jho, E. Gao, B. and Yang, Y. (2017). Hippo signaling interactions with Wnt/ β -catenin and Notch signaling repress liver tumorigenesis. *Clin Invest*. 127(1):137–152. doi:10.1172/JCI88486.

- Li, D. Liu, J. Yang, X. Zhou, C. Guo, J. Wu, C. Qin, Y. Guo, L. He, J. Yu, S. Liu, H. Wang, X. Wu, F. Kuang, J. Hutchins, AP. Chen, J. and Pei, D. (2017). Chromatin Accessibility Dynamics during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell* 21:819–833.
- Li, M. and Izpisua-Belmonte, JC. (2018). Deconstructing the pluripotency gene regulatory network. *Nat Cell Biol* 20:382–392.
- Li, T. Shuai, L. Mao, J. Wang, X. Wang, M. Zhang X. Wang, L. Li, Y. Li, W. and Zhou, Q. (2016). Efficient Production of Fluorescent Transgenic Rats using the piggyBac Transposon. *Sci Rep* 6:33225.
- Lian, I. Kim, J. Okazawa, H. Zhao, J. Zhao, B. Yu, J. Chinnaiyan, A. Israel, MA. Goldstein, LSB. Abujarour, R. Ding, S. and Guan, KL. (2010). The role of YAP transcription coactivator in regulating stem cell self-renewal and differentiation. *Genes & Dev.* 24:1106–1118.
- Liu, X. Roberts, J. Dakic, A. Zhang, Y. and Schlegel, R. (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology* 375:611–623.
- López-Hernández, SE. (2018). Cooperación entre los oncogenes E6/E7 y factores promotores de la angiogénesis en la regeneración de porciones de la oreja de ratón. *Tesis de maestría. Instituto de biotecnología, UNAM.*
- López-Marure, R. (2003). La regulación del ciclo celular y el cancer. *VERTIENTES Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 6(1):40-44.
- Maherali, N. and Hochedlinger, K. (2008). Induced Pluripotency of Mouse and Human Somatic Cells. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LXXIII:157-162.
- Martello, G. and Smith, A. (2014). The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* (30):647-675.
- Martínez-Sarmiento, JA. (2016). Patrones de pluripotencia inducida por reprogramación celular utilizando un sistema auto-inducible. *Tesis de maestría. Instituto de biotecnología, UNAM.*
- Mendoza, JA. Muñoz, M. Téllez, LE. Vielma, S. Mosqueda, N. Pérez, S. y Quintero B. (2007). Virus y cáncer: el ejemplo de los papilomavirus humanos. *Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA* 1(3):133-144.
- Misra JR. and Irvine, KD. (2018). The Hippo Signaling Network and its Biological Functions. *Annu. Rev. Genet.* 52:3.1–3.23.
- Moon, JH. Heo, JS. Kim, JS. Jun, EK. Lee, JH. Kim, A. Kim, J. Whang, KY. Kang, YK. Yeo, S. Lim, HJ. Han, DW. Kim, DW. Oh, S. Yoon, BS. Schöler, HR. You, S. (2011).

Reprogramming fibroblasts into induced pluripotent stem cells with Bmi1. *Cell Research* 21:1305-1315.

- Mosteiro, L. Pantoja, C. Alcazar, N. Marión, RM. Chondronasiou, D. Rovira, M. Fernandez-Marcos, PJ. Muñoz-Martin, M. Blanco-Aparicio, C. Pastor, J. Gómez-López, G. De Martino, A. Blasco, MA. Abad, M. Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for cellular reprogramming in vivo. *Science* 354:aaf4445. DOI: 10.1126/science.aaf4445
- Moya, IM. And Halder, G. (2019). Hippo–YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine. *Nat Rev* 20:211-226. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0086-y>
- Niakan, K. Schrode N. T Y Cho, L. and Hadjantonakis A.K. (2013). Derivation of extraembryonic endoderm stem (XEN) cells from mouse embryos and embryonic stem cells. *Nature Reports* 8(6):1028-1041. doi:10.1038/nprot.2013.049
- Nichols, J. and Smith, A. (2009) Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4(6):487-492.
- Okita, K. Hong, H. Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2010). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc.* 5(3):418-428. doi:10.1038/nprot.2009.231
- Oku, Y. N. Nishiya, T. Shito, R. Yamamoto, Y. Yamamoto, C. Oyama and Y. Uehara. (2015). Small molecules inhibiting the nuclear localization of YAP/TAZ for chemotherapeutics and chemosensitizers against breast cancers. *FEBS Open Bio* 5:542–549.
- Onishi, K. and Zandstra, PW. (2015). LIF signaling in stem cells and development. *Development* 142:2230-2236.
- Panciera T. Azzolin, L. Fujimura, A. Rosato, A. Cordenonsi, M. and Piccolo, S. (2016). Induction of Expandable Tissue-Specific Stem/ Progenitor Cells through Transient Expression of YAP/TAZ. *Stem Cell* 19(6):725–737.
- Panciera, T. Azzolin, L. Cordenonsi, M. and Piccolo, S. (2017). Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat Rev* 18:758-770.
- Piccolo, S. Dupont, S. and Cordenonsi, M. (2014). The biology of yap/taz: hippo signaling and beyond. *Physiol Rev* 94: 1287–1312. doi:10.1152/physrev.00005.2014
- Polo, JM. Anderssen, E. Walsh, RM. Schwarz, BA. Nefzger, CM. Lim, SM. Borkent, M. Apostolou, E. Alaei, S. Cloutier, J. et al., (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell* 151:1617–1632.
- Qin, H. Hejna, M. Liu, Y. Percharde, M. Wossidlo, M. Blouin, L. Durruthy-Durruthy, J. Wong, P. Qi, Z. Yu, J. Qi, L. S. Sebastiano, V. Song, J. S. and Ramalho-Santos, M. (2016).

YAP Induces Human Naive Pluripotency. *Cell Reports* 14:2301-2312.

- Ramalho-Santos, M. and Willenbring, H. (2007). On the Origin of the Term “Stem Cell”. *Cell Stem Cell* 1:35-38. DOI 10.1016/j.stem.2007.05.013
- Ruetz, T. and Kaji, K. (2014). Routes to induced pluripotent stem cells. *Curr Opin Genet Dev.* 28:38–42.
- Salamanca-Gómez, F. (2009). Células troncales, cáncer y p53. *Gac Med Méx* 145(5):441-442.
- Sancho-Martinez, I. and Izpisua Belmonte, J.C. (2013). Surf the waves of reprogramming. *Nature* 493:310-311.
- Stampoulouglou, E. and X. Varelas. (2018). Phosphatidic Acid Signals via the Hippo Pathway. *Molecular Cell* 72:205-206.
- Strickland, SW. Brimer, N. Lyons, C. Pol, SBV. (2018). Human Papillomavirus E6 interaction with cellular PDZ domain proteins modulates YAP nuclear localization. *Virology* 516:127–138.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126, 663–676.
- Takahashi, K. and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev* 17:183-193.
- Tariki, M. Dhanyamraju, PK. Fendrich, V. Borggreffe, Feldmann, T. G and Lauth, M. (2014). The Yes-associated protein controls the cell density regulation of Hedgehog signaling. *Oncogenesis* 3(e112):1-8.
- Theunissen, TW. Friedli, M. He, Y. Planet, E. O’Neill, RC. Markoulaki, S. Pontis, J. Wang, H. Iouranova, A. Imbeault, M. Duc, J. Cohen, MA. Wert, KJ. Castanon, R. Zhang, Z. Huang, Y. Nery, JR. Drotar, J. Lungjangwa, T. Trono, D. Ecker, JR. And Jaenish, R. (2016). Molecular Criteria for Defining the Naive Human Pluripotent State. *Cell Stem Cell* 19:502–515.
- Totaro, A. M. Castellan, D. Di Biagio, and S. Piccolo. (2018). Crosstalk between YAP/TAZ and Notch Signaling. *Trends in Cell Biology* 28(7):560-573.
- Totaro, A. Castellan, M. Battilana, G. Zanconato, F. Azzolin, L. Giulitti, S. Cordenonsi, M. and Piccolo, S. (2017). YAP/TAZ link cell mechanics to Notch signalling to control epidermal stem cell fate. *Nat Commun* 8:15206 | DOI: 10.1038/ncomms15206
- Totaro, A. Panciera, T. and Piccolo, S. (2018). YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol.* 20:888–899.

- Tschaharganeh, D.F. Chen, X. Latzko, P. Malz, M. Gaida, M.M. Felix, K. Ladu, S. Singer, S. Pinna, F. Gretz, N. Sticht, C. Tomas, M.L. Delogu, S. Evert, M. Fan, B. Ribback, S. Jiang, L. Brozzetti, S. Bergmann, F. Dombrowski, F. Schirmacher, P. Calvisi, D.F. and Breuhahn, K. (2013). Yes-Associated Protein Up-regulates Jagged-1 and Activates the Notch Pathway in Human Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology* 144:1530–1542.
- Tsuruga, Y. Kiyono, T. Matsushita, M. Takahashi, T. Kasai, H. Matsumoto, S. and Todo, S. (2008). Establishment of Immortalized Human Hepatocytes by introduction of HPV16 E6/E7 and hTERT as Cell Sources for Liver Cell-Based Therapy. *Cell Transplantation* 17:1083-1094.
- Utikal, J. Polo, J.M. Stadtfeld, M. Maherali, N. Kulalart, W. Walsh, R.M. Khalil, A. Rheinwald J.G. and Hochedlinger K. (2009). Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature* 460:1145–1148.
- Valencia, C. Bonilla-Delgado, J. Oktaba, K. Ocadiz-Delgado, R. Gariglio, P. and Covarrubias, L. (2008) Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *J Invest Dermatol.* 128(12):2894–2903.
- Vallejo-Ruiz, V. Velázquez-Márquez, N. Sánchez-Alonso, P. Santos-López, G. y Reyes-Leyva, J. (2015). La oncoproteína E7 del virus de papiloma humano y su papel en la transformación celular. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 53(2):172-177.
- Van den Hurk, M. Kenis, G. Bardy, C. van den Hove, DL. Gage, FH. Steinbusch, HW. and Rutten, BP. (2016). Transcriptional and epigenetic mechanisms of cellular reprogramming to induced pluripotency. *Epigenomics* 8(8):1131–1149.
- Varelas, X. (2014) The Hippo pathway effectors TAZ and YAP in development, homeostasis and disease. *Development* (141):1614-1626.
- Velychko, S. Adachi, K. Kim, K-P. Hou, Y. MacCarthy, C.M. Wu, G. and Schöler, H.R. (2019). Excluding Oct4 from Yamanaka Cocktail Unleashes the Developmental Potential of iPSCs. *Cell Stem Cell* 25:1–17.
- Wang, P. Qu, J. Wu, MZ. Zhang, W. Liu, GH. Izpisua-Belmonte, JC. (2013). “TET-on” pluripotency. *Cell Research* 23:863-865. doi:10.1038/cr.2013.72
- Weinberger, L. Ayyash, M. Novershtern, N. and 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.
- Werdig, M. Meissner, A. Cassady, JP. and Jaenisch R. (2008). c-Myc Is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2:10-12.

- Woltjen, K. Michael, LP. Mohseni, P. Desai, R. Mileikovsky, M. Hämäläinen, R. Cowling, R. Wang, W. Liu, P. Gertsenstein, M. Kaji, K. Sung, HK. and Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* 458:766-770. doi:10.1038/nature07863
- Wu, J. and Izpisua-Belmonte, JC. (2015). Metabolic exit from naive pluripotency. *Nat Cell Biol.* 17(12):1519-152.
- Xie, Q. Chen, J. Feng, H. Peng, S. Adams, U. Bai, Y. Huang, L. Li, J. Huang, J. Meng, S. and Yuan, Z. (2013). YAP/TEAD–Mediated Transcription Controls Cellular Senescence. *Cancer Res*; 73(12):3615-3626.
- Yamanaka, S. and Blau, HM. (2010). Nuclear reprogramming to pluripotent state by three approaches. *Nature* 465:704-712. doi:10.1038/nature09229
- Yim, E.K. and Park, J.S. (2005). The Role of HPV E6 and E7 Oncoproteins in HPV-associated Cervical Carcinogenesis. *Cancer Res Treat.* 37(6):319-324.
- You, J. (2010). Papillomavirus interaction with cellular chromatin. *Biochimica et Biophysica Acta* 1799:192–199.
- Yu, F.X., Zhao, B. and Guan, K.L. (2015). Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. *Cell* 163:811-828.
- Yu, FX. Zhao, B. Panupinthu, N. Jewell, JL. Lian, I. Wang, LH. Zhao, J. Yuan, H. Tumaneng, K. Li, H. Fu, XD. Mills, GB. and Guan, KL. (2012). Regulation of the Hippo-YAP Pathway by G-Protein-Coupled Receptor Signaling. *Cell* 150:780–791.
- Zhao, B. Li, L. Lei, Q. and Guan, KL. (2010). The Hippo–YAP pathway in organ size control and tumorigenesis: an updated version. *Genes & Dev.* 24:862–874
- Zeineddine, D. Hammoud, AA. Mortada, M. and Boeuf, H. (2014). The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells* 3(2):74-82.