



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DE GENES HUMANOS

OCT 4, SOX 2, NANOG Y LIN28 EN CÉLULAS

ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A :

VLADIMIR JUAREZ ARELLANO



Tutor: DR. KARLEN GAZARIAN GAZARIAN

MÉXICO, D. F.

Abril 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

TRANSFERENCIA Y EXPRESIÓN DE GENES HUMANOS OCT 4, SOX 2, NANOG Y LIN28 EN CÉLULAS ENDOTELIALES DE CORDÓN UMBILICAL.

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Karlen Gazarian Gazarian en el laboratorio de Genética Molecular (nº 5), en el Departamento de Biología molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomedicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

| | |
|----------------------------------|---|
| Dr. Karlen Gazarian Gazarian | Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM |
| Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz | Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM |
| Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez | Instituto de Fisiología Celular , UNAM |

Se reconoce la colaboración del Dra. Blanca Hayde Ruiz Ordaz, Dr. Carlos Cabello del Departamento de Biología molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomedicas, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo la estandarización del cultivo primario de HUVEC.

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACyT . Durante los estudios de maestría goce de una beca otorgada por 12 meses del proyecto “*Estudios de mecanismos de reprogramación del estado pluripotente en células diferenciadas por la transferencia de genes de factores de transcripción con la finalidad de obtener células humanas pluripotentes sin el uso de embriones* (82794)” para la realización de la presente tesis.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día 23 de abril de 2010

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

| | | |
|------------|----------------------------------|---|
| Presidente | Dr. Alejandro García Carrancá | Instituto Nacional de Cancerología |
| Vocal | Dr. Hector Mayani Viveros | Instituto Mexicano del Seguro Social |
| Secretario | Dr. Jaime Iván Velasco Velázquez | Instituto de Fisiología Celular , UNAM |
| Suplente | Dra. Leticia Rocha Zavaleta | Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM |
| Suplente | Dr. Jesús Chimal Monroy | Instituto de Investigaciones Biomedicas, UNAM |

Dedicatorias

A mis queridos abuelos que han partido pero continúan vivos con la sabiduría que me legaron

Sanson Arellano Aguirre

Julian Juarez Morales

Ma. Luisa Arenas y Rosas

A mis padres Esteban Juarez Flores y Agripina Arellano Arenas que siempre han sido participes y me han brindado todo el apoyo y amor incondicional en la realización de este proyecto no tengo mas que decir gracias.

A mi hermano Esteban Ivan Juárez Arellano la confianza y apoyo que siempre me ha tenido en este y todos los proyectos de mi vida.

A Eunice Fabiola Ruiz Jaimes la mujer de mi vida, por su confianza, apoyo, fe y amor en mi y en la realización de nuestro proyecto de vida. Gracias por ayudarme a ser un mejor ser humano.

A toda mi familia, amigos y hermanos(La banda) que siempre han puesto todo de su parte para la realización de este proyecto Gracias

A Carlos Espinosa Roman gracias hermano.

Gracias

Atte. Vlade

Agradecimientos:

Dr Karlen Gazarian por la oportunidad, apoyo, accesoria y enseñanzas en la realización de este trabajo.

Doctores Blanca Hayde Ruiz Ordaz y Jaime Iván Velasco Velázquez por la contribución y asesoría en el desarrollo del proyecto.

A mis compañeros de laboratorio

Nosce te ipsum

Es mayor reto de la vida.

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| ANT | Altered Nuclear Transfer |
| APF | Alkaline phosphatase |
| ASC | Adult Stem Cell |
| BM | Bone Marrow |
| Ck19 | Citoqueratine 19 |
| CXCR4 | Quimiocinas unidas a CXCR4 |
| ECC | Embryonic carcinoma cell |
| EGC | Embryonic germinal cell |
| EGF | Epidermal growth factor |
| ESC | Embryonic stem cell |
| EPCs | Endotelial progenitor cells |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| HCSs | Hematopoietic Stem Cells |
| HGF | Hepatocyte growth factor |
| HBMSC | Células estromales humanas de médula ósea |
| HUVEC | Human Umbilical Vein Endothelial Cells |
| ICM | Inner Cell Mass |
| iPS | Induced Pluripotent Stem |
| IVF | In vitro fertilisation |
| LIF | Leukaemia inhibitory facto |
| MAIMI | Marrow-isolated adult multilineage inducible |
| MAPCs | Multipotent adult progenitor cells |
| MI | Myocardial infarction |
| MSCs | Mesenchymal stem cells |
| non-HCSs | No-Hematopoietic Stem cells |
| NSC | Neural Stem Cell |
| PSC | Pluripotent Stem Cells |
| RT-PCR | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| SC | Stem Cells |
| SCF | Stem cell factor |
| SDF-1 | Stromal derived factor-1 |
| SNC | Sistema Nervioso Central |
| TGF-β | Transforming growth factor beta |
| ZSV | zona subventricular |

ÍNDICE

CONTENIDO

PAGINA

| | |
|--|------------------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| <i>Medicina regenerativa</i> | <i>1</i> |
| <i>Células troncales (Stem Cells)</i> | <i>2</i> |
| <i>Células troncales de embrión (ESC).....</i> | <i>4</i> |
| <i>Células troncales de adulto</i> | <i>7</i> |
| <i>Células troncales de Médula ósea</i> | <i>7</i> |
| <i>Células troncales Neurales.....</i> | <i>8</i> |
| <i>Células Troncales hepáticas.....</i> | <i>10</i> |
| <i>HUVEC (Células humanas endoteliales de cordón umbilical)</i> | <i>12</i> |
| <i>Inducción del estado pluripotencial</i> | <i>13</i> |
| <i>Reprogramacion mediante Transferencia nuclear.....</i> | <i>13</i> |
| <i>Reprogramacion mediante la fusión con células troncales</i> | <i>14</i> |
| <i>Generación de la inducción del estado pluripotente.....</i> | <i>15</i> |
| <i>Factores de pluripotencialidad</i> | <i>18</i> |
| <i>OCT 4 (POU5F1).....</i> | <i>18</i> |
| <i>Sox2</i> | <i>18</i> |
| <i>Nanog.....</i> | <i>19</i> |
| <i>LIN 28.....</i> | <i>20</i> |
| <i>KLF4.....</i> | <i>21</i> |
| PLANTEAMIENTO | 22 |
| HIPÓTESIS | 23 |
| OBJETIVOS | 24 |
| ENFOQUE EXPERIMENTAL | 25 |

MATERIALES Y MÉTODOS26

| | |
|---|----|
| <i>Cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano(HUVEC)</i> | 26 |
| <i>Cultivo Primario de fibroblastos de cordón umbilical</i> | 27 |
| <i>Línea Celular 293T</i> | 28 |
| <i>Crio-preservación de línea celular 293T</i> | 28 |
| <i>Extracción de RNA por el método de Trizol</i> | 28 |
| <i>RT-PCR One-Step Promega (Cat. A1250)</i> | 29 |
| <i>Producción de lentivirus</i> | 30 |
| <i>Concentración de partículas virales PEG 6000</i> | 31 |
| <i>Purificación de RNA viral</i> | 31 |
| <i>Inmunofluorescencia</i> | 31 |
| <i>Purificación de plásmidos</i> | 32 |
| <i>Purificación de Plásmidos</i> | 32 |
| <i>Digestión Enzimática</i> | 32 |
| <i>Oligonucleótidos</i> | 33 |

RESULTADOS34

| | |
|--|----|
| <i>Estandarización y caracterización del cultivo primario de HUVEC</i> | 34 |
| <i>Producción de vectores lentivirales</i> | 38 |
| <i>Análisis de Vectores Lentivirales VOct3/4, VSox2, V Nanog, VLin28</i> | 38 |
| <i>Evaluación de presencia de antígeno p24 (Ensayo HIV Ag/Ab)</i> | 40 |
| <i>Cultivo primario de Fibroblastos de cordón umbilical</i> | 41 |
| <i>Caracterización morfológica</i> | 41 |
| <i>Caracterización de Fibroblastos infectados con factores Oct 4, Nanog, Sox 2</i> | 42 |
| <i>Evaluación de la expresión de Oct 4 , Nanog, Sox 2, Lin28</i> | 44 |
| <i>Presencia de marcadores SSEA-1, SSEA-4</i> | 45 |
| HUVEC | 47 |
| <i>Expresión Basal de los genes OCT4, Sox2, Nanog y Lin 28 en HUVEC</i> | 47 |
| <i>Infección de HUVEC con factores individuales OCT 4, Sox2, Nanog y Lin28</i> | 48 |
| <i>Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Oct 4</i> | 48 |

| | |
|---|------------------|
| <i>Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus NANOG.</i> | <i>49</i> |
| <i>Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Sox 2.</i> | <i>49</i> |
| <i>Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Lin 28.</i> | <i>50</i> |
| <i>Cambios morfológicos en HUVEC Infectadas con cuatro factores.</i> | <i>51</i> |
| <i>Evaluación de la expresión de HUVEC infectadas con 4 factores lentivirales.</i> | <i>53</i> |
| <i>Presencia de marcadores de pluripotencialidad en HUVEC Infectadas</i> | <i>54</i> |
| Discusión..... | 57 |
| CONCLUSION..... | 61 |
| PERSPECTIVAS | 62 |
| Referencias | 63 |

1.INTRODUCCIÓN

1.1.Medicina regenerativa

La medicina regenerativa, un concepto que con el pasar de los años va siendo reestructurado, tiene como objetivo reparar, reemplazar o regenerar; órganos, tejidos o células del organismo. La medicina regenerativa en general ha abarcado desde los primeros implantes quirúrgicos como: implantes de cadera, transfusiones sanguíneas transplantes de órganos y médula ósea. Aunque éstos con ciertas restricciones hasta el momento, debido a que en los transplantes, la demanda de drogas inmunosupresoras es inevitable; los tejidos artificiales pueden causar inflamación, pierden función y se deterioran con el tiempo (caderas metálicas). La médula ósea al ser fuente de una combinación de poblaciones celulares puede presentar poco rendimiento no dando los resultados deseados y contaminarse durante el proceso de extracción (Mason and Dunnill 2008). Por algunas de estas razones actualmente el foco central de la medicina regenerativa son las células pluripotentes. Estas podrían ser somáticas, troncales adultas o células derivadas de embrión y actualmente una versión de células troncales llamadas iP (Células troncales inducidas) que han sido reprogramadas de células adultas (Takahashi and Yamanaka 2006; Takahashi, Okita et al. 2007). Las células derivadas de embrión son excelentes candidatos en terapia celular, aunque implican la destrucción del embrión para su obtención, lo que presenta limitaciones éticas y morales, mientras que las células somáticas y células troncales adultas presentan limitaciones en proliferación, aislamiento y expansión. La obtención de células pluripotentes, multipotentes y monopotentes mediante el uso de nuevas tecnologías es indispensable, la generación de células pluripotentes individuo-específico, promete ser una metodología que ofrece la posibilidad de generar métodos de terapia celular, para tratar patologías como: diabetes insulina-dependiente, Parkinson y posiblemente muchas otras como Alzheimer (Mason and Dunnill 2008).

Actualmente pruebas pre-clínicas han comenzado a realizarse en afecciones cardiacas, como insuficiencia cardiaca, cardiopatía isquémica, cardiomiopatía e infarto al miocardio (MI). Estas pruebas se han realizado con la inserción directa al tejido blanco de la fracción de células mononucleares de médula ósea (O'Brien and Barry 2009). En otros estudios se ha revisado el uso de células troncales (SC) para la regeneración ósea y padecimientos óseo metabólicos mediante el uso de células troncales mesenquimales (MSCs) (Undale, Westendorf et al. 2009).

1.2.Células troncales (Stem Cells)

Las SC son células con potencial de desarrollarse hacia diversos tipos de células en el organismo, funcionan como un sistema de regeneración en algunos órganos del cuerpo (Blelloch 2008). Éstas a su vez pueden dividirse y presentar diferentes características dependiendo del origen de donde son obtenidas ya sea a partir de embriones o de órganos y tejidos. Las células derivadas de embrión son llamadas células troncales embrionarias (ESC) y pueden dar origen a células de las tres capas germinales. Las células aisladas de órganos adultos son nombradas células troncales adultas (ASC), estas son células indiferenciadas (no-especializadas) que se encuentran dentro de tejidos diferenciados (especializados) (Figura 1), pueden mantenerse y regenerar el órgano del cual provienen, se han reportado distintas fuentes de ASC como: médula espinal, sangre periférica, pulpa dental, cornea, retina, hígado, tracto gastro-intestinal y páncreas. A diferencia de ESC no se ha reportado células troncales adultas capaces de diferenciarse en todos los tipos celulares del organismo.

Las células troncales independientemente del origen, poseen dos importantes características que las distinguen de cualquier otro tipo celular. Primera, pueden mantenerse auto renovando *in vivo* como *in vitro* (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Thomson and Marshall 1998) Segunda, tanto *in vivo* como *in vitro* puedan diferenciarse en uno o varios tipos celulares del organismo (Pera, Reubinoff et al.

2000; Blelloch 2008). Mediante la capacidad que las células troncales presentan en diferenciarse en un mayor o menor número de células del organismo se podrán definir como:

- *Células totipotenciales*: poseen la capacidad de desarrollar un organismo completo, dando origen a las tres capas embrionarias, el linaje germinal y los tejidos que darán lugar al saco vitelino así como los componentes extra-embrionarios (placenta).
- *Células pluripotentes*: son capaces de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo).
- *Las células multipotentes*: son aquellas que generan células de su propia capa embrionaria mesodermo, ectodermo o endodermo.
- *Las células monopotentes*: son células en órganos que pueden generar únicamente un tipo de linaje celular (Hochedlinger and Plath 2009).

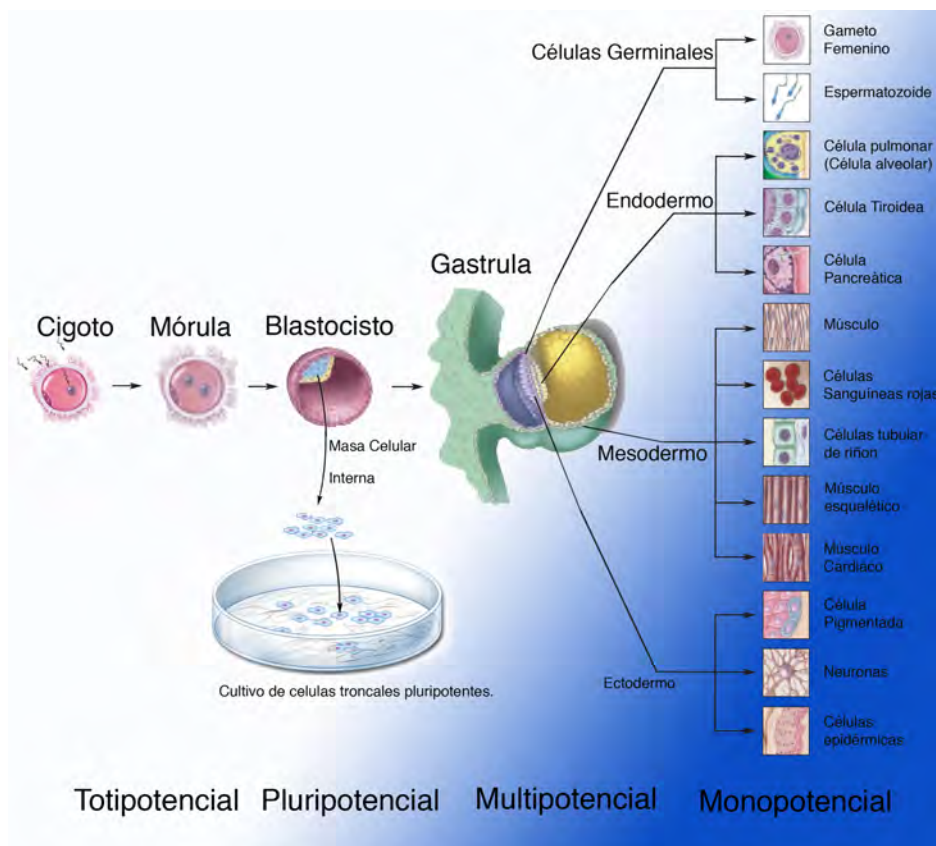


Figura 1: Proceso de diferenciación de SC, se observa la generación de tejidos del organismos a partir de la fecundación. Se muestra la obtención de células troncales pluripotentes a partir de la masa celular interna (ICM) así como que las células germinales (precursoras de espermatozoides y gametos femeninos) no se originan a partir de las capas germinales (Modificada de Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions Terese Winslow)

Actualmente, se ha conseguido cultivar SC tanto *in vitro* así como utilizadas *in vivo* en ensayos de diferenciación celular (Figura 1). En la actualidad encontramos diversas líneas de células troncales (SC) desde las células de carcinoma embrionario (ECC) (Stevens and Little 1954), células troncales embrionarias de ratón (Solter, Skreb et al. 1970; Stevens 1970), células pluripotentes derivadas de la línea germinal (EGC) (Matsui, Zsebo et al. 1992), Células troncales embrionarias humanas (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998), células pluripotentes inducidas (iPs) (Takahashi and Yamanaka 2006); todas ellas han sido usadas por más de cincuenta años en innumerables estudios y diferentes campos de la ciencia, en la actualidad tres líneas principalmente pudieran tener aplicaciones en medicina regenerativa ESC, iPS y ASC.

1.2.1.Células troncales de embrión (ESC)

Las células troncales embrionarias son células derivadas del estado temprano embrionario de la masa celular interna (IMC) de blastocistos (5, 6 días). En 1995 el equipo de James Thomson aislaron células troncales embrionarias (ESC) a partir de blastocistos de *Macaca mulatta* y posteriormente de *Callithrix jacchus*. (Thomson, Kalishman et al. 1996; Marshall, Kalishman et al. 1997) James Thomson y colaboradores en 1998 derivan ES células de blastocistos donados de parejas en tratamientos de fertilización *in vitro* (IVF) (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Thomson and Marshall 1998). ESCs humanas ha sido derivadas de mórula, blastocistos en estado embrionario (Stojkovic, Lako et al. 2004; Stojkovic, Lako et al. 2004; Strelchenko, Verlinsky et al. 2004), blastómeros (Klimanskaya, Chung et al. 2006) y embriones partenogénéticos (Revazova, Turovets et al. 2007). Las ESC son cultivadas sobre fibroblastos de ratón tratados con mitomicina o irradiados, medio con suplemento de suero y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) el cual se sugiere que suprime la expresión del factor de crecimiento transformante beta TGF β en ambas células,

fibroblastos y ESCs lo que promueve la auto renovación de ESCs (Amit, Carpenter et al. 2000) (Figura 2). Se han descrito ciertos criterios generales que describen las características de ESC (Pera, Reubinoff et al. 2000).

| |
|---|
| Derivadas de la masa celular interna/epiblasto del blastocisto |
| Capacidad de someterse a un número ilimitado de divisiones simétricas sin presentar diferenciación (Auto renovación) ^a |
| Exhibir y mantener un cariotipo completamente normal y estable (diploide). |
| Dar origen a todos los tipos celulares que son derivados de las tres capas primarias germinales del embrión (endodermo, mesodermo y ectodermo). |
| Capacidad de integrarse dentro de los tejidos embrionarios durante el desarrollo del embrión (formación de animales quimeras) ^{a,b} |
| Capacidad de colonizar la capa germinal y dar origen a óvulos y espermatozoides. ^{a,b} |
| Pueden ser clonadas, una sola célula puede generar clones o colonias genéticamente idénticas y tener las mismas propiedades que la célula original. ^a |
| Expresar el factor transcripción Oct-4 con actividades o inhibición en genes anfitriones o blanco y mantener las ESC en proliferación y un estado indiferenciado. |
| Pueden ser inducidas a continuar en proliferación o a diferenciarse. |
| A diferencia de las células somáticas, ESC no requieren ningún estímulo externo para iniciar la replicación del DNA. |
| No mostrar inactivación en el cromosoma X. En cada célula somática de mamífero femenino, uno de los dos cromosomas X permanece en una forma inactiva. En ESC no se muestra inactivación de cromosoma X. |
| <i>[^aNo mostrado en EGC ^bNo mostrado en ESC. La mayoría de los criterios ha sido mostrados ESC en ratón.]</i> |

Por las características señaladas las ESC podrían ser los mejores candidatos en terapia regenerativa debido a que al ser células pluripotentes, pueden diferenciarse en cualquier célula del organismo. Esto nos lleva a pensar, de que forma se podrían obtener ESC, al parecer, la respuesta es sencilla, la clonación nos ofrece la posibilidad de obtener células individuo específico, de no ser por las controversias éticas y morales que esto representa, debido a que los métodos existentes requieren de la destrucción de embriones humanos, por esta razón el interés en desarrollar, estudiar y entender alternativas sin el uso de embriones para la obtención de SC. Otra alternativa que se ha planteado es la transferencia de núcleos alterados o ANT (Austriaco 2006) por sus siglas en inglés, es uno de los métodos con mas potencial a desarrollar SC. Por otra parte, recientemente se ha volteado la mirada al estudio de células troncales de adulto las cuales son células indiferenciadas que se encuentran distribuidas en distintos tejidos y órganos del cuerpo.

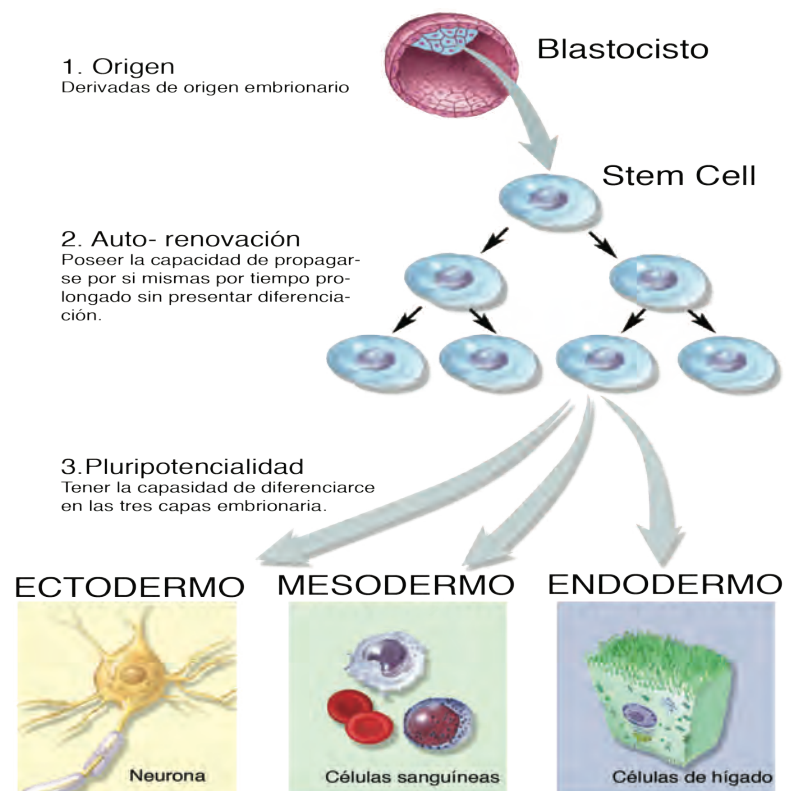


Figura 2: Principales características que presentan ESC. Obtenidas de origen embrionario, auto-renovación y pluripotencialidad (Modificada de Stem Cells: Scientific Progress and Future Research Directions Terese Winslow).

1.2.2.Células troncales de adulto

1.2.2.1.Células troncales de Médula ósea

Actualmente, la médula ósea es una fuente de células para trasplante a pacientes con enfermedades como la leucemia. La médula ósea contiene principalmente dos poblaciones de SC, SC hematopoyéticas para el desarrollo de todos los tipos de células sanguíneas y, SC mesenquimales precursoras de osteogénicas, adipogénicas y condrogénicas. La medula ósea presenta ciertas desventajas en terapia celular: el número de SC disminuye con el tiempo en periodo postnatal, la cantidad de médula ósea que deriva de un donador es muy poca, su obtención presenta problemas técnicos, la obtención de donadores requiere numerosos análisis preliminares para minimizar las reacciones inmunológicas y relacionadas con patógenos virales. Las células hematopoyéticas han sido mejor estudiadas y caracterizadas, éstas son células multipotentes de médula ósea (presentes también en la sangre y en sangre de cordón umbilical). En la médula ósea existen 2 compartimentos: hematopoyético y no-hematopoyético (Ratajczak, Desveaux et al. 2007). El primero produce células sanguíneas a través de la hematopoyesis y el segundo forma el estroma necesario para la hematopoyesis y constituido por células *mesenquimales* y *endoteliales* (van de Ven, Collins et al. 2007). En la última década se ha observado la importancia que pueden jugar las células troncales adultas en tratamiento de diversas enfermedades (Furfaro and Gaballa 2007; Harris, Badowski et al. 2007). El sistema hematopoyético está mejor estudiado y manipulado en comparación con el sistema mesenquimal (Mayani and Lansdorp 1998), mientras que este último tiene posiblemente un potencial más extenso dentro de la terapia celular (Lee, Kuo et al. 2004), debido a su plasticidad, las células troncales mesenquimales (MSCs) fueron detectadas en varios tejidos y ha sido reportado que no solo pueden formar condrocitos, osteocitos, adipositos, sino también neuronas, hepatocitos y posiblemente otros tipos celulares, pero presentan dificultades en la obtención y manipulación *in vitro*. En los últimos años la situación en la expansión de MSCs sigue mejorando

mediante nuevas técnicas de cultivo (Reinisch y col., 2007) y han compensado las incursiones en el desarrollo de terapia celular (Mason and Dunnill 2008) mediante trasplante de la fracción mononuclear de médula ósea (Reinisch, Bartmann et al. 2007) y sangre de cordón umbilical en menor escala (Harris, Badowski et al. 2007), se ha presentado algún efecto positivo pero no muy eficiente, debido a los bajos rendimientos de mejora de la salud del paciente y siendo difícil el seguimiento pos implante.

1.2.2.2. Células troncales Neurales

Las primeras evidencias de que la neurogénesis ocurre en ciertas regiones del cerebro adulto en mamífero se generaron a mediados de los 60's por Altman y Das (Temple 2001). A finales de los años 80's comenzaron estudios sobre el aislamiento de SC a partir del Sistema Nervioso Central (SNC) de embrión y de mamíferos adultos, utilizando cultivos en monocapas (Temple 1989; Cattaneo and McKay 1990). Reynolds y Weiss en 1992 generaron por primera vez en cultivo tres tipos celulares (neuronas, astrocitos y oligodendrocitos) a partir de células troncales aisladas del SNC de mamífero adulto, estas SC neurales fueron llamadas *células troncales neurales* (NSC) o neuroesferas (Reynolds and Weiss 1992). Las NSC fueron inmunoreactivas para la proteína filamentosa intermedia nestina y dieron señales positivas para células neurales de la glía, astrocitos y oligodendrocitos, lo cual sugiere la localización de precursores neuronales en ciertas regiones del SNC (Okano 2002). Así mismo las NSC han sido localizadas en la zona subventricular (ZSV) del ratón (Lois and Alvarez-Buylla 1993), rata (Palmer y col., 1995) y humano, en el hipocampo de la rata y el humano, en el septum y estriado de la rata, en el bulbo olfatorio de la rata y el humano, en la extensión rostral de la ZSV del ratón y en la espina dorsal, cerebelo y la zona subependimial del ratón (Laywell, Rakic et al. 2000). Además de la localización de las NSC en diversos tejidos neurogénicos existen evidencias alternas de la localización de SC en tejidos no neurogénicos (espina dorsal)

(McKay 1997; Kennea and Mehmet 2002; Kennea and Mehmet 2002). En embriones de mono se han detectado NSC en la placa cortical y en la zona subventricular (ZSV) (Ourednik, Ourednik et al. 2001; Ourednik, Ourednik et al. 2001). De igual manera, en el cerebro adulto de aves se han detectado células neurales primarias como precursoras de la glía radial y astrocitos (Alvarez-Buylla, Seri et al. 2002). La neurogénesis se ha reportado en el giro dentado del hipocampo de roedores y primates no humanos (Taupin and Gage 2002). Por otra parte en el giro dentado del gerbo se ha observado neurogénesis con las eventuales etapas de proliferación de las NSC en la zona subgranular, migración a través de la capa granular y diferenciación hacia neuronas (Iwai, Sato et al. 2002). Este mecanismo de proliferación, migración y diferenciación se ha observado en distintas áreas cerebrales de mamíferos (Garcia-Verdugo, Doetsch et al. 1998). Considerando lo anterior es posible afirmar que la ZSV y el hipocampo son las áreas neurogénicas más activas y las fuentes más ricas de NSC (Temple 2001; Galli, Gritti et al. 2003; Parati, Pozzi et al. 2004). Las SC a partir de la masa celular interna del blastocisto son verdaderamente pluripotenciales y con capacidad para generar todos los tejidos, incluyendo el NSC y se ha reportado que la exposición de las ESC a retinoides permite el desarrollo de progenitores neurales (Kennea and Mehmet 2002). El progreso en la biología de las NSC ha sido muy rápido en los últimos diez años gracias a la identificación de marcadores selectivos de NSC, tales como Nestina, Musashi, Sox I (Cattaneo and McKay 1990; Rietze, Valcanis et al. 2001; Okano 2002), CD34", CD45" y CD24" (Uchida, Buck et al. 2000). El uso de estos marcadores selectivos ha demostrado que las células progenitoras troncales del SNC están presentes en diversas regiones y áreas anatómicas del cerebro adulto de diversas especies de vertebrados. Por otra parte, recientemente se ha demostrado la generación de neuronas dopaminérgicas a partir de SC embrionarias, esta inducción específica en la actividad neurogénica puede ser considerada como una herramienta en la aplicación clínica y su uso en terapias para enfermedades neurodegenerativas (Sasai 2002). Algunos de los mecanismos reguladores de la

diferenciación y auto-renovación de las NSC descritos hasta el momento involucran la presencia de factores del crecimiento como Factor de crecimiento epidermal (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos-2 (FGF2) (Reynolds and Weiss 1992). Además de esto se ha observado la regulación a través de vías de señalización JAK/Stat3 y la proteína morfogénica ósea (BMP) para inducir la diferenciación de astrocitos a partir de SC neurales (Nakashima, Yanagisawa et al. 1999). En estos términos, se ha observado que la neurogénesis está controlada por factores de transcripción con dominio bHLH, Mash1 Neurogeninas y la familia Math los cuales funcionan como reguladores transcripcionales (Yamamoto, Yamamoto et al. 2001; Okano 2002). Se ha observado que el proceso de auto-renovación en NSC está regulado por señaladores como Notch. Estas observaciones sugieren la importancia de la dependencia de los nichos microambientales *in-situ* para la neurogénesis en el SNC de mamífero adulto (Okano 2002).

1.2.2.3.Células Troncales hepáticas

En el hígado adulto se ha observado que se mantiene el balance entre la ganancia y la pérdida celular. La primera postulación sobre la existencia de una semejanza a SC con la capacidad de diferenciación hacia hepatocitos fue postulada por Kinoshita a finales de los años 40's, posteriormente los resultados que apoyaban la idea surgieron a finales de los años 60's por Wilson y Leduc (Thorgeirsson 1996). No fue sino hasta finales de los años 80's que se identificaron las células ovaladas como precursoras de hepatocitos. En el humano solo se ha descrito la localización de SC con la denominación de "células ovaladas" como precursoras de hepatocitos y células de los conductos biliares. Morfológicamente, las células ovaladas son pequeñas en tamaño, con un núcleo ovalado, la localización anatómica de las células ovaladas en ratas y ratones fueron detectadas junto al canal de Bering, localizado junto al sistema *canalicular* de hepatocitos y junto a las ramificaciones terminales del árbol biliar (Theise, Saxena et al. 1999). Las

células ovaladas expresan marcadores similares a hepatocitos o células de los conductos biliares como citoqueratina 19 (CK19) glutamil-transpeptidasa.y fosfatasa alcalina (AP), marcador utilizado para medir la activación de las células troncales hepáticas.

Recientes estudios han demostrado la diferenciación de hepatocitos a partir de ESC (Miyashita, Suzuki et al. 2002), así como también dos publicaciones han demostrado la formación de hepatocitos y células biliares a partir de SC de médula ósea (Petersen, Bowen et al. 1999; Alison, Poulson et al. 2000), esto solo había sido reportado a partir de SC de origen hepático. La primera demostración sobre la diferenciación de SC a células hepáticas de ratón *in vivo* se llevo acabo (Choi, Oh et al. 2002) utilizando cortes histológicos de teratoma derivados de SC embrionarias, en donde la naturaleza hepática fue confirmada utilizando RT-PCR e inmunohistoquímica de marcadores específicos para hígado. Estos resultados extienden el potencial uso de SC embrionarias en el tratamiento de enfermedades hepáticas como las porfirias. Hasta el momento se han reportado algunos de los factores de crecimiento involucrados en la activación y expansión de las SC hepáticas como el factor de crecimiento transformante-alfa, el factor decrecimiento de hepatocitos (HGF) y el factor de crecimiento ácido de fibroblastos (aFGF). Cada uno de estos factores es capaz de inducir la replicación de hepatocitos primarios *in vitro*. Adicionalmente, el factor de crecimiento transformante-beta 1 (TGF- β 1) es también expresado durante la regeneración hepática. (Michalopoulos 1990) Todos los factores de crecimiento presentan niveles altos de expresión durante el periodo de diferenciación de las células ovaladas y regresan a los niveles en condiciones normales del hígado al final del proceso de regeneración. Se ha reportado un nuevo factor de SC denominado Factor de células troncales (SCF), el cual solo se ha visto involucrado en etapas tempranas de la activación de SC hepática (Thorgeirsson 1996).

1.3.HUVEC (Células humanas endoteliales de cordón umbilical)

Las células endoteliales realizan una gran variedad de funciones fisiológicas, son influenciadas por heterogeneidad celular en diferentes zonas vasculares, además de jugar papeles importantes en un sin fin de procesos fisiológicos y fisiopatológicos como el tráfico de leucocitos, inflamación, cicatrización de heridas, hematopoyesis (1998), metástasis en tumores y angiogénesis (Barthomeuf, Boivin et al. 2004; Skovseth, Kuchler et al. 2007); esta gran variedad de funciones en las que están involucradas convierte a HUVEC en un modelo de células endoteliales.

La eficiencia de la hematopoyesis es usualmente inducida por la interacción entre las células hematopoyéticas, células estromales y células endoteliales de cordón umbilical. En la sangre de cordón (CB), células endoteliales de cordón (HUVECs) tienen la capacidad de soportar un micro ambiente estromal (Yamaguchi, Ishii et al. 1998), por lo que HUVEC juegan un papel importante en la hematopoyesis en CB. Células endoteliales de venas aisladas de cordones umbilicales son usadas en estudios vasculares (Cajero-Juarez, Avila et al. 2002). Así como se ha descrito un efecto del incremento de AP y síntesis de colágena tipo I en células estromales de médula ósea (HBMSC) con el solo contacto en cultivo de HUVEC lo cual reduce la diferenciación en HBMSC (Villars, Guillotin et al. 2002).

1.4. Inducción del estado pluripotencial

1.4.1. Reprogramación mediante Transferencia nuclear

Durante las últimas décadas se han generado innumerables métodos para obtener células pluripotentes con la finalidad de entender los procesos involucrados en los controles de pluripotencialidad y diferenciación. En 1952 Briggs & King demostraron que la transferencia de núcleos es posible en ranas al realizar una transferencia de núcleos de blástula a huevos enucleados de *Rana pipiens*, donde se desarrollaron embriones normales (Briggs and King 1952). Trabajos posteriores demuestran que trasplantar núcleos de diferentes estados embrionarios resulta en la generación de embriones de desarrollo anormal, lo que sugiere que las diferencias en los estados del núcleo afecta la capacidad de las células somáticas en ser reprogramadas (King and Briggs 1956), Gurdon y col. producen ranas adultos a partir de la transferencia de núcleos de células intestinales a huevos de *Xenopus* enucleados (Gurdon 1962; Gurdon 1966; Gurdon and Uehlinger 1966), lo que muestran que los genes requeridos para la generación de un individuo se encuentran presentes y pueden ser activados en células somáticas. En 1976, Bromhall realiza la transferencia de un núcleo de una célula de mórula de conejo a un huevo sin núcleo, aunque con muy poca eficiencia (Bromhall 1975). Posteriormente McGrath y Solter 1983 obtienen ratones vivos mediante el trasplante de el núcleo de un cigoto donado a cigotos enucleados diferentes (McGrath and Solter 1983; McGrath and Solter 1983). En 1996 Wilmut, mediante transferencia nuclear y utilizando embriones de 9 días de diferenciación obtuvieron una oveja clonada y posteriormente generó la oveja adulta conocida como "Dolly" (Wilmut, Schnieke et al. 1997; Wilmut 2002; Wilmut, Beaujean et al. 2002) .

La generación de la oveja Dolly demostró que la *trans*-activación por el material contenido en los ovocitos era suficiente para cambiar el estado epigenético y diferenciar el núcleo a un estado totipotencial, aunque por otra parte, esto no puede ser tomado como una opción para obtener células pluripotentes en humanos debido a cuestiones éticas y morales acerca de la destrucción de embriones y la obtención de ovocitos.

1.4.2. Reprogramación mediante la fusión con células troncales

Otra estrategia utilizada para reprogramar el núcleo de células somáticas fue la fusión con ESC, células germinales embrionarias (EGC) o carcinoma embrionarias (ECC). Ruddle en 1976 demostró que los timocitos adquieren la capacidad pluripotencial al ser fusionados con ECC (Miller and Ruddle 1976), se obtiene el mismo resultado al fusionar con EGC (Tada, Tada et al. 1997) y células ESC de ratón (Tada, Takahama et al. 2001). El trasplante de estas células en ratones resulta en la formación de teratomas que contienen varios tejidos de las tres capas embrionarias, confirmando esto la pluripotencialidad de estas células. Posteriormente Cowan et al. en 2005 reporta la reprogramación mediante la fusión de ESC de humano (Cowan, Atienza et al. 2005; Jiang, Yuan et al. 2006; Yu, Vodyanik et al. 2006). Estos resultados sugieren que las ESC contienen factores que inducen la pluripotencialidad en células somáticas. Sin embargo esta tecnología resulta en células tetraploides que contienen el genoma derivado de las ESC.

1.4.3. Generación de la inducción del estado pluripotente.

La posibilidad de obtener SC a partir de la idea de que en el citoplasma de ovocitos y ESC se encuentran factores específicos que pueden reprogramar el núcleo somático o estar dirigiendo la generación del estado pluripotente, llevó a la búsqueda y definición de estos factores. Yu y col. 2006 siguiendo esta misma idea, en material humano, comienzan con la obtención de ES reprogramadas de células hematopoyéticas mediante la fusión célula-célula (Yu, Vodyanik et al. 2006). Basándose en esta hipótesis Yamanaka en 2006 prueba 24 factores que pueden estar reprogramando e induciendo la pluripotencialidad, dentro de estos factores proponen tres grupos: el primer grupo con factores de transcripción específicos que solo expresan las ESCs como son Nanog, Sox2, OCT 4, UTF1, Sall4, Sox15 y Rex1. El segundo grupo contiene factores de crecimiento y oncogenes como Myc-c, Stat3, β -catenina, Grb2, KLF4, TCL1 y Eras. El tercer grupo incluyó factores que solo son expresados en ESCs, pero que aún no se define su función: ECAT1, ESG1, Fbx15, DNMT3L, ECAT8, GDF3, ECAT15-1, ECAT15-2, Fthl17 y Stella (Takahashi and Yamanaka 2006). Sin embargo cuando se realizó la combinación de cuatro factores (Oct 4, Sox2, c-Myc y Klf4) se obtuvieron colonias que presentaron morfología y proliferación similar a las ESCs. Posteriormente estas células fueron transplantadas a ratones inmuno-deficientes en donde proliferaron generando teratomas que contienen diferentes tejidos conteniendo derivados de las tres capas embrionarias, lo que probó que las células son pluripotentes, por lo que fueron llamadas células iPS (Induced Pluripotent Stem) (Takahashi and Yamanaka 2006). Este proceso de reprogramación fue confirmado rápidamente por 2 grupos de investigación (Lowry, Richter et al. 2008; Park, Lerou et al. 2008). La inserción de tres factores, con la excepción de OCT 4 y SOX 2 generan los mismos resultados en morfología y proliferación. Subsecuentes modificaciones en el proceso de selección de células iPS, basadas en la reactivación de los promotores de OCT 4 y NANOG, resultaron en iPS con mayor parecido a las células ESC de ratón,

incluyendo la habilidad de contribuir a líneas germinales. Yu y cols. 2007 a partir de 14 genes candidatos que pueden estar involucrados en pluripotencialidad, muestran que cuatro factores (Oct 4, Sox2, Nanog y Lin 28) son suficientes para reprogramar células somáticas a células iPS, en estos ensayos solo el cambio de morfología es suficiente para seleccionarlas, además de que exhiben las características esenciales a ESC al ser inyectadas en ratones inmuno deficientes provocan la formación de teratomas y contribuyen a la formación de quimeras cuando son inyectados en blastocistos ratón.

Recientemente se ha mostrado que Oct 4 y Sox2 son esenciales para la reprogramación celular en contraste *KLF4/c-MYC* y *NANOG/LIN28* que solo contribuyen a la eficiencia de formación de colonias y podrían ser sustituidas indistintamente (Yu, Vodyanik et al. 2007). Se ha observado que la selección genética es innecesaria para la obtención de iPS, debido a que la morfología de las colonias es sumamente característica y suficiente para identificarlas (Blueloch, Venere et al. 2007; Meissner, Wernig et al. 2007).

Actualmente se han obtenido células iPS derivadas de cultivos primarios de pulmón, fibroblastos de neonato y fibroblastos de adulto estas pueden ser reprogramados al estado pluripotencial mediante la expresión genes en distintas combinaciones (*SOX2*, *OCT 4*, *NANOG*, *Lin 28*, *KLF4*, *MYC*). (Huangfu, Osafune et al. 2008; Park, Zhao et al. 2008). Las células iPS obtenidas mediante los factores anteriormente mencionados no muestran alteraciones en su cariotipo, expresan actividad de telomerasa, muestran los marcadores celulares y expresan los genes característicos de ESC humanas. Al ser inyectadas en ratones inmunodeficientes mantienen la capacidad de desarrollarse en las tres capas embrionarias. Lo que satisface los criterios propuestos para células troncales humanas, con la excepción de provenir de embriones. (Thomson, Itskovitz-Eldor et al. 1998; Thomson and Marshall 1998).

Estos métodos involucran el uso de vectores lentivirales lo que genera un potencial riesgo de mutaciones y una limitación en el uso de estas células con fines clínicos.

Carey y cols. en 2009 generan iPS de ratón y keratinocitos humanos mediante el uso de un vector polycistronico que contiene los genes Oct 4, Sox2, Klf4 y c-Myc (Carey, Markoulaki et al. 2009), esto acerca mas las posibilidades de aplicaciones clínicas , Zhou y col. en 2009 generan proteínas recombinantes de los genes Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc con las cuales obtienen células iPS a partir fibroblastos humanos y de ratón en combinación con acido valproico (Zhou, Wu et al. 2009).

1.5. Factores de pluripotencialidad

1.5.1. OCT 4 (POU5F1)

POU5F1, siendo un gen de la familia de POU de factores de transcripción específicamente expresados en ESC, embrión temprano y células germinales, fue originalmente designado como OCT 3 (Okamoto, Okazawa et al. 1990) y OCT 4 (Scholer, Hatzopoulos et al. 1989). Posteriormente conocido como OCT 4 se ha descrito que su ausencia en embriones causa la muerte en útero en estados de peri-implantación durante el desarrollo (Nichols, Zevnik et al. 1998), estos embriones pueden llegar al estado de blastocito *in vitro*. En cultivos la masa celular interna de blastocistos mutantes homocigotos tienden a producir solo linajes de trofoblasto, y ESC mutantes solo se diferencian en trofoblasto, cuando las células expresan una copia de OCT 4 mantienen su estado de pluripotencialidad (Niwa, Miyazaki et al. 2000). Cuando OCT 4 es silenciado en ESC, estas células solo logran diferenciarse en linajes de trofoblasto (Zaehres, Lensch et al. 2005); por el contrario cuando se encuentra sobreexpresando causa diferenciación en mesodermo y endodermo primitivo (Niwa, Miyazaki et al. 2000).

1.5.2. Sox2

Sox2 es miembro de la familia Sox (SRY-related HMG-box), parte de una familia de factores de transcripción expresados en ESC, embrión temprano, células germinales y células troncales neurales (Koopman, Schepers et al. 2004). La ausencia de Sox2 en embriones causa la muerte debido al desarrollo fallido del epiblasto (ectodermo primitivo) (Avilion, Nicolis et al. 2003). Blastocistos homocigotos mutantes parecen morfológicamente normales, pero en células indiferenciadas la proliferación falla cuando son cultivados *in vitro* y solo se producen trofoectodermo y endodermo primitivo. Cuando la expresión de SOX2

es silenciada en ESC da como resultado una rápida diferenciación (Ivanova, Dobrin et al. 2006; Matoba, Niwa et al. 2006).

Estos datos demuestran que Sox2 es indispensable para mantener la pluripotencialidad tanto en embrión temprano como en ESCs. Otros genes de la familia Sox como Sox15 son expresados en grandes cantidades en ESC, aunque su papel no ha sido completamente entendido.

1.5.3. Nanog

Nanog es una proteína *homeobox* específicamente expresada en ESC y en la masa interna celular del blastocisto en estados embrionarios (Chambers, Colby et al. 2003; Mitsui, Tokuzawa et al. 2003). La eliminación de NANOG en embriones muestra la desorganización de los tejidos extraembrionarios. Blastocistos deficientes en Nanog muestran morfología normal, pero la masa interna celular solo produce células parecidas al endodermo parietal y no deriva en epiblasto cuando son cultivadas *in vitro*. La falta de Nanog en ESCs le permite diferenciarse, pero tienden a formar linajes de endodermo extraembrionario incluso en presencia de LIF. Hatano y col. (2005) reportaron que ESC mutantes heterocigotos de Nanog son inestables y susceptibles a diferenciación espontánea (Hatano, Tada et al. 2005). Varias señales intrínsecas como LIF, BMP y Wnt pueden estar sosteniendo pluripotencialidad de ESCs a través de genes de pluripotencialidad. Nanog, es uno de los principales reguladores de estas señales. Niveles elevados de Nanog pueden mantener las ESCs de ratón auto regenerándose independiente de LIF y posibilitar que a las ESC de humano crezcan sin células alimentadoras. Además las vías de señalización con factores de transcripción intrínsecos como FoxD3, P53 y Oct 4 solo se encuentran involucrados en la regulación de la expresión de Nanog. Funcionalmente Nanog trabaja en conjunto con otros factores clave de pluripotencialidad como Oct 4 y Sox2 para controlar el conjunto de genes que tienen importantes funciones en ESCs (Hatano, Tada et al. 2005; Chambers, Silva et al. 2007). Es notable que

Nanog se expresa discontinuamente en el embrión, se expresa durante la formación del blastocisto, es regulado en el tiempo de implantación y después se reexpresa en la implantación del huevo cilíndrico. Por lo que se especula que Nanog no es un factor esencial en la pluripotencialidad pero si ayuda a mantener el estado pluripotencial y en la segunda oleada de expresión puede servir como guardián del huevo cilíndrico del epiblasto como un factor de precoz compromiso durante la gastrulación, de un modo parecido en las ESC (Chambers, Silva et al. 2007). Donde estos factores clave forman una red donde se soportan unos a otros o limitan los niveles de expresión, para mantener las propiedades de la ESCs.

1.5.4.LIN 28

Lin-28 fue el primer gen heterocrónico descrito, se le ha descrito un papel en el control del calendario de desarrollo de *C. elegans* debido a que mutaciones en este gen llevan al desarrollo precoz, aunque el mecanismo molecular no ha sido bien entendido. Se ha sugerido que puede estar actuando como un factor post-transcripcional debido a sus dominios de unión a RNA (CSD Cold shock domain) y un par de dedos de zinc tipo retroviral CCHC. Se ha reportado que proteínas CSD están envueltas en el control transcripcional y se han encontrado unidas a mRNA no traducido y almacenado, predominantemente en desarrollo temprano.

Se ha reportado que la sobre expresión de Lin-28 en SC disminuye la habilidad de las células de crecer en densidades clónales, disminución de la división celular e incremento de la diferenciación al presentar diferenciación a linajes de endodermo extraembrionario (Maherali, Sridharan et al. 2007). Además de que se mostró que en el desarrollo temprano del embrión, se encuentran altos niveles de Lin-28 en endodermo extraembrionario, puede Lin-28 ser prescindible para la reprogramación celular pero es de considerable importancia para autorenovación y evitar la diferenciación celular (Dvash, Mayshar et al. 2004; Darr and Benvenisty 2009).

1.5.5. KLF4

Factor transcripcional tipo kruppel fue originalmente identificado como gen supresor de tumores, debido a que se encuentra silenciado en cáncer gastrointestinal (Rowland, Bernards et al. 2005), lo que se ha mostrado en modelos de ratones *knock-out* a *klf4* (Katz, Perreault et al. 2005). Se ha descrito la sobre expresión de *klf4* en células de carcinoma escamoso y cáncer de seno, piel y testículo (Foster, Liu et al. 2005), por lo que *Klf4* podría estar asociado en un doble papel como supresión de tumores y oncogen.

La expresión ectópica de *Klf4* en células cancerosas suprime la proliferación celular, pero la delección de solo uno de sus genes blanco (*p21*), es suficiente para neutralizar el efecto citostático de *klf4* (Rowland, Bernards et al. 2005), esto podría relacionar la doble función de *klf4* en ambos tipos de cáncer.

En ES de ratón *klf4* se encuentra altamente expresado (Tokuzawa, Kaiho et al. 2003), y la inactivación de *STAT 3* en células ES de ratón decrece dramáticamente la expresión de *klf4*, mientras que la sobre expresión de *klf4* permite la auto-regeneración celular independiente de *LIF* (Tokuzawa, Kaiho et al. 2003), así como se ha descrito una cooperación de *klf4* con *Oct 4* y *sox 2* en la activación del promotor de *Lefty1*, lo que lo sitúa en un lugar importante dentro del proceso de reprogramación (Nakatake, Fukui et al. 2006).

RESUMEN

Desde la clonación de la oveja Dolly se demostró que en el ovoplasma existen los factores necesarios para realizar la reprogramación de un núcleo de célula somática a un estado totipotencial y la subsecuente generación de un individuo completo. En 2006 y 2007 se demostró que mediante la transferencia de factores transcripcionales (Oct 4, Sox2, Klf4, Myc, Nanog, Lin28) en distintas combinaciones a células somáticas de ratón y humano, es posible lograr la reprogramación a un estado pluripotente; en este punto se acuñó el término células iPs (*Induced pluripotent stem*). Recientemente se ha demostrado que solo Sox2 y Oct 4 son indispensables para completar la reprogramación al estado pluripotente. En el presente trabajo se ha seleccionado la combinación de factores transcripcionales Oct 4, Sox2, Nanog y Lin28, así como se ha descartado el uso de c-Myc por ser un potencial oncogen. Los genes se han transferido mediante el uso de vectores lentivirales a células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) que además de poseer características de participación en la cicatrización de heridas, metástasis tumoral y angiogénesis prometen ser una fuente de células individuo-específico para terapia celular. HUVEC alcanzan la reprogramación mediante la transferencia de cuatro factores (OCT 4, Sox2, Nanog y Lin 28) indistintamente. Después de 12 días de ser transducidas por vectores lentivirales que contienen los genes de interés, se presenta la formación de colonias con la morfología característica de células troncales embrionarias. Las colonias expresan los genes OCT 4, Sox2, Nanog y Lin 28 mostrando la capacidad de estas células de expresar los genes exógenos inducidos por vectores lentivirales. Células HUVEC infectadas con 4 lentivirus expresan marcadores de células troncales, tanto de los genes inducidos (OCT 4, Nanog) y marcadores de pluripotencialidad (Tra-1-81, SSEA-1, SSEA-4), lo que indica los primeros indicios de la reprogramación de células HUVEC a un estado pluripotente inducido.

2.PLANTEAMIENTO

HUVEC han sido utilizado como modelo de células endoteliales humano, presentan la ventaja de poder generar células individuo específicas y no requerir procedimientos quirúrgicos para la obtención de la muestra. Se inducirá la expresión de los genes Oct4, Sox2, Nanog y Lin 28 mediante el uso de vectores lentivirales, para generar la expresión de marcadores de pluripotencialidad con el fin de evaluar la posibilidad de ser usadas en generación de células multipotentes o en modelos de enfermedades, dentro del área de medicina regenerativa. A pesar de que los protocolos actuales presentan ciertas limitaciones técnicas, como la posible mutación por el uso de vectores lentivirales, la cual debe ser eliminada antes de considerar alguna prueba clínicas.

3.HIPÓTESIS

La transferencia y expresión de los genes humanos OCT 4, SOX2, NANOG y LIN28, mediante vectores lentivirales en HUVEC, inducirá la expresión de marcadores de ES.

4.OBJETIVOS

GENERAL

- Transferir los genes humanos Oct 4, Sox2, Nanog y Lin28 a células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y evaluar la expresión de marcadores de pluripotencialidad.

PARTICULARES

- Estandarizar el cultivo primario de HUVEC
- Determinar si HUVEC expresan Oct 4, Sox2, Nanog y Lin28 en cultivo primario.
- Llevar acabo la producción del vector lentiviral con los genes de interés.
- Evaluar la expresión a nivel de mRNA de Oct 4, Sox2, Nanog y Lin28 en cultivos HUVEC reprogramados con vectores lentivirales.
- Evaluación de los cambios morfológicos.
- Determinar la expresión de marcadores de pluripotencialidad (SSEA1, SSEA4, OCT 4, NANOG, Tra-1-80,) en células HUVEC reprogramadas.

5.ENFOQUE EXPERIMENTAL

Los cultivos de células endoteliales serán realizados a partir de cordones umbilicales de no mas de 48 horas de haber sido recolectados en hospital, una vez estandarizados y después del tercer pase en donde se asegura una población homogénea, se realizará la extracción de RNA total por el método fenol-cloroformo, posteriormente mediante la técnica RT-PCR se amplificará el mRNA de los factores Oct 4, Sox2, Nanog y LIN 28, mediante electroforesis en gel de agarosa se analizará la presencia de dichos mensajeros en las células no transformadas. En paralelo se realizará la producción de los lentivirus conteniendo los genes anteriormente mencionados y se procederá a la infección de los cultivos, infectando con diferentes combinaciones de vectores lentivirales por cultivo. Obtenidas las células transformadas se analizará mediante RT-PCR los cuatro mensajeros a si como la detección mediante inmuno fluorescencia de marcadores de ESC.

6.MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.Cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano(HUVEC).

Las células se obtienen de cordones umbilicales frescos colectados en una solución de HEPES [0.75 M NaCl, 5 mM KCl, 5 mM HEPES, 6 mM de glucosa, pH 7.5 (SIGMA USA)] pH 7.5 o bien en PBS con el mismo pH. Los cordones se lavan para quitar restos de sangre y verificar que no presenten perforación. Una vez hecho lo anterior, se localiza la vena de cordón, la cual se distingue a simple vista por su tamaño. Por la vena se coloca una aguja de punta roma y se sujeta con cinchos de plástico (entre 10 y 15 cm de largo), por la aguja se pasan de 10 a 20 ml de solución HEPES esto se realiza repetidas ocasiones hasta observar que la solución se encuentre limpia. Una vez observado esto el extremo opuesto se sujeta con un cincho, el cordón es sumergido en una solución de HEPES a 37° C. Habiendo procesado todos los cordones en la forma antes descrita se introduce una solución de tripsina al 0.075% hasta saturar el cordón y se repite para todos los cordones , posteriormente los cordones son incubados a 37° por 15 min. Transcurrido este tiempo se colecta el contenido de los cordones en tubos falcon conteniendo 500 microlitos de SFB.Las muestras deben ser centrifugadas a 1500 revoluciones por 15 min. a 4° C. El sobrenadante es retirado por decantación y la pastilla es resuspendida en medio 199 (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco), 10 mg/ml de heparina porcina, 50 U/ml de penicilina/estreptomicina y 25 mg/ml de factor de crecimiento vascular (Sigma). Las células se siembran en cajas de cultivo de 25 cm² y son incubadas a 37° C con 5% de CO₂ . Las células requieren un tiempo aproximado de 12 horas para adherirse a la placa y el medio debe ser cambiado a cada 12 horas en la primera parte y posteriormente cada 48 o 72 dependiendo del crecimiento y cambio de pH observado en el medio, finalmente para verificar la pureza del cultivo se realizan dos o tres paces dependiendo de la morfología observada, se verifica la presencia del factor de VonWillebran (VWF) por inmunofluorescencia (marcador de superficie característico de HUVEC)(Ozaki, Yoshida et al. 1996), a pesar que la morfología del cultivo.

6.2. Cultivo Primario de fibroblastos de cordón umbilical

Las células se obtienen de cordones umbilicales frescos. Los cordones se lavan para quitar restos de sangre y verificar que no presenten perforación. Una vez hecho lo anterior, se localiza la vena de cordón, la cual se distingue a simple vista de los otros dos orificios ya que es mas grande. Por la vena se coloca una aguja de punta roma y se sujeta con cinchos de plástico (entre 10 y 15 cm de largo), por la aguja se pasan de 10 a 20 ml de solución PBS esto se realiza repetidas ocasiones hasta observar que la solución se encuentre limpia. Una vez observado esto el extremo opuesto se sujeta con un cincho, el cordón es sumergido en una solución de PBS a 37° C.

Habiendo procesado todos los cordones en la forma antes descrita se introduce una solución de tripsina al 0.1% hasta saturar el cordón y se repite para todos los cordones , posteriormente los cordones son puestos en baño María a 37° por 30 min.

Transcurrido este tiempo se colecta el contenido de los cordones en tubos falcón conteniendo 500 microlitos de SFB, es importante que antes de colectar las células los cordones sean masajeados manualmente con el fin de favorecer el desprendimiento de las células.

Las muestras deben ser centrifugadas a 1500 revoluciones por 15 min. a 4° C. El sobrenadante es retirado por decantación y la pastilla es re-suspendida en medio RPMI (Gibco) suplementado con 10% de SFB (Gibco), 50 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células se siembran en cajas de cultivo de 25 cm² y son incubadas a 37° C con 5% de CO₂ . Las células requieren un tiempo aproximado de 12 horas para adherirse a la placa y el medio debe ser cambiado a cada 36 horas en la primera parte y posteriormente cada 72 dependiendo del crecimiento y cambio de pH observado en el medio, finalmente para verificar la pureza del cultivo se realizan dos o tres paces dependiendo de la morfología observada.

6.3.Línea Celular 293T

El cultivo de la línea celular 293T/17 [HEK 293T/17] con número de ATCC CRL-11268, fue adquirida del "ATCC The Global Bioresource Center" , la cual fue propagada en medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de antibióticos, se mantuvo en propagación hasta ser utilizada para la producción de lentivirus.

6.4.Crio-preservación de línea celular 293T

Los cultivos de células 293T una vez alcanzando el 90% de confluencia, fueron tratadas con Tripsina-EDTA 0.25% (Sigma cat. T4049) e incubadas por 5 min. a 37 C, posteriormente fueron cosechadas mediante aspiración y la tripsina es inactivada con 500µl SFB para ser centrifugadas 15 min. a 800 RPM, una vez terminada la centrifugación se retira el sobrenadante mediante absorción por trampa de vacío, las células se resuspenden en 2.5 ml de DMEM, posteriormente se le añade 7 ml de SFB y se adiciona 0.5 ml de DMSO, finalmente son alicuotadas en criotubos de 1.8 ml para ser congeladas paulatinamente, 2 horas a 4 C, 12 horas a -20 C y a -80 C indefinidamente.

6.5.Extracción de RNA por el método de Trizol.

Las monocapa de cultivo al 90% de confluencia, fueron cosechadas con 1000µl de Trizol (Sigma) y homogenizadas, posteriormente se adicionó 200µl de cloroformo y agitadas manualmente por 15s para posteriormente ser Incubadas por 2 o 3 minutos a temperatura de 15° a 30° . Las muestras son centrifugadas ha no mas de 12 000 g por 15 minutos (De 2° a 8° C), la fase acuosa es recuperada en un tubo nuevo (un volumen aproximado de 60% del trizol) y es re precipitada con 0.5 ml de isopropanol por 1 ml de trizol se incuban la muestras por 10 minutos a temperatura de 15° a 30°C. Se centrifugan a 12 000 g por 10 minutos de 2° a 8

° C. Se retiró el sobrenadante por decantación y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%, las muestras fueron agitadas y posteriormente centrifugadas 5 minutos a 10 000 rpm; Finalmente el sobrenadante fue retirado mediante decantación, la pastilla obtenida fue diluida en agua DEPC y cuantificado en el "Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometers".

6.6.RT-PCR One-Step Promega (Cat. A1250)

El RNA_{total} es sometido a reacción, con la enzima Transcriptasa reversa de *Mieloblastos Virus* (MV-LVT) y *Tif*DNA polimerasa para lo cual se incuban 1 µg de RNA bajo las siguientes condiciones; (10 µl Buffer 1° strand, 1 µl dNTP´s, 2 µl M-DTT, 1 µl M-MLV Rev, 1 µl *Tif*DNA polimerasa, 1 µl de desoxinucleótidos 10mM, 2.5 µl de MgCl₂ (50mM)) adicionando 20pM de cada oligonucleótido sentido y antisentido, todo esto se lleva a un volumen final de 50 µl de reacción. La amplificación se realizó en termociclador PTC-100 (MJResearch, Inc.), 37 °C durante una hora, 35 ciclos de 94°C por 1 min., 55°C por 1 min. y 72 °C por 1 min., 9 µl de los 50 µl de la reacción fueron analizados en gel de agarosa al 1% y teñida con bromuro de etidio al 1 %.

6.7. Producción de lentivirus

Las células 293T son sembradas a una concentración de 2.5×10^6 células/ml en botellas de cultivo de 75 cm^2 , una vez que el cultivo ha alcanzado un 70% de confluencia, se realiza la transfección para lo cual se retira el medio de cultivo 2 horas antes y es remplazado por 22.5 ml de medio fresco precalentado a 37 C.

Se prepara una solución que contenga las siguientes cantidades en este orden:

- 112 μg de plásmido pSin-EF2-Gene-Pur conteniendo el gen de interés.
- 39.5 μg del plásmido pMD2G
- 73 μg del plásmido pSPAX2
- 3.3 ml de TE 0.1X
- 1.75 ml de H_2O DD
- 565 μl de CaCl_2 2.5 M (Adicionar gota a gota para evitar precipitado por no menos de 5 min y no mas de 30 min)

Se adicionan 2.25 ml de esta solución por botella de cultivo. El medio deberá ser removido aproximadamente 14 a 16 horas después de la transfección y se le adicionara 14 ml de medio fresco, el sobrenadante deberá ser colectado 12 horas mantenerse a 4 C dure la cosecha, esto se puede repetir por 2 o 3 ocasiones cada 12 horas, una vez transcurrido este tiempo el sobrenadante colectado deberá ser centrifugado con el fin de retirar restos celulares y filtrado en poro de $0.22 \mu\text{m}$ para ser almacenado o usado directamente. Se puede conservar a 4 C por un periodo de 4 a 5 días o a -80 C por un periodo mayor.

6.8. Concentración de partículas virales PEG 6000

Tomar 34 mililitro del sobrenadante del cultivo que contiene el vector, añadir 8.5 ml de PEG 6000 al (50 %), 3.6 ml de NaCl (4 Molar), 3.9 ml de PBS; Almacenar las muestra a 4 °C por 1.5 horas y mezclar el contenido cada 20 0 30 min. Centrifugar las muestras a 7000 g (7500 rpm) por 10 min. a 4°C, se obtiene un precipitado blanco, decantar el sobrenadare y disolver en 600 ul de Tris-HCL 50 mM pH 7.4. Mezclar mediante vortex por 20 a 30 seg, transferir y alicuotar en volumen de 100 ul.

6.9. Purificación de RNA viral

El RNA viral fue realizada mediante el QIAGEN RNeasy Mini kit cat. 74104, posteriormente se verifico la integridad mediante el corrimiento de un gel de agarosa y se cuantifico en el "Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometers".

6.10. Inmunofluorescencia

Los cultivos HUVEC son sembradas después del tercer pase en porta objetos (Glass Slide Sterile NUNC) , posteriormente después de 12 horas alcanzan un 80% de confluencia, en este momento es retirado el medio mediante aspiración y se realizan 3 lavados con PBS 1X a temperatura ambiente, en seguida son fijadas con PFA (Paraformaldeido) al 4% por 20 min. y lavadas 3 veces con PBS 1X, para después la muestra sea bloqueada con BSA al 1%, se añadió el anticuerpo primario contra el factor de VWF (Santacruz Biotechnology, cat. cs-14014) en una dilución 1:50 se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, para posteriormente ser retirado y lavado en 3 ocasiones con PBS 1X, enseguida es adicionado el anticuerpo secundario en una disolución 1:20 (Goat F(ab')₂ anti-Rabbit IgG – FITC) este es incubado por una hora en obscuridad, para ser posteriormente

lavado en tres ocasiones con PBS1X. El portaobjetos es secado y se realizó el montaje con VECTASHIELD Mounting Medium, para ser leído posteriormente en microscopio de fluorescencia.

6.11.Purificación de plásmidos.

Los vectores lentivirales han sido previamente reportados por Yu (Yu, Vodyanik et al. 2007) los plásmidos conteniendo los genes de interés pSin-EF2-Oct4-Pur, pSin-EF2-LIN28-Pur, psin-Ef2-NANOG-Pur, pSIN-EF2-SOX2-Pur; a si como los plásmidos envoltura y empaque pMD2G, pSPAX2. los plásmidos fueron proporcionados por ADDGEN (*psPAX2 (Addgen 12260)*, *pMD2.G (Addgen 12259)*, *pSin-EF2-OCT4-Pur. (Addgene 16579)**pSIN-EF2-SOX2-Pur (Addgen 16577)*, *pSIN-EF2-NANOG-Pur (Addgen 16578)*, *pSIN-EF2-LIN28-Pur (Addgen 16580)*).

6.12.Purificación de Plásmidos

La purificación de plásmidos fue realizada mediante los el uso de columnas, QUIAGEN Plasmid Midi Kit Cat. 12143, QUIAGEN Plasmid Maxi Kit Cat. 12163 y Quick Plasmid Miniprep kit Cat. K2100-10, dependiendo el uso que fuera a tener el plásmido purificado, posterior a la extracción se verifico la integridad del plásmido mediante gel de agarosa al 0.8 % y teñido con bromuro de etidio al 0.1%. la cuantificación se realizó mediante "Thermo Scientific NanoDrop™ Spectrophotometer".

6.13.Digestión Enzimática

Mediante los mapas genéticos se seleccionaran 2 enzimas que liberen los fragmento de los genes de interés contenidos en cada plasmido con el objetivo de confirmar la secuencia del fragmento . A partir de 1 µg de plasmido, se adiciono diferentes unidades de enzima (*EcoR V*, *Spe 1*) y 3 ml de solución amortiguadora (50 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 10 mM MgCl₂ 1 mM dithiothreitol pH 7.9) y 2 µl de agua tratada con DEPC. Se incubaron 2 hrs a 37°C y se analizaron en gel de agarosa al 0.8%

6.14.Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que serán utilizados son provistos por R&D SYSTEMS y no se tiene conocimiento de la secuencia solo de las características abajo mencionadas:

| Gen Amplificado | Número de catalogo | Tamaño de amplificado DNA genómico | Tamaño de amplificado cDNA | Tm |
|-----------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|-------|
| Sox2 | RDP-323 | 591 pb | 591 pb | 55 °C |
| Oct 4 | RDP-321 | 1031 pb | 486 pb | 55 °C |
| Nanog | RDP-320 | 1974 pb | 596 pb | 55 °C |

Tabla 1: Las caracterizaciones de oligonucleotidos marca R&D SYSTEMS

Tabla de oligonucleótidos reportados por Yu (Yu, Vodyanik et al. 2007) de los cuales se ha tomado la secuencia de referencia para ser sintetizados, desalados y purificados.

| Gen | Tm | GenID | Pb | Oligo | Direccion | Secuencia |
|-----------|---------|-------|-----|-------------|-------------|-----------------------|
| GAPDH | 79.1°C | 2597 | 152 | GAPDHF | Sentido | TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC |
| | | | | GAPDHR | Antisentido | GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT |
| OCT 4 | 79.9°C | 5460 | 161 | OCTCDRF1 | Sentido | CAGTGCCCGAAACCCACAC |
| | | | | OCTCDRR1 | Antisentido | GGAGACCCAGCAGCCTCAA |
| NANOG | 74.6 °C | 79923 | 194 | NANOG-CDRF1 | Sentido | TTTGGGAAGCTGCTGGGGAAG |
| | | | | NANOG-CDRR1 | Antisentido | GATGGGAGGAGGGGAGAGGA |
| BRACHYURY | 74.4 °C | 6862 | 165 | BRACHYURF | Sentido | ACCCAGTTCATAGCGGTGAC |
| | | | | BRACHYURR | Antisentido | CCATTGGGAGTACCCAGGTT |
| LIN28 | 80.5°C | 79727 | 456 | LIN28QF | Sentido | AGTAAGCTGCACATGGAAGG |
| | | | | LIN28QR | Antisentido | ATTGTGGCTCAATTCTGTGC |

Tabla 2: Las caracterizaciones de oligonucleotidos se realizaron mediante el programa MacVector 10.6.0.

7.RESULTADOS

7.1.Estandarización y caracterización del cultivo primario de HUVEC

Las células HUVEC se adhieren dentro de las primeras 24 horas, transcurridas 72 horas se observa una duplicación de la población celular en 12 días posteriores se obtiene un cultivo de HUVEC con una confluencia del 80% y una población homogénea en morfología y proliferación (Figura 3).

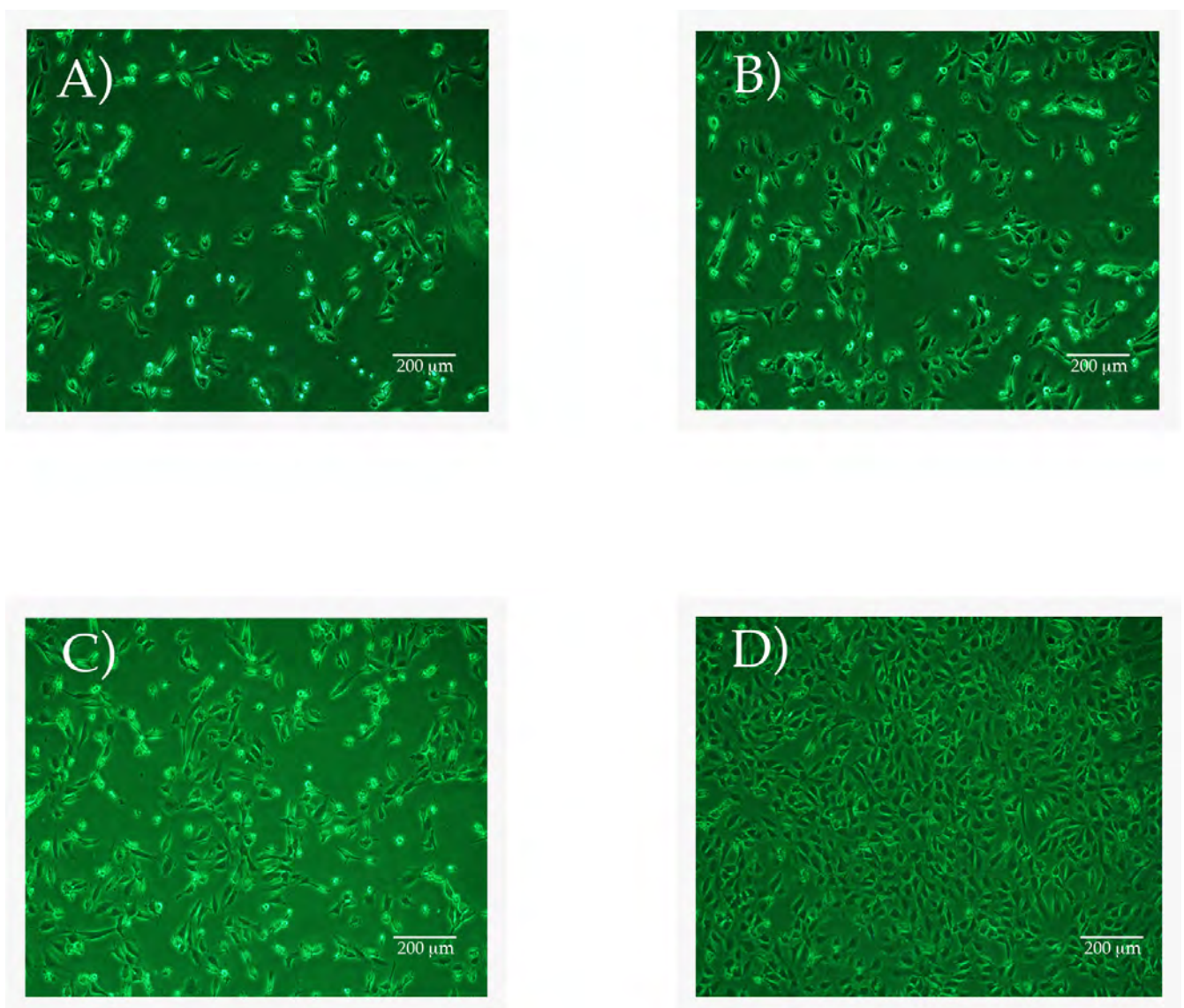


Figura 3: Cultivo de HUVEC en propagación Fotografía en contraste de fase, muestra cultivos HUVEC a través del proceso de propagación hasta el día 12 cuando los cultivos se encuentran confluentes y diferenciados en células endoteliales; A) 24 h de cultivo, B) 72 h de cultivo, C) 8 días de cultivo D) 12 días de cultivo.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia contra en factor de Von Willebrand, marcador característico de HUVEC (Jaffe 1980; Hwang, Maeng et al. 2008). Se encontró presencia de dicho factor lo que confirma una población homogénea de HUVEC (Figura 4). Los cultivos se continuaron en propagación para evaluar la expresión de genes de pluripotencialidad en una primera fase y continuar con análisis posteriores.

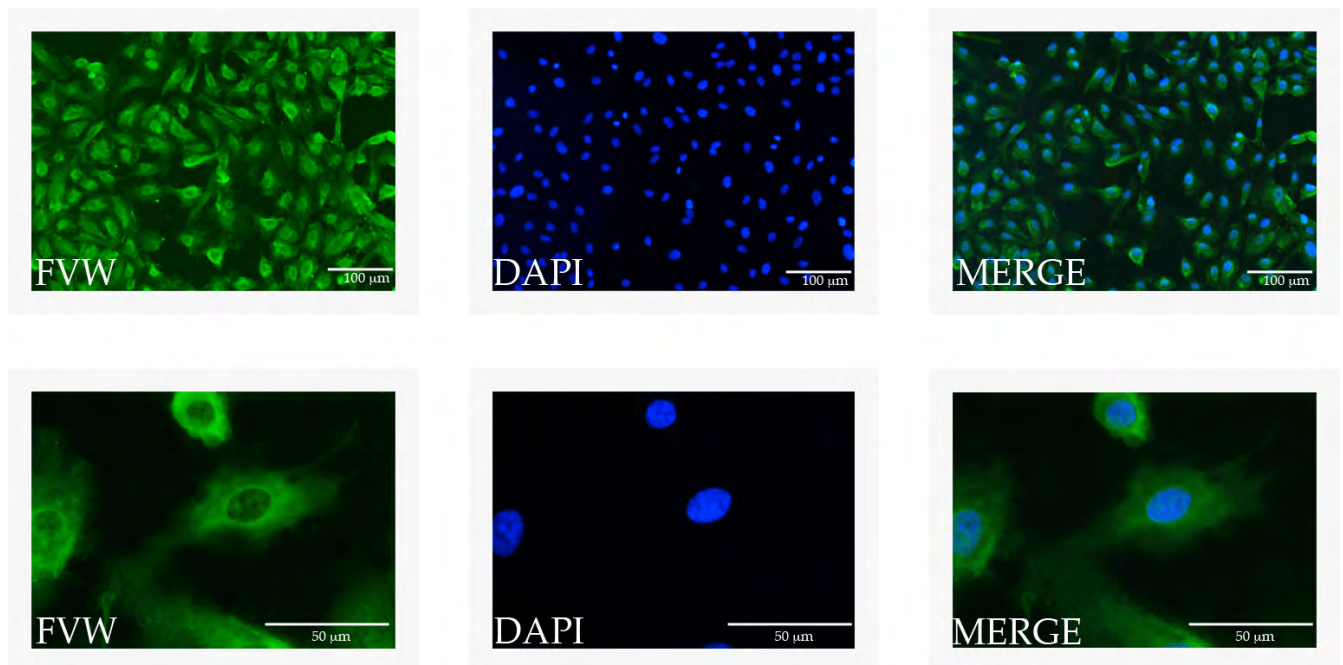


Figura 4 : Fotografía en fluorescencia de HUVEC expresando FVW. Tomadas 15 días posteriores del inicio del cultivo primario, se encuentra una población diferenciada de células HUVEC expresando el factor de Von Willebrand marcador característico de HUVEC. (Anticuerpo contra FVW, conjugado con el anticuerpo secundario FICT.)

Teniendo cultivos de HUVEC caracterizados, se procedió a la construcción de vectores lentivirales. Como primer paso se realizó la purificación y cuantificación (Tabla 3) de plásmidos para la generación de vectores lentivirales, a sí como se procedió al análisis de los plásmidos mediante enzimas de restricción.

| Muestra | [ng/μl] | [μg] | Abs.260 nm | Abs.280 nm | 260/280 | 280/260 |
|---------|----------|--------|------------|------------|----------|----------|
| OCT 4 | 983 | 75.50 | 3.02 | 1.53 | 1.973856 | 0.506623 |
| SOX 2 | 973 | 239.00 | 4.78 | 2.44 | 1.959016 | 0.51046 |
| NANOG | 990 | 160.00 | 3.21 | 1.64 | 1.957317 | 0.510903 |
| Lin 28 | 390 | 172.00 | 3.44 | 1.78 | 1.932584 | 0.517442 |
| psPAX2 | 1010 | 132.00 | 2.79 | 1.351 | 2.065137 | 0.484229 |
| pMD2.G | 942 | 63.00 | 1.269 | 0.598 | 2.122074 | 0.471237 |

Tabla 3: Cuantificación de plásmidos purificados.

Los análisis mediante de enzimas de restricción mostraron que los plásmidos con los genes de interés, envoltura y empaque; generaron fragmentos específicos, pSin-EF2-OCT4-Pur restringido con las enzimas *EcoRI* y *Spe I* se obtuvo un fragmento de 1100 pb, pSin-EF2-SOX2-Pur restringido con las enzimas *EcoRI* y *Spe I* se obtuvo un fragmento de 1000 pb, pSin-EF2-NANOG-Pur restringido con las enzimas *EcoRI* y *Spe I* se obtuvo un fragmento de 900 pb, pSin-EF2-LIN28-Pur restringido con las enzimas *EcoRI* y *Spe I* se obtuvo un fragmento de 600 pb (Figura 5 A), pMD2.G se linealizó mediante la enzima *Hin III* obteniendo un fragmento de 5824 pb y psPAX2 se linealizó mediante la enzima *Eco RI* obteniendo un fragmento de 10703 pb (Figura 5 A) los fragmentos anteriormente descritos coincidieron con las características reportadas por ADDGEN. Confirmando estos resultados se prosiguió a la construcción de los 4 vectores lentivirales.

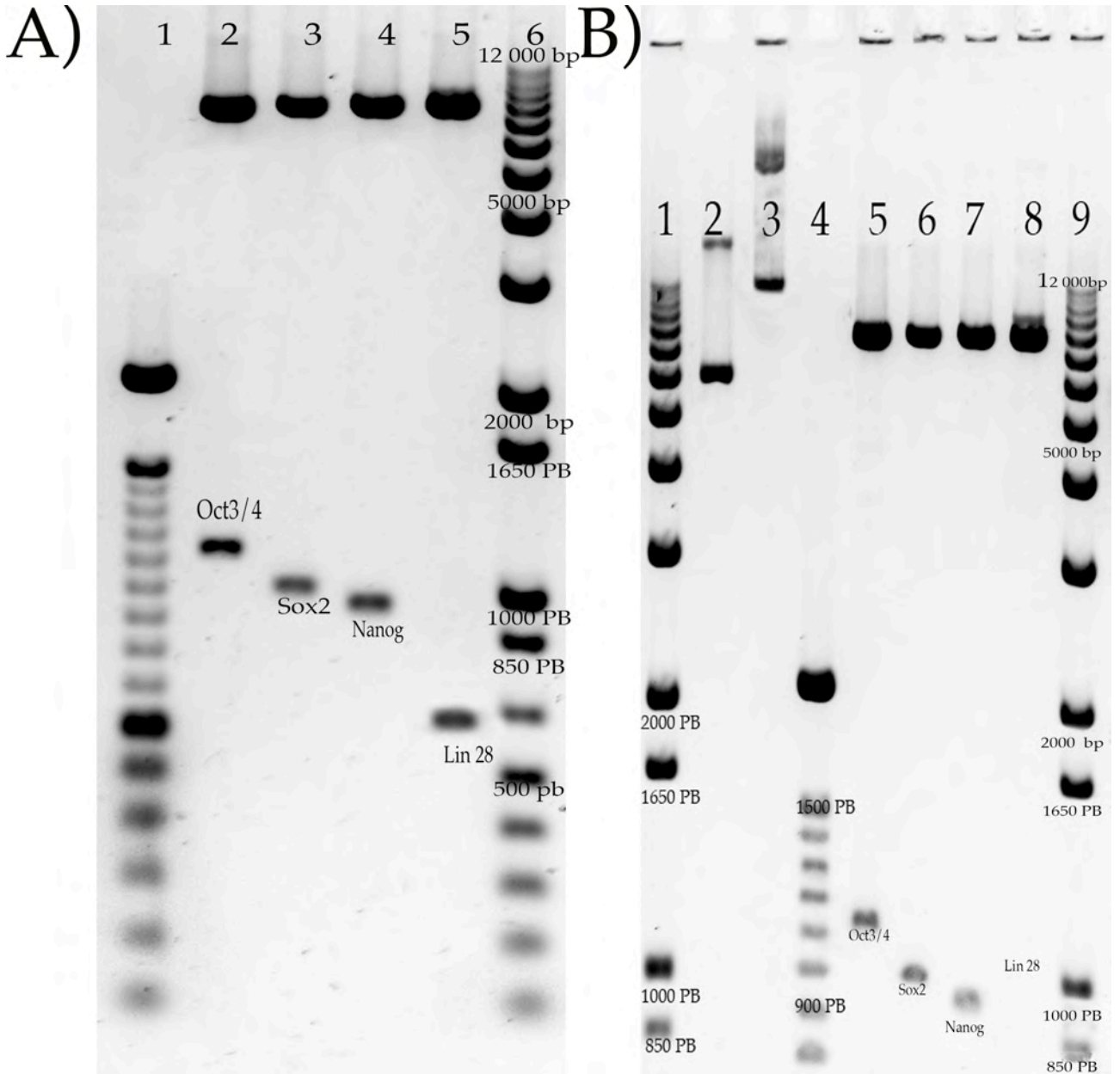


Figura 5. Liberación de fragmentos de genes de interés y linealización de plásmidos. Fotografías de gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio, se muestran los plásmidos para producción de los vectores. **A)** 1) Marcador de peso molecular 100 pb 2) Plásmido pSin-EF2-OCT4-Pur 3) Plásmido pSin-EF2-SOX2-Pur. 4) Plásmido pSin-EF2-NANOG-Pur 5) Plásmido pSin-EF2-LIN28-Pur. 6) Marcador de peso molecular 1 Kb. **B)** 1) Marcador de peso molecular 100 pb 2) Plásmido pMD2.G 3) Plásmido psPAX2. 4) Marcador de peso molecular 100 pb 5) Plásmido pSin-EF2-OCT4-Pur. 6) Plásmido pSin-EF2-SOX2-Pur. 7) Plásmido pSin-EF2-NANOG-Pur. 8) Plásmido pSin-EF2-LIN28-Pur. 9) Marcador de peso molecular 1 Kb.

7.2. Producción de vectores lentivirales

Los vectores lentivirales fueron producidos mediante el protocolo anteriormente descrito, se obtuvieron 50 ml de sobrenadante por cada vector producido, posteriormente la presencia de los vectores fue evaluada mediante RT-PCR donde se observó que mediante el uso de oligonucleótidos específicos se amplificaban fragmentos correspondientes al gen contenido en cada vector lentiviral.

7.2.1. Análisis de Vectores Lentivirales VOct3/4, VSox2, VNanog, VLin28.

La amplificación del cDNA viral generó fragmentos específicos para cada gen VOCT 4 496 pb, VSox 2 591 pb, VNanog 596pb y lin 28 410pb (FIGURA 6); con esto quedó confirmada la presencia de partículas virales conteniendo el gen de interés en cada uno de los sobrenadantes.

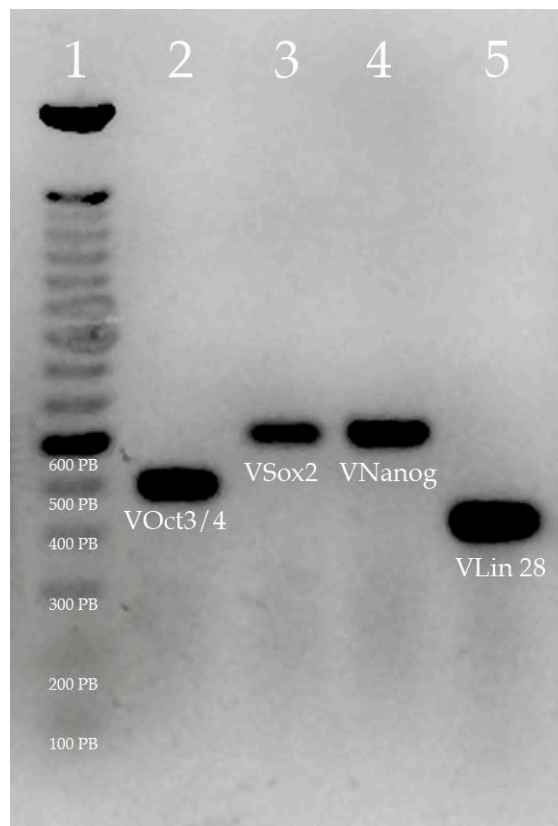


Figura 6. Amplificación del DNA complementario de RNA viral de vectores lentivirales. Fotografía del gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se muestra la evaluación de la presencia de los RNA virales de los vectores de Oct 4, Sox 2, Nanog, Lin 28. Carril 1) TrackIt™ 100 bp DNA Ladder. Carril 2) Fragmento de 486 pb correspondiente a Oct 4 (*oligos comerciales de R&D Systems*). Carril 3) Fragmento de 591 pb correspondiente a Sox2 (*oligos comerciales de R&D Systems*). Carril 4) Fragmento de 596 pb correspondiente a Nanog (*oligos comerciales de R&D Systems*). Carril 5) Fragmento de 410 pb correspondiente a Lin 28.

Se realizaron controles en la amplificación del DNA complementario al RNA viral, donde se realizó la reacción de amplificación sin RT y no se encontró presencia de los fragmentos esperados (Figura 7), lo cual mostró que en el sobrenadante no se encontraban DNA que pudiera ser amplificado. Complementando este análisis se realizó un tratamiento con DNasa I (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade) donde se encontró la amplificación de los fragmentos esperados (Figura 7) y se descartó la contaminación por DNA genómico independientemente de que los oligonucleotidos reconocen y amplifican un fragmento de mayor tamaño cuando parten de DNA genómico. Estos resultados mostraron que los fragmentos amplificados corresponden a las secuencias de los genes de interés contenidas en partículas virales

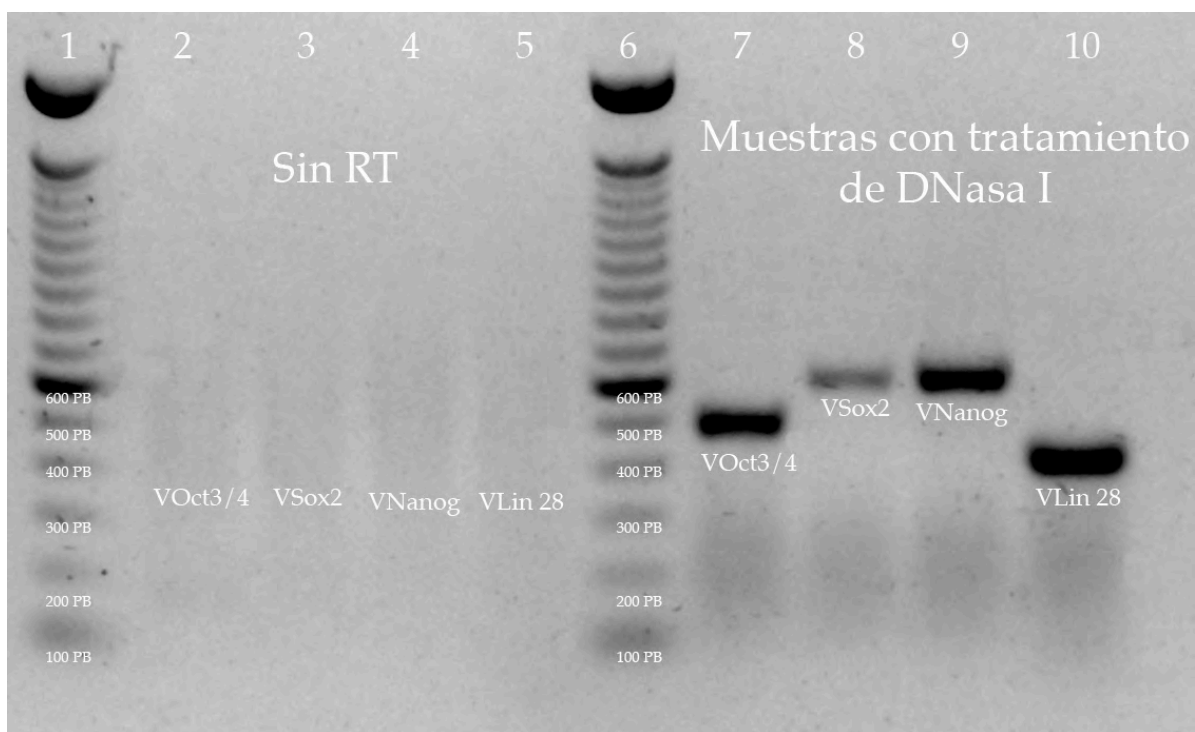


Figura 7. Controles del DNA Amplificado de vectores lentivirales. Fotografía del gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, se muestra la evaluación de la presencia de los RNA Virales de los vectores de Oct 4, Sox 2, Nanog, Lin 28, don de los carriles 2,3,4,5 las muestras eran sin RT, muestras 7,8,9,10 se trataron con de DNasa. Carril 1) TrackIt™ 100 bp DNA Ladder. Carril 6) TrackIt™ 100 bp DNA Ladder. 7) Fragmento de 486 pb correspondiente a Oct 4 (*oligos comerciales de R&D Systems*), Carril 8) Fragmento de 591 pb correspondiente a Sox2 (*oligos comerciales de R&D Systems*), Carril 9) Fragmento de 596 pb correspondiente a Nanog (*oligos comerciales de R&D Systems*), Carril 10) Fragmento de 410 pb correspondiente a Lin 28.

7.2.2. Evaluación de presencia de antígeno p24 (Ensayo HIV Ag/Ab)

Se realizó un análisis de presencia de antígeno de p24 para confirmar la presencia del partículas virales en el sobrenadante. Dando una reactividad positiva donde reactividad superior a 0.5 son consideradas pruebas positivas a VIH por p24.

| Muestra | Reactive | Unidades* | Dilución | ml de Muestra |
|---------|----------|-----------|----------|---------------|
| VOCT 4 | 93.88 | S/CO | 1 | 0.5 |
| VSOX 2 | 91.24 | S/CO | 1 | 0.5 |
| VNANOG | 89 | S/CO | 1 | 0.5 |
| VLIN 28 | 81 | S/CO | 1 | 0.5 |

Tabla 4 La detección de la presencia de lentivirus se realizó mediante reacción de fotoluminiscencia de reacción de anticuerpo p24, HIV Ag/Ab Combo assay (Abbott Laboratories, Abbott Park, Ill.) *(sample rate to cutoff rate [S/CO])

7.3.Cultivo primario de Fibroblastos de cordón umbilical.

7.3.1. Caracterización morfológica

Los cultivos de fibroblastos fueron derivados de cordones umbilicales, el cultivo alcanza a los 17 días el 80% de confluencia. Los fibroblastos se distinguieron en base a morfología presentada, fusiformes con pocas prolongaciones, núcleo pequeño y alargado (Figura 8). El cultivo primario solo pudo ser propagado en un radio de 1:2 antes de presentar un periodo de senescencia.

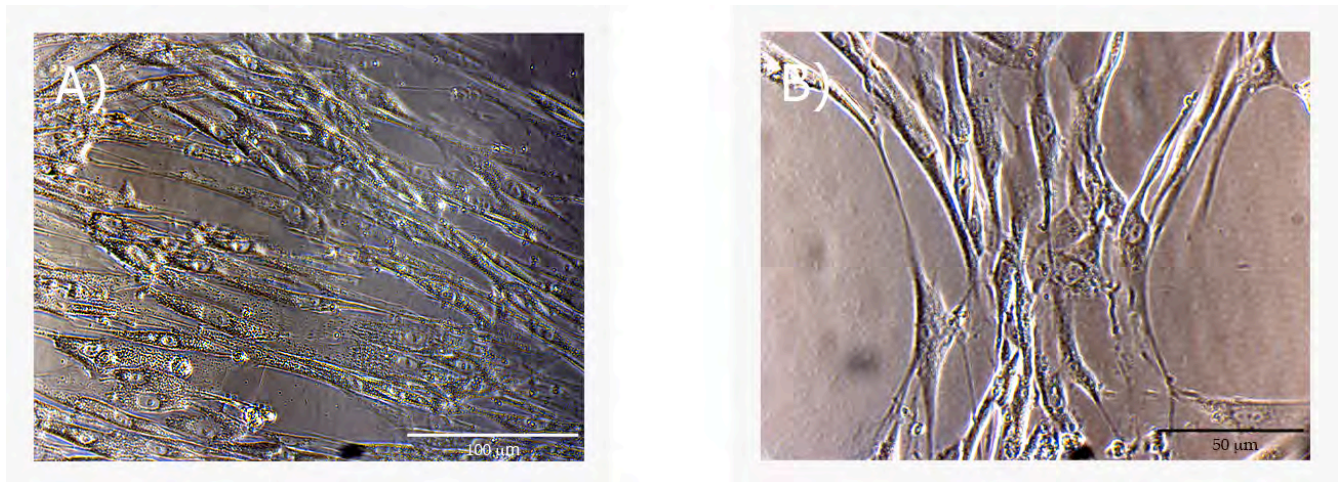


Figura 8 Cultivo primario de fibroblastos de vena de cordón umbilical humano (HUVFC) Fotografía en técnica de contraste de fases de cultivos primarios de fibroblastos extraídos de cordón umbilical humano.

7.4. Caracterización de Fibroblastos infectados con factores Oct 4, Nanog, Sox 2.

Los fibroblastos de cordón umbilical humano (HUVFC) fueron infectados con el sobrenadante de vectores lentivirales (OCT4, SOX2, NANOG) se mantuvo el proceso de infección por 48 horas, posteriormente se mantuvieron en medio DMEN/F12. Días posteriores los fibroblastos comenzaron a presentar cambios de morfología (Figura 9) donde se observaron células pequeñas con núcleos al tamaño de citoplasma lo que coincide con lo reportado (Figura 10) (Park, Lerou et al. 2008). Se procedió a realizar un análisis de la expresión de los marcadores OCT 4, Sox 2, Nanog; Las células fueron transferidas a medio mTeSR1 (específico para propagación de ESC. *StemCell Technologies Inc*) donde se mantuvieron hasta el día 20 donde se realizó un análisis de marcadores de superficie característicos de ESC, SSEA-1, SSEA-4.

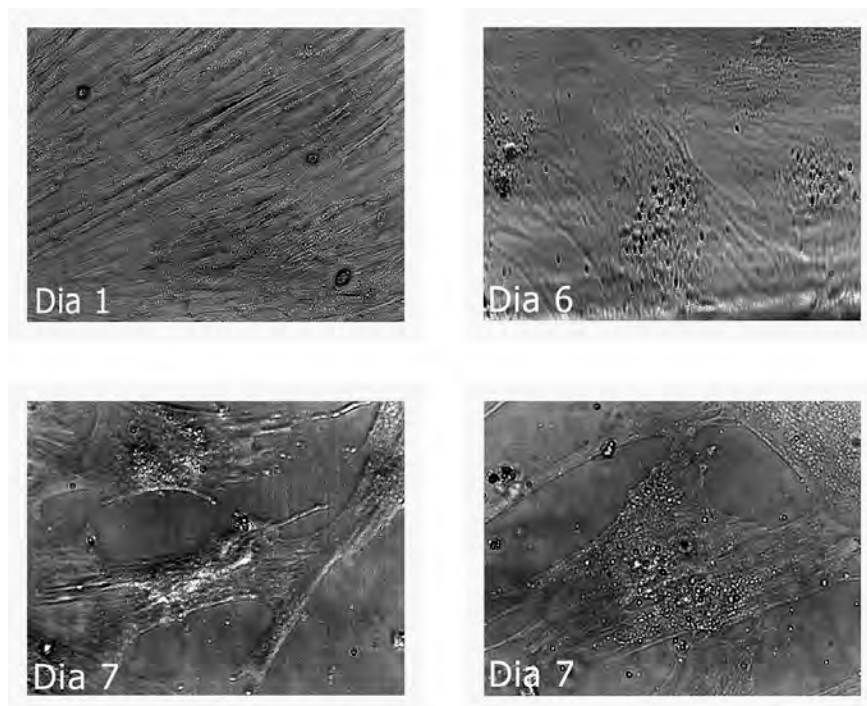


Figura 9: Cambio de morfología de fibroblastos infectados Proceso de infección de fibroblastos con tres vectores lentivirales. Se aprecia el cambio de morfología en comparación de los cultivos de fibroblastos.

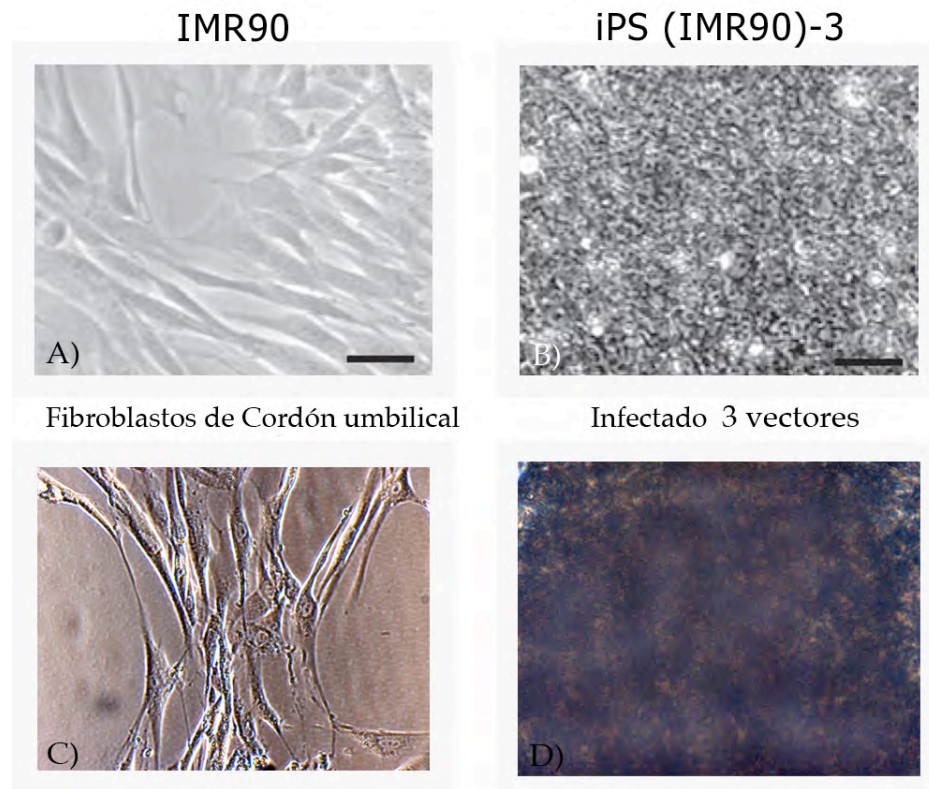


Figura 10: Cambios de morfología antes y después de infección. A,B) Comparación entre los fibroblastos y células iPS (Yu, Vodyanik et al. 2007). C, D) Comparación entre fibroblastos de cordón y fibroblastos de cordón infectados con los lentivirus de OCT 4, Sox2, Nanog.

7.4.1. Evaluación de la expresión de Oct 4 , Nanog, Sox 2, Lin28

Mediante el kit one-step RT-PCR de *Promega* se evaluó la expresión de los mensajeros de Oct4, Sox2, Nanog y Gliceraldehído-3-fosfato Deshidrogenasa (GAPDH) en fibroblastos de cordón y fibroblastos de cordón infectados con 3 vectores lentivirales. En la **Figura 11A** se observa la expresión de los genes inducidos mediante vectores lentivirales, estos genes se encuentran expresando se en forma exógena. En la **Figura 11B** se muestra solo la expresión de GAPDH y no se observa expresión de los genes de pluripotencialidad en fibroblastos sin infectar.

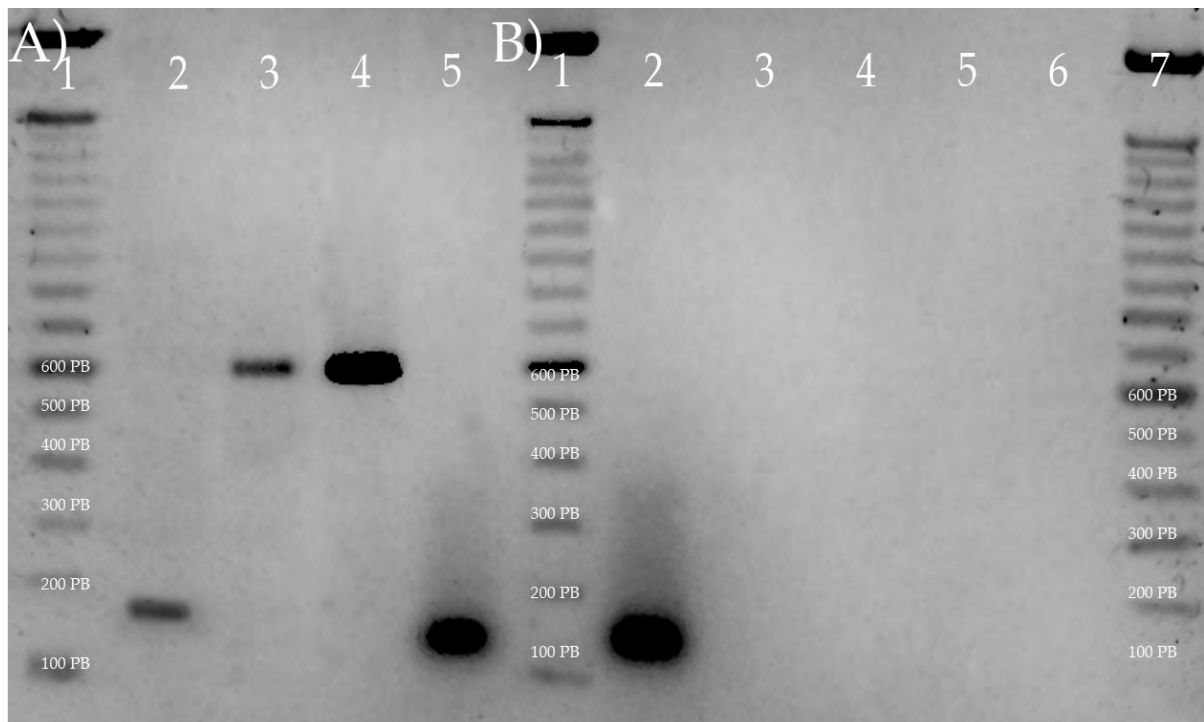


Figura 11: Expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog, GDPH antes y después de la infección. **A)** Fotografía del gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog, GDPH a partir de RNAtotal de fibroblastos de cordón umbilical humano infectados con los vectores lentivirales Oct 4, Sox 2 y Nanog. **1)** Marcador de 100 pb. **2)** Amplificación de Oct 4 producto de 161 pb. **3)** Amplificación de Sox 2 producto de 591 pb (oligos comerciales de R&D Systems) **4)** Amplificación de Nanog producto de 596 pb (oligos comerciales de R&D Systems). **5)** Amplificación de GDPH producto de 153 pb. **B)** Fotografía del gel de agarosa al 1% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNAtotal de fibroblastos de cordón umbilical humano sin transducir **1)** Marcador de peso molecular de 100 pb. **2)** Amplificación de GDPH producto de 153 pb, **3)** Amplificación de Oct 4 producto de 161 pb no se encontró expresión basal. **4)** Amplificación de Sox 2 producto de 591 pb (oligos comerciales de R&D Systems) no se encontró expresión basal **5)** Amplificación de Nanog producto de 596 pb (oligos comerciales de R&D Systems) no se encontró expresión basal **6)** Control sin RT. **7)** Marcador de peso molecular 100pb (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder).

7.4.2. Presencia de marcadores SSEA-1, SSEA-4

Se procedió a evaluar en células de fibroblastos infectadas con tres vectores lentivirales (Figura 13) así como en fibroblastos sin infección (**control negativo**) (Figura 12), la presencia de marcadores SSEA-1 y SSEA-4 los cuales se han reportado como marcadores de pluripotencialidad (Park, Zhao et al. 2008).

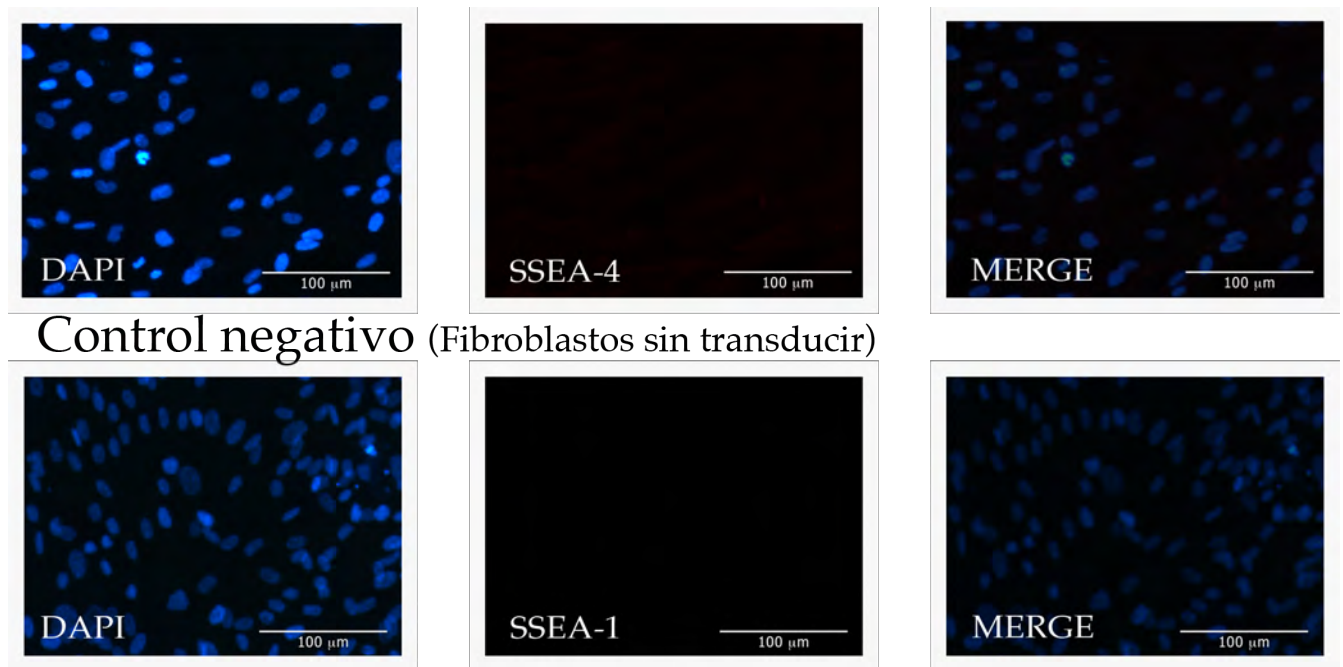


Figura 12 : Control de fibroblastos sin infección contra SSEA-4, SSEA-1. Fotografías de inmunofluorescencia de Fibroblastos no infectados (**control negativo**) en confluencia se realizó un control donde no se encontró presencia de dichos marcadores, Anti-Human SSEA-1 y Alexa 594 Goat Anti-mouse IgM, Anti-Human SSEA-4 y Alexa 568 Goat Anti-mouse igG.

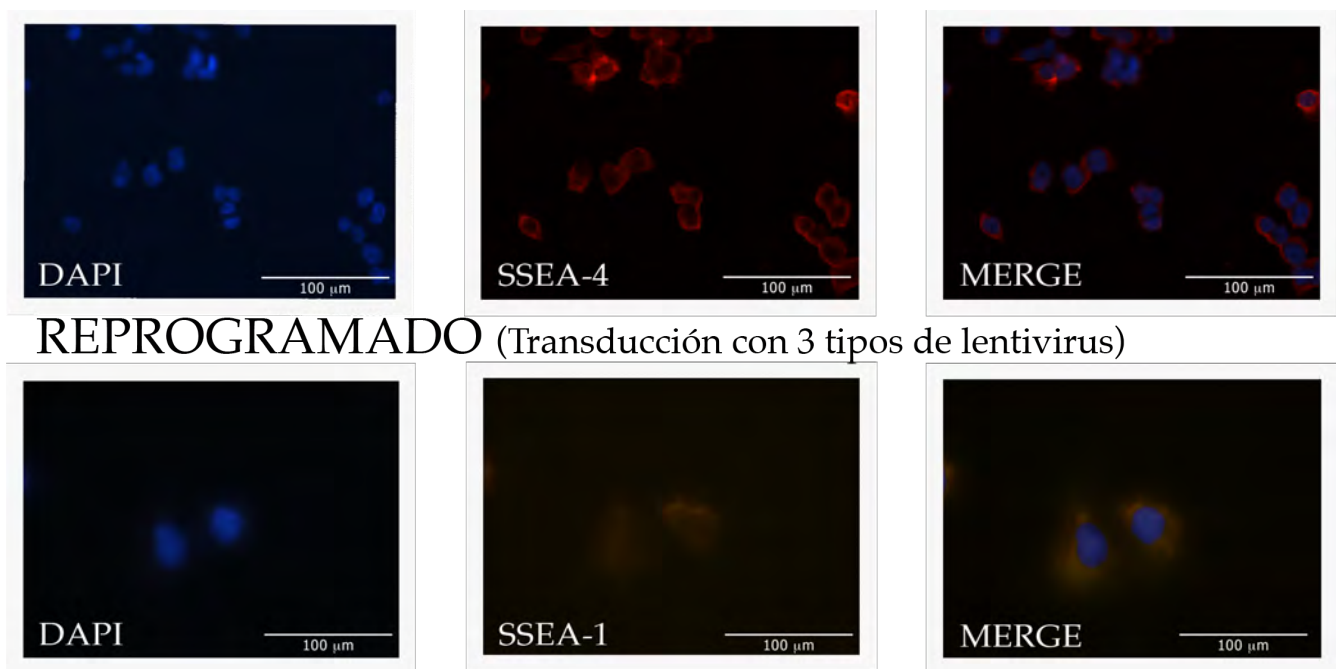


Figura 13 :Fotografías de inmunofluorescencia de fibroblastos infectados. Se observa la presencia de los marcadores de SSEA-1 y SSEA-4 , Anti-Human SSEA-1 y Alexa 594 Goat Anti-mouse IgM, Anti-Human SSEA-4 y Alexa 568 Goat Anti-mouse igG.

Los ensayos por inmunofluorescencia mostraron que los fibroblastos infectados con tres vectores lentivirales, han generado la capacidad de expresar marcadores de superficie característicos de ESC (SSEA-1, SSEA-4). Durante la prueba inicial la infección con lentivirus genera la expresión marcadores de ESC no inducidos, esto nos muestra un primer camino a seguir en el objetivo del proyecto que es HUVEC. Para poder confirmar la reprogramación de los fibroblastos infectados se requieren pruebas de la capacidad de generar células de las tres capas embrionarias mediante la formación de teratomas y diferenciación *in vitro*, así como la presencia de marcadores de superficie como *Oct 4*, *Sox 2*, *Nanog* *Tra-1-80*. En una primera parte del presente trabajo, obtenemos una excelente aportación, debido que la reprogramación con los factores antes mencionados en fibroblastos han sido altamente reportados y el tenerlos como un modelo nos ayuda a vislumbrar obstáculos técnicos que se presentaran en la inducción de HUVEC de la que no se tiene ningún reporte y se desconoce una metodología descrita a seguir. Por lo cual a partir de este punto solo nos enfocaremos a HUVEC.

7.5. HUVEC

7.5.1. Expresión Basal de los genes OCT4, Sox2, Nanog y Lin 28 en HUVEC

Cultivos de HUVEC alcanzan el 80% de confluencia en aproximadamente 12 días y presentan una población homogénea de células endoteliales. Con el fin de buscar la expresión de genes de interés, se procedió a evaluar si las células expresaban alguno de los genes que serán inducidos mediante el uso de vectores lentivirales para lo cual se buscó la amplificación de los mismos mediante RT-PCR en co-amplificación con GAPDH como control constitutivo. Se obtuvo solo la amplificación de GAPDH en las cuatro reacciones (**Figura 14**), lo que nos confirma que los genes de interés no se encuentran expresando basalmente en HUVEC.

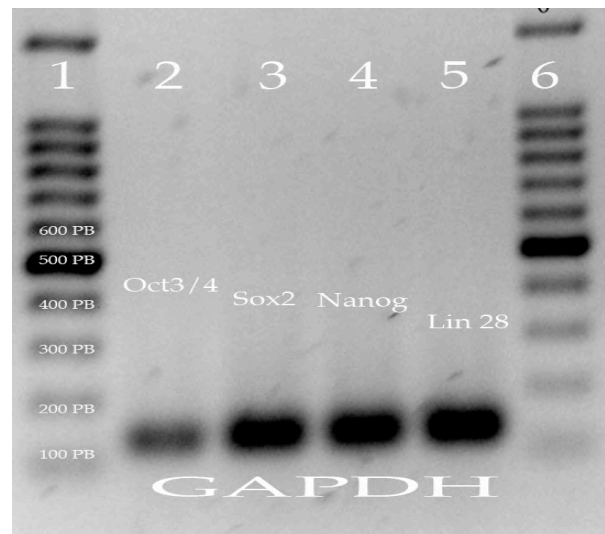


Figura 14: Expresión basal de HUVEC. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 en co-amplificación de GAPDH, a partir de RNA_{total} de HUVEC, se analizó 5 µl del volumen de reacción **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Fragmento de 153 pb correspondiente a la amplificación de GAPDH, OCT 4 no se encontró presencia del fragmento esperado de 486 pb. **3)** Fragmento de 153 pb correspondiente a la amplificación de GAPDH, Sox 2 no se encontró presencia del fragmento esperado de 591 pb. **4)** Fragmento de 153 pb correspondiente a la amplificación de GAPDH, no se encontró presencia del gen Nanog con un fragmento esperado de 596 pb. **5)** Fragmento de 153 pb correspondiente a la amplificación de GAPDH, no se encontró presencia de Lin 28 con un fragmento esperado de 486 pb. **6)** Marcador de peso molecular 100pb.

7.6. Infección de HUVEC con factores individuales OCT 4, Sox2, Nanog y Lin28

Demostrándose que cultivos de HUVEC no expresan dichos genes, se procedió a infectar HUVEC de forma individual con cada vector lentiviral que contenían los genes OCT 4, Sox2, Nanog y Lin28. Transcurrido 9 días de infección se evaluó la expresión de los genes OCT 4, Sox2, Nanog y Lin28 por condición de infección, se observó que en ningún caso se encontró expresión más que del gen correspondiente al lentivirus infectado, HUVEC + VOCT4 solo se observa la expresión de OCT4 (**Figura 15**), HUVEC + VSOX2 solo se observa la expresión de SOX2 (**Figura 16**), HUVEC + VNANOG solo se observa la expresión de NANOG (**Figura 17**) y HUVEC + LIN28 solo se observa la expresión de Lin28 (**Figura 18**).

7.6.1. Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Oct 4.

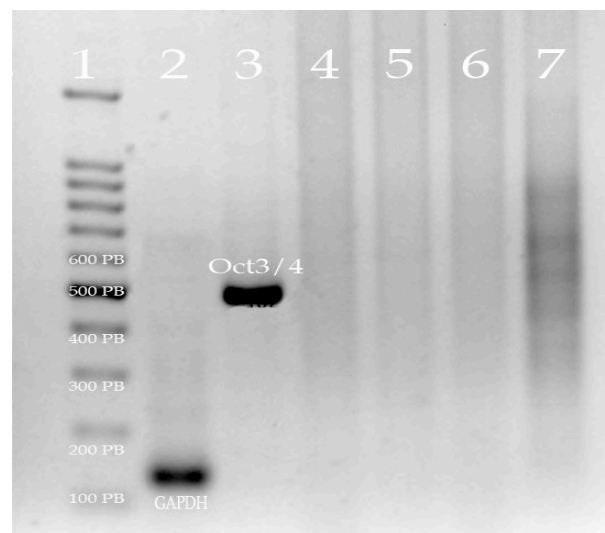


Figura 15: Análisis de expresión de HUVEC infectadas con virus OCT4. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNA_{total} de endotelio de cordón umbilical humano infectados con el lentivirus de Oct 4 **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Fragmento de 153 pb que corresponde a la amplificación de GAPDH como control constitutivo. **3)** Fragmento de 486 pb correspondiente a la amplificación gen OCT 4 mediante oligonucleótidos Marca R&D System **4)** Amplificación de Sox2 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 591 pb. **5)** Amplificación de Nanog no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 596 pb. **6)** Amplificación de Lin28 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 410 pb. **7)** Control sin RT **8)** Marcador de peso molecular 100pb.

7.6.2. Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus NANOG.

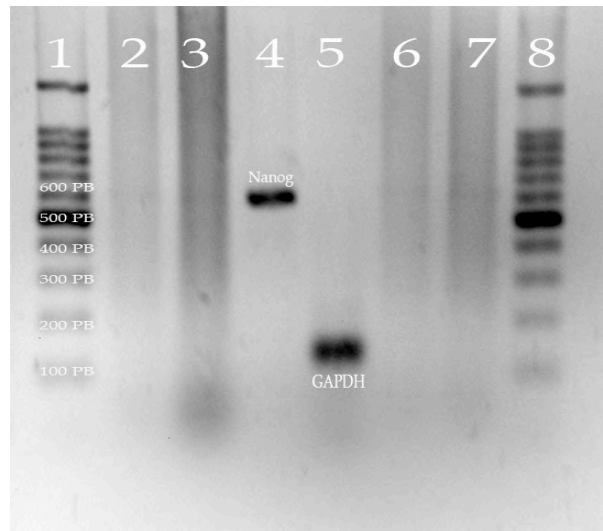


Figura 16: Análisis de expresión de HUVEC infectadas con virus NANOG. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNA total de endotelio de cordón umbilical humano infectados con el lentivirus de Nanog **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Amplificación de Sox2 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 591 pb. **3)** Amplificación de Oct 4 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 496 pb. **4)** Fragmento de 596 pb correspondiente a la amplificación del gen Nanog mediante oligonucleotidos Marca R&D System **5)** Fragmento de 153 pb que corresponde a la amplificación de GAPDH como control constitutivo.. **6)** Amplificación de Lin28 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 410 pb. **7)** Control sin RT **8)** Marcador de peso molecular 100pb

7.6.3. Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Sox 2.

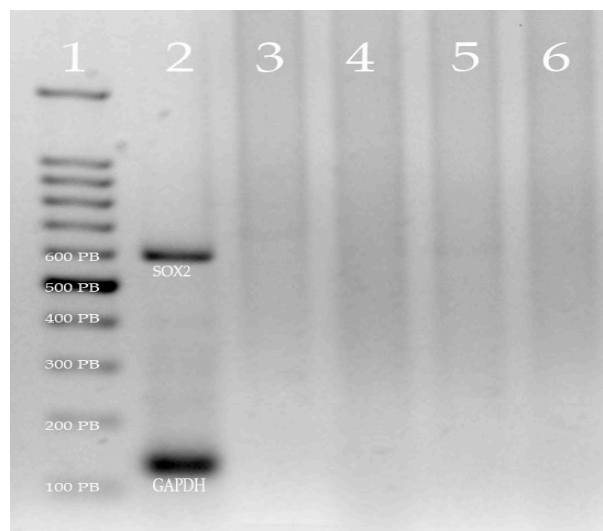
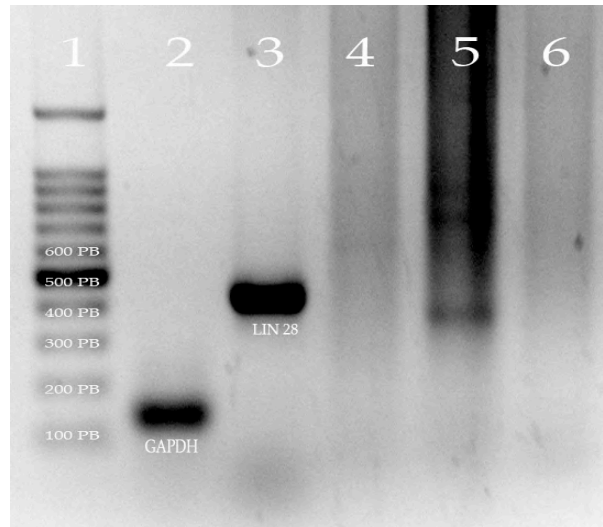


Figura 17: Análisis de expresión de HUVEC infectadas con virus Sox 2. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNA total de endotelio de cordón umbilical humano infectados con el lentivirus de Sox 2 **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Fragments de 591 pb y 186 pb correspondiente a la amplificación de Sox2, GAPDH como control constitutivo. **3)** Reacción sin RT como control. **4)** Amplificación de Sox2 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 591 pb. **5)** Amplificación de Nanog no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 596 pb. **6)** Amplificación de Lin28 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 410 pb.

7.6.4. Evaluación de la expresión HUVEC infectadas con lentivirus Lin 28.



Fotografía 18: Análisis de expresión de HUVEC infectadas con virus Lin 28. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNA total de fibroblastos de cordón umbilical humano infectados con el lentivirus de Lin 28 **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Fragmento de 153 pb que corresponde a la amplificación de GAPDH como control constitutivo. **3).** Fragmento de 410 pb correspondiente a la amplificación del gen Lin 28 mediante oligonucleodos reportados con anterioridad. **4)** Amplificación de Sox2 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 591 pb. **5)** Amplificación de Nanog no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 596 pb. **6)** Amplificación de OCT 4 no se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 486 pb.

Este experimento nos permitió demostrar que no se encontraba ninguna limitación con ninguno de los vectores lentivirales al ser infectados en cultivo de HUVEC y con solo 2 ml de sobrenadante de vector lentiviral eran suficiente para lograr la expresión del gen, a su vez se evaluó la expresión en forma cualitativa de los genes que son factores de pluripotencialidad (Oct 4, Sox2, Nanog y Lin28) en todos los casos, esto con el fin de tener algún dato que nos indicara que la expresión de estos genes endógenos esta siendo activada por la expresión de alguno de los genes exógenos. No se obtuvo evidencia de esto, por lo que proseguimos a realizar la infección con los 4 vectores lentivirales. Se observó que HUVEC infectadas se dirigían a un proceso de senescencia y apoptosis con excepción de la infección de OCT 4, presentaba un retraso en características de senescencia celular en comparación con el control y los demás cultivos infectados, a pesar de esto no fue posible continuar con la propagación de dicho cultivo. Se prosiguió a realizar la infección de HUVEC con 4 vectores.

7.7. Cambios morfológicos en HUVEC Infectadas con cuatro factores.

Se realizó la infección con 2 ml de sobrenadante de cada lentivirus y completado con Medio 199 a un volumen de 10 ml, el proceso de infección fue de 48 horas. Posteriormente se realizaron pruebas con diferentes combinaciones de medio, determinamos que el periodo de 7 a 9 días pos-infección el medio *DMEM/F12* conservaba mejor viabilidad celular. Transcurrido este tiempo se observaron cambios de morfología y HUVEC infectadas fueron transferidas a medio mTeSR1, donde en el día 12 post-infección se realizó la extracción de RNA (**Figura 19**). Se mantuvieron en propagación hasta el día 21 para posteriores análisis.

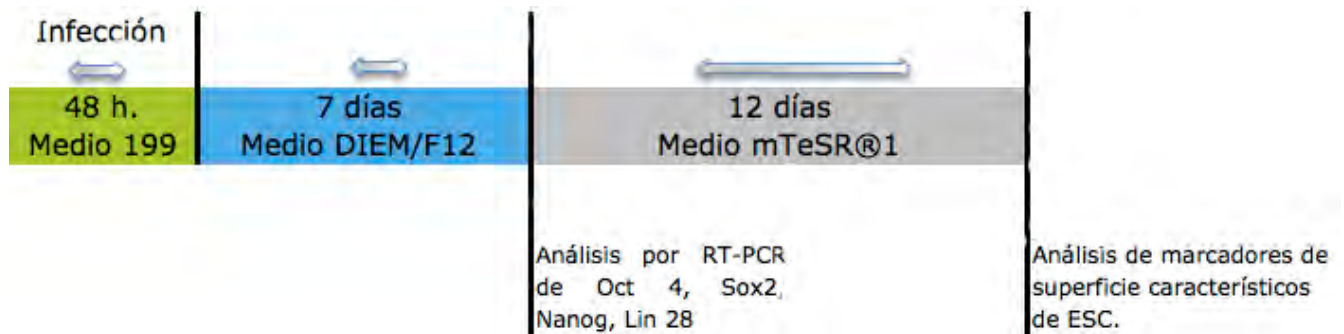
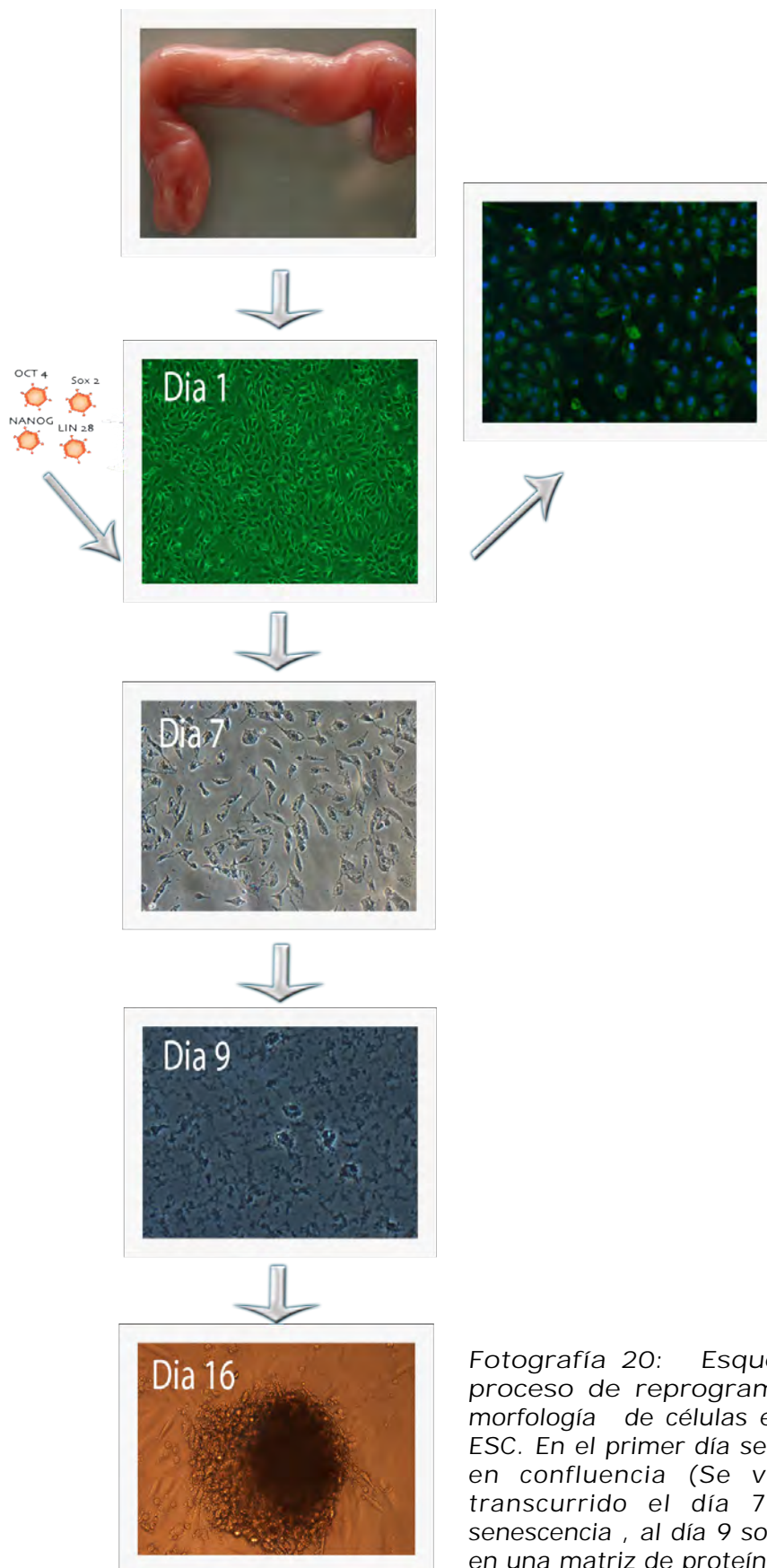


Figura 19. Cronograma del proceso de reprogramación en HUVEC Protocolo realizado para transferencia de 4 vectores lentivirales a HUVEC y condiciones que generarían la presencia de marcadores de ESC. Se muestra los tiempos en que fueron realizados los análisis de RT-PCR e inmunofluorescencia, así como las condiciones de medio utilizadas durante el protocolo.

Durante el proceso de reprogramación se determinaron tiempos y tipos de medio utilizados durante la infección, con base en lo reportado en bibliografía y principal mediante los cambios de morfología observados (**Figura 20**), los cuales han sido de suma importancia para realizar dichas determinaciones. Después de observar los cambios de morfología se realizaron análisis de expresión de los genes de interés así como presencia de marcadores de pluripotencialidad.



Fotografía 20: Esquema cambios morfológicos del proceso de reprogramación. Se observa el cambio de morfología de células endoteliales a colonias parecidas a ESC. En el primer día se presenta una población de HUVEC en confluencia (Se verificó la presencia del WVF), transcurrido el día 7 se presenta un estado de senescencia, al día 9 son transferidas a medio **mTeSR™1** en una matriz de proteínas derivadas de sarcoma de ratón.

7.7.1. Evaluación de la expresión de HUVEC infectadas con 4 factores lentivirales.

Se analizó la expresión de los genes OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 mediante RT-PCR, se encontró que los cuatro genes se encontraban expresando (**Figura 21**), esto se realizó en el día 12 postinfección por lo que esta expresión es exógena derivada de la infección lentiviral. La presencia de dichos genes muestra que las células se encuentran en el proceso de reprogramación.

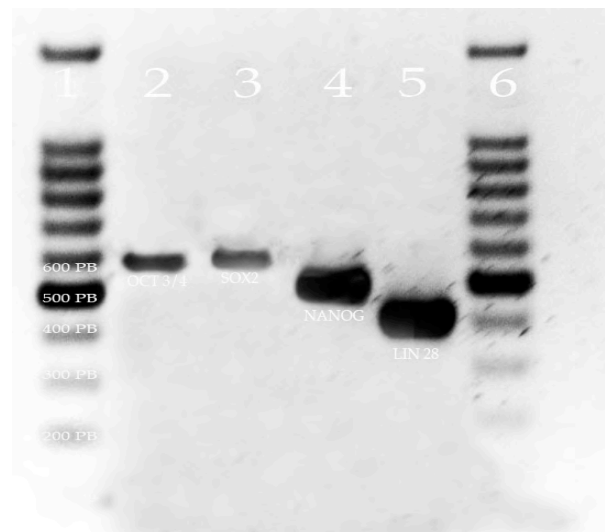


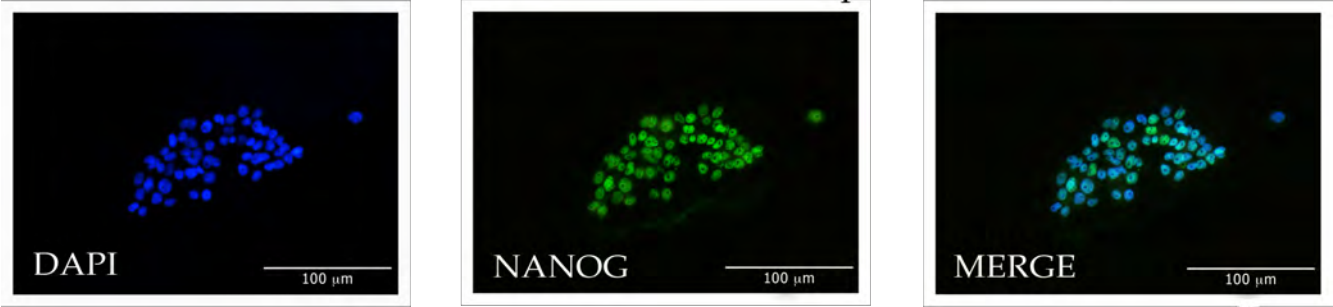
Figura 21: Expresión de genes inducidos por vectores lentivirales en HUVEC. Fotografía del gel de agarosa al 1.5% teñida con bromuro de etidio donde se evaluó la expresión de los genes Oct 4, Sox 2, Nanog y Lin 28 a partir de RNA total de fibroblastos de cordón umbilical humano infectados con el lentivirus de Oct 4 **1)** Marcador de peso molecular 100 pb, **2)** Amplificación de Sox2 se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 591 pb. **3)** Amplificación de Nanog se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 596 pb. **4)** Fragmento de 486 pb correspondiente Oct 4 a la amplificación mediante oligonucleotidos Marca R&D System **5)** Amplificación de Lin28 se encontró amplificación específica contra el fragmento esperado de 410 pb. **6)** Marcador de peso molecular 100pb.

Confirmando la expresión de los genes inducidos, las células fueron cultivadas en condiciones de ESC. A partir del día 12 post-infección se observó la presencia de las primeras colonias con morfología de similar a ESC (**Figura 20**) las colonias se propagaron hasta el día 21 donde se procedió a realizar ensayos de inmunofluorescencia contra marcadores de ESC.

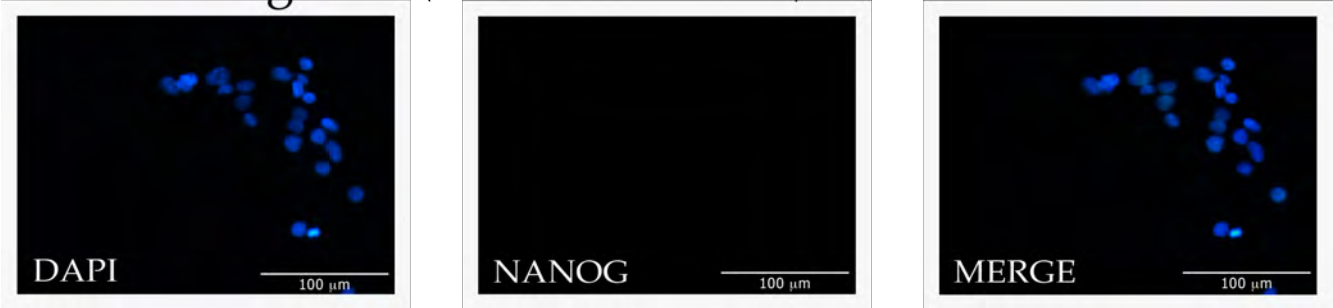
7.7.2. Presencia de marcadores de pluripotencialidad en HUVEC Infectadas

Se realizaron ensayos contra marcadores característicos de ESC en HUVEC infectadas con 4 lentivirus y controles negativos en HUVEC sin infectar, se encontró la presencia de OCT4, NANOG, SSEA-1, SSEA-4, TRA-1-81 (Figura 22) al realizar la infección con 4 vectores lentivirales.

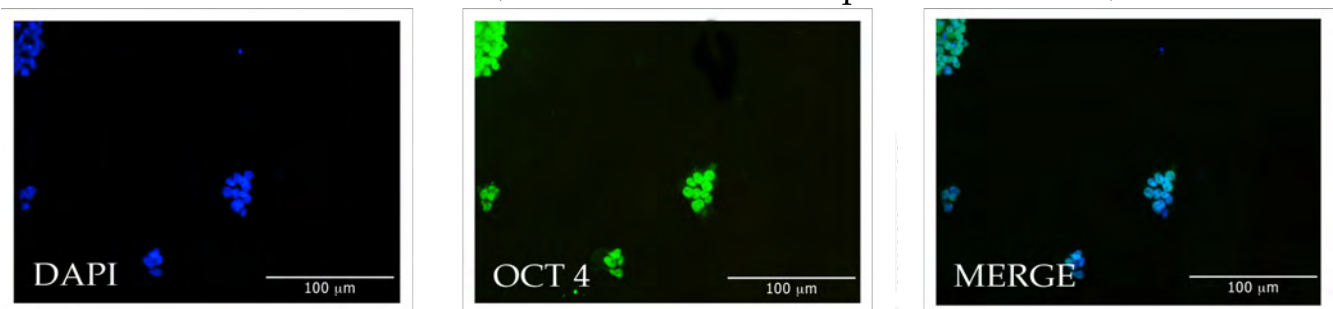
REPROGRAMADO (Transducción con 4 tipos de lentivirus)



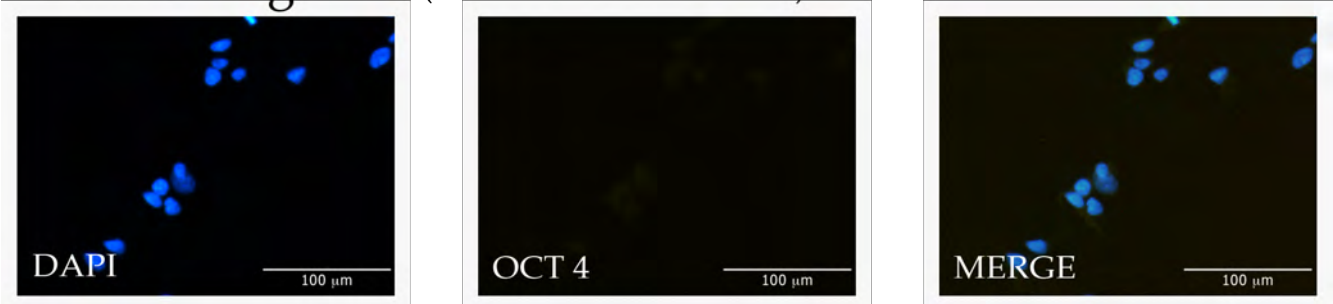
Control negativo (HUVEC sin transducir)



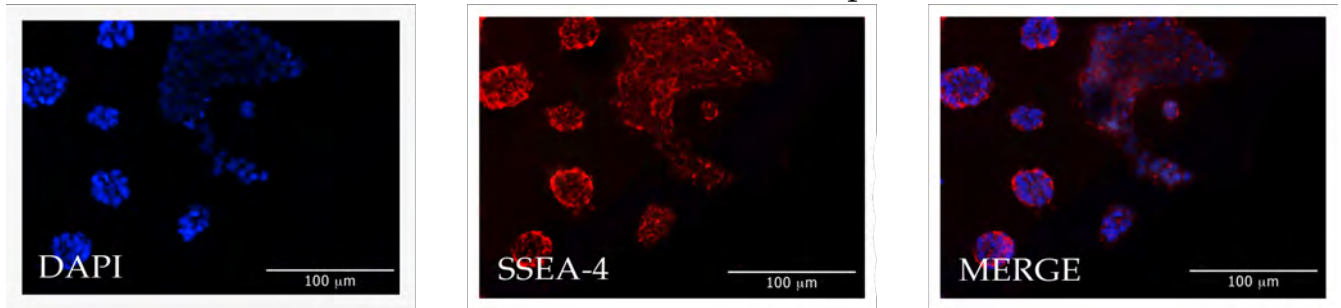
REPROGRAMADO (Transducción con 4 tipos de lentivirus)



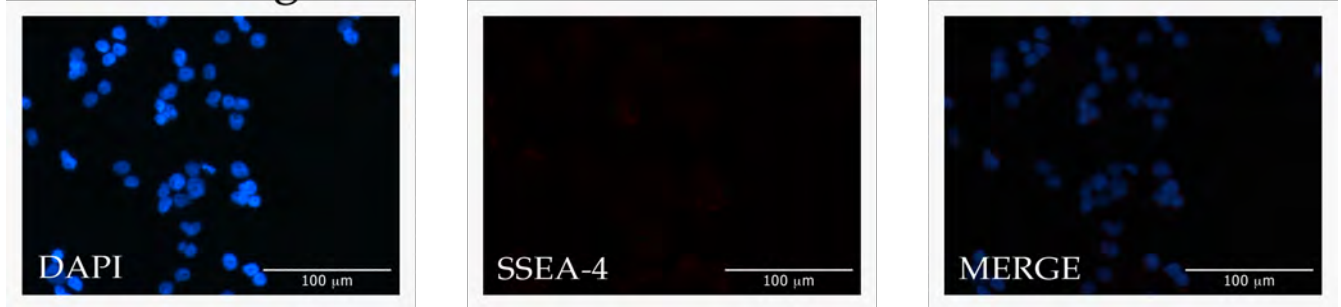
Control negativo (HUVEC sin transducir)



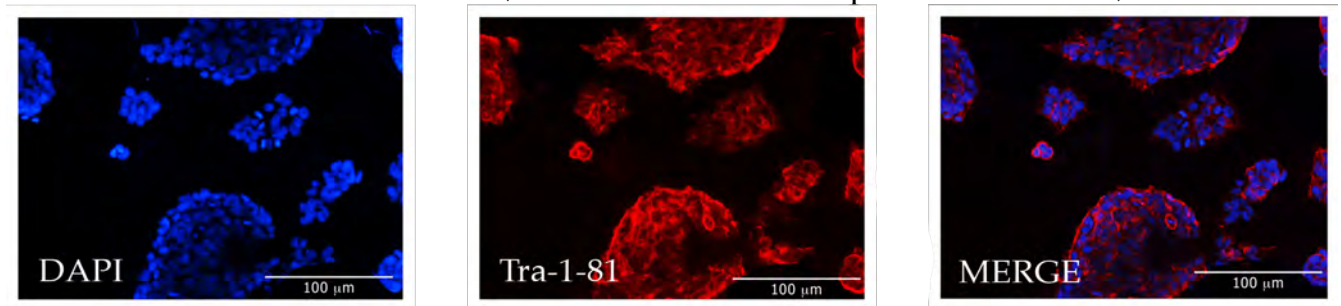
REPROGRAMADO (Transducción con 4 tipos de lentivirus)



Control negativo (HUVEC sin transducir)



REPROGRAMADO (Transducción con 4 tipos de lentivirus)



Control negativo (HUVEC sin transducir)

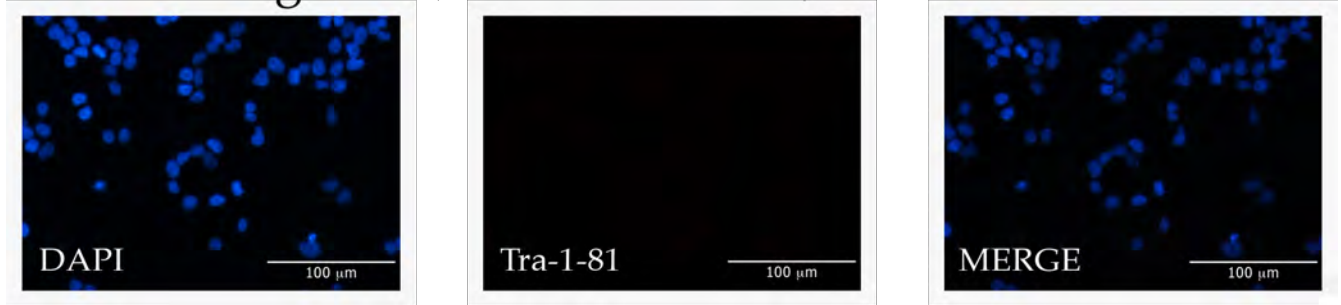


Figura 22: Células HUVEC 21 días post-infección presentan expresión de marcadores de ESC . Los núcleos fueron marcados con 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Oct 4, Nanog, SSEA-1, SSEA-4 y Tra-1-81. Se realizaron los análisis por separado de cada marcador , así como controles negativos con HUVEC en todos los casos. Todas las imágenes presentan un aumento de 20x.

Los análisis de inmunofluorescencia mostraron la presencia de marcadores (**Figura 22**) de ECS. La proteína de Oct 4 se detectó mediante Anti-Human OCT 4 y Alexa 488 Donkey Anti-Goat IgG, se encontró presente en el núcleo y localiza en el núcleo teñido con DAPI. En el control solo se observa DAPI. La proteína NANOG se detectó mediante Anti-Human NANOG y Alexa 488 Donkey Anti-Goat IgG, presentando localización en el núcleo. Los marcadores de superficie SSEA-1, SSEA-4 y TRA-1-81 se detectaron mediante sus anticuerpos correspondientes (Anti-Human SEAA-4 y Alexa 568 Donkey Anti-Mouse IgG, Anti-Human SEAA-1 y Alexa 594 Donkey Anti-Mouse IgG, Anti-Human Tra-1-81 y Alexa 488 Goat Anti-Mouse Ig) la presencia de los mismos fue detectada en HUVEC 21 días post-infección, se realizaron controles negativos con HUVEC donde no se observó la presencia de dichos marcadores. En este punto se determinó la capacidad de HUVEC de expresar marcadores de ESC, 21 días post-infección. Con la obtención de este resultado se obtuvo un protocolo que permite llevar a HUVEC a la expresión de marcadores de ESC y el inicio del camino de iPS.

8.DISCUSIÓN

Con los resultados obtenidos anteriormente sobre cultivos de fibroblastos que son un tipo de células reportado (Lowry, Richter et al. 2008), hemos observado que tres vectores lentivirales son capaces generar cambio de morfología (Figura 9, 10), expresión de los marcadores a nivel de mensajero (Figura 11) y expresión de algunos marcadores de superficie propios de ESC como SSEA-4 y SSEA-1 (Figura 13, 14) (Park, Zhao et al. 2008) a pesar de ésto no podemos con confirmar la obtención de células iPS sino hasta propagar las células en condiciones (Medio, Matrigel y fibroblastos embrionarios de ratón MEF), propagación como ESC y verificar su capacidad de diferenciarse en las tres capas embrionarias. Los fibroblastos de cordón umbilical solo se han tomado como un modelo con el fin de tener una experiencia propia en el camino de la reprogramación.

En cultivos HUVEC nos hemos encontrado sin antecedentes previos, por lo que empezar desde la generación del cultivo fue indispensable, esto a permito generar un método y saltar obstáculos que se presentaron durante el desarrollo de la metodología generada para evaluar la expresión de los genes inducidos e iniciar la obtención de iPS.

Los cultivos de HUVEC presentaron cierta limitación durante el proceso de reprogramacion:

- A) La obtención de células individuo específico tiene como limitante la calidad de la muestra, en tamaño que pueda ser recolectada y la baja capacidad de propagación que presenta este tipo de células, lo cual nos llevó a realizar cultivos a partir de muestras de varios individuos, lo que presenta una limitante en obtener iPS-individuo específico, mas no se descarta que este obstáculo pueda ser superando realizando un estableciendo mas minucioso de criterios en la recolección y tratado de las muestra.

- B) Las condiciones que requiere este cultivo para su propagación, hacen que el cambio de medio sea un factor muy importante a tener en cuenta durante el paso de infección del cultivo, debido a que como en numerosos artículos se reporta con solo el sobrenadante se puede lograr la reprogramación (Nakagawa, Koyanagi et al. 2008) (Yu, Vodyanik et al. 2007; Park, Zhao et al. 2008). En nuestro caso, el volumen requerido provoca que el medio de infección contenga en su gran mayoría DMEM (Medio en el cual se producen la partículas virales en células 293T), esto afecta las condiciones del cultivo de las células

HUVEC durante el proceso de infección. La expresión de los genes exógenos empieza dentro de las 48 horas post-infección, las células pueden no estar desarrollando las condiciones en este tiempo para superar el cambio de medio de la infección y como se ha reportado recientemente mediante el uso de promotores inducibles la expresión de los genes endógenos no comienza sino hasta los 10 a 12 días post infección. (Hockemeyer, Soldner et al. 2008) (Brambrink, Foreman et al. 2008). El considerar complementar la suspensión viral con Medio 199 nos permitió superar este obstáculo. Dentro de la literatura se ha reportado métodos para concentrar el vector lentiviral, como la concentración por ultracentrifugación el problema que esto genera es la acumulación de partículas tóxicas para los cultivos de HUVEC, que resulta perjudicial debido a la sensibilidad del cultivo a cambios de medio (Geraerts, Willems et al. 2006; Tiscornia, Singer et al. 2006; Kutner, Zhang et al. 2009). Otra estrategia planteada es la precipitación mediante PEG 6000 (*Punto 6.8 Concentraron de partículas virales PEG 6000*) (Tiscornia, Singer et al. 2006) esto logra obtener una alta concentración de partículas virales que en cuestión es favorable para evitar el cambio de medio y elaborar un medio de infección a partir de Medio 199, pero no alcanzamos a lograr reprogramación, lo cual puede ser atribuido a que durante el proceso de precipitación se pierda la capacidad infecciosa del virus. La precipitación por dicho método resultó ser favorable para comprobar la presencia del virus en sobrenadante y lograr extraer RNA del concentrado de partículas virales.

C) Con lo mostrado en experimentos anteriores (*Figura 20*) se mostró que es posible infectar 4 vectores lentivirales en HUVEC en forma individual, debido a que al realizar la extracción de RNA a los 9 días post infección se muestra que pueden ser expresados a nivel de mensajero obteniendo la amplificación mediante RT-PCR de las bandas correspondientes a cada uno de los genes insertados mediante partículas virales. La expresión corresponde a los tiempos señalados de expresión de genes exógenos, en este momento no es posible identificar la variación entre la expresión de los genes endógenos y exógenos, salvo el uso de promotores inducibles (Brambrink, Foreman et al. 2008).

D) La evaluación de la expresión a nivel de mensajero sobre el cultivo de HUVEC infectados con 4 partículas virales; se puede estar presentando el caso en el que se encuentren células que no presenten la inserción de los 4 genes debido a que como se reporta Yu. y col. es posible obtener colonias iPS que no expresan el gen Lin28, este punto podrá ser analizado con mayor precisión realizando la clonación y propagación de colonias en forma individual y comparando la expresión entre las mismas (Yu, Vodyanik et al. 2007). Se reportó en trabajos posteriores que solo Sox2 y OCT4 son indispensables para la reprogramación, tomando en cuenta que utilizan desinhibidores de histonas como el VPA (Huangfu, Osafune et al. 2008). La expresión de los genes Oct 4, Sox2, Nanog y lin28 nos mostró la presencia de los primeros marcadores de pluripotencialidad. HUVEC se realizaron ensayos de inmunofluorescencia (Oct 4 y Nanog), lo que mostró la expresión de no solo marcadores inducidos sino la expresión de marcadores de superficie no inducidos como SSEA-1, SSEA-4 y Tra-1-81 que son utilizados como marcador de ESC (Carey, Markoulaki et al. 2009).

E) La presencia de marcadores de superficie no inducidos (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, Tra-1-81) ha sido un punto primordialmente evaluado para comprobar la generación de iPS (Lowry, Richter et al. 2008; Nakagawa, Koyanagi et al. 2008; Park, Lerou et al. 2008; Carey, Markoulaki et al. 2009; Ebert, Yu et al. 2009) (Maherali, Sridharan et al. 2007; Meissner, Wernig et al. 2007; Okita, Ichisaka et al. 2007; Hockemeyer, Soldner et al. 2008; Lowry, Richter et al. 2008), así como de marcadores inducidos (Oct4, Sox2, Nanog) por lo que se analizaron en células HUVEC reprogramadas a los 21 días post-infección, se realizó la evaluación de algunos de estos marcadores con el uso de anticuerpos específicos como lo fueron SSEA-1, SSEA-4, Nanog, Tra-1-81 y Oct4 (*Figura 21*), se encontró que estos cultivos son capaces de mostrar la expresión de marcadores tanto inducidos como no inducidos, lo cual da un indicio de que dentro de las poblaciones de HUVEC reprogramadas tenemos células que fueron infectadas con cuatro genes lo cual desencadenó la expresión de marcadores no inducidos de superficie propios de ES.

La generación de iPS a partir de HUVEC es una posibilidad a corto plazo, continuar con pruebas que den la certeza de afirmar la obtención de células iPS son indispensables, como lo son la clonación y propagación de colonias, la evaluación de las mismas a nivel de mensajero y proteína con todos los marcadores característicos de ESC. La inserción de HUVEC reprogramadas en ratones inmunodeficientes deberá provocar la formación de teratomas, los cuales deberán contener células derivadas de las tres capas embrionarias, (endodermo, mesodermo y ectodermo), lo que probará la presencia de pluripotencialidad en HUVEC reprogramadas. La idea de generar iPS partiendo de HUVEC individuo específico podrá presentar una opción para tratamientos en medicina regenerativa cuando otras fuentes de células no sean viables, esto aunado a métodos de generación de células iPs sin el uso de lentivirus, como el uso de vectores policistrónicos (Carey, Markoulaki et al. 2009) y con el uso de proteínas recombinantes(Zhou, Wu et al. 2009) prometen un futuro prominente en dicha tecnología.

9.CONCLUSION

- Las células endoteliales de cordón umbilical humano son un modelo en el cual es posible la infección de 4 vectores lentivirales y son capaces de generar la expresión de marcadores de ESC.
- Es posible la transferencia de los genes Oct 4, Sox2, Nanog en fibroblastos de cordón, así como la expresión de los mismos, los cuales generan la presencia de marcadores embrionarios SSEA-1, SSEA-4.
- Se realizó la reprogramación en ambos modelos, la expresión de los genes exógenos y la expresión de marcadores de pluripotencialidad aunque no se puede confirmar la obtención de iPS, debido a que se requiere de análisis complementarios.
- HUVEC es un modelo individuo específico con el cual es posible generar iPS

10. PERSPECTIVAS

- Generar una línea celular de iPS HUVEC.
- HUVEC podría en un futuro ser una fuente de células individuo específico, con el cual se podrían generar terapias de medicina regenerativa.
- Realizar análisis de su capacidad de diferenciación, la presencia de APF, propagación inmortal, formación de cuerpos embrionarios así como la formación de teratomas nos confirmarían la obtención de células iPS

11.Referencias

- Alison, M. R., R. Poulson, et al. (2000). "Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells." Nature **406**(6793): 257.
- Alvarez-Buylla, A., B. Seri, et al. (2002). "Identification of neural stem cells in the adult vertebrate brain." Brain Res Bull **57**(6): 751-8.
- Amit, M., M. K. Carpenter, et al. (2000). "Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture." Dev Biol **227**(2): 271-8.
- Austriaco, N. P. (2006). "The moral case for ANT-derived pluripotent stem cell lines." Natl Cathol Bioeth Q **6**(3): 517-37.
- Avilion, A. A., S. K. Nicolis, et al. (2003). "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function." Genes Dev **17**(1): 126-40.
- Barthomeuf, C., D. Boivin, et al. (2004). "Inhibition of HUVEC tubulogenesis by hederacolchiside-A1 is associated with plasma membrane cholesterol sequestration and activation of the Ha-Ras/MEK/ERK cascade." Cancer Chemother Pharmacol **54** (5): 432-40.
- Blelloch, R. (2008). "Regenerative medicine: short cut to cell replacement." Nature **455**(7213): 604-5.
- Blelloch, R., M. Venere, et al. (2007). "Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection." Cell Stem Cell **1**(3): 245-7.
- Brambrink, T., R. Foreman, et al. (2008). "Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells." Cell Stem Cell **2**(2): 151-9.
- Briggs, R. and T. J. King (1952). "Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs." Proc Natl Acad Sci U S A **38**(5): 455-63.
- Bromhall, J. D. (1975). "Nuclear transplantation in the rabbit egg." Nature **258**(5537): 719-22.
- Cajero-Juarez, M., B. Avila, et al. (2002). "Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium." Eur J Cell Biol **81**(1): 1-8.
- Carey, B. W., S. Markoulaki, et al. (2009). "Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(1): 157-62.
- Cattaneo, E. and R. McKay (1990). "Proliferation and differentiation of neuronal stem cells regulated by nerve growth factor." Nature **347**(6295): 762-5.
- Chambers, I., D. Colby, et al. (2003). "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells." Cell **113**(5): 643-55.
- Chambers, I., J. Silva, et al. (2007). "Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development." Nature **450**(7173): 1230-4.
- Choi, D., H. J. Oh, et al. (2002). "In vivo differentiation of mouse embryonic stem cells into hepatocytes." Cell Transplant **11**(4): 359-68.
- Cowan, C. A., J. Atienza, et al. (2005). "Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells." Science **309**(5739): 1369-73.
- Darr, H. and N. Benvenisty (2009). "Genetic analysis of the role of the reprogramming gene LIN-28 in human embryonic stem cells." Stem Cells **27**(2): 352-62.
- Dvash, T., Y. Mayshar, et al. (2004). "Temporal gene expression during differentiation of human embryonic stem cells and embryoid bodies." Hum Reprod **19**(12): 2875-83.
- Ebert, A. D., J. Yu, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient." Nature **457**(7227): 277-80.
- Forbes, S., P. Vig, et al. (2002). "Hepatic stem cells." J Pathol **197**(4): 510-8.

- Forbes, S. J., R. Poulson, et al. (2002). "Hepatic and renal differentiation from blood-borne stem cells." Gene Ther **9**(10): 625-30.
- Foster, K. W., Z. Liu, et al. (2005). "Induction of KLF4 in basal keratinocytes blocks the proliferation-differentiation switch and initiates squamous epithelial dysplasia." Oncogene **24**(9): 1491-500.
- Furfaro, E. M. and M. A. Gaballa (2007). "Do adult stem cells ameliorate the damaged myocardium? Human cord blood as a potential source of stem cells." Curr Vasc Pharmacol **5**(1): 27-44.
- Galli, R., A. Gritti, et al. (2003). "Neural stem cells: an overview." Circ Res **92**(6): 598-608.
- Garcia-Verdugo, J. M., F. Doetsch, et al. (1998). "Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells." J Neurobiol **36**(2): 234-48.
- Geraerts, M., S. Willems, et al. (2006). "Comparison of lentiviral vector titration methods." BMC Biotechnol **6**: 34.
- Gurdon, J. B. (1962). "Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells." Dev Biol **4**: 256-73.
- Gurdon, J. B. (1966). "The cytoplasmic control of gene activity." Endeavour **25**(95): 95-9.
- Gurdon, J. B. and V. Uehlinger (1966). "'Fertile' intestine nuclei." Nature **210**(5042): 1240-1.
- Harris, D. T., M. Badowski, et al. (2007). "The potential of cord blood stem cells for use in regenerative medicine." Expert Opin Biol Ther **7**(9): 1311-22.
- Hatano, S. Y., M. Tada, et al. (2005). "Pluripotential competence of cells associated with Nanog activity." Mech Dev **122**(1): 67-79.
- Hochedlinger, K. and K. Plath (2009). "Epigenetic reprogramming and induced pluripotency." Development **136**(4): 509-23.
- Hockemeyer, D., F. Soldner, et al. (2008). "A drug-inducible system for direct reprogramming of human somatic cells to pluripotency." Cell Stem Cell **3**(3): 346-53.
- Huangfu, D., K. Osafune, et al. (2008). "Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2." Nat Biotechnol **26**(11): 1269-75.
- Hwang, H. S., Y. S. Maeng, et al. (2008). "Nestin expression during differentiation of fetal endothelial progenitor cells and hypoxic culture of human umbilical vein endothelial cells." Acta Obstet Gynecol Scand **87**(6): 643-51.
- Ivanova, N., R. Dobrin, et al. (2006). "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference." Nature **442**(7102): 533-8.
- Iwai, M., K. Sato, et al. (2002). "Three steps of neural stem cells development in gerbil dentate gyrus after transient ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **22**(4): 411-9.
- Jaffe, E. A. (1980). "Culture of human endothelial cells." Transplant Proc **12**(3 Suppl 1): 49-53.
- Jiang, Z. Y., Y. J. Yuan, et al. (2006). "[Research progress on human embryonic stem cell lines]." Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban **35**(1): 108-12.
- Katz, J. P., N. Perreault, et al. (2005). "Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach." Gastroenterology **128**(4): 935-45.
- Kennea, N. L. and H. Mehmet (2002). "Neural stem cells." J Pathol **197**(4): 536-50.
- Kennea, N. L. and H. Mehmet (2002). "Transdifferentiation of neural stem cells, or not?" Pediatr Res **52**(3): 320-1.
- King, T. J. and R. Briggs (1956). "Serial transplantation of embryonic nuclei." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **21**: 271-90.
- Klimanskaya, I., Y. Chung, et al. (2006). "Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres." Nature **444**(7118): 481-5.

- Koopman, P., G. Schepers, et al. (2004). "Origin and diversity of the SOX transcription factor gene family: genome-wide analysis in *Fugu rubripes*." *Gene* **328**: 177-86.
- Kutner, R. H., X. Y. Zhang, et al. (2009). "Production, concentration and titration of pseudotyped HIV-1-based lentiviral vectors." *Nat Protoc* **4**(4): 495-505.
- Laywell, E. D., P. Rakic, et al. (2000). "Identification of a multipotent astrocytic stem cell in the immature and adult mouse brain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(25): 13883-8.
- Lee, O. K., T. K. Kuo, et al. (2004). "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." *Blood* **103**(5): 1669-75.
- Lois, C. and A. Alvarez-Buylla (1993). "Proliferating subventricular zone cells in the adult mammalian forebrain can differentiate into neurons and glia." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(5): 2074-7.
- Lowry, W. E., L. Richter, et al. (2008). "Generation of human induced pluripotent stem cells from dermal fibroblasts." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(8): 2883-8.
- Maherali, N., R. Sridharan, et al. (2007). "Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution." *Cell Stem Cell* **1**(1): 55-70.
- Marshall, V. S., J. Kalishman, et al. (1997). "Nonsurgical embryo transfer in the common marmoset monkey." *J Med Primatol* **26**(5): 241-7.
- Mason, C. and P. Dunnill (2008). "A brief definition of regenerative medicine." *Regen Med* **3**(1): 1-5.
- Matoba, R., H. Niwa, et al. (2006). "Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling." *PLoS ONE* **1**: e26.
- Matsui, Y., K. Zsebo, et al. (1992). "Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture." *Cell* **70**(5): 841-7.
- Mayani, H. and P. M. Lansdorp (1998). "Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells." *Stem Cells* **16**(3): 153-65.
- McGrath, J. and D. Solter (1983). "Nuclear transplantation in mouse embryos." *J Exp Zool* **228**(2): 355-62.
- McGrath, J. and D. Solter (1983). "Nuclear transplantation in the mouse embryo by microsurgery and cell fusion." *Science* **220**(4603): 1300-2.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." *Science* **276**(5309): 66-71.
- Meissner, A., M. Wernig, et al. (2007). "Direct reprogramming of genetically unmodified fibroblasts into pluripotent stem cells." *Nat Biotechnol* **25**(10): 1177-81.
- Michalopoulos, G. K. (1990). "Liver regeneration: molecular mechanisms of growth control." *FASEB J* **4**(2): 176-87.
- Miller, R. A. and F. H. Ruddle (1976). "Pluripotent teratocarcinoma-thymus somatic cell hybrids." *Cell* **9**(1): 45-55.
- Mitsui, K., Y. Tokuzawa, et al. (2003). "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells." *Cell* **113**(5): 631-42.
- Miyashita, H., A. Suzuki, et al. (2002). "Evidence for hepatocyte differentiation from embryonic stem cells in vitro." *Cell Transplant* **11**(5): 429-34.
- Nakagawa, M., M. Koyanagi, et al. (2008). "Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts." *Nat Biotechnol* **26**(1): 101-6.
- Nakashima, K., M. Yanagisawa, et al. (1999). "Synergistic signaling in fetal brain by STAT3-Smad1 complex bridged by p300." *Science* **284**(5413): 479-82.
- Nakatake, Y., N. Fukui, et al. (2006). "Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells." *Mol Cell Biol* **26**(20): 7772-82.
- Nichols, J., B. Zevnik, et al. (1998). "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4." *Cell* **95**(3): 379-91.

- Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-6.
- O'Brien, T. and F. P. Barry (2009). "Stem cell therapy and regenerative medicine." Mayo Clin Proc **84**(10): 859-61.
- Okamoto, K., H. Okazawa, et al. (1990). "A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells." Cell **60**(3): 461-72.
- Okano, H. (2002). "Stem cell biology of the central nervous system." J Neurosci Res **69**(6): 698-707.
- Okita, K., T. Ichisaka, et al. (2007). "Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells." Nature **448**(7151): 313-7.
- Ourednik, J., V. Ourednik, et al. (2001). "Ectopic expression of the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes leads to changes in the development of the corticospinal tract." Eur J Neurosci **14**(9): 1464-74.
- Ourednik, V., J. Ourednik, et al. (2001). "Segregation of human neural stem cells in the developing primate forebrain." Science **293**(5536): 1820-4.
- Ozaki, K., T. Yoshida, et al. (1996). "Use of von Willebrand factor promoter to transduce suicidal gene to human endothelial cells, HUVEC." Hum Gene Ther **7**(13): 1483-90.
- Parati, E. A., S. Pozzi, et al. (2004). "Neural stem cells: an overview." J Endocrinol Invest **27**(6 Suppl): 64-7.
- Park, I. H., P. H. Lerou, et al. (2008). "Generation of human-induced pluripotent stem cells." Nat Protoc **3**(7): 1180-6.
- Park, I. H., R. Zhao, et al. (2008). "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors." Nature **451**(7175): 141-6.
- Pera, M. F., B. Reubinoff, et al. (2000). "Human embryonic stem cells." J Cell Sci **113** (Pt 1): 5-10.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.
- Ratajczak, P., A. Desveaux, et al. (2007). "Alveolar hemorrhage and acute graft-versus-host disease." Biol Blood Marrow Transplant **13**(10): 1244-5.
- Reinisch, A., C. Bartmann, et al. (2007). "Humanized system to propagate cord blood-derived multipotent mesenchymal stromal cells for clinical application." Regen Med **2**(4): 371-82.
- Revazova, E. S., N. A. Turovets, et al. (2007). "Patient-specific stem cell lines derived from human parthenogenetic blastocysts." Cloning Stem Cells **9**(3): 432-49.
- Reynolds, B. A. and S. Weiss (1992). "Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system." Science **255**(5052): 1707-10.
- Rietze, R. L., H. Valcanis, et al. (2001). "Purification of a pluripotent neural stem cell from the adult mouse brain." Nature **412**(6848): 736-9.
- Rowland, B. D., R. Bernards, et al. (2005). "The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene." Nat Cell Biol **7**(11): 1074-82.
- Sasai, Y. (2002). "Generation of dopaminergic neurons from embryonic stem cells." J Neurol **249** Suppl 2: II41-4.
- Scholer, H. R., A. K. Hatzopoulos, et al. (1989). "A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germline-specific expression of an Oct factor." EMBO J **8**(9): 2543-50.

- Skovseth, D. K., A. M. Kuchler, et al. (2007). "The HUVEC/Matrigel assay: an in vivo assay of human angiogenesis suitable for drug validation." *Methods Mol Biol* **360**: 253-68.
- Solter, D., N. Skreb, et al. (1970). "Extrauterine growth of mouse egg-cylinders results in malignant teratoma." *Nature* **227**(5257): 503-4.
- Stevens, L. C. (1970). "The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos." *Dev Biol* **21**(3): 364-82.
- Stevens, L. C. and C. C. Little (1954). "Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **40**(11): 1080-7.
- Stojkovic, M., M. Lako, et al. (2004). "Derivation of human embryonic stem cells from day-8 blastocysts recovered after three-step in vitro culture." *Stem Cells* **22**(5): 790-7.
- Stojkovic, M., M. Lako, et al. (2004). "Derivation, growth and applications of human embryonic stem cells." *Reproduction* **128**(3): 259-67.
- Strelchenko, N., O. Verlinsky, et al. (2004). "Morula-derived human embryonic stem cells." *Reprod Biomed Online* **9**(6): 623-9.
- Tada, M., T. Tada, et al. (1997). "Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells." *EMBO J* **16**(21): 6510-20.
- Tada, M., Y. Takahama, et al. (2001). "Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells." *Curr Biol* **11**(19): 1553-8.
- Takahashi, K., K. Okita, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures." *Nat Protoc* **2**(12): 3081-9.
- Takahashi, K. and S. Yamanaka (2006). "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors." *Cell* **126**(4): 663-76.
- Taupin, P. and F. H. Gage (2002). "Adult neurogenesis and neural stem cells of the central nervous system in mammals." *J Neurosci Res* **69**(6): 745-9.
- Temple, S. (1989). "Division and differentiation of isolated CNS blast cells in microculture." *Nature* **340**(6233): 471-3.
- Temple, S. (2001). "The development of neural stem cells." *Nature* **414**(6859): 112-7.
- Theise, N. D., R. Saxena, et al. (1999). "The canals of Hering and hepatic stem cells in humans." *Hepatology* **30**(6): 1425-33.
- Thomson, J. A., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." *Science* **282**(5391): 1145-7.
- Thomson, J. A., J. Kalishman, et al. (1996). "Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts." *Biol Reprod* **55**(2): 254-9.
- Thomson, J. A. and V. S. Marshall (1998). "Primate embryonic stem cells." *Curr Top Dev Biol* **38**: 133-65.
- Thorgeirsson, S. S. (1996). "Hepatic stem cells in liver regeneration." *FASEB J* **10**(11): 1249-56.
- Tiscornia, G., O. Singer, et al. (2006). "Production and purification of lentiviral vectors." *Nat Protoc* **1**(1): 241-5.
- Tokuzawa, Y., E. Kaiho, et al. (2003). "Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development." *Mol Cell Biol* **23**(8): 2699-708.
- Uchida, N., D. W. Buck, et al. (2000). "Direct isolation of human central nervous system stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(26): 14720-5.

- Undale, A. H., J. J. Westendorf, et al. (2009). "Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases." Mayo Clin Proc **84**(10): 893-902.
- van de Ven, C., D. Collins, et al. (2007). "The potential of umbilical cord blood multipotent stem cells for nonhematopoietic tissue and cell regeneration." Exp Hematol **35**(12): 1753-65.
- Villars, F., B. Guillotin, et al. (2002). "Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication." Am J Physiol Cell Physiol **282**(4): C775-85.
- Wilmut, I. (2002). "Cloning and stem cells." Cloning Stem Cells **4**(2): 103-4.
- Wilmut, I., N. Beaujean, et al. (2002). "Somatic cell nuclear transfer." Nature **419**(6907): 583-6.
- Wilmut, I., A. E. Schnieke, et al. (1997). "Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells." Nature **385**(6619): 810-3.
- Yamaguchi, H., E. Ishii, et al. (1998). "Role of umbilical vein endothelial cells in hematopoiesis." Leuk Lymphoma **31**(1-2): 61-9.
- Yamamoto, N., S. Yamamoto, et al. (2001). "Role of Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor." J Biol Chem **276**(48): 45031-40.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2006). "Human embryonic stem cells reprogram myeloid precursors following cell-cell fusion." Stem Cells **24**(1): 168-76.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." Science **318**(5858): 1917-20.
- Zaehres, H., M. W. Lensch, et al. (2005). "High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells." Stem Cells **23**(3): 299-305.
- Zhang, Y., X. F. Bai, et al. (2003). "Hepatic stem cells: existence and origin." World J Gastroenterol **9**(2): 201-4.
- Zhou, H., S. Wu, et al. (2009). "Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins." Cell Stem Cell **4**(5): 381-4.