



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células mesenquimales de pulpa dental humana con el uso de un vector lentiviral policistrónico

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

RICARDO RAÚL CEVALLOS GUERRA

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Karlen Gazarian – Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Jesús Chimal Monroy – Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dr. Héctor Mayani Viveros – Centro Médico Nacional Siglo XXI

MÉXICO, D. F. Abril, 2013



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.

Agradecimientos:

A mi tutor, el Dr. Karlen Gazarian, por darme la oportunidad de introducirme en el campo de las células troncales.

A mi tutor y mentor, el Dr. Jesús Chimal Monroy, por guiarme en el conocimiento de la biología y motivarme a seguir en el arduo camino científico.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y todos los que laboran en él por darme el espacio y los medios para desarrollar mi investigación.

A la Facultad de Química, al Posgrado en Ciencias Bioquímicas y en especial a Leticia García por ser quien nos ayuda y nos guía desinteresadamente en los trámites académicos y administrativos.

Agradezco la colaboración de: Dr. Juan Carlos Noriega, Dr. Juan José Montesinos, Dr. Héctor Mayani, Dra. María Elena Flores, Lic. Carlos Castellanos, Lic. Alejandra Flores, Lic. Karla Suárez, Lic. Dennisse Álvarez, Lic. Germán Mora, Lic. Luis Ramírez, Lic. Reginaldo Rivera, Lic. Sandra Hernández, M. en C. Francisco Hernández, M. en C. Vladimir Juárez, Lic. Edgar Hernández y a todos quienes de una u otra manera ayudaron a la realización de este proyecto.

Dedicatoria

A mis padres por ser la guía de mi camino

A mi hermano por ser mi ejemplo

A toda mi familia por su cariño incondicional

A mis amigos con quienes he compartido mi vida

A mis compañeros quienes me han apoyado siempre

Índice

Índice de figuras y tablas	iv
Abreviaturas	v
Glosario de términos	vi
Resumen	vii
1. Introducción	1
1.1 Las células troncales.....	1
1.2 Células troncales embrionarias pluripotentes.....	2
1.2.1 El circuito regulatorio de la pluripotencia.....	4
1.3 Células troncales adultas multipotentes.....	5
1.3.1 Células mesenquimales adultas.....	6
1.3.2 Células mesenquimales de pulpa dental.....	8
1.4 La reprogramación celular hacia el estado pluripotente.....	9
1.4.1 Función del factor de transcripción OCT4 en la inducción de la pluripotencia.....	13
1.4.2 Función del factor de transcripción SOX2 en la inducción de la pluripotencia.....	14
1.4.3 Rol de los factores de transcripción KLF4 y MYC en el mantenimiento y la inducción de la pluripotencia.....	15
1.5 La reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental.....	16
1.6 Los retrovirus y los vectores lentivirales.....	17
1.6.1 Construcción de los vectores lentivirales.....	20
1.6.2 Los vectores lentivirales en la reprogramación celular in-vitro.....	22
1.6.3 Vectores lentivirales policistrónicos y su aplicación en la reprogramación celular.....	22
2. Planteamiento del problema	24
3. Hipótesis	25
4. Objetivos	25
4.1 Objetivo general.....	25
4.2 Objetivos particulares.....	26
5. Metodología	26
5.1 Aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental.....	26
5.2 Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental.....	27

5.3	Caracterización inmunofenotípica de las células mesenquimales de pulpa dental....	27
5.4	Caracterización funcional de las células mesenquimales de pulpa dental.....	29
5.5	Caracterización por análisis de tiempo de doblaje y clonogenicidad de las mesenquimales de pulpa dental.....	29
5.6	Aislamiento y cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón.....	30
5.7	Preparación de células alimentadoras para el mantenimiento de células iPS.....	30
5.8	Plásmidos utilizados.....	31
5.9	Purificación de los plásmidos a partir de cultivos bacterianos.....	31
5.10	Producción de vectores lentivirales.....	32
5.11	Transducción de fibroblastos embrionarios con los vectores lentivirales.....	34
5.12	Transducción de células mesenquimales de pulpa dental con los vectores lentivirales.....	34
5.13	Aislamiento de colonias de células pre-iPS.....	35
5.14	Análisis por RT-PCR.....	36
5.15	Ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP).....	36
5.16	Análisis inmunofenotípico de las colonias de células iPS obtenidas a partir de MEF.....	36
5.17	Análisis inmunofenotípico y aislamiento de células iPS obtenidas a partir de CMPD.....	37
5.18	Formación de cuerpos embrioides y diferenciación in-vitro a partir de las iPS de CMPD.....	37
5.19	Trasplante de las iPS a ratones inmunodeprimidos y formación de teratomas.....	38
6.	Resultados.....	39
6.1	Aislamiento y cultivo de células mesenquimales de pulpa dental.....	39
6.2	Caracterización de las células mesenquimales de pulpa dental.....	40
6.3	Caracterización de los plásmidos utilizados.....	42
6.4	Generación de vectores lentivirales y ensayos de transducción a CMPD.....	43
6.5	Estandarización del proceso de reprogramación en fibroblastos embrionarios (MEF).....	45
6.5.1	Transducción de las células MEF con los vectores lentivirales.....	45
6.5.2	Las clonas de iPS expandidas mantienen características de células pluripotentes durante su mantenimiento en un cultivo acondicionado.....	47
6.6	Reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental.....	48
6.6.1	Las CMPD transducidas con los vectores OKSIM y EOS en presencia del inhibidor SB431542 presentan cambio morfológico y actividad de la fosfatasa alcalina.....	48

6.6.2	Las colonias de pre-iPS mantienen la expresión del reportero EOS.....	49
6.6.3	Las colonias de iPS fueron seleccionadas y expresaron marcadores de pluripotencia.....	52
6.6.4	Las células iPS aisladas carecen de marcadores mesenquimales.....	53
6.6.5	Las células iPS aisladas tienen la capacidad de formar cuerpos embrioides y diferenciarse hacia células de las tres capas embrionarias.....	54
6.6.6	Las células iPS aisladas son capaces de formar tumores en ratones inmunodeprimidos.....	56
7.	Discusión.....	57
7.1	Las CMPD son células clonogénicas de característica mesenquimal multipotente.....	57
7.2	El inicio de la reprogramación involucra procesos de epitelización favorecidos por la inhibición de la ruta de TGF- β	57
7.3	Las células reprogramadas pueden sufrir fenómenos de reversión o de adaptación a las condiciones del medio de cultivo.....	58
7.4	Las células iPS son una población heterogénea que debe purificarse por medio de técnicas de separación.....	59
7.5	Las líneas de células iPS SSEA4+ expresan a nivel funcional los factores del circuito de pluripotencia.....	60
7.6	Las células iPS obtenidas no presentan memoria de su estado mesenquimal.....	60
7.7	Las líneas de células iPS aisladas son funcionales in-vitro y forman tumores in-vivo.....	60
8.	Conclusiones.....	61
9.	Perspectivas.....	61
10.	Anexos.....	63
11.	Referencias.....	66

Índice de figuras y tablas

Figuras:

Figura 1. Características y propiedades básicas de las células troncales pluripotentes.....	3
Figura 2. Experimento inicial por transducción de 24 factores en células MEF, realizado por Yamanaka y Takahashi.....	11
Figura 3. Caracterización de células iPS a partir de fibroblastos de cola de ratón (TTF), reprogramadas con 4 factores (OCT4, SOX2, KLF4 y MYC) marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP), realizada por Yamanaka y Takahashi.....	12
Figura 4. Estructura de los genes en los genomas de dos tipos de retrovirus.....	18
Figura 5. Ciclo de vida del lentivirus.....	19
Figura 6. Construcción de vectores retrovirales.....	22
Figura 7. Aislamiento y cultivo de CMPD.....	39
Figura 8. Caracterización inmunofenotípica de las CMPD por medio de citometría de flujo.....	40
Figura 9. Análisis de expresión de factores de pluripotencialidad en las CMPD.....	41
Figura 10. Análisis funcional de las CMPD.....	42
Figura 11. Análisis de restricción de los vectores de empaque, envoltura y transferencia.....	42
Figura 12. Eficiencia de transfección por medio del plásmido reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5).....	43
Figura 13. Establecimiento de una curva estándar de titulación de los vectores lentivirales.....	44
Figura 14. Infección con vector lentiviral en matriz de gelatina.....	46
Figura 15. Reprogramación de MEF.....	47
Figura 16. Mantenimiento de las células iPS obtenidas a partir de MEF.....	48
Figura 17. Infección de las CMPD con los vectores lentivirales.....	50
Figura 18. Morfología de las colonias y expresión del reportero EOS luego del primer pase al día 21 p.i.....	51
Figura 19. Aislamiento de células iPS GFP+SSEA4+.....	52
Figura 20. Resumen experimental y análisis de marcadores de pluripotencia en las líneas de iPS iDL1 e iDL4.....	53
Figura 21. Análisis de marcadores mesenquimales en CMPD y en las células iPS aisladas, por medio citometría de flujo.....	54
Figura 22. Formación de cuerpos embrioides y diferenciación en monocapa.....	55
Figura 23. Morfologías observadas en los cultivos luego de 20 días de diferenciación.....	55
Figura 24. Análisis de marcadores de diferenciación en la línea iDL4.....	56
Figura 25. Formación de tumores tipo teratoma al día 15 luego de la inoculación.....	56

Tablas:

Tabla 1. Porcentaje de células positivas a los marcadores analizados por citometría de flujo.....	40
--	----

Abreviaturas

AP	Fosfatasa Alcalina
BSA	Albúmina Sérica Bovina
CFU-F	Unidad Formadora de Colonias de Fibroblastos
CMPD	Células Mesenquimales de Pulpa Dental
CMM	Células Mesenquimales Multipotentes
DAPI	4',6-diamidino-2-Fenil-indol
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico
ES	(Célula) Troncal Embrionaria
EMT	Transición Epitelio-a-Mesénquima
FGF-2	Factor de Crecimiento de Fibroblastos -2
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GSK3	Glucógeno Sintasa Cinasa 3
hES	(Célula) Troncal Embrionaria de origen humano
HIV-1	Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo-I
HSC	Célula Troncal Hematopoyética
iPS	(Célula) Troncal Pluripotente inducida
IRES	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma
LIF	Factor Inhibidor de Leucemias
LTR	Repeticiones Largas Terminales
MEF	Fibroblasto Embrionario de Ratón
MET	Transición Mesénquima-a-Epitelio
mES	(Célula) Troncal Embrionaria de origen murino
MLV	Virus de la Leucemia murina de Moloney
MSC	Célula Troncal Mesenquimal
NSC	Célula Troncal Neural
PBS	Solución Salina con <i>Buffer</i> de Fosfato
PDGF	Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas
PIC	Complejo de Pre-Integración
SFB	Suero Fetal Bovino
TGF-β	Factor de crecimiento transformante – β
TTF	Fibroblastos de la Cola de Ratón
VSV-G	Proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular

Glosario de términos

Cuerpo embriode: Es un agregado celular tridimensional de forma esférica generado por la interacción intercelular mediada por la elevada expresión de E-Cadherina en las células troncales pluripotentes. La formación de cuerpos embrioides es fácilmente inducida en células troncales pluripotentes por medio de su cultivo in-vitro bajo condiciones no adherentes o en suspensión.

Fosfatasa alcalina: Es una hidrolasa de grupos fosfato que posee una mayor actividad bajo condiciones de pH básico. En el humano existen 3 isoenzimas: intestinal, placentaria y tejido no-específico (presente en el hígado, hueso, riñón y en células ES).

Plasticidad (celular): Es la propiedad de una célula, generalmente no diferenciada, para cambiar de linaje. La plasticidad celular tiene que ver con estados epigenéticos permisivos para adquirir un nuevo fenotipo bajo diferentes condiciones del medio.

Quimera: Se refiere a un organismo compuesto por dos o más poblaciones distintas a nivel genético. Esto se puede lograr por el trasplante de células pluripotentes de un animal de una cepa determinada dentro de un embrión temprano de un animal de una cepa distinta. De hecho, si las células del donante son efectivamente pluripotentes podrán contribuir a varios tejidos del adulto resultante generando así un animal quimérico.

Teratoma: Es una masa celular de tipo tumoral formada por el crecimiento y diferenciación de células troncales pluripotentes dentro del organismo de un animal adulto. Los teratomas son tumores benignos capaces de generar estructuras similares a las formadas durante el desarrollo embrionario. Sin embargo, si las células troncales sufren transformaciones cancerígenas los tumores formados generan masas celulares desorganizadas debido a deficiencias en su capacidad de diferenciación; los tumores en este estado son denominados teratocarcinomas.

Resumen

Las células troncales pluripotentes son células con la capacidad para derivar todos los tipos celulares del organismo adulto. Los conflictos bioéticos han retrasado la investigación sobre las células troncales embrionarias (ES) y su posible aplicación clínica. Sin embargo, el descubrimiento de Shinya Yamanaka con la generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de células diferenciadas por procesos de reprogramación permitió evadir los problemas bioéticos y desarrollar líneas de células iPS capaces de derivar todos los tejidos del organismo adulto tal como lo hacen las células ES. Uno de los problemas para la aplicación clínica de la reprogramación es la fuente celular a partir de la cual se puedan generar células iPS de forma eficiente. Las células mesenquimales de la pulpa dental (CMPD) representan una alternativa bastante atractiva para este fin dado que poseen las ventajas de ser células altamente proliferativas, de fácil manipulación in-vitro y de forma importante son células que se pueden aislar con un mínimo de invasividad sobre el paciente. Además son células fácilmente transducibles con vectores lentivirales que permitan la expresión de los factores reprogramadores OCT4, SOX2, KLF4 y MYC. En el presente proyecto se analizó la capacidad de las CMPD para ser reprogramadas por medio de un vector lentiviral policistrónico denominado OKSIM, que codifica para los cuatro factores reprogramadores. El vector OKSIM, además de permitir la expresión de estos factores en una sola construcción, presenta la ventaja de disminuir la expresión relativa de MYC respecto a los otros tres factores, reduciendo así el efecto citotóxico de su sobre-expresión. Esto a su vez permitió estandarizar el procedimiento para la inducción de la reprogramación de CMPD bajo condiciones óptimas. Estas condiciones también incluyeron el uso de un inhibidor de la ruta de TGF- β el cual logra potenciar los procesos de reprogramación al promover la transición Mesénquima-a-Epitelio (MET).

Los resultados obtenidos bajo las condiciones establecidas en el presente proyecto reflejaron que las CMPD pueden ser reprogramadas con el vector policistrónico OKSIM y que en este proceso la inhibición de la ruta de TGF- β resulta ser crucial. Las CMPD reprogramadas mostraron patrones pluripotenciales tanto fenotípicos como funcionales revelados por medio de análisis bioquímicos, inmunoquímicos, moleculares y morfológicos, así como por su trasplante hacia ratones inmunodeprimidos observándose su capacidad para formar tumores. Gracias al uso de un vector reportero que expresa la proteína fluorescente GFP bajo un promotor activado por miembros del circuito de pluripotencia, se pudieron aislar células reprogramadas verificándose en

ellas que la señal fluorescente coincide con patrones de pluripotencia como son la expresión de OCT4, SOX2 y NANOG así como con la actividad de la fosfatasa alcalina. A partir de estas células reprogramadas se pudieron aislar líneas de células iPS en las cuales se pudo verificar su capacidad para diferenciarse in-vitro hacia células de linaje neural, mesenquimal y endodermal. Estos resultados me permitieron concluir que las células reprogramadas presentan un estado tipo pluripotente funcional y por tanto la inducción de la pluripotencia fue efectiva bajo las condiciones utilizadas. Esto finalmente demuestra que las CMPD pueden ser utilizadas como fuente celular de aislamiento poco invasivo para la generación de células iPS que puedan ser competentes para distintas aplicaciones en el campo de la biomedicina.

1. Introducción

1.1 Las células troncales

Las células troncales se definen como células primitivas capaces de autorenovarse y diferenciarse hacia varios tipos celulares especializados. La autorenovación de las células troncales se refiere a la capacidad, tras una división mitótica, de generar al menos una célula hija con las mismas características fenotípicas y propiedades funcionales que la célula madre. Cuando la autorenovación da como resultado dos células hijas con la misma identidad que la célula madre se dice que la célula troncal efectuó una autorenovación simétrica. Cuando la autorenovación da como resultado una célula idéntica a la célula madre y otra célula con propiedades más especializadas, se dice que la célula troncal efectuó una autorenovación asimétrica.¹ La discriminación entre una división simétrica y una asimétrica en una célula troncal dependerá de señales externas que incluyen interacciones intercelulares y factores de crecimiento². Por otro lado, el potencial de diferenciación es una de las propiedades que ha permitido clasificar a las células troncales en tres grupos principales: células troncales totipotentes, pluripotentes y multipotentes.

La potencialidad de las células troncales está basada en su capacidad para diferenciarse hacia diversos linajes celulares tomando en cuenta el desarrollo embrionario. Así, las células troncales totipotentes son aquellas capaces de derivar células de tejidos tanto embrionarios como extraembrionarios. Ejemplos de células troncales totipotentes son los blastómeros del embrión dentro de las primeras divisiones del cigoto.³ Las células troncales pluripotentes derivan de las células troncales totipotentes, pero su potencial se limita a las células de los tejidos embrionarios, es decir que pueden derivar todos los tipos celulares de un organismo adulto. Las células pluripotentes pueden ser aisladas de la masa celular interna del blastocisto temprano, por lo que en tal caso se las denomina células troncales embrionarias (ES) y pueden ser cultivadas in vitro de forma indefinida en presencia de factores específicos que promueven su división simétrica (y por tanto pueden ser inmortales in-vitro). Por otro lado, las células troncales multipotentes derivan de las células troncales pluripotentes y su potencial está limitado a ciertos tipos celulares de tejidos específicos. Ejemplos de células troncales multipotentes son las células troncales hematopoiéticas (HSC), cuyo potencial está aparentemente limitado a los distintos linajes celulares del tejido sanguíneo.

Debido a actuales evidencias sobre el fenómeno de la **plasticidad** celular, principalmente en células troncales adultas, el tema de la potencialidad se encuentra en debate. Esto ha llevado a la preferencia hacia otra clasificación para las células troncales que se basa en el estado embrionario en el cual se pueden aislar. Es así que se ha clasificado a estas células en: células troncales embrionarias, células troncales del cordón umbilical y la placenta y células troncales adultas. Esta clasificación deja un poco de lado la falta de conocimiento sobre la plasticidad de las células troncales, para de esta manera poder referirnos a un conjunto de células con características fenotípicas distintas pero con posibles propiedades funcionales similares. Sin embargo, la definición de potencialidad sigue siendo importante en el sentido de la capacidad funcional que distingue a las células troncales con características totipotentes, pluripotentes y multipotentes. A continuación me enfocaré en dos grupos de células troncales: las células troncales embrionarias pluripotentes y las células troncales adultas multipotentes. La información abarcada sobre estas poblaciones celulares permitirá comprender las implicaciones de los procesos de reprogramación celular y el impacto que ha tenido la inducción de la pluripotencia en el conocimiento en biología celular.

1.2 Células troncales embrionarias pluripotentes

Las células troncales embrionarias pluripotentes (ES) son células troncales capaces de derivar todos los tipos celulares de un individuo adulto. Las células troncales pluripotentes poseen dos características notables: inmortalidad, o la capacidad para autorenovarse indefinidamente, y pluripotencia, o la capacidad para derivar todos los tejidos del organismo adulto.⁴ Para definir a una célula como troncal pluripotente es indispensable que cumpla con ciertos requisitos fenotípicos y funcionales. A nivel de fenotipo, las células troncales pluripotentes deben expresar de forma obligada los tres genes que forman parte del circuito regulatorio de la pluripotencia, los cuales son: *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*. Además, es un rasgo general de estas células la expresión de proteínas como *KLF4*, *C-MYC*, *LN28*, *ESG1*, *REX1*, *ERAS*, *ECAT1*, *FBX15*, entre otros, y de forma particular la expresión de las proteínas de superficie *Stage Specific Embryonic Antigen* o SSEA (SSEA3 y SSEA4 en células humanas, y SSEA1 en células murinas) y los antígenos de queratán-sulfato Tra1 (Tra1-60 y Tra1-81 en células humanas) (Figura 1A). Muchas de estas proteínas expresadas tienen una función hasta ahora desconocida, sin embargo con el avance en el estudio de las células troncales y la biología celular se ha podido develar la función de algunas de ellas. Por ejemplo ahora se tiene indicios de que las proteínas de queratán-sulfato Tra podrían estar involucradas en la señalización por contactos intercelulares para inhibir la senescencia y promover

la expresión de genes del circuito de pluripotencia. Otras características fenotípicas importantes de las células troncales pluripotentes son la expresión de la enzima **fosfatasa alcalina** así como el patrón morfológico de las colonias durante su crecimiento in-vitro. Las colonias de células pluripotentes humanas pueden tener una morfología tanto plana como tridimensional, con bordes regulares, mientras que la morfología de las colonias de células pluripotentes de ratón tiende a ser más tridimensional con bordes muy regulares y particularmente brillantes al observarlas por microscopía de contraste de fase.

A nivel funcional las células troncales pluripotentes manifiestan dos propiedades básicas de la pluripotencialidad: 1) capacidad de diferenciación hacia células de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) y, 2) capacidad para formar **quimeras** y contribuir a la línea germinal luego de ser trasplantadas dentro de un embrión. Para demostrar la capacidad de diferenciación hacia linajes celulares de las tres capas embrionarias existen algunas estrategias como: la formación de **cuerpos embrioides**, la diferenciación dirigida en monocapa y la formación de **teratomas** por trasplante subcutáneo en ratones inmunodeprimidos. Las dos primeras estrategias involucran manipulaciones in-vitro que permiten controlar el proceso de diferenciación, mientras que la formación de teratomas es una estrategia de diferenciación in-vivo que permite evaluar el comportamiento de las células dentro de un organismo. Tanto la formación de teratomas como la de cuerpos embrioides se consideran requisitos mínimos para demostrar la pluripotencialidad a nivel funcional en las células troncales (Figura 1B).

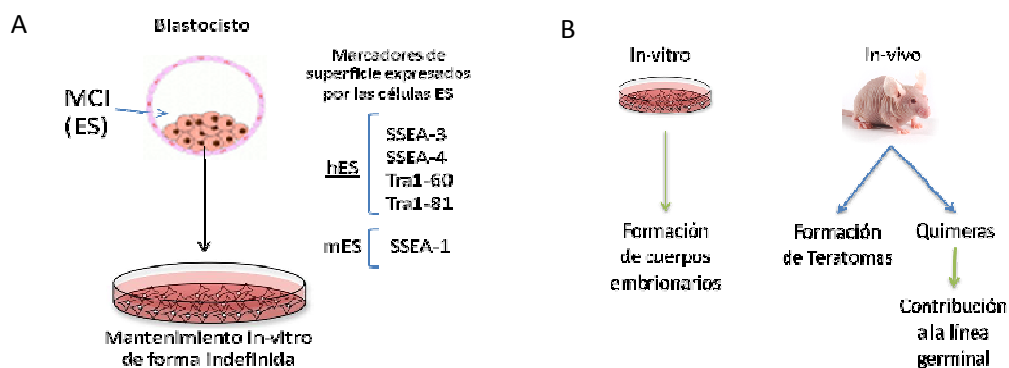


Figura 1. Características y propiedades básicas de las células troncales pluripotentes. A) Las células troncales pluripotentes pueden ser aisladas principalmente de la masa celular interna (MCI) del blastocisto temprano o pueden ser obtenidas de forma artificial por medio de la reprogramación de células diferenciadas. Estas células tienen la característica de ser inmortales (y por tanto pueden ser mantenidas in vitro de forma indefinida) y de expresar marcadores de superficie típicos para células troncales embrionarias humanas (hES) y murinas (mES). B) A nivel funcional, las células troncales pluripotentes tienen la propiedad de formar cuerpos embrioides, de formar teratomas al ser trasplantadas, de formar quimeras al trasplantarlas dentro de un blastocisto y contribuir a la línea germinal en dichas quimeras.

1.2.1 El circuito regulatorio de la pluripotencia

Ya en el año 2005 se tenía claro que los factores OCT4, SOX2 y NANOG conforman el denominado circuito regulatorio de la pluripotencia, que consiste en un circuito de regulación transcripcional que a su vez permiten la inducción de la expresión de genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia (incluyendo sus propios genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*), así como la represión de la expresión de genes relacionados con procesos de diferenciación.⁵ Esta regulación es posible gracias a que cada uno de estos factores que conforman el circuito comparten sitios de unión a promotores (en regiones reguladoras distales) de genes clave para la autorenovación y la diferenciación, pudiendo actuar sea como activadores o como represores de la transcripción.⁶ Es así que los factores OCT4, SOX2 y NANOG cuando actúan en conjunto son inductores de genes como *ESG1*, *REX1*, *FBX15*, y de proteínas de superficie como SSEA y Tra, entre otras, y por tanto su expresión es utilizada como marcador de la actividad funcional del circuito de pluripotencia o de su inducción (apartado 1.4, Reprogramación celular hacia el estado pluripotente).

El factor de transcripción OCT4, formalmente denominado POU5F1, fue descubierto por Okamoto y colaboradores en 1990, y posteriormente fue caracterizado por dos grupos de investigación independientes: el de Louis M. Staudt⁷ del Instituto Nacional de Salud de Bethesda y el de Hans R. Schöler y Peter Gruss del Instituto Max Planck.⁸ El factor de transcripción OCT4 fue identificado como una proteína expresada en células troncales totipotentes, pluripotentes y germinales con una función importante en las primeras divisiones mitóticas del cigoto. Se caracteriza por fijarse a secuencias octaméricas ATT(T/A)GCAT en regiones reguladoras de genes relacionados con autorenovación y diferenciación. Niwa y colaboradores (2000) caracterizaron a la proteína OCT4 como un factor clave para definir el destino de las células troncales pluripotentes por mecanismos dependientes del nivel de expresión: cuando OCT4 se mantiene a cierto nivel de expresión basal (típico de células ES) las células mantienen sus características troncales; cuando se da una sobre-expresión de OCT4 las células se diferencian hacia meso-endodermo; y cuando se da un descenso en la expresión de OCT4 las células se diferencian hacia trofoectodermo.⁹

Posteriormente, en el año 2003 el grupo de investigación del Dr. Shinya Yamanaka publicó un artículo sobre la función del factor ECAT-4 en el mantenimiento de la pluripotencia.¹⁰ Ellos observaron que cuando se sobre-expresa la proteína ECAT-4 en células troncales pluripotentes de ratón éstas son capaces de dividirse de forma simétrica en cultivo sin la necesidad de agregar el

factor inductor de autorenovación LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*). Por otro lado observaron que cuando el gen de ECAT-4 era eliminado, las células troncales se diferenciaban rápidamente aún en presencia de LIF. De esta manera demostraron que el factor ECAT-4 es indispensable para el mantenimiento de la pluripotencia de las células ES y por este motivo los autores del artículo propusieron cambiar el nombre de ECAT-4 por el de NANOG.^a Hay que tomar en cuenta que, si bien el factor OCT4 también es un factor indispensable para el mantenimiento de la pluripotencia, su sobre-expresión por otro lado lleva a las células a procesos de diferenciación, a diferencia de NANOG.

El tercer miembro del circuito regulatorio de la pluripotencia, el factor SOX2, también es un factor relacionado con diferenciación. El factor SOX2 o *Sex-determining region Y box 2* es una proteína de la familia HMG (*High Mobility Group*) que se fija a la secuencia AAGAAACA sobre regiones reguladores de genes específicos. Esta secuencia de fijación es frecuentemente encontrada cerca de secuencias octaméricas de fijación para OCT4 en los promotores de genes relacionados con la pluripotencia como *UTF1*, *NANOG*, *OCT4* y *FGF4*.^{11, 12, 13, 14, 15} Por otro lado, SOX2 se encuentra expresado en células embrionarias con compromiso neuro-ectodermal y se encuentra inhibido en células embrionarias con compromiso meso-endodermal. De hecho ahora se sabe que los niveles de expresión de OCT4 y SOX2 luego de la inhibición de NANOG definen el compromiso de linaje de las células embrionarias que inician la gastrulación.¹⁶ SOX2 se encuentra particularmente expresado en las células progenitoras neurales así como en otras células troncales adultas, y parece estar relacionado con procesos de proliferación celular.

1.3 Células troncales adultas multipotentes

Las células troncales multipotentes son aquellas capaces de diferenciarse hacia tipos celulares de tejidos específicos, es decir que se encuentran especificadas para diferenciarse solo a ciertos linajes. A diferencia de las células embrionarias pluripotentes, las células troncales adultas multipotentes no tienen potencial teratogénico y no son capaces de formar quimeras eficientemente ni de contribuir a la línea germinal al ser trasplantadas a un blastocisto. Esto implica que las células troncales adultas no poseen características funcionales pluripotenciales in-vivo.

^a NANOG fue nombrado así en mención al dios celta de la eterna juventud, Tir Nan Og. Esto como una forma de resaltar la importancia de ECAT-4 para mantener la “juventud” y, por tanto, la troncalidad y pluripotencia de las células ES.

Dentro del grupo de las células troncales multipotentes se encuentran las células troncales fetales, placentarias, del cordón umbilical y adultas. Las células troncales adultas pueden ser obtenidas de linaje endodermal, mesodermal y ectodermal, distribuidas en una gran parte de tejidos adultos. Las HSC de médula ósea son un tipo de célula troncal adulta de origen mesodermal capaces de derivar todos los tipos celulares sanguíneos. En la médula ósea también encontramos células troncales de tipo mesenquimal cuya función es restablecer el tejido óseo así como las células del nicho hematopoyético. Se dice que las células multipotentes tienen restricción de linaje, sin embargo los estudios in-vitro demuestran que la plasticidad de estas células puede ser modificada por medio de la manipulación epigenética y de rutas de señalización.¹⁷ Esto indica que las células troncales adultas podrían revelar un potencial mayor por estímulos ambientales que no se manifiestan in-vivo.

1.3.1 Células mesenquimales adultas

En los años 1940, gracias al estudio sobre los efectos de la radiación ionizante en mamíferos, se descubrió una población de células primitivas presentes en la médula ósea. El trasplante de células mononucleares de la médula ósea de ratones sanos hacia ratones letalmente irradiados permitía el “rescate” de éstos últimos de una muerte inminente. Estas evidencias dieron pie al estudio pionero de Till y McCulloch, el cual se enfocó en determinar los componentes celulares en la médula ósea capaces de reproducir este fenómeno de rescate.¹⁸ Dentro de estos componentes se identificaron a las células troncales hematopoyéticas, las cuales son capaces de dar origen a todos los tipos celulares del tejido sanguíneo.

La investigación de Alexander Friedenstein en la década de los 70s, permitió identificar a otro componente importante de la médula ósea, con morfología fibroblastoide. A este componente se le denominó *Unidad formadora de colonias de fibroblastos* (CFU-F).^{19, 20} Friedenstein demostró que estas células eran capaces de diferenciarse hacia osteoblastos por lo que se las denominó también como progenitores óseos.^{21, 22} Sin embargo, luego se demostró que estas células también eran capaces de diferenciarse hacia otros linajes como hacia adipocitos y condrocitos. Debido a esta capacidad multipotente de las CFU-F para derivar tejidos de linaje mesenquimal, éstas fueron denominadas como células troncales mesenquimales (MSC) de la médula ósea.

El amplio estudio que se les dio a las células troncales mesenquimales presentes en la médula ósea permitió definir a estas células no solo como progenitores de linajes mesenquimales,

sino supuestamente como multiprogenitores de diversos tejidos. Es así que se observó que estas células eran capaces de migrar hacia varios tejidos al ser trasplantadas y no solo daban origen a los tres linajes mesenquimales ya descritos, sino que además podían localizarse en el corazón, hígado, pulmones, cerebro, entre otros.^{23, 24, 25} Sin embargo, la dificultad para demostrar la diferenciación funcional de estas células y de reproducir estos fenómenos in-vitro inició la controversia sobre la plasticidad de las células mesenquimales. Además, no se ha comprobado que estas células efectúen autorenovación o que sean capaces de dividirse de forma tanto simétrica como asimétrica, ni que exista un grupo de marcadores únicos capaces de definir las (ya que representan una población heterogénea). Estas son las razones más importantes por las que la Sociedad Internacional de Terapia Celular (ISCT) propuso denominar a estas células como células del estroma mesenquimal o como células mesenquimales multipotentes (CMM), en lugar de células troncales mesenquimales.²⁶ De todas maneras, es evidente que existe una sub-población troncal con mucho potencial de diferenciación dentro de las células del estroma mesenquimal que aún no ha sido bien identificada ni caracterizada.

Las células troncales hematopoyéticas por otro lado, han sido ampliamente caracterizadas a nivel funcional como células troncales y por tanto son la referencia más utilizada en términos de troncalidad en el individuo adulto. Estas células aunque tienen un gran potencial de diferenciación y proliferación, no han podido ser expandidas in-vitro bajo cultivos convencionales, y aún bajo tratamientos con citoquinas especiales éstas no han podido ser expandidas hasta un número suficiente para su fácil manejo in-vitro. Por el contrario las células mesenquimales tienen una alta capacidad de proliferación y pueden ser cultivadas fácilmente in-vitro con métodos convencionales sin adquirir senescencia luego de varios pases. Por este motivo, las células mesenquimales resultan una fuente celular atractiva para su aplicación en investigación básica, para el modelamiento de enfermedades y para terapia celular.

Las células mesenquimales han sido caracterizadas por la expresión de varias proteínas de superficie, pero particularmente se ha visto que más del 95% de células mesenquimales expresan los marcadores CD73, CD90 y CD105, y carecen de marcadores hematopoyéticos y endoteliales como CD14, CD45, CD34, HLA-DR y CD31 (ver en el **anexo #1** la descripción de los marcadores). A nivel funcional, las células mesenquimales tienen alta capacidad clonogénica y el potencial para diferenciarse hacia tres linajes básicos: osteoblastos, adipocitos y condrocitos. Estas son las

características mínimas que la ISCT ha establecido para denominar a una población celular como células mesenquimales.²⁷

1.3.2 Células mesenquimales de pulpa dental

Las células mesenquimales han sido aisladas a partir de varios tejidos del organismo adulto. De estas fuentes las más estudiadas han sido las células mesenquimales de la médula ósea, gracias a las diversas investigaciones iniciadas por Friedenstein. Sin embargo, en los últimos años se han encontrado fuentes de células mesenquimales muy accesibles y con alta capacidad proliferativa in-vitro. Dentro de éstas, las células mesenquimales de la cavidad oral, y específicamente las células mesenquimales de la pulpa dental (CMPD) han ganado mucha importancia a nivel clínico debido a su accesibilidad y a sus propiedades comparables con las células mesenquimales de la médula ósea. Por tanto las CMPD representan una fuente de células mesenquimales que no requiere de métodos quirúrgicos invasivos para su obtención.

Las CMPD fueron inicialmente caracterizadas como células troncales mesenquimales por el grupo de Songtao Shi en el año 2000.²⁸ Ellos determinaron que las CMPD tienen una alta capacidad clonogénica, aparentemente superior al de las células mesenquimales de médula ósea. Al ser células mesenquimales expresan los marcadores CD105, CD73, CD90, CD44 y CD29, y carecen de la expresión de marcadores no mesenquimales tales como CD34, CD45 y CD33. Sin embargo, a diferencia de las células mesenquimales de médula ósea, se sabe que las CMPD provienen de la cresta neural y por tanto presentan marcadores típicos de este linaje como SNAIL, SLUG, TWIST, SOX1, SOX2 y Nestin.²⁹ Estas células a diferencia de las células mesenquimales de médula ósea, tienen una capacidad de diferenciación neurogénica privilegiada.³⁰

Las CMPD son hasta ahora las células mesenquimales de tejido oral mejor caracterizadas y siguen siendo una fuente celular atractiva para estudios a nivel de ciencia básica sobre su plasticidad. También son una fuente adecuada para obtener células proliferativas que sirvan para procesos de reprogramación y que en un futuro puedan ser aplicables a nivel clínico o diagnóstico. Si bien las CMPD parecen tener cierta plasticidad para diferenciarse hacia varios linajes, los protocolos de diferenciación existentes son aún demasiado empíricos y no son reproducibles. Esto es debido a que las células mesenquimales adultas son poblaciones heterogéneas y al parecer la subpoblación troncal es inestable y pierde su potencial de diferenciación in-vitro conforme va proliferando. A pesar del estudio intenso que se les ha dado a estas células mesenquimales multipotentes aún no ha sido establecido un medio de cultivo

estándar ni un grupo de marcadores consenso que permita aislar y mantener a la subpoblación troncal dentro de la población de células mesenquimales. Es probable que así como sucede en las HSC, en la subpoblación más primitiva de las células mesenquimales el programa de diferenciación es demasiado fuerte como para mantenerse estable por mucho tiempo ex-vivo. Por lo tanto, hasta ahora la aplicación más importante de las células mesenquimales es en la inducción de una población homogénea de células con un amplio potencial de diferenciación lo cual es posible por medio de la reprogramación celular in-vitro.

1.4 La reprogramación celular hacia el estado pluripotente

El Dr. Hans Spemann, un embriólogo ganador del Nobel en medicina en 1935 por el diseño de estrategias quirúrgicas en embriología, fue el primero en plantear la idea de que si el núcleo de una célula diferenciada es transferido dentro del ovoplasma de un oocito enucleado y se genera un individuo adulto esto demostraría que el genoma de una célula adulta sigue siendo totipotente.³¹ Esto a su vez implicaría que los fenómenos de diferenciación celular no eliminan los componentes genéticos necesarios para generar un individuo adulto. Algunos estudios se centraron en comprobar esta hipótesis, pero no fue sino hasta 1958, cuando John Gurdon y sus colegas Michael Fischberg y Thomas R. Eldale publicaron un artículo en el cual se demuestra que el núcleo de una célula adulta intestinal de *Xenopus laevis* podía ser reprogramada por el ovoplasma de un oocito enucleado y generar clones adultos.³² Aunque el descubrimiento de Gurdon causó mucha controversia en el campo científico, nuevas publicaciones demostraron que la transferencia nuclear en *Xenopus* a partir de células adultas genera clones viables.^{33, 34, 35} El descubrimiento de Gurdon no pudo ser replicado en mamíferos sino hasta el año 1997 cuando Keith Campbell y Ian Wilmut demostraron que el núcleo de una célula adulta de mamífero (en este caso células de glándula mamaria de una oveja) podía ser reprogramado por el ovoplasma de un oocito enucleado.³⁶ Aunque los trabajos pioneros tanto de Gurdon como de Wilmut y Campbell permiten demostrar que ciertos factores proteicos presentes en el ovoplasma son suficientes para reprogramar una célula diferenciada, aún quedaba la interrogante de cuáles eran dichos factores reprogramadores. El paradigma que prevalecía en el ámbito científico sobre este enigma era que los factores que inducen la reprogramación celular eran numerosos y sería difícil identificarlos a todos.³⁷

Nueve años más tarde Shinya Yamanaka y Kazutoshi Takahashi en su artículo titulado *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined*

Factors (2006)³⁸, demostraron que células diferenciadas derivadas de ratón pueden ser reprogramadas hacia un estado pluripotencial por medio de la sobreexpresión de cuatro factores de transcripción. Para lograr esto, Yamanaka y Takahashi sobre-expresaron en fibroblastos de ratón 24 factores de transcripción conocidos, que son normalmente expresados en células troncales embrionarias pluripotentes (ver **anexo #2**), utilizando vectores retrovirales portadores de cada uno de ellos. Los fibroblastos transducidos con los 24 factores fueron aislados a partir de ratones transgénicos portadores de un gen de resistencia a neomicina fusionado con el gen para la β -galactosidasa (la fusión es denominada *β -geo*) cuya expresión es dirigida por el promotor del gen de FBX15. Como la expresión de FBX15 es activada por la expresión del circuito de pluripotencia, las células reprogramadas hacia un estado pluripotente podían ser seleccionadas por medio de su cultivo en presencia del antibiótico G-418 (Figura 2A). Tras infectar fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) y fibroblastos de cola de ratón (TTF) con los vectores portadores de los 24 factores los autores observaron que las células cambiaban de morfología y se formaban varias colonias tipo ES resistentes a G-418 (Figura 2B y 2C). Entonces Yamanaka y Takahashi decidieron verificar el coctel mínimo de factores requerido contando el número de colonias obtenidas al eliminar cada uno de estos factores del grupo de 24. De esta manera obtuvieron primero un grupo de 10 factores sin los cuales la eficiencia de formación de colonias decaía significativamente. Realizaron un nuevo proceso de selección ahora con estos 10 factores para finalmente llegar a la fórmula mínima de 4 factores, los cuales resultaron ser las proteínas OCT4, SOX2, KLF4 y MYC.

Las células reprogramadas por medio de este grupo de factores de transcripción presentaron características fenotípicas y funcionales casi idénticas a células troncales embrionarias pluripotentes tales como aspectos morfológicos, patrón de expresión de genes, la capacidad de formar quimeras y contribuir a la formación de varios tejidos incluyendo tejidos gonadales (Figura 3). Por este motivo a las células producto de la reprogramación se las denominaron células Troncales Pluripotenciales inducidas o células iPS por sus siglas en inglés (*induced Pluripotent Stem*). Aunque las células iPS obtenidas por Yamanaka y Takahashi se parecían mucho a las células ES en términos de morfología, proliferación y función (Figura 3 A, C y D), aún estas células no presentaban un perfil epigenético y de expresión de genes completamente idéntico a las células ES (Figura 3B). Esto más tarde explicaría que la reprogramación inducida es un proceso paulatino que requiere de cambios epigenéticos en las células conforme van proliferando y por tanto es necesaria la selección de clones competentes.

Un año más tarde (2007) el grupo de James Thomson demuestra que la reprogramación celular también es posible en células humanas, sin embargo ellos propusieron el uso de los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *LIN28*.³⁹ En el 2007, Yamanaka demuestra que su coctel de genes (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYC*) es capaz de reprogramar fibroblastos humanos, y que además es posible reprogramar células diferenciadas sin el uso del protooncogén *MYC*.^{40 41} En el 2008, el grupo de trabajo del Dr. Rudolf Jaenisch demostró la posibilidad de reprogramar células tanto humanas como de ratón utilizando un solo vector lentiviral policistrónico portador de los cuatro genes utilizados por Yamanaka y Takahashi.⁴² A partir de aquí varias publicaciones han replicado el proceso de reprogramación en muchos tipos celulares, demostrando que la técnica es factible y reproducible.

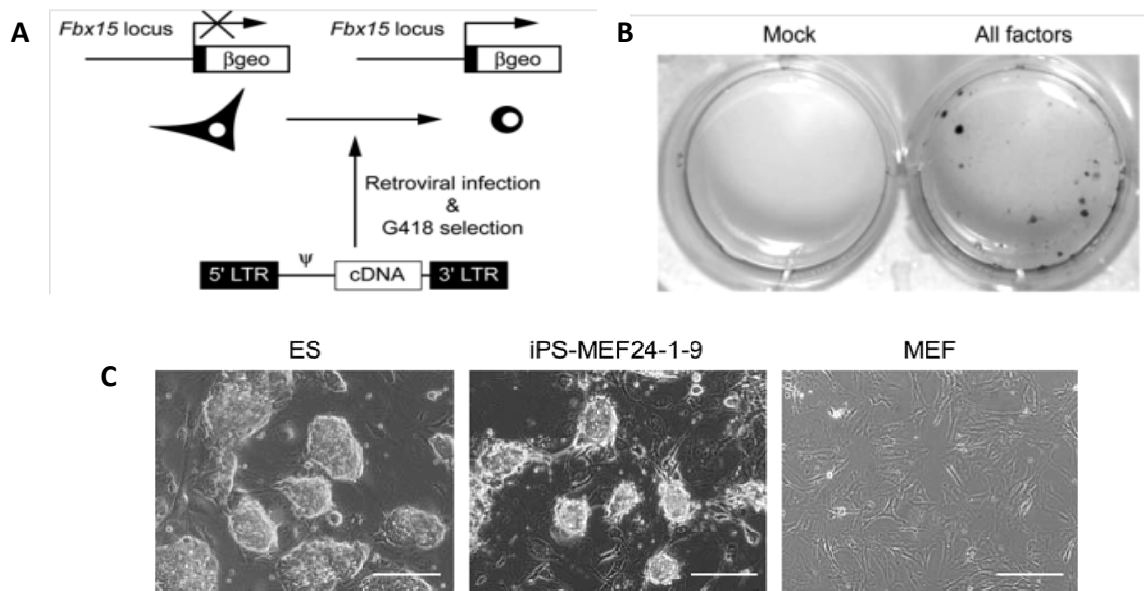


Figura 2. Experimento inicial por transducción de 24 factores en células MEF, realizado por Yamanaka y Takahashi. A) Principio molecular de la selección de colonias resistentes a G418 por la inducción del promotor de *FBX15* en las células transducidas con los vectores retrovirales (representados por la secuencia flanqueada por 5'LTR y 3'LTR). B) Fotografía de los cultivos de células MEF transducidas con un vector control sin transgen (Mock) y de MEF transducidas con los 24 factores (*All Factors*); se puede observar la formación de colonias resistentes a G418 (teñidas con cristal violeta) en las células transducidas con los 24 factores. C) Comparación morfológica de las células ES, iPS y MEF vistas por contraste de fase. Las células ES y las iPS muestran la formación de colonias debido a su tamaño reducido, su rápido crecimiento y la interacción celular por de proteínas como la ocludina y la E-cadherina. La barra indica un aumento de 200 μ m.). Tomado de Yamanaka S, Takahashi K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors

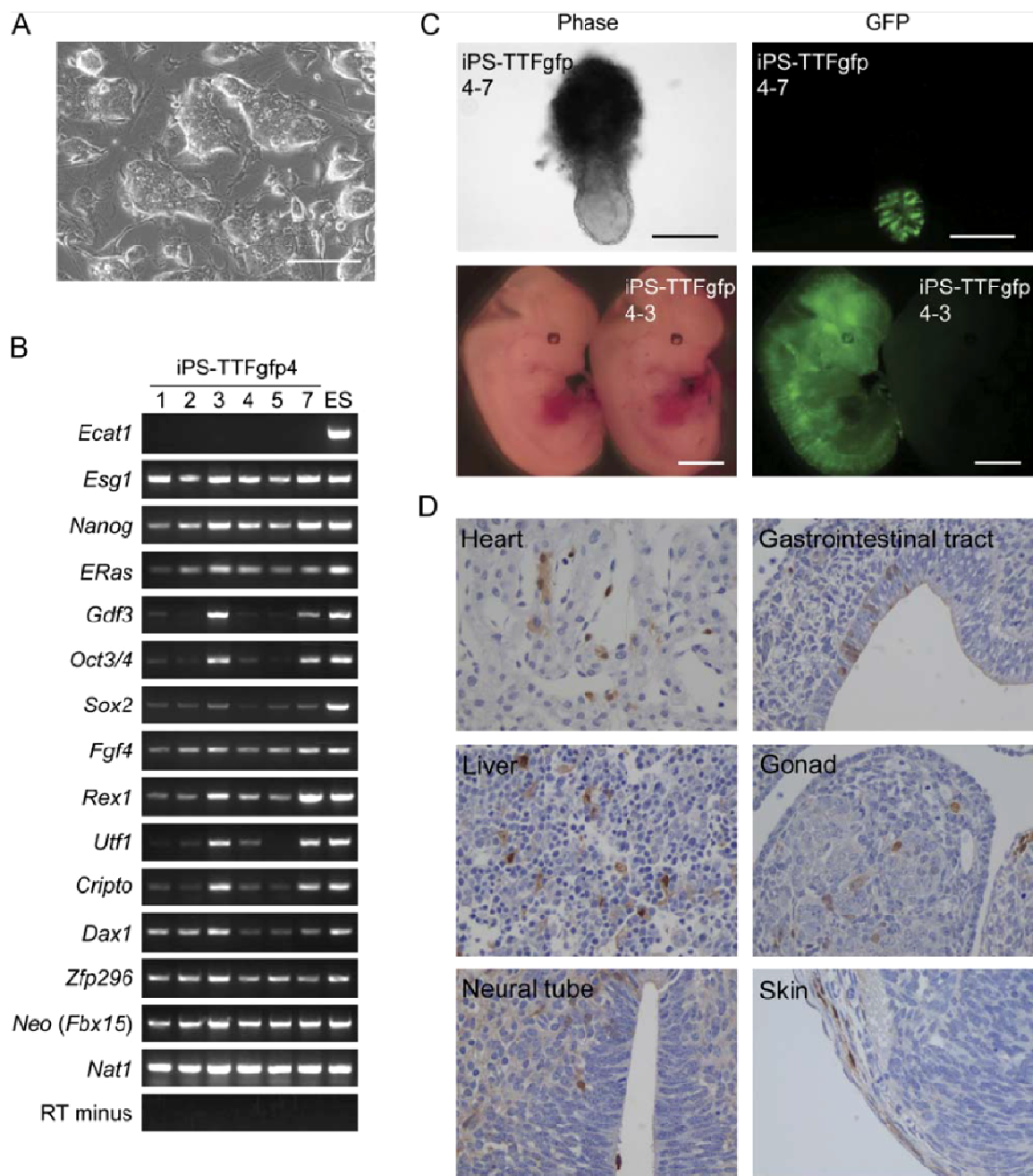


Figura 3. Caracterización de células iPS a partir de fibroblastos de cola de ratón (TTF), reprogramadas con 4 factores (OCT4, SOX2, KLF4 y MYC) marcadas con la proteína verde fluorescente (GFP), realizada por Yamanaka y Takahashi. A) Comparación morfológica de las células ES, las células iPS y las MEF vistas por contraste de fase. B) Análisis de expresión de marcadores de células ES en 6 líneas de células iPS. C) Generación de quimeras por trasplante de células iPS a blastocistos de ratones C57/BL6 observados al estadio E7.5 (fotografías superiores) y al estadio E13 (fotografías inferiores). Tomado de Yamanaka S, Takahashi K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors.

A pesar de la reproductibilidad de la técnica, la inducción de la pluripotencialidad y la generación de iPSC al parecer es un proceso estocástico e ineficiente, obteniéndose menos del 0.1% de células iPS a partir de un cultivo de células diferenciadas. Ahora se sabe que ciertos tipos celulares pueden ser reprogramados de forma más eficiente que otros, y que esto se debe a la presencia o ausencia de un contexto celular adecuado para inducirse la pluripotencialidad. Entre los procesos celulares que promueven la reprogramación se ha comprobado que la transición mesénquima-a-epitelio (MET) es una condición necesaria (ver apartado 1.4.2). Otra condición importante es el estado de ciclo celular, en donde la regulación de supresores de tumores como p21 y p53 juega un papel crucial.^{43,44} Asimismo, el nivel de diferenciación parece ser un factor que influye en la eficiencia de reprogramación,⁴⁵ permitiéndose inclusive la reprogramación de células progenitoras adultas con un menor número de factores.⁴⁶ Una de las alternativas que se ha encontrado con el fin de aumentar la eficiencia de reprogramación es la adición de moléculas orgánicas y fármacos conocidos capaces de influir sobre procesos celulares clave, sea induciendo MET, regulando el ciclo celular, regulando el metabolismo o alterando el estado epigenético.⁴⁷

La aplicación de moléculas orgánicas en la reprogramación in-vitro ha ayudado a entender e identificar los mecanismos implicados. Buena parte del conocimiento actual sobre la función de los factores de reprogramación y del circuito de pluripotencia se ha dado gracias al uso de moléculas inhibitoras de rutas transcripcionales o por medio de RNAs de interferencia. De forma importante, el conocimiento sobre la función y el efecto de la expresión de estos factores ha sido de utilidad para plantear nuevas estrategias terapéuticas en patologías como el cáncer, en cuyas células se ha verificado la expresión de factores como OCT4, SOX2 y NANOG.

Más allá del impacto que tuvo el descubrimiento de Yamanaka y Takahashi a nivel científico, la inducción de la pluripotencialidad in-vitro implicó que las células troncales pluripotentes embrionarias ya no eran indispensables ni para la investigación ni para posibles aplicaciones terapéuticas. Las células troncales embrionarias han sufrido de restricciones bioéticas para su uso tanto en la investigación como en la clínica. El advenimiento de las células pluripotentes inducidas permite saltar los conflictos bioéticos y además permiten generar células pluripotentes específicas para cada paciente lo cual representa una ventaja importante sobre las células ES.

1.4.1 Función del factor de transcripción OCT4 en la inducción de la pluripotencia

La proteína OCT4 es un factor de transcripción clave del circuito regulatorio de la pluripotencia cuyas funciones involucran el mantenimiento de la autorenovación, la inhibición de

la apoptosis, la inhibición de procesos de diferenciación y la inducción de genes del circuito de pluripotencia como *NANOG*. Es un gen indispensable para la inducción de la pluripotencia por reprogramación y solo puede ser reemplazado de forma excepcional bajo ciertas condiciones especiales. Este factor ha podido ser reemplazado por la molécula BIX-01294, inhibidora de la Metil-Transferasa de histona 3 denominada G9a (que a su vez reprime la expresión del gen de *OCT4*) durante la reprogramación de células troncales neurales (NSC), aunque con una baja eficiencia. Esto ha sido posible en este contexto celular dado que las NSC presentan una elevada expresión endógena de *SOX2* y *MYC*.⁴⁸ Así mismo, células de ratón han sido reprogramadas hacia el estado pluripotente reemplazando *OCT4* por el receptor nuclear Nr5a2, un factor de transcripción que al parecer actúa induciendo la expresión de *NANOG*.⁴⁹

1.4.2 Función del factor de transcripción *SOX2* en la inducción de la pluripotencia

En el año 2009, Justin K. Ichida y colaboradores demostraron que la inhibición de la ruta de TGF- β es capaz de reemplazar a *SOX2* en el proceso de reprogramación. Su trabajo se basó en buscar dentro de una biblioteca de moléculas cuál de ellas podía permitir la reprogramación de fibroblastos de ratón en ausencia del factor *SOX2*. Ellos encontraron una molécula, a la cual denominaron RepSox, que era capaz de permitir la reprogramación en ausencia de *SOX2* y que el mecanismo implicado en su acción se basa en la inhibición de la ruta de TGF- β al inhibir la fosforilación de Smad3. Además determinaron que la inhibición de la ruta de TGF- β no induce la expresión de *SOX2* sino más bien induce la expresión de *NANOG* y por tanto demostraron que los pasos iniciales de la reprogramación depende de la inducción de este factor a los 11 días luego de la transducción de los genes *OCT4*, *KLF4* y *MYC*. Sin embargo *NANOG* no es capaz de reemplazar a *SOX2* en el proceso de reprogramación, tal como lo demostró el trabajo previo de reprogramación del grupo de James Thomson en donde se transdujeron los genes *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* y *LIN28*. Por lo tanto el rol de *SOX2* va más allá de la inducción de *NANOG*, probablemente porque el papel de la inhibición de la ruta de TGF- β resulta ser más complejo.

En el mismo año, Nimet Maherali y Konrad Hochedlinger publicaron un artículo similar en donde observan que la inhibición de la ruta de TGF- β por medio de un inhibidor del receptor ALK5 es capaz de aumentar la eficiencia de reprogramación de fibroblastos de ratón desde 0.01 a 0.4% (un aumento en la eficiencia de reprogramación de 40 veces sobre el control).⁵⁰ Dentro de los mecanismos propuestos en dicho artículo mencionan que una probable inhibición de la transición epitelio-mesénquima (EMT) pudiera estar mediando el proceso, dado que TGF- β es un fuerte

inductor de EMT y la reprogramación de fibroblastos involucra una transición mesénquima-epitelio (MET). Este mecanismo un año más tarde (2010) sería confirmado por dos grupos independientes: el de Jeffrey L. Wrana⁵¹ y el de Duanqing Pei.⁵² Ambos grupos llegan a la conclusión de que la EMT es una barrera contra la reprogramación celular y que el favorecimiento del proceso inverso, es decir la MET, aumenta la eficiencia de la inducción de la pluripotencia.⁵³ En base a estas evidencias se podría decir que uno de los mecanismos probables de acción de SOX2 sobre la reprogramación podría incluir la inducción de MET en paralelo con la inducción de NANOG.

1.4.3 Rol de los factores de transcripción KLF4 y MYC en el mantenimiento y la inducción de la pluripotencia

Los factores de transcripción KLF4 y MYC han sido descritos ampliamente como protooncogenes en diversos tipos de cáncer. Sin embargo, es hasta la publicación de Yamanaka y Takahashi sobre reprogramación celular que se encuentra un nexo entre estos factores y el establecimiento de la pluripotencia. Si bien c-MYC es conocido por inhibir a los supresores de tumores P15 y P21, y de esta manera promover la entrada al ciclo celular, se sabe también que cuando este factor es sobre-expresado es capaz de inducir la expresión de P53 y provocar apoptosis.⁵⁴ Por otro lado, Rowland y colaboradores (2005) demostraron que KLF4 también podía tener una función dual, actuando como supresor de tumores y como protooncogen de forma contexto-dependiente.⁵⁵ Es así que KLF4 inhibe P53 pero también induce la expresión de P21. Cuando KLF4 es sobre-expresado en células en las cuales P21 ha sido eliminado, este factor es capaz de inducir una elevada proliferación e inclusive puede provocar transformación en algunas células. Probablemente las células que sufrieron transformación hayan acumulado mutaciones adicionales que les impidió regular adecuadamente su ciclo celular.

Es así que al juntarse la acción de MYC con la de KLF4 en la inducción de la pluripotencia probablemente se crea un contexto celular favorable, en términos de ciclo celular, para procesos de epitelización con una elevada proliferación. Sin embargo, el riesgo de tumorigénesis sigue latente en las células inducidas con el uso de KLF4 y MYC, y por lo tanto se ha intentado inducir la pluripotencia sin la necesidad de MYC, aunque la cinética y la eficiencia de reprogramación se reducen sustancialmente.⁵⁶ Sin embargo con el uso de moléculas orgánicas como ácido valpróico e inhibidores de GSK3 se puede inducir adecuadamente la expresión endógena de MYC durante procesos de reprogramación. Es importante señalar que en células troncales embrionarias y

adultas, KLF4 y MYC se encuentran expresados de forma importante. Probablemente la expresión normal de estos genes tiene lugar bajo un programa celular finamente regulado que impide o bloquea procesos anormales de transformación. Encontrar este sistema regulatorio resulta de importancia para poder generar células iPS con el menor potencial carcinogénico posible al momento de ser trasplantadas, y de esta manera obtener líneas de células iPS lo más parecidas a células ES.

1.5 La reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental

El Dr Tezuka de la Universidad Gifu de Japón, junto con Yamanaka, Takahashi y otros colaboradores en su artículo publicado en el 2010, propusieron utilizar a las células mesenquimales de pulpa dental como fuente para procesos de reprogramación con el fin de crear bancos de células troncales.⁵⁷ Ellos demostraron que las células mesenquimales de la pulpa dental pueden ser reprogramadas con los factores de transcripción propuestos por Yamanaka y Takahashi. Sin embargo ellos establecen una ventaja particular en estas células. Además de ser altamente proliferativas, a diferencia de los fibroblastos dermales, las células mesenquimales de pulpa dental son fácilmente aisladas con un mínimo de invasividad en los procesos quirúrgicos. Este fácil aislamiento ofrece una ventaja importante respecto a las células mesenquimales de médula ósea o de tejido adiposo. Estas ventajas hacen a las células mesenquimales de pulpa dental una fuente celular óptima para el desarrollo de bancos de células para fines de terapia y/o diagnóstico que permitan la generación de células troncales pluripotentes específicas para cada paciente en el momento que éste las requiera.

Otro grupo de investigación publicó en el mismo año un artículo donde se verificó la capacidad de reprogramación de células de tejido oral (Yan X., *et al*; 2010).⁵⁸ Ellos reprogramaron células de la papila apical y CMPD tanto de terceros molares como de dientes temporales extraídos de niños, pero utilizando el conjunto de factores de transcripción propuesto por James Thomson (OCT4, SOX2, NANOG y LIN28). Sus resultados muestran una baja eficiencia de reprogramación, obteniéndose un 0.002% bajo infecciones lentivirales simples y lograron subir la eficiencia hasta un 0.1% bajo un tratamiento de doble infección. Hay que anotar que al realizar dobles infecciones si bien aumenta significativamente la eficiencia de reprogramación también aumenta la probabilidad de causar inactivación génica debido a las múltiples integraciones del transgén lo cual introduce variaciones genéticas que podrían ser indeseables para la funcionalidad

de las células reprogramadas. De forma importante, las múltiples integraciones podrían causar la inactivación de supresores de tumores y facilitar procesos de transformación celular.

En un artículo más reciente publicado en 2011 por Beltrão-Braga y colaboradores en la revista *Cell Transplantation* se asegura por otro lado que las CMPD pueden ser reprogramadas, con el conjunto de factores de transcripción propuesto por Yamanaka, de forma eficiente y con una mayor rapidez en comparación con fibroblatos dermales.⁵⁹ De forma importante ellos revelan que las CMPD pudieron ser reprogramadas inclusive en ausencia de células alimentadoras. Tomando en cuenta que las condiciones de cultivo utilizadas por este grupo de investigación no difiere de forma importante de aquellas utilizadas por Yan y colaboradores, al parecer la diferencia en la eficiencia de reprogramación puede estar relacionada con el conjunto de factores utilizados para la reprogramación. En otras publicaciones se ha observado que el conjunto de factores propuestos por Thomson permiten la reprogramación a una menor eficiencia que el conjunto propuesto por Yamanaka, indicando que KLF4 y MYC son potenciadores importantes de la reprogramación y que esto resulta más notorio en la reprogramación de células humanas.

1.6 Los retrovirus y los vectores lentivirales

Los lentivirus son virus de la familia *Retroviridae* o Retrovirus, y por tanto son virus con envoltura con genoma de RNA monocatenario de cadena positiva (RNA+) que se replican por la generación de un DNA intermediario integrable. La generación del DNA intermediario es mediada por la retrotranscriptasa del virus. En los retrovirus el genoma viral se encuentra flanqueado por repeticiones denominadas LTR (Repeticiones Largas Terminales) conteniendo un 3'LTR y un 5'LTR, y una secuencia de reconocimiento de empaque denominada Ψ ubicada a 3' del 5'LTR. Los genes contenidos en el genoma de los retrovirus se organiza en una secuencia básica 5'-Gag-Pol-Env-3', que codifican para los componentes básicos del virión: los genes Gag que codifican para proteínas de la cápside y la matriz; los genes Pol que codifican para la retrotranscriptasa, proteasa y la integrasa; y los genes Env que codifican para proteínas de la envoltura del virus (Figura 4). Un promotor ubicado en el 5'LTR dirige la transcripción de los genes virales.

El grupo de los lentivirus, al cual pertenece el HIV-1, se caracteriza por ser más complejo en la composición de su genoma respecto a otros retrovirus como los oncoretrovirus. Por ejemplo el HIV-1, además de los genes Gag, Pol y Env, posee dos grupos de genes con funciones adicionales para su ciclo de vida: los genes reguladores Rev y Tat y los genes accesorios Vpr, Vpu, Vif y Nef (Figura 4: Lentivirus). La proteína Tat es necesaria para la transcripción de los genes a partir del

promotor 5'LTR. La proteína Rev se une a la secuencia RRE (*Rev Response Element*) del genoma de RNA para permitir la exportación nuclear eficiente del RNA no empalmado, necesaria para el empaquetamiento del genoma y la expresión de los genes Gag y Pol. La proteína Vpr está involucrada en el arresto en la fase G2 del ciclo celular y en la importación nuclear del complejo de pre-integración (PIC).^b La proteína Vpu es una proteína de 15kDa encargada de la formación de canales iónicos que mejoran la liberación de partículas virales. La proteína Vif está implicada en la replicación del virus en condiciones ex-vivo. La proteína Nef aumenta la capacidad infectiva de las partículas virales por mecanismos aún no bien descritos.⁶⁰

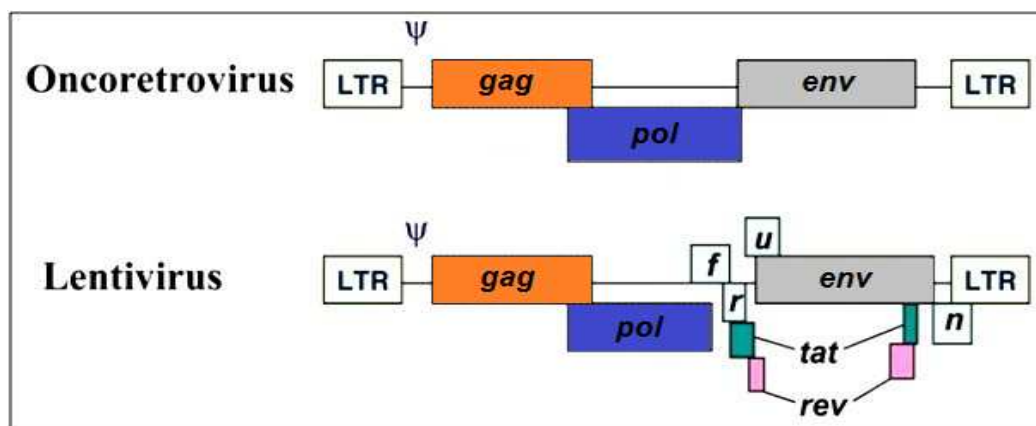


Figura 4. Estructura de los genes en los genomas de dos tipos de retrovirus. Se puede observar la estructura sencilla del genoma de los oncoretrovirus, constituida por los genes gag, pol y env, comparada con la estructura más compleja del genoma del lentivirus. En los lentivirus como el HIV-1 se encuentran también los genes para las proteínas tat, rev, vpu (u), vif (f), vpr (r) y nef (n). La secuencia de señal de empaquetamiento Ψ se encuentra sobrelapada con la secuencia líder de gag. Tomado de: Hunt KK, Vorburger SA, Swisher SG. Cancer Drug Discovery and Development: Gene Therapy for Cancer.⁶¹

El efecto de todo este grupo de proteínas en el ciclo de vida del lentivirus refleja la distinción de éstos sobre otros retrovirus (Figura 5). Las partículas lentivirales se anclan a la membrana de las células blanco (generalmente linfocitos T, B, macrófagos, astrogliá y microglia) a través de interacciones específicas de sus glicoproteínas de la envoltura con receptores de la membrana de la célula, principalmente la proteína CD4 en lentivirus de primates, y receptores de quimiocinas como CXCR4 y CCR5. La envoltura viral se fusiona con la membrana plasmática liberando la cápside viral dentro del citoplasma. La cápside se desarma por acción de la proteasa viral y la retrotranscriptasa rápidamente inicia la síntesis de DNA viral bicatenario. Una vez generado el

^b El complejo de pre-integración (PIC) es una nucleoproteína que en el caso del HIV-1 se compone del genoma de cDNA viral, proteínas de la matriz viral, la proteína Vpr, la Integrasa y proteínas celulares del hospedero. Este complejo proteico está encargado de facilitar los procesos de integración del cDNA viral en el genoma de la célula.

DNA viral se inicia el armado del PIC en el que participan proteínas de la matriz viral, la proteína Vpr, la Integrasa y proteínas celulares del hospedero.⁶²

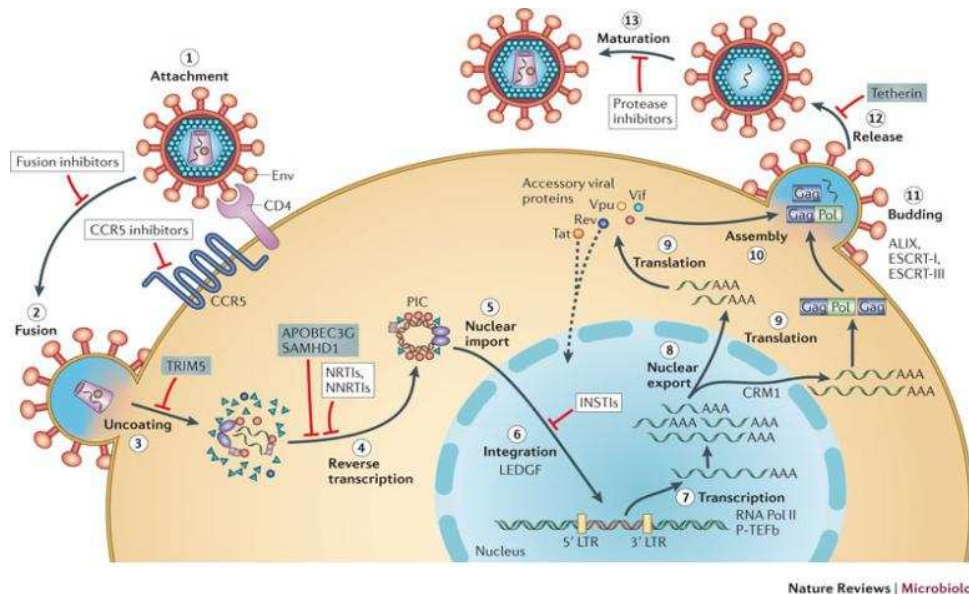


Figura 5. Ciclo de vida del lentivirus. La partícula lentiviral entra en contacto con la célula por interacciones con receptores de membrana (1) y se fusiona a la membrana celular liberando la cápside en el citoplasma (2). La cápside es degradada (3) y libera el genoma que es rápidamente retrotranscrito en DNA de doble cadena (4). El DNA bicatenario del virus es transportado al núcleo formando al PIC (5), para luego ser integrado de forma aleatoria en el genoma de la célula (6). Una vez integrados, los genes virales son transcritos (7) inicialmente como genes empalmados y posteriormente como RNAs no empalmados por efecto de la síntesis de la proteína Rev. Estos RNAs son exportados del núcleo (8) y traducidos por la maquinaria celular en el citosol (9). Los componentes virales sintetizados son ensamblados cerca de la membrana plasmática donde se anclan las proteínas de la matriz y de la cápside viral (10). Este ensamblaje genera vesículas que brotan de la membrana plasmática con los componentes virales dentro de una envoltura compuesta por proteínas transmembrana y de superficie codificados por los genes env (11). Las partículas virales son liberadas (12) y la proteasa viral va madurando a las proteínas de la cápside para estabilizar el genoma interior. Tomado de: Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. (2012).

Las proteínas de la matriz son clave en la entrada del PIC al núcleo de células no proliferativas (en estado de quiescencia o en diferenciación terminal) ya que dichas proteínas poseen una secuencia líder de importación nuclear presente particularmente en los lentivirus y ausente en otros retrovirus como el *Molony Murine Leukemia Virus* (MLV) el cual también ha sido utilizado como vector de transducción génica. Una vez que el PIC se encuentra en el núcleo, el DNA bicatenario se recombina con el genoma celular por medio de la integrasa, por lo que queda integrado de forma estable. Una vez integrado, el genoma viral es transcrito a mRNA por medio del promotor ubicado en el 5'LTR. El mRNA viral inicial se empalma normalmente generando las proteínas de los genes accesorios y reguladores. Es decir que inicialmente se acumularán proteínas como Nef, Rev y Tat. Particularmente Rev y Tat se importarán al núcleo para iniciar su función,

momento en el que Rev cumplirá con la exportación de RNA no empalmado para la traducción de los genes Gag, Pol y Env, y para el empaquetamiento del genoma de RNA. En la figura 5 se resumen los procesos que ocurren durante el ciclo de vida del lentivirus HIV-1.

1.6.1 Construcción de los vectores lentivirales

Para la construcción de vectores virales es necesario tomar en cuenta la necesidad de eliminar su capacidad para auto-replicarse dentro de las células blanco, lo cual implica eliminar su virulencia. En el caso de los vectores retrovirales esto se ha hecho posible utilizando sistemas de producción de partículas virales por la transfección de plásmidos portadores de los genes virales, contruidos de tal forma que los genes implicados en el ensamblaje del virus no sean empacados dentro de las partículas virales generadas. Los plásmidos son transfectados a células altamente proliferativas (células productoras), tal como la línea de células inmortalizadas de epitelio renal denominada HEK293T, para que su maquinaria celular permita la generación de las partículas virales. Para la generación de partículas virales no replicativas, los genes virales fueron separados en dos plásmidos: un plásmido de empaque portador de los genes Gag y Pol, y un plásmido de envoltura portador de los genes Env. Los genes Env han sido reemplazados por otros genes codificadores de proteínas de fusión celular como la proteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular (VSV-G) la cual es altamente fusogénica. Los plásmidos de empaque y envoltura carecen de la secuencia Ψ y por tanto sus productos de transcripción no son capaces de empacarse dentro de la cápside viral. Un tercer plásmido, denominado plásmido de transferencia, es utilizado como la construcción de transferencia del gen de interés y por lo tanto es portador de secuencias LTR así como la secuencia de empaque Ψ (Figura 6). Tanto el plásmido de transferencia como los plásmidos de empaque y envoltura deben ser transfectados dentro de las células productoras para el ensamblaje de las partículas virales. Las partículas virales son liberadas hacia el medio de cultivo y pueden ser recuperadas a partir de éste para su uso en la infección de las células blanco.

A pesar de la mayor complejidad de los lentivirus sobre otros retrovirus la investigación sobre la función de sus genes regulatorios y accesorios ha hecho posible construir vectores de tipo lentiviral con el menor efecto citotóxico. Los genes para proteínas accesorias como Vpr, Vpu, Nif y Vif han sido eliminados de las construcciones utilizadas actualmente para fines de transgénesis con el fin de eliminar su citotoxicidad, y se ha observado que dicha eliminación no afecta su capacidad infectiva. Así mismo, la secuencia reguladora Tat no es necesaria para la transcripción independiente del promotor viral presente en el 5'LTR y por tanto también es eliminada en los

vectores retrovirales construidos actualmente en los que se utilizan otros promotores fuertes para dirigir la expresión del transgén. Aunque estas secuencias han sido eliminadas de los vectores lentivirales, otras secuencias accesorias y reguladoras han sido mantenidas debido a su papel importante en la generación de partículas virales. Secuencias como el del gen Rev y su secuencia de reconocimiento RRE son cruciales para la funcionalidad del vector lentiviral. Otra secuencia como el *Central poly-Purine Tract* o cPPT, es necesaria para aumentar el título viral al aumentar la eficiencia de la importación nuclear del PIC. Una secuencia reguladora denominada PRE, aislada del Virus de la hepatitis *Woodchuck* es comúnmente incluida hacia 3' del gen de transferencia con el fin de mejorar la exportación nuclear de su mRNA. La inclusión de estas secuencias permite generar partículas virales con un elevado título en el medio de cultivo recuperado de las células productoras. Sin embargo el título viral no es el único factor que influye su capacidad infectiva en las células blanco. La capacidad infectiva del virus está también influida por el tipo celular que es transducido, de tal manera que las células epiteliales y fibroblásticas son fácilmente transducibles con vectores lentivirales, mientras que las células no adherentes como las hematopoyéticas son transducidas con menor eficiencia con estos vectores. Este es el problema más notable al momento de querer sobre-expresar genes por medio de vectores lentivirales en células de alto interés clínico como las células troncales hematopoyéticas.

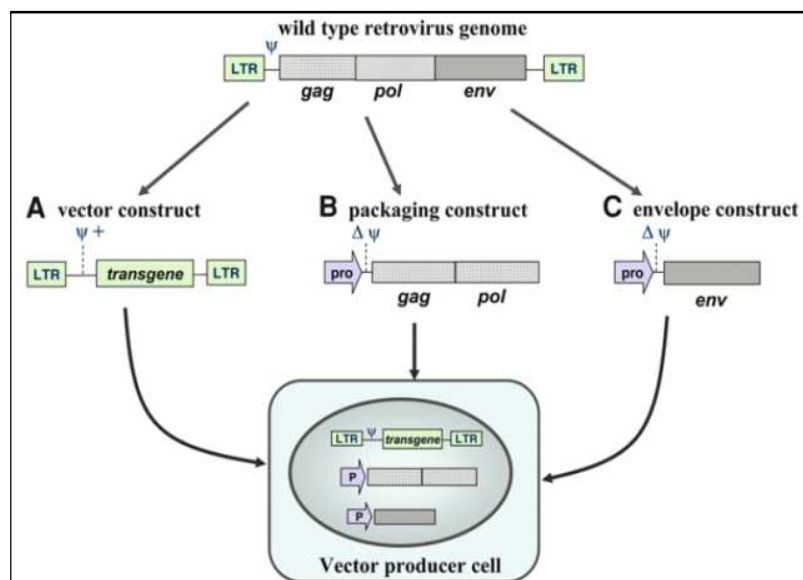


Figura 6. Construcción de vectores retrovirales. Los vectores retrovirales son construidos tomando en cuenta la estructura básica del genoma viral y separándolo en tres vectores plasmídicos: A) un vector de transferencia (*vector construct*) portador del gen de interés, los extremos LTR y la secuencia de empaque Ψ , B) un vector de empaque (*packaging construct*) portador de los genes Gag y Pol, y C) un vector de envoltura portador de la proteína de envoltura para la entrada de la partícula viral en la célula blanco.

1.6.2 Los vectores lentivirales en la reprogramación celular in-vitro

La reprogramación celular in-vitro con el trabajo de Yamanaka y Takahashi fue posible con el uso del vector retroviral pMX construido a partir del oncoretrovirus MLV.⁶³ Sin embargo, la eficiencia de transducción de los vectores retrovirales es menor que la de los vectores lentivirales. Esto es particularmente cierto en el caso de células en estado de quiescencia como las HSC, ya que, como se mencionó anteriormente los genes Gag carecen de secuencias de importación nuclear y por tanto dependen del desarmado de la envoltura nuclear durante la mitosis. Por tal motivo se prefiere el uso de vectores lentivirales derivados del HIV-1 para realizar ensayos de transgénesis en los que se requiere una alta expresión. La reprogramación es uno de estos casos en los que se requiere que la expresión del transgén sea elevada y sostenida. Por medio de vectores lentivirales con promotores doxiciclina-inducibles TetO, el grupo del Dr. Rudolf Jaenisch determinó que la expresión sostenida de los transgenes de OCT4, SOX2, KLF4 y MYC debía durar como mínimo 12 días para que la reprogramación sea efectiva e irreversible. Por este motivo los vectores de tipo lentiviral son preferidos sobre los retrovirales para procesos de reprogramación y transgénesis en general.

1.6.3 Vectores lentivirales policistrónicos y su aplicación en la reprogramación celular

Además de lo conocido en genes bacterianos, la expresión de genes como policistrones ha sido observada en algunos géneros de virus de animales y plantas y en algunos animales como *Trypanosoma* y *Caenorhabditis*. Otras secuencias aisladas de ciertos virus han sido aprovechadas para generar vectores bicistrónicos como las secuencias IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) las cuales son secuencias que permiten el inicio de la traducción de forma independiente del factor de iniciación eIF4 (y por lo tanto independiente de la generación el 5'CAP). Esta propiedad de las secuencias IRES es utilizada por algunos virus con el fin de expresar sus genes bajo condiciones en las cuales la célula es incapaz de llevar a cabo traducciones eficientes, aprovechando de esta manera los recursos traduccionales de la célula. A su vez dicha propiedad de las secuencias IRES ha sido ventajosa para la construcción de vectores que permiten la expresión de genes en eucariontes en arreglos bicistrónicos. Es así que un gen de interés y un gen reportero pueden ser expresados simultáneamente bajo la dirección de un mismo promotor al ser ubicados en tándem colocando una secuencia IRES entre éstos. Sin embargo esta estrategia ha mostrado el inconveniente de que la expresión del cistron ubicado hacia 3' del IRES se expresa a una tasa

menor que el cistron ubicado a 5'. Este inconveniente resulta problemático cuando se requiere de la expresión estequiométrica de las dos proteínas.⁶⁴

Otro sistema policistronico, y quizás el más exitoso hasta ahora, es el sistema de sitios 2A cuyas secuencias fueron identificadas en Picornavirus. Los sitios 2A son secuencias de 18 pares de bases que codifican el péptido consenso Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro.⁶⁵ Estos péptidos son capaces de mediar el "corte" específico al inicio de cada cistron de forma co-traduccional (la secuencia 2A quedará unida al C-terminal de cada cistron excepto el último). El mecanismo más aceptado por el cual los sitios 2A median este efecto es por una supuesta interferencia en la formación del enlace peptídico durante la traducción por interacción con el sitio de actividad peptidil-transferasa del ribosoma.⁶⁶ La función de estas secuencias 2A puede involucrar el optimizar la expresión de los genes virales dirigida por un mismo promotor fuerte dentro de un genoma pequeño. Esta misma función es aprovechada para la generación de vectores policistronicos capaces de mediar la expresión estequiométrica de varios transgenes dirigida por un mismo promotor fuerte.

El grupo de investigación del Dr. Rudolf Jaenisch del Instituto de Tecnología de Massachusetts fue el primero en proponer el uso de vectores policistronicos para procesos de reprogramación. En el artículo titulado *Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector* (Carey BW, et al, 2009) el grupo de Jaenisch demuestra que es posible reprogramar MEF, TTF y queratinocitos humanos utilizando un vector policistronico portador de los cDNA para OCT4, SOX2, KLF4 y MYC arreglados en tándem y separados por sitios 2A. Las células iPS generadas por medio de este vector mostraron todas las características de células pluripotentes tanto in-vitro como in-vivo.⁶⁷

Posteriormente, el grupo de investigación del Dr. José Bernardo Cibelli construyó un vector lentiviral policistronico para la reprogramación eficiente de células humanas bajo condiciones libres de xenobióticos.⁶⁸ Su construcción tomó en cuenta la posible toxicidad inducida por la sobre-expresión de MYC y por lo tanto ubicaron a los genes *OCT4*, *KLF4* y *SOX2* en tándem separados por sitios 2A y al final colocaron a MYC precedido por un sitio IRES con el fin de bajar la expresión de este gen respecto a los otros tres. Debido a la presencia de este sitio IRES el vector fue denominado OKSIM (O, OCT4; K, KLF4; S, SOX2; I, IRES; M, MYC). Con el uso de este vector el grupo de Cibelli logró reprogramar fibroblastos dermales humanos observando crecimiento de colonias al día 21 post-infección. En el presente proyecto utilicé el vector OKSIM para inducir la

reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental, dado que estas células ya tienen una expresión endógena de MYC. Además los sistemas policistrónicos ofrecen la ventaja de que la expresión de los factores reprogramadores solo requiere de la producción de un solo vector lentiviral.

2. Planteamiento del problema

La reprogramación celular se plantea actualmente como una alternativa muy atractiva para la obtención de células troncales pluripotentes humanas sin el uso de embriones. Sin embargo uno de los inconvenientes principales es que la fuente celular a la que se induzca la pluripotencia debe ser altamente proliferativa y fácilmente transfectable o transducible con los vectores de reprogramación. Además resulta mucho más factible utilizar fuentes celulares accesibles, que no requieran de métodos invasivos para su obtención y que puedan ser obtenidas de individuos adultos.

Las células mesenquimales, al ser altamente proliferativas y fácilmente manipulables, son un tipo celular atractivo para su uso en procesos de reprogramación ya que pueden ser mantenidas y expandidas en cultivo durante varios pases y pueden ser criopreservadas para su uso futuro. Se han identificado y caracterizado varias fuentes de células mesenquimales adultas, sin embargo las células mesenquimales derivadas de la pulpa dental se presentan como una alternativa óptima debido principalmente a que para su obtención no se requiere de métodos tan invasivos como lo requieren las CMM de médula ósea o de tejido adiposo. A pesar de las ventajas existentes con las células mesenquimales, la eficiencia de reprogramación en células adultas sigue siendo bastante baja aún con el uso de métodos de alta eficiencia de expresión. Por tanto establecer protocolos adecuados de reprogramación de células humanas adultas, utilizando herramientas moleculares que permitan estudiar de forma más eficiente los procesos celulares de la reprogramación celular resulta de gran importancia para el avance en el área biomédica en este campo.

Aún bajo una fuente celular óptima la necesidad de inducir la expresión de cuatro factores de transcripción exige un buen control de la expresión estequiométrica de estos factores para que el proceso pueda ser reproducible. Además al utilizar vectores integrables que inducen la expresión de los factores reprogramadores de forma separada existe una carga mayor de transgenes integrados capaces de inducir cambios genéticos importantes como la inactivación de genes supresores de tumores. En el presente proyecto planteo utilizar un vector lentiviral policistrónico

(OKSIM) con el fin de facilitar la transferencia de los genes necesarios para establecer la inducción del estado pluripotente en células diferenciadas (*OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYC*). Esta estrategia no solo me permite realizar una sola producción viral para la transducción de las células mesenquimales sino también asegura la transducción de los 4 factores de forma controlable y reduce la sobrecarga de transgenes integrados para inducir una reprogramación efectiva. Este vector también tiene la propiedad de disminuir la expresión relativa del último citrón que codifica para *MYC*, el cual es un oncogén que resulta tóxico cuando es sobre-expresado en una célula. Esto es particularmente importante en células mesenquimales las cuales ya expresan *MYC* de forma basal. Así mismo, se utilizará un vector lentiviral reportero, PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP, que permita observar colonias reprogramadas desde los momentos iniciales de inducción y de esta manera aislar de forma más confiable aquellas células que muestren cambio morfológico.

Además se utilizará un inhibidor de la ruta de TGF- β como adyuvante de la reprogramación. Como ya fue mencionado en la introducción, la ruta de TGF- β limita la inducción de la pluripotencia al bloquear los procesos de epitelización. En el caso de las células mesenquimales de alta proliferación, la epitelización es un punto limitante en la eficiencia de reprogramación debido a que el “programa mesenquimal” (opuesto al estado epitelial) gobierna el contexto celular en las CMM de forma estable. Es así que en este proyecto se plantea utilizar la molécula SB431542, inhibidora del receptor de ALK5, para aumentar la eficiencia de reprogramación en las CMPD.

3. Hipótesis

Las células mesenquimales de pulpa dental humana pueden ser reprogramadas hacia el estado pluripotente con el uso de un vector policistrónico que codifica los factores de transcripción *OCT4*, *KLF4*, *SOX2* y *MYC*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer un protocolo de reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental humana hacia el estado pluripotente, utilizando un vector lentiviral de tipo policistrónico.

4.2 Objetivos particulares

- Aislar células mesenquimales de pulpa dental a partir de terceros molares de pacientes sanos.
- Cultivar células mesenquimales de pulpa dental utilizando un medio de cultivo que permitan su expansión in-vitro.
- Caracterizar a las células mesenquimales expandidas según sus características inmunofenotípicas y sus propiedades funcionales.
- Caracterizar a las células mesenquimales expandidas por la expresión de los factores OCT4, SOX2, KLF4, MYC y NANOG.
- Estandarizar el proceso de generación de vectores lentivirales y diseñar un sistema de titulación viral.
- Estandarizar el proceso de reprogramación en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF).
- Transducir células mesenquimales de pulpa dental con el vector policistrónico OKSIM y con el vector reportero PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP con y sin el uso del inhibidor de ALK5, SB431542.
- Caracterizar las colonias de iPS aisladas por la expresión de los factores OCT4, SOX2 y NANOG, y por la expresión de las proteínas de superficie Tra1-60, Tra1-81 y SSEA-4.
- Caracterizar funcionalmente a las colonias de iPS aisladas por su capacidad para formar cuerpos embrioides y para diferenciarse in-vitro.
- Caracterizar funcionalmente a las colonias de iPS aisladas por su capacidad para formar tumores en ratones *FoxN1nu*.

5. Metodología

5.1 Aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental

Para el aislamiento de células mesenquimales de pulpa dental (CMPD) se colectaron terceros molares de pacientes sanos de edades comprendidas entre 15 y 20 años, bajo carta de consentimiento y con la aprobación del Comité de Bioética del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM). Los dientes fueron colocados en la solución HBSS (*Hank's Balanced Solution Saline*; Invitrogen) estéril suplementada con antibiótico y antimicótico a 2X (Anti-Anti; Invitrogen). Se separó el tejido gingival y se desinfectó la superficie del diente sumergiéndolo en una solución

oral antiséptica baja en alcohol. Se trituró el diente para exponer la pulpa utilizando fórceps debidamente desinfectados. Utilizando pinzas estériles, se retiró la pulpa y se la sumergió en medio DMEM suplementado con antibiótico. Se cortó la pulpa en fragmentos pequeños utilizando un bisturí. Los pedazos de pulpa fueron digeridos parcialmente por tratamiento con colagenasa I (Sigma) a 3 mg/ml hasta un volumen de 2 mL durante 30 minutos a 37°C. Luego de la digestión se adicionaron 2 mL de medio DMEM (*Dulbenco's Modified Eagle Medium*; Gibco) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 20% (medio de inactivación). Se centrifugó la suspensión a 300xg por 10 minutos. El precipitado fue resuspendido en medio de cultivo completo y cada digestión (correspondiente a una pulpa dental) fue sembrada en un pozo separado en platos de 6 pozos o en platos de 60 mm. El medio de cultivo completo consiste de medio OptiMEM (Gibco) suplementado con SFB al 5%, ácido ascórbico (Sigma) 100 μ M, β -mercaptoetanol (Sigma) 50 μ M, EGF (Peprotech) 10 ng/mL, PDGF (Peprotech) 10 ng/mL y Antibiótico-Antimicótico (Invitrogen). Las pulpas digeridas fueron sembradas en este medio y fueron mantenidas dentro de una incubadora a 37°C con 5% de CO₂. Se cambió el medio cada 2 días.

5.2 Cultivo de células mesenquimales de pulpa dental

Una vez que las colonias de células mesenquimales migraron fuera de los pedazos de pulpa y empezaron a tornarse confluentes, éstas fueron levantadas por tratamiento con 1 mL de dispasa (Stem Cell Technologies) a 1 mg/mL durante 10 minutos a 37°C. Las células en suspensión fueron llevadas a 5 mL de medio completo, fueron centrifugadas a 300xg y el precipitado celular fue resuspendido en 2 mL de medio completo. Luego las células fueron sembradas en 3 botellas T25 con 4 mL de medio de cultivo completo. A este proceso se le denominó "pase 1". Luego de la siembra en pase 1, se cambió el medio cada segundo día y se esperó hasta que las células alcancen un 70% de confluencia (aproximadamente 2×10^6 células por botella). En este momento, las células fueron levantadas nuevamente por tratamiento con dispasa y fueron resembradas a una densidad de 2×10^5 células por botella o utilizadas para ensayos de reprogramación o de caracterización por su donogenicidad, su tiempo de doblaje, análisis inmunoquímicos y análisis funcionales.

5.3 Caracterización inmunofenotípica de las células mesenquimales de pulpa dental

Las células mesenquimales de pulpa dental fueron caracterizadas por medio de técnicas de inmunofluorescencia y citometría de flujo. Por medio de citometría de flujo se analizaron los marcadores CD14, CD31, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD105, CD146, HLA-ABC y HLA-DR. Los anticuerpos para citometría de flujo fueron adquiridos de la empresa Miltenyi. El marcaje para el

análisis por citometría de flujo se basó en el protocolo adjunto a cada anticuerpo según lo sugiere la casa comercial (Miltenyi). En resumen, las células fueron llevadas a suspensión homogénea y se resuspendieron 5×10^5 células en 100 uL de *buffer* para citometría, el cual consiste en PBS suplementado con EDTA 2 mM y albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5%. Luego se adicionaron 10 uL de anticuerpo marcado, se mezcló suavemente por pipeteo y se incubó a 4°C durante 15 minutos. Luego se adicionaron 2 mL de *buffer* y se centrifugó a 300xg durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 500 uL de PBS suplementado con EDTA 2 mM y 100 uL de paraformaldehído al 4%. La suspensión celular fue analizada inmediatamente por citometría de flujo en el equipo FACScalibur (Becton Dickinson). El análisis estadístico de la citometría fue realizado utilizando el programa CellQuest (Becton Dickinson).

Por medio de inmunofluorescencia se analizó la presencia de las proteínas Oct4, Sox2 y Nanog en las CMPD. Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de estas proteínas fueron anticuerpos policlonales de conejo de isotipo IgG (Stemgent Inc.). El anticuerpo secundario utilizado para la caracterización inmunofenotípica fue un Goat-Anti-rabbit IgG marcado con Alexa 594 (Abcam). El proceso de marcaje por inmunofluorescencia se basó en protocolos establecidos en la bibliografía con pequeñas modificaciones. En resumen, se sembraron 5×10^3 células en cada pozo en una placa LabTek (LabTek Chamber Slides; Nunc) cubierta previamente con gelatina, en medio de cultivo completo y se esperó hasta que las células alcanzaran una confluencia del 70%. Posteriormente las células fueron fijadas por tratamiento con paraformaldehído al 4% durante 20 minutos y se lavó por 3 ocasiones con 300 uL de PBS. Luego las células fueron permeabilizadas por tratamiento con Tritón-100 al 0.3% en PBS durante 5 minutos y se lavó por 3 ocasiones con 300 uL de PBS. Posteriormente los pozos fueron "bloqueados" de interacciones inespecíficas por tratamiento con SFB al 3% en PBS estéril durante 1 hora a temperatura ambiente y se lavó por 3 ocasiones con 300 uL de PBS. Se diluyó el anticuerpo primario en PBS suplementado con BSA al 3% y Tritón-100 al 0.05% a la concentración requerida y al volumen adecuado para adicionar 200 uL en cada pozo.^c Se incubó a 4°C durante la noche (aproximadamente 12 horas) o a temperatura ambiente por 1 hora y se lavó 3 veces con 300 uL de PBS, por 3 minutos cada lavado. Se diluyó el anticuerpo secundario a una dilución 1:1000, agregando el volumen necesario para adicionar 200 uL por pozo. Se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora fuera del alcance de la luz y luego se lavó 3 veces con 300 uL de PBS. Se adicionaron 200 uL de una solución de DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-

^c La dilución del anticuerpo fue estandarizada según lo recomendado por la casa comercial de donde proviene el anticuerpo.

indol) 100 mM y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos fuera del alcance de la luz. En caso de querer preservar las placas, se secaron totalmente los pozos y se desmontó la placa de las paredes plásticas. Se cubrió la placa con 2 gotas de aceite *anti-fade* y se colocó un cubre-objetos sobre ésta. La señal de fluorescencia fue analizada utilizando un microscopio de fluorescencia invertido Olympus (modelo IX71).

5.4 Caracterización funcional de las células mesenquimales de pulpa dental

Las células mesenquimales de pulpa dental fueron caracterizadas por su capacidad de diferenciación hacia 3 linajes mesenquimales: osteoblastos, condrocitos y adipocitos. Para esto se utilizaron medios de diferenciación comerciales *Stempro Osteogenesis, Adipogenesis & Chondrogenesis Differentiation kit* (Gibco). Para la inducción de la diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica se sembraron 1×10^5 células en platos de 100 mm en presencia del medio de diferenciación y se cultivó durante 14, 21 y 28 días, respectivamente. Luego de este periodo de inducción las células fueron fijadas con ácido acético/metanol (1:7) frío por 5 minutos. Para la detección de la diferenciación hacia adipocitos, las células fueron teñidas con Rojo Oleoso (*Oil Red O working dilution*; Sigma). Para la detección de la diferenciación hacia osteoblastos se realizó un ensayo de actividad de la fosfatasa alcalina utilizando el sistema SigmaFast BCIP®/NBT (Sigma). Para la detección de la diferenciación hacia condrocitos las células fueron teñidas con solución Azul de Alciano al 1% (en solución de ácido acético al 3%) durante 30 minutos.

5.5 Caracterización por análisis de tiempo de doblaje y clonogenicidad de las mesenquimales de pulpa dental

Para el análisis de tiempo de doblaje se sembraron 5×10^4 células por pozo en un plato de 6 pozos. Las células fueron cultivadas en medio completo suplementado con SFB al 2%. Se realizaron conteos del número de células obtenidas a las 48, 72 y 96 horas de incubación con este medio de cultivo, realizando 2 repeticiones por cada tiempo. El tiempo de doblaje (td) fue obtenido a partir de la fórmula:

$$\ln A = \frac{\ln 2}{td} t + \ln A_0 ,$$

donde t es el tiempo transcurrido hasta el momento del conteo (medido en horas), A_0 es el número de células al inicio del experimento (5×10^4) y A es el número de células al tiempo t . El valor de td se obtuvo de la pendiente de la curva $\ln A$ vs t a los diferentes tiempos de conteo. Los conteos celulares se realizaron por medio de una cámara de Neubauer con un factor de dilución 2

(proporción 1:1) en azul de tripano (Gibco) a partir de diluciones celulares de 1 mL. Para el ajuste de tendencia lineal se utilizaron los datos de conteo y su respectiva desviación estándar, y fue calculado por medio del programa GraphPad Prism.

Para el análisis de clonogenicidad se sembraron 100 células en un plato de 100 mm y se esperaron de 10 a 15 días hasta observar el crecimiento de colonias con alrededor de 50 células. En este momento las células fueron fijadas con ácido acético/metanol (1:7) frío por 5 minutos y teñidas con cristal violeta al 0.5%. Se realizaron 4 repeticiones experimentales y se reportó la media y la desviación estándar.

5.6 Aislamiento y cultivo de fibroblastos embrionarios de ratón

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) fueron obtenidos de ratones hembra de la cepa CD1(ICR) con 13.5 días de gestación utilizando protocolos establecidos.⁶⁹ Las células fueron sembradas en platos de 100 mm, mantenidas en medio DMEM (Gibco) suplementado con SFB al 10% y Antibiótico-Antimicótico, e incubadas a 37°C y 5% de CO₂. Al alcanzar una confluencia del 80-90% las células fueron levantadas por tratamiento con 2 mL tripsina al 0.1% durante 5-10 minutos a 37°C. Pasado este lapso se agregaron 2 mL de medio DMEM suplementado con 20% de SFB para inactivar la tripsina, posteriormente la suspensión celular fue centrifugada a 300xg durante 5 minutos y finalmente las células fueron resembradas a una densidad de 1×10^6 células por plato de 100 mm (1.27×10^4 células por cm^2). A este proceso se le denominó “pase”. Para el experimento de inducción de pluripotencia utilicé MEF del primer pase. Para generar células alimentadoras o *feeder* a partir de fibroblastos utilicé MEF de los pases 3 a 6.

5.7 Preparación de células alimentadoras para el mantenimiento de células iPS

Células MEF confluentes de pases 2 a 5 cultivadas en platos de 100 mm fueron tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mitomicina en 10 mL de medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB, por un periodo de 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Luego las células fueron lavadas 3 veces adicionando 8 mL de medio DMEM-F12 sin suero. Posteriormente las células fueron levantadas por tratamiento con 2 mL de tripsina al 0.1% suplementada con EDTA 1mM, durante 5 minutos a 37°C. La tripsina fue inactivada con 2 mL de medio DMEM-F12 suplementado con SFB al 20% y fue transferida a un tubo de 15 mL. A la suspensión celular se le adicionó 2 mL de DMEM-F12, se mezcló por pipeteo para homogenizar la suspensión y se recuperó una alícuota de 10 μL para efectuar un conteo celular por medio de un hemocitómetro de Neubauer. La suspensión celular fue centrifugada a

300xg por 5 minutos y resuspendida en 2 mL de medio DMEM-F12. Se sembraron 5×10^4 células/cm² en medio DMEM-F12 suplementado con SFB al 10% y antibiótico-antimicótico. El medio se cambió cada tercer día hasta su uso, el cual no fue mayor a 1 semana luego del tratamiento con mitomicina.

5.8 Plásmidos utilizados

Para la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón utilicé vectores de transferencia bicistrónicos FUW-SO y FUW-KM portador de los genes POU5F1 (OCT4) junto con SOX2, y KLF4 junto con MYC, respectivamente (Anexo #3). Para el proceso de reprogramación de células mesenquimales utilicé el vector de transferencia OKSIM, portador de las regiones codificantes de los genes POU5F1 (OCT4), KLF4, SOX2 y MYC. El vector OKSIM es un vector policistrónico cuyos genes POU5F1, KLF4 y SOX2 están separados por secuencias 2A y los genes SOX2 y MYC están separados por una secuencia IRES (*Internal Ribosomal Entry Site*) (Anexo #4).^d Utilicé un vector reportero denominado PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP (en adelante también denominado EOS)^e el cual permite detectar el apareamiento de colonias y la expresión de los genes de pluripotencialidad por la expresión de la proteína verde fluorescente EGFP (Anexo #5).⁷⁰ Adicionalmente utilicé el vector pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5), portador del gen de EGFP, como reportero de la eficiencia de transfección y de transducción (Figura #5). Para la producción de los vectores utilicé el plásmidos psPax2 como vector de empaque, y el plásmido pMD2.G como vector de envoltura (Anexo #5). Todos los plásmidos utilizados fueron adquiridos por intermedio de la organización Addgene Inc.

5.9 Purificación de los plásmidos a partir de cultivos bacterianos

Las bacterias transformadas con los plásmidos, obtenidas de la organización Addgene, fueron cultivadas en medio LB con agar en platos de cultivo bacteriológico de 100 mm, con el fin de aislar colonias. Los cultivos en los platos fueron incubados a 37°C por 16 horas. Al día siguiente se seleccionaron tres colonias y se sembraron por separado en 25 mL de medio básico Luria (LB) líquido en frascos de 100 mL, a 37°C durante 16 horas en agitación a 300 rpm. Posteriormente se aislaron de 3 a 4 alícuotas de 500 uL de los cultivos líquidos y se mezclaron con 500 uL de glicerol

^d Las secuencias 2A codifican péptidos con la secuencia consenso Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro, las cuales interfieren con la formación del enlace peptídico durante la traducción.

^e La denominación EOS es un acrónimo de *Enhancer OCT4/SOX2*, que indica la presencia de regiones reguladoras distales donde OCT4 y SOX2 interactúan para estabilizar la expresión del gen regulado. Por lo tanto la señal de eGFP será fuerte cuando ambos factores interactúen con el promotor de EOS.

al 50% con el fin de criopreservarlos a -80°C hasta su uso. El resto fue utilizado para aislar el plásmido de cada colonia y caracterizarlo por medio de análisis de restricción. El plásmido fue purificado utilizando el *kit* de purificación *Plasmid Purification Midi kit* (Qiagen) basado en el sistema de lisis alcalina y purificación en columnas con resina de intercambio aniónico. Los plásmidos de empaque (psPAX2) y de envoltura viral (pMD2.G) fueron caracterizados por restricción con las enzimas de corte único (linearización) *SacI* y *HindIII*, respectivamente; y con las enzimas de dos cortes *NcoI* y *BglII*, respectivamente. Los plásmidos de transferencia OKSIM, FUW-SO y FUW-KM fueron linearizados con la enzima *XbaI*; el plásmido pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) fue linearizado por medio de *Sall* y PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP fue linearizado con la enzima *BamHI*.

Para la purificación de los plásmidos, las bacterias portadoras de los mismos fueron cultivadas en 150 mL de medio LB a 37°C por un periodo de 16 horas en matraces de 500 mL en agitación continua a 250 rpm. Las células fueron precipitadas por centrifugación a $6000\times g$ durante 15 minutos. El plásmido fue aislado posteriormente y purificado del precipitado celular utilizando el *kit* de purificación *Plasmid Purification Maxi kit* (Qiagen). El DNA plasmídico fue precipitado por lavados con isopropanol y etanol al 75%, y finalmente fue resuspendido en 1 mL de agua estéril desionizada grado biología molecular.

5.10 Producción de vectores lentivirales

Para la producción de vectores lentivirales a partir de los plásmidos FUW-SO, FUW-KM, OKSIM (en adelante denominados también plásmidos de transferencia) utilicé el sistema de transfección por medio de la mezcla de lípidos catiónicos TransFast (Promega). Para la transfección por medio del reactivo TransFast, los plásmidos de transferencia fueron transfectados por separado a células de la línea 293T junto con los plásmidos psPAX2 (vector de empaque) y pMD2.G (vector de envoltura) en una proporción 1:2:3 a un total de 30 ug de plásmido (5 ug de pMD2.G, 10 ug de psPAX2 y 15 ug del vector de transferencia) durante 1 hora en 6 mL de medio OptiMEM (Gibco) en ausencia de SFB y en presencia de 90 uL de reactivo TransFast. Pasada la hora de transfección se adicionaron 12 mL de medio OptiMEM suplementado con 360 uL de SFB (previamente inactivado a 56°C por 20 minutos) durante 8 horas. Luego de este periodo, el medio de transfección fue retirado y se adicionaron 8 mL de medio DMEM-F12 suplementado con 5% de SFB inactivado. Se incubó durante 24 horas, se conservó el sobrenadante y se adicionó medio DMEM-F12 sin SFB (en adelante a este proceso se le denomina “cosecha”). Se incubó por 12 horas, se conservó el sobrenadante y se adicionó medio DMEM-F12 sin SFB. Se realizó una tercera

y última cosecha luego de 12 horas más. Completándose 3 cosechas, los sobrenadantes recolectados fueron filtrados utilizando filtros de 0.8 μm para eliminar restos celulares. Los sobrenadantes filtrados fueron mantenidos a 4°C hasta su uso por no más de 3 días luego de la última cosecha. Estos sobrenadantes de lentivirus fueron suplementados con PEG-6000 a una concentración final de 10%, seguido de un periodo de incubación a 4° durante 2 horas (con agitaciones suaves cada 20 minutos) para posteriormente ser concentrados por centrifugación a 20000 rpm durante 2 horas a 4°C. Los pellets de virus fueron resuspendidos en 500 μL de PBS con BSA al 0.1%.

Luego de la concentración del virus, el vector viral pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) portador del gen EGFP fue utilizado para establecer una referencia de título viral según su capacidad infectiva. Para esto realicé transducciones virales por duplicado con 0 μL , 2 μL , 5 μL , 12 μL , 25 μL , 50 μL y 100 μL de virus concentrado sobre CMPD sembradas en un plato de 12 pozos a una densidad de 1.25×10^4 células/ cm^2 (5×10^4 células por pozo en platos de 12 pozos) tal como se ilustra en la figura 6A. El análisis por citometría de flujo me permitió determinar una curva de porcentaje de células GFP positivas versus el volumen de concentrado viral (Figura 6B). Para el ajuste de la tendencia utilicé el programa estadístico GraphPad Prism5. Esta curva de referencia fue correlacionada con el ciclo de amplificación (Ct) por PCR cuantitativo de extractos de DNA genómico a partir de células infectadas con virus concentrado. Para esto, extraje el DNA del genoma celular a partir de células transducidas con cuatro volúmenes de virus concentrado (5 μL , 25 μL , 50 μL y 100 μL) y lo resuspendí en 50 μL de agua destilada estéril libre de nucleasas. Amplifiqué alícuotas de 5 μL de DNA por medio de PCR cuantitativo (qPCR) utilizando el kit Kapa PCR (Kapa Biosystems) y adicionando los *primers* universales denominados *lentiter-f* y *lentiter-r* cuya secuencia es 5' ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC y 5' CACCCATCTCTCTCTTAGCC, respectivamente. Estos *primers* universales permiten la amplificación de cualquier vector de transferencia de tipo lentiviral según lo establecido previamente en la bibliografía (Sastry L *et al.*, 2002). El programa de amplificación utilizado se basó en lo recomendado por Kapa Biosystems y consistió en 35 ciclos de amplificación en dos pasos donde cada ciclo consistió en una denaturación a 95°C por 5 segundos y una extensión a 60°C por 20 segundos. Las reacciones de amplificación fueron realizadas en el equipo Rotor-Gene (Qiagen) en tubos de 20 μL . El análisis de cuantificación para la obtención de los valores de Ct fue realizado mediante el programa Rotor-Gene 6000 Software. Una vez obtenidos los datos de fluorescencia y de Ct se generó una curva de titulación Ct vs Señal de GFP utilizando el programa GraphPad Prism 5.

5.11 Transducción de fibroblastos embrionarios con los vectores lentivirales

Para la infección con los vectores lentivirales FUW-SO y FUW-KM, las células MEF fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 células por pozo en platos de 6 pozos (densidad 1×10^4 células/cm²) cubiertos con gelatina (los platos fueron previamente incubados a 37° durante un mínimo de 3 horas con gelatina al 0.1%). Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por 2 mL medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB inactivado, y se adicionó el volumen correspondiente de los virus FUW-SO y FUW-KM concentrados que equivale a un 100% de células infectadas según lo determinado en la curva de titulación. Paralelamente se infectó un pozo con la misma cantidad del virus pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) como control de infección (Ci) y se dejó un pozo sin tratamiento como control negativo (Cn). La infección se realizó durante 12 horas, luego de las cuales el medio con las partículas virales fue removido y desechado en una solución de hipoclorito de sodio al 1%, y se lo cambió por medio DMEM-F12 suplementado con 10% de SFB. De aquí en adelante el medio será reemplazado todos los días hasta observar cambios morfológicos durante los próximos 5 días post-infección (p.i.). Una vez verificado el cambio morfológico se esperó hasta el día 7 p.i. y se cambió el medio de cultivo por medio para mantenimiento de células troncales embrionarias murinas (medio mES) que consiste en: OptiMEM suplementado con ITES (Lonza) al 1%, SFB al 5%, Factor Inhibidor de Leucemia (LIF; Millipore) a 1000 U/mL, β -mercaptoetanol 0.1 mM y Antibiótico-Antimicótico.

5.12 Transducción de células mesenquimales de pulpa dental con los vectores lentivirales

Para la infección con los vectores lentivirales, las células mesenquimales de pulpa dental (CMPD) fueron sembradas a una densidad de 1×10^5 células por pozo en platos de 6 pozos cubiertos con gelatina. Al día siguiente se cambió el medio de cultivo por 2 mL de medio completo suplementado con 5% de SFB inactivado, y se adicionó el volumen correspondiente de virus policistrónico y del reportero EOS concentrado que equivale a un 100% de células infectadas según lo determinado en la curva de titulación. Paralelamente se infectó un pozo con la misma cantidad del virus pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) como control de infección (Ci) y un pozo solo con el vector reportero EOS como control negativo (Cn). La infección se realizó durante 12 horas, luego de las cuales el medio con las partículas virales fue removido y desechado (en una solución de hipoclorito de sodio al 1%), y se lo cambió por medio completo suplementado con 10% de SFB. Para el experimento con CMPD realicé dos variantes: una en la que cambié el medio sin ningún

estímulo, y otra en la que cambié a medio completo suplementado con un inhibidor de la ruta de TGF- β , la molécula SB431542. Para cada tratamiento realicé 4 repeticiones. De aquí en adelante el medio fue reemplazado todos los días hasta observar cambios morfológicos durante los próximos 5 días post-infección (p.i.). Una vez verificado el cambio morfológico se esperó hasta el día 14 p.i. para el aislamiento de colonias y el cambio de medio por medio para mantenimiento de células troncales embrionarias humanas (medio hES) bajo la formulación comercial de la empresa Stemgent Inc. (NutriStem XF/FF Culture Medium). Todo el experimento fue repetido por dos ocasiones.

5.13 Aislamiento de colonias de células pre-iPS

Una vez que se verificó el cambio morfológico en las células infectadas y se observó la expresión del reportero cultivé dos platos de 100 mm con células alimentadoras de MEF hasta alcanzar 90-100%. Alcanzada esta confluencia, traté a las células MEF con mitomicina a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ durante 3 horas, las lavé 3 veces con medio DMEM-F12 sin suero y las pasé a platos de 12 pozos cubiertos con gelatina a una densidad de 2.5×10^4 células/ cm^2 . Una vez alcanzado un crecimiento adecuado de las colonias de pre-iPS, se seleccionaron 6 colonias con morfología característica (colonias compactas con bordes brillantes) y éstas fueron levantadas por disrupción mecánica utilizando puntas de 10 μL y por observación bajo un estereomicroscopio. Las colonias restantes fueron criopreservadas en medio de congelación en nitrógeno líquido. Las colonias seleccionadas fueron centrifugadas y posteriormente tratadas con dispasa 1 a mg/mL durante 5 minutos a 37°C . Luego las colonias fueron disgregadas por pipeteo durante 10 segundos y se adicionaron 4 volúmenes de medio mES o hES según sea el caso. Cada colonia se sembró a una densidad de aproximadamente 5000 células por pozo en los platos de 12 pozos cubiertas con MEF. Para el cultivo de las colonias pre-iPS de ratón se utilizó una preparación especial que consiste en medio OptiMEM (Gibco) suplementado con SFB al 10%, LIF 1000 U/ mL , SB431542 (inhibidor de T β R1) 4 μM y PD0325901 (inhibidor de MEK1) 1 μM ; a este medio se lo denominó medio ES 2i. Para el cultivo de colonias pre-iPS humanas se utilizó el medio NutriStem (Stemgent). El medio fue cambiado todos los días. Una vez que las colonias tomaron la morfología típica de células troncales pluripotentes, éstas fueron pasadas por disrupción mecánica para análisis de inmunofluorescencia, RT-PCR, actividad de la fosfatasa alcalina, formación de cuerpos embrioides y formación de teratomas.

5.14 Análisis por RT-PCR

Para el análisis de expresión de genes extraje el RNA total de las células por medio del reactivo Trizol (Invitrogen) seguido por un tratamiento con DNAsa (DNase set; Qiagen) y lavado en columna con el sistema RNeasy Mini Kit (Qiagen). Realicé un análisis de los niveles de expresión basal de los genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYC*, tanto en las células MEF como en las células mesenquimales de pulpa dental, por medio de RT-PCR tiempo final utilizando el kit Access RT-PCR System (Promega).

Al día 30 p.i. las células reprogramadas a partir de MEF fueron caracterizadas por la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*. Como control interno utilicé *primers* específicos para el gen GAPDH y paralelamente se verificó el silenciamiento del transgén por medio de un *primer* reverso específico para el sitio P2A. Así mismo, al día 30 p.i. las células reprogramadas a partir de CMPD fueron caracterizadas por la expresión de los genes *OCT4*, *REX1* y *MYC*, y del gen de linaje endodérmico *SOX17*. Como control interno utilicé *primers* específicos para el gen GAPDH.

5.15 Ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina (AP)

El ensayo de la actividad de la fosfatasa alcalina se llevó a cabo a partir del día 14 p.i. una vez verificado el cambio morfológico y el crecimiento de colonias. Para el ensayo de la actividad de AP, las células fueron lavadas una vez con PBS y fijadas por 1 minuto en paraformaldehído al 4%. Inmediatamente después se lava dos veces con buffer TBS-T (TBS más Tween20 al 0.05%). Para el ensayo colorimétrico se utilizaron los reactivos del kit *Alkaline Phosphatase Assay kit* (Millipore), siguiéndose el protocolo correspondiente. En resumen, las células en monocapa fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 1 minuto, luego fueron lavadas con 1 mL de TBS-T (Tris 50 mM, NaCl 150 mM y Tween20 0.05%) y finalmente se adicionó la solución de reacción que se compone de solución FastRedViolet, solución Naftol Bifosfato y agua destilada en proporción 2:1:1. Se incubó durante 15 minutos en la solución de reacción. Se lavó con PBS y se observó al microscopio para contar el número de colonias positivas (en color violeta).

5.16 Análisis inmunofenotípico de las colonias de células iPS obtenidas a partir de MEF

Las colonias reprogramadas luego del día 30 post infección, así como las células control de la línea de teratocarcinoma NCCIT, fueron analizadas por medio de inmunofluorescencia para verificar la expresión de las proteínas Oct4 y SSEA-1. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron un Goat-Anti-mouse IgM (Invitrogen) y un Goat-Anti- IgG (Invitrogen) marcados con los

fluorocromos Alexa594 y Alexa568, respectivamente. Para realizar el análisis se cubrieron placas LabTek con gelatina al 0.1% durante toda la noche y posteriormente se sembraron 5×10^4 células MEF (inactivadas con mitomicina) por cada pozo. Se esperó hasta el día siguiente para que las MEF pudieran adherirse firmemente a la matriz de gelatina, momento en el cual se sembraron células iPS a una densidad de aproximadamente 5×10^3 células por pozo. Se esperó hasta que las colonias de iPS crecieran hasta un tamaño adecuado para su análisis (aproximadamente 5 días). El procedimiento para el marcaje fue igual al descrito en el apartado 5.3 para las CMPD.

5.17 Análisis inmunofenotípico y aislamiento de células iPS obtenidas a partir de CMPD

Las colonias reprogramadas luego del día 30 post infección fueron analizadas por medio de inmunofluorescencia para verificar la expresión de las proteínas OCT4, SOX2 y NANOG, y por medio de citometría de flujo para verificar la expresión de las proteínas de superficie SSEA-4, Tra1-60. Los anticuerpos para la detección de OCT4, SOX2 y NANOG fueron anticuerpos policlonales de isotipo IgG producidos en conejo, obtenidos de la empresa Stemgent Inc. El anticuerpo para la detección de Tra1-60 fue un anticuerpo monoclonal de isotipo IgM producido en ratón, obtenido de la empresa Stem Cell Technologies. Se utilizaron los anticuerpos secundarios *Goat-Anti-mouse* IgM (Invitrogen) y *Goat-Anti-rabbit* IgG (Abcam) marcados con los fluorocromos ficoeritrina y Alexa594, respectivamente. Para el análisis de la expresión del marcador SSEA-4 por citometría de flujo se utilizó un anticuerpo marcado con ficoeritrina (anti-SSEA4-PE; Stemgent Inc.). Una vez verificada la expresión de SSEA-4, se aislaron células iPS SSEA4+ puras por medio de una separación por citometría de flujo utilizando el equipo FACSAria. Las células iPS SSEA4+ fueron analizadas respecto a la expresión de marcadores mesenquimales típicos como CD105 y CD90 para confirmar la eliminación de rasgos mesenquimales en las células reprogramadas.

5.18 Formación de cuerpos embrioides y diferenciación in-vitro a partir de las iPS de CMPD

De las células SSEA-4 positivas obtenidas por medio de citometría de flujo se sembraron 10^3 células en gotas de 40 uL de medio hES suspendido en la tapa de platos de 100 mm. Se sembraron células SSEA-4 positivas en un total de 10 gotas suspendidas. En el recipiente inferior del plato se colocaron 10 mL de PBS estéril para evitar la desecación de las gotas suspendidas. El medio fue cambiado cada día reemplazando 15 uL de la gota suspendida por medio hES hasta el quinto día (que corresponde al tiempo requerido para la formación del cuerpo embrioide). En este estadio

los cuerpos embrioides fueron transferidos a platos de 24 pozos cubiertos con gelatina. Realicé 3 tratamientos de diferenciación según lo reportado previamente. Un tratamiento de inducción neural que consistió de medio OptiMEM suplementado con ácido retinóico 2 uM, FGF-2 10 ng/mL, EGF 10 ng/mL y suplemento ITS. Realicé un tratamiento para inducción de endodermo que consistió de medio OptiMEM suplementado con Activina 4 nM y BIO 2 uM durante 1 día y Activina 4 nM durante 2 días. Realicé un tratamiento de diferenciación con DMEM-F12 y SFB al 5% como control. Verifiqué la señal de fluorescencia en todos los tratamientos.

Luego de la inducción neural durante 30 días analicé la expresión del filamento intermedio GFAP por medio de inmunofluorescencia. Por otro lado, luego del tratamiento de inducción de endodermo durante 3 días, analicé la expresión de *SOX17* y *OCT4* en los cuerpos embrioides adheridos por medio de RT-PCR. Las células tratadas con SFB al 5% fueron analizadas por la expresión de Vimentina luego de 30 días de tratamiento. Los anticuerpos Anti-GFAP y Anti-Vimentina utilizados en estos experimentos fueron anticuerpos monoclonales de ratón de isotipo IgG, por lo cual se utilizó un anticuerpo secundario policlonal *Goat-anti-mouse IgG* (Life) marcado con el fluorocromo Alexa-568, adicionado a una dilución 1:1000.

5.19 Trasplante de las iPS a ratones inmunodeprimidos y formación de teratomas

Se tomaron colonias de iPS sorteadas cultivadas en un plato de 60 mm y se disgregaron por tratamiento con 1 mL dispasa a 1 mg/mL durante 5 minutos. La digestión fue detenida agregando 2 mL de medio hES y centrifugando a 300xg por 5 minutos. El precipitado de células se resuspendió en 2 mL medio hES y se contaron por medio de un hematocitómetro de Neubauer. Se hicieron dos alícuotas de 2×10^6 células resuspendidas en 100 uL de PBS estéril y se inyectaron de forma subcutánea en la zona de la cadera de 2 ratones de la cepa *FoxN1nu* de 6 semanas de edad. Como control negativo se inyectaron CMPD y vehículo bajo el mismo procedimiento en la zona opuesta de la cadera inoculada con iPS. Como control positivo se inyectaron células de la línea de teratocarcinoma NCCIT bajo el mismo procedimiento en otro ratón de la misma cepa. Los ratones fueron mantenidos en condiciones asépticas hasta el crecimiento de los tumores durante aproximadamente 30 días post-trasplante.

6. Resultados:

6.1 Aislamiento y cultivo de células mesenquimales de pulpa dental

Las pulpas dentales sembradas en cultivo completo mostraron contener células capaces de adherirse o de migrar fuera de la pulpa, lo cual se pudo verificar desde el primer día hasta el quinto día luego de la siembra (Figura 7). Las células alcanzaron una confluencia óptima para realizar el pase luego de 10 a 14 días posteriores a la siembra de las pulpas. Las células en su mayoría mostraron una morfología fibroblastoide lo cual se pudo evidenciar claramente en el primer pase, aunque se observaron adicionalmente distintas morfologías tal como células muy pequeñas y redondas (Figura 7D).

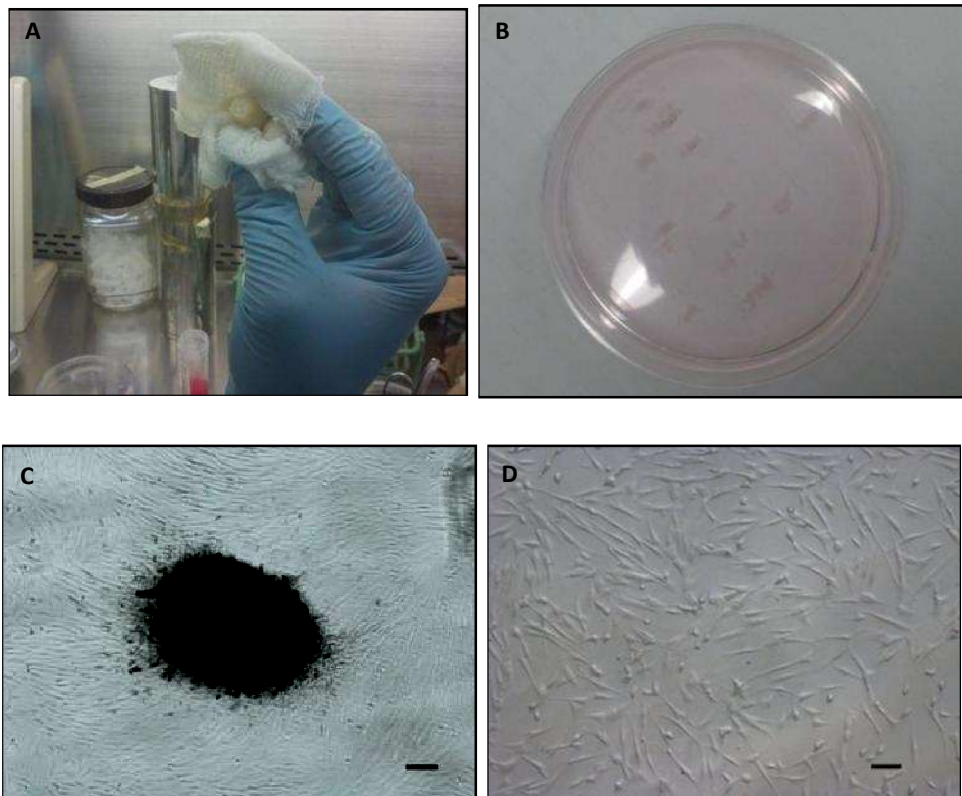


Figura 7. Aislamiento y cultivo de CMPD. A) Fotografía de un tercer molar con la pulpa expuesta. B) Fotografía de las pulpas digeridas sembradas en un plato de cultivo. C) Microfotografía por contraste de fase de un fragmento de pulpa dental adherido al plato de cultivo, del cual han migrado células mesenquimales hacia la periferia. D) microfotografía por contraste de fase de CMPD al 60% de la confluencia al pase 1, en la que se pueden observar células con morfología fibroblastoide así como células pequeñas y redondas. Barra=100 μm .

6.2 Caracterización de las células mesenquimales de pulpa dental

La caracterización por citometría de flujo demostró que las CMPD cumplen con el patrón fenotípico de células del estroma mesenquimal, basado en la expresión de los marcadores CD44, CD73, CD90 y CD105, y la ausencia de marcadores hematopoyéticos como CD14, CD34 y CD45, y endoteliales como CD31 (Figura 8). Otros marcadores presentes en células mesenquimales también fueron expresados por las CMPD tal como se muestra en la tabla 1.

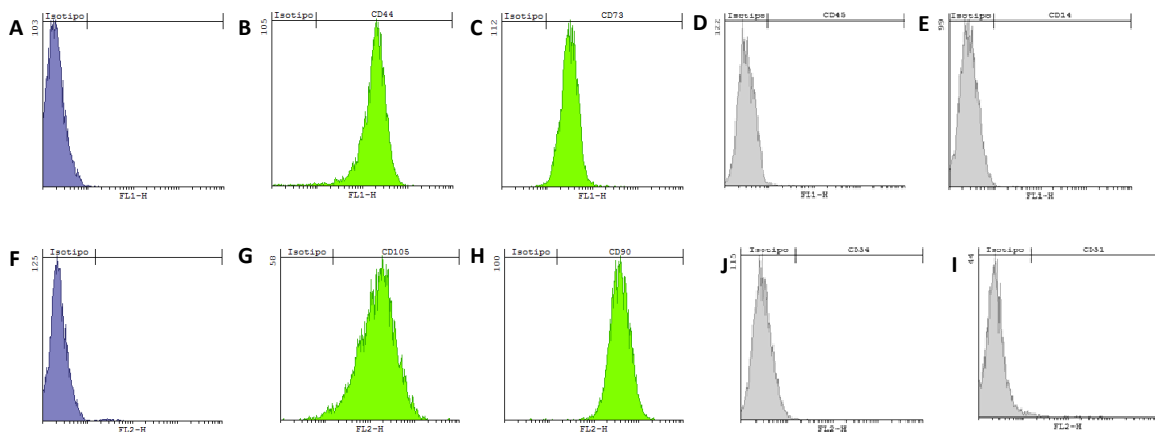


Figura 8. Caracterización inmunofenotípica de las CMPD por medio de citometría de flujo. Las CMPD de pase 1 fueron marcadas con anticuerpos acoplados a FITC (A-E) y PE (F-J). En los histogramas A y F se muestran azul los controles de isotipo IgG-FITC e IgG-PE, respectivamente. Los anticuerpos utilizados fueron específicos para los marcadores de superficie CD44 (B), CD73 (C), CD45 (D), CD14 (E), CD105 (G), CD90 (H), CD34 (I) y CD31 (J). Las poblaciones positivas se muestran con verde y las negativas con gris.

	CMPD (%)
Marcadores de Células Mesenquimales	
CD44	99.8
CD73	99.79
CD90	99.5
CD105	96.05
Marcador variable	
CD146	38.8
Marcadores del CMH	
HLA-ABC	37.22
HLA-DR	0
Marcadores negativos	
CD45	0
CD34	0
CD31	1.06
CD14	0.26

Tabla 1. Porcentaje de células positivas a los marcadores analizados por citometría de flujo. Es notable el bajo porcentaje de células que expresan HLA tipo I clásico (ABC). CMH=complejo mayor de histocompatibilidad; CM=células mesenquimales.

Las CMPD fueron caracterizadas por la expresión de los genes de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, y *MYC* por medio de RT-PCR tiempo final, donde se pudo observar la expresión del factor de transcripción *MYC*, importante para la autorenovación de las células mesenquimales (Figura 9A). Paralelamente analicé la expresión de los factores del circuito de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* por medio de inmunofluorescencia, en donde pude verificar que las CMPD no expresan dichos factores (Figura 9B).

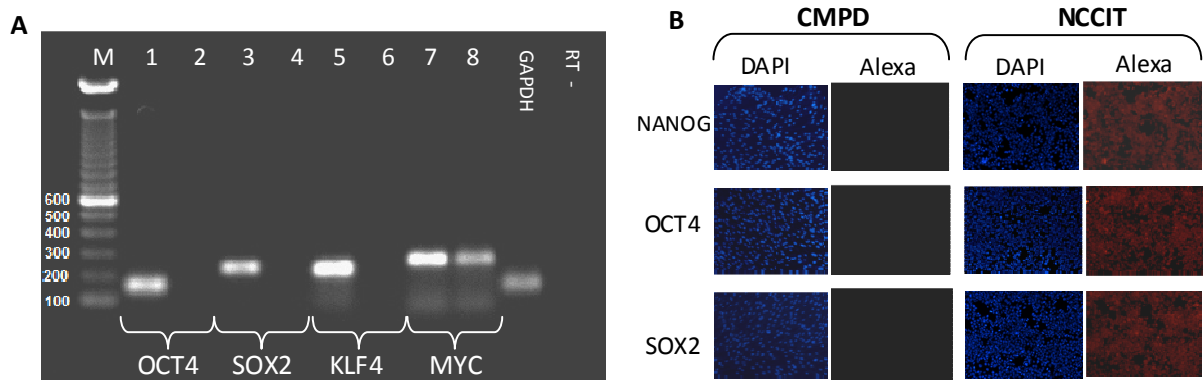


Figura 9. Análisis de expresión de factores de pluripotencialidad en las CMPD. A) Análisis por RT-PCR de la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* y *MYC*. Se amplificó el gen de la gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como control interno y una amplificación del mismo gen sin retrotranscriptasa (RT-) como control de contaminación con DNA en los extractos celulares de RNA de CMPD. Las amplificaciones a partir de extractos celulares de RNA de CMPD se encuentran en los carriles 2, 4, 6 y 8, y los controles positivos que corresponden a DNA del plásmido OKSIM se ubican en los carriles 1, 3, 5 y 7. B) Análisis por inmunofluorescencia de la expresión de los factores *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* en CMPD y en células de teratocarcinoma humano de la línea NCCIT como control positivo. Las células fueron marcadas con un anticuerpo secundario conjugado con el fluorocromo Alexa594 (Alexa). M=marcador de peso molecular.

A nivel funcional, las CMPD fueron caracterizadas por su capacidad clonogénica, tiempo de doblaje y capacidad de diferenciación adipogénica, osteogénica y condrogénica. Se pudo verificar que las CMPD son altamente clonogénicas obteniéndose $84 \pm 4.1\%$ de células clonogénicas (Figura 10A). El tiempo de doblaje obtenido bajo el sistema de cultivo utilizado fue de 37.03 horas (Figura 10B) lo cual concuerda con lo reportado en la bibliografía bajo otros sistemas de cultivo. Respecto a su potencial de diferenciación se pudo observar una fuerte diferenciación condrogénica (Figura 10C) y osteogénica (Figura 10D), pero no se pudo observar diferenciación adipogénica (Figura 10E) bajo los medios de cultivo utilizados en este proyecto.

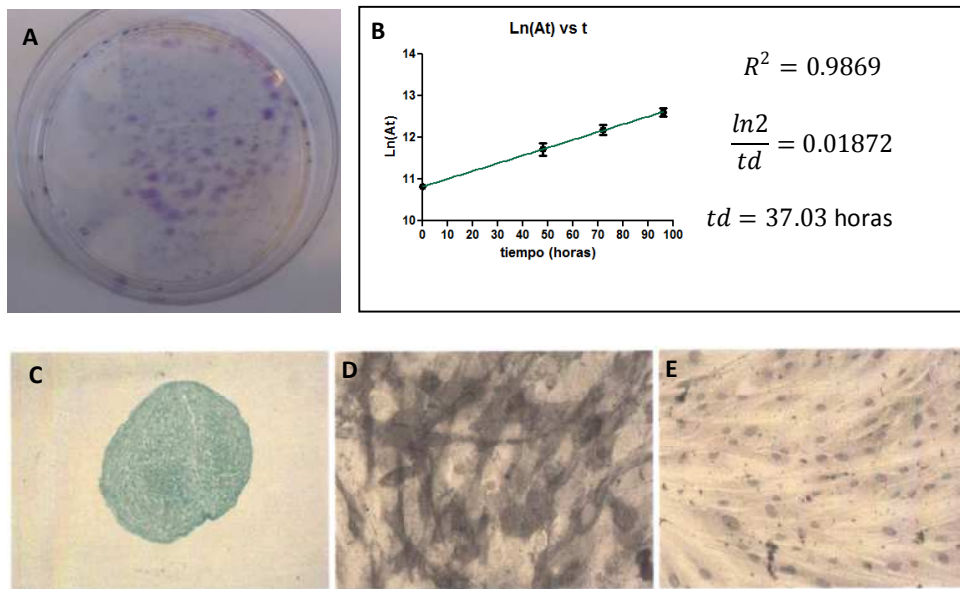


Figura 10. Análisis funcional de las CMPD. A) Análisis de clonogenicidad donde se observan colonias de CMPD teñidas con cristal violeta. B) Curva para obtener el tiempo de doblaje (td) a partir de la pendiente del ajuste lineal ($\ln 2/td$). C) Análisis de diferenciación condrogénica en el que se observa la tinción positiva de azul alciano sobre un cúmulo celular que expresa glicoproteínas. D) Análisis de diferenciación osteogénica en el que se observa actividad de la fosfatasa alcalina (coloración violeta oscuro). E) Análisis de diferenciación adipogénica, en la cual no se pudo observar la formación de vacuolas lipídicas.

6.3 Caracterización de los plásmidos utilizados

Por medio del análisis electroforético de las restricciones de los plásmidos aislados se pudo verificar que los lotes de bacterias mantenidas contienen efectivamente los plásmidos esperados (Figura 11). Las restricciones realizadas con enzimas de corte único (linearizaciones) demostraron que los plásmidos aislados corresponden con el tamaño esperado (anexos 3-7).

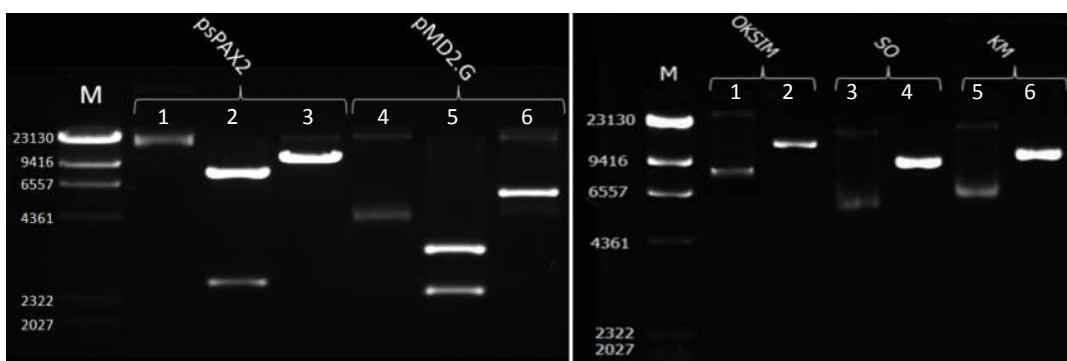


Figura 11. Análisis de restricción de los vectores de empaque, envoltura y transferencia. A) Análisis de restricción de los vectores de empaque (psPAX2) y envoltura (pMD2.G) por restricción con enzimas de dos cortes (carriles 2 y 3) y con enzimas de corte único (carriles 4 y 6). En los carriles 1 y 4 se muestran las bandas de los plásmidos sin restricción. B) Análisis de restricción de los plásmidos de transferencia OKSIM, FUW-SO (SO) y FUW-KM (KM) por restricción con enzimas de corte único (carriles 2, 4 y 6). En los carriles 1, 3 y 5 se muestran las bandas de los plásmidos sin restricción. M= marcador de peso molecular.

6.4 Generación de vectores lentivirales y ensayos de transducción a CMPD

Luego de la transfección de los plásmidos en las células 293T la eficiencia de transfección fue evaluada gracias al reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5). A las 24 horas post-transfección es posible verificar la expresión del reportero, tal como se muestra en la figura 12A. El análisis por citometría de flujo mostró que la eficiencia de transfección por medio del protocolo estandarizado es de aproximadamente el 94% (Figura 12B).

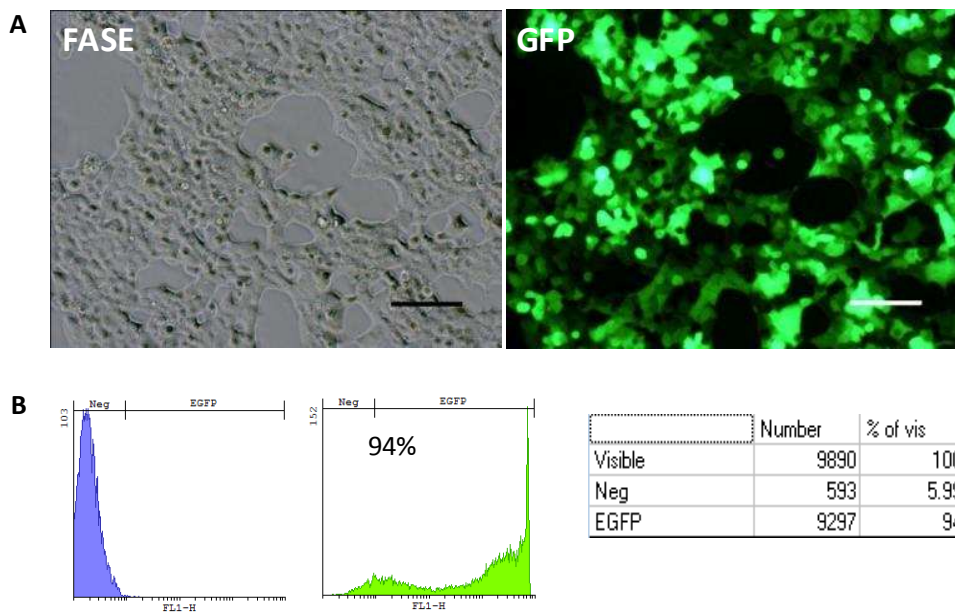
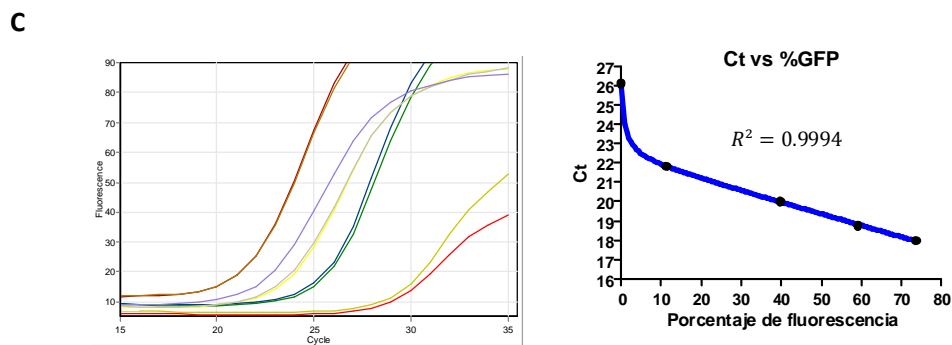
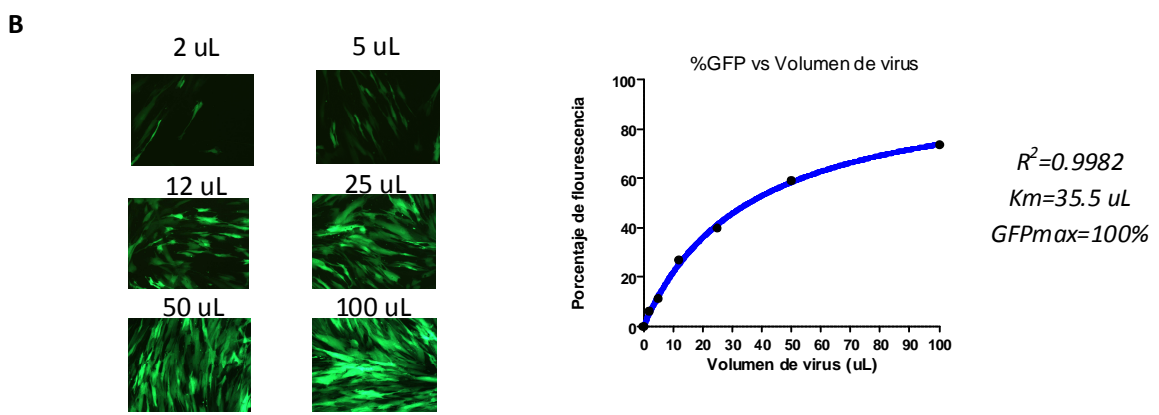
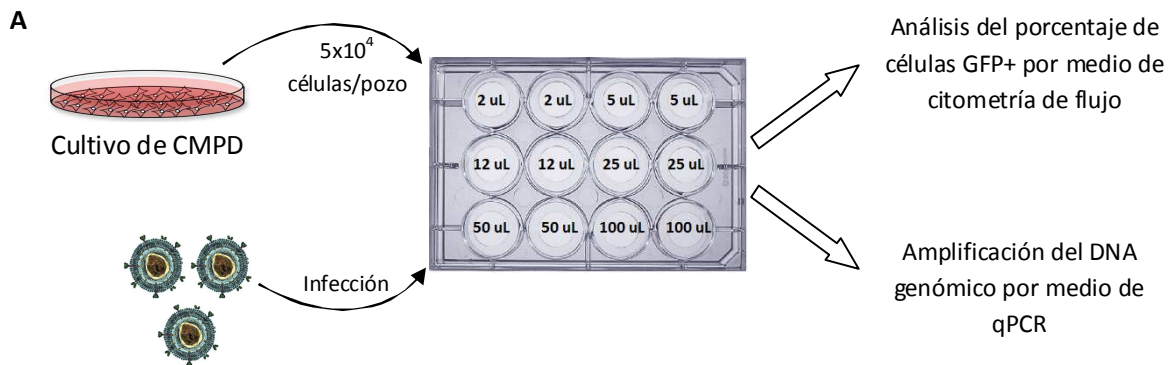


Figura 12. Eficiencia de transfección por medio del plásmido reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5). A) Análisis de las células transfectadas por contraste de fase (Fase) y microscopía de fluorescencia (GFP). Barra=100 um. B) Análisis de las células transfectadas por medio de citometría de flujo donde se muestra un histograma en azul (control negativo) de células 293T sin transfección y un ensayo representativo en con transfección en color verde y su correspondiente análisis en números totales y porcentaje.

Una vez estandarizado el proceso de transfección de vectores lentivirales realicé un estudio de los posibles métodos para obtener datos cuantitativos del título viral en cada producción. Utilizando el vector reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) realicé transducciones virales por duplicado en CMPD con distintos volúmenes del virus concentrado (Figura 13A). La primera observación realizada fue que los vectores lentivirales logran infectar de forma efectiva a las CMPD, lo cual se pudo verificar por la señal de GFP por microscopía de fluorescencia (Figura 13B). Posteriormente, el análisis por citometría de flujo me permitió determinar una curva de porcentaje de células GFP positivas versus el volumen de concentrado viral (Figura 13C), observándose una tendencia de saturación.



$$Ct = \frac{-3.89 \cdot \%GFP}{0.87 + \%GFP} - 0.06 \cdot \%GFP + 26.1$$

Figura 13. Establecimiento de una curva estándar de titulación de los vectores lentivirales. A) Ilustración del procedimiento realizado para la infección de CMPD con el vector reportero. B) Análisis de la señal de fluorescencia en las células infectadas, donde se pudo verificar una tendencia creciente por medio de microscopía de fluorescencia, y se pudo revelar una tendencia de saturación por medio del análisis por citometría de flujo. C) Análisis por qPCR de los extractos de DNA a partir de células infectadas con 0, 5, 25, 50 y 100 uL de concentrado viral (izquierda) que permitió la generación de una curva Ct vs %GFP (derecha).

Para el ajuste de la tendencia utilicé el programa estadístico GraphPad Prism5. Las células infectadas con el vector reportero fueron sometidas a extracción de DNA por columna con el fin de aislar el DNA genómico. Los extractos de DNA fueron sometidos a amplificación por PCR cuantitativo (qPCR) para determinar el número de ciclo (Ct) al cual amplifica cada valor de porcentaje de GFP positivas. Esto me permitió determinar una curva estándar de Ct versus % de células positivas a GFP. El modelo más cercano para la curva obtenida fue un modelo no lineal de saturación, obteniéndose un R^2 de 0.9974 (Figura 13C).

6.5 Estandarización del proceso de reprogramación en fibroblastos embrionarios (MEF)

6.5.1 Transducción de las células MEF con los vectores lentivirales

Según se pudo verificar gracias a los controles Ci infectados únicamente con el vector reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) que la transducción viral es efectiva también en células MEF (Figura 14A). No se observó pérdida de la viabilidad luego de las 12 horas de infección, ni arresto del ciclo celular. Luego de la infección con los vectores bicistrónicos FUW-SO y FUW-KM, la morfología de los fibroblastos cambió entre el tercer y quinto día post infección (p.i.) (Figura 14B). Por medio de amplificación por RT-PCR de una región específica del vector viral integrado (sitio 2A) y del cDNA de OCT4 se verificó que el cambio de morfología se debe a la expresión de los transgenes virales (Fig. 14C). Todos los pozos con fibroblastos infectados con los vectores FUW mostraron cambio de morfología. Los fibroblastos en los pozos control sin infección (Cn) y con reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) (Ci) no mostraron cambio morfológico alguno. Los fibroblastos infectados con el vector pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) mostraron una fuerte señal del reportero GFP al día 3 p.i., lo cual corresponde al tiempo que tardan los vectores FUW en inducir cambios morfológicos.

Al día 7 se dió crecimiento de colonias (Figura 15B-a), y según el análisis por RT-PCR la expresión de los transgenes se mantuvo de forma satisfactoria (Figura 15C). Para el día 14 las colonias crecieron lo suficiente como para ser transferidas a nuevos pozos (Figura 15 B-b). Paralelamente se realizaron ensayos de fosfatasa alcalina en uno de los tres pozos tratados con los vectores bicistrónicos así como en el control Cn.

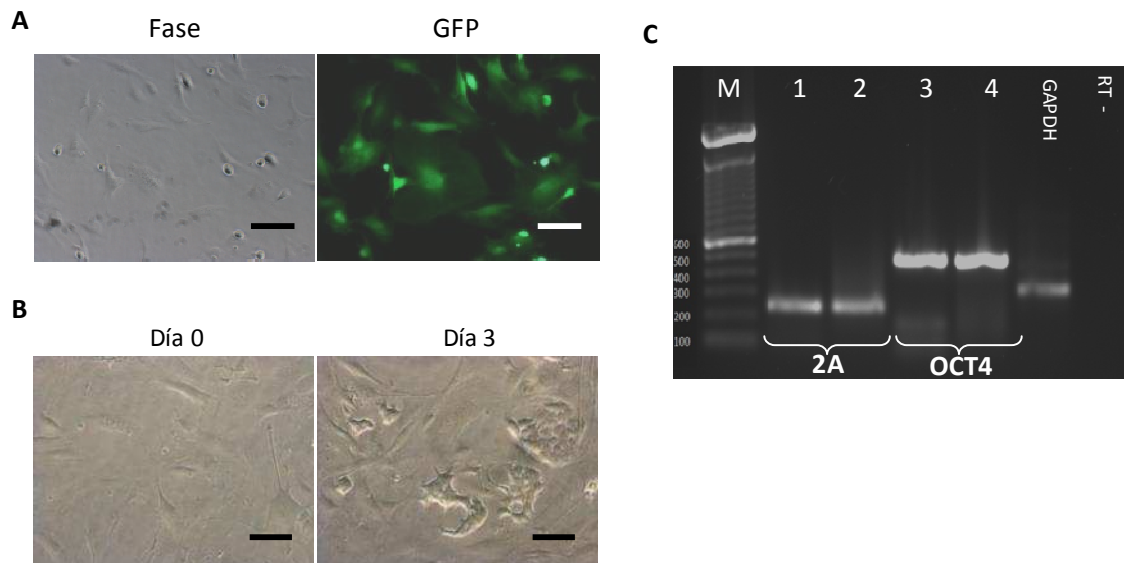


Figura 14. Infección con vector lentiviral en matriz de gelatina. A) Control de infección (Ci) al día 3 p.i. infectado sólo con el vector reportero pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5) visto por microscopía de contraste de fase (Fase) y fluorescencia (GFP). B) Tratamiento con vectores bicitrónicos FUW-SO y FUW-KM al día 0 y al día 3 p.i. C) Análisis por RT-PCR de las células transducidas con los vectores FUW-SO y FUW-KM al día 3 p.i., utilizando *primers* específicos para el sitio 2A del vector viral (carriles 1 y 2) y para el transgen de Oct (carriles 3 y 4). Los carriles 1 y 3 corresponden a controles de RNA viral. Los carriles 2 y 4 corresponden a los extractos de RNA de células infectadas. M= marcador de peso molecular; G=*GAPDH*; RT-= amplificación de *GAPDH* sin retrotranscriptasa Barra=100 um.

Las 10 colonias seleccionadas para el aislamiento presentaron morfología pre-iPS (colonias planas de bordes irregulares) aunque ya en esta etapa se pudo evidenciar la actividad de la fosfatasa alcalina en todas las colonias formadas (Figura 15D). Estas colonias fueron dispersadas y se seleccionaron 5 clonas para ser cultivadas en un medio ES convencional y las 5 restantes en medio 2i. Luego de una semana de cultivo (día 21 p.i.) se produjo la conversión de las pre-iPS en iPS verdaderas con morfología redondeada y más compacta (Figura 15 B-c), típica de células troncales embrionarias, y todas expresaron fosfatasa alcalina. Sin embargo, únicamente las clonas tratadas con el medio 2i mantuvieron la morfología sin señales de diferenciación durante todo el proceso de cultivo. Estas clonas conservaron la expresión de Oct4 y otros marcadores de pluripotencialidad como Sox2 y Nanog. De las 5 clonas de ambos tratamientos se seleccionaron 3 para su expansión y análisis por RT-PCR e inmunofluorescencia luego del día 30 (pase #3). Las clonas restantes fueron criopreservadas en nitrógeno líquido en medio mES suplementado con SFB al 40% y DMSO al 10%.

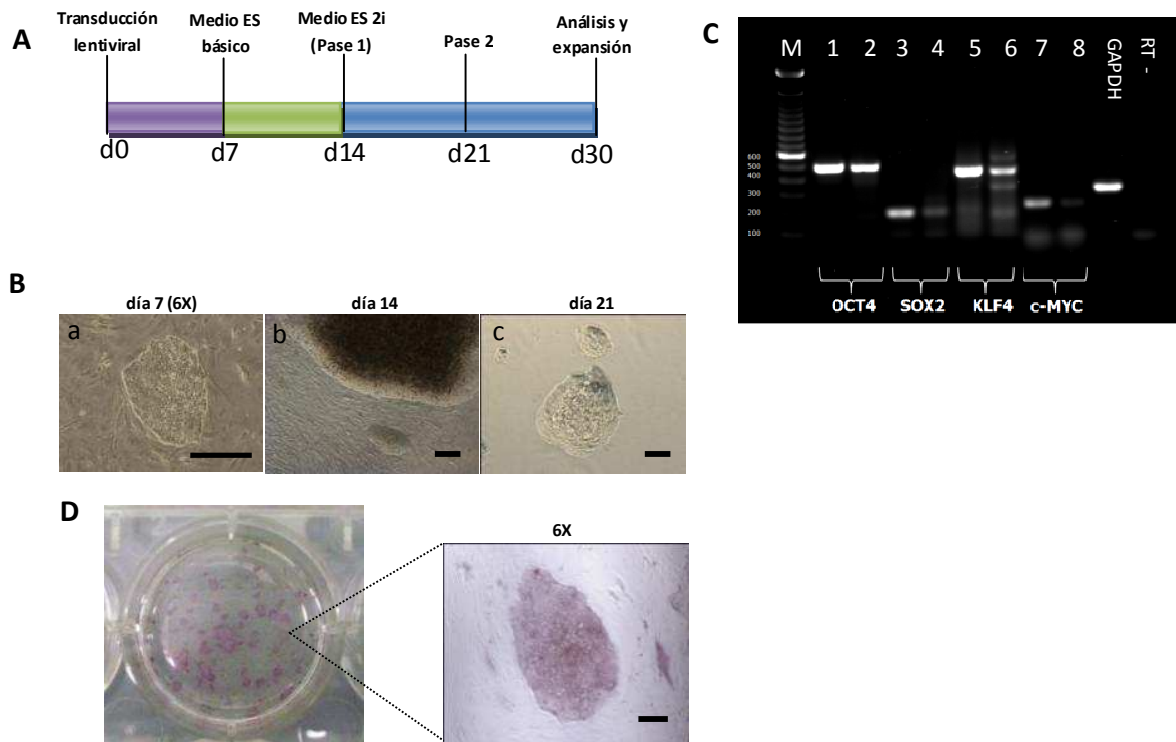


Figura 15. Reprogramación de MEF. A) Línea cronológica para la inducción de iPSCs con vectores bicistrónicos SO y KM e inhibidores (2i). B) Secuencia de cambio morfológico de las colonias desde el día 7 al día 21 p.i. C) Análisis de expresión de genes de pluripotencialidad Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc al día 14 p.i. en extractos celulares de pre-iPS (carriles 2, 4, 6 y 8) y extractos virales del vector OSKM (carriles 1, 3, 5 y 7). M= marcador de peso molecular; RT=control sin retrotranscripción de GAPDH; GAPDH=control *housekeeping*. D) Análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina al día 14 p.i. Barra=200 um.

6.5.2 Las clonas de iPS expandidas mantienen características de células pluripotentes durante su mantenimiento en un cultivo acondicionado

Las tres clonas aisladas fueron expandidas y mantenidas en medio 2i así como en medio basal convencional. Al día 30 p.i. estas clonas presentaron colonias pequeñas con morfología redondeada, y en su mayoría mantuvieron dicha morfología más allá de los 30 días de cultivo (Figura 16 A-a). Sin embargo, las células mantenidas en medio ES basal mantuvieron siempre colonias con bordes irregulares con pequeños cúmulos de células diferenciadas en el centro (Figura. 16 A-b). Según el análisis de expresión por RT-PCR, el patrón de expresión de genes de pluripotencialidad se mantuvo tanto en las clonas mantenidas en medio mES 2i (IPS13 e IPS17) como en las mantenidas en medio mES regular (IPSMR) (Figura 16 B), y ambas mantuvieron la actividad de fosfatasa alcalina (Figura 16 C) y del marcador de superficie SSEA-1 (Figura 16 D).

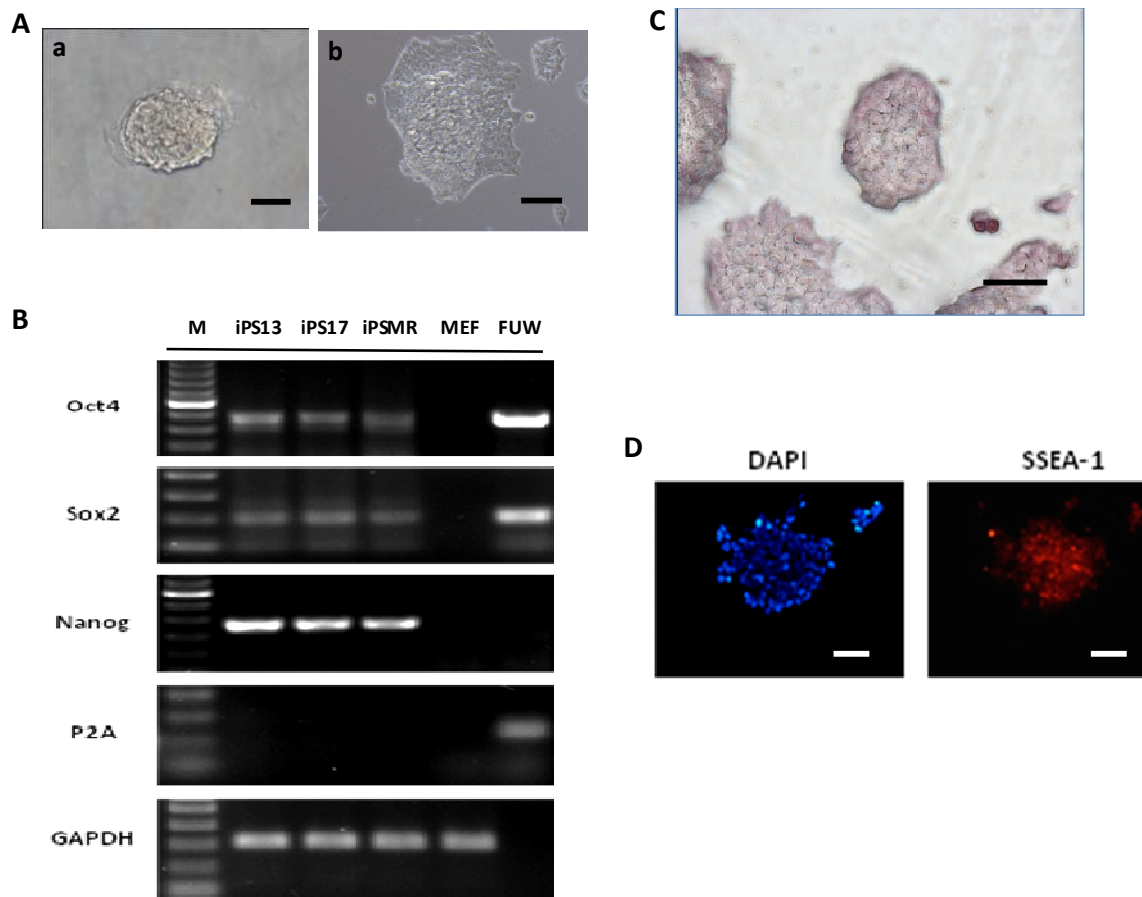


Figura 16. Mantenimiento de las células iPS obtenidas a partir de MEF. A) Comparación morfológica de colonias de iPSCs mantenidas en medio básico (a) y en medio 2i (b) al día 30 p.i. B) Análisis del perfil de expresión de genes de pluripotencialidad Oct4, Sox2, Nanog y Esg-1 en tres líneas de iPS aisladas: dos líneas mantenidas en medio 2i (iPS13 e iPS17) y una línea mantenida en medio básico (iPSMR); se analizó también la expresión del transgen FUV (primers para P2A) para verificar su silenciamiento. Se utilizó mRNA de MEF y de virus (FUV) como controles. C) Análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina en células iPS mantenidas en medio 2i. D) Inmunofluorescencia para SSEA-1 en las células iPS mantenidas en medio 2i por más de 30 días p.i. Barra=100 μ m.

6.6 Reprogramación de células mesenquimales de pulpa dental

6.6.1 Las CMPD transducidas con los vectores OKSIM y EOS en presencia del inhibidor SB431542 presentan cambio morfológico y actividad de la fosfatasa alcalina

Luego de la co-infección de las CMPD con los vectores OKSIM y EOS se esperó hasta que las células mostraran cambios morfológicos tal como se había observado en MEF. No se observó ningún cambio morfológico en las células control Cn infectadas con el reportero de reprogramación EOS (Figura 17A) ni en las células control Ci infectadas con el reportero de GFP constitutivo pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5). Los cambios morfológicos se evidenciaron únicamente

en las células infectadas con los vectores OKSIM y EOS, suplementados con el inhibidor SB431542, del día 3 al 5 p.i. (Figura 17B). Se observó sin embargo, que todas las células transducidas con el vector OKSIM proliferaron más rápido que las células control Cn y Ci, alcanzando la confluencia en menor tiempo. Las pequeñas colonias que emergieron fueron fácilmente identificadas gracias a la señal de fluorescencia emitida por el reportero EOS. Algunos agregados celulares pueden ser observados normalmente en cultivos de CMPD que podrían ser confundidos con cúmulos de células reprogramadas (fecha roja en la Figura 17B), aunque puede ser fácilmente descartado por la ausencia de fluorescencia. Fue notable que únicamente las células tratadas con el inhibidor de la ruta de TGF- β revelaron cambio morfológico y crecimiento de colonias positivas a fosfatasa alcalina (Figura 17C), identificándose alrededor de 31 y 9 colonias AP+ en dos ensayos experimentales, respectivamente. Tomando en cuenta una densidad celular inicial de 1×10^5 células se obtuvo una eficiencia de reprogramación del 0.031% y 0.009% en el primer y segundo ensayo respectivamente. Se pudo observar que el cambio morfológico presenta las características de procesos de epitelización: citoplasma reducido y un núcleo prominente. Este cambio morfológico coincide con el cambio visto en células MEF transducidas. Las células reprogramadas mostraron una señal heterogénea del reportero EOS, pudiéndose identificar células con mayor señal de GFP que otras dentro del mismo cúmulo celular. El medio de mantenimiento en esta etapa consistió en medio completo suplementado con SFB al 10%, FGF-2 a 10 ng/mL y SB-431542 a 4 μ M.

6.6.2 Las colonias de pre-iPS mantienen la expresión del reportero EOS

Al día 14 p.i. las pequeñas colonias fueron levantadas por interrupción mecánica con la ayuda de un estereomicroscopio y fueron tratadas con dispasa (1 mg/mL) con el fin de sembrar células individuales sobre una monocapa de células *feeder* de MEF. El medio de mantenimiento se cambió al medio NutriStem (Stemgent) sin ningún suplemento adicional. Desde este periodo se observaron cambios en la morfología de las colonias formadas, algunas de las cuales dejaron de expresar el reportero EOS (Figura 18A). Sin embargo, crecieron varias colonias con morfología típica de células troncales pluripotentes que expresaron fuertemente la señal del reportero EOS (Figura 18B). Al día 21 varias colonias positivas al reportero EOS crecieron lo suficiente para realizar un nuevo pase (Figura 18C). Fue notable que las células que se adaptaron al medio NutriStem mostraron una señal un poco más homogénea del reportero EOS dentro de las colonias.

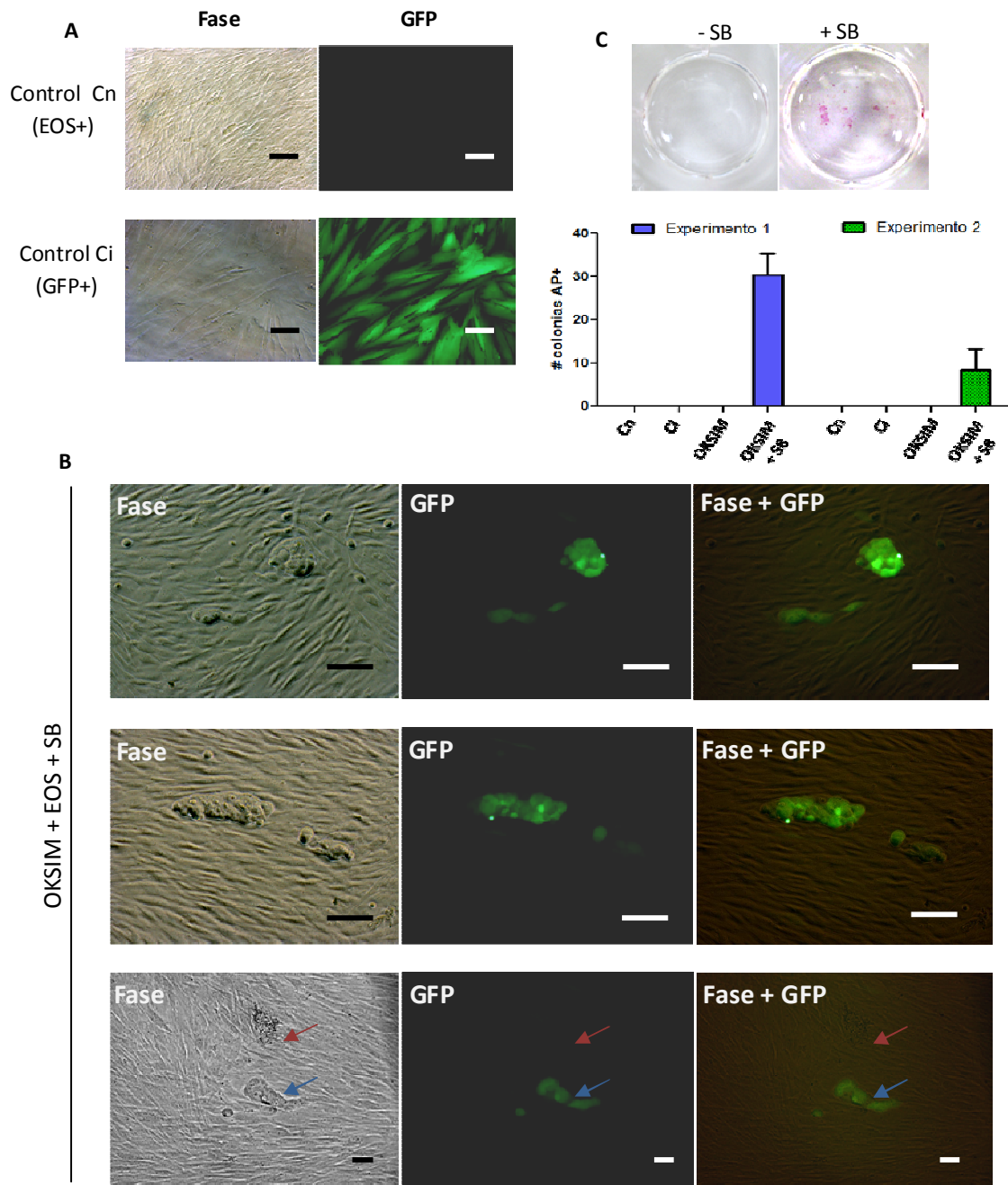


Figura 17. Infección de las CMPD con los vectores lentivirales. A) Control negativo (Cn) transducido con el vector reportero de reprogramación EOS y control de infección (Ci) transducido con el reportero de GFP constitutivo pLenti-CMV-GFP-Puro-(658-5), vistos por microscopía por contraste de fase (FASE) y fluorescencia (GFP). B) Cambios morfológicos representativos de las CMPD infectadas con los vectores OXSIM y EOS entre los 3 y 5 días p.i., observadas en contraste de fase (Fase) y fluorescencia (GFP). La flecha roja indica agregados celulares que no mostraron señal de GFP mientras que la flecha azul indica agregados de células reprogramadas. C) Los cúmulos celulares con cambio morfológico fueron analizados al día 14 p.i. por su actividad de fosfatasa alcalina. Se observa que solo las células tratadas con el inhibidor SB431542 (+SB) muestran colonias positivas a fosfatasa alcalina (AP+), tal como se muestra en las fotografías superiores y en la gráfica inferior, en base a 2 experimentos independientes. Barra= 100 μ m.

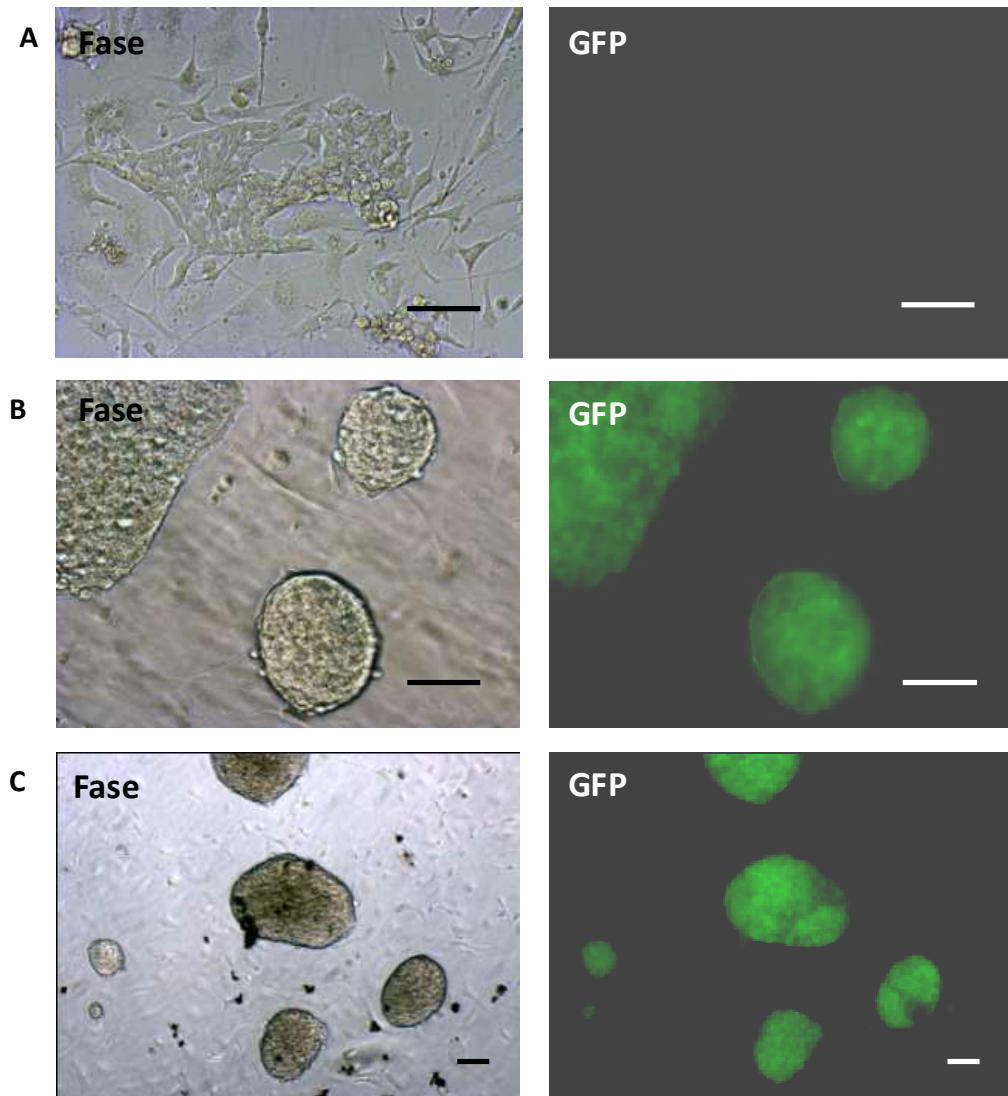


Figura 18. Morfología de las colonias y expresión del reportero EOS luego del primer pase al día 21 p.i. A) Colonia de células planas con características epiteliales pero que no expresan el reportero EOS, observada en el cultivo con medio hES. B) Colonia de células reprogramadas con morfología plana y tridimensional, crecidas sobre MEF y en presencia del inhibidor SB431542, que muestra expresión uniforme del reportero EOS. C) Colonias de células reprogramadas cultivadas sobre MEF listas para realizar un pase. Barra=100 um.

6.6.3 Las colonias de iPS fueron seleccionadas y expresaron marcadores de pluripotencia

Luego del día 30 p.i. las colonias crecieron y estuvieron listas para su análisis y criopreservación. Estas colonias fueron sometidas inicialmente a un análisis por citometría de flujo para detectar la expresión del marcador SSEA4 y poder aislar iPS verdaderas. Dicho análisis determinó que varias células que eran positivas al reportero EOS co-expresaron SSEA4, y por lo tanto fueron sometidas a un *sorting* (Figura 19A). Las células iPS fueron sembradas nuevamente sobre monocapas de MEF para su expansión y análisis. Primeramente se verificó que las células aisladas sigan expresando el reportero EOS y que posean actividad de la fosfatasa, con el fin de descartar algún cambio inducido por el proceso de separación (Figura 19 B y C). Las colonias con una expresión homogénea del reportero fueron aisladas para generar líneas de iPS. El análisis de la expresión de OCT4, SOX2, NANOG, Tra1-60 y SSEA-4 por inmunofluorescencia y citometría determinó que las líneas de células EOS+SSEA4+ cumplen con el patrón de expresión de marcadores de células troncales pluripotentes, tal como se observa en la figura 20B y 20C. Esto también fue comprobado por la expresión de los genes *OCT4* y *ZFP40 (REX1)* analizada por medio de RT-PCR (Figura 20D).

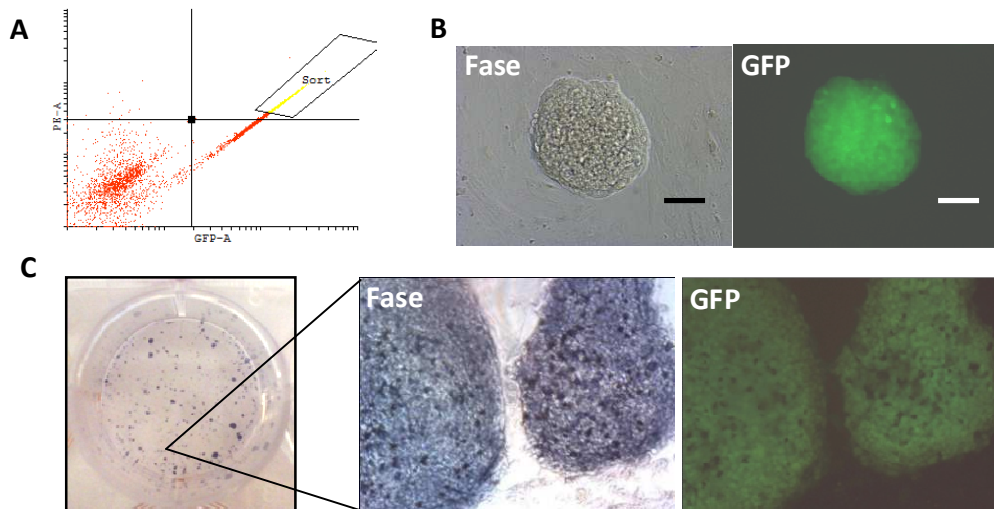


Figura 19. Aislamiento de células iPS GFP+SSEA4+. A) Las células que co-expresaron el marcador SSEA-4 y el reportero EOS (población en amarillo) fueron separadas por citometría de flujo. La población GFP+SSEA4+ representó aproximadamente el 60% de la población GFP+. B) Células iPS GFP+SSEA4+ vistas al contraste de fase y fluorescencia, demostrando que el proceso de separación fue satisfactorio y genera colonias con morfología típica de células pluripotentes. C) Análisis de la actividad de la fosfatasa alcalina en las células GFP+SSEA4+ separadas, observándose una correlación entre el reportero EOS y la actividad de la fosfatasa. Barra=100um.

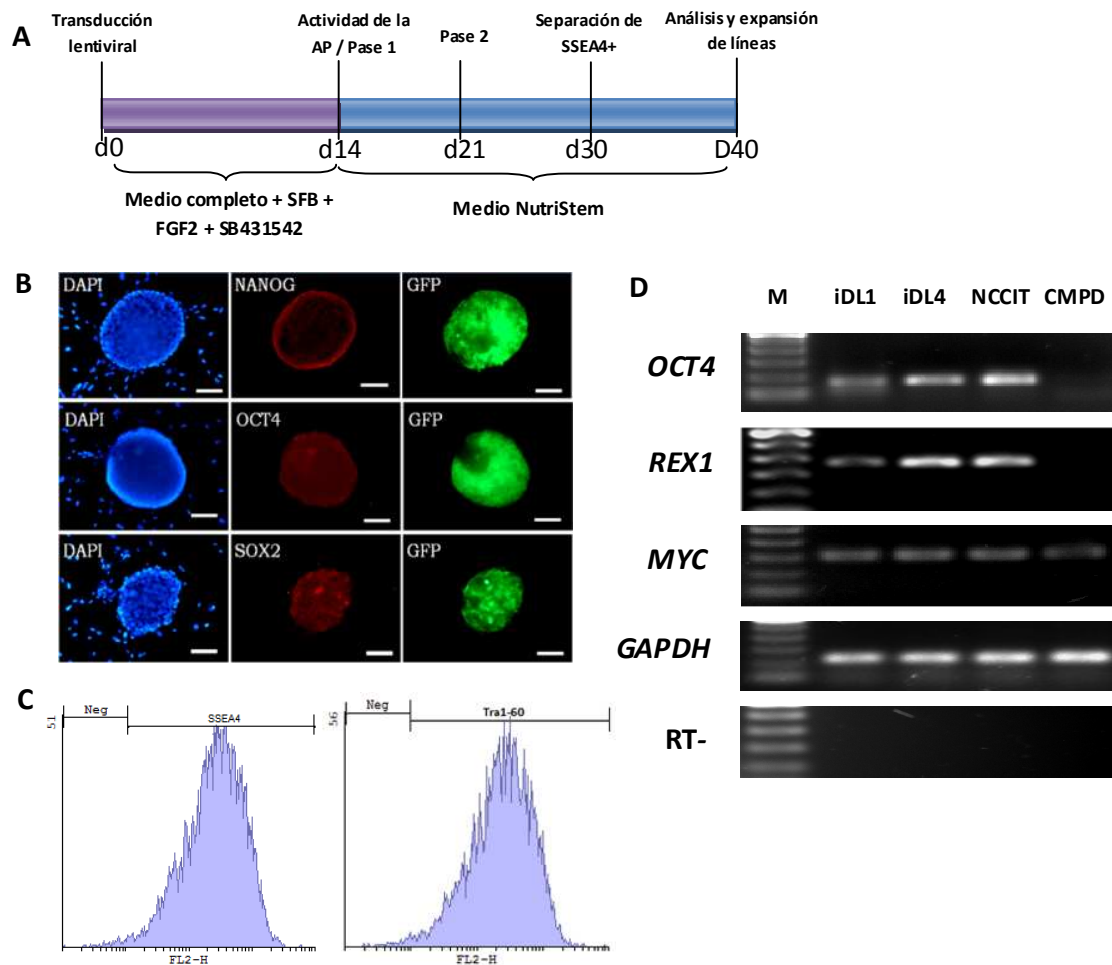


Figura 20. Resumen experimental y análisis de marcadores de pluripotencia en las líneas de iPS iDL1 e iDL4. A) Línea temporal donde se indican los días en los cuales se llevaron a cabo las diferentes actividades para la obtención de iPS. B) Análisis de la expresión de NANOG, OCT4 y SOX2 por medio de inmunofluorescencia de la línea iDL4. C) Análisis de la expresión de las proteínas de superficie SSEA-4 y TRA1-60 por medio de citometría de flujo en la línea iDL4. D) Análisis de la expresión de *OCT4*, *REX1* y *MYC* por medio de RT-PCR en las clonas de iPS iDL1 y iDL4. Se analizaron células de la línea NCCIT como control positivo y CMPD como control negativo. Se amplificó el gen *GAPDH* como control y con los mismos *primers* se descartó la presencia de DNA (RT-).

6.6.4 Las células iPS aisladas carecen de marcadores mesenquimales

El análisis por citometría de flujo para los marcadores mesenquimales CD105 y CD90 en las células iPS aisladas me permitió observar que la reprogramación logró eliminar el estado mesenquimal de dichas células iPS (Figura 21).

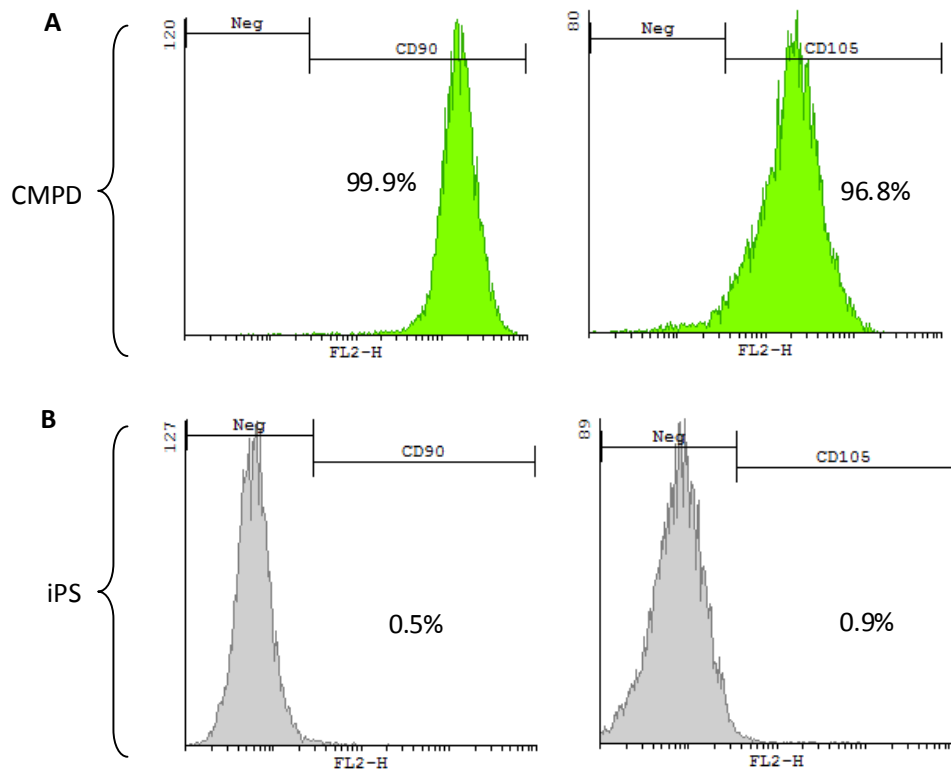


Figura 21. Análisis de marcadores mesenquimales en CMPD y en las células iPS aisladas, por medio citometría de flujo. A) Histogramas control de CMPD analizadas para los marcadores CD90 y CD105. B) Histogramas de las células iPS analizadas para los marcadores CD90 y CD105.

6.6.5 Las células iPS aisladas tienen la capacidad de formar cuerpos embrioides y diferenciarse hacia células de las tres capas embrionarias

Las células iPS fueron disgregadas y puestas en suspensión por la técnica de gota suspendida hasta darse la formación de cuerpos embrioides en un tiempo aproximado de 5 días (Figura 22A). Los cuerpos embrioides fueron sometidos a diferenciación transfiriéndolos a platos de cultivo cubiertos con una matriz de gelatina y cultivándolos en medios de diferenciación (Figura 22B). Las células empezaron a migrar al plato de cultivo (Figura 22C y D) y luego de 20 días tomaron distintas morfologías (Figura 23). Las células diferenciadas mostraron ser positivas para marcadores de diferenciación neural (GFAP) y mesenquimal (vimentina) (Figura 24 A y B). El análisis por RT-PCR de los genes *SOX17* y *OCT4* en los cuerpos embrioides tratados con Activina y BIO demostró que las iPS son capaces de diferenciarse hacia células del endodermo y que durante esta diferenciación la expresión del gen *OCT4* parece reducirse, aunque no completamente (Figura 24C).

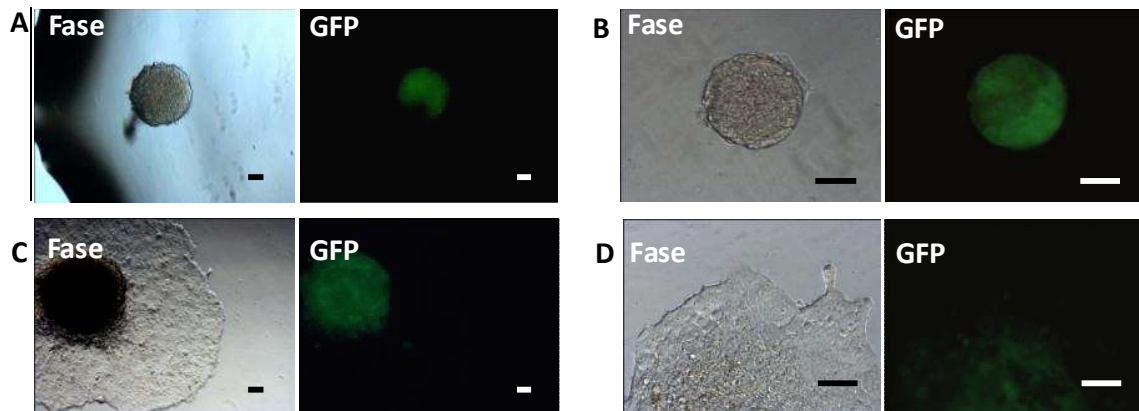


Figura 22. Formación de cuerpos embrioides y diferenciación en monocapa. A) Morfología de un cuerpo embrioides en una gota suspendida, a los 5 días de cultivo, visto en contraste de fase (Fase) y por fluorescencia (GFP). B) Cuerpo embrioides adherido al plato de cultivo cubierto con gelatina visto en contraste de fase y fluorescencia a los 7 días de cultivo. C) y D) Células en proceso de diferenciación proliferan hacia la periferia del cuerpo embrioides, vistas en contraste de fase y fluorescencia a los 15 días de cultivo. Barra=100 μ m.

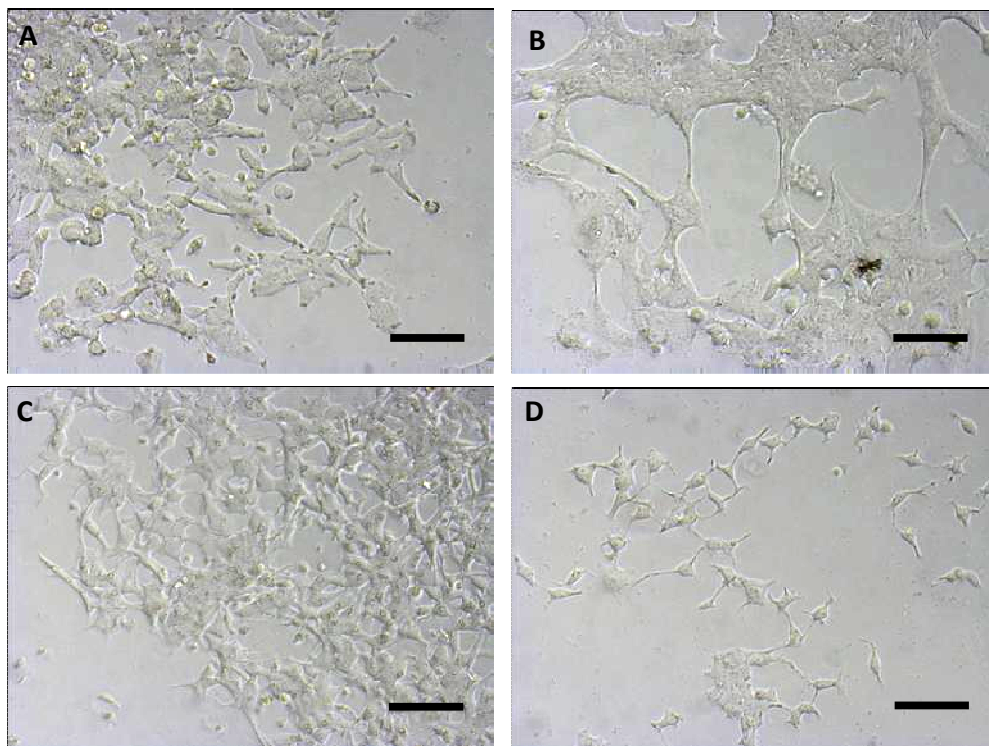


Figura 23. Morfologías observadas en los cultivos luego de 20 días de diferenciación. Se observaron morfologías tipo mesenquimal o fibroblastoide (A y B) en las células tratadas con SFB al 5% en ausencia de ácido retinóico. Los tratamientos libres de suero y en presencia de ácido retinóico, EGF y FGF2 mostraron morfologías tipo neural (C y D). Barra=100 μ m.

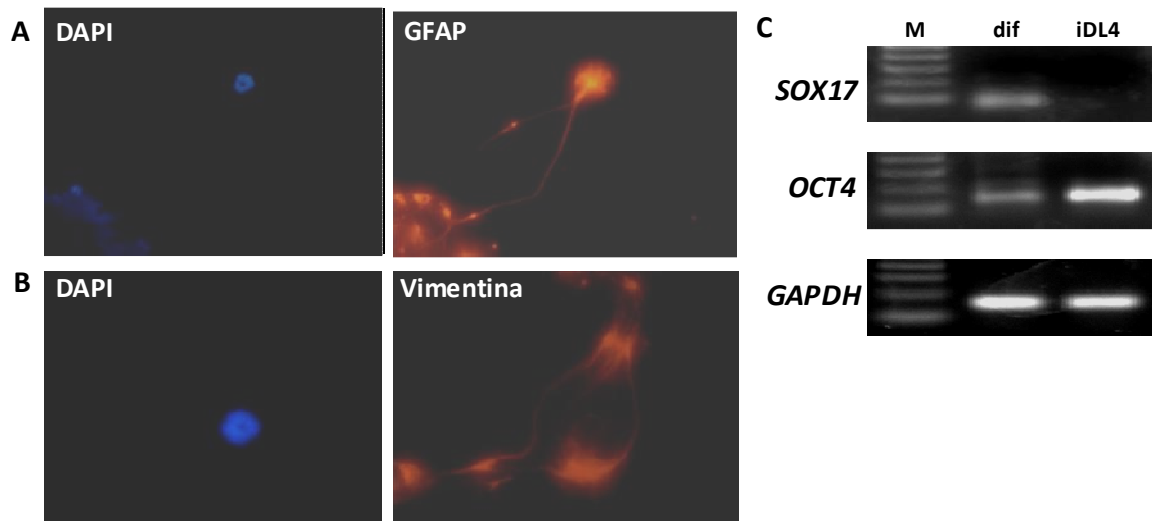


Figura 24. Análisis de marcadores de diferenciación en la línea iDL4. A) Análisis de la expresión del filamento intermedio GFAP por inmunofluorescencia en células iPS tratadas con inductores de neurogénesis. B) Análisis de la expresión del filamento intermedio Vimentina por inmunofluorescencia en células iPS tratadas con SFB al 5% a los 30 días. C) Análisis de expresión de los genes *SOX17* y *OCT4* en los cuerpos embrioides adheridos tratados con el coctel de moléculas de inducción de endodermo (dif) respecto al control de células iPS de la línea iDL4.

6.6.6 Las células iPS aisladas son capaces de formar tumores en ratones inmunodeprimidos

Las células iPS fueron disgregadas y aproximadamente 2×10^6 células fueron inyectadas en la cadera de ratones de la cepa *FoxN1nu*. Alrededor de 15 días después de la inoculación se observó el crecimiento de tumores en las áreas de inyección (Figura 25). Las áreas inoculadas con la misma cantidad de CMPD no mostraron formación de tumores. Luego del día 20 el tumor formado por las células iPS se reabsorbió, por lo que no se pudieron realizar análisis histológicos.

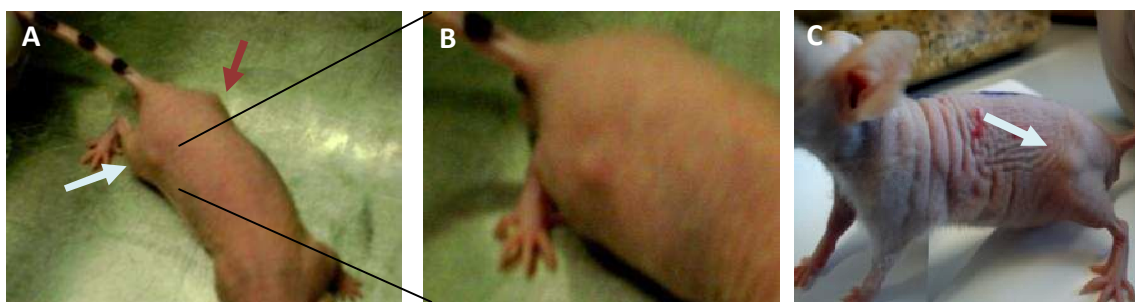


Figura 25. Formación de tumores tipo teratoma al día 15 luego de la inoculación. A) Fotografía de las zonas de inoculación control (flecha roja) y de células iPS (flecha blanca). Se observa que solo en la zona inoculada con iPS se da la formación de tumor. B) Fotografía ampliada del tumor formado. C) Formación de tumor (flecha blanca) a partir de un control positivo de células de teratocarcinoma NCCIT.

7. Discusión

7.1 Las CMPD son células clonogénicas de característica mesenquimal multipotente

Al aislar CMPD y cultivarlas in-vitro se observaron muchas células con morfología fibroblastoide tipo mesenquimal, pero también hubieron células con morfologías menos típicas, tales como células pequeñas y redondeadas o células pequeñas con bordes irregulares y granuloso. A pesar de esto, cerca del total de las células fueron positivas a marcadores mesenquimales típicos. A nivel funcional se observó que estas células poseen potencial condrogénico y osteogénico, pero no se pudo verificar diferenciación adipogénica.

La falta de diferenciación adipogénica en los ensayos realizados no descarta que dicho potencial esté presente en las CMPD aisladas. Hay que tomar en cuenta que las CMPD utilizadas en el presente proyecto fueron cultivadas en un medio suplementado con suero fetal al 5%, lo cual aún es un porcentaje elevado de SFB. Aún así, el tiempo de doblaje en células de tercer pase fue de 37 horas, un tiempo menor a lo reportado por otros autores quienes han utilizado medios de cultivo con suero fetal al 10%. En concordancia con este resultado, la fuerte expresión de c-MYC observada en las CMPD indica que tienen una capacidad clonogénica elevada. Sin embargo, el potencial de diferenciación adipogénico tendrá que compararse con un medio rico en SFB y con un medio libre de SFB.

Adicionalmente se pudo observar de forma notable la baja expresión de HLA-ABC, lo cual indica que estas células podrían estar expresando HLA de tipo no clásico. La expresión de HLA no clásico es típico de células troncales multipotentes con propiedades inmuno-moduladoras. Esta propiedad ha sido ampliamente estudiada en CMM de médula ósea por su aplicabilidad en trasplantes.

7.2 El inicio de la reprogramación involucra procesos de epitelización favorecidos por la inhibición de la ruta de TGF- β

Tal y como fue observado luego de alrededor de 5 días de la transducción con los vectores lentivirales, el cambio morfológico es el primer indicador de que la reprogramación se está efectuando en las células. Dicho cambio morfológico implica una notable compactación celular seguida de una intensa proliferación que da como resultado la formación de pequeños aglomerados celulares que en último término generarán colonias. Es importante señalar que el cambio morfológico observado tanto en MEF como en las CMPD es muy parecido. Gracias a la

señal del vector reportero EOS, los aglomerados celulares con cambio morfológico fueron fácilmente identificables en las CMPD transducidas a pesar de que las CMPD no reprogramadas proliferaron hasta la confluencia.

Es notable que, en las CMPD, la inhibición de la ruta de TGF- β fue clave para la inducción inicial de la reprogramación. Únicamente las células tratadas con el inhibidor SB-431542 mostraron cambio morfológico y formación de colonias GFP+ y AP+, lo cual podría indicar que las células mesenquimales deben cruzar una barrera mucho más fuerte comparado con los fibroblastos embrionarios para alcanzar la epitelización. Esto es lógico pensar tomando en cuenta el estado del desarrollo en que se encuentran estas dos poblaciones de células. Podría suponerse que las células embrionarias tienen una mayor plasticidad que las células adultas, lo cual refleja un estado epigenético más permisivo para procesos de reprogramación. Sin embargo aún se desconocen todas las características que confieren a una célula su potencial para reprogramarse.

Por otro lado, la necesidad de inhibir la ruta de TGF- β para permitir la reprogramación de células mesenquimales también denota la influencia del medio de cultivo en el cual se está manteniendo a las CMPD. El suero fetal bovino posee cantidades considerables de ligandos activadores de la ruta de TGF- β y por tanto resulta importante encontrar las condiciones de cultivo óptimas reduciendo la cantidad de SFB y minimizar la activación de esta ruta para fines de reprogramación. En nuestro laboratorio se está trabajando en este problema con el objetivo de reducir los efectos negativos del suero fetal y encontrar un reemplazo nutricional que permita el mantenimiento adecuado de la expresión endógena de genes como MYC y KLF4 sin la necesidad de utilizar SFB.

7.3 Las células reprogramadas pueden sufrir fenómenos de reversión o de adaptación a las condiciones del medio de cultivo

Las células reprogramadas pueden revertir su fenotipo epitelial y dejar de expresar el reportero EOS al ser cultivadas en medio de células ES. Esto parece ser un fenómeno de selección en el cual las células efectivamente reprogramadas podrán avanzar hacia un estado de iPS maduras. Las células reprogramadas que pueden adaptarse al medio de cultivo de células ES y que pueden sobrevivir y proliferar sin cambios morfológicos ni funcionales se dice que han alcanzado un estado de iPS verdaderas. La expresión sostenida de los transgenes durante un tiempo prudencial (alrededor de 12 días) es necesaria para que este proceso de adaptación se lleve a

cabo. Cuando los transgenes se insertan en zonas donde la cromatina es muy inestable o en regiones de heterocromatina, el silenciamiento del transgén podría ser un evento frecuente capaz de inhibir el establecimiento de una reprogramación completa. Las reprogramaciones incompletas dan como resultado una reversión fenotípica del estado epitelial tal como se muestra en la figura 18.

Es importante observar que las células que lograron adaptarse a las condiciones de cultivo de células pluripotentes empezaron a proliferar rápidamente y mantuvieron la señal del reportero EOS. A las células les tomó 10 días para generar colonias lo suficientemente grandes como para ser observadas sin la necesidad de un microscopio y al día 14 ya pudieron ser transferidas a nuevos platos. Esta rápida cinética de generación de colonias pre-iPS ha sido reportada únicamente en fibroblastos humanos por Lin *et al* (2009) quienes utilizaron un tratamiento con 3 moléculas inhibitoras que incluyeron a SB431542.⁷¹ Probablemente la adición de SB431542 en las CMPD sea suficiente para una efectiva inducción de la pluripotencia y la generación de colonias estables carentes de fenómenos de reversión. La morfología de las colonias que empezaron a crecer luego del primer pase tuvo las características típicas observadas en células ES cultivadas *in-vitro*. La morfología tridimensional observada en estas células revela la expresión de la proteína de adhesión celular E-Cadherina, importante para el mantenimiento de la pluripotencia por interacciones células-célula.

7.4 Las células iPS son una población heterogénea que debe purificarse por medio de técnicas de separación

El análisis por citometría de flujo células iPS al día 30 reveló que aunque las células pueden expresar el reportero EOS, no todas expresan el marcador de superficie SSEA-4 (alrededor del 60% de las iPS expresaron SSEA4 al día 30 p.i.). Esta heterogeneidad de la población de células iPS implica que dichas células no se encuentran sincronizadas respecto a su nivel de reprogramación. Probablemente las células SSEA-4 negativas deben ser expuestas un mayor tiempo al medio de cultivo con el fin de iniciar la expresión de todos los marcadores de pluripotencia. Por este motivo la separación de la población GFP+SSEA4+ resulta conveniente para la obtención de iPS con un nivel de reprogramación homogéneo para la obtención de líneas celulares. Algo importante también fue verificar que la señal del reportero EOS y del marcador SSEA-4 efectivamente se correlaciona con la actividad de la fosfatasa alcalina en las colonias de células iPS aisladas, lo cual demuestra que la población aislada tiene características funcionales de pluripotencia.

7.5 Las líneas de células iPS SSEA4+ expresan a nivel funcional los factores del circuito de pluripotencia

Se pudo verificar que las células iPS generadas expresan los genes *OCT4*, *SOX2* y *NANOG*, los cuales componen el circuito de pluripotencia. Los genes del circuito de pluripotencia si bien pueden estar expresados es necesario verificar que dicho circuito sea capaz de inducir genes de pluripotencia como *REX1* o de marcadores de superficie como las proteínas Tra. Por medio de citometría de flujo y RT-PCR se pudo comprobar que la proteína Tra1-60 se encontraba expresada en las iPS y que el gen *REX1* estaba inducido en dichas células. Aunque es necesario verificar la expresión de una mayor cantidad de genes con el fin de confirmar la completa reprogramación de las células, los datos obtenidos indican que las células están sufriendo un re-arreglo epigenético importante que finalmente terminará con la completa reprogramación del genoma.

7.6 Las células iPS obtenidas no presentan memoria de su estado mesenquimal

Una de las propiedades especiales de la reprogramación hacia el estado pluripotente es su capacidad para eliminar las características fenotípicas de la célula reprogramada. Sin embargo es común observar que las células reprogramadas mantienen ciertos marcadores típicos de las células de las cuales se originaron, lo cual se denomina como “memoria celular”. Aunque la memoria celular puede ser consecuencia de re-arreglos epigenéticos incompletos cuyo análisis requiere de técnicas moleculares especiales, en las células mesenquimales es fácil observar este fenómeno por la presencia o ausencia de los marcadores mesenquimales típicos. Según el resultado obtenido con el análisis de los marcadores CD90 y CD105 se pudo verificar que las células reprogramadas carecen de las características mesenquimales y que el proceso de reprogramación, al menos en las células iPS aisladas, fue efectivo.

7.7 Las líneas de células iPS aisladas son funcionales in-vitro y forman tumores in-vivo

Las células iPS aisladas tuvieron la capacidad de formar cuerpos embrioides al ser cultivadas en suspensión. De estos cuerpos embrioides empezaron a migrar células proliferativas al plato de cultivo cubierto con gelatina. Estas células redujeron marcadamente la señal del reportero EOS e iniciaron procesos de diferenciación revelado por el cambio morfológico. Los análisis por inmunofluorescencia y RT-PCR demuestran que los tratamientos de diferenciación realizados efectivamente inducen la expresión de marcadores de linajes de células adultas o de sus progenitoras. Estas evidencias demuestran que las células iPS generadas a partir de CMPD son funcionales in-vitro.

La diferenciación in-vitro es una prueba importante para demostrar la funcionalidad de las células pluripotentes, sin embargo la diferenciación in-vivo demuestra la capacidad de estas células para responder al ambiente dentro de un organismo vivo. Por medio del experimento por trasplante hacia ratones *FoxN1nu* se pudo verificar que la línea iDL4 es capaz de formar tumores al día 15 luego de la inoculación, sin embargo el ensayo no pudo ser completado debido a que los tumores formados fueron eliminados por el ratón hospedero al día 20. La culminación del experimento implicaría la realización de cortes histológicos de los tumores para verificar que estos posean estructuras estratificadas a diferencia de los tumores cancerosos que no estratifican los tejidos tumorales. La absorción del tumor pudo deberse a que los ratones utilizados tenían una edad avanzada y su sistema inmune independiente de células T fue capaz de eliminar el tumor formado. Además, los protocolos más recientes de trasplante incluyen matrices extracelulares como Matrigel, quizás como un soporte para mejorar la retención de las células en la zona de inoculación. Para nuevos ensayos de formación de teratomas se propone utilizar ratones *FOXN1nu* de 4 semanas de edad como máximo o utilizar ratones de la cepa *NOD-SCID* los cuales poseen una inmunosupresión más estable. De todas maneras, el potencial tumorigénico de las células iPS pudo ser demostrado, cumpliéndose con el perfil de características funcionales que definen a una célula pluripotente.

8. Conclusiones

Tomando en cuenta el análisis de los resultados obtenidos se puede concluir que las células mesenquimales de pulpa dental humana pueden ser inducidas hacia un estado tipo troncal pluripotente con el uso de un vector lentiviral policistrónico facilitando a nivel técnico la generación de células iPS. La generación de células iPS en este modelo celular, bajo las condiciones de cultivo utilizadas, fue únicamente posible por medio de la inhibición de la ruta de TGF- β , probablemente por inhibición del estado mesenquimal y por el favorecimiento de la transición mesénquima-a-epitelio.

El presente trabajo propone dos estrategias innovadoras: 1) el uso de un vector policistrónico que había sido probado únicamente en fibroblastos dermales, y 2) el uso de una sola molécula, el inhibidor SB-431542, la cual es suficiente para permitir la reprogramación de CMPD. Previamente Lin y colaboradores (2009) propusieron utilizar un coctel de tres moléculas sin las cuales la reprogramación de fibroblastos dermales resulta significativamente ineficiente: SB431542,

PD0325901 (inhibidor de MEK) y thiazovivin (inhibidor de ROCK). A parte de que el uso de moléculas potenciadoras de la reprogramación no ha sido evaluado en células mesenquimales, en este trabajo se pudieron obtener colonias de células reprogramadas utilizando una sola molécula potenciadora demostrando que las células mesenquimales se encuentran menos restringidas para procesos de reprogramación en relación a los fibroblastos dermales. Nuevas investigaciones sobre la inhibición del estado mesenquimal permitirán establecer métodos aún más eficientes para generar células iPS a partir de células mesenquimales.

9. Perspectivas

La presente investigación deja algunas perspectivas generadas a partir de la experimentación. Primeramente las condiciones de cultivo de las células que se quiere reprogramar podría ser un factor que aún no se ha tomado en cuenta en la inducción de la pluripotencia. Si bien se sabe que las células van perdiendo su capacidad de reprogramarse mientras proliferan debido a la adquisición de senescencia in-vitro, aún no se sabe bajo qué condiciones se deberían mantener a estas células de tal forma de que no pierdan aquellas propiedades que les permiten reprogramarse de forma eficiente. Encontrar dichas condiciones podría ayudar a identificar y entender a las propiedades que permiten la reprogramación del núcleo celular. Bajo los resultados experimentales obtenidos en el presente proyecto, definitivamente una de las condiciones importantes es el favorecimiento de la epitelización por inhibición de la ruta de TGF- β . Probablemente existan otras condiciones favorables que puedan ser aplicadas ya durante el cultivo rutinario de las células mesenquimales y de esta manera permitir la reprogramación independientemente del pase en que se encuentren las células. Sería interesante averiguar el nivel de senescencia adquirido bajo diferentes condiciones de cultivo y ver cómo esto se correlaciona con la eficiencia de reprogramación.

A nivel técnico queda como perspectiva el completar la caracterización de las líneas de células iPS obtenidas. Esto implica el análisis de expresión de una mayor cantidad de genes específicos de células pluripotentes, el análisis del estado epigenético de los promotores de genes del circuito de pluripotencia y la identificación de estructuras embrionarias dentro de los tumores formados por el trasplante de células iPS, análisis que son necesarios para demostrar de forma definitiva el estado de pluripotencia completa de las células reprogramadas. Una vez verificado esto, las células iPS serán utilizadas para estudios de diferenciación inducida hacia linajes como el cardiaco,

hepático, pancreático y neural. Esto demostraría la competencia de las líneas de iPS obtenidas para diferenciarse hacia algunas de las células adultas de gran importancia a nivel clínico y nos permitirá mejorar nuestro conocimiento sobre los mecanismos implicados en la diferenciación celular.

10. Anexos

Anexo #1. Descripción de los marcadores positivos y negativos evaluados en las células mesenquimales.

Marcadores positivos

CD	Nombre(s) de la proteína	Descripción
CD44	H-CAM (<i>Homing Cell Adhesion Molecule</i>); Pgp-1; Hermes	Se une a hialuronato; interviene en la adhesión a células endoteliales y a la matriz extracelular.
CD73	Ecto-5'-nucleotidasa	Proteína con actividad ecto-5' nucleotidasa; interviene en señalización celular principalmente en linfocitos T.
CD90	Thy-1 (<i>Thymocyte differentiation antigen</i>)	Función no bien establecida; posible función en la activación de linfocitos T.
CD105	Endoglin	Modula la respuesta a TGF- β
CD146	MCAM (<i>Melanoma Cell Adhesion Molecule</i>)	Posible función en uniones intercelulares.

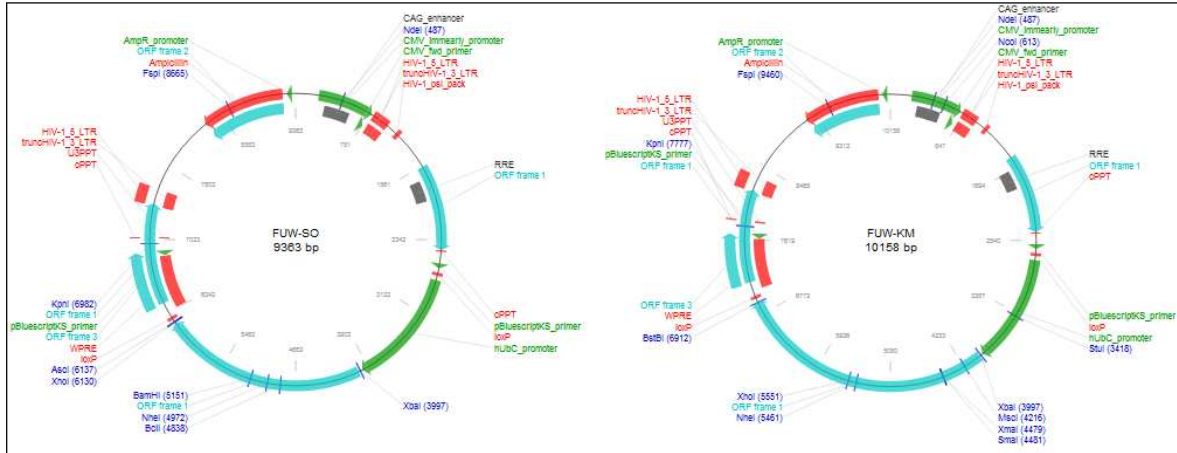
Marcadores negativos

CD	Nombre de la proteína	Descripción
CD14	Antígeno de diferenciación de monocitos	Componente del receptor de LPS
CD31	PECAM-1 (<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1</i>)	Proteína de adhesión importante en la diapédesis leucocitaria.
CD34	<i>Hematopoietic progenitor cell antigen</i>	Adhesión intercelular; se une a la selectina L (CD62L).
CD45	Antígeno común de linfocitos; PTPRC.	Función en la señalización mediada por los receptores antigénicos de los linfocitos T y B.

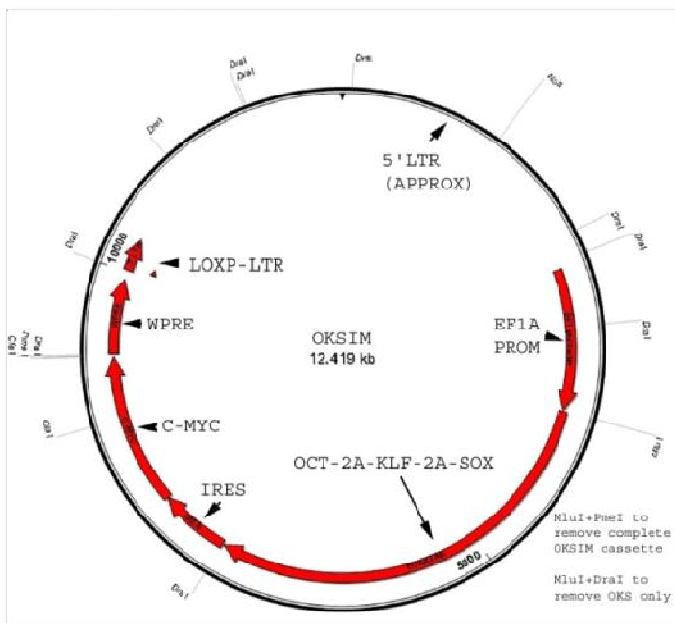
Anexo #2. Lista de factores de transcripción utilizados por Yamanaka y Takahashi para la inducción de la pluripotencia en MEF y TTF.

ECAT1	ESG1	ERAS
ECAT8	DPPA2	TCL1
NANOG	DPPA3	GDF3
DNMT31	DPPA4	CTNNB1
ZFP42	FBXO15	SALL4
UTF1	OCT4	SOX15
FTLH17	MYC	SOX2
FOXD3	STAT3	KLF4

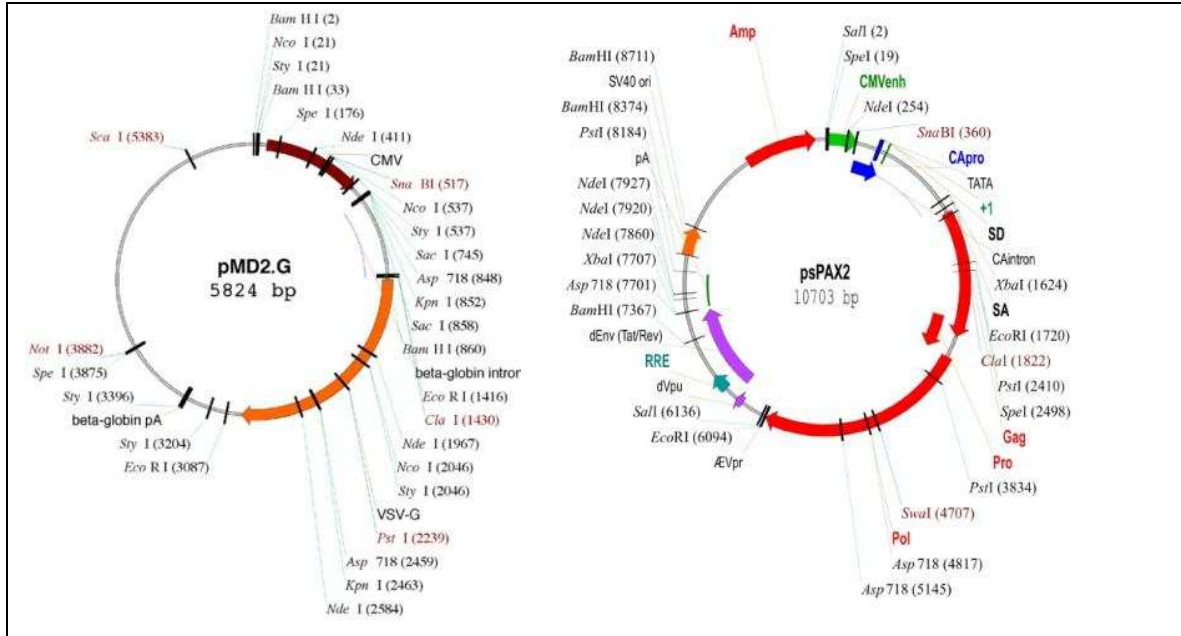
Anexo #3. Mapa de los vectores de transferencia FUW-SO y FUW-KM, utilizados para la reprogramación de MEF. Tomado de: www.addgene.org



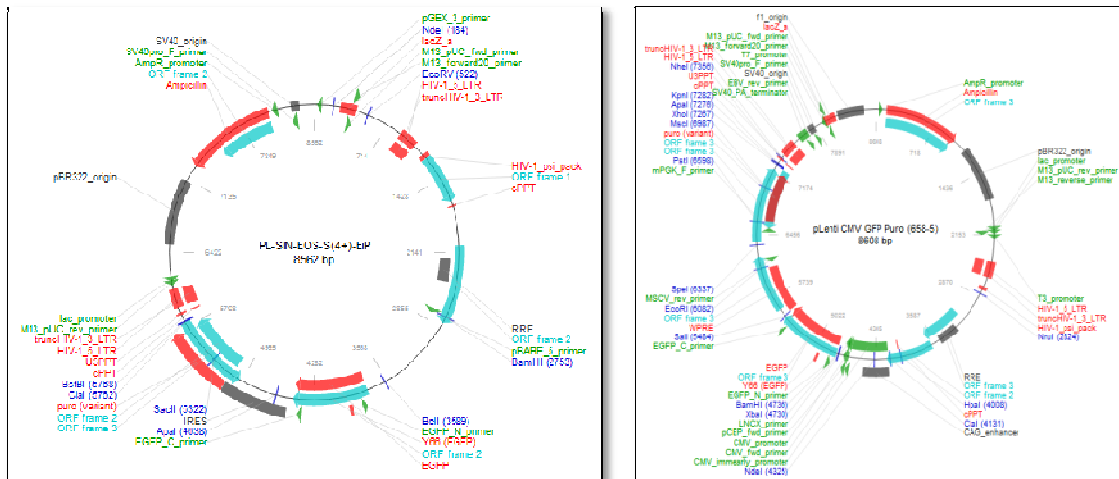
Anexo #4. Mapa del vector de transferencia OKSIM utilizado para la reprogramación de DPSC. Tomado de: www.addgene.org



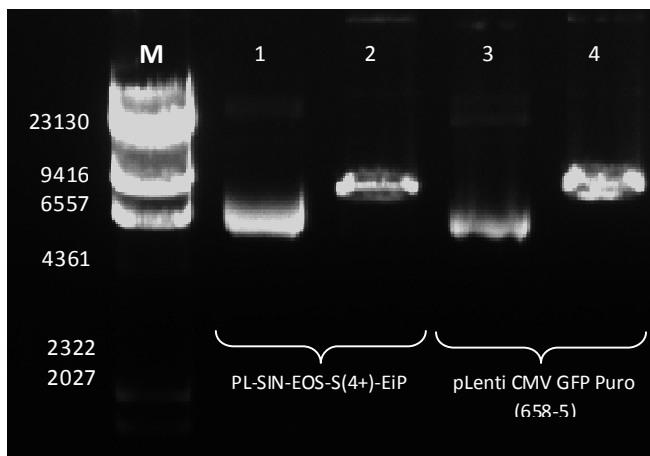
Anexo #5. Mapa del vector de envoltura pMD2.G y del vector de empaque psPAX2. Tomado de: www.addgene.org



Anexo #6. Mapa de los vectores de transferencia PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP y plenti CMV GFP Puro (658-5) utilizados como reporteros de reprogramación y de infección, respectivamente. Tomado de: www.addgene.org



Anexo #7. Análisis de restricción de los vectores de transferencia PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP y pLenti CMV GFP Puro (658-5) utilizados como reporteros de reprogramación y de infección. Los carriles 1 y 3 muestran las bandas sin restricción de los plásmidos PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP y pLenti CMV GFP Puro (658-5) respectivamente. Los carriles 2 y 4 muestran las bandas de los plásmidos PL-SIN-EOS-S(4+)-EiP y pLenti CMV GFP Puro (658-5) linearizados por restricción con enzimas de corte único.



11. Referencias

¹ Morrison SJ, Kimble J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature*. 2006, 441:1068-1074.

² Knoblich JA. Mechanisms of Asymmetric Stem Cell Division. *Cell*. 2008, 132: 583–597.

³ Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. Mosby. 3ra edición.

⁴ Pera MF, Tam MPL. Extrinsic regulation of pluripotent stem cells. *Nature*. 2010, 465:713-720.

⁵ Boyer LA, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 2005; 122(6):947-956.

⁶ Hochedlinger K, Plath K. Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development*. 2009; 136(4): 509-523.

⁷ Staudt LM, et al. Oct-3 is a Maternal Factor Required for the First Mouse Embryonic Division. *Cell*. 1991, 64:1103-1110.

-
- ⁸ Schöler HR, *et al.* New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. *Nature*. 1990, 344(6265):435-439.
- ⁹ Niwa H, *et al.* Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature*, 2000; 4: 372-376.
- ¹⁰ Mitsui K, *et al.* The Homeoprotein Nanog is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell*, 2003; 113:631-642.
- ¹¹ Nishimoto M, *et al.* The Gene for the Embryonic Stem Cell Coactivator UTF1 Carries a Regulatory Element Which Selectively Interacts with a Complex Composed of Oct-4 and Sox-2. *Mol Cell Biol*, 1999.
- ¹² Nishimoto M, *et al.* Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30(14):3202-3213.
- ¹³ Okumura-Nakanishi S, *et al.* Oct-3/4 and Sox2 regulate Oct-3/4 gene in embryonic stem cells. *J Biol Chem*, 2005; 280(7):5307-5317.
- ¹⁴ Koruda T, *et al.* Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression. *Mol Cell Biol*, 2005; 25(6):2475-2485.
- ¹⁵ Yuan H, *et al.* Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. *Genes Dev*. 1995; 9(21):2635-2645.
- ¹⁶ Thomson M, *et al.* Pluripotency Factors in Embryonic Stem Cells Regulate Differentiation into Germ Layers. *Cell*. 2011, 145: 875–889.
- ¹⁷ Wei G, *et al.* Stem cell plasticity in mammals and transdetermination in *Drosophila*: Common Themes? *Stem Cells*. 2000, 18:409-414.
- ¹⁸ Till, J.E. and McCullough, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res*. 1961, 14:213–222.
- ¹⁹ Luria EA, Panasyuk AF, Friedenstein AY. Fibroblast colony formation from monolayer cultures of blood cells. *Transfusion*. 1971, 11(6):345-349.
- ²⁰ Friedenstein AJ, *et al.* Precursors for fibroblasts in different populations of hematopoietic cells as detected by the in vitro colony assay method. *Exp Hematol*. 1974;2(2):83-92.

-
- ²¹ Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet.* 1987, 20(3):263-272.
- ²² Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Cell Tissue Kinet.* 1987, 20(3):263-272.
- ²³ The generation of hepatocytes from mesenchymal stem cells and engraftment into the liver. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010; 16(1):69-75.
- ²⁴ Rojas M, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33(2):145-152.
- ²⁵ Cipriani S, *et al.* Mesenchymal cells from human amniotic fluid survive and migrate after transplantation into adult rat brain. *Cell Biol Int.* 2007; 31(8):845-850.
- ²⁶ Horwitz EM, *et al.* Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2005;7(5):393-395.
- ²⁷ Dominici M, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; 8(4): 315-317.
- ²⁸ Gronthos S, *et al.* Postnatal human dental pulp stem cells (DPSC) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(25): 13625–13630.
- ²⁹ Janebodin K, *et al.* Isolation and Characterization of Neural Crest-Derived Stem Cells from Dental Pulp of Neonatal Mice. *PlosOne.* 2011, 6(11):e27526.
- ³⁰ Karaoz E, *et al.* Human dental pulp stem cells demonstrate better neural and epithelial stem cell properties compared to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2011, 136:455–473.
- ³¹ Christen Brownlee. Nuclear Transfer: Bringing in the Clones. PNAS. Página web: <http://www.pnas.org/site/classics/classics4.xhtml>
- ³² Fishberg M, Gurdon JB, Elsdale TR. Nuclear transfer in amphibia and the problem of the potentialities of the nuclei of differentiating tissues. *Nature.* 1958, 181(424).
- ³³ Gurdon JB. Tetraploid Frogs. *J Exp Zool.* 1959, 141:519-543.
- ³⁴ Fishberg, M., Gurdon, J. B., & Elsdale, T. R. A description of the technique for nuclear transplantation in *Xenopus laevis*. *J Embryol Exp Morphol.* 1960, 8:437-444.

-
- ³⁵ Gurdon JB, Uehlinger V. "Fertile" intestine nuclei. *Nature*. 1966, 210(5042):1240-1241.
- ³⁶ Wilmut I, *et al.* Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells. *Nature*. 2007, 385(27):810-813.
- ³⁷ Meyers RA (Editor). *Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine: Stem Cells*. Wiley-VCH. 2012, 2da edición.
- ³⁸ Yamanaka S, Takahashi K. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006; 126: 663–676.
- ³⁹ Yu J, *et al.* Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science*. 2007, 318:1917-1920.
- ⁴⁰ Takahashi K, *et al.* Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007, 131, 861–872.
- ⁴¹ Nakagawa M, *et al.* Generation of induced pluripotent stem cells without c-Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*. 2008, 26(1):101-106.
- ⁴² Carey BW, *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *PNAS*. 2008, 106(1): 157–162.
- ⁴³ Mario MR, *et al.* A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity. *Nature*. 2009, 460:1149-1153.
- ⁴⁴ Kawamura T, *et al.* Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*. 2009, 460: 1140-1144.
- ⁴⁵ Eminli S, *et al.* Differentiation stage determines potential of hematopoietic cells for reprogramming into induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2009, 41(9):968-976.
- ⁴⁶ Giorgetti A, *et al.* Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Cord Blood Using OCT4 and SOX2. *Cell*. 2009, 5:353-357.
- ⁴⁷ Li W, Ding S. Small molecules that modulate embryonic stem cell fate and somatic cell reprogramming. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009,31(1):36-45.
- ⁴⁸ Shi Y, *et al.* A Combined Chemical and Genetic Approach for the Generation of Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2008, 2:525-528.

-
- ⁴⁹ Heng JC, *et al.* The nuclear receptor Nr5a2 can replace Oct4 in the reprogramming of murine somatic cells to pluripotent cells. *Cell Stem Cell*. 2010, 6(2):167-174.
- ⁵⁰ Maherali N, Hochedlinger K. Tgfbeta signal inhibition cooperates in the induction of iPSCs and replaces Sox2 and cMyc. *Cell Curr Biol*. 2009, 19(20):1718-1723.
- ⁵¹ Samavarchi-Tehrani P, *et al.* Functional Genomics Reveals a BMP-Driven Mesenchymal-to-Epithelial Transition in the Initiation of Somatic Cell Reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2010, 7(1):64–77.
- ⁵² Li R, *et al.* A Mesenchymal-to-Epithelial Transition Initiates and Is Required for the Nuclear Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010, 7(1):51-63.
- ⁵³ Polo JM, Konrad Hochedlinger K. When Fibroblasts MET iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2010, 7(1):5-6.
- ⁵⁴ Grignani F, *et al.* Negative autoregulation of c-myc gene expression is inactivated in transformed cells. *EMBO J*. 1990, 9(12):3913-22.
- ⁵⁵ Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*; 7(11):1074-1082.
- ⁵⁶ Werning M, *et al.* c-Myc is dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell*. 2008, 2:10-12.
- ⁵⁷ Tamaoki M, *et al.* Dental Pulp Cells for Induced Pluripotent Stem Cell Banking. *J Dent Res*. 2010, 89(8):773-778.
- ⁵⁸ Yan X, *et al.* iPS cells reprogrammed from human mesenchymal-like stem/progenitor cells of dental tissue origin. *Stem Cells Dev*. 2010; 19(4):469-480.
- ⁵⁹ Beltrão-Braga PI, *et al.* Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. *Cell Transplant*. 2011, 20:1707-1719.
- ⁶⁰ Maurizio Federico. *Lentivirus Gene Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*. Humana Press. 2003, Vol 229. Totowa, New Jersey.
- ⁶¹ Hunt KK, Vorburger SA, Swisher SG. *Cancer Drug Discovery and Development: Gene Therapy for Cancer*. Humana Press Inc. 2007, Totowa, NJ.
- ⁶² Raghavendra NK, *et al.* Identification of host proteins associated with HIV-1 preintegration complexes isolated from infected CD4+ cells. *Retrovirology*. 2010, 7(66).

-
- ⁶³ Kitamura T, *et al.* Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp Hematol.* 2003, 31(11):1007-1014.
- ⁶⁴ Hennecke M, *et al.* Composition and arrangement of genes define the strength of IRES-driven translation in bicistronic mRNAs. *Nucleic Acids Research.* 2001, 29:3327–3334.
- ⁶⁵ de Felipe P, *et al.* E unum pluribus: multiple proteins from a self-processing polyprotein. *Trends Biotechnol.* 2006, 24:68–75.
- ⁶⁶ Donnelly ML, *et al.* Analysis of the aphthovirus 2A/2B polyprotein ‘cleavage’ mechanism indicates not a proteolytic reaction but a novel translational effect: a putative ribosomal skip. *J Gen Virol.* 2001, 82:1013–1025.
- ⁶⁷ Carey BW, *et al.* Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *PNAS.* 2009, 106(1):157-162
- ⁶⁸ Ross PJ, *et al.* Human Induced Pluripotent Stem Cells Produced Under Xeno-Free Conditions. *Stem Cells Dev.* 2010, 19(8):1221-1229.
- ⁶⁹ Michalska AE. Isolation and Propagation of Mouse Embryonic Fibroblasts and Preparation of Mouse Embryonic Feeder Layer Cells. *Current Protocols in Stem Cell Biology*, 2009; U 1C3.
- ⁷⁰ Hotta *et al.* Isolation of human iPS cells using EOS lentiviral vectors to select for pluripotency. *Nature Methods.* 2009, 6(5):370-376.
- ⁷¹ Lin T, *et al.* A chemical platform for improved induction of human iPSCs. *Nature Methods.* 2009, 6(11):805-808.