



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

**OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES EMBRIONARIAS DERIVADAS
DE CIGOTOS EN SEGMENTACIÓN DE MALA CALIDAD**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. EN C. DANIELA AVILA GONZÁLEZ

TUTOR:

DR. NÉSTOR FABIÁN DÍAZ MARTÍNEZ FACULTAD DE CIENCIAS

COMITÉ TUTOR:

DR. IGNACIO CAMACHO ARROYO, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. FERNANDO PEÑA ORTEGA, INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX., JUNIO, 2017



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

Al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT), por la beca brindada con el número de registro 231731.

Al Instituto Nacional de Perinatología (INPer) con el número de proyecto 212250-21071 y a CONACyT con el número de proyecto 20271, por el financiamiento otorgado para llevar a cabo este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Anayansi Molina Hernández, cuyos consejos y sugerencias me sirvieron para resolver algunos problemas técnicos que tuve mientras realizaba los experimentos.

A la Dra. Wendy Portillo, por su valioso apoyo a diferentes niveles para poder llevar a cabo esta tesis doctoral.

Al Dr. Emmanuel Díaz, por su colaboración en los ensayos de teratomas.

A la M. en C. Guadalupe García López, a la Dra. Irma García Castro y al M. en C. Héctor Flores Herrera, por el apoyo técnico y porque siempre estuvieron dispuestos a ayudarme cuando se los solicitaba.

A los miembros de mi Comité Tutorial, por sus recomendaciones a lo largo de todos los exámenes tutorales.

A los miembros de mi Jurado, por sus aportaciones para la culminación de esta tesis.

A mi tutor, Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez, por haberme aceptado como integrante de su laboratorio, por haber depositar su confianza en mí para llevar a cabo esta tesis, y sobre todo, por enseñarme que es un honor y un orgullo hacer ciencia.

MÁS AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi familia por todo su apoyo incondicional; a mis amigos, ustedes saben quiénes son, incluyendo a los que conocí en el taller de cuento y novela y en el grupo de lectura de Leonardo Garvas; por último, a los acaparadores del grupo esnobista de Gredos, entre ellos a Ismael, Moisés y demás fauna.

Lo que no puedo crear, no lo puedo entender

Richard P. Feynman

ÍNDICE

SIGLAS Y ABREVIATURAS.....	i
RESUMEN	iv
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
ANTECEDENTES.....	2
¿Qué son las células troncales?.....	2
El origen de la pluripotencia durante el desarrollo celular	4
Origen histórico de las células troncales embrionarias: de monstruos a maravillas.....	6
Caracterización <i>ad hoc</i> para la determinación de la pluripotencia <i>in vitro</i>	11
La familia de las células troncales pluripotentes.....	15
El Atlas de la pluripotencia: las vías de señalización descritas en las mESC y hESC	20
Bases moleculares de la pluripotencia humana y murina	24
La epigenética de la pluripotencia humana.....	28
Estados alternos de la pluripotencia: <i>naive</i> y <i>primed</i>	30
¿Cuál es la auténtica naturaleza de las hESC?	32
Los microRNAs: su biogénesis y función	35
Pequeños reguladores no codificantes: pedestales de la pluripotencia.....	38
Problemas en la investigación con hESC	41
Uso de embriones humanos para la derivación de hESC.....	41
Falta de disponibilidad de líneas hESC.....	44
Capas nodrizas de origen animal para el cultivo de hESC	45
La heterogeneidad de las hESC	46
Células epiteliales del amnios humano: una alternativa de capa nodriza	48
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	54
HIPÓTESIS.....	56
OBJETIVOS.....	57
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	58
Obtención de cigotos de mala calidad	58
Obtención de la capa nodriza del epitelio amniótico humano	58
Obtención de la capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados.....	59
Derivación de hESC a partir de embriones de mala calidad	60
Mantenimiento de hESC en condiciones de capa nodriza	61

Detección de fosfatasa alcalina	62
Análisis del cariotipo	62
Retrotranscripción (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
Inmunohistoquímica	67
Diferenciación <i>in vitro</i>	68
Ensayo de formación de teratomas.....	68
Obtención de medio condicionado de las capas nodrizas.....	69
Mantenimiento de las líneas hES en condiciones libres de capa nodriza	70
Extracción del DNA y análisis Epi-Pluri-Score.....	71
Diseño de primers para la detección de miRNAs por RT y PCR.....	72
Identificación de miRNAs relacionados con la pluripotencia mediante RT y PCR.....	73
Secuenciación de los productos de miRNAs de PCR punto final.....	75
Cuantificación de los niveles de miRNAs por qPCR	75
Validación del método $2^{\Delta\Delta CT}$	76
RESULTADOS.....	78
Derivación de una línea de hESC utilizando hAEC como capa nodriza	78
Morfología de las hESC.....	79
Caracterización de la línea Amicqui-1 derivada y mantenida sobre hAEC.....	81
Diferenciación <i>in vitro</i> de la línea Amicqui-1 hacia los tres linajes embrionarios.....	92
Diferenciación <i>in vivo</i> de Amicqui-1 hacia los tres linajes embrionarios	94
Mantenimiento de las líneas H1 y H9 sobre la capa nodriza de hAEC.....	96
Mantenimiento de las líneas Amicqui-1, H1 y H9 en condiciones libres de capa nodriza	103
Análisis Epi-Pluri-Score.....	117
Identificación de miRNAs relacionados con la pluripotencia en las células y en el medio de cultivo	119
Cuantificación de los niveles de miRNAs por qPCR	121
DISCUSIÓN.....	128
CONCLUSIONES.....	143
REFERENCIAS	144
ANEXOS.....	159
ADDENDUM	165
PUBLICACIONES GENERADAS CON AGRADECIMIENTOS AL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS	166

SIGLAS Y ABREVIATURAS

2i: inhibidor de ERK2 (PD0325901) e inhibidor de GSK3 (CHIR99021)

A: condición de cultivo sobre Haec

A-CM: Matrigel con hAEC-CM

APC: Adenomatous Polyposis Coli

bFGF: basic Fibroblast Growth Factor

BMP: Bone Morphogenetic Proteins

cDNA: DNA complementario

CM: Conditioned media

DMSO: Dimethyl Sulfoxide

DNMT: DNA Methyltransferases

dNTP: desoxinucleótido

EB: Embryoid Bodies

ECC: Embryonal Carcinoma Cells

EGC: Embryonic Germinal Cells

EGF: Epidermal Growth Factor

EpiPost: Epiblasto Postimplantado

EpiPre: Epiblasto Preimplantado

EpiSC: Epiblast-derived Stem Cells

ESC: Embryonic Stem Cells

FA: Fosfatasa Alcalina

FBS: Fetal Bovine Serum

Feeder-free: Condiciones libres de capa nodriza

FGF: Fibroblast Growth Factor

GSK3: Glycogen Synthase Kinase-3

H3K4me3: trimetilación de la lisina 4 de la Histona 3

H3K27me3: trimetilación de la lisina 27 de la Histona 3

hAEC: human Amniotic Epithelial Cells

hAEC-CM: hAEC- Conditioned Media

hEGC: human EGC

hESC: human ESC
HFM: Human Fetal Membranes
HGF: Hepatocyte Growth Factor
hiPSC: human iPSC
hPSC: human PSC
ICM: Inner Cell Mass
iMEF: MEF inactivados
iPSC: induced Pluripotent Stem Cells
ISSCR: International Society for Stem Cell Research
JAK: Janus Associated Tyrosine Kinase
JNK: c-Jun N-terminal Kinase
KGF: Keratinocyte Growth Factor
KLF: Kruppel Like Factor
KOSR: Knockout Serum Replacement
LIF: Leukemia inhibitory factor
lncRNA: long non coding RNA
LRP5/6: Low Density-Lipoprotein Receptor Related Protein 5/6
M: condición de cultivo sobre iMEF
M-CM: Matrigel con MEF-CM
MAPK/ERK: Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal Regulated Kinase
MBD2: Methyl-CpG Domain Protein 2
MECP2: Methyl CpG Binding Protein 2
meDNA: metilación del DNA
MEF: Mouse Embryonic Fibroblasts
MEF-CM: MEF-Conditioned Media
mESC: mouse ESC
mEGC: mouse EGC
miRNA: microRNA
OSKM: Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc
OSN: OCT4, SOX2 y NANOG
PBS: Phosphate Buffered Saline

PGC: Primordial Germinal Cells
PI3K: Phosphatidylinositol 3-OH Kinase
PICMI: Post ICM Intermediate
PKC: Protein Kinase C
pluri-miRNAs: miRNAs relacionados con la pluripotencia
PRC2: Polycomb Repressive Complex2
PRDM14: PR Domain Containing 14
PSC: Pluripotent Stem Cells
Rbl2: Retinoblastoma Like
REX1: Reduced Expression Proteon 1
RISC: RNA-induced silencing complex
RT: Transcripción Reversa
SB: inhibidor SB431542
SCID: Severe Combined Immunodeficient
SCNT: Somatic Cell Nuclear Transfer
TGF: Transforming Growth Factor
shRNA: short hairpin RNA
SMAD2/3: Mother Against Decapentaplegic Homolog 2/3
SSEA: Stage Specific Embryonic Antigen
STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3
TC: Teratocarcinomas
TCF: T-Cell Factors
TRA1-1: Tumor Rejection Antigen 1-60
TrxG: Trithorax Complex
TE: Trofoectodermo
Y27632: inhibidor de Rho-cinasa

RESUMEN

La mayoría de las líneas de células troncales embrionarias humanas (hESC) han sido derivadas y mantenidas sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Sin embargo, el uso de capas nodrizas de origen no humano tiene varios inconvenientes como el riesgo de transmitir componentes xénicos al cultivo celular, lo que induciría una respuesta inmune una vez que las células fueran trasplantadas; *ergo*, representaría una barrera para la futura aplicación médica de las hESC. Además, el uso de condiciones alternativas como las matrices extracelulares sintéticas está relacionado con un mayor riesgo de alteraciones genéticas y epigenéticas, comprometiendo la pluripotencia de las hESC, por lo que hoy en día se ha sugerido que el uso de capas nodrizas humanas es aún el método más seguro para la derivación y el mantenimiento rutinario de las hESC. En este trabajo demostramos que las células del epitelio amniótico humano (hAEC) soportan la derivación y el mantenimiento de hESC a partir de embriones de mala calidad, aunque el mecanismo por el que interactúan ambos tipos celulares para promover la pluripotencia se desconoce. Por otra parte, cuando nuestra línea derivada Amicqui-1 así como H1 y H9 fueron cultivadas bajo diferentes condiciones (MEF, medio condicionado MEF [MEF-CM],

hAEC y medio condicionado hAEC [hAEC-CM]) fueron positivas para todos los marcadores pluripotentes así como el análisis Epi-Pluri-Score dictaminó que todas las líneas en todas las condiciones eran pluripotentes. Sin embargo, al evaluar ciertos miRNAs que están involucrados en la pluripotencia se encontró que los

niveles de miR-200c eran más altos en las condiciones de hAEC ya sea como capa nodriza o con su medio condicionado en comparación con MEF o MEF-CM. Esto sugiere que las hAEC pueden mantener la pluripotencia de las hESC a través de miR-200c el cual podría ser además un indicador de la heterogeneidad en el estado pluripotente de las hESC al ser cultivadas bajo distintas condiciones de cultivo.

ABSTRACT

Most existing human embryonic stem cells (hESC) lines have been derived and maintained in mouse embryonic fibroblasts (MEFs). However, the use of non-human feeder layers had several drawbacks, since they have the potential to transmit xenic-contaminants to the cell culture and, therefore, induce an immune response upon transplantation that would present a barrier for future medical application of hESC. In addition, the use of synthetic extracellular matrices could induce genetic and epigenetic alterations, compromising the pluripotency of hESC, for this reason human feeder layers in xeno-free conditions is still the safest method to derive and maintain hESC. We demonstrated that human Amniotic epithelial cells (hAEC) support the derivation and maintenance of hESC from poor quality embryos; however, the mechanisms involved in the interaction between both cell types to promote the pluripotency still remain unknown. In other hand, when Amicqui-1, H1 and H9 hESC were cultured under different culture conditions (feeder MEF, MEF conditioned media [MEF-CM], feeder hAEC and hAEC conditioned media [hAEC-CM]) they expressed all pluripotency markers evaluated and the analysis by Epi-Pluri-Score (based on DNA methylation at specific genes) classified these lines as pluripotent in all conditions. However, analysis by qPCR showed that hESC maintained on feeder-hAEC or Matrigel with hAEC-CM expressed high levels of microRNAs (e.g. miR-200c) as compared with feeder-MEF or MEF-CM. The above mentioned evidence suggests that hAEC can maintain the pluripotency of hESC and

induce change in levels of miR-200c which could be an indicator of differences in the functional potential of hESC cultured under different conditions.

INTRODUCCIÓN

Las células troncales embrionarias (ESC, por sus siglas en inglés *Embryonic Stem Cells*) se definen de acuerdo a dos características principales: la autorrenovación y la pluripotencia. La primera se refiere a la capacidad de una célula de generar un número indefinido de sucesoras idénticas, mientras que la pluripotencia se define como la capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular especializado que conforma a un organismo. Ambas propiedades le confieren una naturaleza única a las ESC, lo que las hacen aptas para ser utilizadas como modelo de estudio en la biología del desarrollo y la investigación biomédica, aportando información valiosa para comprender los mecanismos de desarrollo y diferenciación, en búsqueda de cómo a partir de una sola célula puede derivarse un organismo completo. En la última década dicha investigación ha incluido nuevos enfoques para la elucidación de la fisiopatología de enfermedades; lo que ofrece promesas para el descubrimiento de nuevas drogas y la producción de terapias de reemplazo celular para una plétora de enfermedades genéticas y degenerativas, que actualmente son intratables.

Sin embargo, a pesar de la existencia de líneas ESC de origen humano (hESC, *human ESC*), la mayoría de los avances se han realizado con líneas murinas. Además, de que se han reportado diferencias considerables entre éstas y las humanas. Por ejemplo: el requerimiento de los factores de crecimiento y las vías de señalización intracelular para mantenerlas en estado pluripotente, así como los marcadores de superficie celular, los cuales son específicos para cada especie (Wei et al., 2005). A razón de estas disparidades interespecie, los datos de investigación que se han acumulado acerca de las propiedades de las ESC de ratón (mESC, *mouse ESC*) no deberían ser extrapolados para la caracterización de las líneas humanas, así que es necesario ampliar el conocimiento acerca de la naturaleza única de las hESC y de los otros tipos de células pluripotentes humanas (hPSC, por sus siglas en inglés *human pluripotent stem cells*)

ANTECEDENTES

¿Qué son las células troncales?

De acuerdo a la Sociedad Internacional para la Investigación de Células Troncales (ISSCR, por sus siglas en inglés *International Society for Stem Cell Research*), las células troncales se definen de acuerdo a dos características fundamentales que las distinguen de cualquier otro tipo celular: una alta autorrenovación (facultad para dividirse y generar más células troncales idénticas a la antecesora) y por la capacidad de diferenciación ya sea hacia uno o más tipos celulares que tendrán una función especializada en el organismo. *Grosso modo* se pueden clasificar a las células troncales con base en su potencial de diferenciación a lo largo del desarrollo: Totipotentes (del latín *totus*, “entero”), pluripotentes (del latín *pluris*, “más”), multipotentes (del latín *multus*, “muchos”) y unipotentes (del latín *unus*, “uno”) (Figura 1).

La totipotencia se refiere a la capacidad de generar todos los linajes de un organismo completo incluyendo los tejidos extraembrionarios. En mamíferos únicamente el cigoto y las blástómeras de las dos primeras segmentaciones poseen dicho potencial. Las ESC son derivadas del embrión preimplantación y tienen un potencial pluripotente, el cual se refiere a la capacidad de formar todos los tipos celulares especializados que conforman un organismo a excepción de los tejidos extraembrionarios. Las células multipotentes se localizan en tejidos fetales y postnatales y su potencial es más limitado, ya que dan origen a tipos celulares de un linaje determinado. Ejemplo de ello son las células troncales neurales del sistema nervioso central (Jaenisch and Young, 2008). Finalmente, las células unipotentes son competentes para diferenciarse en únicamente un tipo celular, como el caso de las células troncales del epitelio intestinal (Slack, 2000).

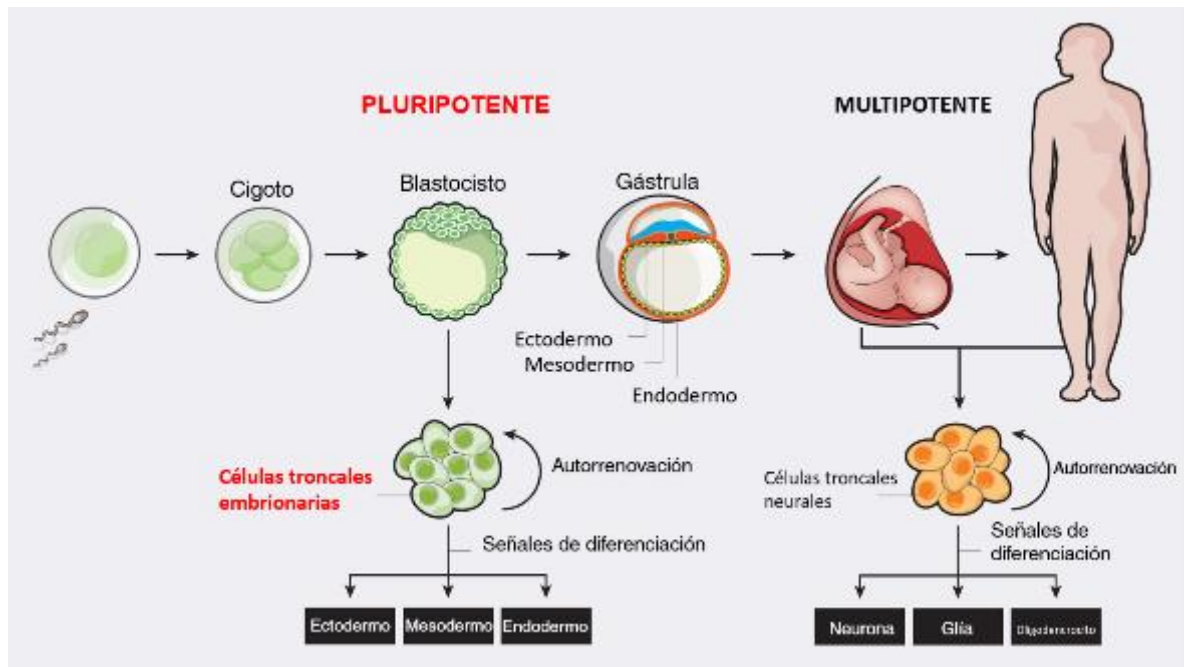


Figura 1. Células troncales embrionarias (ESC) y células troncales adultas (ASC). En las primeras etapas del desarrollo embrionario previo a la implantación, la masa celular interna (ICM) del blastocisto tiene un potencial pluripotente, ya que puede de dar origen a todos los tipos celulares de los tres linajes embrionarios (ectodermo, mesodermo y endodermo) que conforman un organismo. A partir de la ICM es posible derivar ESC las cuales se caracterizan por ser autorrenovables y mantener el potencial pluripotente, capaces de responder a señales específicas para diferenciarse a todos o alguno de los tres linajes y de esta forma, recapitular el desarrollo embrionario. En tanto que las ASC residen en sitios específicos (nichos) de los tejidos fetales y postnatales a la espera de señales determinadas para diferenciarse, de esta manera cumplen una función importante en el organismo como lo es el reemplazo celular. Sin embargo, su autorrenovación es menor comparado con las ESC, así como su potencial de diferenciación es multipotente al limitarse únicamente al linaje celular de donde se localiza su nicho. Por ejemplo, las células troncales neurales del sistema nervioso central pueden diferenciarse solamente a neuronas, oligodendrocitos y astrocitos. Modificado de Shevde, 2012.

El origen de la pluripotencia durante el desarrollo celular

Durante las primeras etapas del desarrollo embrionario en mamíferos, la fecundación del ovocito por el espermatozoide genera una célula con potencial totipotente, el cigoto, el cual mediante una secuencia específica espacial y temporal dará origen a un organismo completo y fértil (Condic, 2014). De esta manera, se presenta desde la etapa de una sola célula en el día 0.5 postfertilización (E0.5) hasta el cigoto de 8 células (E2.5) en el ratón; mientras que en el humano, el cigoto sigue siendo totipotente hasta la etapa de 4 células (E2.0) (De Paepe et al., 2014, Van de Velde et al., 2008). Conforme avanza el desarrollo, las blastómeras al compactarse para formar el blastocisto preimplantación pierden este potencial, ya que ocurre la primera especificación de linaje: las células ubicadas hacia el exterior formarán el trofoectodermo (TE) (estructura que dará origen a las estructuras extraembrionarias), mientras que las que poseen un mayor contacto entre ellas conformarán la masa celular interna (ICM, por sus siglas en inglés *Inner Cell Mass*), las cuales tienen un potencial pluripotente (Posfai et al., 2014) (Figura 1).

La pluripotencia se define como la capacidad de una célula para diferenciarse en todos los tejidos derivados de los tres linajes embrionarios que conforman un organismo (mesodermo, endodermo y ectodermo) a excepción de las estructuras extraembrionarias (Condic, 2014). A esta habilidad intrínseca de las células de la mórula compacta (E3.0) y de la masa celular interna del blastocisto preimplantación (E3.5-4.0) durante el desarrollo del ratón, se le denomina pluripotencia *naive*. Una vez que se implanta el blastocisto (E4.5-5.25) la ICM se segregará en dos linajes distintos: el hipoblasto que formará el endodermo primitivo y el epiblasto (ectodermo primitivo), el cual aún conserva la propiedad pluripotente aunque en esta ventana de tiempo se le designa pluripotencia *primed* (Figura 2). A partir del día E6.0 hasta el E8.5, durante la etapa de la gastrulación, el epiblasto postimplantación murino pierde su potencial para diferenciarse en los tres linajes embrionarios (Boroviak and Nichols, 2014, Boroviak et al., 2014).

A pesar de lo efímero de la pluripotencia durante el desarrollo en mamíferos, dicho estado puede ser capturado en condiciones *in vitro*, al cultivar cigotos en segmentación o la ICM en condiciones específicas, dando como resultado la

derivación de líneas de ESC. Estas células no sólo retienen la capacidad pluripotente, sino que, a diferencia del embrión y en condiciones específicas, pueden mantenerse en un estado de proliferación indefinido, generando un número ilimitado de células sucesoras idénticas (Martello and Smith, 2014, Hackett and Surani, 2014).

Actualmente, se encuentran registradas 378 líneas hESC en el *National Institute of Health* (<https://grants.nih.gov/grants/oer.htm>) así como 701 líneas en el *Human Pluripotent Stem Cell Registry* (<https://hpscereg.eu/>), lo que demuestra el gran interés que existe a nivel internacional por derivar, mantener y utilizar ESC de origen humano en la investigación básica, repercutiendo en su probable uso en la medicina regenerativa a futuro.

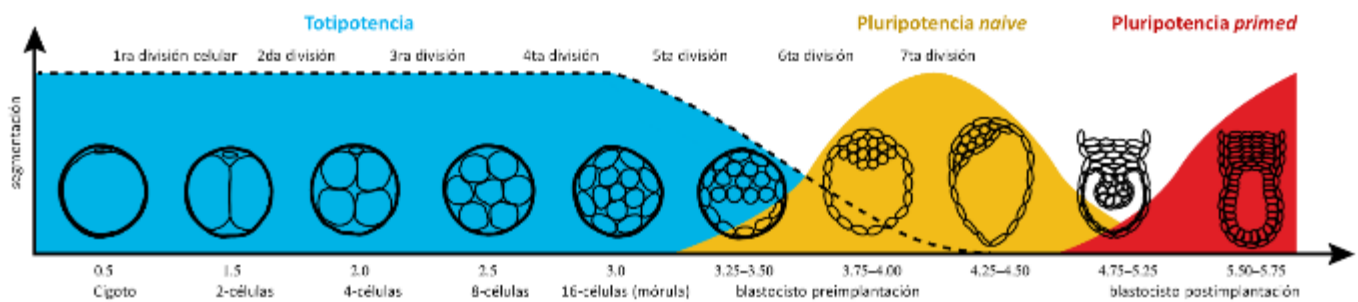


Figura 2. Resumen del potencial de diferenciación embrionario del ratón en relación a la ventana de tiempo desde el cigoto hasta a la postimplantación. Las etapas de segmentación se indican por la línea punteada y corresponden al período de potencial totipotente (azul). La pluripotencia naíve (amarillo) se establece en la etapa del blastocito previa a la preimplantación y finalmente la pluripotencia primed (rojo) es una propiedad del epiblasto ya implantado. Modificado de Boroviak & Nichols, 2014.

Origen histórico de las células troncales embrionarias: de monstruos a maravillas

El conocimiento que se tiene acerca de la naturaleza de las ESC ha sido posible por el descubrimiento y la investigación en torno a los teratocarcinomas (TC) y las células del carcinoma embrionario a partir de 1950. Los teratomas y los TC son tumores (benignos o malignos, respectivamente) encapsulados que se originan usualmente en las gónadas, aunque en ocasiones pueden crecer en sitios extragonadales. La palabra *teratos* proviene del griego y significa “monstruo”, en referencia a que estas neoplasias están conformadas por derivados de las tres capas embrionarias, desde dientes, trozos de hueso, piel, cabello, entre otros; por lo que para la biología del desarrollo y la embriología el fenómeno de los TC y teratomas siempre ha sido un tema intrigante. Sin embargo, por muchos años su estudio se limitó únicamente al reporte de casos descriptivos en humanos, debido a que en modelos animales era extremadamente rara su aparición, lo que dificultaba su análisis de forma experimental (Solter, 2006).

En la década de los 50s del siglo XX, Leroy Stevens se percató que los ratones de la cepa 129, a diferencia de otras, desarrollaban una mayor incidencia de estos tumores gonadales (1%), lo que marcó no sólo el inicio del trabajo experimental para dilucidar la biología de los teratomas y TC, sino que también del campo de las células troncales pluripotentes (Stevens and Little, 1954). Trabajos pioneros demostraron que al trasplantar las gónadas primordiales provenientes de un embrión de linaje 129 a testículos de ratones adultos podían originar teratomas, estos resultados llevaron a la hipótesis de que tanto los teratomas como los TC pueden derivarse de las células germinales primordiales del embrión en desarrollo (Stevens, 1964, Stevens, 1967).

Ese mismo año, Kleinsmith & Pierce realizaron una serie de experimentos cruciales al inyectar intraperitonealmente una sola célula que provenía de los TC y observaron la formación de nuevos TC en el sitio de inyección. De esta forma, se demostró que los TC poseen un tipo celular único de naturaleza troncal que no solamente podía proliferar de forma indefinida, sino que además conservaba su capacidad de diferenciarse hacia múltiples linajes, es decir, con un potencial pluripotente (Kleinsmith and Pierce, 1964).

Estos hallazgos sugerían que las células troncales de los TC, tenían peculiaridades similares a las células embrionarias de etapas tempranas del desarrollo. Tomando en cuenta estos antecedentes, Stevens realizó otra serie de experimentos, pero en lugar de injertar gónadas primordiales trasplantó el embrión completo, observó el mismo fenómeno de aparición de tumores en las gónadas adultas del receptor. La obtención de TC directamente a partir de embriones lo llevó a afirmar que «las células embrionarias indiferenciadas pueden retener su capacidad de proliferación de forma indefinida para dar lugar a la producción de teratocarcinomas» (Stevens, 1970).

Una vez que se confirmó la naturaleza embrionaria de los TC, el siguiente progreso fue establecer líneas celulares *in vitro* a partir de ellos, dado que el cultivo celular ofrecía las ventajas de ser un sistema experimental más manejable y manipulable y con ello estudiar a las células indiferenciadas responsables de la formación de los tumores. Los grupos de investigación de Sato y Ephrussi lograron aislar estas células, las cuales fueron denominadas como células del carcinoma embrionario (ECC, por sus siglas en inglés *Embryonal Carcinoma Cells*) (Rosenthal et al., 1970, Kahan and Ephrussi, 1970). Estas líneas podían ser propagadas a partir de una sola célula para dar origen a toda una población celular indiferenciada (ensayo clonal), lo que demostraba su capacidad de proliferación. Por otra parte, estas poblaciones clonales podían ser inyectadas a animales y ser capaces de formar TC, recapitulando el proceso de diferenciación hacia diversos tejidos al igual que los experimentos previos de Stevens, solo que esta vez el proceso era de *in vitro* a *in vivo*.

La generación de líneas ECC demostró que era posible mantener *in vitro* a una población celular responsable de la formación de los TC, la cual conserva sus propiedades de proliferación y pluripotencia, no obstante eran de naturaleza maligna. Asimismo, los investigadores se percataron que ambas propiedades iban declinando conforme aumentaba el número de pases *in vitro*; aunque los tumores primarios de los cuales se habían derivado originalmente las líneas, no presentaban alteraciones en su nivel de proliferación *in vivo* cuando eran trasplantados de un hospedero a uno nuevo para originar nuevos tumores. Esto datos sugerían que no

se había logrado obtenido las condiciones fetén de cultivo para el mantenimiento de las ECC (Evans, 2011). Por este motivo, Martin & Evans escudriñaron establecer líneas ECC capaces de proliferar y diferenciarse por un extenso período de pasajes continuos, para ello su estrategia fue utilizar una capa nodriza de fibroblastos embrionarios irradiados de pollo para ser cocultivada con las ECC. Si bien en la actualidad se ha descontinuado el uso de fibroblastos de pollo al cultivo, estos ensayos demostraron que las ECC necesitaban de la interacción con otro tipo celular que le diera soporte para lograr una mayor supervivencia en cultivo (Evans, 1972, Martin and Evans, 1974).

En los siguientes años, se llevaron a cabo diversos experimentos que demostraron que las ECC poseían un fenotipo muy similar a las células germinales primordiales y a la población de la ICM del blastocisto, como la presencia de los mismos antígenos de superficie, además que los agregados de ECC en suspensión formaban estructuras con cavidad que fueron denominadas cuerpos embrionarios a causa de su semejanza con los embriones de etapa temprana (Adamson et al., 1977, Martin and Evans, 1975).

Por otra parte, en la misma época que Stevens y otros investigadores estaban revelando la troncalidad de los TC, se hicieron importantes avances para conocer sobre los procesos de destino celular y restricción de linajes durante el desarrollo temprano del ratón. A inicios de la década de 1970, se llevó a cabo una serie de elegantes experimentos, los cuales consistieron en la formación artificial de quimeras (del griego *chímaira* que significa animal fabuloso; en biología del desarrollo, se define como un individuo conformado por dos o más poblaciones celulares con carga genética distinta) manifestando que la población de células de la ICM del blastocisto tenía el potencial de formar un organismo completo. Richard Gardner, quien fue mentor de Evans, inyectó de una a cinco células aisladas de la ICM de un ratón donador de la cepa CBA/T6 a blastocistos de una cepa albina. Subsecuente, transfirió los blastocistos al útero de una ratona subrogada, la cual tuvo una descendencia de animales albinos empero con pigmentación ocular, así como en la epidermis y en el pelaje, lo que demostró palmariamente que las células de la ICM tenían una capacidad pluripotente (Gardner, 1968).

En la actualidad, el ensayo de formación de quimeras se considera la prueba más estricta para demostrar la capacidad pluripotente de las células candidatas, puesto que deben contribuir tanto a los linajes somáticos y a la línea germinal para formar un organismo viable que sea capaz de reproducirse (Bradley et al., 1984).

Brinster fue el primero en reportar que era posible obtener quimeras al transferir ECC a blastocistos de ratón, demostrando que las células del TC podían comportarse como células embrionarias (y por ende, ser pluripotentes) (Brinster, 1974). Sin embargo, la mayoría de las líneas tenían una contribución baja a las quimeras, además de que su transmisión a la línea germinal era muy esporádica. Aunado a esto, un número significativo de los animales híbridos desarrollan tumores, atribuido a las mutaciones y cariotipos anormales del TC de donde se derivaron originalmente las ECC (Papaioannou et al., 1975, Mintz and Illmensee, 1975).

No obstante, estos antecedentes fueron la base para que Evans sugiriera que las células del TC tienen su origen de células normales y que además era posible obtener *in vitro* células pluripotentes directamente del embrión (Evans, 1981).

Para resolver este desafío, Martin y Evans, de forma independiente, cultivaron blastocistos intactos de ratón sobre fibroblastos embrionarios de la misma especie (MEF, por sus siglas en inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*). A los pocos días observaron que las células de la ICM comenzaron a formar colonias pequeñas y compactas compuestas de células con el núcleo prominente y poco citoplasma. Estas células, al igual que las ECC, podían ser cultivadas sobre nuevas capas nodrizas para continuar proliferando, formaban cuerpos embrionarios en estado de suspensión y al ser inyectadas en ratones adultos podían formar teratomas; pero a diferencia de las ECC, estas nuevas líneas poseían un cariotipo normal. Aunque hubo algunas diferencias en la metodología para derivarlas, la utilización de una capa alimentadora fue fundamental para el establecimiento de estas líneas pluripotentes derivadas del embrión, a las cuales se les denominó células troncales embrionarias de ratón (mESC) (Evans and Kaufman, 1981, Martin, 1981).

Tuvieron que pasar casi quince años para que Thomson y colaboradores generaran las primeras líneas ESC de primates (*Macaca mulatta* y *Callithrix jacchus*) utilizando una metodología muy similar para derivar a las mESC (Thomson et al., 1995, Thomson et al., 1996). Después de casi 50 años de investigación en torno a la pluripotencia, las líneas de primates fueron el antecedente directo para la posterior derivación de ESC de origen humano (hESC) por el mismo grupo de Thomson, utilizando embriones supernumerarios congelados y donados previo consentimiento informado por parte de parejas en tratamiento por el servicio de reproducción asistida (Thomson et al., 1998). Las hESC al igual que todas las demás líneas pluripotentes mencionadas fueron caracterizadas mediante una serie de pruebas para demostrar su potencial pluripotente, de las cuales se hablará a continuación.

Caracterización ad hoc para la determinación de la pluripotencia in vitro

Una vez que se deriva y mantiene una presunta línea pluripotente, es necesario realizar una serie de pruebas para confirmar su identidad. Estas consisten en la evaluación de su morfología, la presencia de marcadores específicos, el perfil de expresión génica, la capacidad de diferenciación *in vitro*, la formación de teratomas y quimeras (Cahan and Daley, 2013, Marti et al., 2013) .

1. Morfología: las colonias de las mESC al mantenerse en un estado indiferenciado tienen forma de domo, con células estrechamente compactas de forma que una sola no se puede discernir cuando se observa en baja amplificación. En contraste, las hESC crecen formando colonias mucho más planas, con una morfología de células en forma de pavimento (*pavet, cobblestone*). Sin embargo, está reportado que las colonias pueden presentar dicha morfología y a la vez diferenciándose cuando hay una disminución en la expresión de genes relacionados con la pluripotencia, por lo cual la evaluación de la morfología no es un indicativo suficiente (Cahan and Daley, 2013).
2. Expresión de fosfatasa alcalina (FA) de tejido inespecífica: la detección de colonias positivas a FA se utiliza como un indicador sensible y riguroso del estado indiferenciado, ya que durante los procesos de diferenciación la falta de expresión de la enzima se antecede a la de otros antígenos de superficie e incluso de factores de transcripción relacionados con la pluripotencia. No obstante, se desconoce cuál es su función en las células pluripotentes (O'Connor et al., 2008).
3. Detección de antígenos de superficie relacionados con la pluripotencia: los antígenos de superficie celular de tipo proteoglicanos o esfingolípidos originalmente identificados en las ECC se siguen utilizando como marcadores extracelulares de la pluripotencia, los cuales son específicos para cada especie. Por ejemplo, SSEA-1 (por sus siglas en inglés *Stage Specific Embryonic Antigen 1*) es exclusivo de mESC, mientras que SSEA-3, SSEA-4 y TRA1-60 (por sus siglas en inglés *Tumor Rejection Antigen 1-60*) son específicos de las hESC (Marti et al., 2013).

4. Presencia de factores de transcripción relacionados con la pluripotencia: Está ampliamente documentado que el mantenimiento de la pluripotencia o el inicio de la diferenciación depende de un equilibrio altamente regulado entre los factores de transcripción (FT) POU5F1 (*alias* OCT4), SOX2 y NANOG, usualmente denominados como la tríada o el “core” de pluripotencia. Más adelante se hará una descripción del papel de cada uno de estos factores para regular la pluripotencia murina y humana.
5. Ensayos de diferenciación: Después de detectar los marcadores de pluripotencia, el siguiente paso en la caracterización es demostrar que las ESC así como otros tipos celulares pluripotentes pueden diferenciarse para formar tejidos derivados de las tres capas primordiales del embrión (ectodermo, mesodermo y endodermo). Esto puede ser a través de pruebas de diferenciación *in vitro* o *in vivo*.
 - a. Diferenciación *in vitro*: Las colonias de células pluripotentes son cultivadas en suspensión de tal forma que se organizarán en estructuras denominadas cuerpos embrionarios (EB, por sus siglas en inglés *embryoid bodies*). Estos agregados pueden ser analizados *in toto* para buscar mediante la técnica de inmunofluorescencia marcadores de diferenciación celular. De forma alternativa, los EB pueden ser transferidos a superficies adherentes y cultivados por varios días para la posterior detección de marcadores específicos de derivados diferenciados de cada una de las tres capas embrionarias (Marti et al., 2013).
 - b. Diferenciación *in vivo*: Teniendo como antecedente directo los experimentos de inducción de TC en ratones hospederos utilizando células aisladas de ECC (descritos en el capítulo previo). Los ensayos consisten en inyectar células en ratones inmunodeficientes (SCID, por sus siglas en inglés *Severe Combined Immunodeficient*). Si son pluripotentes van a formar un teratoma encapsulado en el sitio de inyección que contendrá múltiples tejidos diferenciados de las tres capas embrionarias. Se han descrito diferentes metodologías para

generar teratomas, con diferencias en las condiciones de cultivo, cantidad de células inyectadas y la región de inyección (intratesticular, cápsula renal, intramuscular e intraperitoneal), de manera que hasta la fecha no hay un consenso para llevar a cabo de forma rutinaria un protocolo de inducción de teratomas. A pesar de que se considera la prueba más rigurosa para evaluar la pluripotencia en células humanas, en los últimos años ha sido criticada por motivos éticos en cuanto al uso de animales, así que se han estado buscando métodos alternativos para caracterizar líneas pluripotentes humanas (Buta et al., 2013).

6. Formación de quimeras. Se considera como el estándar de oro para determinar la pluripotencia. Descrita en el capítulo anterior, se realiza al inyectar células a blastocistos hospederos que son implantados en ratonas subrogadas, si son células pluripotentes deben de contribuir a todos los linajes del embrión, incluyendo a la línea germinal. Sin embargo, por razones éticas y de acuerdo a los lineamientos de la ISSCR esta prueba no puede llevarse a cabo con células humanas, dado el potencial de que podrían contribuir a la línea germinal del hospedero no humano, por tanto la formación de quimeras viables no es un ensayo disponible para evaluar la capacidad de la pluripotencia en el *Homo sapiens*. A pesar de esta limitante, en los últimos años se ha reportado que las células humanas pueden ser retadas en el ensayo de formación de quimeras interespecies, siempre y cuando se destinen en embriones no viables (a los que se les removió las estructuras extraembrionarias) cultivados *in toto* (Mascetti and Pedersen, 2016, Wu et al., 2015, Gafni et al., 2013).

7. Métodos bioinformáticos:

a. PluriTest: Como una alternativa al ensayo de quimeras, el laboratorio de Loring desarrolló una herramienta alternativa llamada PluriTest, la cual es capaz de definir “el estado pluripotente humano” mediante un análisis bioinformático basado en la comparación de los perfiles completos de expresión génica de diferentes líneas pluripotentes. Los

datos obtenidos a partir de un microarreglo de una muestra “potencialmente pluripotente” son subidos a la página <http://pluritest.org/> y comparados con los metadatos previamente almacenados de diferentes líneas. Sin embargo, una de sus desventajas es el uso exclusivo de la plataforma Illumina, de manera que es una herramienta de relativo alto costo dado el uso de un microarreglo por muestra (Muller et al., 2011).

- b. Epi-Pluri-Score: Como una alternativa al PluriTest, Lenz y colaboradores concibieron el uso de biomarcadores epigenéticos para discernir entre células pluripotentes y somáticas, basado en el estado de metilación del DNA (meDNA) de únicamente tres sitios CpG. El análisis dictamina que una muestra debe presentar niveles altos de meDNA en los genes *C14orf115* y *ANKRD46* en combinación con niveles bajos de meDNA de *POU5F1* para ser clasificada como pluripotente. Para la validación del análisis, Lenz y colaboradores compararon las bases de datos del perfil de meDNA de 264 muestras de líneas pluripotentes con 1951 muestras de líneas somáticas, obteniendo una sensibilidad del 98.9% y una especificidad del 99.9%. Si bien el Epi-Pluri-Score no provee información acerca del potencial de diferenciación, esta herramienta se ha sugerido como un biomarcador sencillo, confiable y robusto para determinar si una línea es pluripotente (Lenz et al., 2015).

La familia de las células troncales pluripotentes

Además de las ESC y las ECC, existen otros tipos de células pluripotentes que fueron derivadas en la década de los 90 y a principios del siglo XXI.

Células germinales embrionarias

Las células germinales embrionarias (EGC, por sus siglas en inglés *Embryonic Germinal Cells*) del ratón (mEGC) y del humano (hEGC) debido a su morfología, la expresión de antígenos de superficie y su capacidad de formar teratomas son análogas a las ESC (Shamblott et al., 1998, Matsui et al., 1992). Esta semejanza se atribuye, a pesar de no ser originadas en la ICM, a que son derivadas de las células germinales primordiales (PGC, por sus siglas en inglés *Primordial Germinal Cells*), las cuales emergen durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (Ohinata et al., 2009, Sasaki et al., 2016). Sin embargo, en comparación con las ESC y las ECC, la capacidad de proliferación de las EGC es finita, además que para el caso de las mEGC cuando son usadas para el ensayo de quimeras, algunos de los productos presentaron anomalías como retraso en el crecimiento y defectos esqueléticos en las costillas y en la columna vertebral (Labosky et al., 1994).

Células troncales del epiblasto

Además de las mESC, existen otro tipo de células troncales derivadas directamente del embrión, las células troncales del epiblasto (EpiSC, por sus siglas en inglés *Epiblast-derived Stem Cells*) que son aisladas de blastocistos tardíos post-implantados, cuando la ICM se ha especificado a epiblasto e hipoblasto. Estas células se caracterizan por expresar bajos niveles de los factores de pluripotencia en comparación con las mESC y exteriorizar marcadores específicos del epiblasto como FGF5 (por sus siglas en inglés *Fibroblastic Growth Factor 5*). Pueden formar teratomas, pero su contribución a la formación de quimeras es mínima en contraste con las mESC (Tesar et al., 2007, Brons et al., 2007). *Ipsa facto*, el descubrimiento

de estas células hizo concebir la idea de que la pluripotencia no consiste en únicamente una fase estática y relativamente efímera previo a la implantación del embrión, sino que podría existir un *spectrum* completo de la pluripotencia, del cual hablaremos más adelante.

Células troncales pluripotente inducidas

Durante la mayor parte del siglo XXI, el dogma que prevaleció acerca de la diferenciación celular es que era un proceso unidireccional, en el que las células embrionarias eran incapaces de retornar a un estado inmaduro (pluripotente) una vez que se diferenciaban para adquirir funciones de una célula somática. Sin embargo, en 1962 John. B. Gurdon demostró que el núcleo de una célula epitelial del intestino de rana podía ser introducido en un ovocito anucleado para dar lugar a un embrión y formar un organismo totalmente funcional. Esta técnica denominada “Transferencia nuclear de célula somática” (SCNT, por sus siglas en inglés *Somatic Cell Nuclear Transfer*) le sirvió a Gurdon para descifrar los enigmas de la reprogramación celular, es decir, de cómo una célula especializada puede dediferenciarse hacia un estado más primigenio. De esta forma, concluyó que el núcleo de una célula somática tenía el potencial de revertirse para ser pluripotente (Gurdon, 1962).

Pasaron décadas sin que se comprobara de forma experimental la conversión de una célula somática en una pluripotente, hasta que a inicios del siglo XXI los trabajos de Shinya Yamanaka demostraron que era posible la reprogramación. Para ello, seleccionó 24 genes que expresaban factores de transcripción, con base en la hipótesis de que cada uno de estos factores tenía un papel esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Cuando Yamanaka introdujo los 24 genes candidatos en fibroblastos de ratón, identificó que la combinación de Oct4, Sox2, Klf4 y cMYC (OSKM) era suficiente para convertir fibroblastos embrionarios o de adulto en células pluripotentes. Dichas células fueron denominadas células troncales pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés *induced Pluripotent Stem Cells*), las cuales presentaban morfología y propiedades de las ESC, así como la expresión endógena de los marcadores de

pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog. El trasplante de las iPSC en ratones inmunosuprimidos resultó en formación de teratomas, además de que las células fueron capaces de formar quimeras después de ser inyectadas en blastómeras de ratón (Takahashi and Yamanaka, 2006). Paralelamente, el grupo de Thomson reportó la reprogramación de fibroblastos humanos para obtener iPSC humanas (hiPSC), utilizando en este caso los factores OCT4, SOX2, NANOG y LIN28 (Yu et al., 2007). De cómo los factores de transcripción sostienen la pluripotencia se discutirá más adelante.

Aunque las ESC y las iPSC poseen prácticamente las mismas propiedades pluripotentes, los estudios de caracterización reportan que las segundas presentan alteraciones genéticas y epigenéticas, *v.gr.* regiones diferenciales de metilación del DNA (Koyanagi-Aoi et al., 2013), cambios en la variación del número de copias (Hussein et al., 2011), además de la expresión irregular de genes de impronta (genes que son expresados específicamente de acuerdo a su origen parental) (Pick et al., 2009). Se ha sugerido que estas disparidades podrían ser consecuencia del proceso de reprogramación o de la “retención” de la memoria epigenética de la célula somática donadora. Asimismo, algunos estudios que se han enfocado en la obtención de tejidos derivados a partir de iPSC, desde neuronas, cardiomiocitos, células endoteliales y hematopoyéticas, entre otros, reportan que la obtención puede ser ineficiente o variable en estas líneas cuando se comparan con las ESC, además de presentar alteraciones celulares (mutaciones, muerte celular, senescencia) que podrían afectar su funcionalidad y su probable uso en la clínica (Hu et al., 2010, Feng et al., 2010, Zhang et al., 2009).

Células troncales embrionarias obtenidas por transferencia nuclear

Los experimentos de Gurdon y la obtención de iPSC llevaron a proponer la existencia de rutas alternativas para obtener células que fueran de naturaleza idéntica a las ESC, pero utilizando como fuente de derivación embriones clonados por SCNT. En esta técnica, el núcleo de una célula somática es insertado en un ovocito anucleado, el cual es activado mediante un estímulo eléctrico o químico para iniciar la embriogénesis, en donde el núcleo donador es reprogramado por los factores citoplasmáticos del ovocito para convertirse en el núcleo de un cigoto. El embrión continuará con su desarrollo *in vitro* hasta formar un blastocisto, que es de donde se obtiene la ICM para derivar las ESC, en este caso denominadas SCNT-ESC (Trounson and DeWitt, 2013).

Aunque en el 2001 se crearon las SCNT-mESC que satisfacían con los estándares más rigurosos para probar su potencial (incluyendo formación de quimeras con transmisión a la línea germinal) (Wakayama et al., 2001), tuvo que pasar más de una década para que el grupo de Mitalipov consiguiera las primeras líneas humanas mediante SCNT (SCNT-hESC) utilizando núcleos donadores de fibroblastos fetales (Tachibana et al., 2013). En trabajos posteriores, el mismo laboratorio reportó que era posible utilizar los núcleos somáticos de tejidos provenientes de adultos mayores de 35 y 75 años, incluyendo una paciente con diabetes tipo I (Yamada et al., 2014, Chung et al., 2014). Debido a la naturaleza de estos resultados, reavivó el interés por clonar células humanas mediante SCNT con fines terapéuticos, ya que la generación de ESC “personalizadas” a partir de células somáticas de un paciente podrían servir como modelo de estudio de los mecanismos de enfermedades y en última instancia para su posible uso en la terapia celular (Yang et al., 2007). Un ejemplo de probable intervención terapéutica, es el reemplazo de mitocondrias durante la derivación de las líneas SCNT-hESC para el tratamiento de enfermedades causadas por mutaciones en el DNA mitocondrial (Ma et al., 2015).

Se ha propuesto que este proceso es más efectivo que el método para generar iPSC, puesto que el núcleo de una célula somática estaría bajo un “reseteo

genético y epigenético” por factores citoplasmáticos del ovocito (los cuales se desconocen), recapitulando la misma secuencia del desarrollo de un embrión fertilizado *in vivo*. De hecho, en un estudio donde se comparó el transcriptoma y el patrón de metilación del DNA de las hESC, hiPSC y SCNT-hESC, se reportó que los perfiles de las SCNT-hESC fueron más similares al de las hESC, mientras que las hiPSC presentaban patrones de metilación aberrantes, concluyendo que las SCNT-hESC son más parecidas a las hESC que las hiPSC, aunque únicamente en su caracterización epigenética (Ma et al., 2014a).

Sin embargo, dado que ambos procesos de reprogramación *per se* ocasionan que las líneas tengan una estabilidad genética relativa y residuos de memoria epigenética somática, se ha enfatizado que las hiPSC y las SCNT-hESC aún no pueden compararse con las hESC (derivadas mediante métodos tradicionales) en cuanto a poseer la misma capacidad pluripotente, debido a lo cual éstas aún son consideradas el estándar de oro para el estudio de la pluripotencia humana (Trounson et al., 2013).

El Atlas de la pluripotencia: las vías de señalización descritas en las mESC y hESC

Para que las células pluripotentes conserven su identidad, deben responder a distintos factores extracelulares que activen sus respectivas vías de señalización intracelular, dando como resultado la expresión de genes involucrados en la pluripotencia, promover la autorrenovación y el bloqueo de vías que induzcan la diferenciación. En el ratón, el factor inhibidor de la leucemia (LIF, por sus siglas en inglés *Leukemia inhibitory factor*) es la molécula extrínseca que estimula la proliferación de las mESC por excelencia, miembro de la familia de citosinas de la interleucina 6, cuyos efectos son mediados a través de un complejo heterodímero compuesto por el receptor de LIF y la proteína gp130 (Williams et al., 1988).

La unión de LIF a sus ligandos conduce a la activación de tres vías: 1) JAK (por sus siglas en inglés *Janus associated tyrosine kinase*)/STAT3 (por sus siglas en inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), 2) PI3K (por sus siglas en inglés *phosphatidylinositol 3-OH kinase*)-Akt y 3) MAPK/ERK (por sus siglas en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular signal-Regulated Kinase*) (Dejosez and Zwaka, 2012). En mESC la vía de JAK/STAT3 es activada exclusivamente por LIF y la fosforilación de STAT3 por JAK promueve su dimerización y traslocación nuclear, en donde actúa como activador transcripcional (Niwa et al., 1998).

Sin embargo, la sola vía LIF/STAT3 no es suficiente para mantener la pluripotencia en mESC en condiciones de cultivo libres de suero; ya que su identidad pluripotente se ve comprometida y las células se diferencian hacia linajes del ectodermo, debido a la falta de proteínas morfogenéticas del hueso (BMP, por sus siglas en inglés *Bone Morphogenetic Proteins*) que activan vías de señalización para suprimir procesos de desarrollo. Las BMP son antagonistas potentes del desarrollo neural y junto con LIF son los factores extrínsecos necesarios para bloquear la diferenciación en las mESC (Ying et al., 2003).

Por otra parte, entre los factores que desencadenan los procesos de diferenciación en las células murinas son el factor de crecimiento fibroblástico 4 (FGF4, por sus siglas en inglés *Fibroblastic Growth Factor 4*) (Kunath et al., 2007) y la quinasa de la glucógeno sintetasa (GSK3, por sus siglas en inglés *Glycogen Synthase Kinase-3*) (Sato et al., 2004). Se ha demostrado que la activación de la

vía de ERK2 por FGF4 induce la transición de un estado de autorrenovación hacia el compromiso de linajes embrionarios, mientras que GSK3 fosforila a β -catenina para impedir su asociación con E-cadherina en la membrana celular o su traslocación al núcleo para funcionar como transactivador en las mESC (Kunath et al., 2007, Sato et al., 2004). De esta forma, datos en la literatura sustentan que la vía activa de LIF/STAT3 es suficiente para mantener el estado indiferenciado en estas células, al adicionar inhibidores selectivos sintéticos de las vías de ERK2 y GSK3, PD0325901 y CHIR99021, de forma respectiva (Martello and Smith, 2014).

De forma interesante, la vía de LIF/STAT3 no tiene ningún efecto en el mantenimiento de las hESC convencionales (Daheron et al., 2004), mientras que las BMP son inductores de su diferenciación hacia mesoendodermo y tejido extraembrionario (Sudheer et al., 2012). Estos datos sugieren que las vías de señalización que regulan la pluripotencia humana son diferentes a lo que se ha descrito en el ratón, a pesar de que comparten la expresión de la tríada maestra de OSN, PRDM14, KLF4, entre otros.

A diferencia del papel que tiene ERK2 en las mESC como inductor de la diferenciación, en las hESC es la vía principal activada por FGF2 en mantener la autorrenovación. La unión de la molécula a su receptor (FGFR1) promueve las siguientes vías de señalización: 1) JAK/STAT, 2) PI3K-Akt, 3) proteína quinasa C (PKC, por sus siglas en inglés *Protein Kinase C*) y 4) ERK2 (Dejosez and Zwaka, 2012). De hecho, FGF2 fue el primer factor crucial en ser identificado para su mantenimiento en estado indiferenciado y proliferación de las hESC (Eiselleova et al., 2009). De esta forma, los protocolos convencionales para cultivarlas incluyen la adición de la susodicha molécula en forma soluble al medio de cultivo. Asimismo, influye en la proliferación y en la represión intrínseca de genes de diferenciación para mantener la identidad de las células pluripotentes. Para ello, la vía de ERK2 activada por FGF2 regula genes clasificados en tres módulos: 1) involucrados en la pluripotencia, transcripción y regulación de la cromatina cuyos promotores activos son sitio de unión de ERK2. Uno de estos genes blancos es ELK1, componente de la cascada de señalización de ERK2; 2) implicados en el metabolismo, traducción y progresión del ciclo celular, activados al ser ocupados por ERK2 y ELK1 y 3) genes

de diferenciación inactivados por la ocupación de ELK1, actuando como represor (Goke et al., 2013).

Otra ruta importante en el mantenimiento de las hESC es activada por los ligandos Activina y Nodal de la familia TGF- β , los cuales comparten a los receptores tipo I (Alk4 y Alk7) y tipo II (ActRIIB) para activar la vía de señalización de SMAD2 y 3 (por sus siglas en inglés *Mothers against decapentaplegic homolog 2 and 3*) estos mediadores se unen directamente al DNA desencadenando la expresión de factores involucrados en la pluripotencia como NANOG (Dejosez and Zwaka, 2012). Aunado a esto, el bloqueo de la vía mediante el uso de inhibidores selectivos (SB431542, SB) promueve la rápida diferenciación de las hESC, demostrando su importancia para mantener el estado pluripotente (Vallier et al., 2005). En células humanas, BMP4 induce la diferenciación hacia estirpes del mesodermo y tejidos extraembrionarios; situación opuesta a lo que sucede con sus pares murinas. Asimismo, se ha descrito que las vías principales que mantienen a las hESC (activadas por FGF2 y Activina/Nodal) suprimen a BMP4 previniendo su diferenciación (Sudheer et al., 2012).

Se sabe que la vía de Wnt/ β -catenina en combinación con LIF ayuda a mantener la autorrenovación de las mESC (Ogawa et al., 2006). En ausencia de Wnt, β -catenina es degradada rápidamente por el complejo conformado por Axina, APC (por sus siglas en inglés *Adenomatous polyposis coli*) y GSK3. Cuando Wnt se une al receptor Frizzled y al correceptor LRP5/6 (por sus siglas en inglés *Low-Density-Lipoprotein-Receptor-Related Protein 5 o 6*), el complejo de degradación es inactivado y por lo tanto β -catenina se mantiene estable para traslocar al núcleo, en donde interactúa con el factor celular T (TCF, por sus siglas en inglés *T-cell factors*) y regula la expresión de genes específicos de la pluripotencia murina (Sokol, 2011).

Sin embargo, el papel de Wnt/ β -catenina en la pluripotencia humana es contradictorio. Por una parte, se ha sugerido que su activación o el uso de inhibidores de GSK3 promueven la autorrenovación en hESC (Sato et al., 2004). En contraste, diversos estudios demuestran que la vía no es necesaria para la autorrenovación y que su activación induce la diferenciación (Dravid et al., 2005, Davidson et al., 2012). No obstante, reportes recientes apoyan la hipótesis de que

la vía de Wnt efectúa la autorrenovación o diferenciación de las hESC dependiendo de la localización de β -catenina dentro de la célula, *i.e.*, cuando la vía de Wnt es activada y GSK3 inhibido, se evita la degradación de β -catenina y su retención en el citoplasma ayuda a mantener la identidad de las hESC, pero su traslocación nuclear e interacción con TCF induce la diferenciación (Kim et al., 2013). A pesar de ello, se desconoce el mecanismo por el que β -catenina tiene su efecto a nivel del citoplasma, aunque se ha sugerido que interactúa con E-cadherina, α -catenina y con filamentos de actina, lo que repercutiría en procesos de adhesión celular y transducción de señales (Yamada et al., 2005).

Bases moleculares de la pluripotencia humana y murina

En ratones transgénicos se llevaron a cabo las primeras pruebas referentes a que POU5F1 es un gen esencial para la pluripotencia. En estos estudios se demostró que su eliminación impedía la formación de la ICM, ocasionando un arresto en el desarrollo de los embriones, así como la imposibilidad de obtener líneas mESC (Nichols et al., 1998). Además de afectar el desarrollo temprano y la derivación de líneas, su pérdida de función directamente en mESC conduce a una alteración en la regulación del mantenimiento de la pluripotencia y al fallo en la diferenciación hacia los tres linajes embrionarios (Niwa et al., 2000).

Por otro lado, la pérdida del factor de transcripción Nanog produce que el embrión de ratón se desarrolle solo hasta la etapa de blastocisto, así como la desestabilización de la red de pluripotencia tanto *in vivo* como *in vitro* (Chambers et al., 2007, Silva et al., 2009). El factor de transcripción Sox2 también es esencial para el mantenimiento y autorenovación de las mESC, en este caso, su inactivación conduce a la formación de trofoblasto, evitando que los embriones no se formen más allá de la implantación (Avilion et al., 2003).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina combinados con metodologías para la localización de secuencias de DNA específicas, se ha demostrado que en las ESC tanto murinas como *Homo sapiens* la tríada de OCT4, SOX2 y NANOG (OSN) se unen a los mismos sitios en las regiones reguladoras de genes de la pluripotencia o de diferenciación, efectuando su activación o represión transcripcional respectivamente (Boyer et al., 2005, Loh et al., 2006).

Estos datos fueron la base para construir el modelo imperante el cual establece que OSN controlan sus genes blanco de forma dependiente, actuando de forma coordinada para mantener el programa transcripcional de la pluripotencia (Jaenisch and Young, 2008). Para lograrlo, los tres factores ejercen las siguientes funciones: 1) forman un asa de autorregulación positiva interconectada para activar sus propios promotores, 2) ocupan las mismas secuencias reguladoras para activar otros genes pluripotentes y 3) reprimen los mismos genes que favorecen la diferenciación (Young, 2011). Sin embargo, este dogma solamente se puede aplicar para las mESC, ya que mediante experimentos de pérdida y ganancia de función

en combinación con análisis de perfiles de transcripción realizados en hESC demostraron que las funciones de la tríada OSN en humanos discrepan a lo reportado en el modelo murino.

En las hESC, OCT4 puede inhibir tanto los linajes extraembrionarios como los de las tres capas embrionarias a través de una dosis dependiente de BMP4. Los niveles altos de OCT4 y la ausencia de BMP4 permiten su autorrenovación, pero en presencia de BMP4 las células se diferencian hacia mesodermo. En contraste, niveles bajos de OCT4 y la ausencia de BMP4 inducen la diferenciación a ectodermo, pero con BMP4 hay una preferencia hacia tejidos extraembrionarios (Wang et al., 2012c). Por otra parte, la función de NANOG es la de reprimir exclusivamente la diferenciación hacia ectodermo, con poca contribución para inhibir otros linajes, de esta forma en vez de ser un represor general de la diferenciación, NANOG tiene una función de restricción de linaje específico en las hESC. En cambio, SOX2 reprime únicamente a los genes de diferenciación hacia mesoendodermo, no obstante es un factor dispensable para la autorrenovación debido a la compensación por SOX3, el cual tiene bajos niveles de expresión en las hESC, pero es regulado de forma positiva una vez que SOX2 es eliminado, permitiendo la autorrenovación (Wang et al., 2012c).

Por ello, mientras que en las mESC los tres factores funcionan como activadores recíprocos de los genes de la pluripotencia y como panrepresores de la diferenciación, en las hESC cada miembro de la tríada controla un linaje específico de forma independiente, teniendo una participación mínima en la represión de otros linajes (Wang et al., 2012c).

Sin embargo, en los últimos años, se han descrito otros factores de transcripción que participan de forma directa para mantener el estado indiferenciado, al modular la expresión de los genes maestros. Uno de los escasos trabajos que aborda esta temática en hESC es el de Chia y colaboradores, en donde utilizaron un sistema de RNA de interferencia para dilucidar qué factores eran determinantes para conservar su identidad. Descubrieron que la proteína con dominios de dedos de zinc PRDM14 (por sus siglas en inglés *PR Domain Containing 14*) puede regular directamente la expresión de OCT4 a través de la unión a su

enhancer proximal. Además, puede formar complejos con cada uno de los componentes de la tríada al unirse a las regiones reguladoras de los genes involucrados en procesos desarrollo, por lo que PRDM14 funciona como un correpresor de la diferenciación en las hESC (Chia et al., 2010).

KLF4 (por sus siglas en inglés *Kruppel like factor 4*) es un factor de transcripción altamente expresado en células pluripotentes, cuyos niveles disminuyen de forma drástica durante la diferenciación celular. Estudios tanto en mESC como en hESC demuestran que KLF4 es un regulador positivo directo de *NANOG*, al unirse tanto a su promotor como a elementos distales y proximales (Zhang et al., 2010, Chan et al., 2009). Asimismo, como se mencionó, la expresión ectópica de KLF4 junto con OCT4 y SOX2 es capaz de reprogramar fibroblastos humanos hacia iPSC tanto de ratón como de humano (Takahashi et al., 2007, Takahashi and Yamanaka, 2006).

REX1 (por sus siglas en inglés *Reduced Expression Proteon 1, alias ZFP42*) es otro de los transcritos altamente enriquecidos en las hESC (Richards et al., 2004). Si bien ha sido catalogado como no esencial para la pluripotencia en mESC debido a que su eliminación no conlleva pérdida significativa del potencial de diferenciación, en las hESC parece ser que juega un papel fundamental (Scotland et al., 2009). En diferentes líneas humanas se ha demostrado que REX1 forma un asa de autorregulación positiva con *ONS* y al ser inhibido mediante *short hairpin* RNA (shRNA), las células no son capaces de formar cuerpos embrionarios ni teratomas que presenten tejidos derivados del mesodermo (Son et al., 2013). Otro trabajo describe que las hESC con el knockout a REX1 presentan alteraciones en procesos celulares tales como traducción, regulación de la función mitocondrial y diferenciación específica hacia cardiomiocitos (Son et al., 2015), aunque no se ha determinado el mecanismo exacto por el cual REX1 fomenta la identidad de las hESC.

Tfcp2l1 es un factor de transcripción que puede actuar de forma sinérgica con otros factores como Klf2 para regular hacia arriba la expresión de Nanog, de manera que tiene un papel crítico en el mantenimiento de las mESC. En contraste, las hESC no presentan éste factor (Qiu et al., 2015, Ye et al., 2013). Sin embargo,

cuando O'Leary realizó una búsqueda de marcadores en común entre el blastocisto y las ESC humanas, encontró que la ICM presenta niveles altos de TFCP2L1, concluyendo que durante los procesos de derivación las hESC pierden la expresión de TFCP2L1, probablemente a causa de las condiciones de cultivo (O'Leary et al., 2012). De hecho, en los últimos años se ha propuesto que existen diferentes estados de pluripotencia *in vivo* y que pueden ser capturados *in vitro* dependiendo de las condiciones de cultivo. Precisamente TFCP2L1 ha sido catalogado como un componente específico de un tipo de pluripotencia denominada *naive*, al cual las mESC pertenecen, pero de forma intrigante las hESC no son consideradas como *naive*, sino están clasificadas dentro de otro estado de pluripotencia denominado *primed* (Takashima et al., 2014). Cuando se ha intentado obtener las condiciones idóneas para convertir las hESC de *primed* a *naive*, uno de los factores que incrementa es precisamente TFCP2L1, así que es probable que este factor pueda ser importante para un determinado tipo de pluripotencia humana (Guo et al., 2016). Más adelante se discutirá en un capítulo con mayor detalle los estadios de pluripotencia que se han descrito hasta el momento en el ratón y en el humano.

La epigenética de la pluripotencia humana

El perfil epigenético (cambios estructurales en la cromatina que no alteran la secuencia del DNA) de las mESC y hESC se caracteriza principalmente por distintas modificaciones en las histonas, así como un patrón específico de metilación en el DNA, lo que le confiere un estado único de la cromatina. Para ello, varios reguladores epigenéticos son los que se encargan de hacer dichos cambios en la estructura de la cromatina, permitiendo la activación o represión de genes. Por ejemplo, el complejo represor Polycomb 2 (PRC2, por sus siglas en inglés *Polycomb Repressive Complex 2*) es el encargado de mediar la trimetilación de la lisina 27 de la Histona 3 (H3K27me3), la señal de reconocimiento para la incorporación de PRC1, lo que resulta en una mayor condensación de la cromatina y por ende una represión génica. La contraparte correspondería al complejo Trithorax (TrxG), el cual induce la trimetilación en la lisina 4 de la Histona 4 (H3K4me3), una marca asociada a cromatina abierta que permite la activación transcripcional (Delgado-Olguin and Recillas-Targa, 2011). *Ipsa facto*, el rasgo epigenético que hace a las mESC y hESC únicas se le conoce como cromatina bivalente: los genes que promueven la diferenciación están enriquecidos con ambas marcas de H3K27me3 y H3K4me3, de tal manera que permanecen inactivados mientras las células son pluripotentes, pero están “preparados” para su rápida activación una vez que se reciben las señales necesarias para comenzar los procesos de diferenciación (Pan et al., 2007). Cabe mencionar que los complejos epigenéticos carecen de un dominio de unión para el establecimiento de estas marcas en la cromatina, así que deben ser acarreados por factores de transcripción. Por ejemplo, en hESC los represores epigenéticos se asocian con los factores OSN para ocupar los mismos sitios en los genes de diferenciación (Lee et al., 2006). Para que ocurra esta asociación, algunos RNAs largos no codificantes (lncRNA, del inglés *long non coding RNA*) interactúan físicamente con la proteína SUZ12 del complejo Polycomb así como con SOX2, por lo que los lncRNA podrían actuar como andamio para reclutar a PRC2 y de esta manera conseguir el silenciamiento de los genes blancos de la tríada pluripotente en hESC (Ng et al., 2012).

La metilación del DNA es otro de los mecanismos epigenéticos, el cual consiste en añadir un grupo metilo en el carbono de la posición 5' de las citosinas en regiones ricas de islas CpG. A grandes rasgos, esta marca evita la unión de factores de transcripción y es reconocida por proteínas de unión a metilos como MeCP2 y MBD2 (del inglés *Methyl CpG binding protein 2* y *Methyl-CpG Binding Domain Protein 2*), que a su vez atraerán a enzimas desacetilasas y metiltransferasas de histonas para contribuir a la represión génica (Moore et al., 2013). La metilación en el DNA es mediada por tres principales metiltransferasas (DNMT, del inglés *DNA methyltransferases*): la DNMT1 es la responsable del mantenimiento de la metilación una vez que las células se replican, mientras que DNMT3A y 3B depositan la marca *de novo* en el DNA no metilado. La ausencia de estas tres enzimas es letal en embriones knockout de ratón, demostrando la importancia de la metilación del DNA durante el desarrollo; sin embargo, mESC con el triple knockout aún son capaces de proliferar y expresar marcadores de pluripotencia, lo que significa que la metilación del DNA no es esencial para mantener la pluripotencia murina (Tsumura et al., 2006).

En cambio las células humanas tienen un comportamiento diferente: si bien las hESC carentes de DNMT3A y 3B no afecta su pluripotencia, la eliminación constitutiva o inducida de DNMT1 ocasiona la inmediata muerte celular, sugiriendo que el mantenimiento de la metilación en el DNA es indispensable para la identidad de las células pluripotentes humanas (Liao et al., 2015).

Estados alternos de la pluripotencia: naive y primed

Se ha expuesto que las hESC, por su origen embrionario, se les considera la representación *in vitro* de la pluripotencia humana; sin embargo, en los últimos años se ha descubierto que las diversas condiciones de cultivo pueden tener un efecto directo sobre las células pluripotentes, cambiando su nivel de expresión de genes, su perfil epigenético y de RNAs no codificantes, así como la activación de distintas vías de señalización, dando como resultado estados alternos de pluripotencia, los cuales a su vez podrían representar diferentes etapas durante el desarrollo. A continuación, se describirán los dos tipos de pluripotencia que se han caracterizado en el ratón, denominados *naive* y *primed*.

El primero se refiere a la condición cuya contraparte en la naturaleza correspondería a la ICM o epiblasto preimplantado (EpiPre), el cual da origen a todos los linajes embrionarios y se define como el estado *ground* durante el desarrollo (Nichols and Smith, 2009). En esta etapa del blastocisto, las células embrionarias se caracterizan por una expresión uniforme de los factores involucrados en la pluripotencia, así como la reactivación de ambos cromosomas X en los embriones femeninos, como consecuencia de la hipometilación global del DNA, liberándolo de restricciones epigenéticas (Hackett and Surani, 2014), sugiriendo que el epiblasto preimplantado es el estado más excelso de la pluripotencia (*naive*) hallado en la naturaleza. Posteriormente, cuando la ICM se divide en epiblasto e hipoblasto, las células *naive* transitan a un estado distinto de pluripotencia, que correspondería a la etapa del epiblasto postimplantado (EpiPost) con potencial pluripotente *primed*, el cual ya posee restricciones epigenéticas y por lo tanto un potencial pluripotente más limitado (Hackett and Surani, 2014).

Como ya se mencionó, en el ratón se han logrado capturar estos dos niveles de pluripotencia: las mESC y las EpiSC. Las primeras representan la adaptación *in vitro* de las células del EpiPre (y por lo tanto son *naive*) (Boroviak et al., 2014), mientras que las EpiSC provienen del EpiPost (*primed*) (Tesar et al., 2007). Estas células pluripotentes murinas pueden ser catalogadas como *naive* y *primed* con base en múltiples características: los niveles de metilación global del DNA, el estado de inactivación del cromosoma X en células femeninas, la expresión de marcadores

relacionados con la pluripotencia *naive* o *primed*, así como la respuesta a diferentes vías de señalización para conservar su estado indiferenciado (Xiao et al., 2016).

Para la obtención del estado *naive*, las mESC requieren de la activación de STAT3, así como de la inhibición de ERK2 y GSK3 (ya se había mencionado que ambas vías promueven la diferenciación en células pluripotentes murinas), de modo que se utiliza un medio suplementado con LIF y con las moléculas pequeñas PD0325901 y CHIR99021 que inhiben a ERK2 y a GSK3, respectivamente (condición LIF/2i). En contraste, las EpiSC dependen de las vías de FGF/ERK2 y Activina/Nodal para mantener su identidad. La diferencia funcional de estos dos estados pluripotentes se puede determinar mediante los ensayos de formación de quimeras; las células *naive* pueden reintegrarse a un blastocisto para contribuir a la formación de un nuevo organismo, mientras que las *primed* son menos competentes para integrarse en el blastocisto hospedero (Manor et al., 2015).

¿Cuál es la auténtica naturaleza de las hESC?

De forma interesante, las hESC a pesar de ser derivadas de la ICM y no del EpiPost comparten un gran número de características con las EpiSC de ratón. De esta forma, las vías de señalización para mantenerla en estado indiferenciado son dependencia de FGF/ERK2 y Activina/Nodal, no contribuyen a la formación de quimeras, baja eficiencia de clonación a partir de una sola célula, presentan altos niveles de la marca de represión epigenética H3K27 y de metilación global en el DNA, expresión reducida de los marcadores asociados a la pluripotencia *naive* (KLF2, KLF4, ESRRB, TBX3, TFCP2L1) y no responden a LIF/2i (Manor et al., 2015, Gafni et al., 2013). Los datos anteriores sugieren que las hESC son de naturaleza *primed*; sin embargo, es importante señalar que no son idénticas a las EpiSC murinas debido a que también presentan atributos inherentes a las mESC. Por ejemplo, al igual que las células *naive* de ratón, las líneas hESC expresan KLF4, REX1 y E-Cadherina. Asimismo, FGF5 es un marcador de células *primed* murinas, el cual se encuentra ausente en las líneas convencionales de humano (Manor et al., 2015).

Cabe mencionar que estas características son propias de las hESC cuando son cultivadas en lo que se denomina condiciones estándar o convencionales: en medio suplementado con reemplazo de suero Knockout (KOSR, por sus siglas en inglés *Knockout Serum Replacement*) al 20% más FGF2. Sin embargo, en fechas recientes se han empleado diversos protocolos en los que se incluye la adición de otros factores y moléculas pequeñas inhibitorias, con la finalidad de encontrar las condiciones idóneas para conseguir un estado de pluripotencia humana *naive* (Avila-Gonzalez et al., 2016).

El gran interés por obtener este tipo de células radica en las diferencias que se han reportado entre mESC y EpiSC, puesto que la generación de un estado pluripotente humano con propiedades *naive* podría servir como modelo de estudio que superara las limitaciones que tienen las actuales hESC debido a sus propiedades *primed*, como la baja eficiencia de clonación y su potencial de pluripotencia más restringido (Gafni et al., 2013).

Sin embargo, los diferentes grupos de trabajo que estudian la pluripotencia humana no han llegado a un acuerdo acerca de las condiciones idóneas para capturar células humanas *naive*. Por una parte, varios autores han señalado que es posible la conversión de las hESC hacia un estado *naive* cuando son derivadas o mantenidas en la condición LIF/2i, al mismo tiempo que seguirían siendo dependientes de FGF y Activina. Sin embargo, la fórmula de un medio definido para conseguir la condición *naive* no solo incluye a LIF/2i y FGF/Activina, sino que cada uno de los grupos reportó la adición de diferentes moléculas pequeñas para inhibir distintas vías de señalización, entre ellas JNK (*c-Jun N-terminal Kinases*) y p38 (Gafni et al., 2013); BMPs (Chan et al., 2013); desacetilasas de histonas (Ware et al., 2014), serina/treonina quinasa BRAF (*B-Raf Proto-Oncogene*) y la tirosina quinasa SRC (Theunissen et al., 2014) o PKC (Gafni et al., 2013, Takashima et al., 2014). Estos trabajos sugieren que aunque haya diferentes rutas para conseguir la pluripotencia humana *naive*, la adición de FGF2 sigue siendo fundamental para el mantenimiento de las células humanas en estado *naive*, aunque no necesariamente a través de la vía ERK2. De hecho, cuando Duggal reportó una nueva combinación de moléculas pequeñas y factores de crecimiento (2i/LIF/FGF2/Ácido ascórbico/Forskolina) para facilitar la inducción del estado *naive* en hESC, al igual que en los trabajos previos, las células seguían siendo dependientes de FGF2 para mantener el estado indiferenciado, solo que en este trabajo se propuso que es a través de la vía de PI3K/AKT/mTORC) (Duggal et al., 2015). Sin embargo, Chan y col. demostraron que la activación constitutiva de STAT3 junto con la adición de LIF/2i era suficiente para que las hESC presentaran un fenotipo *naive*, utilizando una ruta de señalización independiente de FGF2, puesto que las células no se diferenciaban al agregar un inhibidor de FGF2 (SU5402) (Chen et al., 2015). Por última mención, se reportó que la condición LIF/2i junto con un inhibidor de la tanquirasa I (o Polimerasa 5A Poli-[ADP-ribosa]) puede promover dicho estado pluripotente (Zimmerlin et al., 2016). Estos dos últimos artículos se contraponen a lo reportado por los otros grupos que derivaron líneas humanas con características *naive* dependientes de FGF2. En breve, la descripción de dos tipos de pluripotencia en el ratón, así como los recientes y diversos protocolos con moléculas pequeñas

para cultivar células pluripotentes humanas, sugiere la existencia de otros estados pluripotentes que aún no se han descrito, en consecuencia las actuales líneas PSC que se utilizan como modelo de estudio muy probablemente no representan dicho *spectrum* (Avila-Gonzalez et al., 2016).

Los microRNAs: su biogénesis y función

Los microRNAs (miRNAs) son una clase de RNAs pequeños no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que juegan un papel muy importante en la modulación de la expresión génica, a través de la inhibición de la traducción del RNA mensajero o induciendo su degradación (He and Hannon, 2004).

Los miRNAs se pueden transcribir de dos maneras: a través de la vía canónica o clásica y de una vía no canónica. En la primera, los miRNAs utilizan su propio promotor y son transcritos por la polimerasa de RNA II y la III, tanto de manera policistrónica o en “cluster”, es decir, varios miRNAs se transcriben al mismo tiempo por un solo promotor, o de manera monocistrónica, cuando solamente un miRNA es transcrito (Ruby et al., 2007). Su biogénesis comienza con el producto transcrito de una molécula de RNA de alrededor 1kb de nucleótidos, conocida como miRNA primario. La estructura primaria de este miRNA inmaduro es en forma de tallo asa, el cual es procesado por la endonucleasa Drosha (enzima que escinde cerca de la base del tallo para dar lugar a un producto de aproximadamente 70-80 nucleótidos denominado pre-miRNA) en el núcleo. Posteriormente, es exportado hacia el citoplasma a través de la Exportina V y su cofactor Ran-GTP, en donde la endonucleasa Dicer corta al pre-miRNA, lo que resulta en la generación de un miRNA maduro de 22 nucleótidos de doble cadena (dúplex). Finalmente, una de las dos cadenas es incorporada al complejo de silenciamiento inductor del RNA (RISC, *RNA-induced silencing complex*) y por complementariedad se une a los RNAm blancos para inducir su degradación o inhibición de la traducción (Diaz et al., 2014). Por otra parte, en la vía no canónica, un RNA es transcrito a partir de un intrón y procesado mediante *splicing* alternativo, generando un fragmento corto denominado *mirtrón* que mimetiza al pre-miRNA y subsiguiente entrar a la vía canónica, con la excepción de que su procesamiento es independiente de Drosha (Ruby et al., 2007).

Como se mencionó, el miRNA debe llevar a cabo su función en asociación con RISC, el cual posee un componente principal denominado Argonauta, que actúa como endonucleasa de RISC. Para que el miRNA en conjunto con el complejo silenciador reconozca sus blancos específicos, los nucleótidos 2-8 de su extremo 5' deben ser complementarios al extremo 3' del RNAm, en una región llamada

“secuencia semilla”, siendo de suma importancia para la predicción de la unión con los RNAs mensajeros diana. Debido a que es una región muy corta, los miRNAs pueden regular un número considerable de transcritos. Asimismo, en ausencia de complementariedad perfecta entre el miRNA y el blanco, la asociación con RISC bloquea la traducción del RNAm en vez de promover su corte y degradación (Lai, 2004).

De forma interesante, se ha reportado la presencia de miRNAs en fluidos del cuerpo humano, así como en el espacio extracelular y en el medio condicionado (CM, *conditioned media*) derivado de células en cultivo (Weber et al., 2010, Turchinovich et al., 2011). Estos estudios sugieren la transferencia horizontal de miRNAs entre células como una nueva forma de comunicación intercelular. De esta forma, se ha descrito la liberación de miRNAs hacia sus células blanco a través de un tráfico activo de vesículas pequeñas llamadas exosomas en donde se encapsulan los miRNAs, así como su asociación con proteínas de unión al RNA (Valadi et al., 2007, Chen et al., 2012). Dentro del campo que nos concierne, se ha reportado que las mESC secretan microvesículas cargadas de miRNAs que son transferidas hacia los MEF (Yuan et al., 2009). Asimismo, se ha descrito que los telocitos de tejido cardíaco pueden modular la liberación de miRNAs en exosomas hacia células troncales hematopoyéticas y progenitores de cardiomiocitos (Cismasiu and Popescu, 2015). Recientemente, se han reportado los posibles efectos de la transferencia de miRNAs entre células troncales con otros tipos celulares, vgr, células de Müller humanas fueron expuestas a microvesículas liberadas por mESC cuyo contenido eran miRNAs del cluster 290 (reguladores importantes del ciclo celular en células troncales). En este experimento, las células tratadas presentaron cambios morfológicos, así como la inducción endógena de factores de transcripción (como OCT4) (Katsman et al., 2012). A su vez, la incubación de mESC en medio de cultivo que contenía vesículas con miRNAs secretadas de una línea celular de preosteoblastos indujo cambios significativos en la expresión de genes, sobre todo en el incremento de marcadores para linajes de diferenciación (Nair et al., 2014).

Estos resultados sugieren que los miRNAs al ser secretados al medio de cultivo pueden tener un efecto funcional sobre células receptoras en cocultivo, ya

sea al incidir en la regulación de la pluripotencia o en los mecanismos de diferenciación. Sin embargo, la investigación en este campo apenas está iniciando.

Pequeños reguladores no codificantes: pedestales de la pluripotencia

Los primeros reportes que demuestran el papel crucial de los miRNAs en la regulación de la pluripotencia consistían en la eliminación de las enzimas Dicer y Drosha (consideradas como reguladores maestros del procesamiento de miRNAs). La falta de ellas induce una pérdida global de miRNAs, resultando en defectos en procesos de diferenciación y proliferación en mESC. Además, en ratones knockout a *Dicer* se presentó la muerte durante etapas tempranas del desarrollo (Kanellopoulou et al., 2005); mientras que en hESC afecta los procesos de proliferación y de diferenciación (Qi et al., 2009), sugiriendo la importancia general de los miRNAs en la pluripotencia de los mamíferos.

Enfocándonos en el humano, se ha reportado que la tríada OSN se une a promotores específicos para estimular la expresión de clusters de miRNAs (Marson et al., 2008), siendo los miembros de las familias miR-302 y miR-92 los más abundantes en las hESC (Bar et al., 2008, Suh et al., 2004).

La familia miR-302 fue identificada como un cluster en el cromosoma humano 4 y consiste de nueve diferentes miRNAs que se transcriben de manera policistónica: miR-302a, miR-302a*, miR-302b, miR-302b*, miR-302c, miR-302c*, miR-302d, miR-367 y miR-367*, siete de ellos con la región 5' altamente conservada (Tabla 1) (Suh et al., 2004).

En cuanto a la familia miRNA-92, el miR-92a pertenece al cluster 17/92 que se expresa a partir del cromosoma 13, mientras que para el miR-92b el gen se localiza en el cromosoma 1, no obstante ambos comparten la secuencia semilla (Tabla 1).

Diversos estudios han demostrado que los miRNAs para mantener la pluripotencia reprimen reguladores claves del ciclo celular o de la diferenciación. Por ejemplo, los miembros de las familias miR-302 y miR-92 inhiben a Rbl2 (*Retinoblastoma-like 2*), así como inhibidores de la cinasa dependiente de ciclina 1A (Cdkn1A o p21) y 1C (Cdkn1C o p57) lo que permite una transición rápida de la fase

G1-S (Card et al., 2008, Leonardo et al., 2012). Los miembros miR-302 no solo regulan el ciclo celular, puesto que otro de sus blancos específicos es AKT1, la cual fosforila a OCT4, promoviendo su degradación vía el sistema ubiquitina-proteosoma. De esta forma, miR-302 es capaz de regular indirectamente los niveles proteicos de OCT4 al suprimir a AKT1 y con ello mantener la pluripotencia humana (Li et al., 2016).

Recientemente, se ha descrito la importancia que tiene la familia miR-200 en la pluripotencia humana; el miR-200c localizado en el cromosoma 12, está enriquecido en hESC y es regulado hacia abajo cuando las células comienzan a diferenciarse. Estudios de pérdida y ganancia de función de dicho miRNA sugieren que uno de sus papeles es la inhibición directa de los factores involucrados en la diferenciación endodérmica como GATA4 (Huang et al., 2014). Por otra parte, inhibe a ZEB1 y ZEB2, quienes a su vez reprimen la expresión de E-cadherina, favoreciendo el mantenimiento del fenotipo epitelial (característica importante de la pluripotencia) al evitar la transición hacia mesénquima. Cabe mencionar que estos trabajos solo se han demostrado con líneas de cáncer y durante los procesos de reprogramación de células somáticas hacia iPSC (Park et al., 2008, Wang et al., 2013).

De hecho, se ha demostrado que la transfección directa de miRNAs (cluster miR-302 y algunos miembros de la familia miR-200) es suficiente para reprogramar células somáticas humanas, incluso con una mayor eficiencia que el método descrito por Yamanaka, así como potenciar el proceso cuando se utiliza en conjunto con los factores OSKM (Anokye-Danso et al., 2011, Subramanyam et al., 2011, Miyoshi et al., 2011). Estos resultados confirman que los miRNAs tienen un efecto en vías esenciales para la inducción y el mantenimiento de la pluripotencia.

Además de regular el ciclo celular y la diferenciación, estas moléculas pueden repercutir en los niveles de metilación del DNA, así como en modificaciones de las histonas aunque el mecanismo es de forma indirecta, al ser reguladores negativos postranscripción de las metiltransferasas de DNA y de histonas. Sin embargo, un reporte actual sugiere que los miRNAs pueden regular la pluripotencia directamente a nivel epigenético, al descubrir que se requiere la biogénesis de miRNAs

dependiente de DICER para la unión de los componentes del complejo PCR2 (EZH2 y SUZ12), así como la presencia de la marca H2K27me3 en genes bivalentes de células pluripotentes. De esta forma, un papel novedoso de los miRNAs independiente de su función inhibitoria postranscripcional es el mantenimiento de una cromatina bivalente, aunque solo se ha descrito en mESC (Graham et al., 2016).

miRNA	Secuencia
hsa-miR-92a	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-92b	UAUUGCACUCGUCCCGGCCUCC
hsa-miR-302a	UAAGUGCU UCCAUGUUUUGGUGA
hsa-miR-302b	UAAGUGCU UCCAUGUUUAGUAG
hsa-miR-302c	UAAGUGCU UCCAUGUUUCAGUGG
hsa-miR-302d	UAAGUGCU UCCAUGUUUGAGUGU
hsa-miR-302e	UAAGUGCU UCCAUGCUU
hsa-miR-200c	<u>UAAUACUGCCGGG</u> UAAUGAUGGA

Tabla 1. miRNAs con mayor expresión en las hESC. Las secuencias corresponden al antisentido (3p) de cada miRNA. En color gris se remarca la secuencia semilla de la familia miR-92, en color negro resalta la secuencia semilla de la familia miR-302 y finalmente el subrayado la secuencia semilla de la familia miR-200.

Problemas en la investigación con hESC

El potencial que poseen las hESC las coloca como un modelo atractivo y único para el estudio de los mecanismos del desarrollo de los vertebrados. El cultivar a estas células de forma indefinida, las hacen aptas para ensayos de mecanismos que confieren la autorrenovación y pluripotencia. Además, dada su capacidad de dar origen a todos los tipos celulares, se consideran un modelo de los eventos moleculares que definen la diferenciación celular (Warmflash et al., 2012), lo que resultaría en la obtención de protocolos de diferenciación dirigidos hacia un tipo celular específico y con ello un reservorio de material biológico para un posible uso en la medicina regenerativa. Sin embargo, existen una serie de problemas en torno a la investigación con las hESC que es necesario resolver a mediano plazo.

Uso de embriones humanos para la derivación de hESC

El primero implica cuestiones bioéticas, puesto que la obtención de estas células mediante las técnicas estándar de derivación implica la destrucción de un blastocisto con potencial de desarrollo en un ser humano (McLaren, 2001) motivo por el cual se han buscado métodos alternativos para su obtención. Una posible solución a este problema es el uso de cigotos de mala calidad; durante los procesos de fertilización *in vitro* (IVF) en las unidades de reproducción asistida, la calidad de los embriones se clasifica de acuerdo a una serie de caracteres morfológicos que se evalúan en los días 3 y 5 post IVF (Tabla 2). De acuerdo a éstas, los cigotos considerados de mala calidad presentan una muy baja o nula posibilidad de éxito en la implantación o embarazo bioquímico (detección de gonadotropina coriónica humana beta en el suero materno una vez que ocurre la implantación), por lo que son descartados de forma rutinaria para su uso en la clínica (Alikani et al., 1999, Racowsky et al., 2003).

No obstante, se ha demostrado que estos embriones son una fuente para el establecimiento de nuevas líneas celulares de hESC, las cuales presentan las mismas características que las líneas derivadas de cigotos de buena calidad. Un estudio pionero utilizó embriones de 5 días de la categoría blastocisto poco

desarrollado (considerado de mala calidad) para cultivarlos sobre una capa de MEF en medio suplementado con FGF y suero, derivando un total de 4 líneas las cuales al ser caracterizadas presentaban los marcadores de pluripotencia, además de mantener su potencial de diferenciación al formar células neuronales y del tejido cardíaco inclusive 12 meses después de su derivación (Mitalipova et al., 2003). Asimismo, en otro reporte se utilizaron 171 embriones de mala calidad del día 3 que de igual manera fueron sembrados sobre MEF, pero en solo cinco embriones se observó el crecimiento celular sobre la capa nodriza, los cuales fueron pasados de forma mecánica pero solo uno continuó proliferando en cada pase. Esta única línea hESC fue derivada a partir de un cigoto arrestado en la etapa de 6-células, pero cuya caracterización demostró que las células tenían cariotipo normal y eran capaces de formar teratomas en ratones SCID, sugiriendo que a partir de embriones de mala calidad del día 3 es posible obtener líneas hESC (Lerou et al., 2008a, Lerou et al., 2008b). El grupo de Hovatta analizó la relación entre la calidad de la morfología del embrión y el éxito de derivar una línea de hESC y concluyó que al utilizar tanto embriones de mala como de buena calidad, se obtiene el mismo porcentaje en la obtención de líneas celulares (Strom et al., 2010). Es por ello que con base en estos primeros reportes, se ha considerado el uso de los embriones anormales como una fuente que se utiliza de forma más frecuente para la derivación de hESC (Bradley et al., 2014, Wang et al., 2012b, Wang et al., 2012a).

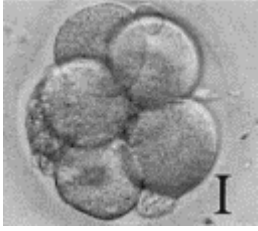
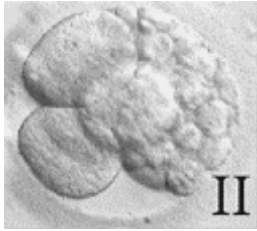
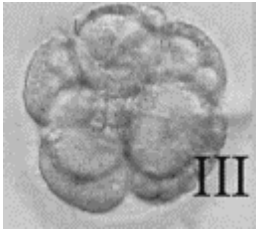
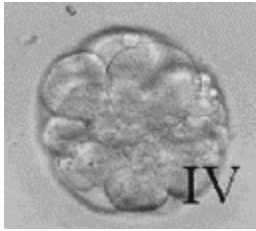
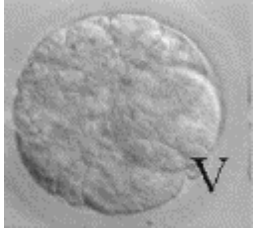
<p>Grado I. Fragmentación mínima (0-5%) asociada a solo un blastómero. Blastómeros de igual tamaño.</p>	
<p>Grado II. Blastómeros de igual tamaño. Fragmentación localizada, de un 6-15%.</p>	
<p>Grado III. Fragmentos pequeños pero dispersos. Blastómeros de tamaño diferente. Fragmentación del 16-25%.</p>	
<p>Grado IV. Fragmentos grandes, distribuidos al azar. Blastómeros desiguales en tamaño. Fragmentación del 26-35%.</p>	
<p>Grado V. Fragmentación severa (>al 35%), apariencia granular.</p>	

Tabla 2. Escala de Scott para la clasificación de cigotos. La clasificación se basa principalmente en el porcentaje de fragmentación citoplasmática y número de blastómeras. Cigotos de buena calidad poseen fragmentación mínima y los blastómeros de igual tamaño, mientras que los de mala calidad tienen mayor fragmentación o tamaño desigual de blastómeras. Micrografías tomadas de Alikani et al., 1999.

Falta de disponibilidad de líneas hESC

En el 2010 un grupo de la Universidad de Michigan realizó un estudio para determinar el origen étnico de las líneas hESC utilizadas en la mayoría de los artículos publicados. Para ello se genotipificó los SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) de cada línea celular y se compararon con genotipos de sujetos que representaban a un total de 63 poblaciones mundiales obtenidos de los proyectos *HapMap* y *Human Genome Diversity*. Los resultados fueron representados en un análisis de cluster que combinaba los genotipos de las líneas con el de las muestras poblacionales, demostrando que la mayoría se agrupaban exclusivamente con sujetos de origen europeo y de Asia del Este, sin representar a regiones como África y América Latina. Dicho trabajo concluyó que deberían hacerse más esfuerzos para obtener y difundir nuevas líneas hESC de poblaciones con poca representación genética (Mosher et al., 2010). Este es un dato crítico dado que se ha demostrado las diferencias en la epidemiología de las enfermedades y susceptibilidad a ellas entre los diferentes grupos étnicos, por lo que la disponibilidad de líneas con mayor variabilidad genética reduciría el riesgo de que los beneficios potenciales de la investigación con hESC se limite a solas unas poblaciones (Stepanov, 2010).

Con base en esto, en los últimos años aumentó el número de líneas pluripotentes humanas que se han generado a partir de poblaciones afroamericanas, asiáticas e hispanas (Chang et al., 2015), pero para Latinoamérica la mayoría proceden de Brasil (Fraga et al., 2011, de Oliveira Georges et al., 2014, Tofoli et al., 2016), no existiendo hasta el momento líneas que representen a la población mexicana. Por lo tanto, es necesaria la obtención de nuevas líneas hESC bien caracterizadas, así como nuevos métodos para su derivación que no conlleven problemas ético-legales.

Capas nodrizas de origen animal para el cultivo de hESC

Otro de los problemas actuales es el uso de productos derivados de animales para la obtención y mantenimiento de las líneas de hESC. Desde la obtención de las primeras líneas humanas, el sistema de cultivo convencional emplea medio suplementado con suero y una capa alimentadora de MEF (Thomson et al., 1998). La presencia de componentes indefinidos en este sistema es problemática, por dos razones: a) los factores desconocidos en el suero o producidos por la capa alimentadora pueden confundir la interpretación de los estudios de los efectos de agentes exógenos en el crecimiento y en la diferenciación de las ESC y b) es deseable reducir el número de factores exógenos, ya que pueden tener el potencial de transmitir patógenos a las células cultivadas, lo que presentaría una barrera para su futura aplicación clínica (Stacey et al., 2006). Por ejemplo, el uso del suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovine Serum*) conlleva el riesgo de una exposición potencial a virus y priones bovinos (Desai et al., 2015); además que se ha identificado la presencia de glicoproteínas de ratón en la superficie membranal de células hESC que fueron mantenidas previamente MEF, dichas moléculas pueden desencadenar reacciones inmunológicas severas al momento de realizarse los trasplantes en el hospedero (Martin et al., 2005). Otro riesgo son los virus y priones de origen murino, porque si bien la mayoría son incapaces de infectar células humanas, se ha reportado que algunos elementos retrovirales endógenos sí pueden ser transmitidos a líneas humanas (Song et al., 2002).

Dado esta problemática, se han buscado alternativas para la derivación y mantenimiento de líneas libres de la capa alimentadora de MEF. Una de las primeras opciones descritas fueron las matrices definidas (Matrigel, Geltrex, derivadas del tumor murino Englebreth-Holm-Swarm), constituidas por colágena IV, laminina, entactina, heparán sulfato y proteoglicanos. Sin embargo, Ludwig derivó dos líneas de hESC sobre Matrigel en un medio de cultivo químicamente definido; pero ambas líneas no conservaron su estabilidad genómica a lo largo del tiempo, presentando trisomías en los cromosomas 12 y X (Ludwig et al., 2006). A pesar de este antecedente, el Matrigel es uno de los componentes más ampliamente usados

en la investigación para mantener hESC sin depender de la capa nodriza de origen animal. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que el mantenimiento de las líneas en condiciones libres de capa, se asocia con altas tasas de inestabilidad genética (duplicación y delección total o parcial de regiones cromosómicas) y aberraciones epigenéticas (cambios en la metilación de DNA), comprometiendo la capacidad pluripotente (Garitaonandia et al., 2015).

De esta forma, diversos investigadores apoyan la idea de la continuidad del mantenimiento de las hESC dependiente de capas alimentadoras de origen humano, las cuales podrían ser hasta el momento el método más seguro para derivar y mantener líneas (Unger et al., 2008).

La heterogeneidad de las hESC

Como aún no se ha confirmado la existencia de diferentes tipos de pluripotencia humana que puedan representarse *in vitro*, por ende, la mayoría de las hESC (así como las hiPSC) se podrían considerar de naturaleza *primed* independientemente de la metodología del cultivo (capas nodrizas, sustratos sintéticos, medios definido, suero). Las líneas que se utilizan en la investigación a grandes rasgos presentan el mismo patrón de marcadores pluripotentes y aparentemente no hay diferencias en el potencial para formar teratomas (Avila-Gonzalez et al., 2016). Sin embargo, un análisis más detallado indica que hay variaciones intrínsecas entre cada línea, haciéndola única. Verbigracia, Bock comparó los perfiles de transcriptoma y metilación del DNA entre 20 líneas de hESC mediante tres técnicas distintas; sus resultados demostraron que si bien todas las líneas presentaban niveles globales de metilación y expresión de genes muy similares, entre ellas había varios genes con expresión diferencial significativa, lo que les confería un perfil específico (Bock et al., 2011).

En concordancia con esta heterogeneidad, algunos grupos evaluaron la capacidad de diferenciación de diferentes líneas utilizando protocolos de diferenciación espontánea y específicos de linaje; mientras que en la mayoría no se observaron acentuadas diferencias en los marcadores pluripotentes previos a la

diferenciación, durante dichos procesos se encontró que la expresión de los genes específicos de linaje fueron diferentes, sugiriendo que varias de las líneas que se utilizan actualmente tienen una marcada propensión para diferenciarse hacia cierto tejido. Por ejemplo, Osafune reportó que HUES8 es idónea para ser utilizada en diferenciación pancreática mientras que las HUES3 para el linaje cardíaco (Osafune et al., 2008). En otro trabajo, Bock concluyó que las líneas H1 y H9 son más competentes para diferenciarse hacia linaje neural, mientras que HUES8 tiene predilección hacia un destino endodérmico, corroborando trabajo previos (Bock et al., 2011).

Se había mencionado los inconvenientes de utilizar capas nodrizas de origen animal y matrices sintéticas en cuanto a riesgos de contaminación xénica e inestabilidad cromosómica. Recientemente, se ha reportado que estas condiciones de cultivo podrían ser en parte la causa de la heterogeneidad de las líneas humanas. Como prueba, Ojala midió la eficiencia de diferenciación de hESC e hiPSC hacia linaje cardíaco cuando crecían sobre la capa nodriza de MEF o Matrigel. A pesar que en ambas condiciones se obtuvieron células con fenotipo parecido a cardiomiocitos, la eficiencia fue más alta al crecer sobre la capa nodriza (Ojala et al., 2012). Asimismo, el grupo de Bhatia evaluó el potencial de diferenciación hacia linaje neural y hematopoyético cuando las células crecían con medio condicionado de MEF (MEF-CM) o con un medio comercial diseñado para células pluripotentes (TesR1); los resultados mostraron que las células con TesR1 se diferenciaron preferentemente hacia tejido neural mientras que el MEF-CM indujo hacia tejido hematopoyético (Lee et al., 2015b). Estos trabajos demuestran que las condiciones de cultivo pueden inducir heterogeneidad en el potencial de las células pluripotentes. De forma intrigante, en estos trabajos no se observó que las condiciones de cultivo afectaran *grosso modo* los niveles globales de expresión de marcadores pluripotentes como OSN; sin embargo, no se ha estudiado si hay una correlación entre diferentes condiciones de cultivo con cambios en el perfil de miRNAs relacionados con la pluripotencia (a partir de este momento abreviado como pluri-miRNAs).

Células epiteliales del amnios humano: una alternativa de capa nodriza

Durante el período gestacional, las membranas fetales humanas (HFM, *Human Fetal Membranes*) envuelven al feto en la cavidad amniótica, cuyas funciones principales incluyen brindarle protección durante su desarrollo, facilitar el intercambio de gases y desechos y juegan un papel crítico como barrera de defensa contra infecciones, traumas y toxinas, entre otras (Ilancheran et al., 2009). Las HFM están conformadas por el corion y el amnios, la membrana más externa corresponde al corion, el cual está vascularizado y en contacto con la pared uterina, mientras que el amnios es una membrana traslúcida y avascular en contacto con el fluido amniótico (Figura 3) (Garcia-Lopez et al., 2015).

Histológicamente el amnios humano se compone de cinco capas: el epitelio amniótico, la membrana basal, la capa compacta, la fibroblástica y la esponjiforme. El epitelio amniótico corresponde a la capa más interna y está constituida por una monocapa de células cuboides con microvellosidades. Estas células secretan varios componentes de la matriz extracelular como colágena tipo IV, V y VII, fibronectina y laminina que constituyen la membrana basal del amnios. A estas dos primeras capas se les conoce en conjunto como ectodermo amniótico, la cual está en contacto con el mesodermo amniótico que constituye las siguientes tres capas. Subyacente a la membrana basal está la capa compacta acelular, en donde hallaremos una red conectiva de más componentes extracelulares como colágeno tipo I, II, V, VI y fibronectina. La siguiente es la capa fibroblástica y contiene principales células mesenquimales y algunos macrófagos. Finalmente, tenemos la capa esponjosa, compuesta por colágeno tipo I, III, IV y proteoglicanos y es la que separa al amnios del corion (Figura 3) (van Herendael et al., 1978).

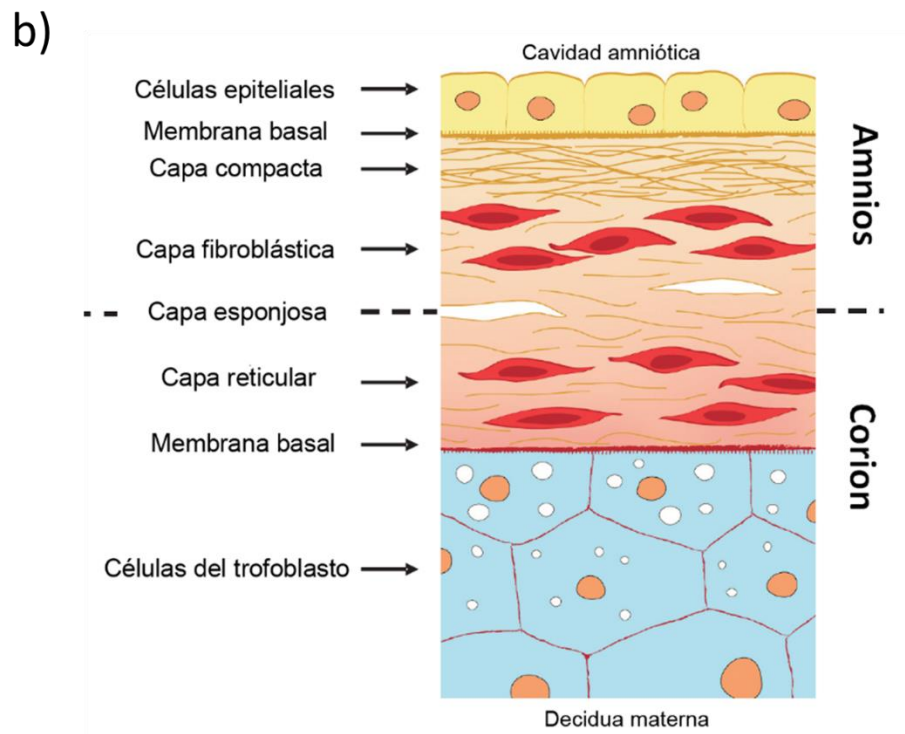
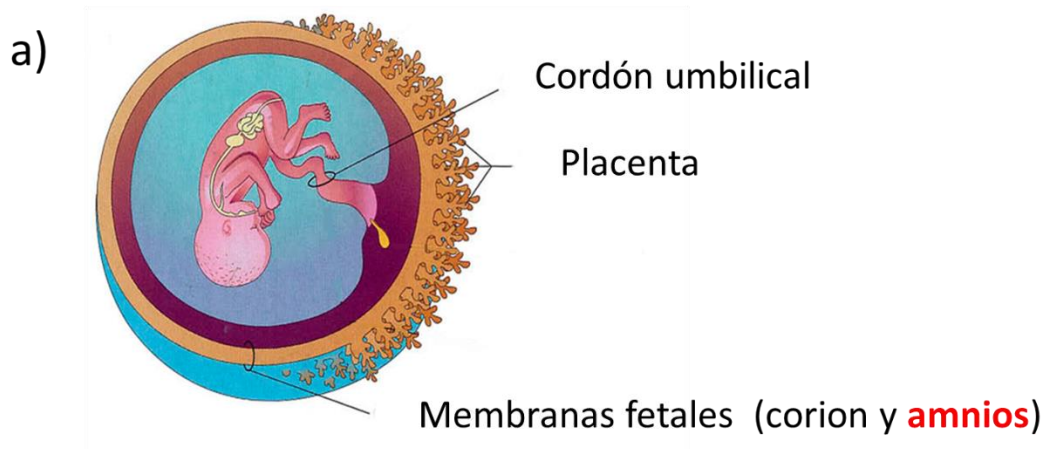


Figura 3. Membranas fetales. A) Representación esquemática de la localización de las membranas fetales (amnios y corion) en los tejidos extraembrionarios durante la etapa de gestación. **B)** Representación esquemática de la histología de las membranas fetales humanas. El amnios se conforma por una monocapa de células epiteliales, una membrana basal, una capa compacta, una fibroblástica y la esponjosa; mientras que el corion se conforma por la capa reticular y células del trofoblasto. Ambas capas son separadas por otra membrana basal. Modificado de Dobrevá et al. 2010.

Estudios comparativos del desarrollo del amnios entre el mono Rhesus y el humano demostraron que el proceso de formación es básicamente igual entre ambas especies, aunque en el humano la cavidad amniótica comienza entre 7 y 8 dpf comparado con los 10 dpf en el mono (Luckett, 1975). Por otra parte, el corion y el mesodermo amniótico se originan del hipoblasto, mientras que el epitelio amniótico se deriva directamente del epiblasto. En el humano, el ectodermo amniótico es la primera estructura derivada del epiblasto una vez que ocurrió la postimplantación y antes de la etapa de gastrulación (15-17 dpf) (Bianchi et al., 1993). Por muchas décadas, la única evidencia de la formación del amnios (amniogénesis) humano fueron análisis histológicos, los cuales indicaban que el epitelio amniótico surgía de la cavidad que forma el epiblasto y no fue hasta 1986 en donde un estudio minucioso permitió conocer cómo era el proceso de amniogénesis en primates (mono Rhesus). De acuerdo a Enders, una vez que ocurre la implantación del embrión, las células del epiblasto comienzan a polarizarse y a congregarse de forma radial para formar una pequeña cavidad en el sitio en donde ellas convergen. Posteriormente, conforme el número de células del epiblasto aumenta, la cavidad se amplía para formar la denominada cavidad amniótica y en este momento, las células que están en el borde y que anteriormente formaban parte del epiblasto ahora se denominan como ectodermo amniótico. Más adelante, el mesodermo extraembrionario se asociará con el ectodermo amniótico para formar la membrana del amnios, conformada por las dos capas celulares ya mencionadas (el epitelio amniótico y la capa fibroblástica) rodeadas de una acumulación de matriz extracelular (Enders et al., 1986).

Recientemente, tres grupos de investigación obtuvieron pruebas del origen del amnios humano. Por una parte, dos laboratorios de forma independiente diseñaron una estrategia para cultivar por primera vez embriones humanos postimplantación hasta un estadio equivalente a los 13 dpf. Ellos observaron que una vez que el blastocisto se adhería a la placa de cultivo, el trofoectodermo comenzaba a expandirse y posteriormente diferenciarse a tipos celulares especializados de las estructuras extraembrionarias. Al mismo tiempo, la ICM se segregaba en endodermo primitivo y epiblasto. En ambos trabajos se describió que

a los 8-9 dpf un grupo de células del epiblasto (identificadas con el marcador OCT4) comenzaban a adquirir una polarización basal-apical y a organizarse de forma radial alrededor de una pequeña cavidad central. Dados los antecedentes de los trabajos hechos en primates, se consideró que la formación del pequeño lumen en el sitio exacto de la incipiente polarización apical del epiblasto era el nacimiento de la cavidad amniótica y por lo tanto, una prueba de que el amnios proviene en efecto del epiblasto en el humano (Deglincerti et al., 2016, Shahbazi et al., 2016).

Como complemento, un tercer grupo utilizó un sistema a base de biomateriales que permitía el cultivo 3D de líneas pluripotentes humanas (hPSC) y su posterior autorganización, mimetizando los procesos que ocurren en el epiblasto después de la implantación. De forma sorprendente, las hPSC formaron un quiste conformado por un epitelio columnar de células con una morfología escamosa que eran negativas para los marcadores de pluripotencia pero cuya expresión de E-cadherina revelaba su naturaleza todavía epitelial. La ausencia de marcadores del surco primitivo, así como la expresión de genes que se habían observado previamente en tejido del amnios humano del primer trimestre de gestación, llevó a la conclusión que la amniogénesis humana ocurre por la autorganización de células pluripotentes por lo menos en un nicho sintético que simula la implantación (Shao et al., 2016).

Bajo estos antecedentes, puede asumirse que el epitelio amniótico humano proviene directamente del epiblasto postimplantado, mucho antes de que ocurra la formación del surco primitivo de la etapa de la gastrulación y por lo tanto, la pérdida de la pluripotencia. De hecho, células epiteliales recién aisladas del amnios humano a término (hAEC, *human Amniotic Epithelial Cells*) son positivas para varios marcadores relacionados con la pluripotencia humana, como los antígenos de superficie SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60 y los factores de transcripción OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 y REX1, por lo que las hAEC podrían considerarse como un remanente del estado efímero de la pluripotencia (Garcia-Castro et al., 2015, Miki et al., 2005).

Dado su origen embrionario y la estrecha relación que guardan con el epiblasto durante la ontogenia de los primates, se ha sugerido que las hAEC pueden

ser idóneas para el mantenimiento de células pluripotentes (Chen et al., 2013). Asimismo, poseen características únicas que las hacen aptas para servir como capa nodriza: 1) pueden ser obtenidas con relativa facilidad (su obtención no representa muchos problemas ético-legales) ya que se consideran un material de desecho médico después del nacimiento del producto; 2) una vez que son aisladas mantienen las propiedades de las membranas fetales como lo es una baja o nula respuesta inmunológica, efectos anti-bacteriales, anti-inflamatorios y anti-virales, peculiaridades que podrían ser útiles en su posible aplicación clínica (Garcia-Lopez et al., 2015, Niknejad et al., 2008); 3) secretan factores de crecimiento como: EGF (por sus siglas en inglés *Epidermal Growth Factor*), TGF- α (por sus siglas en inglés *Transforming Growth Factor- α*), KGF (por sus siglas en inglés *Keratinocyte Growth Factor*), HGF (por sus siglas en inglés *Hepatocyte Growth Factor*), bFGF (por sus siglas en inglés *basic Fibroblastic Growth Factor*), TGF- β 1 y β 2 (Koizumi et al., 2000) y 4) secretan proteínas que forman parte de la matriz extracelular como la colágena del tipo IV, fibronectina y laminina, las cuales podrían estar favoreciendo la adhesión celular de otras células como en este caso de las líneas pluripotentes (Roubelakis et al., 2012).

En congruencia con los antecedentes mencionados, se ha demostrado que las hAEC pueden mantener líneas pluripotentes como las mESC e hiPSC, de hecho las colonias presentaban niveles de expresión de la tríada OSN mucho más altos cuando crecían sobre hAEC en comparación sobre la capa convencional de MEF (Liu et al., 2010, Liu et al., 2012b, Chen et al., 2013).

Por otra parte, en un par de estudios se propuso que las hAEC pueden regular al miR-145, así como al factor epigenético DNMT 1 como posibles mecanismos por los cuales mantienen a las células pluripotentes en estado indiferenciado (Liu et al., 2012b, Chen et al., 2013). Sin embargo, es importante considerar que estos análisis se realizaron exclusivamente con hiPSC, las cuales son muy diferentes de las hESC, de acuerdo a lo que se explicó en capítulos previos, poseen aberraciones epigenéticas contraídas durante la reprogramación así como un potencial de diferenciación limitado (Hu et al., 2010, Liang and Zhang, 2013).

Hasta el momento el momento no ha habido reportes acerca de cuáles podrían ser los mecanismos mediante los cuales las hAEC pueden ayudar a mantener la pluripotencia de las hESC.

Aunado a esto, proponemos a las hAEC como una capa alimentadora para derivar hESC a partir de embriones de mala calidad y de esta manera contar con nuevas líneas pluripotentes que representen a la población mexicana.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dados los antecedentes mencionados, podemos inferir que las hPSC y en particular las hESC tienen una importancia inestimable en la biología, tanto como un modelo para comprender los procesos del desarrollo en el humano, así como su empleo para la obtención de protocolos de diferenciación dirigida hacia un linaje en específico. Por ello, como contribución para resolver algunos de los problemas de la investigación básica de las hESC, en esta tesis se plantea derivar líneas mexicanas a partir de embriones de mala calidad, utilizando como alternativa a los MEF una capa nodriza de hAEC. Sin embargo, aparte de estos inconvenientes que son necesarios resolver a mediano plazo, aún falta por estudiar los mecanismos en la pluripotencia de las hESC (Figura 4).



Figura 4. Resumen de los mecanismos que imperan la pluripotencia de las hESC. Las hESC se caracterizan por expresar el “core” de la pluripotencia conformado por OCT4, SOX2 y NANOG, factores de transcripción que interactúan a nivel nuclear con reguladores epigenéticos para la activación de genes relacionados con la autorrenovación y pluripotencia así como la represión de genes específicos de linaje. Estas interacciones nucleares son el resultado de las principales vías de activación (ERK2/FGF2 y Activina/Nodal de la familia TGF- β) presentes en hPSC. Se ha sugerido que los microRNAs tienen un papel fundamental en la pluripotencia al regular la expresión de varios componentes de procesos elementales como el ciclo celular, la diferenciación, la transición de epitelio-mesénquima y reguladores epigenéticos

De esta forma, en los últimos años ha habido grandes avances en nuestra comprensión de las redes implicadas en estos procesos, pero la caracterización rigurosa de las hESC sigue siendo un tema vasto por estudiar, puesto que se ha demostrado la heterogeneidad dentro de las líneas, probablemente a causa de la diversidad de protocolos para su derivación y mantenimiento (Cahan and Daley, 2013). Esta heterogeneidad puede manifestarse en respuestas diferenciales a las señales de diferenciación, lo que en un futuro causaría un sesgo en la obtención de linajes específicos durante los protocolos de terapia celular. Motivo por el cual es un gran desafío el identificar, analizar y describir las interacciones de las células pluripotentes en su nicho, así como con las capas alimentadoras o con los sustratos sintéticos para detectar las diferencias que podría haber en su potencial de autorrenovación y pluripotencia *in vitro*. A pesar que se ha demostrado la importancia de los miRNAs en la pluripotencia humana, poco se sabe de su dinámica de expresión cuando las hPSC crecen en diferentes condiciones de cultivo. En cambio, en el ratón se sabe que las mPSC en condiciones *naive* tienen un perfil de miRNAs totalmente distinto cuando están en condiciones *primed*, siendo un reflejo de las diferencias funcionales entre los dos tipos pluripotentes (Jouneau et al., 2012), pero ya hemos mencionado que en el humano aún no se ha determinado si hay diferentes estados de pluripotencia. Nosotros pensamos que antes de continuar con la caracterización del fenotipo *naive* humano, es necesario realizar estudios comparativos entre las actuales condiciones para cultivar hPSC (condiciones de capa nodriza versus libres de capa nodriza, de las que hablaremos en el siguiente apartado). Por ello, como añadidura a la derivación y caracterización de hESC sobre hAEC, también evaluaremos los niveles de algunos pluri-miRNAs bajo diferentes condiciones de cultivo.

HIPÓTESIS

Las células del epitelio amniótico humano pueden soportar la derivación y el mantenimiento de células troncales embrionarias humanas a partir de cigotos en segmentación de mala calidad.

OBJETIVOS

V.I. Objetivo general:

Obtener células troncales embrionarias a partir de cigotos en segmentación de mala calidad utilizando células epiteliales del amnios humano como capa nodriza.

V.II Objetivos particulares

1. Desarrollar un protocolo para la obtención de hESC a partir de cigotos en segmentación de mala calidad.
2. Caracterización de las hESC derivadas y mantenidas sobre una capa nodriza de hAEC para demostrar su pluripotencia.
3. Determinar la expresión relativa de los microRNAs relacionados con la pluripotencia en las hESC, al ser mantenidas bajo diferentes condiciones de cultivo.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Obtención de cigotos de mala calidad

Se obtuvieron cigotos en segmentación humanos descartados por sus características morfológicas y fisiológicas para ser usados en tratamientos de infertilidad en la Unidad de Reproducción Asistida del Instituto Nacional de Perinatología (INPer), previa firma del consentimiento informado de la pareja. La selección de los cigotos fue realizada por el embriólogo coordinador del laboratorio de Reproducción Asistida del INPer. El protocolo fue aprobado por el Comité de Investigación y Bioética del INPer (número de registro 212250-21071), además de cumplir con los lineamientos establecidos para la investigación con células troncales de la ISSCR (<http://www.isscr.org/home/publications/guide-clintrans>).

Obtención de la capa nodriza del epitelio amniótico humano

Para el aislamiento y cultivo de hAEC, utilizamos el protocolo de Miki y colaboradores (Miki et al., 2010). Se obtuvieron membranas fetales de mujeres con edad gestacional de 37-40 semanas, cuyo parto se realizó mediante cesárea y sin presentar antecedentes de infección alguna, previa autorización y firma de consentimiento informado en la unidad tocoquirúrgica del INPer. Las membranas fueron transportadas al laboratorio donde se procedió con el aislamiento de las hAEC bajo condiciones estériles. Una vez que el amnios se separó de forma mecánica del corion, la membrana se lavó con solución salina para remover los coágulos adheridos y se incubó durante 2 periodos de 45 minutos en tripsina/EDTA al 0.05% (Gibco, 25300-054) a 37°C sin agitación. Posteriormente, la tripsina fue inactivada con medio con FBS (Gibco, 16000-044). Las células obtenidas fueron centrifugadas por 10 min a 200 g a temperatura ambiente. Se resuspendió el pellet en medio de cultivo para hAEC [DMEM alto en glucosa (Gibco, 12430-054), 10%

FBS, aminoácidos no esenciales (Gibco, 11140-050), mercaptoetanol (Gibco, 21985-023), antibiótico-antimicótico (Gibco, 15240-062), piruvato de sodio (Gibco, 11360-070) y 10 ng/mL de EGF (Peprotech, AF-100-15)]. Las células fueron sembradas a una densidad de $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ y se mantuvieron en cultivo a 37°C hasta llegar a confluencia (5-7 días). Una vez que las células llegaron a confluencia, fueron despegadas con Tripsina/EDTA al 0.05%, centrifugadas a 200 g por 5 min, el medio se retiró y el pellet celular fue suspendido en 10 ml de medio hAEC para posteriormente contabilizarlas con una cámara de Neubauer.

Las células fueron de nuevo centrifugadas y resuspendidas en medio DMEM con 10% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, por sus siglas en inglés *Dimethyl Sulfoxide*) (D2650, Sigma) a una concentración de 3×10^6 células/ml y se almacenaron a -70°C . Para preparar una capa nodriza de hAEC, un criovial con 3×10^6 células fue descongelado a 37°C para suspender las células en 5 ml de medio hAEC tibio y se centrifugó a 200 g por 5 minutos a 4°C . Se retiró el medio y el pellet celular fue resuspendido en 12 ml de medio hAEC, se agregó 2 ml de la suspensión a cada pozo de una placa de cultivo de 6 pozos (Corning, 3516) a una densidad celular de $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ y se incubó a 37°C . Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% (2-3 días) fueron utilizadas como capa nodriza.

Obtención de la capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón inactivados

Los MEF fueron aislados a partir de embriones de E12.5. Las madres preñadas fueron sacrificadas por dislocación cervical y se extrajeron los embriones los cuales fueron colectados en PBS (del inglés *Phosphate Buffered Saline*) 1X sobre hielo para remover las estructuras extraembrionarias, la cabeza y los órganos intratorácicos e intraabdominales. El tejido restante fue macerado para su incubación en Tripsina/EDTA al 0.25% (Gibco, 25200-056) a 37°C por 30 min e inactivación con DMEM + 10% FBS. Posteriormente, se centrifugó a 200 g por 5 minutos a 4°C , retirándose el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en 2 ml de medio por cada embrión procesado para obtener una suspensión celular. Después se transfirieron 2 ml de la suspensión a una caja de cultivo de 55 cm^2 (430167,

Corning) con 5 ml de medio para MEF [DMEM, 10% FBS, aminoácidos no esenciales y penicilina/estreptomina (Gibco, 15070-063)] para incubarse a 37°C con 5% CO₂ hasta llegar a confluencia (1-3 días). Una vez que las células llegaron a confluencia fueron tratadas con tripsina/EDTA 0.05% por 5 minutos, se agregó DMEM con FBS 10% para inactivar y se centrifugó a 200 g por 5 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en medio de congelación (DMEM con FBS 10% más 10% de DMSO) y las células fueron congeladas en crioviales en nitrógeno líquido para su uso posterior. Para preparar MEF inactivados (iMEF), se descongeló un criovial a 37°C, las células fueron transferidas a un tubo cónico de 50 ml con 10 ml de medio MEF y centrifugadas a 200 g por 5 minutos a 4°C. Los MEF fueron sembrados en 4 placas de 55 cm² con 7 ml de medio MEF por placa, a 37°C con 5% CO₂ y se cambió el medio cada tercer día hasta llegar a confluencia (3-5 días). Se retiró el medio y se hicieron 3 lavados con 7 ml de PBS 1X por placa; las células fueron tratadas con 10µg/ml de mitomicina C (Sigma, M4287) para inactivar el ciclo celular y se incubó por tres horas a 37°C. Posteriormente, se aspiró el medio y las células inactivadas fueron lavadas dos veces con PBS 1X, se hizo un período de incubación de 5 minutos con tripsina/EDTA 0.05% y se agregó medio DMEM con 10% FBS para inactivarla. Las células despegadas se centrifugaron a 200 g por 5 minutos a 4°C, el pellet se resuspendió en medio MEF y se contabilizó para sembrar 5x10⁴ de iMEF por cm² en placas de seis pozos previamente tratadas con gelatina porcina al 0.1% (Sigma, G1890). 24 horas después los iMEF se habían adherido formando una monocapa la cual se utilizó como capa nodriza.

Derivación de hESC a partir de embriones de mala calidad

Para lograr el primer objetivo, cigotos arrestados de mala calidad fueron tratados de 30 segundos a 2 minutos con solución ácida de Tyrode (T1788, Milipore) para remover la zona pelúcida. El proceso de degradación de la zona pelúcida fue observado bajo un estereoscopio Olympus (SZX16) en campo claro. Posteriormente, las células fueron sembradas sobre una capa de hAEC en placas de cuatro pozos (14444, NUNC) con medio de derivación de hESC [DMEM Knockout

(10829-018, Gibco), 17% KOSR, (10828-028), 3% FBS certificado para células troncales (10439-024, Gibco), L-glutamina (25030-081, Gibco), aminoácidos no esenciales, mercaptoetanol y 10 ng/ml de FGF2 (100-18B, Peprotech) y se incubaron a 37°C en condiciones hipóxicas (5% CO₂ y 5% O₂). El cambio de medio fue cada 24 horas. Al cabo de dos semanas, las colonias que crecieron se pasaron mecánicamente utilizando agujas 27G (302485, BD) con la ayuda del estereoscopio Olympus en campo oscuro hacia una nueva capa de células nodriza hAEC y así sucesivamente por varios pases hasta la obtención de una línea de hESC.

Mantenimiento de hESC en condiciones de capa nodriza

Las colonias de la recién línea hESC se pasaron de forma mecánica durante los primeros 5 pases y de forma enzimática con Acutasa (A1110501, StemPro) en los pases subsecuentes. A partir del pase 5 las células se cultivaron en medio de mantenimiento hESC [DMEM/F12 (11330-032), 20% de KOSR, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, mercaptoetanol y 4 ng/mL de FGF2] en condiciones hipóxicas. Las líneas H1 (WiCell, WA01) y H9 (WiCell, WA09) de hESC fueron utilizadas como grupo control. De esta forma, los viales fueron descongelados y cada línea se sembró en un pozo de 9.6 cm² sobre iMEF a 37°C en condiciones de hipoxia. Cuando las colonias crecieron (7 días aproximadamente), la H1 y H9 fueron pasadas a nuevos pozos ya sea sobre hAEC o iMEF, el medio se cambió diariamente y cada 5-7 días se hizo el pase en ambas condiciones. Durante los primeros 5 pases el procedimiento fue mecánico, mientras que para los subsecuentes pases se usó la enzima Acutasa. Para la realización de los pases mecánicos, el medio fue aspirado, se agregó 1ml de medio DMEM/F12 y con una aguja de 27G las colonias fueron cortadas en trazos perpendiculares y horizontales, todo ello bajo el estereoscopio Olympus de campo oscuro. Los cúmulos celulares fueron despegados con una punta de plástico de 1000 µl y trasladados con el medio de cultivo a un tubo cónico de 15 mL. Las células se centrifugaron a 200 g por 3 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Finalmente, el pellet fue resuspendido en

medio de mantenimiento fresco y se incubó a 37°C, 5% CO₂, 5% O₂ sin mover las cajas por 48 h.

Para el pase enzimático, cada pozo de células fue lavado con DMEM/F12 y se adicionó 1 ml de Acutasa para su incubación a 37°C. Bajo el microscopio estereoscópico se revisó cada 5 minutos que las colonias comenzaran a disgregarse como célula única. Las células despegadas se colectaron en un tubo cónico de 15 mL y se centrifugaron a 200 g por 3 minutos a 4°C. Finalmente, las células se sembraron sobre las capas nuevas de hAEC o iMEF a 37°C en condiciones hipóxicas y no se movieron por 48 h.

Detección de fosfatasa alcalina

Se utilizó un kit de sustrato BCIP/NBT (del inglés 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate) / nitro blue tetrazolium) el cual produce una reacción índigo en presencia de FA activa. Se siguió el procedimiento recomendado por el proveedor (SK-5400, Vector Laboratories) para la preparación y mezcla de los reactivos. Para preparar una solución de trabajo del sustrato, a 5 ml de 100 mM Tris-HCl (pH 9.5) con Tween 0.1% (P1379, Sigma) se añadió 84 µl del Reactivo 1, 40 µl del Reactivo 2 y 80 µl del Reactivo 3. Las colonias se incubaron con la solución del sustrato de 10 a 30 min a temperatura ambiente, hasta observar que las colonias adquirieran una coloración índigo. Se hizo tres lavados con PBS 1x para retirar el sustrato, las colonias fueron observadas bajo un microscopio Zeiss Axio Vert.A1 y se obtuvieron micrografías en formato RGB con una cámara AxioCam ICC5 de 5 megapíxeles.

Análisis del cariotipo

Para determinar si las hESC no tienen alteraciones cromosómicas, se llevó a cabo un análisis del cariotipo *in situ* mediante la técnica G-banding para colorear las bandas de los cromosomas.

Las células fueron sembradas sobre cubreobjetos (Corning, 2935) previamente tratados con gelatina porcina al 0.1% y se cultivaron con medio de mantenimiento hESC sin FGF2. Al cabo de 48 horas, se retiró el medio y las células fueron lavadas con PBS al 1X. Se añadió medio con colchicina (0.1 µg/ml) (Life Technologies, 15212-012) al cultivo y se dejó incubar por 45 min a 37°C. Al finalizar el período de incubación, el medio fue retirado y se hizo otro lavado con PBS 1X. Las células fueron tratadas con una solución hipotónica (citrato de sodio al 0.8%) por un período de 30 min a 37°C. Se retiró la solución hipotónica y las células fueron fijadas con metanol: ácido acético glacial a una relación de 3:1 por 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se retiró la solución fijadora y se hicieron otros tres períodos de fijación de 20 min cada uno. Los cubreobjetos con las células fijadas fueron colocados toda la noche en una cámara Thermotron a 60°C. Al día siguiente, las muestras fueron embebidas en una solución de Tripsina al 0.1% por 30 segundos y se hicieron dos lavados con PBS 1X. Las células fueron teñidas con una solución de Giemsa [2 ml de Gurr's Giemsa Stain (Life Technologies, 35086HE), 4 ml Harleco-Wright Giemsa (WWR, 15204-232) y 74 ml de Gurr's Buffer (Life Technologies, 10582-013)] por 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavó con agua destilada y se dejó secar dentro de una campana de flujo laminar. Finalmente, las muestras fueron cubiertas con medio de montaje (Polysciences, 18606) y portaobjetos (63411-01, Electron Microscopy Sciences). Los cromosomas fueron observados utilizando una lente de inmersión en aceite 100x a campo claro, para detectar al menos 20 metafases. La interpretación de los resultados se llevó a cabo en conjunto con un experto en citogenética del Departamento de Genética del INPer.

Retrotranscripción (RT) y Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

El RNA de los cultivos celulares se extrajo con el método de fenol-cloroformo (Trizol). Para ello, las células fueron despegadas con 1 ml de Acutasa por 5 minutos, colectadas en tubos Eppendorf de 1.5 ml y centrifugadas a 200 g por 5 minutos a 4°C. A cada pellet celular se le añadió 100 µl de Trizol (Ambion, 10296028). Las

muestras fueron mezcladas de forma vigorosa utilizando un vortex por 60 segundos y se incubaron 15 minutos a 30°C. Después, a cada muestra se le adicionó 20 µl de cloroformo (Sigma, 650498), se volvió a mezclar con un vortex por 15 segundos y se incubó 3 minutos a 30°C. Las muestras fueron centrifugadas por 15 minutos a 1700 g a 4°C para obtener la fase acuosa, la cual fue transferida a tubos nuevos. Se agregó un volumen igual a la fase acuosa recuperada de isopropanol (Sigma, I9516) y se mezcló con el vortex por 15 segundos. Las muestras fueron incubadas por 10 minutos a 30°C y centrifugadas a 1700 g por 10 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se hizo un lavado con 1ml de etanol puro (Sigma, E7023). Se mezcló con el vortex por 15 segundos y se volvió a centrifugar a 1700 g por 5 minutos a 4°C. Se retiró el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol pero esta vez a una concentración del 75%. Se volvió a centrifugar y se retiró el sobrenadante. Las muestras se dejaron secar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente cada muestra de RNA fue resuspendida en 40 µl de agua inyectable e incubadas por 10 minutos a 60°C.

La pureza del RNA fue determinada por la relación 260/280 nm (≥ 1.6) usando un espectrofotómetro (Glomax Multi Microplate Multimode, Promega) y la integridad del RNA fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%.

La transcripción reversa (RT) se llevó a cabo con el kit Reverse Transcription System (Promega, A3500). De cada muestra se tomó el volumen necesario para 1 µg de RNA y se mezcló con 2 µl del Buffer de la transcriptasa reversa 10X, 4 µl de MgCl₂ 25 mM, 2 µl de la mezcla de desoxinucleótidos (dNTPs) 10 mM, 0.5 µl del inhibidor de ribonucleasa, 2 µl de los primers Oligo-dT, 0.2 µl de la enzima transcriptasa reversa y el volumen necesario de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó a 45°C durante 30 minutos, seguido de un período de inactivación de la enzima a 95° por 5 minutos, para finalizar con 5 minutos a 4°C. El DNA complementario (cDNA) se almacenó a -20°C para su uso posterior. Una vez obtenido el cDNA, se llevó a cabo la amplificación utilizando primers específicos para cada gen (ver Tabla 3) y el kit Access PCR System (Promega, A1250). Para la reacción de PCR se tomó el volumen necesario para 1 µg de cDNA y se añadió en una solución de reacción que contenía 5 µl de Flexi

Buffer Gotaq 5X, 2.5 µl de MgCl₂ 2.5 mM, 1 µl de dNTPs 10 mM, 1 µl de primer sentido (25 pmol), 1 µl de primer antisentido (25 pmol), 0.40 µl de la DNA polimerasa GoTaq® Flexi (5 u/µl) y el volumen necesario de agua libre de nucleasas, para un volumen final de 25 µl.

La amplificación siempre incluyó controles negativos en donde se omitió el cDNA para descartar falsos positivos, así como controles positivos (muestras H1 y H9) para validar el experimento. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 95° por 15 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificación [desnaturalización a 95°C por 60 segundos, alineación por 60 segundos cuya temperatura fue determinada de acuerdo a los primers utilizados (ver Tabla 3), elongación a 72° C por 60 segundos] y una extensión final a 72°C por 10 minutos.

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en gel de agarosa al 2% y las imágenes capturadas por un analizador MiniBis Pro (Bio-Imaging System), usando el programa Gel Capture.

Referencia NCBI	GEN	PRIMERS	Tm C°	Tamaño
NM_002701	OCT4 (POU5F1)	F-GAGGAGTCCCAGGACATCAA R- GTGGTCTGGCTGAACACCTT	57.0	149
NM_024865	NANOG	F- TGCAAATGTCTTCTGCTGAGAT R- GTTCAGGATGTTGGAGAGTTC	54.0	287
NM_003106	SOX2	F- GCCGAGTGGAAACTTTTGTG R- GTTCATGTGCGCGTAACTGT	55.2	264
NM_001314052	KLF4	F- GATGGGGTCTGTGACTGG AT R- CCCCCAACTCACGGATATAA	55.0	134
NM_174900	REX1	F- GCGTACGCAAATTAAGTCCAGA R-CAGCATCCTAAACAGCTCGCAGAAT	57.5	307
NM_199286	DPPA3	F- GTTACTGGGCGGAGTTCGTA R- TGAAGTGGCTTGGTGTCTTG	56.0	168
NM_020436	SALL4	F- TGCAGCAGTTGGTGGAGAAC R- TCGGTGGCAAATGAGACATTC	56.8	68
NM_005996	TBX3	F- GCAGCTTTCAACTGCTTCG R- TGAGGTTGATGTCCCTACA	55.0	67
NM_016270	KLF2	F- CTACACCAAGAGTTCGCATCTG R- CCGTGTGCTTTCGGTAGTG	55.8	137
NM_002007	FGF4	F- CTACAACGCCTACGAGTCCTACA R- GTTGCACCAGAAAAGTCAGAGTTG	57.2	371
NM_001485	GBX2	F- CACCACGTCTACGGGCAAGAA R- AGCTGCTGATGCTGACTTCTGA	59.5	309
NM_000222.2	KIT	F-GGCGACGAGATTAGGCTGTT R-CATTCGTTTCATCCAGGATCTCA	56.0	76
NM_003641	IFITM1	ATGTCGTCTGGTCCCTGTTC GTCATGAGGATGCCCAGAAT	55.8	184
NM_014553	TFCP2L1	F-CCCCTGCAATATGTGTTGTG R-AAAGTCTCCCAGCTTCCGAT	55.0	129
NM_002046	GAPDH	F-AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC R-CCTGGAAGATGGTGATGGGAT	56.8	229

Tabla 3. Secuencias de primers utilizados para la identificación de genes relaciones con la pluripotencia humana.

Immunohistoquímica

Las células cultivadas fueron fijadas con PFA al 4% y lavadas 3 veces con PBS 1X para posteriormente permeabilizarlas con Tritón (Sigma, T8787) al 0.3% por 30 minutos, seguido de un bloqueo con albúmina al 5% por 30 minutos. Una vez hecho esto, las células se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos primarios en solución de bloqueo (Tabla 4). Al día siguiente se lavaron 3 veces con PBS 1x y se adicionó los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos [Alexa 488 (Thermo Fisher, A11029), Alexa 596 (Thermo Fisher, A11036)] en solución de bloqueo a una concentración de 1:1000 y se incubó una hora a temperatura ambiente. Se hicieron 3 lavados con PBS 1X y se adicionó una solución con 4',6-diamino-2-fenilindol en PBS 1x (5 µg/ml) (D1306, Thermo Fisher) para teñir los núcleos. Como control negativo, muestras de hESC fueron incubadas únicamente con el anticuerpo secundario. Las tinciones fueron visualizadas bajo un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX-81) y se obtuvieron fotografías con una cámara CCD (Hamamatsu, ORCA-Flash). A su vez, para establecer la coexpresión de marcadores nucleares, se adquirieron imágenes mediante microscopía confocal (LSM710, Zeiss). Una vez obtenidas, se realizó el empalme de las imágenes con ayuda del programa Zeiss Zen Pro.

Anticuerpo primario	Hospedero	Concentración	Marca
OCT4	Ratón	1:100	611202, BD
OCT4	Conejo	1:400	19857, Abcam
NANOG	Conejo	1:500	500-P236, Peprotech
SOX2	Conejo	1:1000	AB5603, Millipore
SSEA4	Ratón	1:250	16287, Abcam
TRA 1-60	Ratón	1:500	16288, Abcam
E-CADHERINA	Ratón	1:100	610181, BD
β -III-TUBULINA	Ratón	1:2000	410P, Covance
PAX6	Conejo	1:200	154253, Abcam
BRACHURY	Conejo	1:100	20680, Abcam
SOX17	Ratón	1:100	84990, Abcam
FOXA2	Conejo	1:1000	40874, Abcam

Tabla 4. Lista de anticuerpos primarios utilizados en la técnica de inmunofluorescencia.

Diferenciación in vitro

Para la formación de EB, las células hESC fueron despegadas de forma mecánica con una aguja G27 y transferidas a placas no adherentes de 57 cm² (Corning, CLS3262) en medio de mantenimiento hESC sin FGF2. Las células fueron cultivadas en suspensión durante 7 días para permitir la formación de EB y el medio se cambió diariamente. Al día 8, los EB fueron transferidos a placas previamente tratadas con 0.1% de gelatina porcina, y se mantuvieron en cultivo (DMEM/F12, L-glutamina, aminoácidos no esenciales y 20% FBS) por dos semanas, con cambio de medio cada tercer día. Para finalizar, los EB fueron fijados para su posterior tratamiento con inmunohistoquímica para detectar marcadores específicos de las tres capas embrionarias (Tabla 4).

Ensayo de formación de teratomas

Se evaluó la capacidad *in vivo* de diferenciación a través de la formación de teratomas en ratones inmunodeficientes de la cepa C.B-17/lcrHsd-Prkdcscid. Los

animales fueron criados en el bioterio del Instituto de Neurobiología-UNAM (INB), en un ambiente libre de patógenos con condiciones de temperatura, luz y humedad controladas. El agua y el alimento fueron *ad libitum* en condiciones estériles. Cabe mencionar que el cuidado de los animales, así como la experimentación con ellos se llevó a cabo con la aprobación del Comité de Ética e Investigación del INB (proyecto 70) y bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Animales de 8 semanas de edad fueron anestesiados en una cámara de anestesia con isoflurano a una dosis de inducción al 3% y de 1.5 % para mantenimiento en un mezcla de 95% O₂ y 5% CO₂. Se colocó al ratón en posición decúbito prono y previa asepsia-antisepsia de la región se realizó una incisión vertical en la línea media de la piel y con las tijeras se cortó el tejido conectivo de los músculos de la pared abdominal. Después, para sacar el riñón derecho, con las tijeras se perforó perpendicularmente la pared abdominal. Una vez descubierto el riñón, por medio de una aguja Hamilton y de un microinyector se inyectó 1×10^6 células en 30 μ l de DMEM/F12: Matrigel directamente en la cápsula renal. Por último, se regresó el riñón a su sitio anatómico y se procedió al cierre de los planos quirúrgicos mediante sutura de nylon 3-0. Los animales estuvieron en monitoreo continuo y bajo un tratamiento con antibiótico para evitar infecciones. Seis semanas después fueron sacrificados por dislocación cervical y se buscó estructuras ectópicas adosadas al riñón. Los tumores fueron fijados con PFA al 4%, se montaron en parafina y finalmente se analizaron mediante histología tinción de hematoxilina-eosina para revisar los tipos celulares derivados de las capas embrionarias. Un médico especialista en anatomía patológica determinó los tejidos diferenciados en el teratoma.

Obtención de medio condicionado de las capas nodrizas

La obtención del medio condicionado de los MEF inactivados (MEF-CM) se llevó a cabo de acuerdo a reportes previos, y se usó como referencia para la

obtención del medio condicionado de hAEC (hAEC-CM) (Xu et al., 2001). Brevemente, las células fueron sembradas en placas de 55 cm² y se cultivaron con 10 ml de medio de mantenimiento hESC. El medio condicionado de ambos tipos celulares fue colectado cada 24 horas por siete días consecutivos, el cual se congeló a -80°C hasta su posterior uso. Al descongelarlo para su uso, al medio se le añadió 6 ng/ml de FGF2 y se filtró a través de una membrana con poros de 0.2µm de diámetro.

Mantenimiento de las líneas hES en condiciones libres de capa nodriza

Para estas condiciones se usó de referencia reportes previos (McElroy and Reijo Pera, 2008). Brevemente, para preparar placas tratadas con Matrigel, dicha matriz extracelular sintética fue resuspendida con base en el factor de dilución del certificado de análisis dependiendo del lote; posteriormente se agregó 1 ml de esta dilución a cada pozo de 9.6 m² de área y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C en condiciones estériles. El Matrigel fue retirado y se agregó 1.5 ml de MEF-CM o hAEC-CM a cada pozo. Para adaptar las líneas hESC de condiciones de capa nodriza a condiciones de Matrigel, las colonias sobre MEF o hAEC fueron despegadas de forma mecánica y sembradas en los pozos tratados con Matrigel, y se agregó 1.5 ml de medio condicionado con el inhibidor de Rho-cinasa (ROCK) (Y27632, Stem Cell Technologies) a una concentración 10 µM para incrementar la sobrevivencia celular. En los pases subsecuentes, una vez que las células llegaron a confluencia, se aspiró el medio y las células fueron incubadas con 1 ml de Acutasa/pozo a 37°C durante 3-10 min, revisando que las células comenzaran a despegarse, para después colectarlas en un tubo cónico de 15 ml. Los pozos se limpiaron con 1 ml de medio DMEM/F12 para recuperar células restantes y se centrifugó a 200 g por 3 min a 4°C. Finalmente, las células fueron sembradas sobre placas tratadas con Matrigel, utilizando MEF-CM o hAEC-CM con Y27632, a 37°C en condiciones hipóxicas y no se movieron por 48 h.

Extracción del DNA y análisis Epi-Pluri-Score

Brevemente, se aisló el DNA genómico utilizando el High Pure FFPE DNA Isolation Kit de acuerdo a instrucciones del proveedor (11732668001, Roche). Las muestras fueron enviadas a Alemania para el análisis del Epi-Pluri-Score por parte de la empresa Cygenia, en donde fueron tratadas con bisulfito de sodio utilizando el kit EZ DNA Methylation (D5001, Zymo Research), posteriormente las regiones de interés de los genes *ANKRD46*, *C14ORF115* y *OCT4* fueron amplificadas por PCR utilizando primers específicos (Tabla 5). A partir de estos productos amplificados se preparó DNA lineal de una sola cadena utilizando el PyroMark Q96 Vacuum Prep Workstation (Qiagen). Finalmente, la reacción de secuenciación fue llevada a cabo con un primer de secuenciación específico para cada gen (Tabla 5), en un PyroMark Q96 ID System y se analizó con el programa PyroMark CpG SW 1.0.

El puntaje del Epi-Pluri-Score para cada muestra se obtuvo de la combinación de los niveles de metilación del DNA de los sitios CpG ANKRD46 y C14orf115, en conjunto con un sitio CpG en el gen POU5F1 que fue utilizado para discriminar muestras pluripotentes de no pluripotentes (Lenz et al., 2015).

Los resultados del análisis fueron representados en un esquema en donde se mostró la clasificación de las muestras analizadas al compararlas con una base de datos de células pluripotentes o células no pluripotentes.

Primer	CpG-ID	Secuencia
ANKRD46-seq	ANKRD46 (cg23737055)	5'- CACAATTTTAATACTTTCCC
ANKRD46-for		5'- Biotin-AGGGGAGGGGTTAGATAGGGGTAG
ANKRD46-rev		5'- CCACAATTTTAATACTTTCCCTAATTCAAAAC
C14ORF115-seq	C14ORF115 (cg22247240)	5'- CCAAACCAATTTTCATATC
C14ORF115-for		5'-Biotin -GATTTTTGGGGGGAGTGGTTTAAAGT
C14ORF115-rev		5'- CCACCTTCCAACCTAAAACATTTAAATCACC
POU5F1/OCT4-seq	POU5F1/OCT4 (cg13083810)	5'- TAGTTTTTTAAATTTATTGAATG
POU5F1/OCT4-for		5'-GATTTTTGGTATTGTGTTTTAGGGGTTAGTTA
POU5F1/OCT4-rev		5'-Biotin-TAAACCCAATCAATCCAAATCTAATCCC

Tabla 5. Primers para pirosecuenciación de tres regiones específicas CpG para ANKRD46, C14ORF115 y POU5F1 (OCT4) para en análisis Epi-Pluri-Score.

Diseño de primers para la detección de miRNAs por RT y PCR

La identificación de miRNAs en el medio de cultivo de las hAEC se evaluó mediante la utilización de primers específicos para las reacciones de RT y de PCR los cuales se diseñaron de acuerdo a estudios previos (Chen et al., 2005a). Para cada miRNA se utilizó un primer específico para la RT, el cual se compone de un “stem-loop” base de 44 nucleótidos, en donde los que se ubican en la posición 1-14 del extremo 5' forma una doble cadena con los nucleótidos 31-44 del extremo 3', dando lugar a la estructura del tallo, mientras que los nucleótidos intermedios constituyen el asa (Figura 5). La especificidad para cada primer RT está determinada por los últimos seis nucleótidos del extremo 3', que corresponden a la secuencia complementaria de los últimos seis nucleótidos del extremo 3' de cada miRNA (Tabla 6).

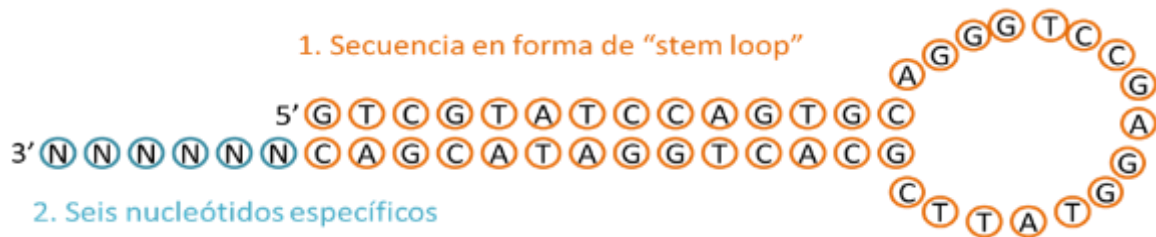


Figura 5. Esquema representativo del primer "stem-loop" diseñado para la RT. La secuencia de 44 nucleótidos (representada por el color naranja) forma una estructura de tallo-asa, mientras que en el extremo 3' los últimos seis nucleótidos (en azul) son complementarios para cada miRNA.

miRNA	Secuencia específica para el primer "stem loop" RT
hsa-miR-92a-3p	ACA GGC
hsa-miR-92b-3p	GGA GGC
hsa-miR-302a-3p	TCA CCA
hsa-miR-302b-3p	CTA CTA
hsa-miR-302c-3p	CCA CTG
hsa-miR-302d-3p	ACA CTC
hsa-miR-200c	TCC ATC

Tabla 6. Secuencias específicas para la RT. Los últimos seis nucleótidos complementarios y anti-sentido de cada microRNA se unen en el extremo 3' del miRNA específico.

Identificación de miRNAs relacionados con la pluripotencia mediante RT y PCR

Las células hAEC en P1 fueron cultivadas en medio de mantenimiento hESC, y tanto las células como el medio fueron colectados por separado. El medio fue filtrado a través de una membrana con poros de 22 µm de diámetro para eliminar restos celulares. Para la extracción de RNA enriquecido con miRNAs a partir de las células, se utilizó la técnica de Trizol con la adición de glucógeno para la precipitación de RNAs pequeños. Para el caso del medio de cultivo, las muestras

fueron purificadas y concentradas a partir de columnas del kit RNA Clean & Concentrator^{TM-5}, siguiendo el procedimiento recomendado por el proveedor (R1016, Zymo Research). Posteriormente, se realizaron las RT específicas para cada miRNA, seguidas de una PCR en punto final; las condiciones de amplificación fueron diferentes a las mencionadas para los mRNAs: 95° por 10 minutos seguidos de 35 ciclos de amplificación (95°C para desnaturalización por 30 s, 58°C de alineación por 10 s y 72° C de elongación por 20 segundos).

Para la PCR, los primers fueron diseñados con las siguientes características: el “forward” (sentido) contiene en su extremo 3’ la secuencia exacta correspondiente a los primeros 9-12 nucleótidos del miRNA y en el extremo 5’ una secuencia rica de citosinas y guaninas necesarias para aumentar el punto de fusión (58°C) a la cadena del DNA complementario (cDNA). La secuencia del “reverse” (antisentido) corresponde a los últimos 15 nucleótidos complementarios y anti-sentido de la secuencia del primer universal tipo “stem-loop”, de manera que es utilizado para todas las reacciones de PCR sin importar el miRNA (Tabla 7).

miRNA	Forward	Reverse
hsa-miR-92a-3p	<u>CGG CCG</u> TAT TGC ACT TGT CC	GTG CAG GGT CCG AGG T
hsa-miR-92b-3p	<u>CGG CCG</u> TAT TGC ACT CGT CC	
hsa-miR-302a-3p	<u>CGG CCG</u> TAA GTG CTT CCA	
hsa-miR-302b-3p		
hsa-miR-302c-3p		
hsa-miR-302d-3p	<u>CGG CCG</u> TAA GTG CTT CCA TGT	
hsa-miR-200c	<u>CGG CCG</u> TAA GTG CTT CCA TGC	

Tabla 7. Secuencias de “primers” para la reacción de PCR. En el extremo 3’ de cada “forward” se agregó la secuencia CGGCCG para aumentar la temperatura de fusión. El “reverse” es una secuencia universal para todos los miRNAs dado que reconoce el “stem loop” que se diseñó para la RT.

Secuenciación de los productos de miRNAs de PCR punto final

Una vez que se realizaron las PCR de punto final para la identificación de los miRNAs en las células hAEC, las bandas obtenidas en los geles de electroforesis fueron cortadas y purificadas con el kit Zymoclean™ Gel DNA Recovery (D4001, ZymoResearch). Las muestras purificadas de cDNA fueron clonadas en el vector pGEM-EASY (Promega) y posteriormente secuenciadas por el método de terminación con el Big Dye de Applied Biosystems y en un secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer en la Unidad de Proteogenómica del INB.

Cuantificación de los niveles de miRNAs por qPCR

Mediante PCR cuantitativa (qPCR) se determinaron los niveles de los miRNAs candidatos en las hAEC y se compararon con el cocultivo de las hAEC con las hESC. Los grupos experimentales se muestran en la Figura 6. Se determinó la expresión relativa mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para normalizar las muestras, se utilizó como control el Spike-In miR-39 de *C. elegans*, el cual se agregó a cada muestra previo a la extracción del RNA (Li and Kowdley, 2012). Los valores obtenidos se calibraron utilizando las líneas que se mantuvieron sobre la capa MEF.

Para cada miRNA, previo a la reacción de qPCR se realizó una preamplificación a partir de 800 ng de cDNA; las condiciones fueron las siguientes: 95° C por 10 minutos seguidos de 15 ciclos de amplificación (95°C para desnaturalización por 30 segundos, 58°C de alineación por 10 segundos y 72° C de elongación por 20 segundos). A partir de la preamplificación se tomó 1 µg de cDNA preamplificado por muestra, al cual se le añadió 12.5 µl de KAPA SYBR FAST qPCR Master Mix 2X (KM4100) con 1 µl de primer sentido (20 pmol) y 1 µl de primer antisentido (20 pmol) y H₂O libre de RNAsas para tener un volumen final de 25 µl por reacción. Las condiciones de la qPCR fueron las siguientes: un período inicial de desnaturalización a 95° por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de amplificación (95°C de desnaturalización por 5 s, 60°C de elongación por 20 s, y 72°C de elongación por 5 s).

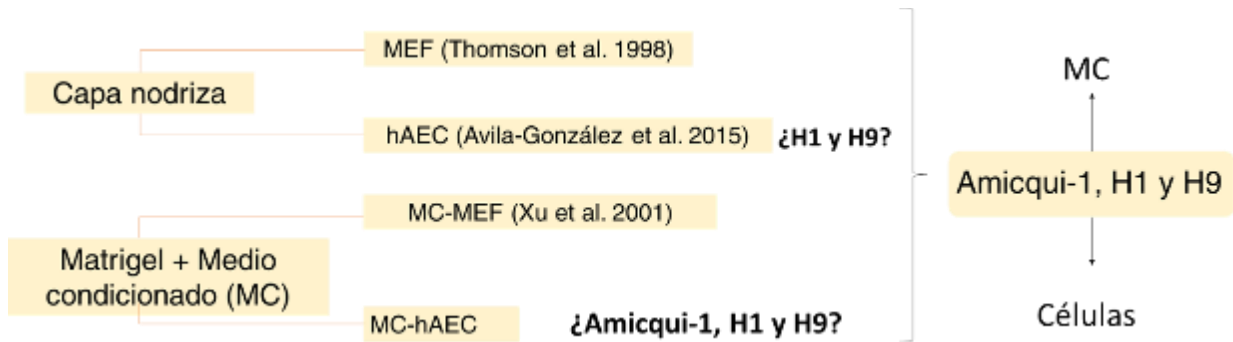


Figura 6. Grupos experimentales para determinar la expresión relativa de miembros de las familias miRNAs relacionados con la pluripotencia. El símbolo ✓ significa que se ha demostrado la presencia de miRNAs (Bar et al. 2008; Huang et al. 2014), mientras que el signo ? significa que aún no se ha caracterizado

Validación del método $2^{\Delta\Delta CT}$

Para estandarizar y validar el método de cuantificación relativa por qPCR se realizó un rango dinámico para cada miRNA, con este fin se utilizaron concentraciones conocidas de cDNA (1000, 100 y 10 ng) por duplicado y se procesaron bajo las condiciones de temperatura y tiempos previamente mencionadas. Una vez obtenidos los datos se obtuvieron los valores de ΔCT , mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta CT = CT_{miR-X} - CT_{miR-39}$$

Donde CT_{miR-X} es el ciclo umbral obtenido en la reacción de qPCR para un determinado miRNA, y CT_{miR-39} es el ciclo umbral del control exógeno que se utiliza para normalizar los datos, en este caso, el miR-39 de *C. elegans*.

Después de haber obtenido los valores de ΔCT se procederá a calcular el valor de $\Delta\Delta CT$, con la fórmula:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_X - \Delta CT_{H9/H1}$$

Donde ΔCT_X es ΔCT para cada muestra a analizar mientras que $\Delta CT_{H9/H1}$ es el ΔCT de las líneas H1 y H9 utilizadas como control positivo. Una vez obtenido el

valor de $\Delta\Delta CT$, se calculó el $2^{-\Delta\Delta CT}$ y los datos se mostraron como expresión relativa para cada miRNA analizado.

RESULTADOS

Derivación de una línea de hESC utilizando hAEC como capa nodriza

64 embriones de mala calidad (Figura 7) fueron cultivados sobre una capa nodriza hAEC; 48 h después se observó una masa de células compactas rodeada de otro tipo de células mucho más alargadas (denominado crecimiento externo, del inglés *outgrowth*) que correspondería a células del trofoblasto. La estructura compacta parecida a la ICM ha sido reportada como un paso intermedio entre el cultivo del embrión y la derivación de hESC, llamada PICMI (del inglés *post ICM intermediate*) (O'Leary et al., 2012) (Figura 8). De cinco PICMI que emergieron del total de los 64 embriones, solamente uno sobrevivió a los subsecuentes pases (P1-P5) formando colonias, las cuales fueron pasadas de forma mecánica y expandidas en una relación 1:2. A partir del P6, se utilizó Acutasa para disgregar las colonias así como la adición de Y27632 (inhibidor específico de la proteína cinasa dependiente de Rho), lo que permitió la sobrevivencia de las hESC al bloquear la apoptosis inducida por la disociación de las colonias al momento de hacer los pases (Ohgushi et al., 2010).

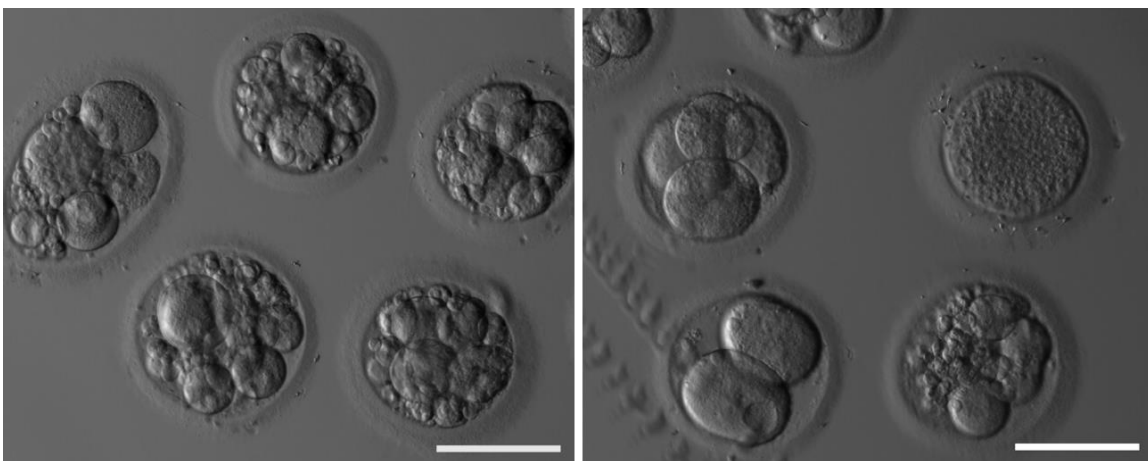


Figura 7. Micrografía a campo claro (10x) de cigotos de mala calidad descartados de la Unidad de Reproducción Asistida. Barra de calibración 500 μ m.

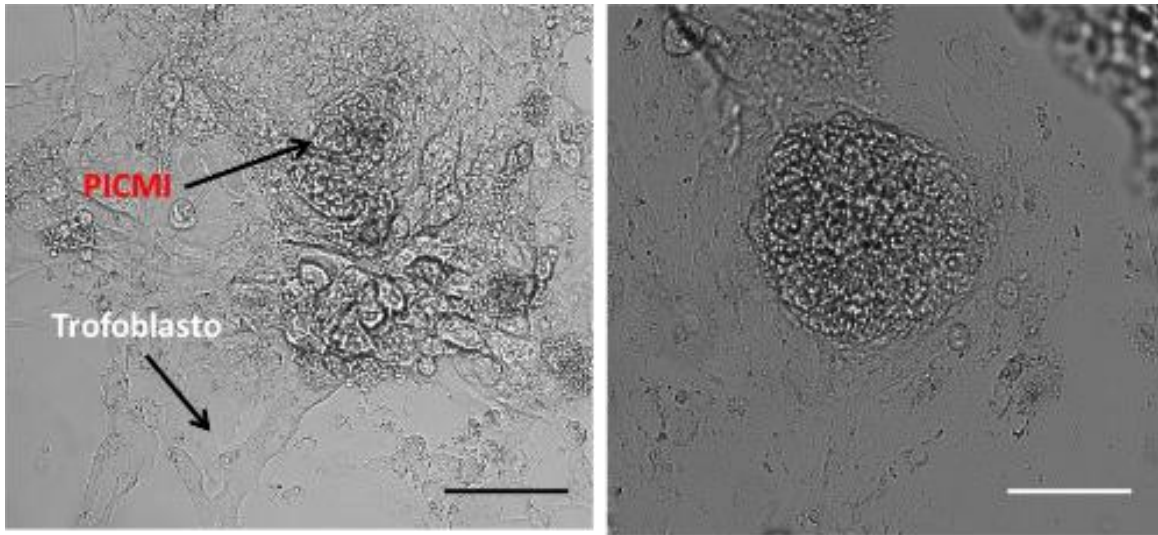


Figura 8. El inicio de la derivación de una línea hESC a partir de embriones de mala calidad. Magnificaciones (10x) a campo claro de un embrión de mala calidad cultivado sobre capa nodriza hAEC. Izquierda, se puede apreciar la formación del PICMI rodeado de crecimiento externo que correspondería al trofoblasto. Derecha, PICMI en crecimiento después del primer pase (P1) sobre una nueva capa nodriza hAEC. Barra de calibración, 100 µM.

Morfología de las hESC

La morfología típica de una colonia indiferenciada de hESC de la línea H1 o H9 sobre una capa nodriza consiste en células estrechamente compactas, con los bordes definidos y con núcleo grande (Figura 9). Nuestras colonias que derivamos de un embrión de mala calidad presentaron una morfología similar a las líneas H1 y H9 (Figura 10), la cual se ha mantenido hasta el P50, lo que sugeriría que las hAEC soportan la derivación y el mantenimiento de colonias con morfología de hESC. Esta nueva línea fue bautizada como Amicqui-1, palabra derivada del náhuatl que significa “cosa inmortal”.

Debido a que la H1 y H9 se mantienen de forma rutinaria sobre una capa de MEF, nuestra nueva línea fue cultivada bajo las mismas condiciones y como se puede observar en la Figura 10B, las colonias de Amicqui-1 poseen la misma morfología que las colonias de las líneas H1 y H9 bajo las mismas condiciones de

cultivo. A partir de este momento comenzaremos a definir nuestra línea derivada como Amicqui-A cuando se mantuvo sobre hAEC, y como Amicqui-M cuando se utilizaron iMEF.

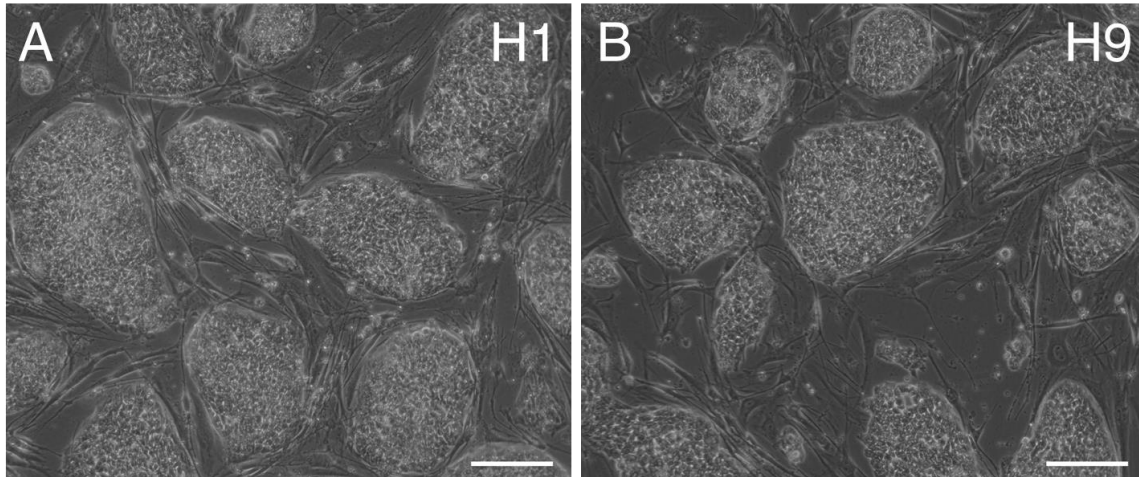


Figura 9. Morfología de las líneas H1 y H9 sobre iMEF. Magnificación (10x) en contraste de fases de una colonia de línea H1 (A) o H9 (B) sobre una capa de iMEF, presentando una morfología típica de hESC: células estrechamente compactas en una colonia con bordes definidos, barra de calibración 50 μ M. D.

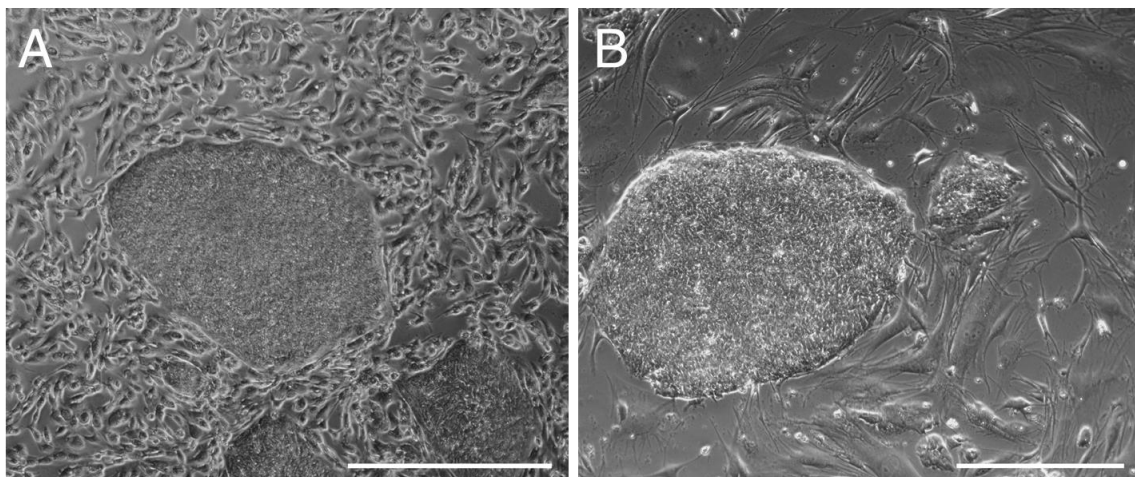


Figura 10. Morfología de la Amicqui-1. Magnificaciones (10x) en contraste de fases de la línea Amicqui-1 sobre capa nodriza hAEC (A) o de iMEF. (B). Ambas colonias presentan células estrechamente compactas, colonia plana con bordes definidos. Barras de calibración, 200 μ M

Caracterización de la línea Amicqui-1 derivada y mantenida sobre hAEC

Una vez que obtuvo la línea Amicqui-1, se procedió a caracterizarla mediante la detección de una batería de marcadores relacionados con la pluripotencia. Como se observa en la Figura 11A, las colonias de la Amicqui-1 fueron positivas a FA, mientras que las células de la capa nodriza no fueron teñidas; además, se determinó el cariotipo de la línea, utilizando la técnica de la tinción de Giemsa. El estudio citogenético resultó en un cariotipo 46, XY (Figura 11B).

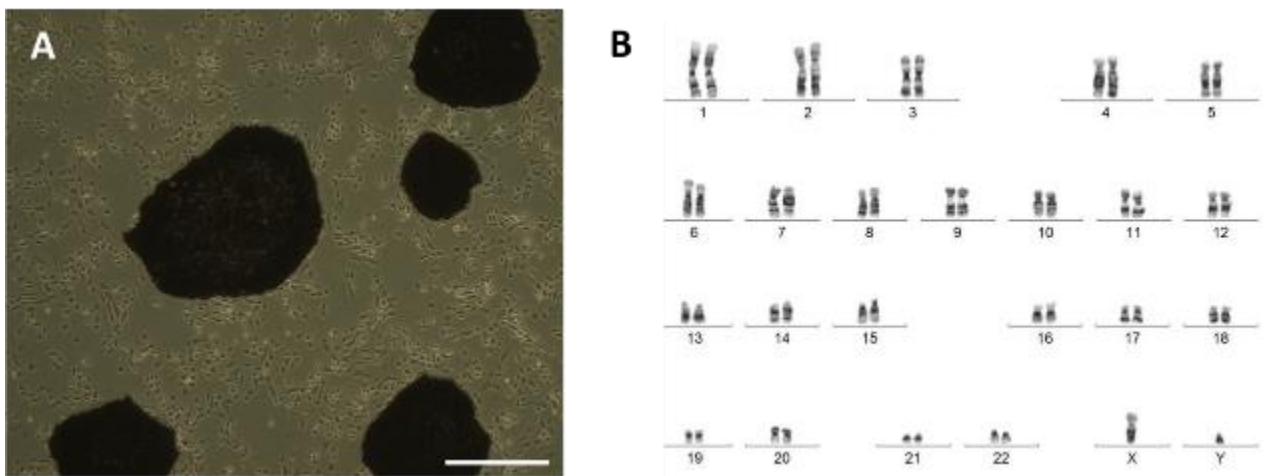


Figura 11. Detección de fosfatasa alcalina y cariotipo de Amicqui-1. A) Micrografía de colonias Amicqui-1 positivas a fosfatasa alcalina sobre una capa de hAEC. Barra de calibración 500 µm. B) Fotografía de la metafase de una célula de una colonia de Amicqui-1 con cariotipo 46, XY, en donde se muestran organizados los cromosomas en pares

Posteriormente, se llevaron a cabo varias RT-PCR en punto final para buscar la presencia de mRNA de marcadores de hESC. Nuestra línea Amicqui-1 en ambas capas nodrizas (hAEC y iMEF) presentó el mRNA de la tríada OSN así como de otros factores clave para mantener la red de pluripotencia como KLF4 o REX-1. En adición, se encontraron marcadores propios del epiblasto temprano (IFITM1, FGF4, Gbx2, Kit, TCFLP2). Muestras de H1 y H9 sobre MEF fueron utilizadas como controles positivos (Figura 12).

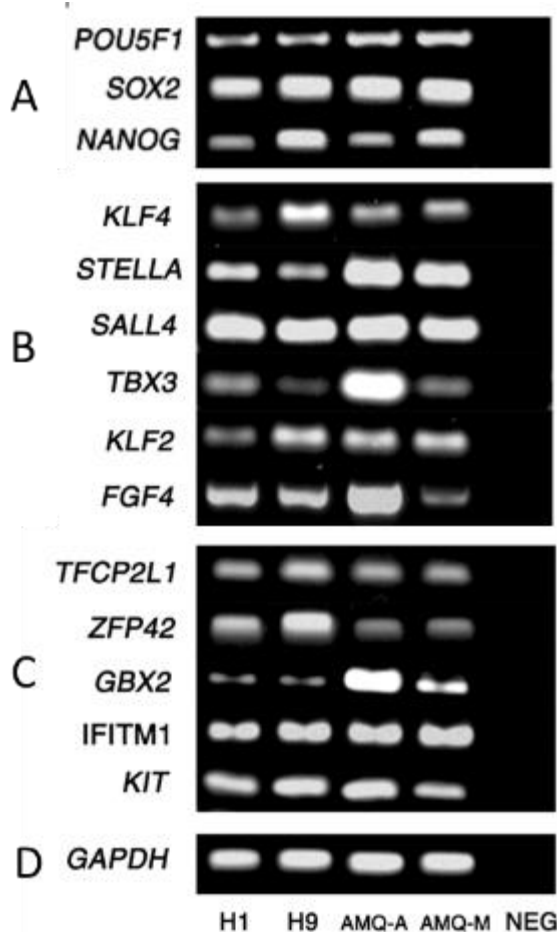


Figura 12. Expresión de genes relacionados con la pluripotencia en la línea Amicqui-1. A) Genes del “core” de pluripotencia; B) otros genes involucrados en la red de pluripotencia; C) genes del epiblasto humano. Carril 1 y 2, H1 y H9 sobre iMEF como controles positivos; carril 3 y 4, Amicqui-1 sobre capa nodriza hAEC y capa nodriza iMEF respectivamente; carril 5, control negativo. GAPDH se utilizó como control constitutivo (D).

En complementación con la detección de mRNAs, se llevaron a cabo inmunofluorescencias para monitorear la presencia de las proteínas de los marcadores de pluripotencia, utilizando colonias que fueron fijadas a diferentes intervalos entre los P6 y P38. Se detectaron los factores de transcripción de la triada OSN, marcadores de superficie celular SSEA-4 y TRA1-60, así como la molécula de adhesión E-cadherina (marcador pluripotente que confirma la naturaleza epitelial de las hESC); para ello se realizaron diferentes combinaciones y se observó en las colonias la co-localización de estos marcadores (demostrado por dobles inmunofluorescencias). La presencia de estas moléculas nos indicó un estado indiferenciado, lo que sugiere que las células Amicqui-1 sobre hAEC son pluripotentes (Figuras 13-16). A su vez, Amicqui-1 se puede mantener bajo las

condiciones dependientes de la capa nodriza de MEF, demostrado por la detección de los marcadores pluripotentes mediante RT-PCR (Figura 12) e inmunofluorescencia (Figura 17-20). Al igual que con la RT-PCR, se utilizó como control positivo las líneas H1 y H9 sobre iMEF, las cuales de forma esperada fueron positiva para todos los marcadores de pluripotencia evaluados (Figura 21)

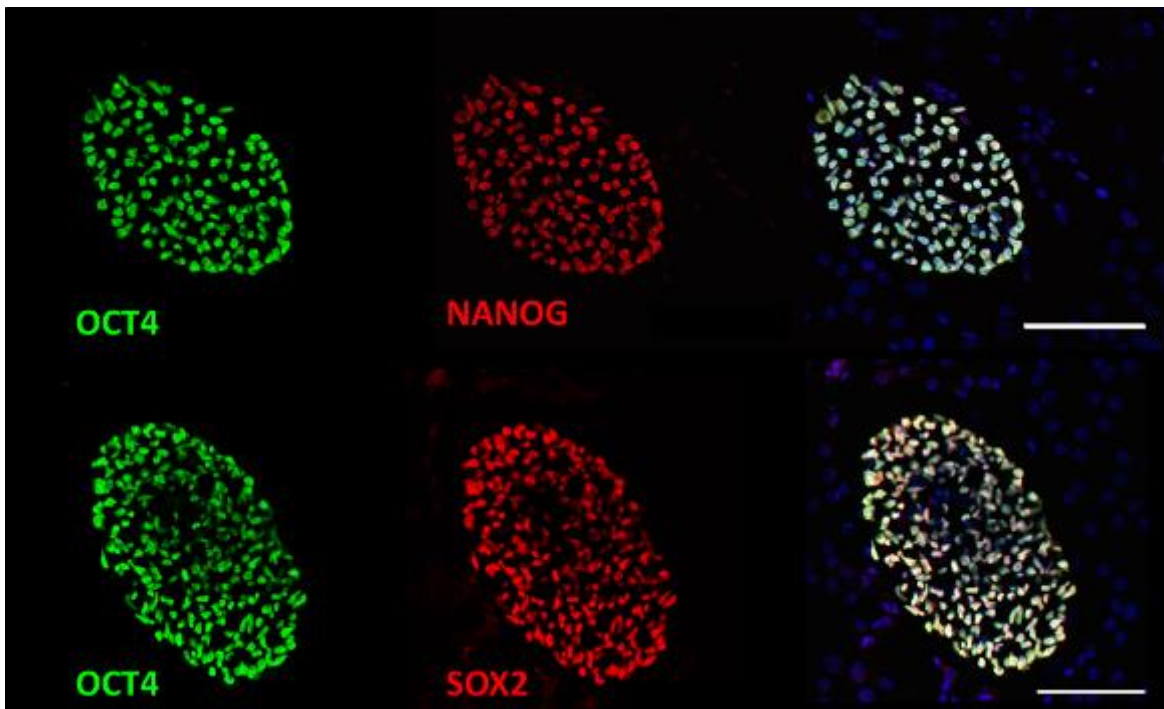


Figura 13. La línea Amicqui-1 derivada y mantenida sobre hAEC es positiva a la tríada de pluripotencia. Micrografías (20x) tomadas con microscopía confocal de colonias Amicqui-1 sobre una capa de hAEC con inmunotinción para OCT4 con NANOG y OCT4 con SOX2. Se puede observar que los núcleos celulares (teñidos con DAPI) de la colonia presentan doble marcaje positivo. Barra de calibración, 50 μ M.

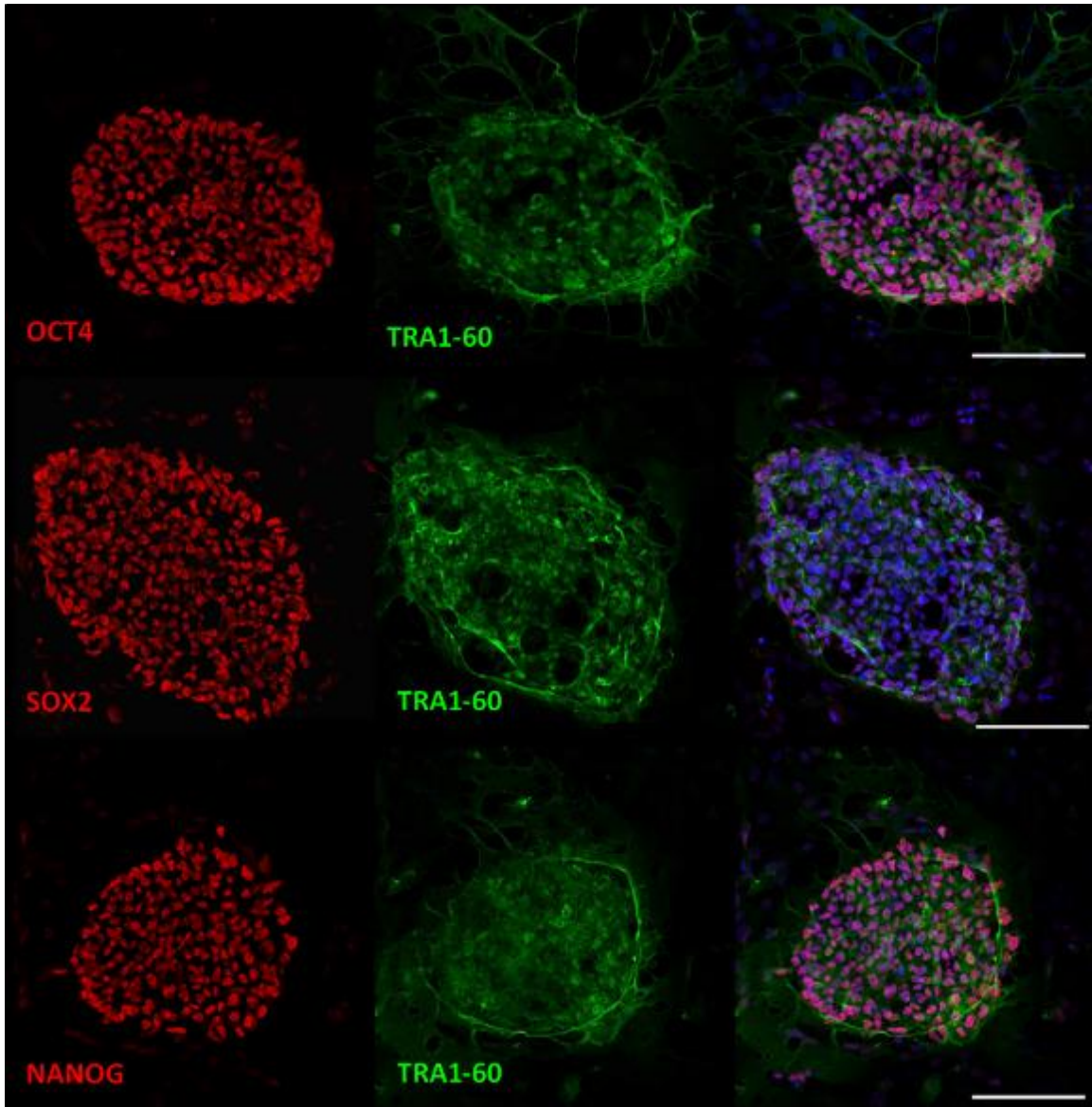


Figura 14. Presencia del antígeno de superficie TRA1-60 en Amicqui-1. Micrografías (20x) tomadas con microscopía confocal de colonias Amicqui-1 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OCT4, SOX2 y NANOG) con el antígeno TRA1-60. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para TRA1-60 las células presentan marcaje más periférico. Barras de calibración, 50 μ M.

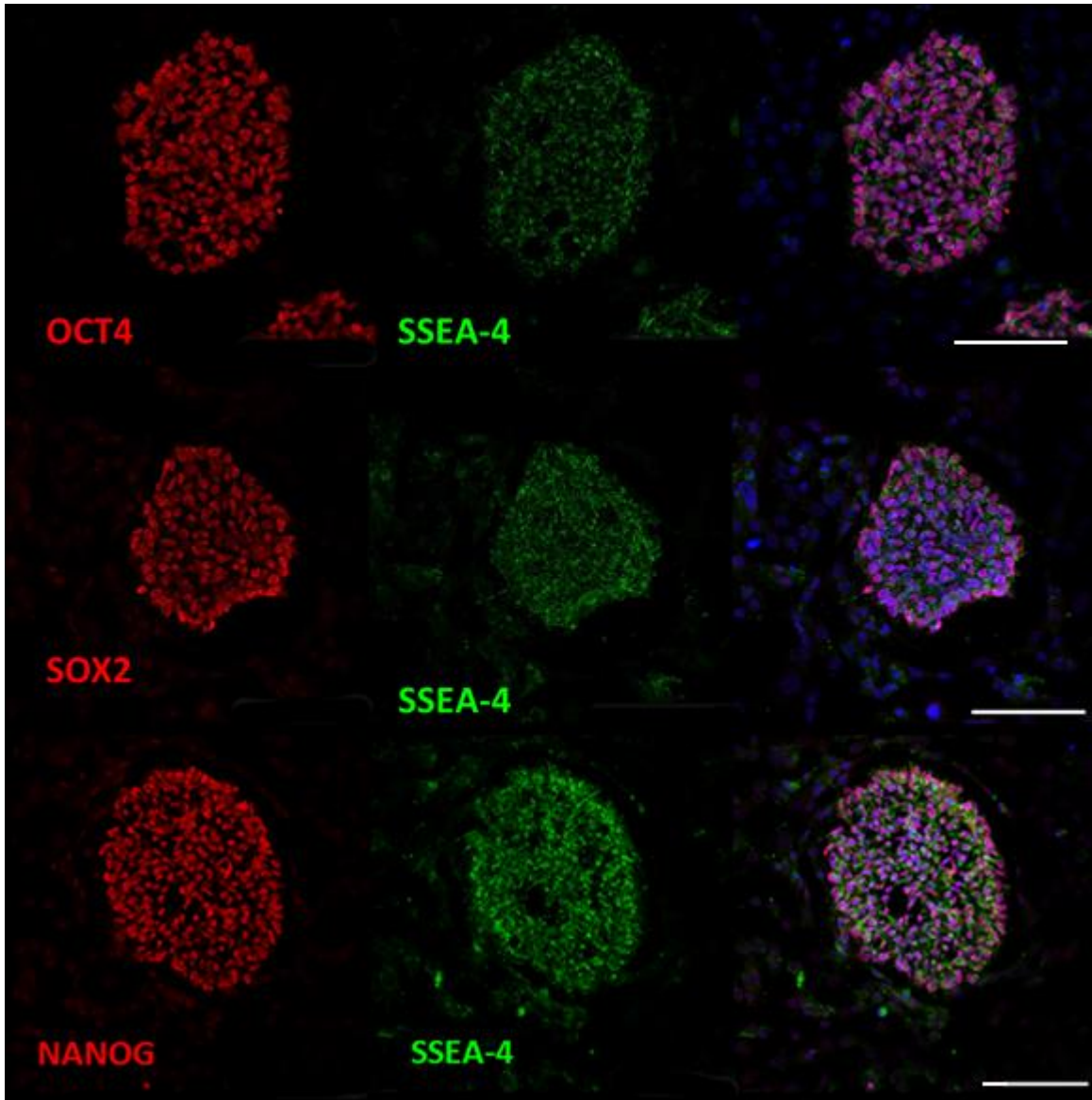


Figura 15. Presencia del antígeno de superficie SSEA-4 en Amicqui-1. Micrografías (20x) tomadas con microscopía confocal de colonias Amicqui-1 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OCT4, SOX2 y NANOG) con el antígeno SSEA-4. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para SSEA-4 las células presentan marcaje más periférico. Barras de calibración, 50 μ M

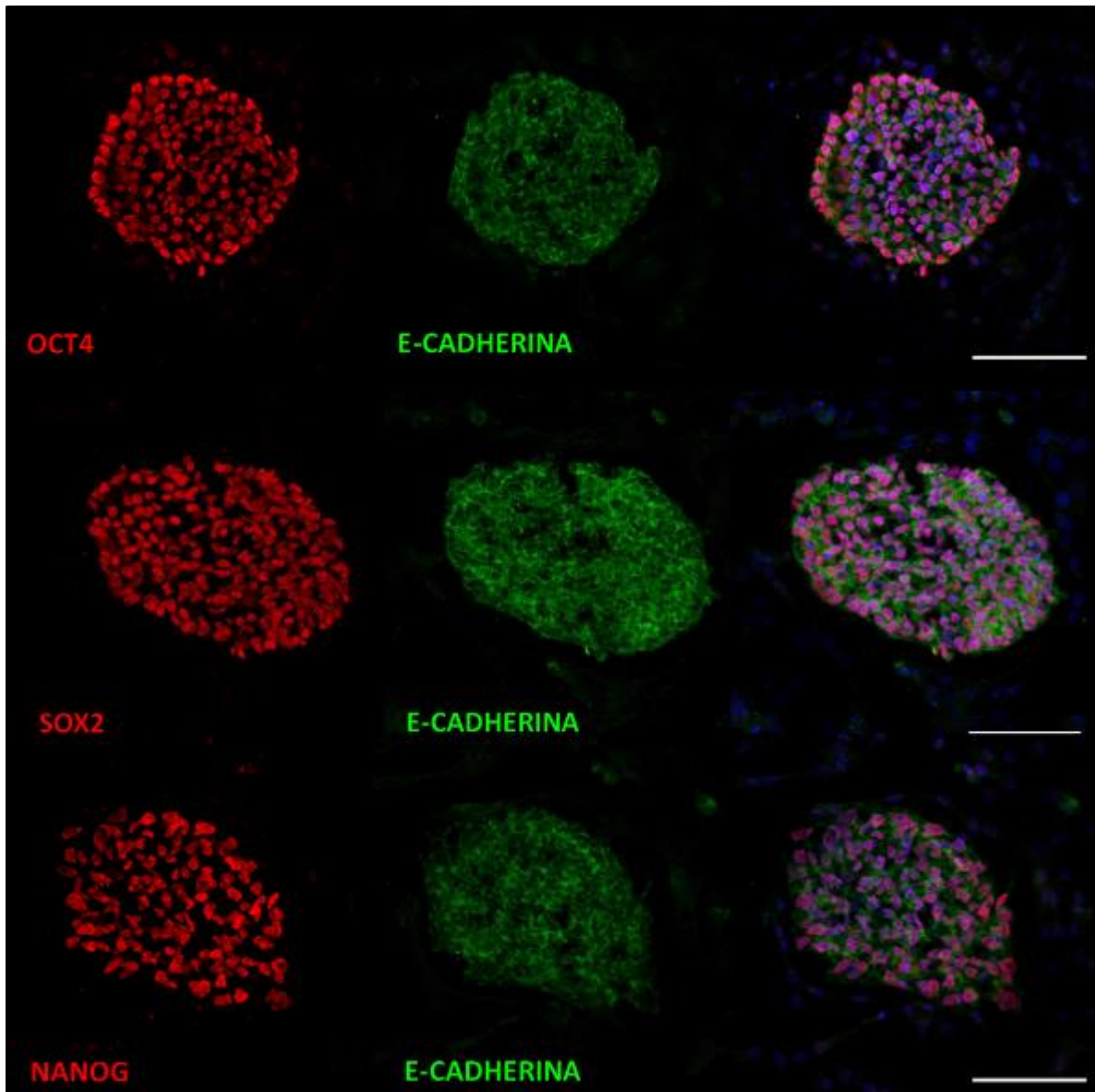


Figura 16. Expresión de E-Cadherina en Amicqui-1. Micrografías (20x) tomadas con microscopía confocal de colonias Amicqui-1 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OCT4, SOX2 y NANOG) con la molécula de adhesión E-Cadherina. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para E-Cadherina las células presentan marcaje más periférico (ver *Addendum*). Barras de calibración, 50 μ M

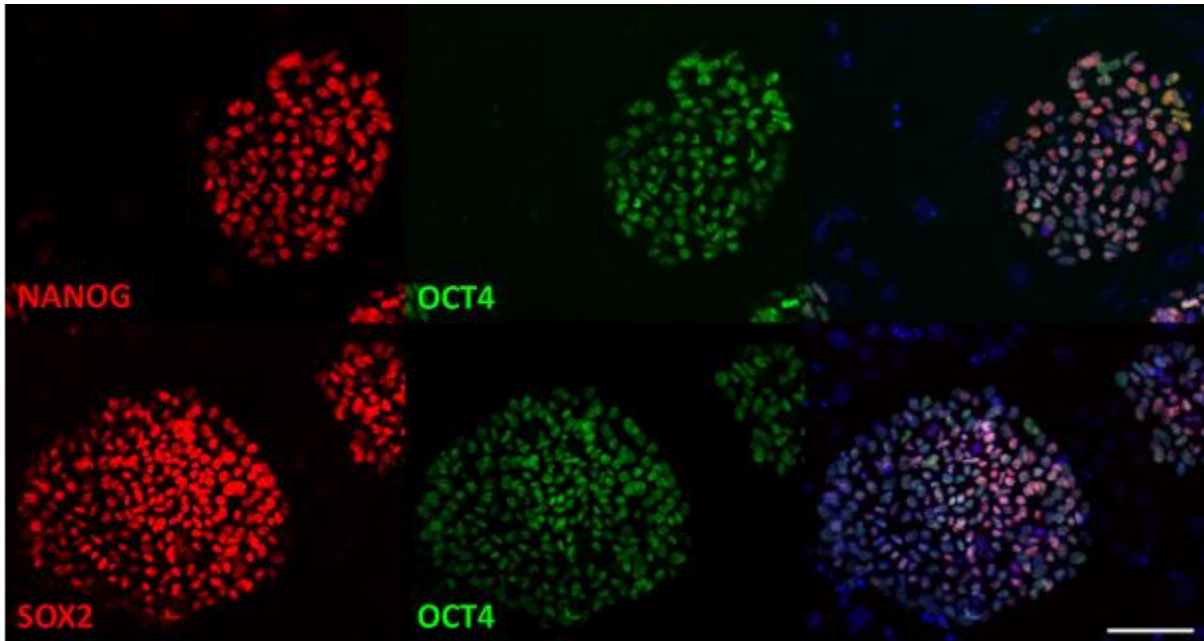


Figura 17. La línea Amicqui-1 mantenida sobre la capa nodriza convencional MEF es positiva a la tríada de pluripotencia. Micrografías (20x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias Amicqui-1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Los núcleos fueron teñidos con DAPI para su identificación. Se puede observar que las células de la colonia presentan doble marcaje positivo en el núcleo. Barra de calibración, 50 μ M.

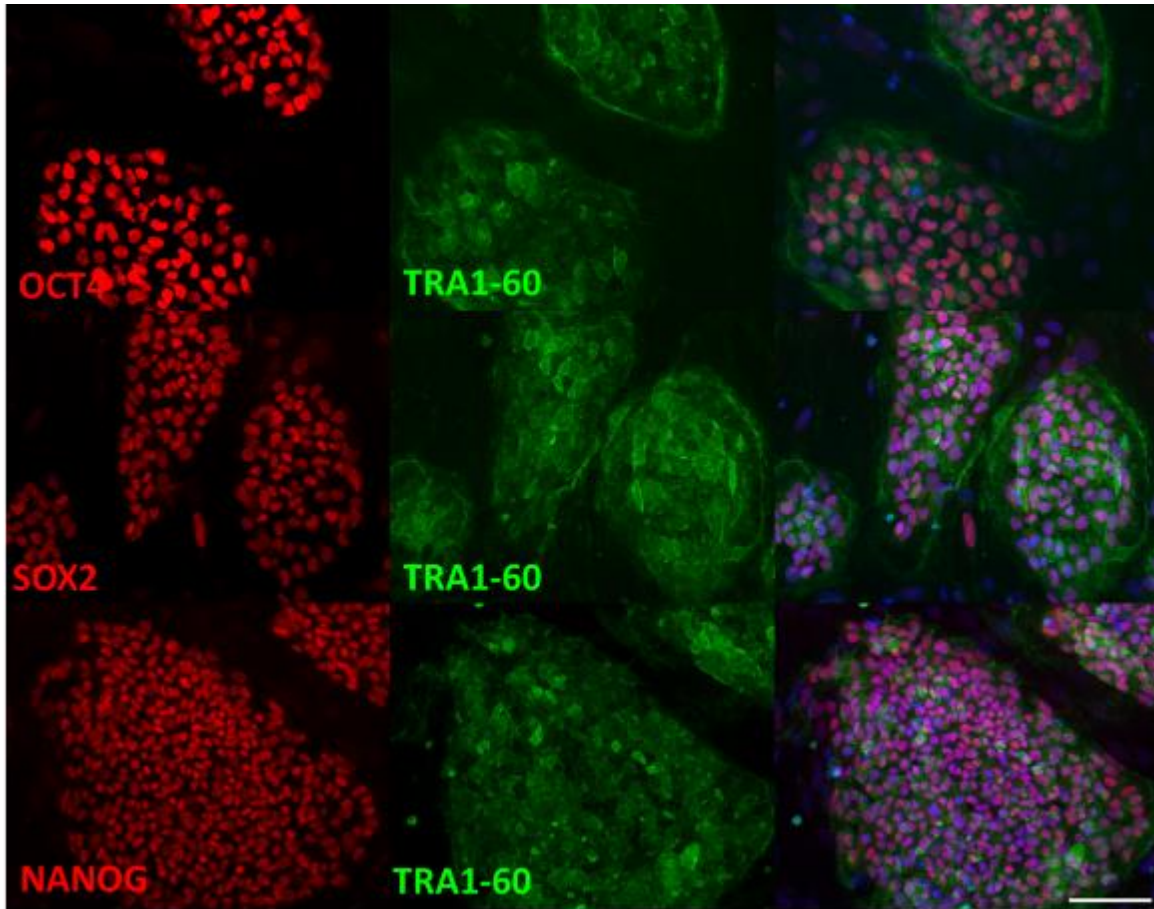


Figura 18. Amicqui-1 presenta TRA1-60 en condiciones de capa nodriza MEF. Micrografías (20x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de Amicqui-1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con el marcador de superficie celular TRA1-60. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para TRA1-60 las células presentan marcaje más periférico. Barras de calibración, 50 μ M

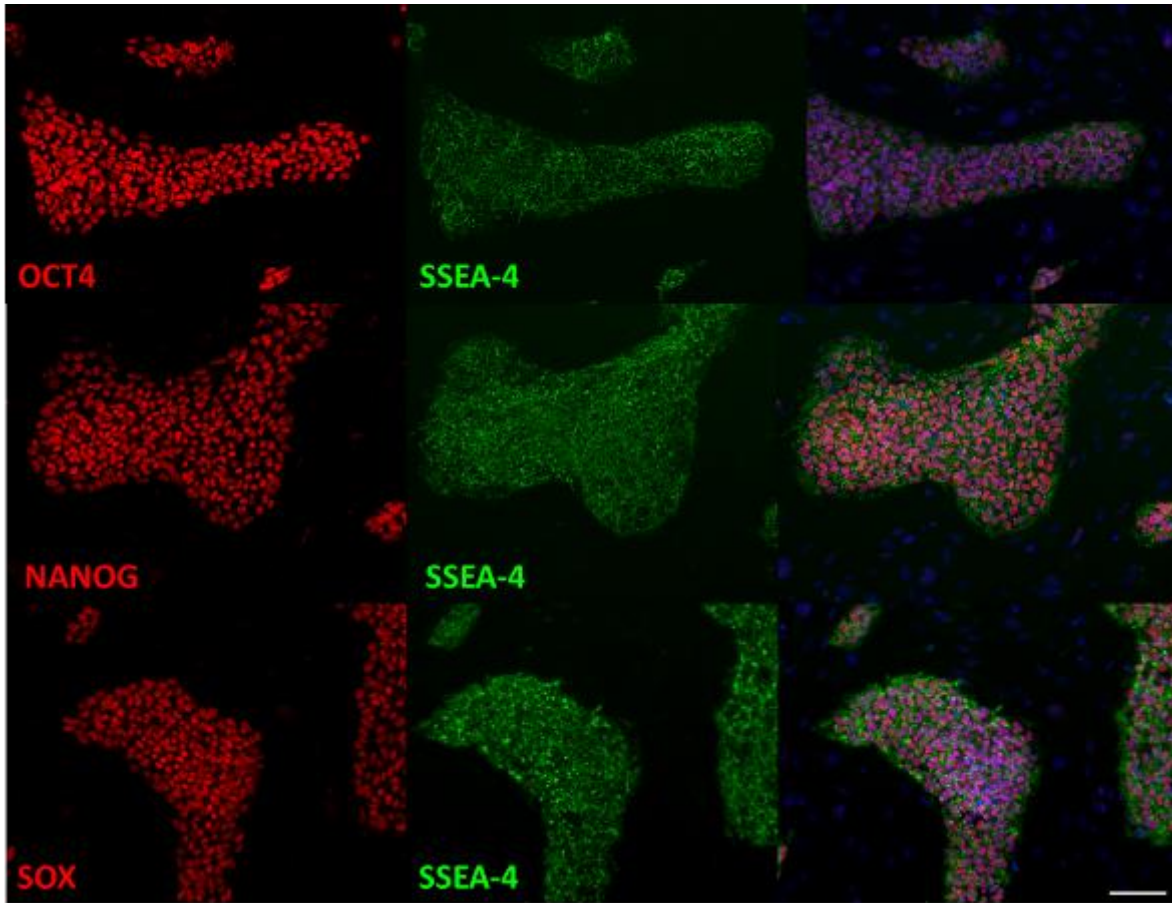


Figura 19. Amicqui-1 presenta SSEA-4 en condiciones de capa nodriza MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de Amicqui-1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con el marcador de superficie celular SSEA-4. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para SSEA-4 las células presentan marcaje más periférico. Barra de calibración, 100 μ M

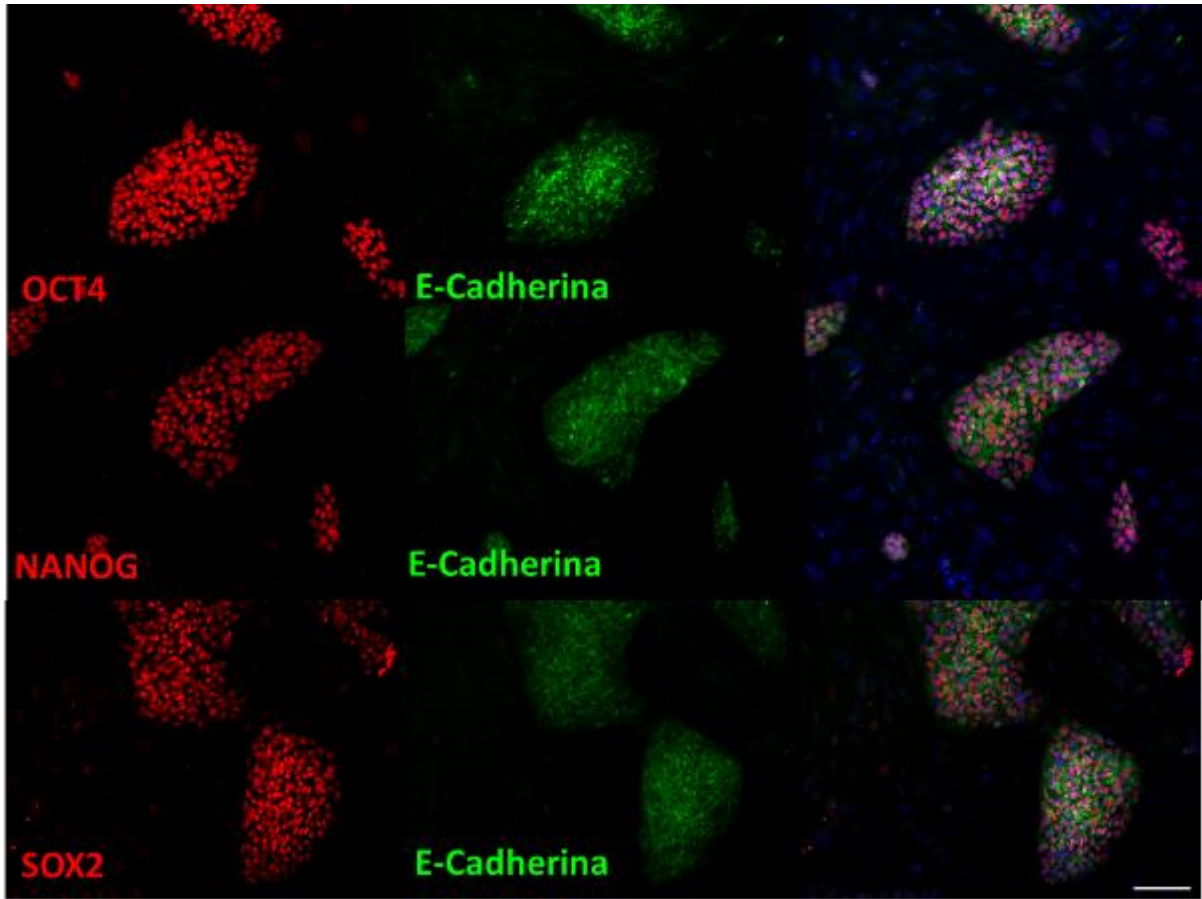


Figura 20. Expresión de E-cadherina en Amicqui-1 en condiciones de capa nodriza MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de Amicqui-1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con el marcador de superficie celular E-cadherina. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para E-cadherina las células presentan marcaje más periférico. Barras de calibración, 100 μ M

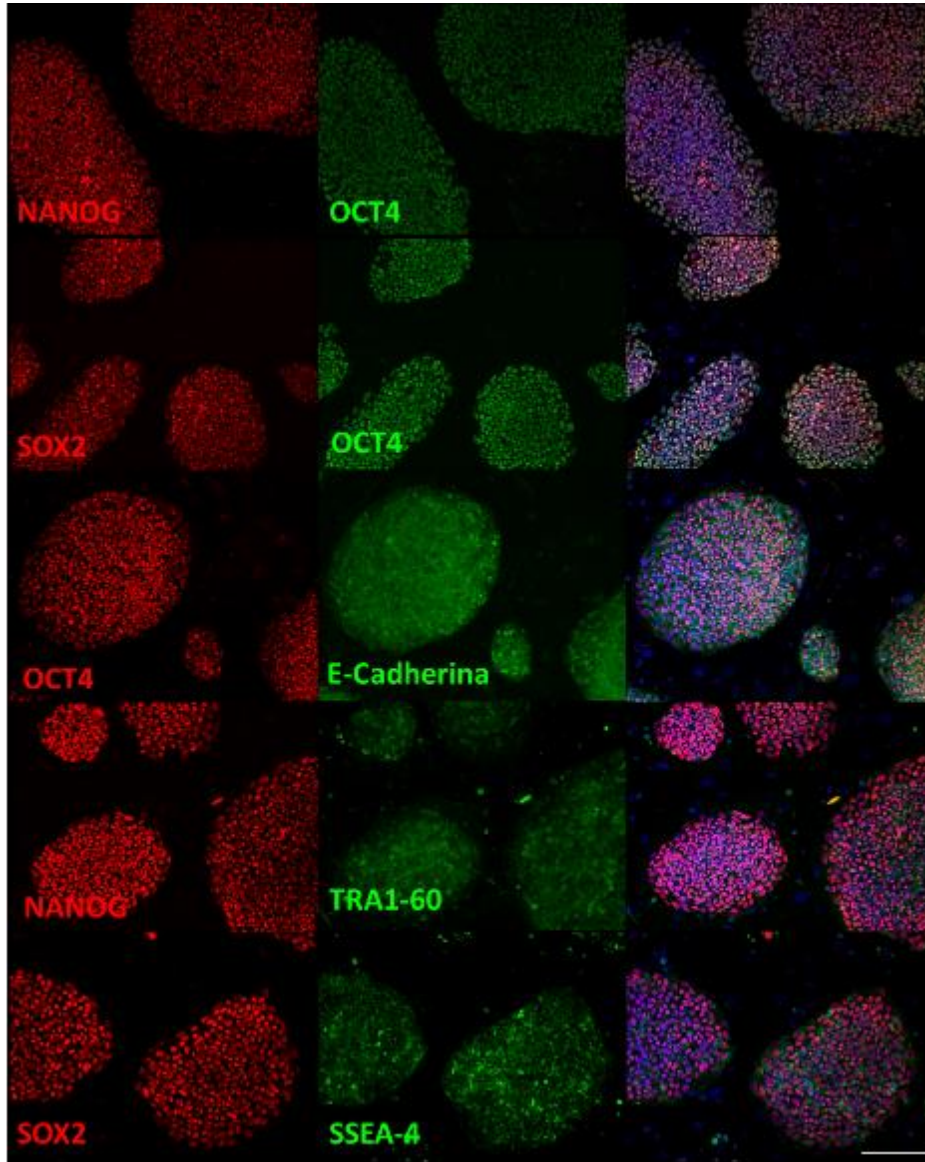


Figura 21. Validación de los anticuerpos primarios en la línea H1. Micrografías (10x) tomadas con microscopía confocal de colonias H1 con doble inmunotinción para marcadores de pluripotencia. Las colonias H1 son positivas para los factores de transcripción OCT4, SOX2 y NANOG y los antígenos de superficie E-cadherina, Tra1-60 y SSEA-4. Barra de calibración, 50 μ M.

Diferenciación in vitro de la línea Amicqui-1 hacia los tres linajes embrionarios

Prosiguiendo con la caracterización, mediante el ensayo de formación de cuerpos embrionarios y su diferenciación se buscaron marcadores de las tres capas germinales por la técnica de inmunofluorescencia. Para el caso del ectodermo, se detectó la presencia de células PAX6 positivas, el cual es un marcador de células progenitoras neurales, así como β III-Tubulina, marcador de neuronas inmaduras, lo que sugiere que las hESC son capaces de diferenciarse hacia un destino neuronal (Figura 22). Asimismo, se detectaron células positivas a FOXA2 y SOX17, marcadores de endodermo definitivo (Figura 23). Finalmente, se observó la marca positiva de BRACHURY, factor de transcripción presente en células comprometidas hacia linaje mesodérmico (Figura 24).

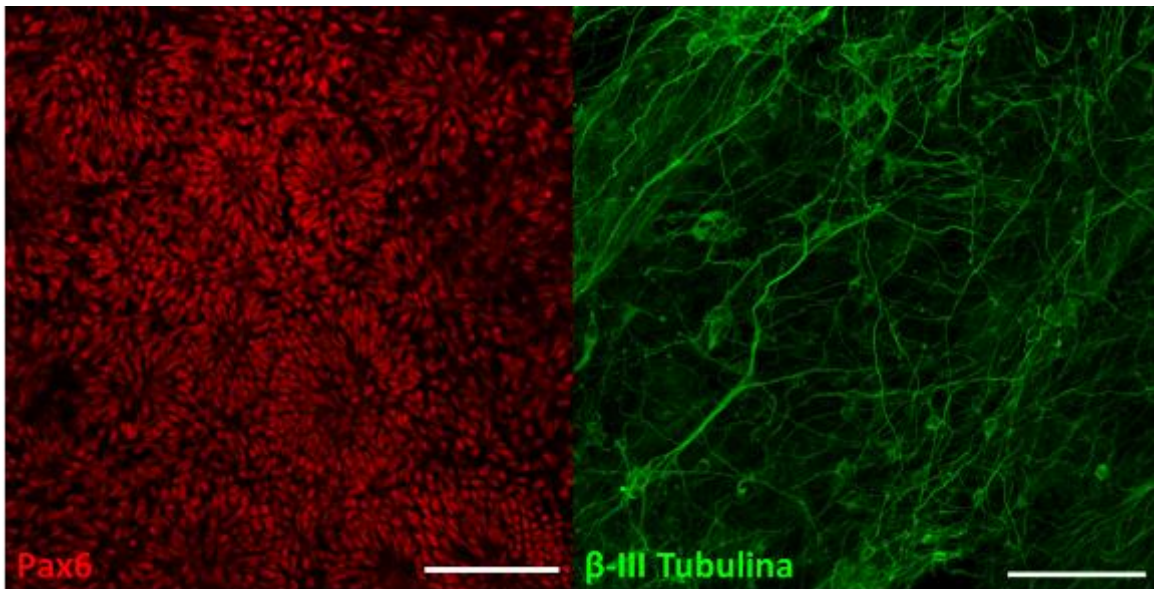


Figura 22. Diferenciación *in vitro* de Amicqui-1 hacia el linaje del ectodermo. Micrografías (20x) de confocal, de células derivadas de Amicqui-1 a partir de la formación de cuerpos embrionarios. Se observan rosetas neurales positivas a PAX6, marcador de células troncales neurales, así como células con prolongaciones positivas para β -III Tubulina. Barra de calibración, 50 μ m.

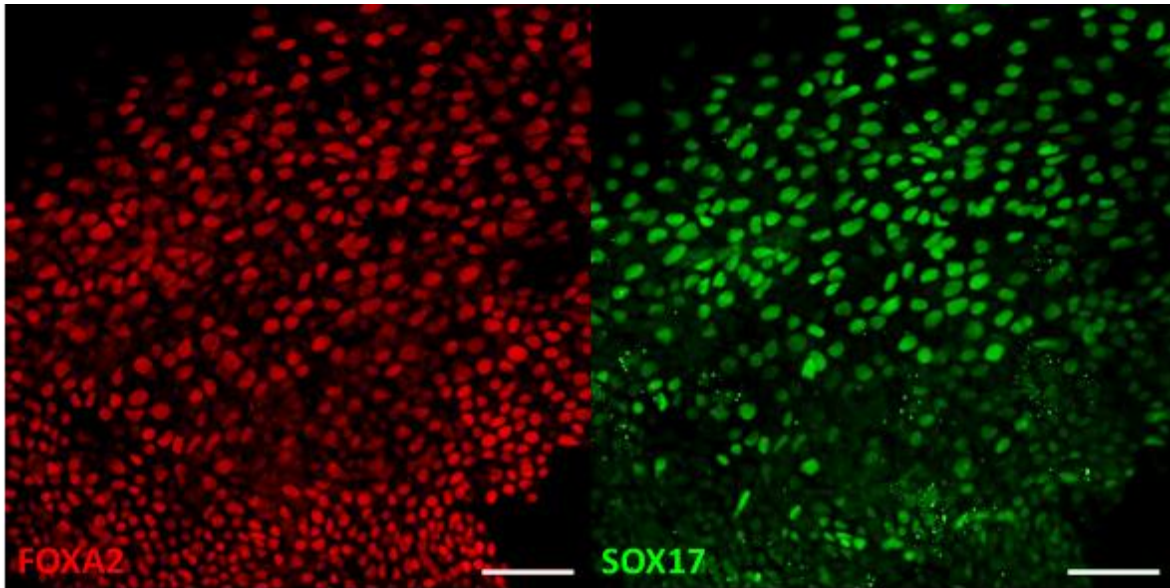


Figura 23. Diferenciación *in vitro* de Amicqui-1 hacia el linaje del endodermo. Micrografías (20x) de confocal, de células derivadas de Amicqui-1 a partir de la formación de cuerpos embrionarios. La marca corresponde a células positivas a FOXA2 (en rojo) y SOX17 (verde), marcadores de endodermo definitivo. Barra de calibración, 50 μ m.

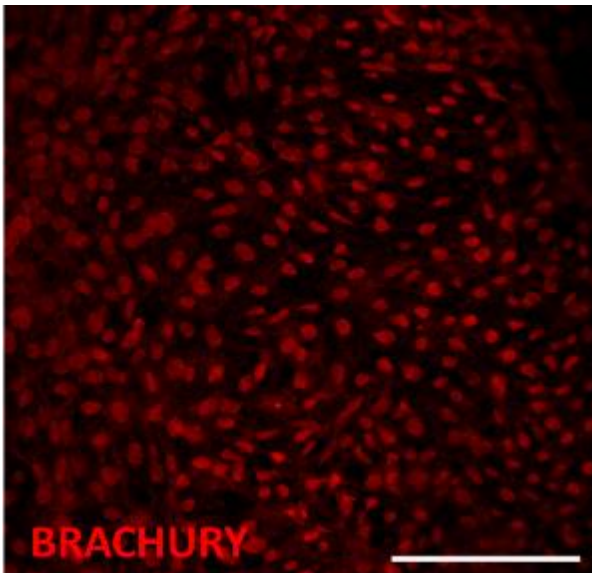


Figura 24. Diferenciación *in vitro* de Amicqui-1 hacia el linaje del mesodermo. Micrografía (20x) de confocal, de células derivadas de Amicqui-1 a partir de la formación de cuerpos embrionarios. Se observan células positivas a BRACHURY, un marcador característico de mesodermo. Barra de calibración, 100 μ m.

Diferenciación in vivo de Amicqui-1 hacia los tres linajes embrionarios

Se llevó a cabo la prueba “estándar de oro” para demostrar la capacidad pluripotente de líneas de origen humano que es la formación de teratomas. Se hizo un trasplante de Amicqui-1 en la cápsula renal de ratones inmunodeficientes de la cepa C.B-17/IcrHsd-Prkdc^{scid}; seis semanas después los animales fueron sacrificados y se observó que en los animales se habían desarrollado tumores. El análisis histológico determinó que en los tumores había tipos celulares derivados del ectodermo, mesodermo y endodermo. Para el caso del ectodermo se encontró rosetas neurales, las cuales consisten en agrupaciones celulares circulares con lumen central, presuntamente del tipo célula troncal neural. Para el mesodermo, se identificó cartílago en desarrollo, en forma de una estructura denominada placa de crecimiento, la cual contiene cuatro principales capas de condrocitos morfológicamente distintos (zona en reposo, zona proliferativa, zona prehipertrófica e hipertrófica). Finalmente, para el endodermo se identificó epitelio intestinal, conformado por un epitelio columnar y algunas células de Goblet rodeando un lumen (Figura 25). Para validar este ensayo, se inyectaron células de la línea H1 sobre iMEF en ratones inmunodeficientes, observando de manera semejante estructuras de las tres capas embrionarias (Figura 26).

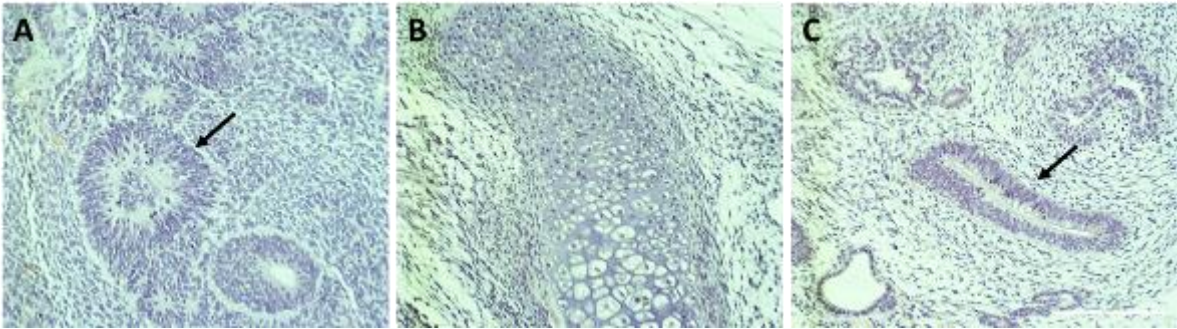


Figura 25. La línea Amicqui-1 es capaz de formar teratomas compuestos por los tres linajes embrionarios. Micrografías a campo claro de cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina de teratomas formados en ratones inmunodeficientes, después de haber trasplantado la Amicqui-1 en la cápsula renal. En A se puede observar la clásica morfología de rosetas neurales (ectodermo). En B se puede observar tejido cartilaginoso en formación (mesodermo). En C, con la flecha se señala epitelio intestinal (endodermo). Barra de calibración, 250 μ M.

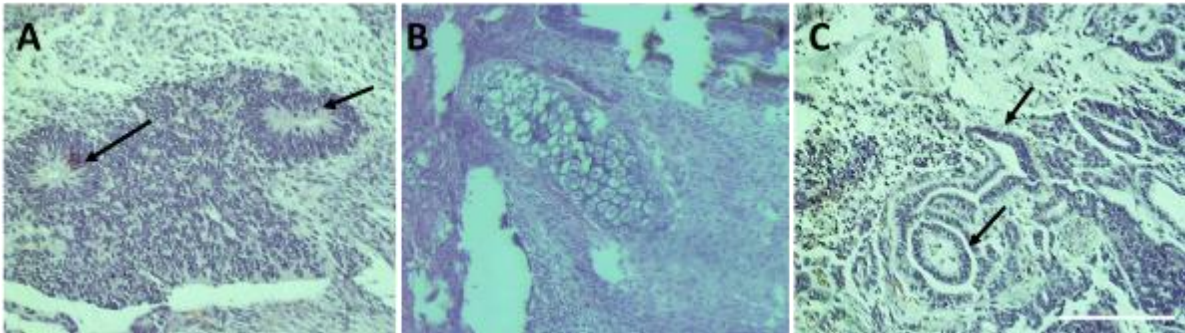


Figura 26. Validación del ensayo de formación de teratomas utilizando la línea H1. Micrografías a campo claro de cortes histológicos con tinción hematoxilina-eosina de teratomas formados en ratones inmunodeficientes, después de haber trasplantado la línea H1 en la cápsula renal. En A se puede observar la clásica morfología de rosetas neurales (ectodermo). En B se puede observar tejido cartilaginoso en formación (mesodermo). En C, con la flecha se señala epitelio intestinal (endodermo). Barra de calibración, 250 μ M.

Mantenimiento de las líneas H1 y H9 sobre la capa nodriza de hAEC

Con el fin de determinar si la capa nodriza de hAEC era capaz de mantener otras líneas hESC, las H1 y H9 fueron mantenidas sobre hAEC durante 10 pases consecutivos, en donde se observó que las células seguían formando colonias uniformes y compactas, preservando la misma morfología que se observó cuando crecían sobre la capa convencional de MEF; asimismo fueron positivas a FA, sugiriendo que se mantenían indiferenciadas (Figura 27).

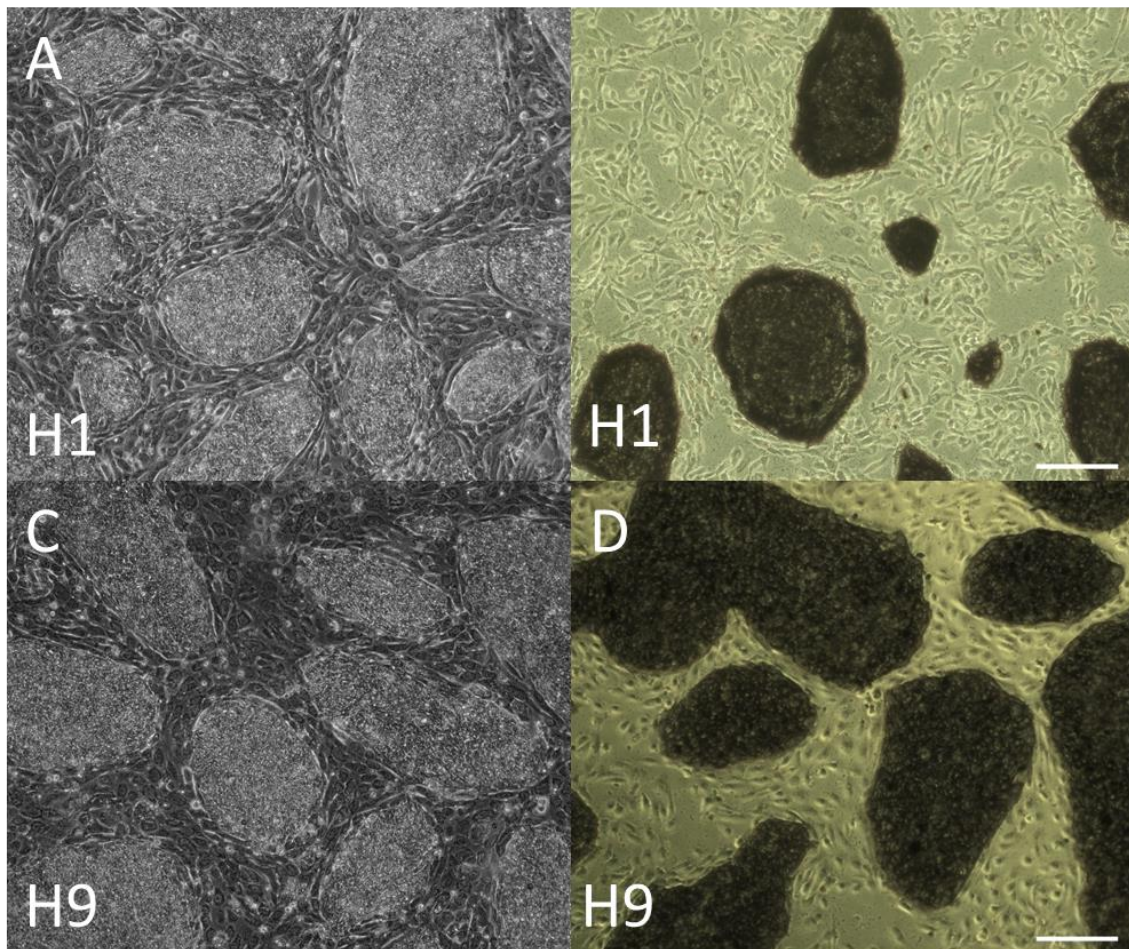


Figura 27. Morfología de las colonias de H1 y H9 sobre hAEC. Micrografías de H1 (A) y H9 (C) mantenidas sobre capa nodrizas hAEC. Las colonias presentan una morfología típica de hESC: células uniformes, estrechamente compactas y formando colonias con bordes definidos. B y D corresponde a colonias de H1 y H9 sobre hAEC, positivas para FA. Barra de calibración, 100 μ M.

Posteriormente, se buscaron los marcadores de la pluripotencia mediante la técnica de inmunofluorescencia. Las colonias de ambas líneas fueron positivas para el “core” OSN (Figura 28 para H1 y Figura 31 para H9) y para el antígeno de superficie TRA1-60 y E-cadherina (Figuras 29 y 30 para H1; Figuras 32 y 33 para H9), lo cual sugiere que las H1 y H9 se pueden mantener pluripotentes sobre la capa hAEC.

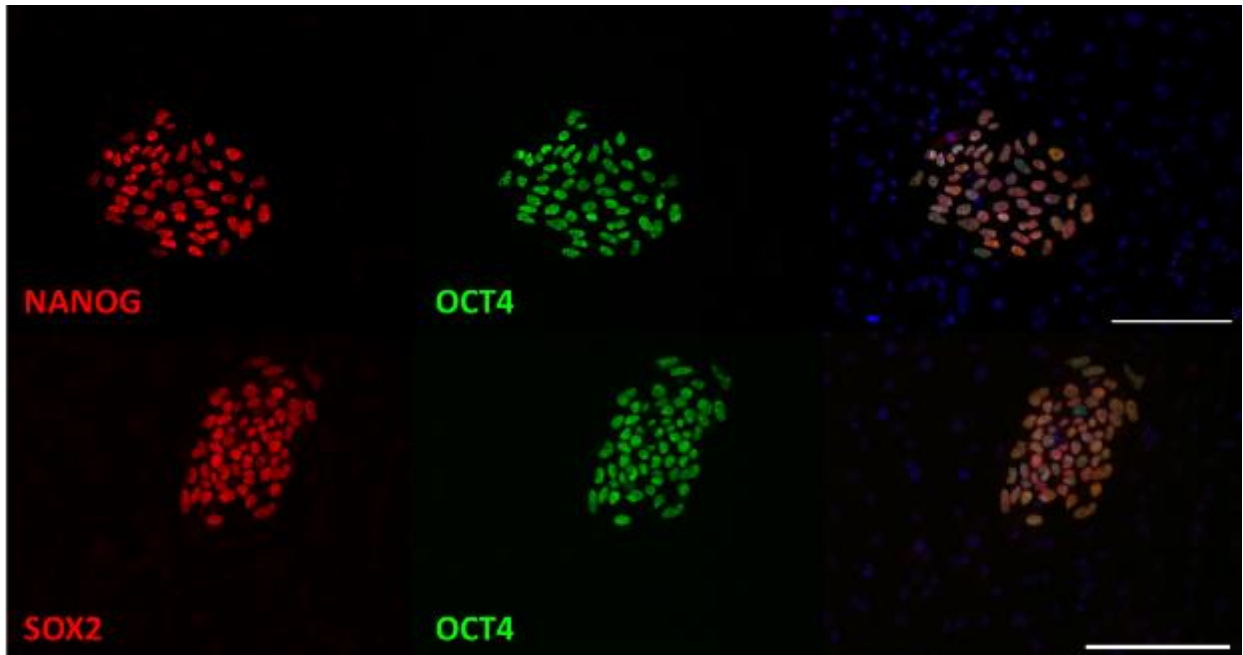


Figura 28. Detección de la tríada de pluripotencia OCT4, NANOG Y SOX2 en H1 sobre hAEC. Micrografías (20x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias H1 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Los núcleos fueron teñidos con DAPI para su identificación. Se puede observar que la marca de los factores está localizada en los núcleos. Barras de calibración, 100 μ m.

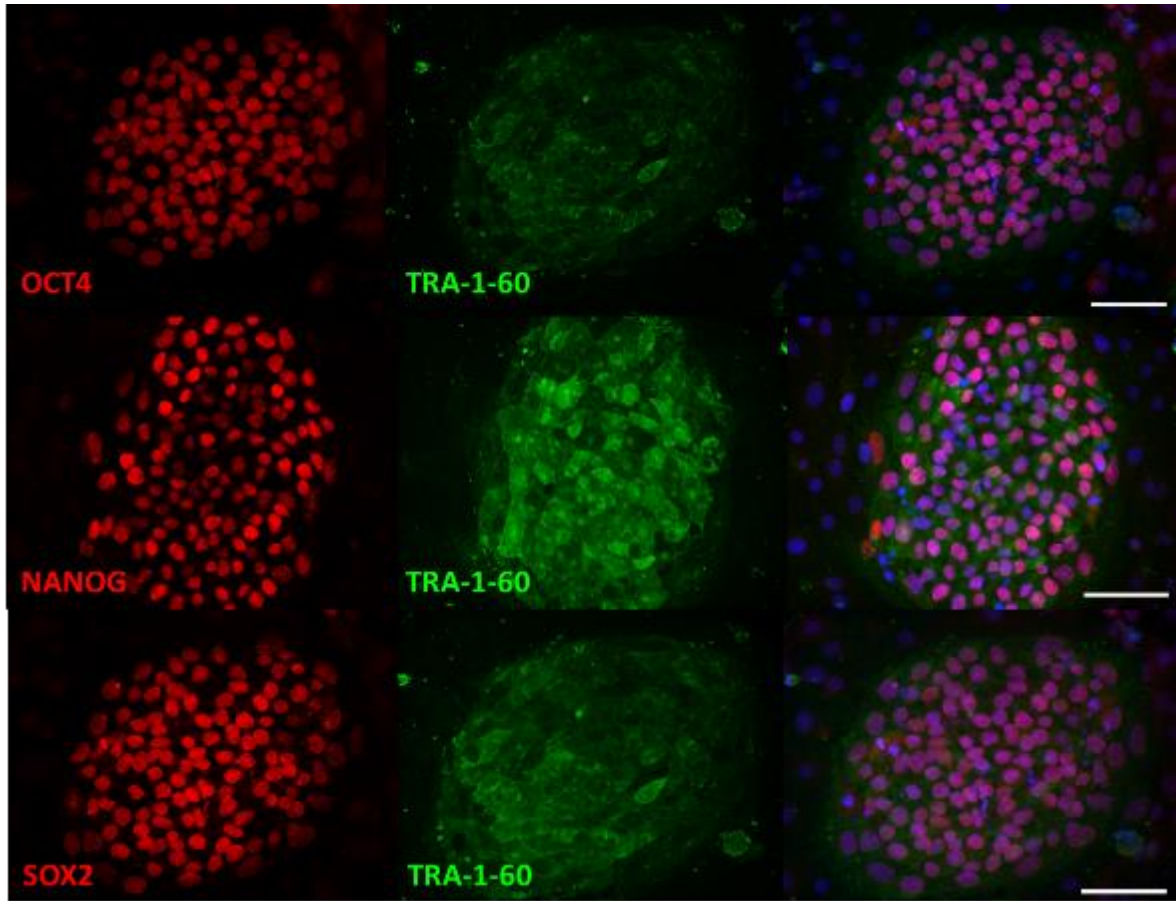


Figura 29. Detección del marcador de superficie relacionado con la pluripotencia TRA1-60 en la línea H1 sobre hAEC. Micrografías (20x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de H1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con el marcador de superficie celular TRA1-60. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para TRA1-60 las células presentan marcaje más periférico. Barra de calibración, 50 μ M.

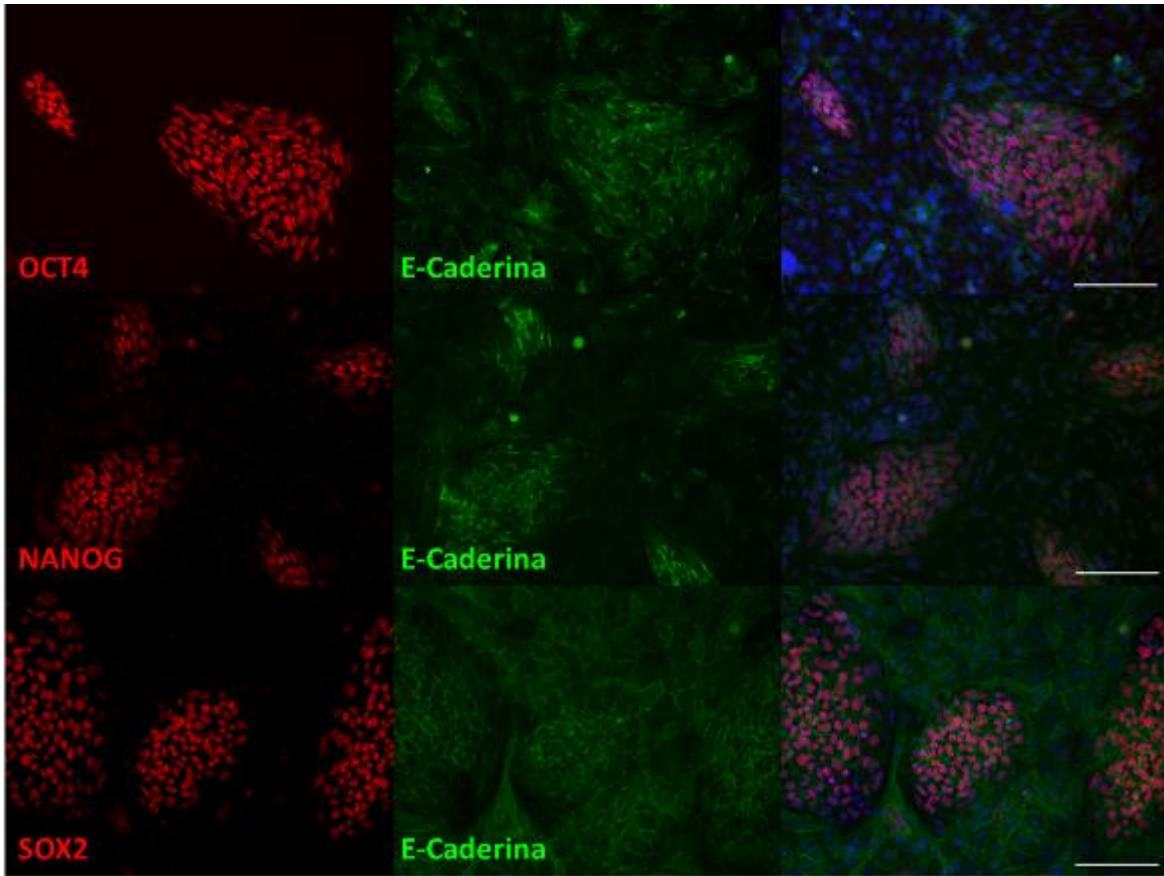


Figura 30. Detección de E-Cadherina en la línea H1 sobre hAEC. Micrografías (20x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de H1 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con la molécula de adhesión E-cadherina. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para E-cadherina las células presentan marcaje más periférico. Barra de calibración, 50 μ M.

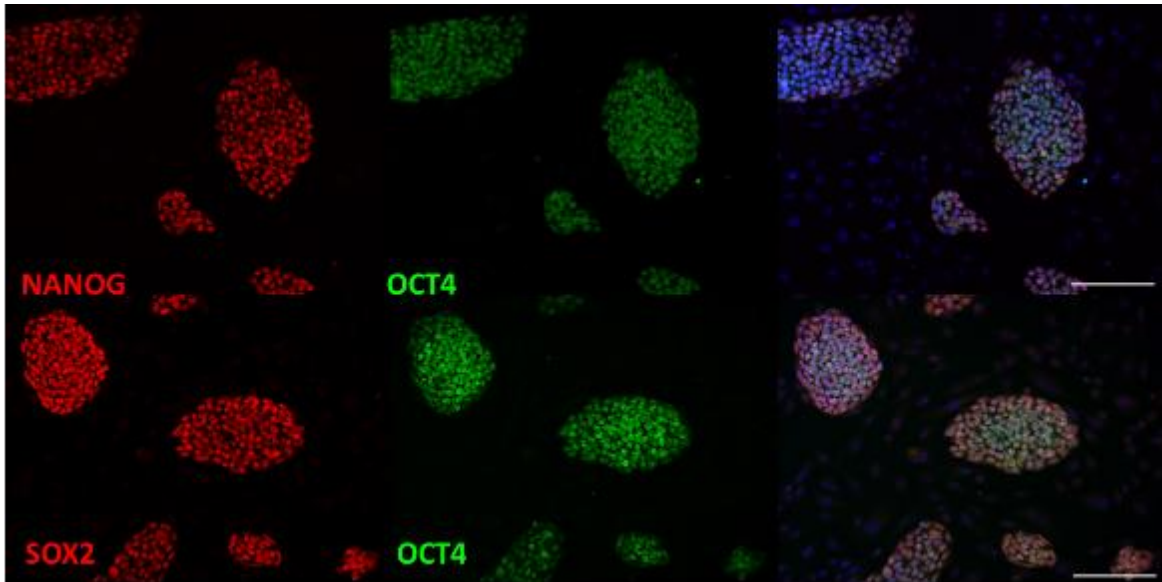


Figura 31. Detección de la tríada de pluripotencia OCT4, NANOG Y SOX2 en H9 sobre hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias H9 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Los núcleos fueron teñidos con DAPI para su identificación. Se puede observar que la marca de los factores está localizada en los núcleos. Barras de calibración, 100 μ m.

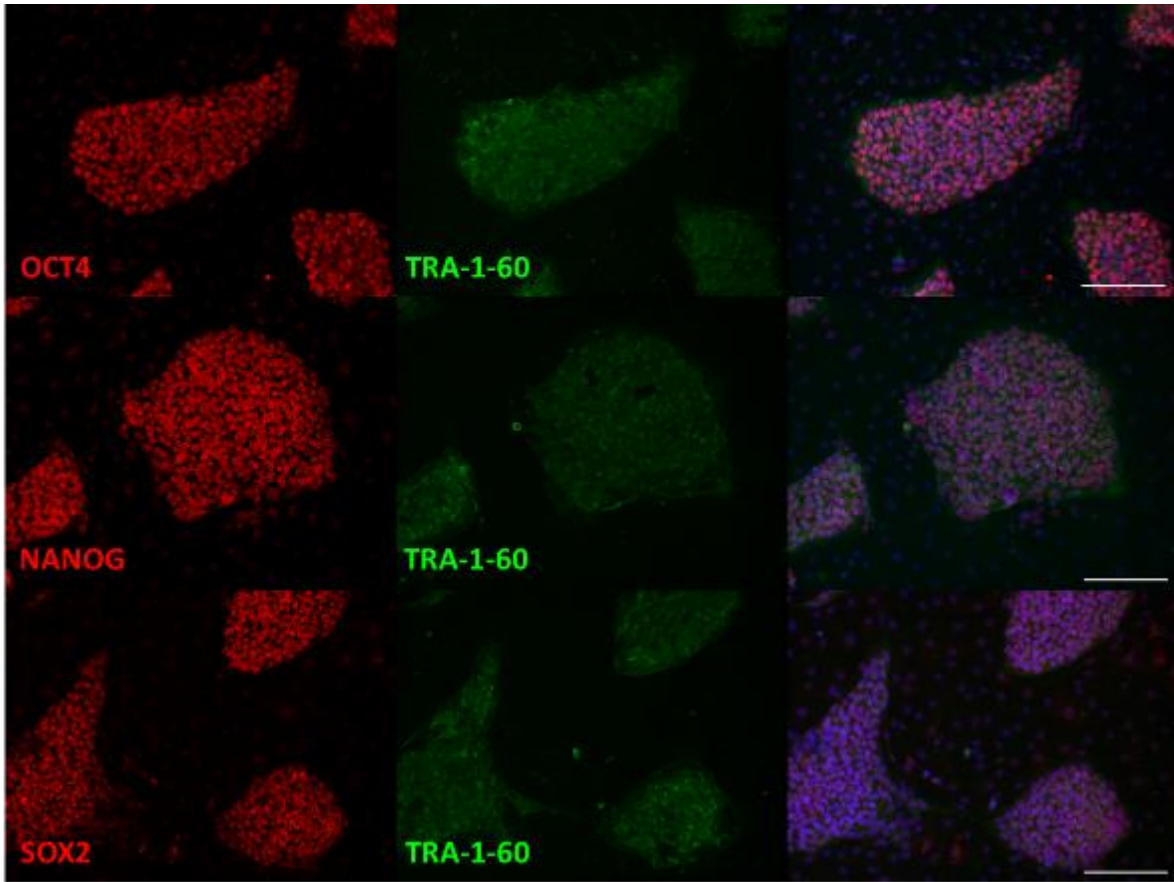


Figura 32. Detección de TRA1-60 en la línea H9 sobre hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de H9 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con el marcador de superficie celular TRA1-60. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para TRA1-60 las células presentan marcaje más periférico. Barra de calibración, 100 μ M.

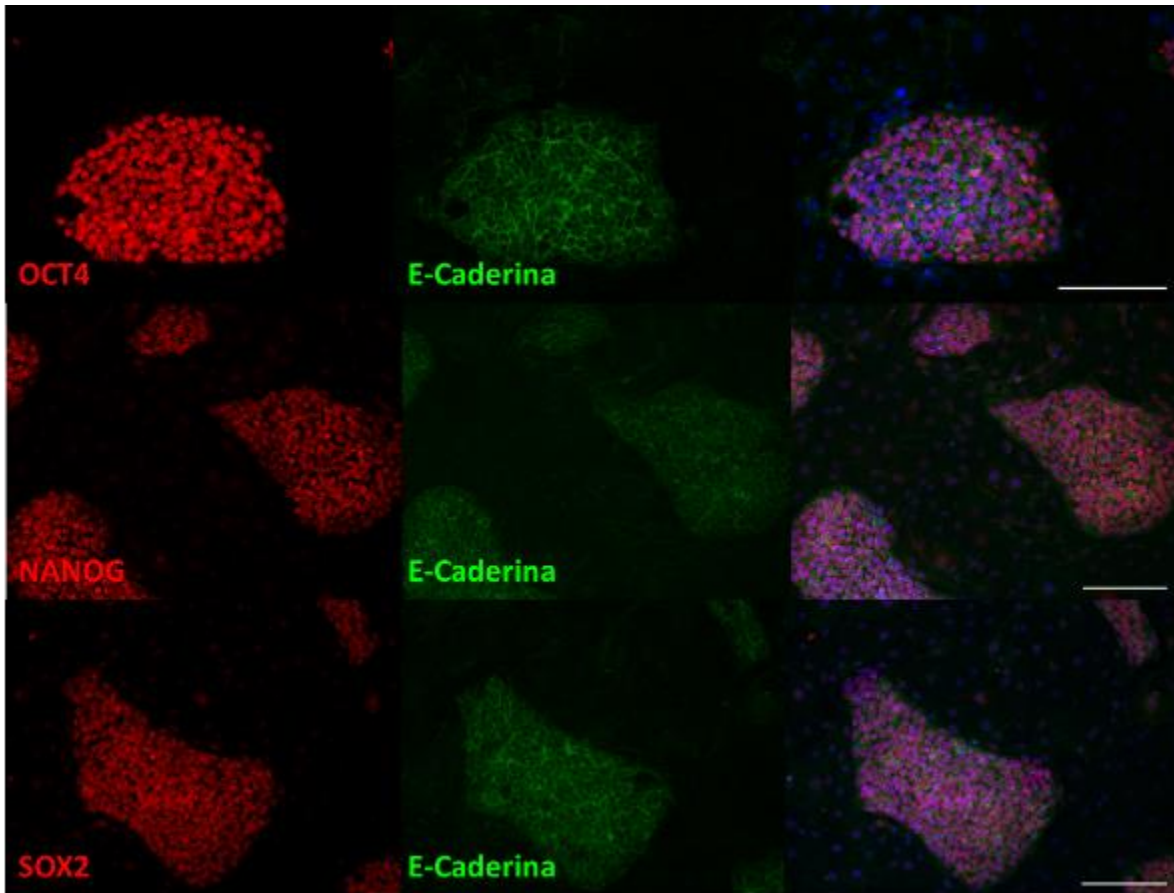


Figura 33. Expresión de E-Cadherina en la línea H9 sobre hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias de H9 sobre una capa de iMEF con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OSN) con la molécula de adhesión E-cadherina. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para E-cadherina las células presentan marcaje más periférico. Barra de calibración, 50 μ M.

Mantenimiento de las líneas Amicqui-1, H1 y H9 en condiciones libres de capa nodriza

Una vez que las tres líneas hESC fueron adaptadas a crecer sobre MEF y hAEC, se prosiguió con el mantenimiento en condiciones libres de capa nodriza (“*feeder-free*”), utilizando como soporte la matriz sintética Matrigel con MEF-CM o hAEC-CM. Cuando se utilizó el MEF-CM, la morfología de las tres líneas cambió de acuerdo a lo reportado en la literatura: en lugar de colonias compactas con células estrechas, las células fueron más grandes y alargadas, no formaron colonias compactas con bordes definidos y crecieron como una monocapa hasta alcanzar la confluencia (Figura 34).

A continuación, las células fueron cultivadas sobre Matrigel con hAEC-CM para determinar si el medio condicionado de las hAEC puede mantener la pluripotencia de hESC al igual que el MEF-CM. De forma interesante, las tres líneas mostraron la misma morfología que cuando fueron cultivadas con MEF-CM (Figura 35).

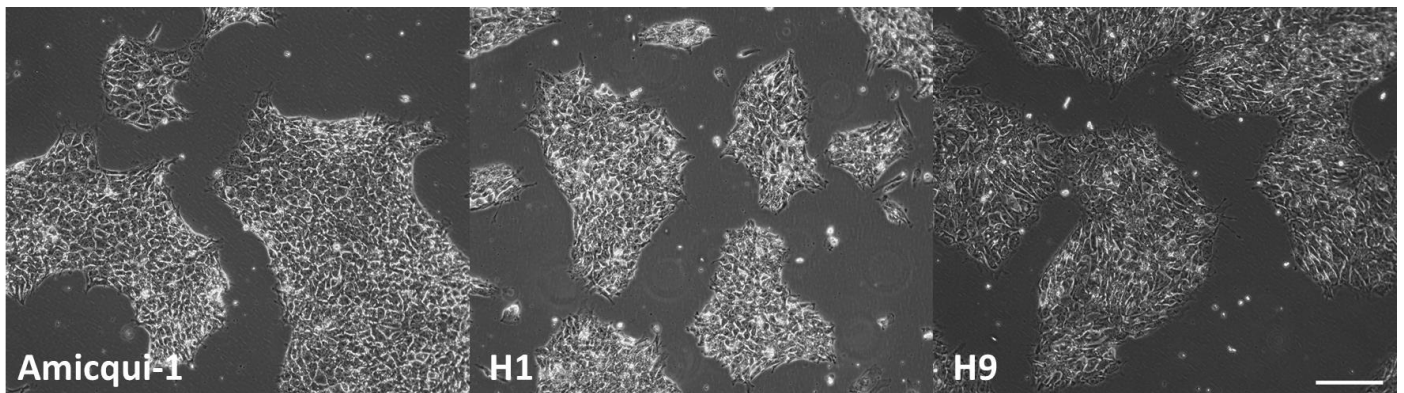


Figura 34. Morfología de líneas hESC en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado de MEF. Micrografías de campo claro (10x) de Amicqui-1, H1 y H9 al crecer sobre Matrigel con MEF-CM. Barra de calibración, 200 μ m.

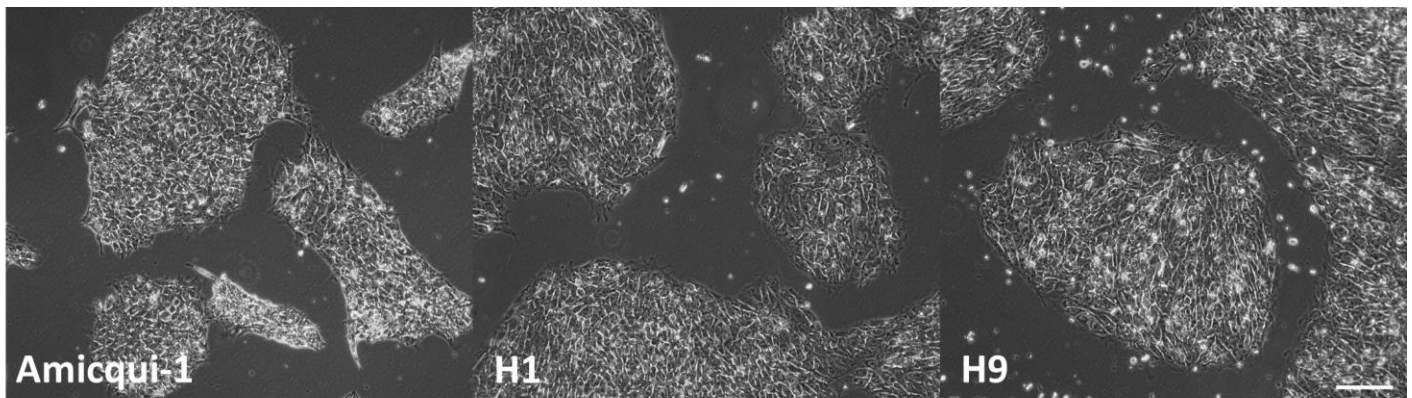


Figura 35. Morfología de líneas hESC en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado de hAEC. Micrografías de campo claro (10x) de Amicqui-1, H1 y H9 al crecer sobre Matrigel con hAEC-CM. Barra de calibración, 200 µm.

Posteriormente, se detectó mediante la técnica de inmunofluorescencia diversos marcadores de pluripotencia. Las tres líneas fueron positivas a la tríada OSN (Figura 36 para Amicqui-1, Figura 40 para H1 y Figura 44 para H9), así como a los antígenos de superficie Tra1-60, SSEA-4 y E-Cadherina (Figura 37 para Amicqui-1, Figura 41 para H1 y Figura 45 para H9) cuando crecieron con el MEF-CM. Cuando repetimos estos ensayos con las células creciendo con AEC-CM, obtuvimos resultados similares tanto para OSN (Figura 38 para Amicqui-1, Figura 42 para H1 y 46 para H9), como para los antígenos de superficie (Figura 39 para Amicqui-1, Figura 43 para H1 y Figura 47 para H9), lo que sugiere que la condición de AEC-CM puede soportar el mantenimiento de líneas pluripotentes de la misma forma que el MEF-CM.

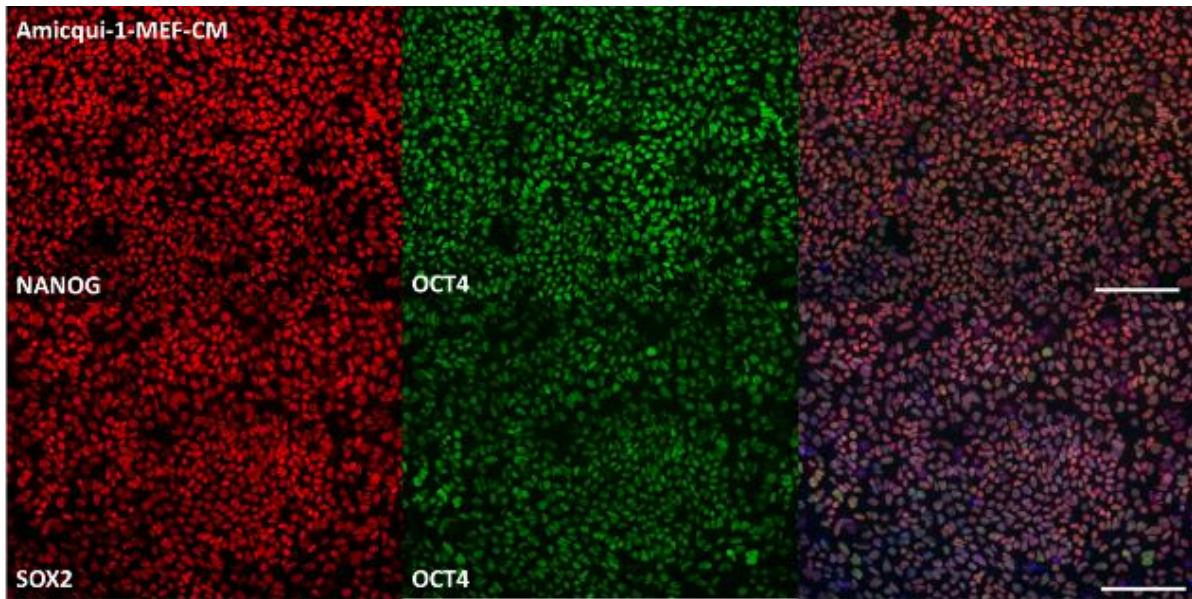


Figura 36. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea Amicqui-1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células Amicqui-1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μ m.

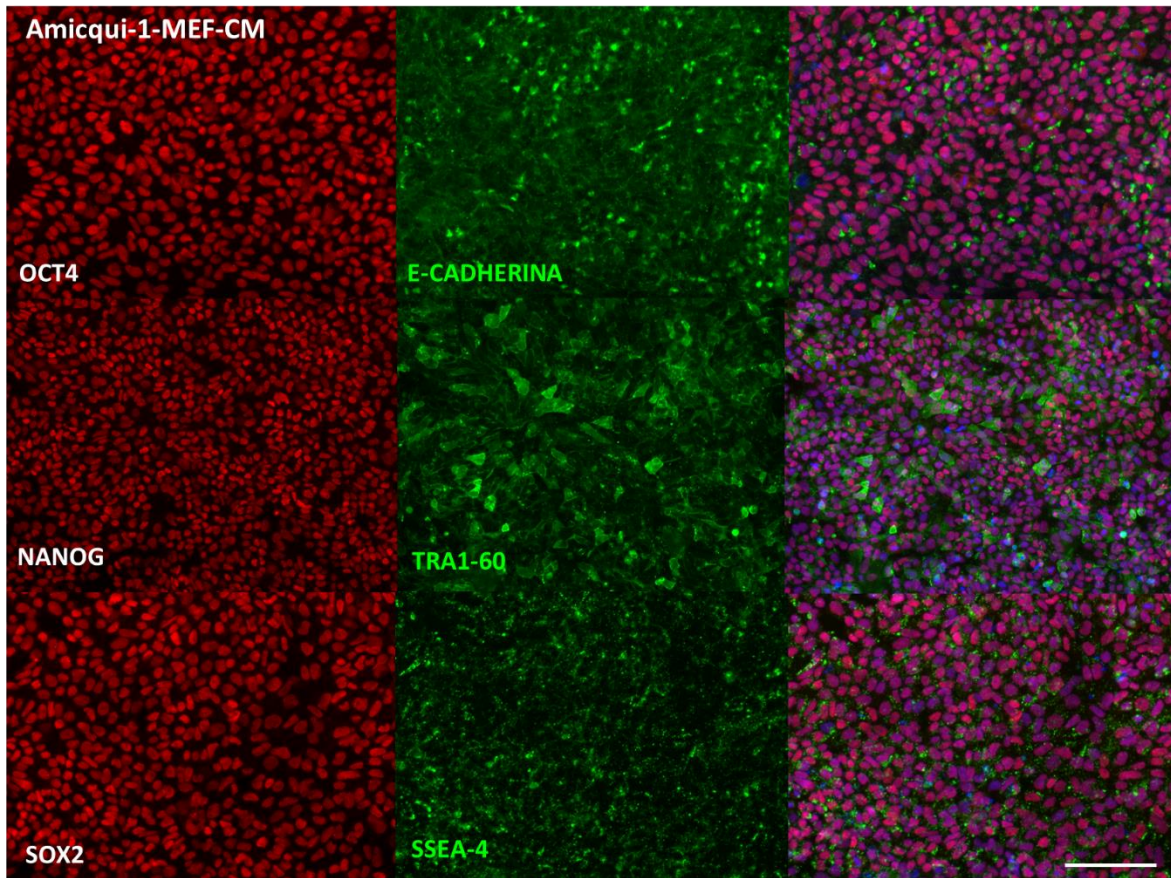


Figura 37. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea Amicqui-1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células Amicqui-1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μm .

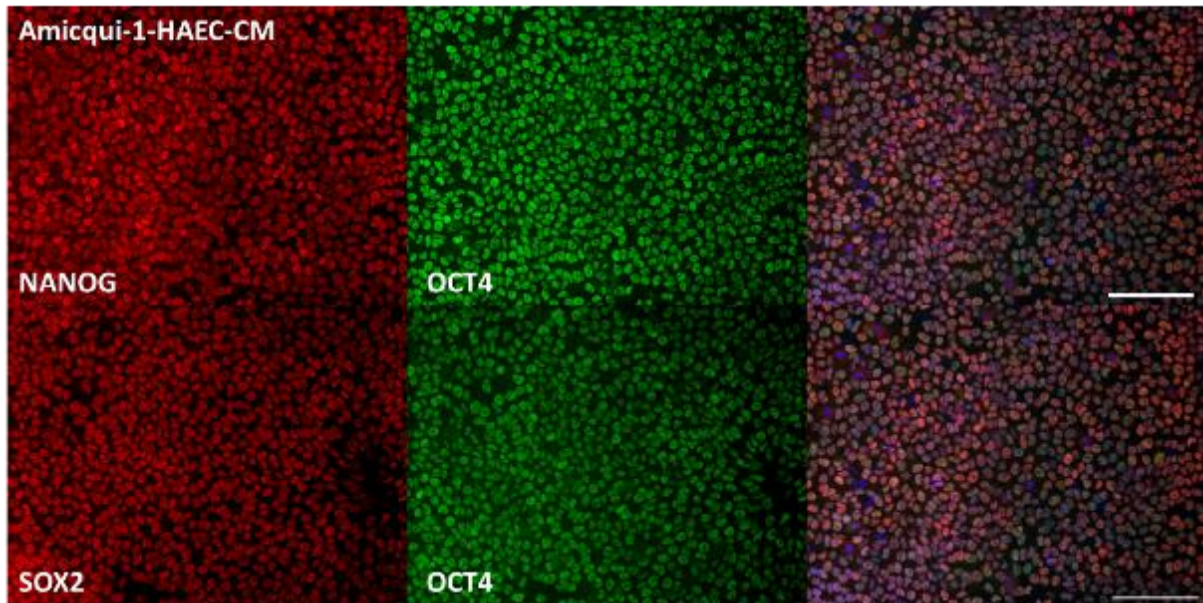


Figura 38. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea Amicqui-1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado HAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células Amicqui-1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con HAEC, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μm .

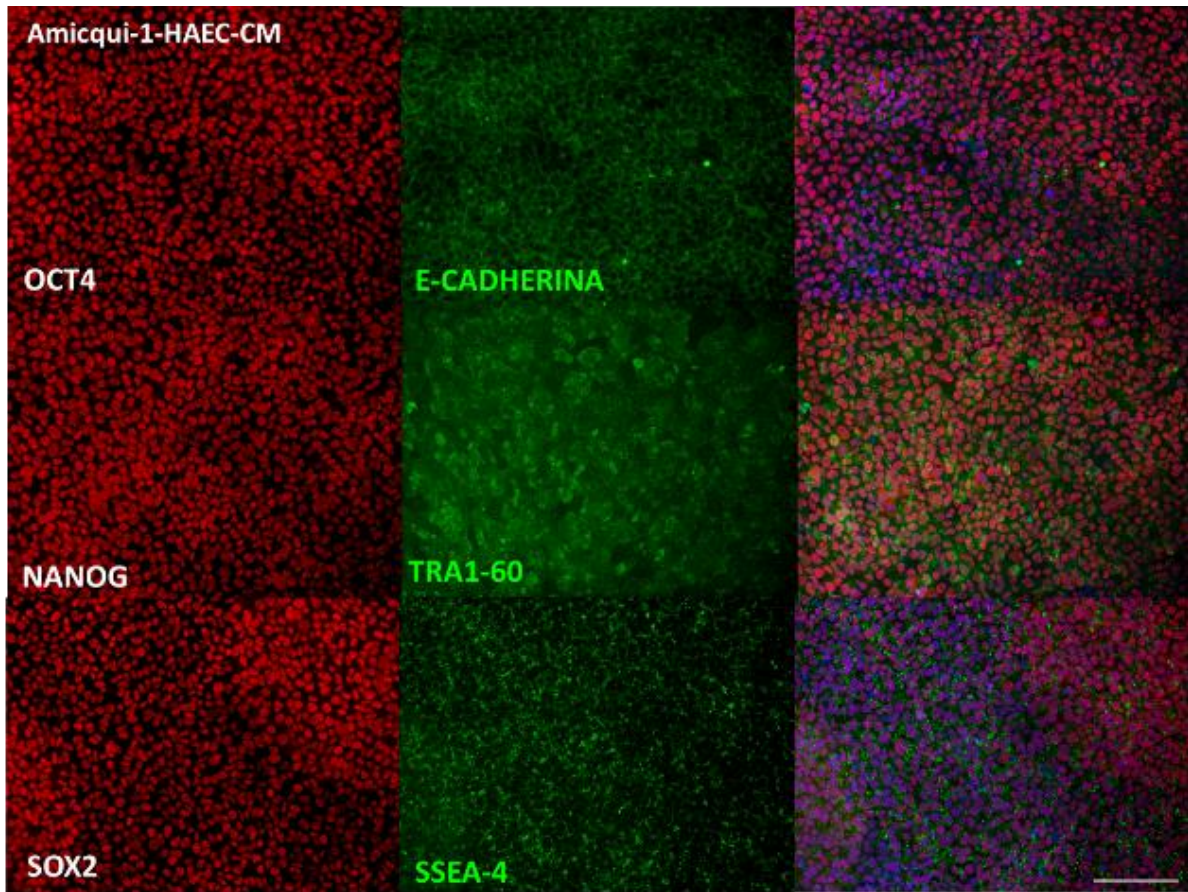


Figura 39. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea Amicqui-1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado HAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células Amicqui-1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con HAEC-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μm .

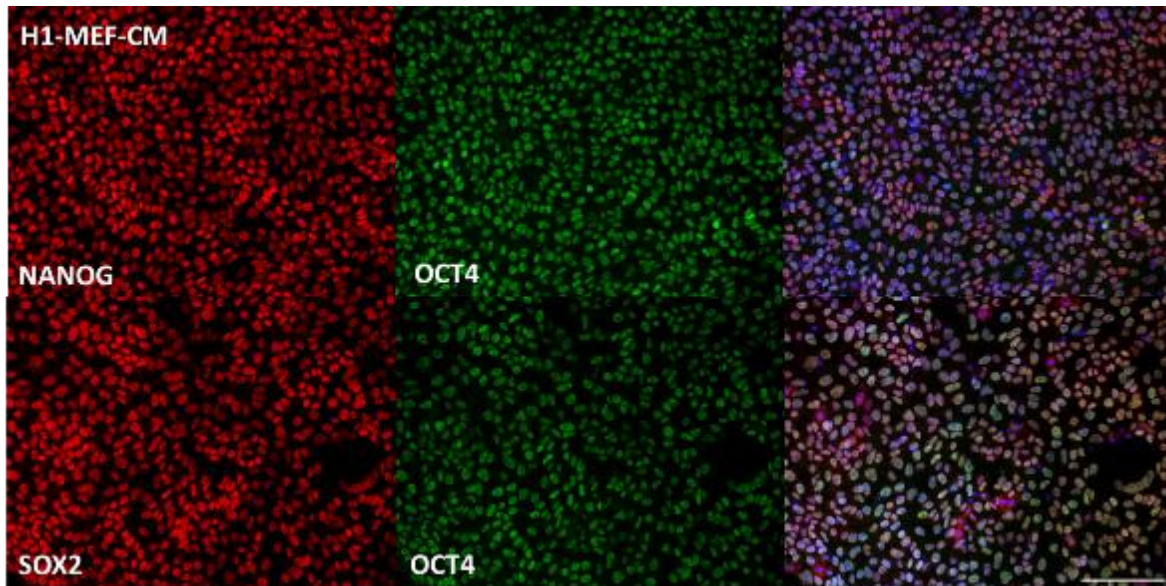


Figura 40. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea H1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μ m.

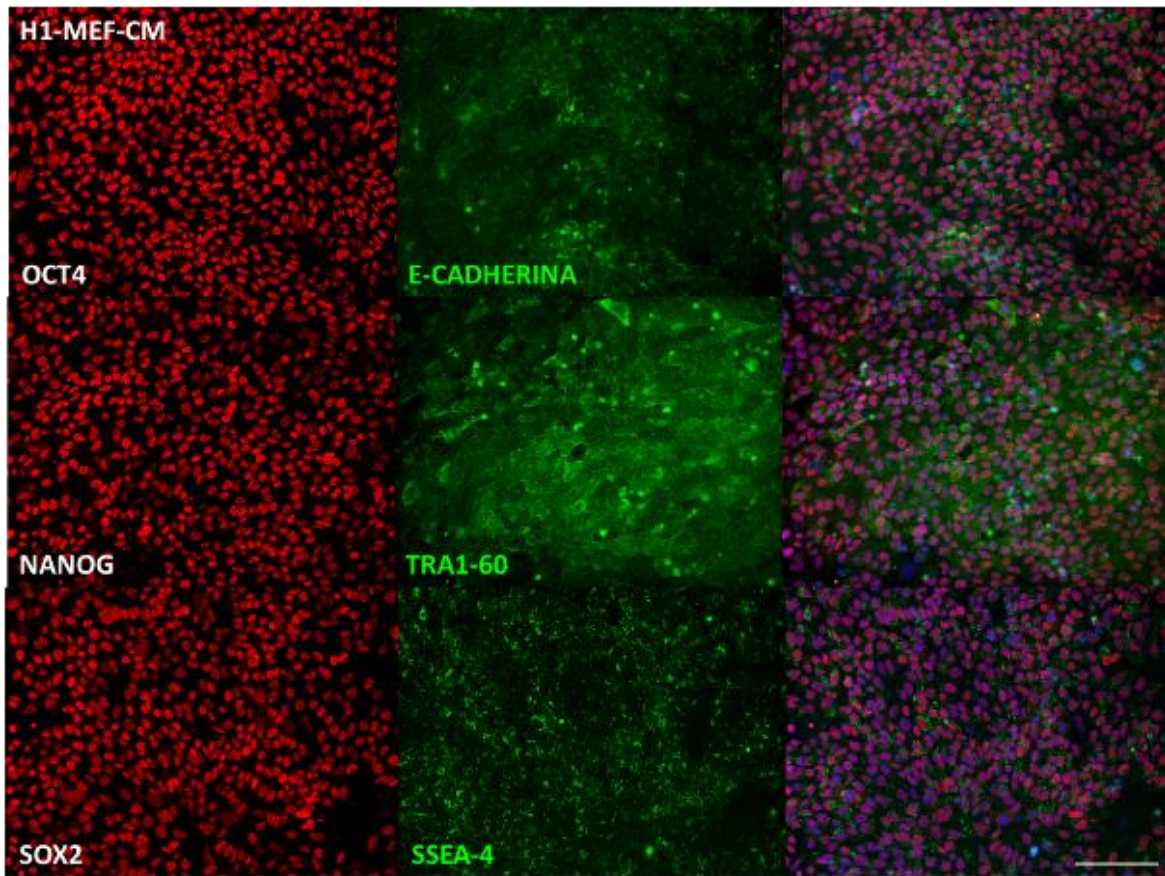


Figura 41. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea H1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μ m.

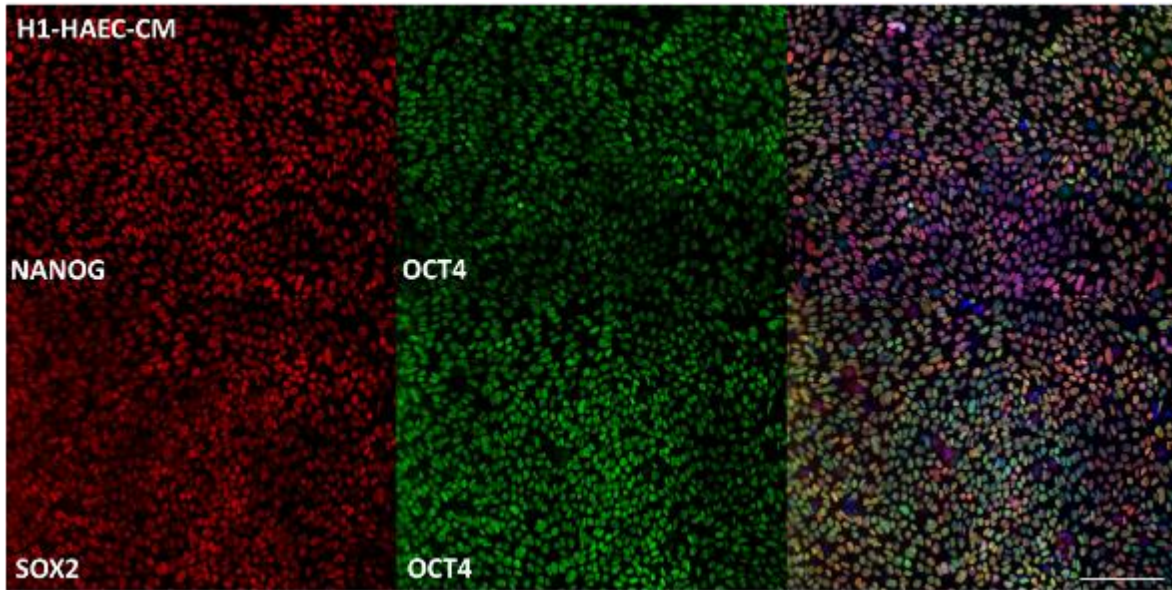


Figura 42. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea H1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado HAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con HAEC-CM, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μ m.

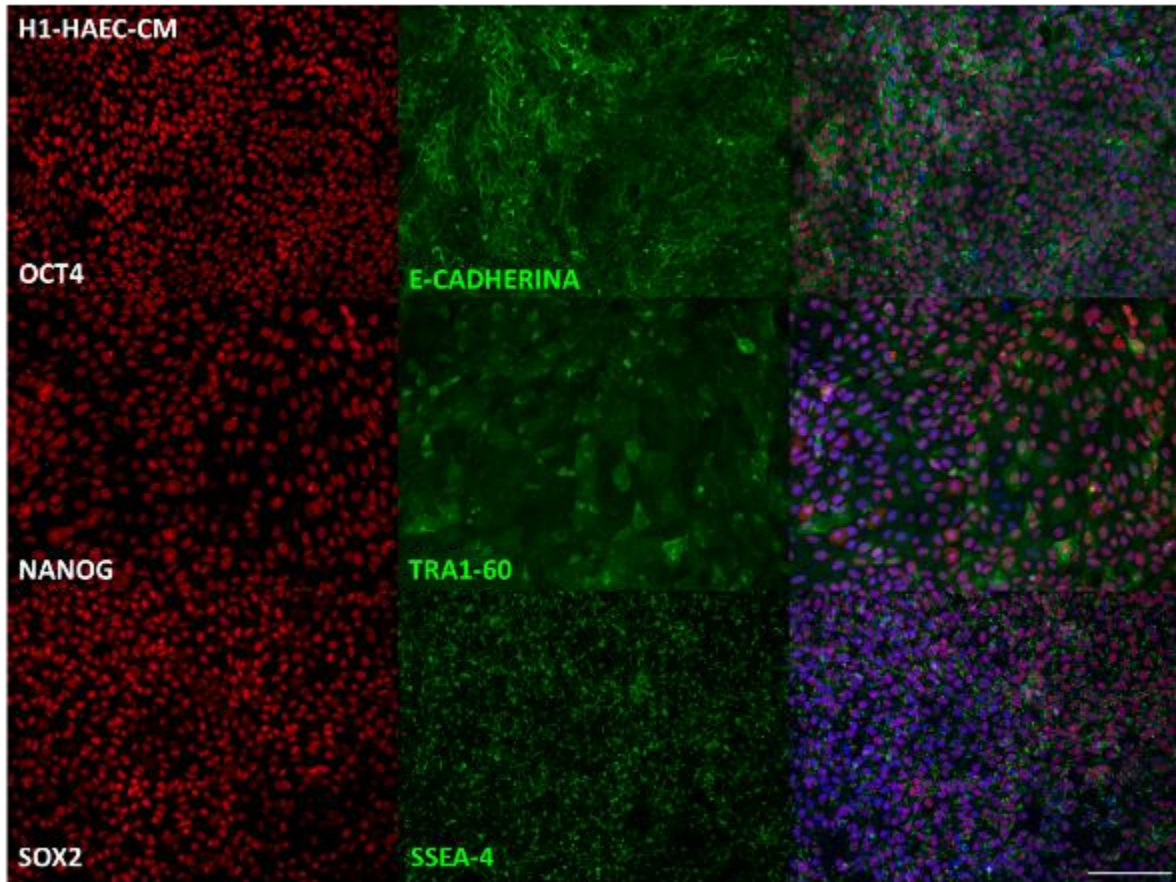


Figura 43. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea H1 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H1 creciendo en monocapa sobre Matrigel con hAEC-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μ m.

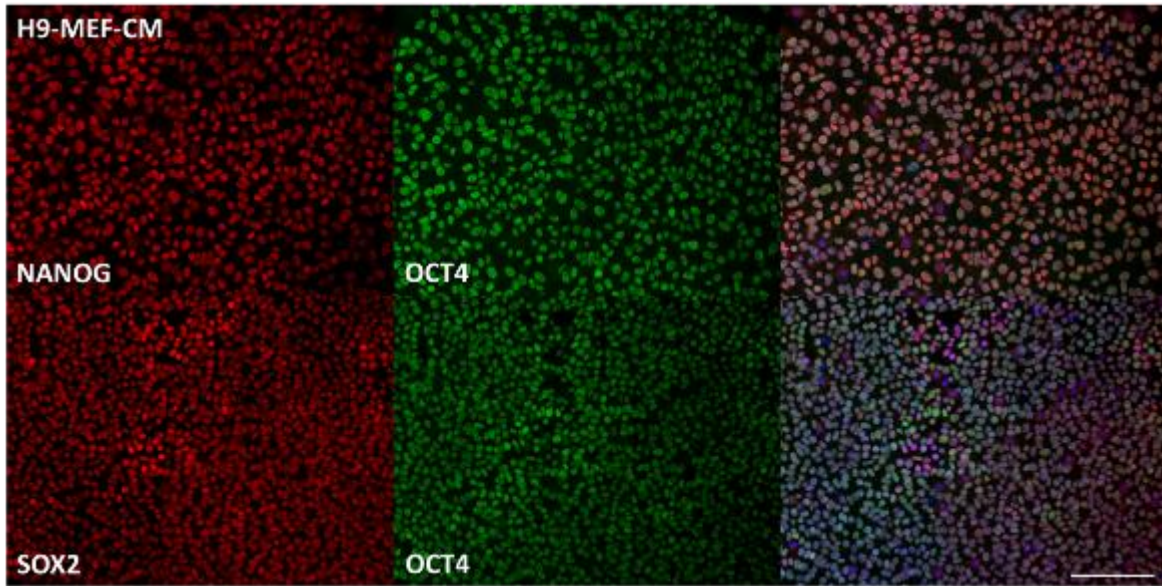


Figura 44. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea H9 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H9 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μ m.

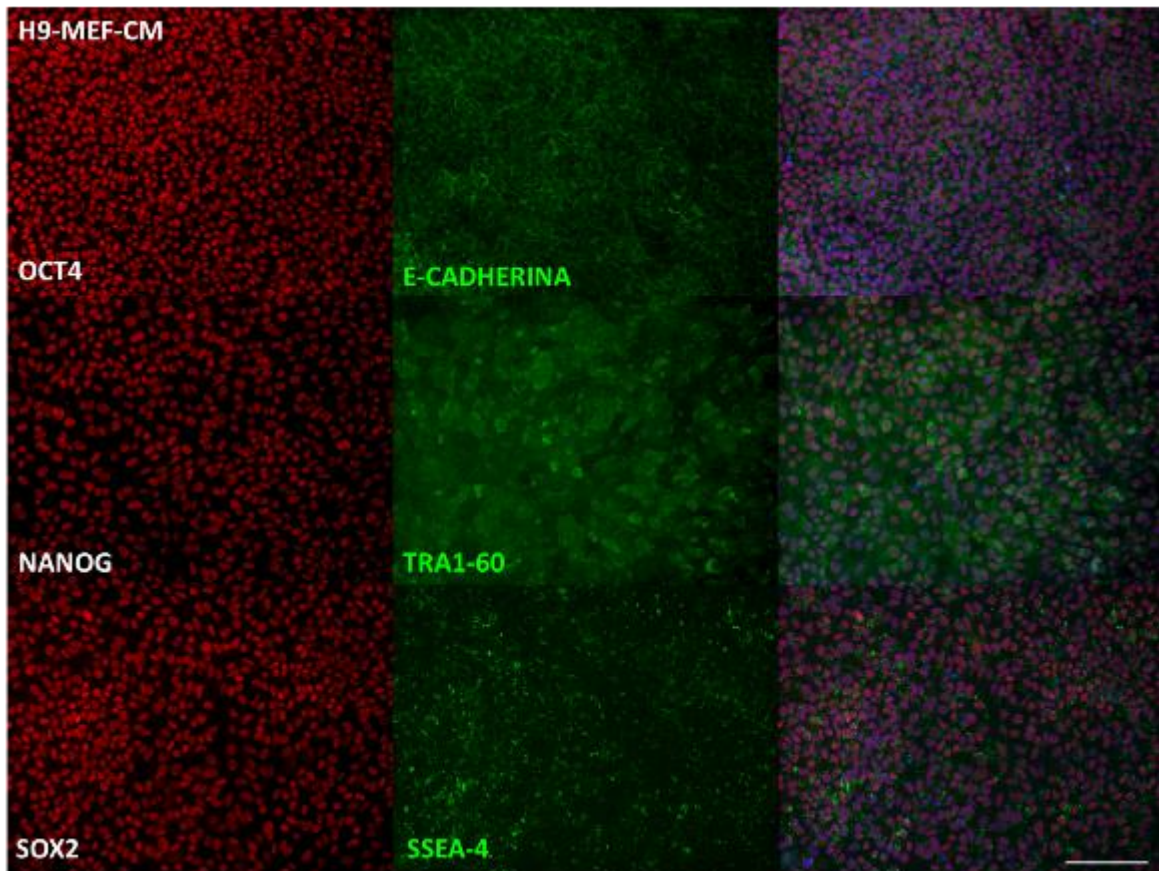


Figura 45. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea H9 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado MEF. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H9 creciendo en monocapa sobre Matrigel con MEF-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μm .

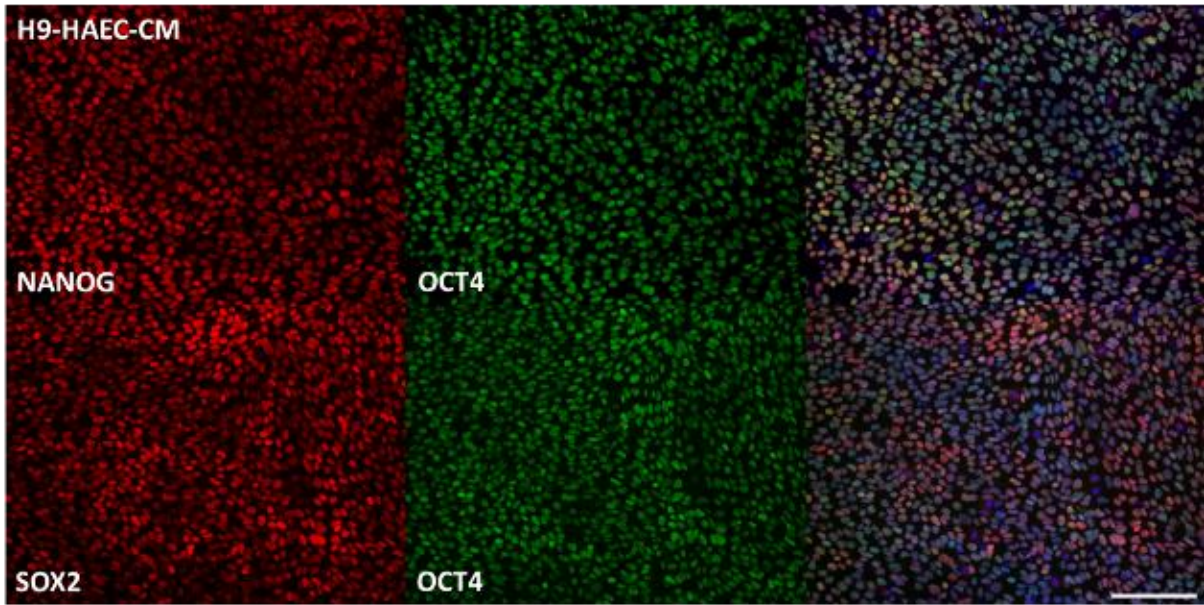


Figura 46. Presencia de los factores de transcripción relacionados con la pluripotencia en línea H9 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H9 creciendo en monocapa sobre Matrigel con hAEC-CM, donde se muestra la doble inmunotinción para NANOG con OCT4 y SOX2 con OCT4. Barra de calibración, 100 μ m.

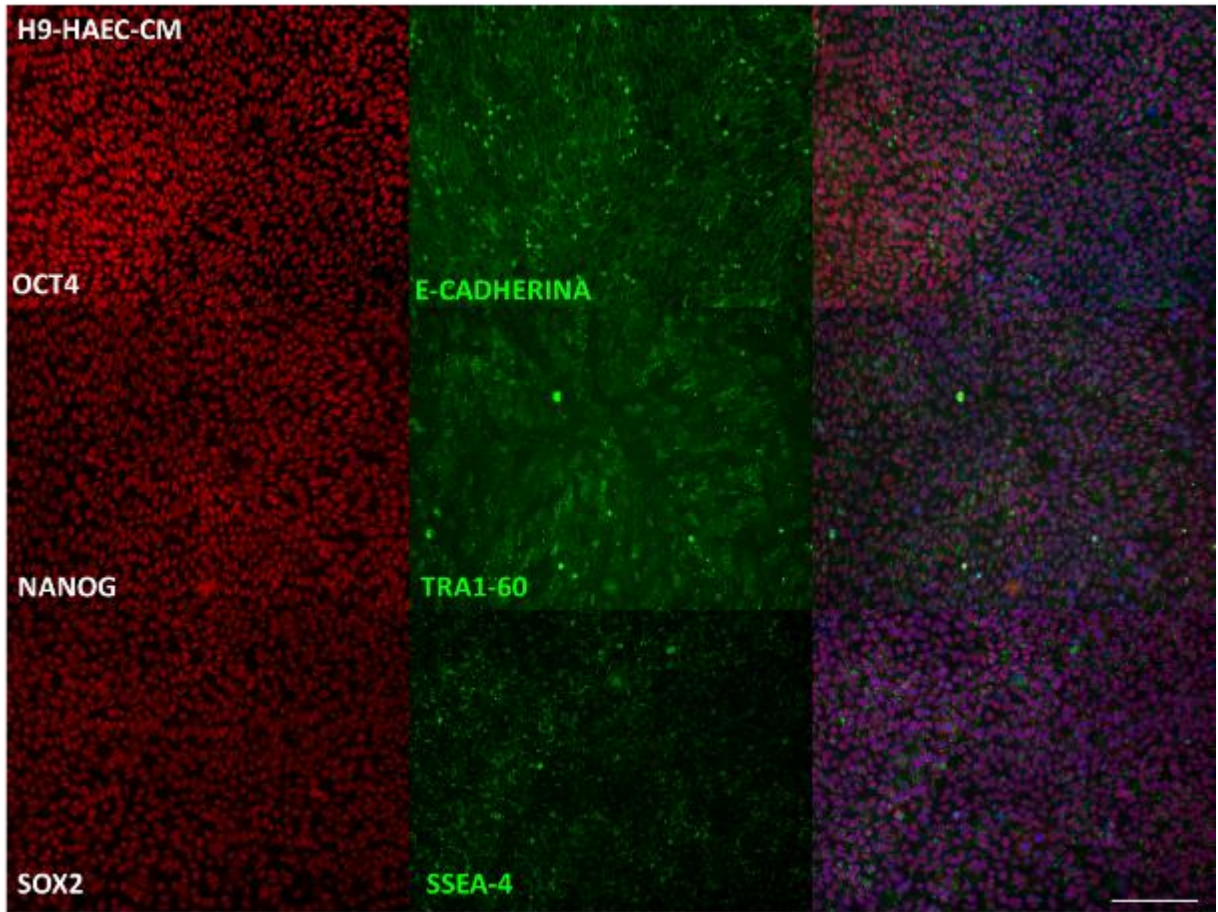


Figura 47. Presencia de los marcadores relacionados con la pluripotencia E-cadherina. TRA1-60 y SSEA-4 en línea H9 en condiciones libres de capa nodriza con medio condicionado hAEC. Micrografías (10x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de células H9 creciendo en monocapa sobre Matrigel con hAEC-CM, donde se muestra la doble inmunotinción de OCT4 con E-cadherina, NANOG con TRA1-60 y SOX2 con SSEA-4. Barra de calibración, 50 y 100 μ m.

Análisis Epi-Pluri-Score

Como se mencionó anteriormente, la técnica de formación de teratomas es considerada como el estándar de oro para demostrar la pluripotencia de células de origen humano. No obstante, en los últimos años se le ha atribuido a este ensayo una carencia en su estandarización, así como posibles problemas éticos por el uso de animales para inducir la formación de tumores, por lo que se han propuesto otras metodologías. Es por ello que en lugar de realizar los ensayos de formación de teratomas se utilizó el Epi-Pluri-Score.

Las muestras analizadas fueron las siguientes: en condiciones de capa nodriza Amicqui-1 sobre MEF y sobre hAEC, así como las líneas control H1 y H9 sobre MEF y hAEC; en condiciones *feeder-free* Amicqui-1 con MEF-CM o hAEC-CM; así como las dos líneas H1 y H9 con MEF-CM o hAEC-CM, y por último las células hAEC sin haber estado en cocultivo con las hESC.

El reporte del Epi-Pluri-Score determinó que todas las condiciones en que fueron sembradas las hESC fueron pluripotentes, con especial interés de las provenientes de las tres líneas que estuvieron sobre hAEC o con hAEC-CM, mientras que la capa nodriza hAEC que no tuvo interacción con hESC se reportó como somática (Figura 48).

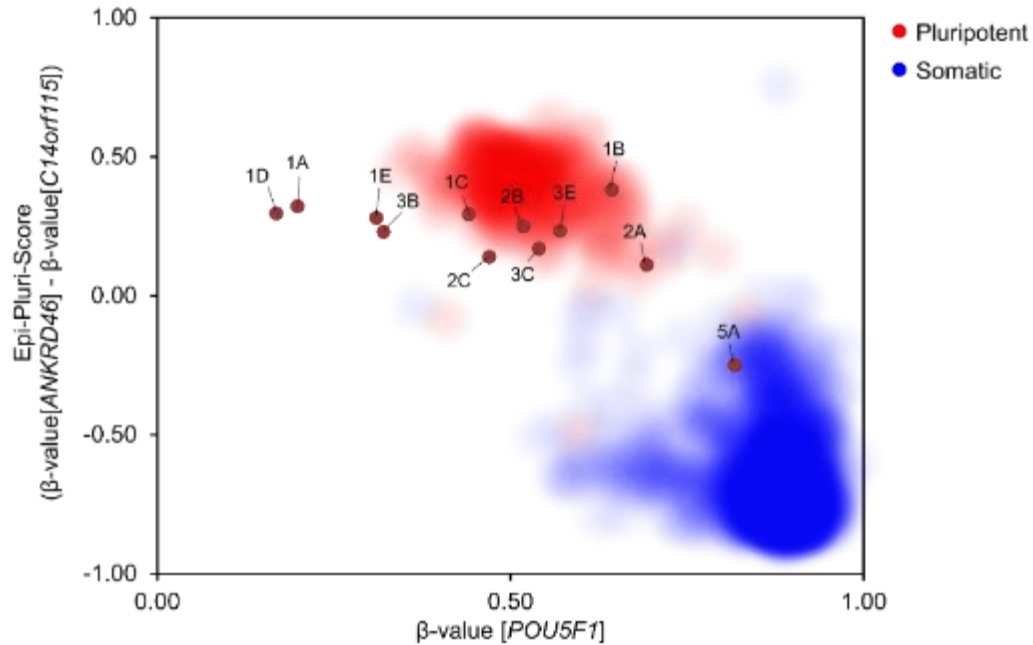


Figura 48. Determinación de la pluripotencia en líneas hESC a través del análisis Epi-Pluri-Score. Se analizó el nivel de metilación del DNA en tres sitios CpG específicos. Uno de estos sitios está localizado en el gen relacionado con la pluripotencia *POU5F1* (alias *OCT4*). Aunado a ello, el resultado del Epi-Pluri-Score para cada muestra es definido como el valor β de [ANKRD46] – valor β de [C14orf115] (Lenz et al., 2015). Las nubes de color rojo y azul se refieren a los perfiles de metilación del DNA (obtenidos con la plataforma de Illumina Human Methylation27 BeadChip) de 264 preparaciones de células pluripotentes y 1951 no pluripotentes, respectivamente. El Epi-Pluri-Score clasificó a las muestras 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 2A, 2B, 2C, 3B, 3C y 3E como pluripotentes. **1A**, Amicqui-1 sobre MEF; **1B**, H1 sobre MEF; **1C**, Amicqui-1 sobre hAEC; **1D**, Amicqui-1 con MEF-CM; **1E**, Amicqui-1 con hAEC-CM; **2A**, H9 sobre hAEC; **2B**, H9 sobre MEF; **2C**, H9 con hAEC-CM; **3B**, H1 con MEF-CM; **3C**, H1 sobre hAEC; **3E**, H1 con hAEC-CM; **5A**, hAEC.

Identificación de miRNAs relacionados con la pluripotencia en las células y en el medio de cultivo

Como una primera aproximación sobre el mecanismo por el cual las hAEC mantienen la pluripotencia en células humanas y una vez que comprobamos que las tres líneas se mantienen pluripotentes en cuatro diferentes condiciones de cultivo (sobre MEF, sobre hAEC, con MEF-CM y hAEC-CM), nos enfocamos en analizar la expresión de pluri-miRNAs bajo dichas condiciones. De esta forma, se buscó la presencia de miembros de la familia miR-92 (92a-3p, 92b-3p), miR-302 (302a, 302b, 302d) y miR-200c, tanto en las células como en el medio de cultivo de Amicqui-1 creciendo sobre MEF o hAEC. Las líneas H1 y H9 sobre iMEF fueron utilizadas como control positivo. De acuerdo a los resultados obtenidos mediante PCR de punto final, se detectó la presencia de bandas que corresponden al peso esperado del producto final de PCR (60-70 pb) de miR-92a y 92b; del cluster miR-302a-d y el miR-200c en la línea Amicqui-1 (en ambas condiciones de capa nodriza). Por lo que se refiere a las líneas H1 y H9 sobre iMEF (grupos control), también fueron detectados este conjunto de miRNAs. De manera interesante, la capa nodriza de hAEC por sí sola (sin haber estado en cocultivo con hESC) presentó algunos de los miRNAs evaluados (miR-92a, miR-302d, miR-200c) con excepción del cluster miR-302a/b/c (Figura 49). Las bandas de los productos obtenidos en los geles de agarosa se mandaron secuenciar para comprobar la amplificación de los productos esperados (Tabla 9). Con base en estos resultados, elegimos el miR-92a, miR-302d y miR-200c para medir su expresión relativa de las hESC en diferentes condiciones de cultivo.

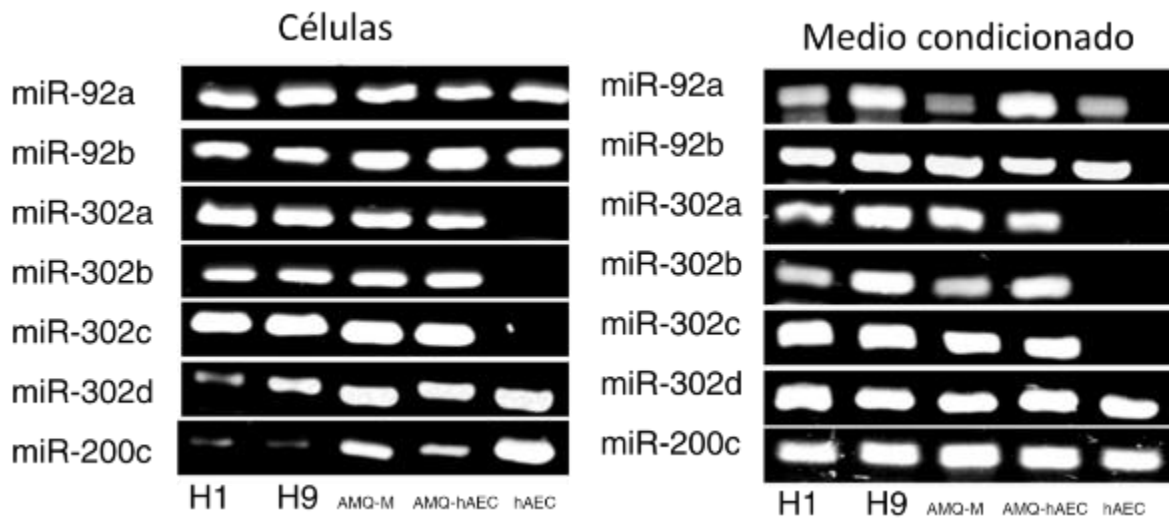


Figura 49. Presencia de miRNAs relacionados con la pluripotencia en las células y en el medio de cultivo de las hAEC. En geles de agarosa al 4% se corrió el producto final de PCRs en donde se amplificó con primers específicos para cada miRNA. Se puede observar que todas las líneas embrionarias presentan todos los miRNAs candidatos, en cambio, las hAEC no presentaron los miembros miR-302a, miR-302b y miR-302c.

Secuenciación de los productos de PCR para identificación de miRNAs

miR-92a	Query	1	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	22
	Sbjct	12	TATTGCACTTGTCCCGGCCTGT	33
miR-92b	Query	1	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC	22
	Sbjct	17	TATTGCACTCGTCCCGGCCTCC	38
miR-302a	Query	1	TAAGTGCTTCCATGTTTGGTGA	23
	Sbjct	111	TAAGTGCTTCCATGTTTGGTGA	133
miR-302b	Query	1	TAAGTGCTTCCATGTTTGTAGTAG	23
	Sbjct	78	TAAGTGCTTCCATGTTTGTAGTAG	100
miR-302c	Query	1	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG	23
	Sbjct	14	TAAGTGCTTCCATGTTTCAGTGG	36
miR-302d	Query	1	TAAGTGCTTCCATGTTTGAGTGT	23
	Sbjct	155	TAAGTGCTTCCATGTTTGAGTGT	133
miR-200c	Query	1	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	23
	Sbjct	163	TAATACTGCCGGGTAATGATGGA	141

Tabla 9. Los resultados de la secuenciación de los productos de PCR (Sbjct) de muestras hESC Amicqui-1 sobre hAEC se compararon con la secuencia de cada miRNA (Query) de la base de datos miRBase.org

Cuantificación de los niveles de miRNAs por qPCR

Antes de evaluar la expresión relativa de los pluri-miRNAs, se estandarizó el protocolo y se validó el método de cuantificación. Para ello, la eficiencia de las reacciones se llevó a cabo a través de los rangos dinámicos para cada uno de los miRNA utilizando concentraciones de 1,000, 100 y 10 ng/ul de cDNA. Los valores de CT variaron de acuerdo a las concentraciones de cDNA usadas, obteniendo los valores más bajos para 1,000 ng y los más altos para la concentración de 10 ng de cDNA. Al graficar los valores de CT para cada miRNA *versus* la concentración (10,

100 y 1000 ng/ μ l), se observó que las pendientes obtenidas presentan valores cercanos al valor óptimo esperado de -3.3 (Tabla 8 y Figuras suplementarias 1-4).

	cDNA (ng/ μ l)	CTs	Pendiente	r2	Eficiencia	Figura
hsa-miR-92a	1000	4.84				
	100	6.9	-3.26	0.95	1.03	17
	10	11.36				
hsa-miR-302d	1000	3.72				
	100	5.82	-3.22	0.96	1.04	18
	10	10.17				
hsa-miR-200c	1000	8.07				
	100	11.22	-3.13	0.99	1.08	19
	10	14.34				
ce-miR-39	1000	13.59				
	100	16.24	-2.8	0.99	1.27	20
	10	19.205				

Tabla 8. Resultados de los rangos dinámicos para cada miRNA. hsa: *Homo sapiens*, ce: *C. elegans*

Además, las eficiencias de las reacciones oscilaron entre 1.04 a 1.2, valores cercanos a 1, el cual es indicador de una eficiencia del 100%. Posteriormente, al graficar el logaritmo de la concentración conocida de cDNA *versus* el Δ Ct de cada muestra, se obtuvieron valores de pendiente cercanos a cero con cada uno de los miRNAs analizados (Figura Supl. 5), lo que nos indicó que las eficiencias entre los miRNAs (miR-92a, miR-302d y miR-200c) y el miRNA de referencia (miR-39) son similares. Una vez validada la eficiencia de las amplificaciones se procedió a analizar las muestras de los diversos grupos experimentales (Figura 6). Para cada línea se usaron las cuatro condiciones de cultivo (sobre iMEF [M], Matrigel con MEF-CM [M-CM], sobre hAEC [A] y Matrigel con hAEC-CM [A-CM]), con la condición sobre M como control.

Para el caso de los niveles de miR-92a presente en las células de H1, H9 y Amicqui no se detectaron diferencias entre las cuatro condiciones. Sin embargo, en el medio de cultivo de H1 se encontró un aumento de los niveles del miRNA en las condiciones M-CM, A y A-CM (Figura 50A); este mismo fenómeno ocurrió para

Amicqui-1 (Figura 50C), mientras que para H9 solo se detectó un incremento en la condición M-CM (Figura 50B). En cuanto a los niveles de miR-302d en las células, no se encontró diferencias entre las cuatro condiciones para las tres líneas. No obstante, en el medio de cultivo la condición A-CM presentó los valores más altos y significativos para todas las líneas, aunque la línea H9 en M-CM, también fue diferente respecto a su control (Figura 51). Finalmente, la cuantificación de miR-200c demostró que no hubo diferencias en el medio de cultivo de todas las hESC bajo todas las condiciones, a diferencia de los otros dos miRNAs; mientras que en las células sí hubo cambios en los niveles de miR-200c cuando las tres líneas fueron cultivadas en condiciones *feeder-free* con A-CM, mientras que H9 y Amicqui-1 sobre hAEC también presentaron niveles más altos a comparación de su respectivo control (para H1-AEC hubo tendencia a incrementar pero no fue significativo) (Figura 52). Por último, dado que se encontraron diferencias significativas en las células de este miRNA, se presenta en una misma gráfica los niveles relativos de miR-200c de las tres líneas, así como de las capas nodrizas. De manera interesante, los datos muestran que las hAEC presentaron los niveles más altos de este miRNA (Figura 53).

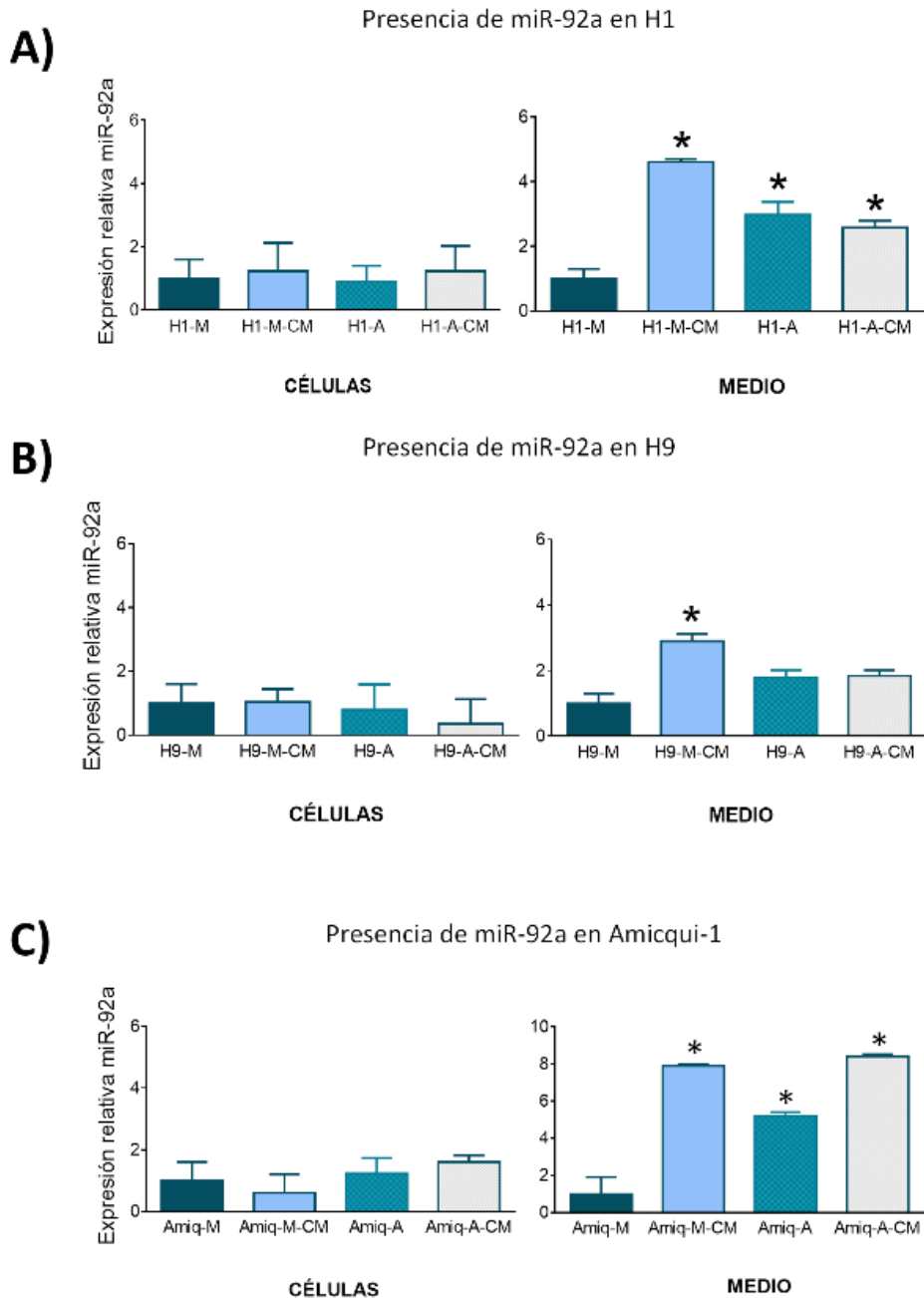


Figura 50. Expresión de miR-92a en H1, H9 y Amicqui-1 mantenidas en diferentes condiciones de cultivo. A) H1-M, H1 sobre MEF; H1-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H1-A, H1 sobre hAEC; H1-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. B) H9-M, H1 sobre MEF; H9-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H9-A, H1 sobre hAEC; H9-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. C) A) Amiq-M, Amicqui-1 sobre MEF; Amiq-M-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel y MEF-CM; Amiq-A, Amicqui-1 sobre hAEC; Amiq-A-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel con hAEC-CM. La muestra calibradora en cada gráfica corresponde a la condición sobre MEF. $P > 0.0001$.

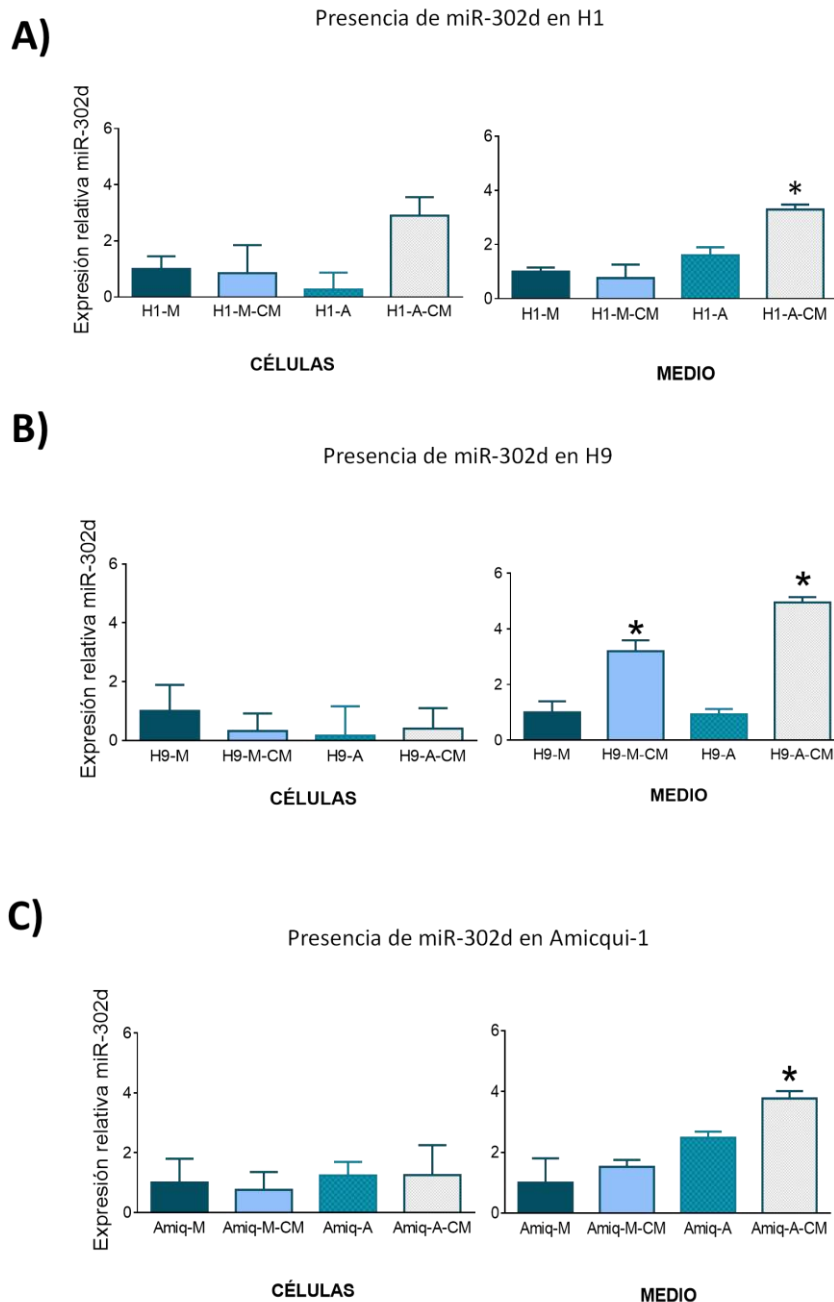


Figura 51. Expresión de miR-302d en H1, H9 y Amicqui-1 mantenidas en diferentes condiciones de cultivo. A) H1-M, H1 sobre MEF; H1-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H1-A, H1 sobre hAEC; H1-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. B) H9-M, H1 sobre MEF; H9-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H9-A, H1 sobre hAEC; H9-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. C) A) Amiq-M, Amicqui-1 sobre MEF; Amiq-M-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel y MEF-CM; Amiq-A, Amicqui-1 sobre hAEC; Amiq-A-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel con hAEC-CM. La muestra calibradora en cada gráfica corresponde a la condición sobre MEF. $P > 0.0001$.

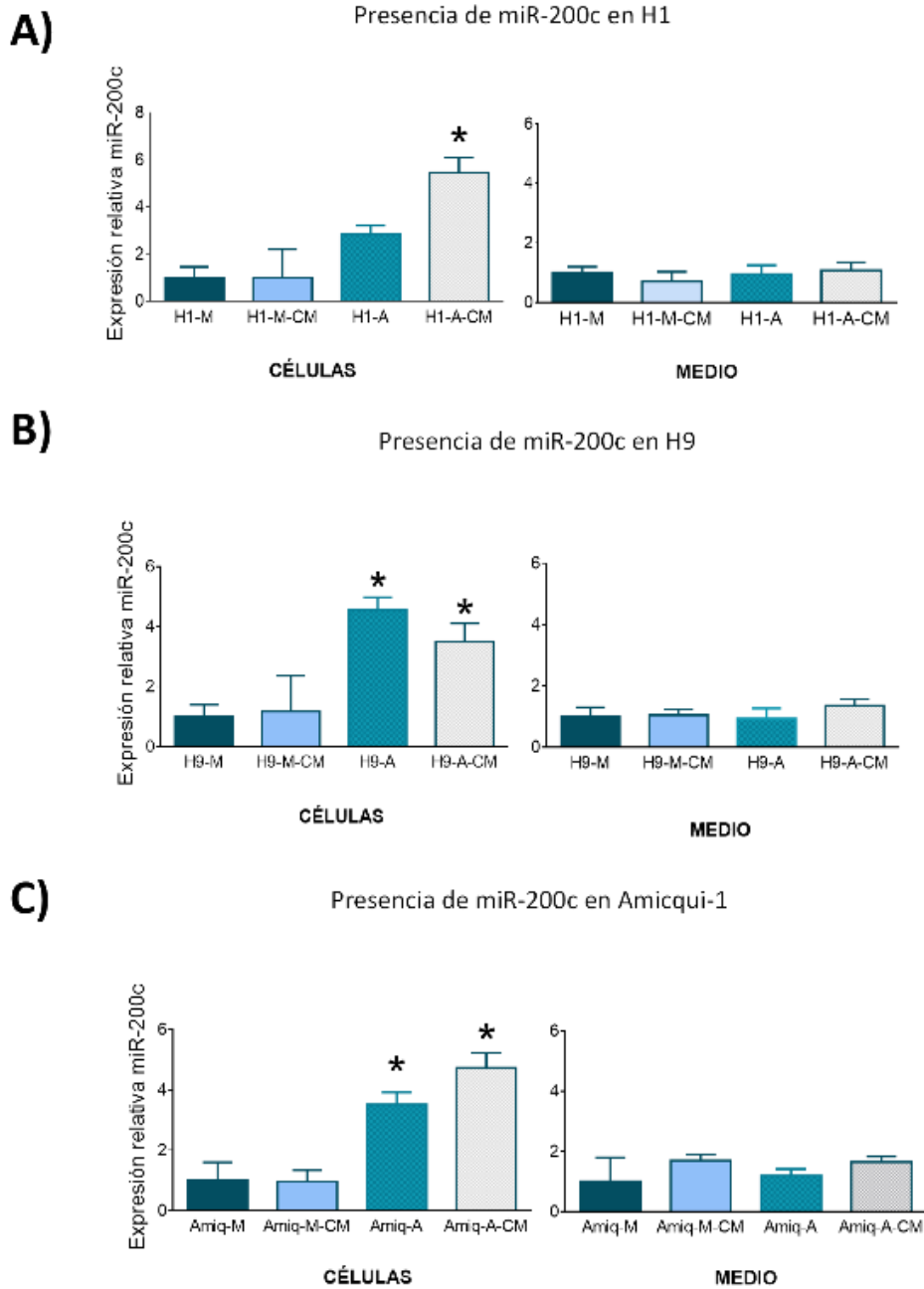


Figura 52. Expresión de miR-200c en H1, H9 y Amicqui-1 mantenidas en diferentes condiciones de cultivo. A) H1-M, H1 sobre MEF; H1-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H1-A, H1 sobre hAEC; H1-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. B) H9-M, H1 sobre MEF; H9-M-CM, H1 sobre Matrigel y MEF-CM; H9-A, H1 sobre hAEC; H9-A-CM, H1 sobre Matrigel con hAEC-CM. C) A) Amiq-M, Amicqui-1 sobre MEF; Amiq-M-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel y MEF-CM; Amiq-A, Amicqui-1 sobre hAEC; Amiq-A-CM, Amicqui-1 sobre Matrigel con hAEC-CM. La muestra calibradora en cada gráfica corresponde a la condición sobre MEF. $P > 0.0001$.

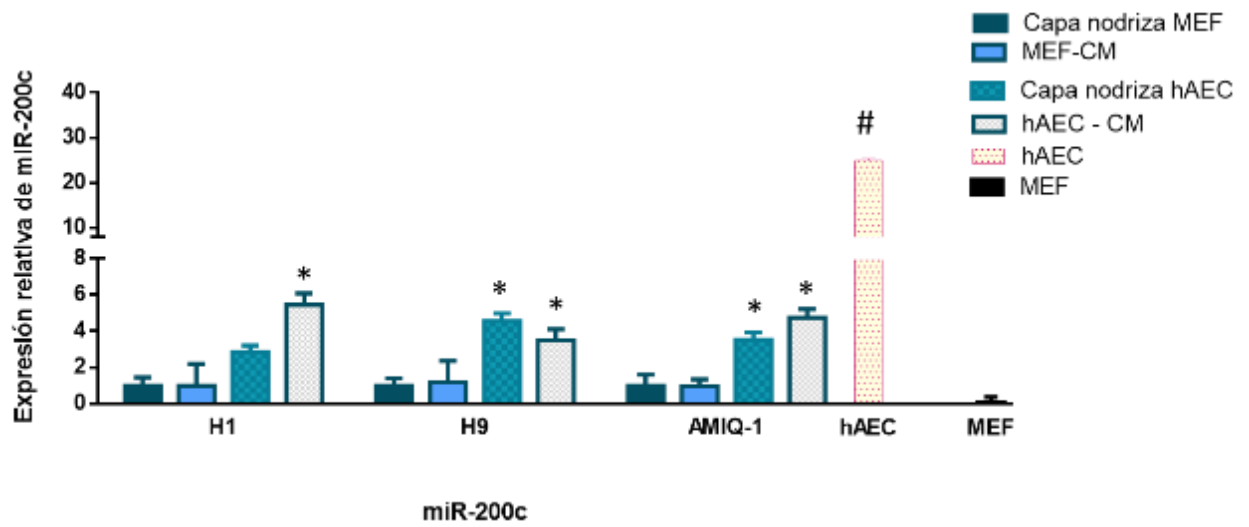


Figura 53. Expresión relativa de miR-200c en líneas hESC al crecer en diferentes capas nodrizas (MEF o hAEC) o en condiciones libres de capa nodriza (MEC-CM o hAEC-CM) así como en las hAEC. * $p < 0.001$, # $p < 0.0001$.

DISCUSIÓN

En este trabajo el objetivo principal fue la derivación y mantenimiento de hESC sobre una capa nodriza de hAEC utilizando como fuente embriones de mala calidad, esto como una aportación para resolver algunos de los problemas en la investigación básica con hPSC y específicamente con hESC, entre ellos, la falta de disponibilidad de líneas, el uso de componentes animales para su cultivo y los debates éticos en torno a la derivación de ellas, lo cual sería el principio de prueba para su posterior uso en la medicina regenerativa. La mayoría de las líneas que se utilizan actualmente en la investigación provienen de poblaciones caucásicas o del este de Asia (Mosher et al., 2010), lo cual representa un punto crítico para su futuro uso en la terapia celular, así como en las diversas aplicaciones de las hESC en la investigación biomédica. Por ejemplo, en fármacogenética se ha demostrado que la variación génica que distingue a las diversas poblaciones humanas induce a que no respondan de la misma forma a una droga, afectando su eficacia así como el incremento de reacciones adversas para ciertos grupos étnicos (Weinshilboum, 2003). De esta forma, el uso de las líneas actuales de hESC como modelo para evaluar el efecto de drogas nuevas, solo beneficiaría a poblaciones específicas. De hecho, para Latinoamérica hasta el 2014 se había reportado solo tres líneas hESC de origen brasileño aunque para octubre del 2016 se publicó un trabajo del establecimiento de 23 líneas hiPSC de individuos procedentes de dicho país (Fraga et al., 2011, de Oliveira Georges et al., 2014, Tofoli et al., 2016). No obstante, se ha demostrado que las hiPSC poseen un número significativo de mutaciones cromosómicas, ya sea debido a los métodos de reprogramación o por su origen somático, por lo que las hiPSC no pueden equipararse a las hESC para el estudio de la pluripotencia humana (Lo Sardo et al., 2017).

Estos reportes resaltan el interés por derivar líneas con nuevos genotipos, hasta nuestro conocimiento, Amicqui-1 es la única línea obtenida de la población mexicana, aunque es necesario resaltar que no se realizó el genotipo, pero de acuerdo a estadísticas proporcionadas por el INPer, más del 99% de los pacientes

que se han atendido en la Unidad de Reproducción Asistida es de origen mexicano (Avila-Gonzalez et al., 2015).

Por otro lado, existe un dilema ético en torno a la investigación con hESC, ya que para la obtención de líneas la mayoría de los protocolos implica la posible destrucción de un embrión humano. Si bien el *status* moral del embrión humano todavía sigue en debate, varios grupos de investigación han propuesto el uso de los embriones de mala calidad como una fuente para la derivación de nuevas líneas (Mitalipova et al., 2003, Lerou et al., 2008a, Liu et al., 2009, Strom et al., 2010, Wang et al., 2012a, Wang et al., 2012b, Bradley et al., 2014). Hasta el día de hoy, en Reproducción Asistida el criterio estándar para la selección de embriones a implantar se basa exclusivamente en caracteres morfológicos. Las características como el arresto celular, así como una excesiva fragmentación son indicativos del bajo potencial de los embriones, puesto que se ha demostrado que los que presentan dichas características tienen porcentajes mucho más bajos para la obtención de un embarazo bioquímico en comparación con los que presentan una morfología adecuada, en consecuencia, no se consideran aptos para su implantación, ni para su criopreservación y son descartados de forma rutinaria en Reproducción Asistida como desecho médico (Racowsky et al., 2003). Sin embargo, la falta de embriones de buena calidad donados para la investigación, así como las objeciones éticas han conducido a que los embriones descartados sean considerados de forma más frecuente para la derivación de líneas, aunque la tasa de éxito sea mucho más baja (Taei et al., 2010). *vgr.*, en trabajos previos, para la derivación de líneas a partir de embriones del día 3 de mala calidad se obtuvieron eficiencias que van desde 0.3% (Genbacev et al., 2005), 1.4% (Lerou et al., 2008b), 1.5% (Chen et al., 2005b), hasta el 2.4% (Liu et al., 2009). Además, cabe mencionar que en estos trabajos se utilizó una capa nodriza iMEF para la derivación y el mantenimiento de las colonias. En este proyecto obtuvimos una línea hESC con cariotipo 46, XY, después de haber cultivado sobre hAEC 64 embriones descartados de la Unidad de Reproducción Asistida del INPer, por lo que la eficiencia fue del 1.56%, la cual entra dentro del rango de eficiencia que reportaron los otros grupos de investigación.

Por otra parte, durante los procesos de IVF, se ha observado que el porcentaje de embriones con anormalidades cromosómicas como la aneuploidía es mayor en los de mala calidad, lo que sugiere un efecto negativo de la aneuploidía en el desarrollo del embrión y una probable causa de las alteraciones morfológicas que se observan *in vitro* (Alfarawati et al., 2011). Con este planteamiento, se podría inferir que el cultivo de cigotos de mala calidad resultaría en la obtención de “líneas hESC anormales”. Sin embargo, existen reportes en la literatura en donde embriones descartados aneuploides fueron utilizados para la derivación de líneas y de manera sorprendente, el análisis del cariotipo demostró que las células tenían genotipos normales, además de presentar los marcadores de pluripotencia y la capacidad de diferenciarse hacia los tres linajes embrionarios (Bradley et al., 2014, Taei et al., 2010, Lavon et al., 2008).

Se han postulado diversas hipótesis para explicar por qué las líneas hESC son aparentemente normales a pesar del uso de embriones de mala calidad. Estos cigotos suelen tener un mosaicismo de células diploides y aneuploides, así que un probable mecanismo para la estabilización de células pluripotentes *in vitro* sería que las células anormales del cigoto solamente contribuirían al trofoectodermo, mientras que las que formarían propiamente el embrión no presentan alteraciones (Bazrgar et al., 2013). Otra posibilidad es que la derivación es un proceso selectivo de las células que formarán la línea hESC. i.e, en la etapa de segmentación del cigoto la aneuploidía correlaciona con un arresto celular, de modo que este letargo en la división podría ser un mecanismo para la selección de células diploides *versus* aneuploides en cultivo (Munne, 2006). De hecho, se ha reportado que durante el proceso de derivación con cigotos con células anormales, las poblaciones con cariotipo euploide van incrementando a lo largo de los primeros pasajes, hasta la estabilización de una línea hESC sin aneuploidías (Munne et al., 2005). Asimismo, no se descarta la posibilidad que la obtención de líneas “estables” gira en torno al incremento de la expresión de genes de reparación del DNA que son necesarios para el control de la división celular en las hESC (Maynard et al., 2008).

Estos trabajos, así como los presentes resultados sugieren que los cigotos de mala calidad pueden ser utilizados para generar líneas que no tengan diferencias

con las obtenidas a partir de embriones de buena calidad, dado que durante la derivación podrían darse una serie de procesos de selección, reparación o de adaptación a las condiciones de cultivo (Bazrgar et al., 2013). No obstante, faltaría verificar la estabilidad del cariotipo mediante técnicas con una mayor resolución (como la hibridación *in situ* fluorescente) para la detección de pequeñas deleciones y duplicaciones.

Además de la calidad morfológica del cigoto, existe un diverso número de variables (edad de la donadora, calidad del ovocito y del espermatozoide, tipo de tratamiento hormonal para la obtención de óvulos, entre otras) que hace difícil la detección de un parámetro que sea fundamental para la derivación de hESC. Aunado a esto, diversos estudios reportan que no existen disimilitudes entre las hESC obtenidas de diferentes estadios (8-células, mórula, blastocisto), lo que sugiere que no importa la fuente embrionaria ni su calidad, siempre y cuando corresponda con la ventana de tiempo de la pluripotencia durante el desarrollo del embrión preimplantación. De esta forma, serían las condiciones de cultivo las que podrían influir de forma definitiva para obtener las líneas pluripotentes (Strom et al., 2010, Giritharan et al., 2011).

Actualmente, las hESC así como otros tipos de hPSC requieren de un sistema de cultivo complejo que incluye un medio enriquecido con diversos componentes, así como un sustrato sobre el que puedan mantenerse. Las capas nodrizas soportan el crecimiento de las líneas al producir factores de crecimiento y proveer moléculas de adhesión y componentes de la matriz extracelular para la adhesión de las células. La capa nodriza de iMEF es la que se utiliza de forma más frecuente para el mantenimiento rutinario de diferentes tipos de células pluripotentes (Mallon et al., 2006), pero los MEF constan de subpoblaciones heterogéneas, además de ser un componente xénico para el cultivo de células humanas (Chen et al., 2014b), por lo que en este trabajo sugerimos a las hAEC como capa nodriza, demostrando que en efecto estas células son capaces de mantener la pluripotencia de las hESC. Al comparar con los iMEF, el uso de hAEC conlleva diferentes ventajas, dado que posee diversas propiedades que las hacen aptas como capa nodriza. Por ejemplo, estas células expresan varias proteínas antiangiogénicas y

antiinflamatorias, como el antagonista del receptor a interleucina 1 (inhibiendo la inflamación mediada por interleucina 1), lactoferrina (la cual suprime la producción de la citosina proinflamatoria interleucina 6) e inhibidores de metaloproteasas. A su vez, producen β -defensinas, las cuales son péptidos antimicrobianos que forman parte integral del sistema inmune innato. Por otra parte, las hAEC expresan el antígeno no polimórfico HLA-G, mientras que carecen de los antígenos polimórficos HLA-A, B y C, lo que les confiere una baja inmunogenicidad y por lo tanto, una ventaja inmunológica al disminuir el riesgo de rechazo en un posible trasplante (Niknejad et al., 2008, Garcia-Lopez et al., 2015).

Una vez que obtuvimos una línea de hESC con cariotipo normal sobre hAEC, fue necesario llevar a cabo una serie de técnicas para demostrar que nuestra línea derivada era pluripotente. Como la morfología no es indicativo único para determinar la presencia de células indiferenciadas, la detección de colonias positivas a FA tejido inespecífico se considera como el primer ensayo para caracterizar ESC, esto de acuerdo a estudios en donde se ha demostrado que la ausencia de esta enzima es uno de los indicadores tempranos de la diferenciación y pérdida de la capacidad pluripotente (O'Connor et al., 2008). Además de la actividad de la FA que se observó en todas las colonias (Figura 11), la caracterización molecular de Amicqui-1 incluyó la detección del RNA mensajero y la proteína de la tríada de los factores OSN, así como de la presencia de los antígenos de superficie celular SSEA4 y TRA-1-60 y la molécula de adhesión E-Cadherina (Figuras 11-16). Aunado a esto, nuestra línea también presentó otros marcadores que en los últimos años se ha demostrado que forman parte de la red de pluripotencia, tales como KLF4, KLF2, ZFP42 o STELLA, además de expresar marcadores característicos de la ICM (IFITM1, GBX2, KIT, TFCEP2L1), lo que demuestra la naturaleza embrionaria de Amicqui-1 (Figura 12).

No obstante, la verificación de las moléculas relacionadas con la pluripotencia tampoco es suficiente para dictaminar que una línea es pluripotente, sino que es necesario poner a prueba el potencial de diferenciación de las células, de tal manera se llevó a cabo un protocolo de diferenciación *in vitro* mediante la formación de EB, así como la formación de los teratomas. Para el caso de las células derivadas de los EB, mediante la técnica de inmunofluorescencia se detectó la

proteína de diferentes marcadores asociados con cada uno de los tres linajes embrionarios, mientras que el análisis histológico determinó que las hESC formaban teratomas en ratones SCID que incluían derivados de cada una de las tres capas (Figuras 22-25).

Con estos resultados podemos concluir que se logró derivar una línea pluripotente, confirmando la hipótesis de que las hAEC pueden funcionar como capa nodriza (Avila-Gonzalez et al., 2015). Cabe mencionar que pocas semanas antes de que nuestros hallazgos fueran publicados, otro grupo de investigación, de forma independiente, reportó el uso de las hAEC como capa nodriza (Lai et al., 2015). Sin embargo, la fuente que ellos utilizaron fueron embriones de buena calidad, mientras que el aporte de nuestro trabajo fue haber demostrado que es posible utilizar embriones descartados para la obtención de líneas hESC. Por otra parte, en dicho trabajo los autores no detectaron el marcador epitelial E-Cadherina en las líneas que derivaron, lo cual es desconcertante, ya que está ampliamente documentado que las hESC expresan E-Cadherina, teniendo dicha molécula de adhesión celular una función importante para la regulación de la pluripotencia y la autorrenovación (Li et al., 2012, Soncin and Ward, 2011).

Por ejemplo, se ha demostrado que E-Cadherina puede reemplazar a OCT4 durante los procedimientos de reprogramación para la obtención de células pluripotentes inducidas (Redmer et al., 2011). A su vez, las células embrionarias de etapas preimplantación poseen un fenotipo epitelial, caracterizadas por la expresión de esta molécula de interacción célula-célula. De hecho, la expresión de esta molécula es elemental durante etapa de especificación de los primeros linajes, ya que su pérdida induce a que las blastómeras tengan una preferencia para diferenciarse hacia tejido extraembrionario y no se forme la ICM, probablemente por la pérdida de contacto celular (Stephenson et al., 2010). Con base en esto, se tiene la hipótesis de que las células de la periferia de las colonias de hESC que crecen sobre MEF o sobre otro tipo celular tipo fibroblasto pierden su identidad pluripotente y adquieren un fenotipo con características mesénquimales, porque la interacción entre hESC con este tipo de capas nodrizas no involucra a E-Cadherina (Chen et al., 2014a). Dado su naturaleza embrionaria, se esperaría que las hESC en estado

indiferenciado expresen esta molécula de adhesión, lo cual no fue detectado en el trabajo de Lai y colaboradores. En comparación, en esta tesis se demostró que tanto Amicqui-1 como la H1 y H9 mantenidas sobre hAEC, seguían presentando este importante marcador de la pluripotencia (Figura 16 y Figura 16.1 en *Addendum* para Amicqui-1, Figura 30 para H1 y Figura 33 para H9).

Después de haber demostrado que las hAEC soportan la derivación y el mantenimiento de hESC, determinamos si las hAEC también podrían soportar la sobrevivencia de líneas arquetipo. Para ello, células H1 y H9 fueron cultivadas por más de diez pasajes sobre las hAEC y se procedió a su caracterización. De forma interesante, ambas líneas cultivadas sobre hAEC conservaban la misma morfología que cuando están con iMEF, eran positivas a FA (Figura 27) y presentaron la batería pluripotente de OSN, los antígenos de superficie TRA1-60, SSEA-4 y E-cadherina (Figuras 28-30 para H1 y Figuras 31-33 para H9). Posteriormente, una vez que conseguimos el mantenimiento rutinario de las tres líneas sobre ambas capas nodrizas, procedimos a la tarea de cultivarlas sobre Matrigel y con el medio condicionado de los iMEF y de las hAEC (MEF-CM, hAEC-CM), esto como un principio de prueba para indagar si el medio condicionado de las hAEC en condiciones *feeder-free* puede mantener la pluripotencia de las hESC, sin que haya interacción de célula a célula. Al utilizar el MEF-CM o el hAEC-CM, las tres líneas presentaron la morfología característica cuando hESC crecen libres de la capa nodriza (Figura 34 para la condición MEF-CM, Figura 35 para hAEC-CM). Asimismo, expresaron el juego de marcadores pluripotentes (Figuras 36-47). A pesar de que los teratomas son considerados como la prueba estándar de oro para demostrar la pluripotencia de células humanas, en los últimos años se han buscado alternativas basadas en métodos bioinformáticos para un diagnóstico más sencillo que determine si cierto tipo celular es o no pluripotente sin necesidad de utilizar modelos animales. Por ello, como parte de la caracterización de nuestros grupos experimentales, se llevó a cabo la prueba Epi-Pluri-Score (Lenz et al., 2015). El análisis demostró que los “clusters” de color rojo y azul se refieren al perfil de metilación de 264 tipos celulares pluripotentes y 1951 células somáticas, respectivamente; notablemente, la prueba clasificó a las tres líneas como

pluripotentes, tanto en las dos condiciones de capa nodriza (iMEF o hAEC) así como en condiciones libres de capa nodriza (MC-M o MC-hAEC) (Figura 48). Esto en conjunto con los datos de las inmunofluorescencias, sugiere que las tres líneas no solo se mantienen pluripotentes sobre la capa convencional de iMEF y su respectiva condición de Matrigel con medio condicionado (MEF-MC), sino que las hAEC también son capaces de mantener las tres líneas hESC tanto como capa nodriza o con su medio condicionado (hAEC-CM).

Sin embargo, surge la pregunta de si las líneas hESC poseen el mismo estado pluripotente cuando están sobre hAEC en comparación con los iMEF. El ensayo de formación de teratomas, el protocolo de formación de EB de diferenciación espontánea o el análisis Epi-Pluri-Score son metodologías cuya finalidad solo es determinar si cierto tipo celular es o no pluripotente, i.e., que tenga la habilidad de formar los tres linajes del ectodermo, mesodermo y endodermo. Al respecto, en los últimos años se ha descrito en el modelo murino dos estados alternos de pluripotencia que se distinguen por tener diferentes vías de señalización y perfiles de expresión (ver Antecedentes). De esta forma, cuando son retadas para determinar su pluripotencia, las EpiSC forman teratomas y EB con derivados de los tres linajes germinales al igual que las mESC, concluyendo que ambos tipos celulares son pluripotentes. No obstante, en el ensayo de formación de quimeras las mESC se integran con éxito a los blastocistos de la etapa preimplantación (E4.5) mientras que las EpiSC son incapaces de contribuir a la formación del embrión en este período del desarrollo y en cambio, solo integrarse en etapas más tardías (E6.5-7.5) (Brons et al., 2007, Huang et al., 2012). Este ensayo nos indica que, aunque las mESC y EpiSC tienen en común la capacidad pluripotente, la equivalencia funcional de su contraparte *in vivo* difiere. Más aún, cuando ambos tipos celulares son sometidos a protocolos de diferenciación para la obtención de linajes específicos, las mESC tienen un mejor desempeño para recapitular un proceso de diferenciación que las EpiSC. Por ejemplo, cuando se comparó su eficiencia para generar células troncales neurales (NSC, por sus siglas en inglés *Neural Stem Cells*), las NSC derivadas de mESC tenían un perfil de expresión más

similar a las NSC obtenidas directamente del neuroepitelio que las derivadas de EpiSC (Jang et al., 2014).

Aunado a esto, el año pasado el grupo de Brickman demostró que distintas condiciones de cultivo pueden “reprogramar” el potencial de las mESC. Si bien en todas las condiciones utilizadas (suero, KOSR o LIF/2i) la expresión de marcadores pluripotentes eran similares, el transcriptoma de las mESC cultivadas con KOSR o LIF/2i correlacionaba con los estadios más tempranos de preimplantación, capaces de integrarse a un embrión de la etapa de 2-células; en cambio, las mESC cultivadas con suero tenían un perfil de expresión diferente a las otras condiciones y fallaban para formar quimeras con los embriones de 2-células; lo cual demuestra que las condiciones de cultivo pueden soportar distintos estados pluripotentes en las mESC (Martin Gonzalez et al., 2016).

Si bien todos estos trabajos han sido realizados en especie murina, aún no se ha determinado si existen diferentes tipos de pluripotencia en el humano, ni las condiciones adecuadas de cultivo para poder retener *in vitro* dichos estados alternos. Motivo por el cual el objetivo de muchos laboratorios de investigación es definir en el humano los estados equivalentes al *naive* y *primed* del ratón (Kalkan et al., 2017, Boroviak and Nichols, 2017). No obstante, se ha descrito la variación en la capacidad de las hESC e hiPSC para diferenciarse en determinados linajes como cardiomiocitos, progenitores hematopoyéticos o neurales, dependiendo si crecen sobre capas nodrizas, matrices sintéticas, medio condicionado o medios definidos (Ojala et al., 2012, Lee et al., 2015b). Por ello, es posible que entre las cuatro condiciones utilizadas, las tres líneas presenten cambios que no fueron detectados con las metodologías empleadas, por lo que se necesitaría un mayor escrutinio para concluir si hay diferencias cuando hESC crecen sobre hAEC versus MEF o con su respectivo CM en condiciones *feeder-free*. Dentro de las perspectivas se propone llevar a cabo las siguientes metodologías: a) comparar el transcriptoma de las hESC entre las cuatro condiciones de cultivo; b) llevar a cabo protocolos de diferenciación dirigida para generar tipos celulares específicos de las tres capas germinales y comparar el rendimiento y su funcionalidad de las células obtenidas entre las cuatro condiciones; c) hacer experimentos de formación de quimeras para

dilucidar si hay correlación entre las cuatro condiciones de cultivo con diferentes etapas del desarrollo temprano.

Y esto nos lleva a la cuestión de ¿cómo es que las hAEC influyen para que las células pluripotentes puedan mantenerse en estado indiferenciado? Previos trabajos en donde se utilizó a las hAEC como capa nodriza para el mantenimiento de otro tipo de células pluripotentes, proponen como mecanismo la acción de miRNAs específicos. Liu y colaboradores transfectaron hAEC con una versión mutada de miR-199a, lo que permitió la regulación hacia arriba de los blancos específicos de este miRNA, entre ellos LIF. De esta forma, los autores sugirieron que la ausencia de miR-199a permite la expresión de LIF en las hAEC, y que este ligando podría ser un componente crucial para la pluripotencia en mESC (Liu et al., 2012a). Sin embargo, como se mencionó en los antecedentes, la vía de LIF/STAT es característica de las mESC, a su vez que se ha demostrado que esta vía es incapaz de mantener activa la red puripotente humana (Daheron et al., 2004).

En otra publicación, se reportó que los niveles de miR-145 son más bajos cuando las hiPSC crecen sobre hAEC versus MEF y se ha reportado que este miRNA reprime directamente la pluripotencia al tener como blancos específicos los RNA mensajeros de OCT4, SOX2, KLF4, entre otros factores (Xu et al., 2009), apoyando la idea que el efecto de las hAEC también podría ser a nivel de los miRNAs (Liu et al., 2012b).

De manera interesante, con base a nuestros resultados, se encontró que las hAEC expresan algunos pluri-miRNAs (Figura 42), lo que sugiere que los miRNAs podrían tener un papel importante en nuestro sistema de interacción de capas nodrizas y hESC. Como principio de prueba se midieron los niveles de expresión relativa de tres pluri-miRNAs, previa detección mediante una PCR de punto final en los controles H1 y H9 sobre iMEF y nuestra línea Amicqui-1 sobre ambas capas nodrizas (Figura 49). Para la expresión relativa se encontraron algunas diferencias entre las diferentes condiciones de cultivo, lo que sugiere una heterogeneidad por lo menos en cuanto al patrón de expresión de pluri-miRNAs. Para el miR-92a no hubo cambios dentro de las células de las tres líneas utilizadas, pero en el medio condicionado se encontró que cuando células H9 eran cultivadas con MEF-CM, los

niveles de miR-92a aumentaban respecto al control, mientras que en H1 y Amicqui-1 la presencia de este miRNA fue más alta en todos los grupos comparados con la condición MEF (Figura 50). Para el miR-302d tampoco se observó diferencias en las células, aunque en el medio de la H9 hubo mayor expresión relativa de miR-302d en ambas condiciones *feeder-free* (MEF-CM, hAEC-CM), mientras que para H1 y Amicqui-1 solo hubo aumento cuando eran cultivadas con CM-hAEC (Figura 51).

Finalmente, para el miR-200c sí hubo diferencias dentro de las células: para H1 el miRNA incrementó únicamente en la condición hAEC-CM, mientras que para H9 y Amicqui-1 las dos condiciones donde se utilizó hAEC como capa nodriza o su medio condicionado con fueron significativamente diferentes en comparación con el control así como la condición *feeder-free* que utiliza el MEF-CM, aunque para la H1 hubo una tendencia cuando crecía sobre hAEC (Figura 52).

De forma interesante, las hAEC presentaron niveles relativos de miR-200c más altos que las células pluripotentes (Figura 53). Este dato sugiere que uno de los mecanismos involucrados en el mantenimiento de las hESC es a través de los miRNAs provenientes de las hAEC. En apoyo a esta posible hipótesis, se ha reportado que los miRNAs no solo pueden ser liberados al medio extracelular, sino que también pueden ser transferidos de una célula hospedera a otro tipo celular (como una célula troncal), en donde el miRNA puede inducir cambios en la célula receptora. Por ejemplo, Lee y colaboradores encontraron que al cocultivar mESC y hESC con células endoteliales aumentó la expresión de varios miRNAs, entre ellos: miR-125b-5p, miR-199a-5p, miR-221 y miR-222. En este sistema la alta expresión de estas moléculas se correlacionó con una mejora en la obtención de cardiomiocitos maduros derivados de PSC, concluyendo que la inducción de esta combinación de miRNAs a través del cocultivo con células endoteliales incrementa la maduración de cardiomiocitos derivados de PSC. No obstante, no discernieron si los miRNAs incrementados eran resultado de la biosíntesis endógena de las PSC o provenían de las células endoteliales (Lee et al., 2015a). Otro estudio, utilizando un modelo de ratón con obstrucción ureteral unilateral para analizar el efecto de células troncales mesenquimales que sobreexpresaban miR-let7, las cuales fueron alojadas en el riñón dañado. De manera sorprendente, la presencia de las células

mesenquimales con miR-let7 atenuaba el daño renal, mediante la regulación negativa de varios blancos relacionados con la fibrosis renal como: colágena IValfa1, metaloproteinasa 9, TGF- β 1 y su receptor TGF- β R1. Estos resultados fueron confirmados en un modelo *in vitro* al cocultivar let7-MSK con células NRK52E; la expresión de genes propios de los fibroblastos fue reprimida en las células de riñón y se demostró que el miR-let7 era transferido desde las MSC mediante la secreción de exosomas (Wang et al., 2016).

Estos datos apoyan la hipótesis que en nuestro sistema las hAEC pueden inducir la alta presencia de miR-200c en las hESC, ya sea mediante la biosíntesis por las propias hESC o la liberación del miRNA al medio extracelular. De hecho, los altos niveles de miR-200c que encontramos en las hAEC (Figura 53) nos sugiere que en el cocultivo el miRNA podría ser liberado y recapturado por las hESC, aunque esta teoría necesita ser demostrada.

Nuestros resultados del aumento de miR-200c en diferentes condiciones de cultivo son interesantes en cuanto a la importancia que tiene miR-200c para regular procesos celulares involucrados en el mantenimiento de la pluripotencia. De acuerdo a bases de datos de MirPath, algunos de los blancos candidatos que podrían estar regulados directamente por miR-200c son: TCF3, SMAD4, BMPR2, ERBB, AKT1, GATA 4 y ZEB1/2, componentes involucrados en procesos de diferenciación durante el desarrollo. TCF3 (*Transcription Factor 3*) es un factor de transcripción que forma un complejo con β -catenina en el núcleo para inhibir genes blancos de la vía de canónica de WNT y se ha sugerido que en las hESC esta vía se activa durante los procesos de diferenciación (Kim et al., 2013). A su vez, SMAD4 y BMPR2 son una proteína de transducción de señal y un receptor respectivamente de la vía de BMP, la cual en hESC debe estar inhibida para evitar la diferenciación hacia mesodermo (Avery et al., 2010). Por otro lado, se ha reportado que en hESC PI3K/AKT puede inhibir a SMAD2/3 en la vía de Activina/Nodal para evitar la expresión de NANOG. Además, AKT sería un factor de diferenciación temprana altamente expresado durante la formación de EB (Singh et al., 2012, Li et al., 2016). Asimismo, Huang y colaboradores reportaron cómo miR-200c inhibe a su blanco GATA4 en las hESC para evitar la diferenciación hacia

mesoendodermo (Huang et al., 2014). Finalmente, se ha demostrado que miR-200c inhibe directamente a ZEB1 y ZEB2 (*Zinc Finger E-box binding homeobox 1 or 2*), los cuales son represores transcripcionales de E-Cadherina, aunque esto solo se ha demostrado en células de cáncer (Park et al., 2008). La expresión de ZEB1/2 en células troncales con un fenotipo epitelial induce a que adquieran una morfología más fibroblástica, dicho proceso se conoce como transición de epitelio a mesénquima, el cual es uno de los eventos clave durante el desarrollo temprano para la formación del surco primitivo, en donde células del epiblasto pierden su polaridad y adhesión celular para eventualmente migrar y diferenciarse hacia tejido mesodérmico (Levayer and Lecuit, 2008).

Con base en estos antecedentes, nosotros conjeturamos que uno de los posibles mecanismos por el cual la capa nodriza de hAEC mantiene la pluripotencia es mediante la inducción de un aumento de los niveles de miR-200c para evitar la transición epitelio-mesénquima, y por lo tanto la inducción de los procesos de diferenciación en las hESC.

Por otra parte, se ha propuesto que las hESC necesitan estar en cocultivo con una capa nodriza adecuada para estimular interacciones no solo entre células y matriz extracelular, sino también el contacto de célula-célula (Chen et al., 2014a). Una propiedad esencial de las hESC es que conservan el fenotipo epitelial de las células embrionarias de las etapas tempranas del desarrollo, al expresar E-Cadherina, cuya importancia para la pluripotencia se describió en párrafos previos. A diferencia de los MEF y de otros tipos de capas nodrizas, las hAEC expresan E-Cadherina dada su naturaleza epitelial, de manera que la derivación y mantenimiento de hESC sobre este tipos de células es solo el principio de prueba para plantear si es a través de interacciones mediadas por E-Cadherina entre ambos tipos celulares (Avila-Gonzalez et al., 2016).

Otro posible mecanismo podría ser mediante la secreción de factores. Se han reportado niveles proteicos de EGF, KGF, HGF, TGF- β , TGF- α y FGF2 dentro de la membrana amniótica, pero esto incluiría a las seis capas que conforman el amnios y se desconoce si estos factores son producidos únicamente en el epitelio amniótico, además de la posibilidad de que puedan ser secretados al medio

extracelular (Lopez-Valladares et al., 2010, Koizumi et al., 2000). No obstante, existe un solo reporte que explora esta idea, utilizando células del fluido amniótico (hAFSC, *Human amniotic fluid stem cells*) en lugar de hAEC como capa nodriza. Los resultados demostraron que hAFSC soportan la propagación indiferenciada de hESC sin la necesidad de agregar FGF2 al medio de cultivo, sugiriendo en primera instancia que las hAFSC podrían mantener la pluripotencia mediante la secreción de factores. Sin embargo, la cantidad exógena convencional de FGF2 para el mantenimiento rutinario de las hESC es de 4-10 ng/ml ya sea sobre MEF o condiciones *feeder-free* y al determinar la concentración de FGF2 en el medio condicionado de las hAFSC los niveles fueron inferiores a 4 ng/ml, por lo que se tiene que explorar otros mecanismos subyacentes por los cuales hESC no dependan del FGF2 secretado por las capas nodrizas (Ma et al., 2014b). Asimismo, las hAEC no solamente podrían secretar factores de crecimiento, la capa basal (matriz extracelular) de la membrana amniótica se compone de colágena, fibronectina, laminina, ligandos para los receptores de integrinas presentes en las membranas celulares permiten la adhesión al sustrato (Niknejad et al., 2008). Las hESC así como otros tipos de células pluripotentes (hiPSC) expresan niveles altos de integrinas, además que diversos estudios han fundamentado la interacción de los componentes de la matriz extracelular con las integrinas como un elemento crucial para el mantenimiento de la pluripotencia (Hayashi and Furue, 2016, Rowland et al., 2010, Villa-Diaz et al., 2016). De esta forma, sería interesante dilucidar si las hAEC secretan algunos componentes específicos de la matriz extracelular que interactúen con los receptores de integrinas de las hESC.

Bajo dicho contexto, recientemente se publicó un trabajo donde se demostró que la adición de una sola proteína, inhibidor-inter-alfa (Ial, *inter-alpha-inhibitor*), permite la adhesión de las hESC e hiPSC a un sustrato de vitronectina, manteniéndose indiferenciadas por diversos pases y se sugiere que es a través de la interacción con las integrinas (Pijuan-Galito et al., 2016). De manera interesante, las subunidades HC1 y HC2 de Ial están presentes de forma constitutiva en la membrana amniótica, siendo uno de los pocos tejidos en donde se ha reportado

(Zhang et al., 2012). Con ello, la liberación de ldl sería un buen candidato para profundizar en el mecanismo de interacción de hAEC con hESC.

Finalmente, se necesitan estudios que determinen la interacción de los diversos componentes (incluyendo vías de señalización, factores de transcripción, microRNAs) que podrían estar participando en la compleja interacción de las hESC con la capa nodriza hAEC que da como resultado la derivación y el mantenimiento de la pluripotencia humana.

CONCLUSIONES

Es posible la derivación y el mantenimiento de hESC (Amicqui-1) a partir de embriones de mala calidad y utilizando una capa nodriza de hAEC, siendo hasta el momento la primera y única línea obtenida de la población mexicana. Así mismo, las hAEC ya sea como capa nodriza o en condiciones libres de capa nodriza pueden mantener la pluripotencia de las líneas H1 y H9 esto con base en la presencia de marcadores pluripotentes así como de acuerdo al análisis de Epi-Pluri-Score.

Si bien la caracterización desarrollada en este trabajo sugiere que las cuatro condiciones de MEF, MEF-CM, hAEC y hAEC-CM pueden mantener un estado basal pluripotente, la detección de niveles más altos de miR-200c en las células que crecen sobre hAEC o hAEC-CM podría ser un indicador ya sea directo o indirecto de cómo diferentes condiciones de cultivo pueden influir en el potencial funcional de las hESC, así como sugerir que las hAEC podrían estar manteniendo la pluripotencia de las hESC mediante un mecanismo que involucra a miR-200c.

REFERENCIAS

- Adamson, E D, Evans, M J & Magrane, G G 1977. Biochemical markers of the progress of differentiation in cloned teratocarcinoma cell lines. *Eur J Biochem*, 79, 607-15.
- Alfarawati, S, Fragouli, E, Colls, P, Stevens, J, Gutierrez-Mateo, C, Schoolcraft, W B, Katz-Jaffe, M G & Wells, D 2011. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*, 95, 520-4.
- Alikani, M, Cohen, J, Tomkin, G, Garrisi, G J, Mack, C & Scott, R T 1999. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. *Fertil Steril*, 71, 836-42.
- Anokye-Danso, F, Trivedi, C M, Jühr, D, Gupta, M, Cui, Z, Tian, Y, Zhang, Y, Yang, W, Gruber, P J, Epstein, J A & Morrissey, E E 2011. Highly efficient miRNA-mediated reprogramming of mouse and human somatic cells to pluripotency. *Cell Stem Cell*, 8, 376-88.
- Avery, S, Zafarana, G, Gokhale, P J & Andrews, P W 2010. The role of SMAD4 in human embryonic stem cell self-renewal and stem cell fate. *Stem Cells*, 28, 863-73.
- Avila-Gonzalez, D, Garcia-Lopez, G, Garcia-Castro, I L, Flores-Herrera, H, Molina-Hernandez, A, Portillo, W & Diaz, N F 2016. Capturing the ephemeral human pluripotent state. *Dev Dyn*, 245, 762-73.
- Avila-Gonzalez, D, Vega-Hernandez, E, Regalado-Hernandez, J C, De La Jara-Diaz, J F, Garcia-Castro, I L, Molina-Hernandez, A, Moreno-Verduzco, E R, Razo-Aguilera, G, Flores-Herrera, H, Portillo, W, Diaz-Martinez, N E, Garcia-Lopez, G & Diaz, N F 2015. Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos. *Stem Cell Res*, 15, 322-4.
- Avilion, A A, Nicolis, S K, Pevny, L H, Perez, L, Vivian, N & Lovell-Badge, R 2003. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev*, 17, 126-40.
- Bar, M, Wyman, S K, Fritz, B R, Qi, J, Garg, K S, Parkin, R K, Kroh, E M, Bendoraite, A, Mitchell, P S, Nelson, A M, Ruzzo, W L, Ware, C, Radich, J P, Gentleman, R, Ruohola-Baker, H & Tewari, M 2008. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells*, 26, 2496-505.
- Bazrgar, M, Gourabi, H, Valojerdi, M R, Yazdi, P E & Baharvand, H 2013. Self-correction of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*, 22, 2449-56.
- Bianchi, D W, Wilkins-Haug, L E, Enders, A C & Hay, E D 1993. Origin of extraembryonic mesoderm in experimental animals: relevance to chorionic mosaicism in humans. *Am J Med Genet*, 46, 542-50.
- Bock, C, Kiskinis, E, Verstappen, G, Gu, H, Boulting, G, Smith, Z D, Ziller, M, Croft, G F, Amoroso, M W, Oakley, D H, Gnirke, A, Eggan, K & Meissner, A 2011. Reference Maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell*, 144, 439-52.
- Boroviak, T, Loos, R, Bertone, P, Smith, A & Nichols, J 2014. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol*, 16, 516-28.
- Boroviak, T & Nichols, J 2014. The birth of embryonic pluripotency. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 369.
- Boroviak, T & Nichols, J 2017. Primate embryogenesis predicts the hallmarks of human naive pluripotency. *Development*, 144, 175-186.

- Boyer, L A, Lee, T I, Cole, M F, Johnstone, S E, Levine, S S, Zucker, J P, Guenther, M G, Kumar, R M, Murray, H L, Jenner, R G, Gifford, D K, Melton, D A, Jaenisch, R & Young, R A 2005. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122, 947-56.
- Bradley, A, Evans, M, Kaufman, M H & Robertson, E 1984. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309, 255-6.
- Bradley, C K, Peura, T, Dumevska, B, Jovasevic, A, Chami, O, Schmidt, U, Jansen, R P & Stojanov, T 2014. Cell lines from morphologically abnormal discarded IVF embryos are typically euploid and unaccompanied by intrachromosomal aberrations. *Reprod Biomed Online*, 28, 780-8.
- Brinster, R L 1974. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J Exp Med*, 140, 1049-56.
- Brons, I G, Smithers, L E, Trotter, M W, Rugg-Gunn, P, Sun, B, Chuva De Sousa Lopes, S M, Howlett, S K, Clarkson, A, Ahrlund-Richter, L, Pedersen, R A & Vallier, L 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448, 191-5.
- Buta, C, David, R, Dressel, R, Emgard, M, Fuchs, C, Gross, U, Healy, L, Hescheler, J, Kolar, R, Martin, U, Mikkers, H, Muller, F J, Schneider, R K, Seiler, A E, Spielmann, H & Weitzer, G 2013. Reconsidering pluripotency tests: do we still need teratoma assays? *Stem Cell Res*, 11, 552-62.
- Cahan, P & Daley, G Q 2013. Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14, 357-68.
- Card, D A, Hebbbar, P B, Li, L, Trotter, K W, Komatsu, Y, Mishina, Y & Archer, T K 2008. Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*, 28, 6426-38.
- Cismasiu, V B & Popescu, L M 2015. Telocytes transfer extracellular vesicles loaded with microRNAs to stem cells. *J Cell Mol Med*, 19, 351-8.
- Condic, M L 2014. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev*, 23, 796-812.
- Chambers, I, Silva, J, Colby, D, Nichols, J, Nijmeijer, B, Robertson, M, Vrana, J, Jones, K, Grotewold, L & Smith, A 2007. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450, 1230-4.
- Chan, K K, Zhang, J, Chia, N Y, Chan, Y S, Sim, H S, Tan, K S, Oh, S K, Ng, H H & Choo, A B 2009. KLF4 and PBX1 directly regulate NANOG expression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27, 2114-25.
- Chan, Y S, Goke, J, Ng, J H, Lu, X, Gonzales, K A, Tan, C P, Tng, W Q, Hong, Z Z, Lim, Y S & Ng, H H 2013. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell*, 13, 663-75.
- Chang, E A, Tomov, M L, Suhr, S T, Luo, J, Olmsted, Z T, Paluh, J L & Cibelli, J 2015. Derivation of Ethnically Diverse Human Induced Pluripotent Stem Cell Lines. *Sci Rep*, 5, 15234.
- Chen, C, Ridzon, D A, Broomer, A J, Zhou, Z, Lee, D H, Nguyen, J T, Barbisin, M, Xu, N L, Mahuvakar, V R, Andersen, M R, Lao, K Q, Livak, K J & Guegler, K J 2005a. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 33, e179.
- Chen, H, Aksoy, I, Gonnot, F, Osteil, P, Aubry, M, Hamela, C, Rognard, C, Hochard, A, Voisin, S, Fontaine, E, Mure, M, Afanassieff, M, Cleroux, E, Guibert, S, Chen, J, Vallot, C, Acloque, H, Genthon, C, Donnadiou, C, De Vos, J, Sanlaville, D, Guerin, J F, Weber, M, Stanton, L W, Rougeulle, C, Pain, B, Bourillot, P Y & Savatier, P 2015. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun*, 6, 7095.

- Chen, H, Qian, K, Hu, J, Liu, D, Lu, W, Yang, Y, Wang, D, Yan, H, Zhang, S & Zhu, G 2005b. The derivation of two additional human embryonic stem cell lines from day 3 embryos with low morphological scores. *Hum Reprod*, 20, 2201-6.
- Chen, K G, Mallon, B S, Johnson, K R, Hamilton, R S, Mckay, R D & Robey, P G 2014a. Developmental insights from early mammalian embryos and core signaling pathways that influence human pluripotent cell growth and differentiation. *Stem Cell Res*, 12, 610-21.
- Chen, K G, Mallon, B S, Mckay, R D & Robey, P G 2014b. Human pluripotent stem cell culture: considerations for maintenance, expansion, and therapeutics. *Cell Stem Cell*, 14, 13-26.
- Chen, Q, Qiu, C, Huang, Y, Jiang, L, Huang, Q, Guo, L & Liu, T 2013. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain iPS cell pluripotency by inhibiting endogenous DNA methyltransferase 1. *Exp Ther Med*, 6, 1145-1154.
- Chen, X, Liang, H, Zhang, J, Zen, K & Zhang, C Y 2012. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*, 22, 125-32.
- Chia, N Y, Chan, Y S, Feng, B, Lu, X, Orlov, Y L, Moreau, D, Kumar, P, Yang, L, Jiang, J, Lau, M S, Huss, M, Soh, B S, Kraus, P, Li, P, Lufkin, T, Lim, B, Clarke, N D, Bard, F & Ng, H H 2010. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature*, 468, 316-20.
- Chung, Y G, Eum, J H, Lee, J E, Shim, S H, Sepilian, V, Hong, S W, Lee, Y, Treff, N R, Choi, Y H, Kimbrel, E A, Dittman, R E, Lanza, R & Lee, D R 2014. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell*, 14, 777-80.
- Daheron, L, Opitz, S L, Zaehres, H, Lensch, M W, Andrews, P W, Itskovitz-Eldor, J & Daley, G Q 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 22, 770-8.
- Davidson, K C, Adams, A M, Goodson, J M, Mcdonald, C E, Potter, J C, Berndt, J D, Biechele, T L, Taylor, R J & Moon, R T 2012. Wnt/beta-catenin signaling promotes differentiation, not self-renewal, of human embryonic stem cells and is repressed by Oct4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109, 4485-90.
- De Oliveira Georges, J A, Vergani, N, Fonseca, S A, Fraga, A M, De Mello, J C, Albuquerque, M C, Fujihara, L S & Pereira, L V 2014. Aberrant patterns of X chromosome inactivation in a new line of human embryonic stem cells established in physiological oxygen concentrations. *Stem Cell Rev*, 10, 472-9.
- De Paepe, C, Krivega, M, Cauffman, G, Geens, M & Van De Velde, H 2014. Totipotency and lineage segregation in the human embryo. *Mol Hum Reprod*, 20, 599-618.
- Deglincerti, A, Croft, G F, Pietila, L N, Zernicka-Goetz, M, Siggia, E D & Brivanlou, A H 2016. Self-organization of the in vitro attached human embryo. *Nature*, 533, 251-4.
- Dejosez, M & Zwaka, T P 2012. Pluripotency and nuclear reprogramming. *Annu Rev Biochem*, 81, 737-65.
- Delgado-Olguin, P & Recillas-Targa, F 2011. Chromatin structure of pluripotent stem cells and induced pluripotent stem cells. *Brief Funct Genomics*, 10, 37-49.
- Desai, N, Rambhia, P & Gishto, A 2015. Human embryonic stem cell cultivation: historical perspective and evolution of xeno-free culture systems. *Reprod Biol Endocrinol*, 13, 9.
- Diaz, N F, Cruz-Resendiz, M S, Flores-Herrera, H, Garcia-Lopez, G & Molina-Hernandez, A 2014. MicroRNAs in central nervous system development. *Rev Neurosci*, 25, 675-86.
- Dravid, G, Ye, Z, Hammond, H, Chen, G, Pyle, A, Donovan, P, Yu, X & Cheng, L 2005. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival, proliferation, and self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 23, 1489-501.
- Duggal, G, Warriar, S, Ghimire, S, Broekaert, D, Van Der Jeught, M, Lierman, S, Deroo, T, Peelman, L, Van Soom, A, Cornelissen, R, Menten, B, Mestdagh, P, Vandesomepele, J, Roost, M,

- Slieker, R C, Heijmans, B T, Deforce, D, De Sutter, P, De Sousa Lopes, S C & Heindryckx, B 2015. Alternative Routes to Induce Naive Pluripotency in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 33, 2686-98.
- Eiselleova, L, Matulka, K, Kriz, V, Kunova, M, Schmidtova, Z, Neradil, J, Tichy, B, Dvorakova, D, Pospisilova, S, Hampl, A & Dvorak, P 2009. A complex role for FGF-2 in self-renewal, survival, and adhesion of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 27, 1847-57.
- Enders, A C, Schlafke, S & Hendrickx, A G 1986. Differentiation of the embryonic disc, amnion, and yolk sac in the rhesus monkey. *Am J Anat*, 177, 161-85.
- Evans, M 1981. Origin of mouse embryonal carcinoma cells and the possibility of their direct isolation into tissue culture. *J Reprod Fertil*, 62, 625-31.
- Evans, M 2011. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12, 680-6.
- Evans, M J 1972. The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells. *J Embryol Exp Morphol*, 28, 163-76.
- Evans, M J & Kaufman, M H 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292, 154-6.
- Feng, Q, Lu, S J, Klimanskaya, I, Gomes, I, Kim, D, Chung, Y, Honig, G R, Kim, K S & Lanza, R 2010. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells*, 28, 704-12.
- Fraga, A M, Sukoyan, M, Rajan, P, Braga, D P, Iaconelli, A, Jr., Franco, J G, Jr., Borges, E, Jr. & Pereira, L V 2011. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. *Cell Transplant*, 20, 431-40.
- Gafni, O, Weinberger, L, Mansour, A A, Manor, Y S, Chomsky, E, Ben-Yosef, D, Kalma, Y, Viukov, S, Maza, I, Zviran, A, Rais, Y, Shipony, Z, Mukamel, Z, Krupalnik, V, Zerbib, M, Geula, S, Caspi, I, Schneir, D, Shwartz, T, Gilad, S, Amann-Zalcenstein, D, Benjamin, S, Amit, I, Tanay, A, Massarwa, R, Novershtern, N & Hanna, J H 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature*, 504, 282-6.
- Garcia-Castro, I L, Garcia-Lopez, G, Avila-Gonzalez, D, Flores-Herrera, H, Molina-Hernandez, A, Portillo, W, Ramon-Gallegos, E & Diaz, N F 2015. Markers of Pluripotency in Human Amniotic Epithelial Cells and Their Differentiation to Progenitor of Cortical Neurons. *PLoS One*, 10, e0146082.
- Garcia-Lopez, G, Garcia-Castro, I L, Avila-Gonzalez, D, Molina-Hernandez, A, Flores-Herrera, H, Merchant-Larios, H & Diaz-Martinez, F 2015. [Human amniotic epithelium (HAE) as a possible source of stem cells (SC)]. *Gac Med Mex*, 151, 66-74.
- Gardner, R L 1968. Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature*, 220, 596-7.
- Garitaonandia, I, Amir, H, Boscolo, F S, Wambua, G K, Schultheisz, H L, Sabatini, K, Morey, R, Waltz, S, Wang, Y C, Tran, H, Leonardo, T R, Nazor, K, Slavin, I, Lynch, C, Li, Y, Coleman, R, Gallego Romero, I, Altun, G, Reynolds, D, Dalton, S, Parast, M, Loring, J F & Laurent, L C 2015. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS One*, 10, e0118307.
- Genbacev, O, Krtolica, A, Zdravkovic, T, Brunette, E, Powell, S, Nath, A, Caceres, E, McMaster, M, Mcdonagh, S, Li, Y, Mandalam, R, Lebkowski, J & Fisher, S J 2005. Serum-free derivation of human embryonic stem cell lines on human placental fibroblast feeders. *Fertil Steril*, 83, 1517-29.

- Giritharan, G, Ilic, D, Gormley, M & Krtolica, A 2011. Human embryonic stem cells derived from embryos at different stages of development share similar transcription profiles. *PLoS One*, 6, e26570.
- Goke, J, Chan, Y S, Yan, J, Vingron, M & Ng, H H 2013. Genome-wide kinase-chromatin interactions reveal the regulatory network of ERK signaling in human embryonic stem cells. *Mol Cell*, 50, 844-55.
- Graham, B, Marçais, A, Dharmalingam, G, Carroll, T, Kanellopoulou, C, Graumann, J, Nesterova, T B, Bermange, A, Brazauskas, P, Xella, B, Kriaucionis, S, Higgs, D R, Brockdorff, N, Mann, M, Fisher, A G & Merkenschlager, M 2016. MicroRNAs of the miR-290-295 Family Maintain Bivalency in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports*, 6, 635-42.
- Guo, G, Von Meyenn, F, Santos, F, Chen, Y, Reik, W, Bertone, P, Smith, A & Nichols, J 2016. Naive Pluripotent Stem Cells Derived Directly from Isolated Cells of the Human Inner Cell Mass. *Stem Cell Reports*, 6, 437-46.
- Gurdon, J B 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol*, 10, 622-40.
- Hackett, J A & Surani, M A 2014. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell*, 15, 416-30.
- Hayashi, Y & Furue, M K 2016. Biological Effects of Culture Substrates on Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2016, 5380560.
- He, L & Hannon, G J 2004. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*, 5, 522-31.
- Hu, B Y, Weick, J P, Yu, J, Ma, L X, Zhang, X Q, Thomson, J A & Zhang, S C 2010. Neural differentiation of human induced pluripotent stem cells follows developmental principles but with variable potency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4335-40.
- Huang, H N, Chen, S Y, Hwang, S M, Yu, C C, Su, M W, Mai, W, Wang, H W, Cheng, W C, Schuyler, S C, Ma, N, Lu, F L & Lu, J 2014. miR-200c and GATA binding protein 4 regulate human embryonic stem cell renewal and differentiation. *Stem Cell Res*, 12, 338-53.
- Huang, Y, Osorno, R, Tsakiridis, A & Wilson, V 2012. In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep*, 2, 1571-8.
- Hussein, S M, Batada, N N, Vuoristo, S, Ching, R W, Autio, R, Narva, E, Ng, S, Sourour, M, Hamalainen, R, Olsson, C, Lundin, K, Mikkola, M, Trokovic, R, Peitz, M, Brustle, O, Bazett-Jones, D P, Alitalo, K, Lahesmaa, R, Nagy, A & Otonkoski, T 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature*, 471, 58-62.
- Ilancheran, S, Moodley, Y & Manuelpillai, U 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta*, 30, 2-10.
- Jaenisch, R & Young, R 2008. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell*, 132, 567-82.
- Jang, H J, Kim, J S, Choi, H W, Jeon, I, Choi, S, Kim, M J, Song, J & Do, J T 2014. Neural stem cells derived from epiblast stem cells display distinctive properties. *Stem Cell Res*, 12, 506-16.
- Jouneau, A, Ciaudo, C, Sismeiro, O, Brochard, V, Jouneau, L, Vandormael-Pournin, S, Coppee, J Y, Zhou, Q, Heard, E, Antoniewski, C & Cohen-Tannoudji, M 2012. Naive and primed murine pluripotent stem cells have distinct miRNA expression profiles. *RNA*, 18, 253-64.
- Kahan, B W & Ephrussi, B 1970. Developmental potentialities of clonal in vitro cultures of mouse testicular teratoma. *J Natl Cancer Inst*, 44, 1015-36.
- Kalkan, T, Olova, N, Roode, M, Mulas, C, Lee, H J, Nett, I, Marks, H, Walker, R, Stunnenberg, H G, Lilley, K S, Nichols, J, Reik, W, Bertone, P & Smith, A 2017. Tracking the embryonic stem cell transition from ground state pluripotency. *Development*.

- Kanellopoulou, C, Muljo, S A, Kung, A L, Ganesan, S, Drapkin, R, Jenuwein, T, Livingston, D M & Rajewsky, K 2005. Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev*, 19, 489-501.
- Katsman, D, Stackpole, E J, Domin, D R & Farber, D B 2012. Embryonic stem cell-derived microvesicles induce gene expression changes in Muller cells of the retina. *PLoS One*, 7, e50417.
- Kim, H, Wu, J, Ye, S, Tai, C I, Zhou, X, Yan, H, Li, P, Pera, M & Ying, Q L 2013. Modulation of beta-catenin function maintains mouse epiblast stem cell and human embryonic stem cell self-renewal. *Nat Commun*, 4, 2403.
- Kleinsmith, L J & Pierce, G B, Jr. 1964. Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Res*, 24, 1544-51.
- Koizumi, N J, Inatomi, T J, Sotozono, C J, Fullwood, N J, Quantock, A J & Kinoshita, S 2000. Growth factor mRNA and protein in preserved human amniotic membrane. *Curr Eye Res*, 20, 173-7.
- Koyanagi-Aoi, M, Ohnuki, M, Takahashi, K, Okita, K, Noma, H, Sawamura, Y, Teramoto, I, Narita, M, Sato, Y, Ichisaka, T, Amano, N, Watanabe, A, Morizane, A, Yamada, Y, Sato, T, Takahashi, J & Yamanaka, S 2013. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 20569-74.
- Kunath, T, Saba-El-Leil, M K, Almousailleakh, M, Wray, J, Meloche, S & Smith, A 2007. FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. *Development*, 134, 2895-902.
- Labosky, P A, Barlow, D P & Hogan, B L 1994. Mouse embryonic germ (EG) cell lines: transmission through the germline and differences in the methylation imprint of insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r) gene compared with embryonic stem (ES) cell lines. *Development*, 120, 3197-204.
- Lai, D, Wang, Y, Sun, J, Chen, Y, Li, T, Wu, Y, Guo, L & Wei, C 2015. Derivation and characterization of human embryonic stem cells on human amnion epithelial cells. *Sci Rep*, 5, 10014.
- Lai, E C 2004. Predicting and validating microRNA targets. *Genome Biol*, 5, 115.
- Lavon, N, Narwani, K, Golan-Lev, T, Buehler, N, Hill, D & Benvenisty, N 2008. Derivation of euploid human embryonic stem cells from aneuploid embryos. *Stem Cells*, 26, 1874-82.
- Lee, D S, Chen, J H, Lundy, D J, Liu, C H, Hwang, S M, Pabon, L, Shieh, R C, Chen, C C, Wu, S N, Yan, Y T, Lee, S T, Chiang, P M, Chien, S, Murry, C E & Hsieh, P C 2015a. Defined MicroRNAs Induce Aspects of Maturation in Mouse and Human Embryonic-Stem-Cell-Derived Cardiomyocytes. *Cell Rep*, 12, 1960-7.
- Lee, J B, Graham, M, Collins, T J, Lee, J H, Hong, S H, Mcnicol, A J, Shapovalova, Z & Bhatia, M 2015b. Reversible lineage-specific priming of human embryonic stem cells can be exploited to optimize the yield of differentiated cells. *Stem Cells*, 33, 1142-52.
- Lee, T I, Jenner, R G, Boyer, L A, Guenther, M G, Levine, S S, Kumar, R M, Chevalier, B, Johnstone, S E, Cole, M F, Isono, K, Koseki, H, Fuchikami, T, Abe, K, Murray, H L, Zucker, J P, Yuan, B, Bell, G W, Herbolsheimer, E, Hannett, N M, Sun, K, Odom, D T, Otte, A P, Volkert, T L, Bartel, D P, Melton, D A, Gifford, D K, Jaenisch, R & Young, R A 2006. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 125, 301-13.
- Lenz, M, Goetzke, R, Schenk, A, Schubert, C, Veeck, J, Hemedda, H, Koschmieder, S, Zenke, M, Schuppert, A & Wagner, W 2015. Epigenetic biomarker to support classification into pluripotent and non-pluripotent cells. *Sci Rep*, 5, 8973.
- Leonardo, T R, Schultheisz, H L, Loring, J F & Laurent, L C 2012. The functions of microRNAs in pluripotency and reprogramming. *Nat Cell Biol*, 14, 1114-21.

- Lerou, P H, Yabuuchi, A, Huo, H, Miller, J D, Boyer, L F, Schlaeger, T M & Daley, G Q 2008a. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality in vitro fertilization embryos. *Nat Protoc*, 3, 923-33.
- Lerou, P H, Yabuuchi, A, Huo, H, Takeuchi, A, Shea, J, Cimini, T, Ince, T A, Ginsburg, E, Racowsky, C & Daley, G Q 2008b. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *Nat Biotechnol*, 26, 212-4.
- Levayer, R & Lecuit, T 2008. Breaking down EMT. *Nat Cell Biol*, 10, 757-9.
- Li, H L, Wei, J F, Fan, L Y, Wang, S H, Zhu, L, Li, T P, Lin, G, Sun, Y, Sun, Z J, Ding, J, Liang, X L, Li, J, Han, Q & Zhao, R C 2016. miR-302 regulates pluripotency, teratoma formation and differentiation in stem cells via an AKT1/OCT4-dependent manner. *Cell Death Dis*, 7, e2078.
- Li, L, Bennett, S A & Wang, L 2012. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr*, 6, 59-70.
- Li, Y & Kowdley, K V 2012. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal Biochem*, 431, 69-75.
- Liang, G & Zhang, Y 2013. Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell*, 13, 149-59.
- Liao, J, Karnik, R, Gu, H, Ziller, M J, Clement, K, Tsankov, A M, Akopian, V, Gifford, C A, Donaghey, J, Galonska, C, Pop, R, Reyon, D, Tsai, S Q, Mallard, W, Joung, J K, Rinn, J L, Gnirke, A & Meissner, A 2015. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. *Nat Genet*, 47, 469-78.
- Liu, T, Chen, Q, Huang, Y, Huang, Q, Jiang, L & Guo, L 2012a. Low microRNA-199a expression in human amniotic epithelial cell feeder layers maintains human-induced pluripotent stem cell pluripotency via increased leukemia inhibitory factor expression. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 44, 197-206.
- Liu, T, Cheng, W, Huang, Y, Huang, Q, Jiang, L & Guo, L 2012b. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain human iPS cell pluripotency via inhibited endogenous microRNA-145 and increased Sox2 expression. *Exp Cell Res*, 318, 424-34.
- Liu, T, Cheng, W, Liu, T, Guo, L, Huang, Q, Jiang, L, Du, X, Xu, F, Liu, Z & Lai, D 2010. Human amniotic epithelial cell feeder layers maintain mouse embryonic stem cell pluripotency via epigenetic regulation of the c-Myc promoter. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 42, 109-15.
- Liu, W, Yin, Y, Long, X, Luo, Y, Jiang, Y, Zhang, W, Du, H, Li, S, Zheng, Y, Li, Q, Chen, X, Liao, B, Xiao, G, Wang, W & Sun, X 2009. Derivation and characterization of human embryonic stem cell lines from poor quality embryos. *J Genet Genomics*, 36, 229-39.
- Lo Sardo, V, Ferguson, W, Erikson, G A, Topol, E J, Baldwin, K K & Torkamani, A 2017. Influence of donor age on induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 35, 69-74.
- Loh, Y H, Wu, Q, Chew, J L, Vega, V B, Zhang, W, Chen, X, Bourque, G, George, J, Leong, B, Liu, J, Wong, K Y, Sung, K W, Lee, C W, Zhao, X D, Chiu, K P, Lipovich, L, Kuznetsov, V A, Robson, P, Stanton, L W, Wei, C L, Ruan, Y, Lim, B & Ng, H H 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet*, 38, 431-40.
- Lopez-Valladares, M J, Teresa Rodriguez-Ares, M, Tourino, R, Gude, F, Teresa Silva, M & Couceiro, J 2010. Donor age and gestational age influence on growth factor levels in human amniotic membrane. *Acta Ophthalmol*, 88, e211-6.
- Luckett, W P 1975. The development of primordial and definitive amniotic cavities in early Rhesus monkey and human embryos. *Am J Anat*, 144, 149-67.

- Ludwig, T E, Levenstein, M E, Jones, J M, Berggren, W T, Mitchen, E R, Frane, J L, Crandall, L J, Daigh, C A, Conard, K R, Piekarczyk, M S, Llanas, R A & Thomson, J A 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol*, 24, 185-7.
- Ma, H, Folmes, C D, Wu, J, Morey, R, Mora-Castilla, S, Ocampo, A, Ma, L, Poulton, J, Wang, X, Ahmed, R, Kang, E, Lee, Y, Hayama, T, Li, Y, Van Dyken, C, Gutierrez, N M, Tippner-Hedges, R, Koski, A, Mitalipov, N, Amato, P, Wolf, D P, Huang, T, Terzic, A, Laurent, L C, Izpisua Belmonte, J C & Mitalipov, S 2015. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature*, 524, 234-8.
- Ma, H, Morey, R, O'neil, R C, He, Y, Daughtry, B, Schultz, M D, Hariharan, M, Nery, J R, Castanon, R, Sabatini, K, Thiagarajan, R D, Tachibana, M, Kang, E, Tippner-Hedges, R, Ahmed, R, Gutierrez, N M, Van Dyken, C, Polat, A, Sugawara, A, Sparman, M, Gokhale, S, Amato, P, Wolf, D P, Ecker, J R, Laurent, L C & Mitalipov, S 2014a. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature*, 511, 177-83.
- Ma, X, Li, H, Xin, S, Ma, Y & Ouyang, T 2014b. Human amniotic fluid stem cells support undifferentiated propagation and pluripotency of human embryonic stem cell without b-FGF in a density dependent manner. *Int J Clin Exp Pathol*, 7, 4661-73.
- Mallon, B S, Park, K Y, Chen, K G, Hamilton, R S & McKay, R D 2006. Toward xeno-free culture of human embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 1063-75.
- Manor, Y S, Massarwa, R & Hanna, J H 2015. Establishing the human naive pluripotent state. *Curr Opin Genet Dev*, 34, 35-45.
- Marson, A, Levine, S S, Cole, M F, Frampton, G M, Brambrink, T, Johnstone, S, Guenther, M G, Johnston, W K, Wernig, M, Newman, J, Calabrese, J M, Dennis, L M, Volkert, T L, Gupta, S, Love, J, Hannett, N, Sharp, P A, Bartel, D P, Jaenisch, R & Young, R A 2008. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 521-33.
- Martello, G & Smith, A 2014. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 647-75.
- Marti, M, Mulero, L, Pardo, C, Morera, C, Carrio, M, Laricchia-Robbio, L, Esteban, C R & Izpisua Belmonte, J C 2013. Characterization of pluripotent stem cells. *Nat Protoc*, 8, 223-53.
- Martin Gonzalez, J, Morgani, S M, Bone, R A, Bonderup, K, Abelchian, S, Brakebusch, C & Brickman, J M 2016. Embryonic Stem Cell Culture Conditions Support Distinct States Associated with Different Developmental Stages and Potency. *Stem Cell Reports*, 7, 177-91.
- Martin, G R 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78, 7634-8.
- Martin, G R & Evans, M J 1974. The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture. *Cell*, 2, 163-72.
- Martin, G R & Evans, M J 1975. Differentiation of clonal lines of teratocarcinoma cells: formation of embryoid bodies in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 1441-5.
- Martin, M J, Muotri, A, Gage, F & Varki, A 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med*, 11, 228-32.
- Mascetti, V L & Pedersen, R A 2016. Human-Mouse Chimerism Validates Human Stem Cell Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 18, 67-72.
- Matsui, Y, Zsebo, K & Hogan, B L 1992. Derivation of pluripotential embryonic stem cells from murine primordial germ cells in culture. *Cell*, 70, 841-7.
- Maynard, S, Swistowska, A M, Lee, J W, Liu, Y, Liu, S T, Da Cruz, A B, Rao, M, De Souza-Pinto, N C, Zeng, X & Bohr, V A 2008. Human embryonic stem cells have enhanced repair of multiple forms of DNA damage. *Stem Cells*, 26, 2266-74.

- Mcelroy, S L & Reijo Pera, R A 2008. Culturing human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *CSH Protoc*, 2008, pdb prot5044.
- Mclaren, A 2001. Ethical and social considerations of stem cell research. *Nature*, 414, 129-31.
- Miki, T, Lehmann, T, Cai, H, Stolz, D B & Strom, S C 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*, 23, 1549-59.
- Miki, T, Marongiu, F, Dorko, K, Ellis, E C & Strom, S C 2010. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1, Unit 1E 3.
- Mintz, B & Illmensee, K 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 3585-9.
- Mitalipova, M, Calhoun, J, Shin, S, Wininger, D, Schulz, T, Noggle, S, Venable, A, Lyons, I, Robins, A & Stice, S 2003. Human embryonic stem cell lines derived from discarded embryos. *Stem Cells*, 21, 521-6.
- Miyoshi, N, Ishii, H, Nagano, H, Haraguchi, N, Dewi, D L, Kano, Y, Nishikawa, S, Tanemura, M, Mimori, K, Tanaka, F, Saito, T, Nishimura, J, Takemasa, I, Mizushima, T, Ikeda, M, Yamamoto, H, Sekimoto, M, Doki, Y & Mori, M 2011. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell*, 8, 633-8.
- Moore, L D, Le, T & Fan, G 2013. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 38, 23-38.
- Mosher, J T, Pemberton, T J, Harter, K, Wang, C, Buzbas, E O, Dvorak, P, Simon, C, Morrison, S J & Rosenberg, N A 2010. Lack of population diversity in commonly used human embryonic stem-cell lines. *N Engl J Med*, 362, 183-5.
- Muller, F J, Schuldt, B M, Williams, R, Mason, D, Altun, G, Papapetrou, E P, Danner, S, Goldmann, J E, Herbst, A, Schmidt, N O, Aldenhoff, J B, Laurent, L C & Loring, J F 2011. A bioinformatic assay for pluripotency in human cells. *Nat Methods*, 8, 315-7.
- Munne, S 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online*, 12, 234-53.
- Munne, S, Velilla, E, Colls, P, Garcia Bermudez, M, Vemuri, M C, Steuerwald, N, Garrisi, J & Cohen, J 2005. Self-correction of chromosomally abnormal embryos in culture and implications for stem cell production. *Fertil Steril*, 84, 1328-34.
- Nair, R, Santos, L, Awasthi, S, Von Erlach, T, Chow, L W, Bertazzo, S & Stevens, M M 2014. Extracellular vesicles derived from preosteoblasts influence embryonic stem cell differentiation. *Stem Cells Dev*, 23, 1625-35.
- Ng, S Y, Johnson, R & Stanton, L W 2012. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J*, 31, 522-33.
- Nichols, J & Smith, A 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*, 4, 487-92.
- Nichols, J, Zevnik, B, Anastassiadis, K, Niwa, H, Klewe-Nebenius, D, Chambers, I, Scholer, H & Smith, A 1998. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*, 95, 379-91.
- Niknejad, H, Peirovi, H, Jorjani, M, Ahmadiani, A, Ghanavi, J & Seifalian, A M 2008. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering. *Eur Cell Mater*, 15, 88-99.
- Niwa, H, Burdon, T, Chambers, I & Smith, A 1998. Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12, 2048-60.
- Niwa, H, Miyazaki, J & Smith, A G 2000. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24, 372-6.
- O'connor, M D, Kardel, M D, Iosifina, I, Youssef, D, Lu, M, Li, M M, Vercauteren, S, Nagy, A & Eaves, C J 2008. Alkaline phosphatase-positive colony formation is a sensitive, specific, and

- quantitative indicator of undifferentiated human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 26, 1109-16.
- O'leary, T, Heindryckx, B, Lierman, S, Van Bruggen, D, Goeman, J J, Vandewoestyne, M, Deforce, D, De Sousa Lopes, S M & De Sutter, P 2012. Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. *Nat Biotechnol*, 30, 278-82.
- Ogawa, K, Nishinakamura, R, Iwamatsu, Y, Shimosato, D & Niwa, H 2006. Synergistic action of Wnt and LIF in maintaining pluripotency of mouse ES cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 343, 159-66.
- Ohgushi, M, Matsumura, M, Eiraku, M, Murakami, K, Aramaki, T, Nishiyama, A, Muguruma, K, Nakano, T, Suga, H, Ueno, M, Ishizaki, T, Suemori, H, Narumiya, S, Niwa, H & Sasai, Y 2010. Molecular pathway and cell state responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*, 7, 225-39.
- Ohinata, Y, Ohta, H, Shigeta, M, Yamanaka, K, Wakayama, T & Saitou, M 2009. A signaling principle for the specification of the germ cell lineage in mice. *Cell*, 137, 571-84.
- Ojala, M, Rajala, K, Pekkanen-Mattila, M, Miettinen, M, Huhtala, H & Aalto-Setälä, K 2012. Culture conditions affect cardiac differentiation potential of human pluripotent stem cells. *PLoS One*, 7, e48659.
- Osafune, K, Caron, L, Borowiak, M, Martinez, R J, Fitz-Gerald, C S, Sato, Y, Cowan, C A, Chien, K R & Melton, D A 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol*, 26, 313-5.
- Pan, G, Tian, S, Nie, J, Yang, C, Ruotti, V, Wei, H, Jonsdottir, G A, Stewart, R & Thomson, J A 2007. Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 1, 299-312.
- Papadopoulos, V E, McBurney, M W, Gardner, R L & Evans, M J 1975. Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos. *Nature*, 258, 70-73.
- Park, S M, Gaur, A B, Lengyel, E & Peter, M E 2008. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev*, 22, 894-907.
- Pick, M, Stelzer, Y, Bar-Nur, O, Mayshar, Y, Eden, A & Benvenisty, N 2009. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*, 27, 2686-90.
- Pijuan-Galito, S, Tamm, C, Schuster, J, Sobol, M, Forsberg, L, Merry, C L & Anneren, C 2016. Human serum-derived protein removes the need for coating in defined human pluripotent stem cell culture. *Nat Commun*, 7, 12170.
- Posfai, E, Tam, O H & Rossant, J 2014. Mechanisms of pluripotency in vivo and in vitro. *Curr Top Dev Biol*, 107, 1-37.
- Qi, J, Yu, J Y, Shcherbata, H R, Mathieu, J, Wang, A J, Seal, S, Zhou, W, Stadler, B M, Bourgin, D, Wang, L, Nelson, A, Ware, C, Raymond, C, Lim, L P, Magnus, J, Ivanovska, I, Diaz, R, Ball, A, Cleary, M A & Ruohola-Baker, H 2009. microRNAs regulate human embryonic stem cell division. *Cell Cycle*, 8, 3729-41.
- Qiu, D, Ye, S, Ruiz, B, Zhou, X, Liu, D, Zhang, Q & Ying, Q L 2015. Klf2 and Tfc2l1, Two Wnt/beta-Catenin Targets, Act Synergistically to Induce and Maintain Naive Pluripotency. *Stem Cell Reports*, 5, 314-22.
- Racowsky, C, Combelles, C M, Nureddin, A, Pan, Y, Finn, A, Miles, L, Gale, S, O'leary, T & Jackson, K V 2003. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod Biomed Online*, 6, 323-31.

- Redmer, T, Diecke, S, Grigoryan, T, Quiroga-Negreira, A, Birchmeier, W & Besser, D 2011. E-cadherin is crucial for embryonic stem cell pluripotency and can replace OCT4 during somatic cell reprogramming. *EMBO Rep*, 12, 720-6.
- Richards, M, Tan, S P, Tan, J H, Chan, W K & Bongso, A 2004. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*, 22, 51-64.
- Rosenthal, M D, Wishnow, R M & Sato, G H 1970. In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse cells derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*, 44, 1001-14.
- Roubelakis, M G, Trohatou, O & Anagnou, N P 2012. Amniotic fluid and amniotic membrane stem cells: marker discovery. *Stem Cells Int*, 2012, 107836.
- Rowland, T J, Miller, L M, Blaschke, A J, Doss, E L, Bonham, A J, Hikita, S T, Johnson, L V & Clegg, D O 2010. Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin. *Stem Cells Dev*, 19, 1231-40.
- Ruby, J G, Jan, C H & Bartel, D P 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448, 83-6.
- Sasaki, K, Nakamura, T, Okamoto, I, Yabuta, Y, Iwatani, C, Tsuchiya, H, Seita, Y, Nakamura, S, Shiraki, N, Takakuwa, T, Yamamoto, T & Saitou, M 2016. The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion. *Dev Cell*, 39, 169-185.
- Sato, N, Meijer, L, Skaltsounis, L, Greengard, P & Brivanlou, A H 2004. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med*, 10, 55-63.
- Scotland, K B, Chen, S, Sylvester, R & Gudas, L J 2009. Analysis of Rex1 (zfp42) function in embryonic stem cell differentiation. *Dev Dyn*, 238, 1863-77.
- Shahbazi, M N, Jedrusik, A, Vuoristo, S, Recher, G, Hupalowska, A, Bolton, V, Fogarty, N M, Campbell, A, Devito, L G, Ilic, D, Khalaf, Y, Niakan, K K, Fishel, S & Zernicka-Goetz, M 2016. Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues. *Nat Cell Biol*, 18, 700-8.
- Shamblott, M J, Axelman, J, Wang, S, Bugg, E M, Littlefield, J W, Donovan, P J, Blumenthal, P D, Huggins, G R & Gearhart, J D 1998. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 13726-31.
- Shao, Y, Taniguchi, K, Gurdziel, K, Townshend, R F, Xue, X, Yong, K M, Sang, J, Spence, J R, Gumucio, D L & Fu, J 2016. Self-organized amniogenesis by human pluripotent stem cells in a biomimetic implantation-like niche. *Nat Mater*.
- Silva, J, Nichols, J, Theunissen, T W, Guo, G, Van Oosten, A L, Barrandon, O, Wray, J, Yamanaka, S, Chambers, I & Smith, A 2009. Nanog is the gateway to the pluripotent ground state. *Cell*, 138, 722-37.
- Singh, A M, Reynolds, D, Cliff, T, Ohtsuka, S, Mattheyses, A L, Sun, Y, Menendez, L, Kulik, M & Dalton, S 2012. Signaling network crosstalk in human pluripotent cells: a Smad2/3-regulated switch that controls the balance between self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*, 10, 312-26.
- Slack, J M 2000. Stem cells in epithelial tissues. *Science*, 287, 1431-3.
- Sokol, S Y 2011. Maintaining embryonic stem cell pluripotency with Wnt signaling. *Development*, 138, 4341-50.
- Solter, D 2006. From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nat Rev Genet*, 7, 319-27.
- Son, M Y, Choi, H, Han, Y M & Cho, Y S 2013. Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem Cells*, 31, 2374-87.

- Son, M Y, Kwak, J E, Kim, Y D & Cho, Y S 2015. Proteomic and network analysis of proteins regulated by REX1 in human embryonic stem cells. *Proteomics*, 15, 2220-9.
- Soncini, F & Ward, C M 2011. The function of e-cadherin in stem cell pluripotency and self-renewal. *Genes (Basel)*, 2, 229-59.
- Song, X, Wang, B, Bromberg, M, Hu, Z, Konigsberg, W & Garen, A 2002. Retroviral-mediated transmission of a mouse VL30 RNA to human melanoma cells promotes metastasis in an immunodeficient mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 6269-73.
- Stacey, G N, Cobo, F, Nieto, A, Talavera, P, Healy, L & Concha, A 2006. The development of 'feeder' cells for the preparation of clinical grade hES cell lines: challenges and solutions. *J Biotechnol*, 125, 583-8.
- Stepanov, V A 2010. Genomes, populations and diseases: ethnic genomics and personalized medicine. *Acta Naturae*, 2, 15-30.
- Stephenson, R O, Yamanaka, Y & Rossant, J 2010. Disorganized epithelial polarity and excess trophoblast cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development*, 137, 3383-91.
- Stevens, L C 1964. Experimental Production of Testicular Teratomas in Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 654-61.
- Stevens, L C 1967. The biology of teratomas. *Adv Morphol*, 6, 1-31.
- Stevens, L C 1970. The development of transplantable teratocarcinomas from intratesticular grafts of pre- and postimplantation mouse embryos. *Dev Biol*, 21, 364-82.
- Stevens, L C & Little, C C 1954. Spontaneous Testicular Teratomas in an Inbred Strain of Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 40, 1080-7.
- Strom, S, Rodriguez-Wallberg, K, Holm, F, Bergstrom, R, Eklund, L, Stromberg, A M & Hovatta, O 2010. No relationship between embryo morphology and successful derivation of human embryonic stem cell lines. *PLoS One*, 5, e15329.
- Subramanyam, D, Lamouille, S, Judson, R L, Liu, J Y, Bucay, N, Derynck, R & Belloch, R 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol*, 29, 443-8.
- Sudheer, S, Bhushan, R, Fauler, B, Lehrach, H & Adjaye, J 2012. FGF inhibition directs BMP4-mediated differentiation of human embryonic stem cells to syncytiotrophoblast. *Stem Cells Dev*, 21, 2987-3000.
- Suh, M R, Lee, Y, Kim, J Y, Kim, S K, Moon, S H, Lee, J Y, Cha, K Y, Chung, H M, Yoon, H S, Moon, S Y, Kim, V N & Kim, K S 2004. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol*, 270, 488-98.
- Tachibana, M, Amato, P, Sparman, M, Gutierrez, N M, Tippner-Hedges, R, Ma, H, Kang, E, Fulati, A, Lee, H S, Sritanaudomchai, H, Masterson, K, Larson, J, Eaton, D, Sadler-Fredd, K, Battaglia, D, Lee, D, Wu, D, Jensen, J, Patton, P, Gokhale, S, Stouffer, R L, Wolf, D & Mitalipov, S 2013. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell*, 153, 1228-38.
- Taei, A, Gourabi, H, Seifinejad, A, Totonchi, M, Shahbazi, E, Valojerdi, M R, Eftekhari, P, Karimian, L & Baharvand, H 2010. Derivation of new human embryonic stem cell lines from preimplantation genetic screening and diagnosis-analyzed embryos. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 46, 395-402.
- Takahashi, K, Tanabe, K, Ohnuki, M, Narita, M, Ichisaka, T, Tomoda, K & Yamanaka, S 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131, 861-72.
- Takahashi, K & Yamanaka, S 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126, 663-76.

- Takashima, Y, Guo, G, Loos, R, Nichols, J, Ficz, G, Krueger, F, Oxley, D, Santos, F, Clarke, J, Mansfield, W, Reik, W, Bertone, P & Smith, A 2014. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell*, 158, 1254-69.
- Tesar, P J, Chenoweth, J G, Brook, F A, Davies, T J, Evans, E P, Mack, D L, Gardner, R L & McKay, R D 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448, 196-9.
- Theunissen, T W, Powell, B E, Wang, H, Mitalipova, M, Faddah, D A, Reddy, J, Fan, Z P, Maetzel, D, Ganz, K, Shi, L, Lungjangwa, T, Imsoonthornruksa, S, Stelzer, Y, Rangarajan, S, D'alessio, A, Zhang, J, Gao, Q, Dawlaty, M M, Young, R A, Gray, N S & Jaenisch, R 2014. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell*, 15, 471-87.
- Thomson, J A, Itskovitz-Eldor, J, Shapiro, S S, Waknitz, M A, Swiergiel, J J, Marshall, V S & Jones, J M 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282, 1145-7.
- Thomson, J A, Kalishman, J, Golos, T G, Durning, M, Harris, C P, Becker, R A & Hearn, J P 1995. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 7844-8.
- Thomson, J A, Kalishman, J, Golos, T G, Durning, M, Harris, C P & Hearn, J P 1996. Pluripotent cell lines derived from common marmoset (*Callithrix jacchus*) blastocysts. *Biol Reprod*, 55, 254-9.
- Tofoli, F A, Dasso, M, Morato-Marques, M, Nunes, K, Pereira, L A, Da Silva, G S, Fonseca, S A, Costas, R M, Santos, H C, Da Costa Pereira, A, Lotufo, P A, Bensenor, I M, Meyer, D & Pereira, L V 2016. Increasing The Genetic Admixture of Available Lines of Human Pluripotent Stem Cells. *Sci Rep*, 6, 34699.
- Trounson, A, Daley, G Q, Pasque, V & Plath, K 2013. A new route to human embryonic stem cells. *Nat Med*, 19, 820-1.
- Trounson, A & Dewitt, N D 2013. Pluripotent stem cells from cloned human embryos: success at long last. *Cell Stem Cell*, 12, 636-8.
- Tsumura, A, Hayakawa, T, Kumaki, Y, Takebayashi, S, Sakaue, M, Matsuoka, C, Shimotohno, K, Ishikawa, F, Li, E, Ueda, H R, Nakayama, J & Okano, M 2006. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*, 11, 805-14.
- Turchinovich, A, Weiz, L, Langheinz, A & Burwinkel, B 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39, 7223-33.
- Unger, C, Skottman, H, Blomberg, P, Dilber, M S & Hovatta, O 2008. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet*, 17, R48-53.
- Valadi, H, Ekstrom, K, Bossios, A, Sjostrand, M, Lee, J J & Lotvall, J O 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9.
- Vallier, L, Alexander, M & Pedersen, R A 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci*, 118, 4495-509.
- Van De Velde, H, Cauffman, G, Tournaye, H, Devroey, P & Liebaers, I 2008. The four blastomeres of a 4-cell stage human embryo are able to develop individually into blastocysts with inner cell mass and trophectoderm. *Hum Reprod*, 23, 1742-7.
- Van Herendaal, B J, Oberti, C & Brosens, I 1978. Microanatomy of the human amniotic membranes. A light microscopic, transmission, and scanning electron microscopic study. *Am J Obstet Gynecol*, 131, 872-80.
- Villa-Diaz, L G, Kim, J K, Laperle, A, Palecek, S P & Krebsbach, P H 2016. Inhibition of Focal Adhesion Kinase Signaling by Integrin alpha6beta1 Supports Human Pluripotent Stem Cell Self-Renewal. *Stem Cells*, 34, 1753-64.

- Wakayama, T, Tabar, V, Rodriguez, I, Perry, A C, Studer, L & Mombaerts, P 2001. Differentiation of embryonic stem cell lines generated from adult somatic cells by nuclear transfer. *Science*, 292, 740-3.
- Wang, B, Yao, K, Huuskens, B M, Shen, H H, Zhuang, J, Godson, C, Brennan, E P, Wilkinson-Berka, J L, Wise, A F & Ricardo, S D 2016. Mesenchymal Stem Cells Deliver Exogenous MicroRNA-let7c via Exosomes to Attenuate Renal Fibrosis. *Mol Ther*, 24, 1290-301.
- Wang, F, Kong, H J, Kan, Q C, Liang, J Y, Zhao, F, Bai, A H, Li, P F & Sun, Y P 2012a. Analysis of blastocyst culture of discarded embryos and its significance for establishing human embryonic stem cell lines. *J Cell Biochem*, 113, 3835-42.
- Wang, G, Guo, X, Hong, W, Liu, Q, Wei, T, Lu, C, Gao, L, Ye, D, Zhou, Y, Chen, J, Wang, J, Wu, M, Liu, H & Kang, J 2013. Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 2858-63.
- Wang, Y, Xu, C, Wang, H, Liu, J, Hui, S, Li, N, Liu, F & Li, J 2012b. Efficient derivation of human embryonic stem cell lines from discarded embryos through increases in the concentration of basic fibroblast growth factor. *Hum Cell*, 25, 16-23.
- Wang, Z, Oron, E, Nelson, B, Razis, S & Ivanova, N 2012c. Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*, 10, 440-54.
- Ware, C B, Nelson, A M, Mecham, B, Hesson, J, Zhou, W, Jonlin, E C, Jimenez-Caliani, A J, Deng, X, Cavanaugh, C, Cook, S, Tesar, P J, Okada, J, Margaretha, L, Sperber, H, Choi, M, Blau, C A, Treuting, P M, Hawkins, R D, Cirulli, V & Ruohola-Baker, H 2014. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 4484-9.
- Warmflash, A, Arduini, B L & Brivanlou, A H 2012. The molecular circuitry underlying pluripotency in embryonic stem cells. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*, 4, 443-56.
- Weber, J A, Baxter, D H, Zhang, S, Huang, D Y, Huang, K H, Lee, M J, Galas, D J & Wang, K 2010. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*, 56, 1733-41.
- Wei, C L, Miura, T, Robson, P, Lim, S K, Xu, X Q, Lee, M Y, Gupta, S, Stanton, L, Luo, Y, Schmitt, J, Thies, S, Wang, W, Khrebtukova, I, Zhou, D, Liu, E T, Ruan, Y J, Rao, M & Lim, B 2005. Transcriptome profiling of human and murine ESCs identifies divergent paths required to maintain the stem cell state. *Stem Cells*, 23, 166-85.
- Weinshilboum, R 2003. Inheritance and drug response. *N Engl J Med*, 348, 529-37.
- Williams, R L, Hilton, D J, Pease, S, Willson, T A, Stewart, C L, Gearing, D P, Wagner, E F, Metcalf, D, Nicola, N A & Gough, N M 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336, 684-7.
- Wu, J, Okamura, D, Li, M, Suzuki, K, Luo, C, Ma, L, He, Y, Li, Z, Benner, C, Tamura, I, Krause, M N, Nery, J R, Du, T, Zhang, Z, Hishida, T, Takahashi, Y, Aizawa, E, Kim, N Y, Lajara, J, Guillen, P, Campistol, J M, Esteban, C R, Ross, P J, Saghatelian, A, Ren, B, Ecker, J R & Izpisua Belmonte, J C 2015. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature*, 521, 316-21.
- Xiao, J, Mai, D H & Xie, L 2016. Resetting Human Naive Pluripotency. *Genet Epigenet*, 8, 37-41.
- Xu, C, Inokuma, M S, Denham, J, Golds, K, Kundu, P, Gold, J D & Carpenter, M K 2001. Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol*, 19, 971-4.
- Xu, N, Papagiannakopoulos, T, Pan, G, Thomson, J A & Kosik, K S 2009. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. *Cell*, 137, 647-58.
- Yamada, M, Johannesson, B, Sagi, I, Burnett, L C, Kort, D H, Prosser, R W, Paull, D, Nestor, M W, Freeby, M, Greenberg, E, Golland, R S, Leibel, R L, Solomon, S L, Benvenisty, N, Sauer, M V

- & Egli, D 2014. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature*, 510, 533-6.
- Yamada, S, Pokutta, S, Drees, F, Weis, W I & Nelson, W J 2005. Deconstructing the cadherin-catenin-actin complex. *Cell*, 123, 889-901.
- Yang, X, Smith, S L, Tian, X C, Lewin, H A, Renard, J P & Wakayama, T 2007. Nuclear reprogramming of cloned embryos and its implications for therapeutic cloning. *Nat Genet*, 39, 295-302.
- Ye, S, Li, P, Tong, C & Ying, Q L 2013. Embryonic stem cell self-renewal pathways converge on the transcription factor Tfcp2l1. *EMBO J*, 32, 2548-60.
- Ying, Q L, Nichols, J, Chambers, I & Smith, A 2003. BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115, 281-92.
- Young, R A 2011. Control of the embryonic stem cell state. *Cell*, 144, 940-54.
- Yu, J, Vodyanik, M A, Smuga-Otto, K, Antosiewicz-Bourget, J, Frane, J L, Tian, S, Nie, J, Jonsdottir, G A, Ruotti, V, Stewart, R, Slukvin, I & Thomson, J A 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*, 318, 1917-20.
- Yuan, A, Farber, E L, Rapoport, A L, Tejada, D, Deniskin, R, Akhmedov, N B & Farber, D B 2009. Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*, 4, e4722.
- Zhang, J, Wilson, G F, Soerens, A G, Koonce, C H, Yu, J, Palecek, S P, Thomson, J A & Kamp, T J 2009. Functional cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells. *Circ Res*, 104, e30-41.
- Zhang, P, Andrianakos, R, Yang, Y, Liu, C & Lu, W 2010. Kruppel-like factor 4 (Klf4) prevents embryonic stem (ES) cell differentiation by regulating Nanog gene expression. *J Biol Chem*, 285, 9180-9.
- Zhang, S, He, H, Day, A J & Tseng, S C 2012. Constitutive expression of inter-alpha-inhibitor (I α I) family proteins and tumor necrosis factor-stimulated gene-6 (TSG-6) by human amniotic membrane epithelial and stromal cells supporting formation of the heavy chain-hyaluronan (HC-HA) complex. *J Biol Chem*, 287, 12433-44.
- Zimmerlin, L, Park, T S, Huo, J S, Verma, K, Pather, S R, Talbot, C C, Jr., Agarwal, J, Stepan, D, Zhang, Y W, Considine, M, Guo, H, Zhong, X, Gutierrez, C, Cope, L, Canto-Soler, M V, Friedman, A D, Baylin, S B & Zambidis, E T 2016. Tankyrase inhibition promotes a stable human naive pluripotent state with improved functionality. *Development*.

ANEXOS

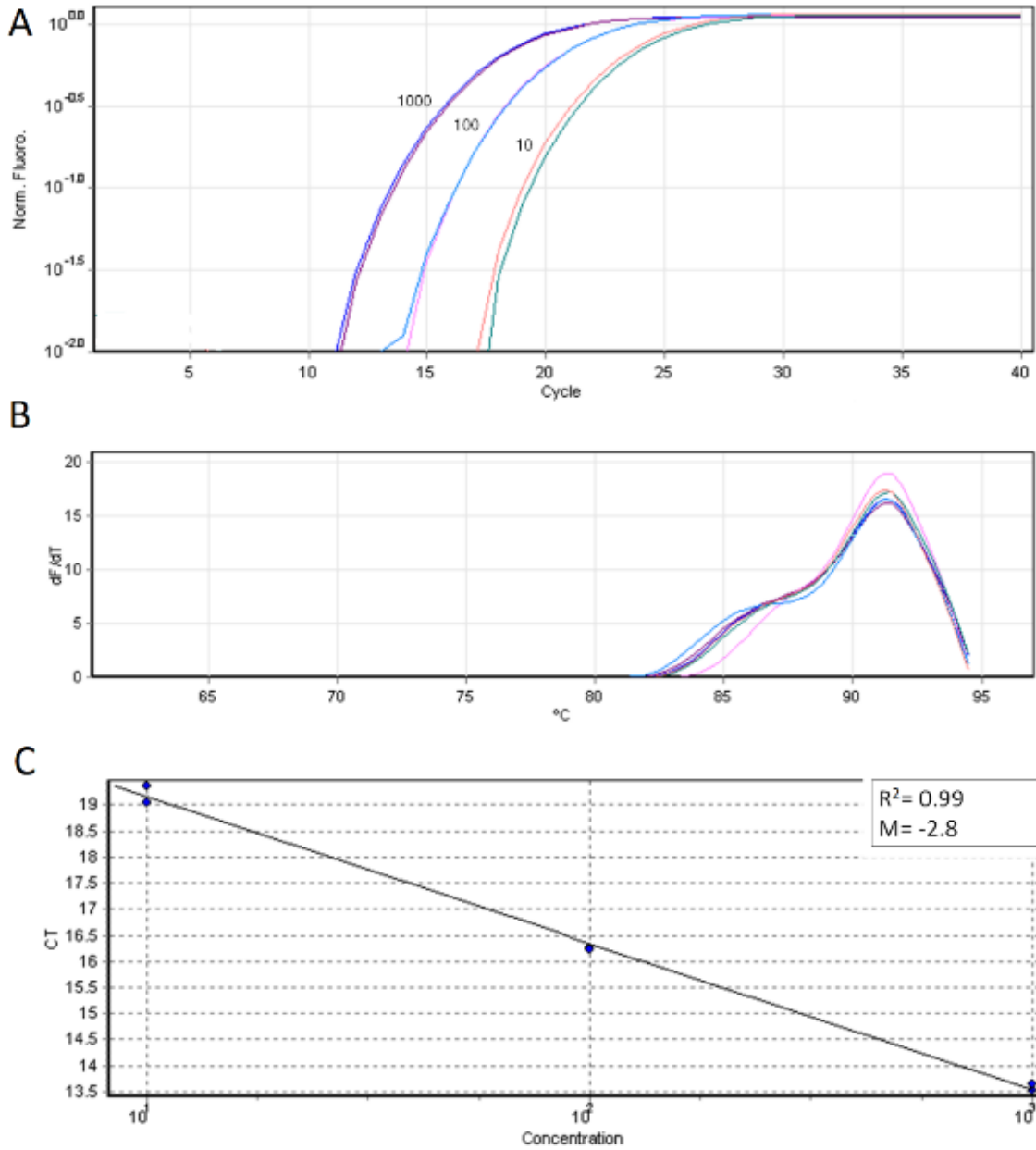


Figura Suplementaria 1. Rango dinámico miR-39. Se muestran las gráficas generadas por el programa Rotor-Gene Q. A) Curvas de amplificación obtenidas al graficar la fluorescencia por ciclo para cada concentración de cDNA (1000, 100 y 10 ng/μl). B) Curvas de fusión de las muestras en donde se corrobora la especificidad de la reacción por la presencia de un solo pico. C) Regresión lineal del promedio del CT de las réplicas para cada concentración de cDNA contra el logaritmo de la concentración de cDNA empleada (puntos). R2 =índice de correlación lineal y M= pendiente.

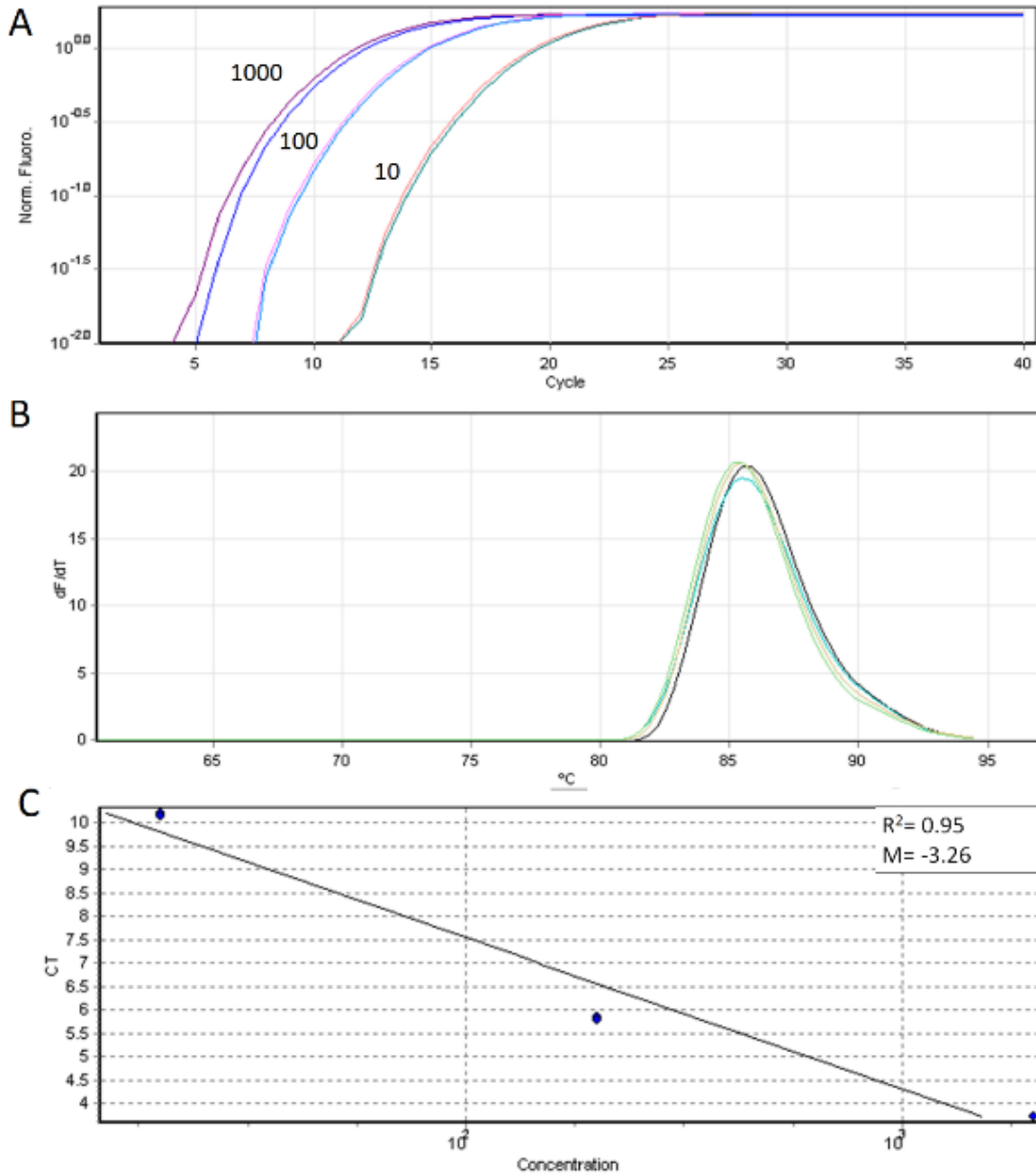


Figura Suplementaria 2. Rango dinámico miR-92a. Se muestran las gráficas generadas por el programa Rotor-Gene Q. A) Curvas de amplificación obtenidas al graficar la fluorescencia por ciclo para cada concentración de cDNA (1000, 100 y 10 ng/μl). B) Curvas de fusión de las muestras en donde se corrobora la especificidad de la reacción por la presencia de un solo pico. C) Regresión lineal del promedio del CT de las réplicas para cada concentración de cDNA contra el logaritmo de la concentración de cDNA empleada (puntos). R² = índice de correlación lineal y M = pendiente.

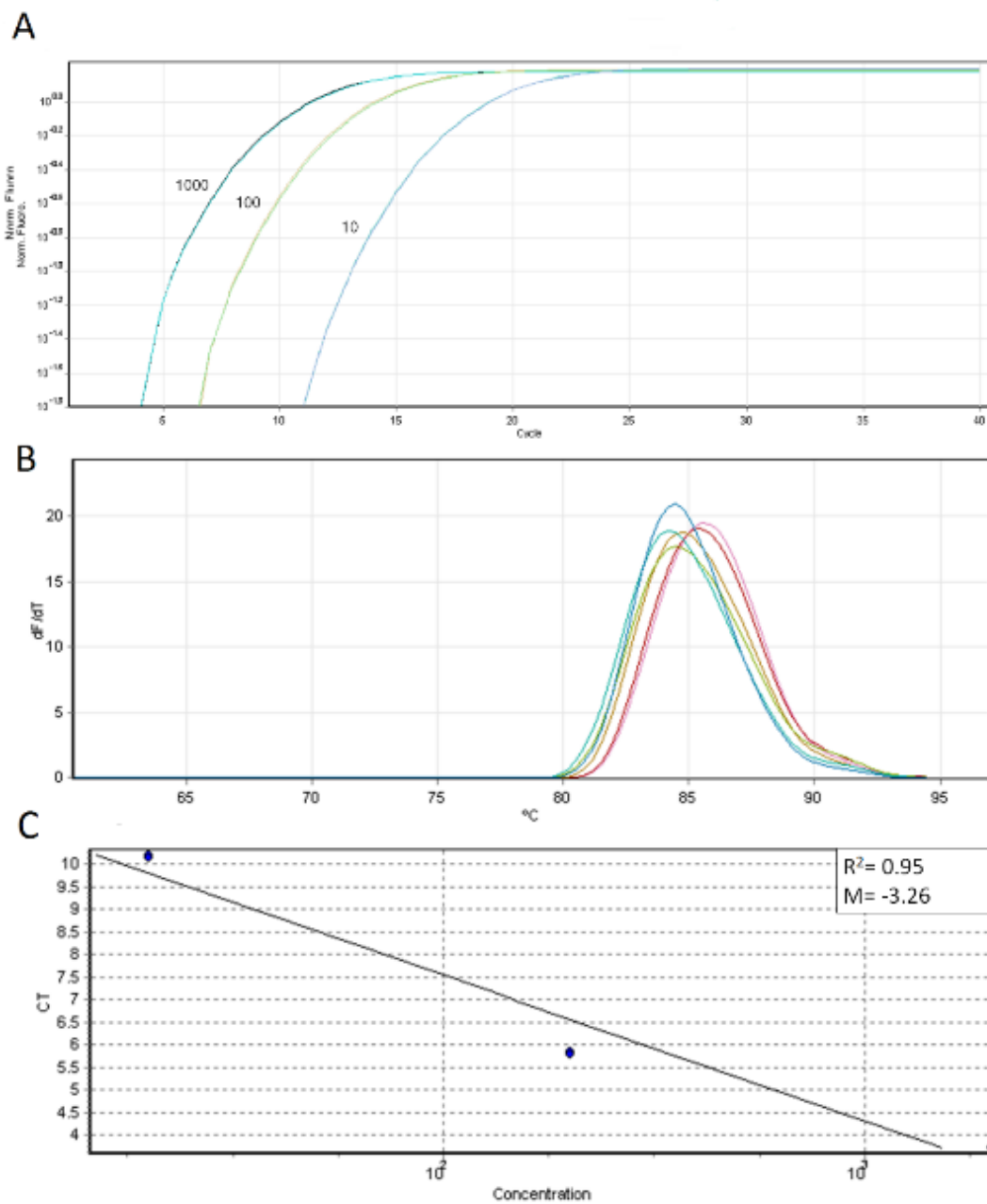


Figura Suplementaria 3. Rango dinámico miR-302d. Se muestran las gráficas generadas por el programa Rotor-Gene Q. A) Curvas de amplificación obtenidas al graficar la fluorescencia por ciclo para cada concentración de cDNA (1000, 100 y 10 ng/ μ l). B) Curvas de fusión de las muestras en donde se corrobora la especificidad de la reacción por la presencia de un solo pico. C) Regresión lineal del promedio del CT de las réplicas para cada concentración de cDNA contra el logaritmo de la concentración de cDNA empleada (puntos). R^2 =índice de correlación lineal y M= pendiente.

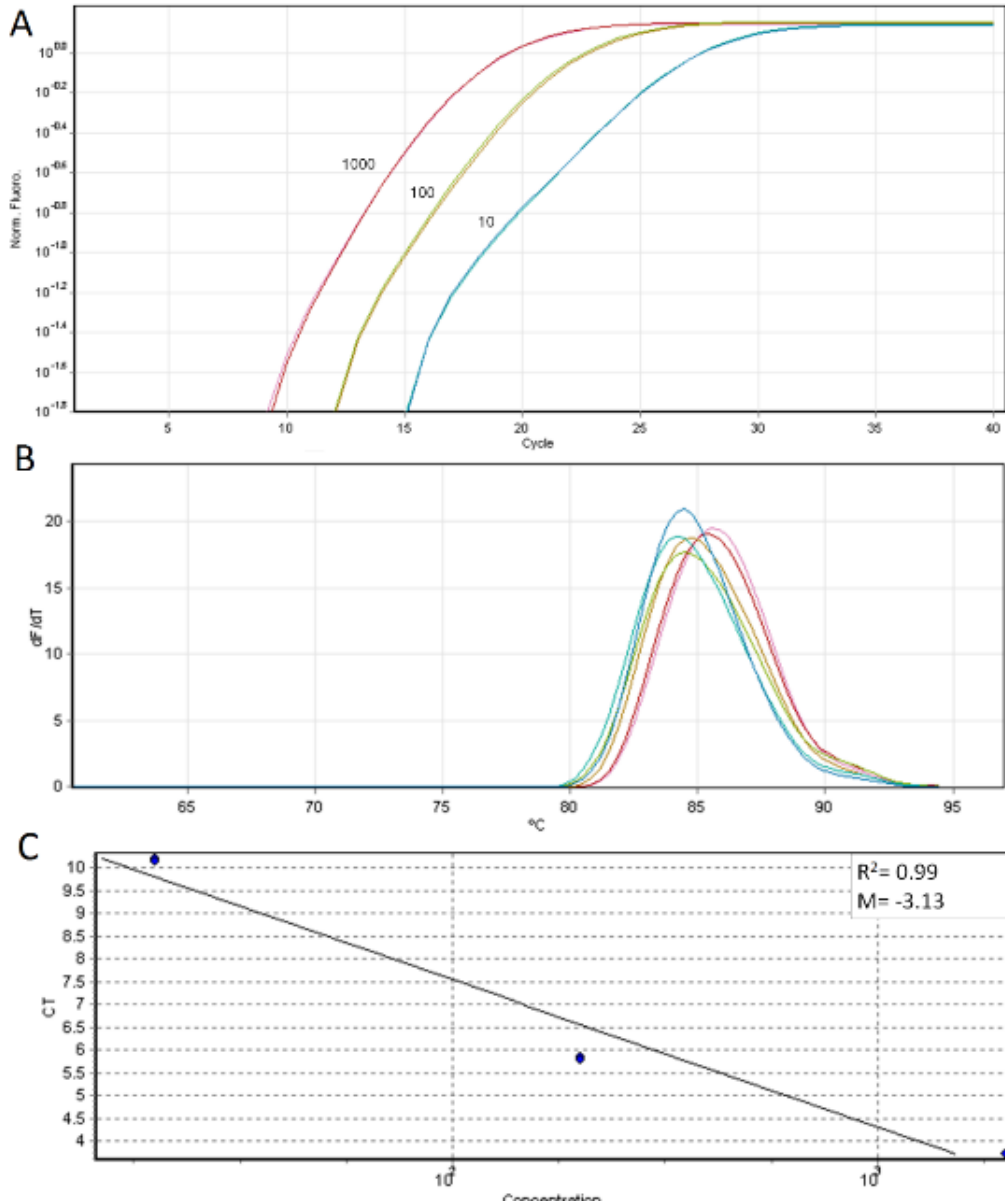


Figura Suplementaria 4. Rango dinámico miR-200c. Se muestran las gráficas generadas por el programa Rotor-Gene Q. A) Curvas de amplificación obtenidas al graficar la fluorescencia por ciclo para cada concentración de cDNA (1000, 100 y 10 ng/μl). B) Curvas de fusión de las muestras en donde se corrobora la especificidad de la reacción por la presencia de un solo pico. C) Regresión lineal del promedio del CT de las réplicas para cada concentración de cDNA contra el logaritmo de la concentración de cDNA empleada (puntos). R2 =índice de correlación lineal y M= pendiente.

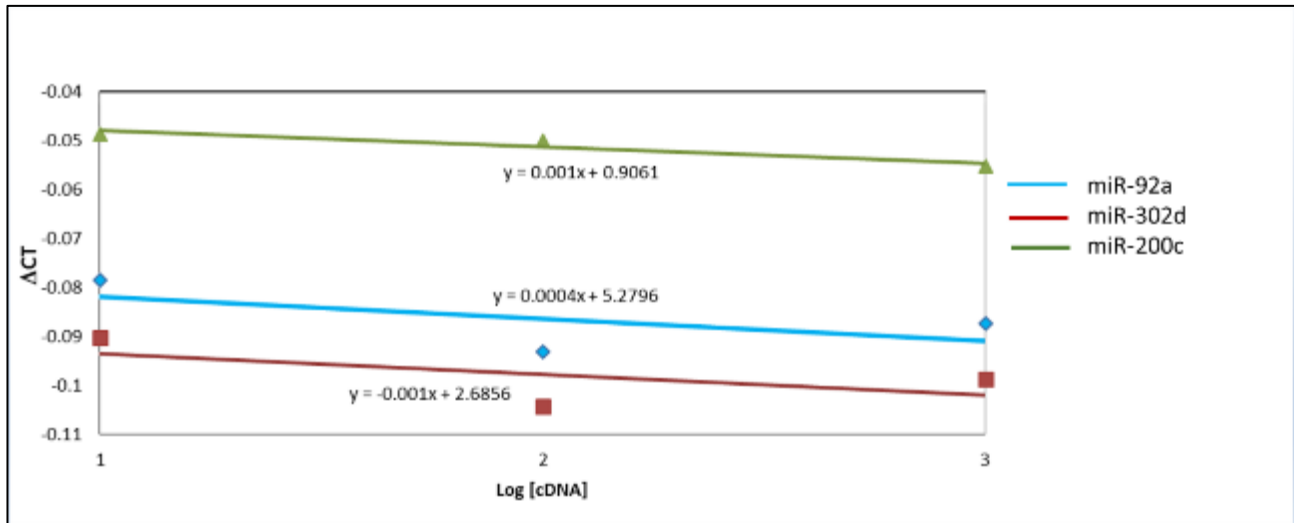


Figura Suplementaria 5. Validación del método $2^{-\Delta\Delta CT}$. La gráfica muestra los valores obtenidos de ΔCT para cada miRNA en relación al logaritmo de las concentraciones de cDNA (10, 100 y 1000 ng/ μ l) y el ajuste de los mismos usando la ecuación de regresión lineal. En todos los casos los valores de las pendientes de las líneas fueron cercanos a cero.

ADDENDUM

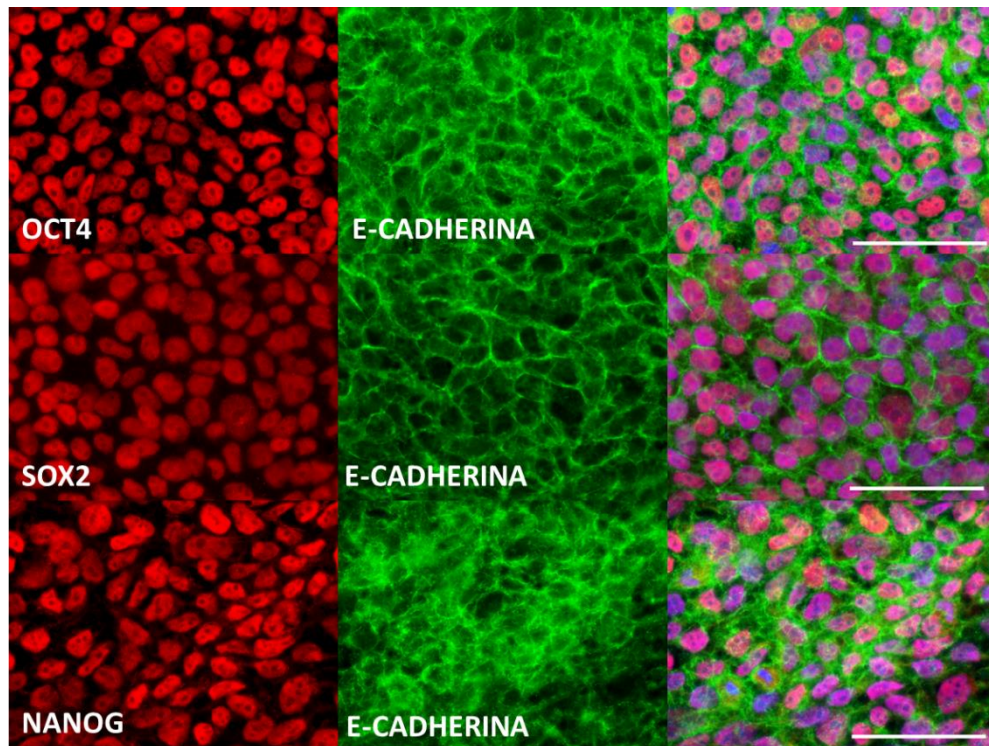
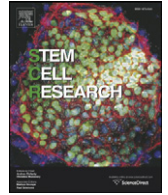


Figura 16.1 Expresión de E-Cadherina en Amicqui-1. Micrografías (40x) tomadas con microscopía de epifluorescencia de colonias Amicqui-1 sobre la capa de hAEC con doble inmunotinción para cada factor de transcripción (OCT4, SOX2 y NANOG) con la molécula de adhesión E-Cadherina. Se puede observar que para los factores de transcripción la marca es nuclear (núcleos identificados con DAPI), mientras que para E-Cadherina las células presentan marcaje no nuclear. Barras de calibración, 25 μ M

**PUBLICACIONES GENERADAS CON AGRADECIMIENTOS AL PROGRAMA
DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**



Lab resource: Stem cell line

Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos

Daniela Ávila-González^a, Eva Vega-Hernández^b, Juan Carlos Regalado-Hernández^b, Julio Francisco De la Jara-Díaz^b, Irma Lydia García-Castro^a, Anayansi Molina-Hernández^a, Elsa Romelia Moreno-Verduzco^c, Guadalupe Razo-Aguilera^d, Héctor Flores-Herrera^e, Wendy Portillo^f, Néstor Emmanuel Díaz-Martínez^g, Guadalupe García-López^{a,*}, Néstor Fabián Díaz^{a,*}

^a Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico

^b Subdirección de Reproducción Humana, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico

^c Departamento de Anatomía Patológica, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico

^d Departamento de Genética, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico

^e Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Perinatología, Ciudad de México, Mexico

^f Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

^g Departamento de Biotecnología Médica y Farmacéutica, Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, Guadalajara, Jalisco, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 July 2015

Accepted 21 July 2015

Available online 26 July 2015

ABSTRACT

Data from the literature suggest that human embryonic stem cell (hESC) lines used in research do not genetically represent all human populations. The derivation of hESC through conventional methods involve the destruction of viable human embryos, as well the use of mouse embryonic fibroblasts as a feeder layer, which has several drawbacks. We obtained the hESC line (Amicqui-1) from poor-quality (PQ) embryos derived and maintained on human amniotic epithelial cells (hAEC). This line displays a battery of markers of pluripotency and we demonstrated the capacity of these cells to produce derivatives of the three germ layers.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Resource table:

Name of stem cell construct	Amicqui-1
Institution	Instituto Nacional de Perinatología (INPER)
Persons who created resource	Daniela Ávila González and Néstor Fabián Díaz
Contact person and email	nestor.diaz@inper.mx
Date archived/stock date	June, 2015
Origin	3 day poor-quality embryos
Type of resource	Biological reagent: hESC derived
Sub-type	Cell line
Key transcription factors	POU5F1, SOX2, NANOG, KLF4, ZFP42, STELLA, SALL4, TBX3, KLF2, FGF4, TFCEP2L1, GBX2, IFITM1, KIT
Authentication	Identity and purity of cell line confirmed (Fig. 1)
Link to related literature (direct URL links and full references)	N/A
Information in public databases	N/A

* Corresponding authors at: Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Torre de Investigación, Departamento de Biología Celular, Ciudad de México, 11000, Mexico.

E-mail addresses: guadalupe.garcia@inper.mx (G. García-López), nestor.diaz@inper.mx (N.F. Díaz).

1. Resource Details

Sixty-four IVF 3-day embryos (Fig. 1A) that were deemed PQ and thus unsuitable for either uterine transfer or cryopreservation were donated and cultured on hAEC. Morphological grading criteria used by embryologists were previously described [Racowsky et al., 2003](#). We observed embryo outgrowth in 3 samples on the 4th day after plating. Just one embryo outgrowth survived (Fig. 1B) consecutive mechanic passages until colonies were obtained and the line Amicqui-1 was established. Our derivation efficiency was 1.5%, similar to that reported in the literature [Lerou et al., 2008a](#). This line presented a normal karyotype 46, XY (Fig. 1C), and it was positive for unspecific alkaline phosphatase (Fig. 1D). Amicqui-1 cells expressed the core genes of pluripotency, OCT4, SOX2 and NANOG, detected by immunofluorescence (Fig. 1E) and by RT-PCR (Fig. 1F). Also, the line was positive for surface antigens TRA-1-60, SSEA-4 and the cellular adhesion molecule E-CADHERIN (Fig. 1E), and it expressed KLF4, STELLA, SALL4, TBX3, KLF2, FGF4 mRNAs for transcription factors involved in pluripotency (Fig. 1D). Later, we evaluated the differentiation capacity of Amicqui-1 cells through *in vitro* and *in vivo* assays. The tissues derived from embryoid bodies were positive for specific markers: mesoderm (T), ectoderm (PAX6 and TUJ-1) and endoderm (FOXA2 and SOX17) (Fig. 1G), while the teratomas contained differentiated cellular types from the three embryonic layers (Fig. 1H).

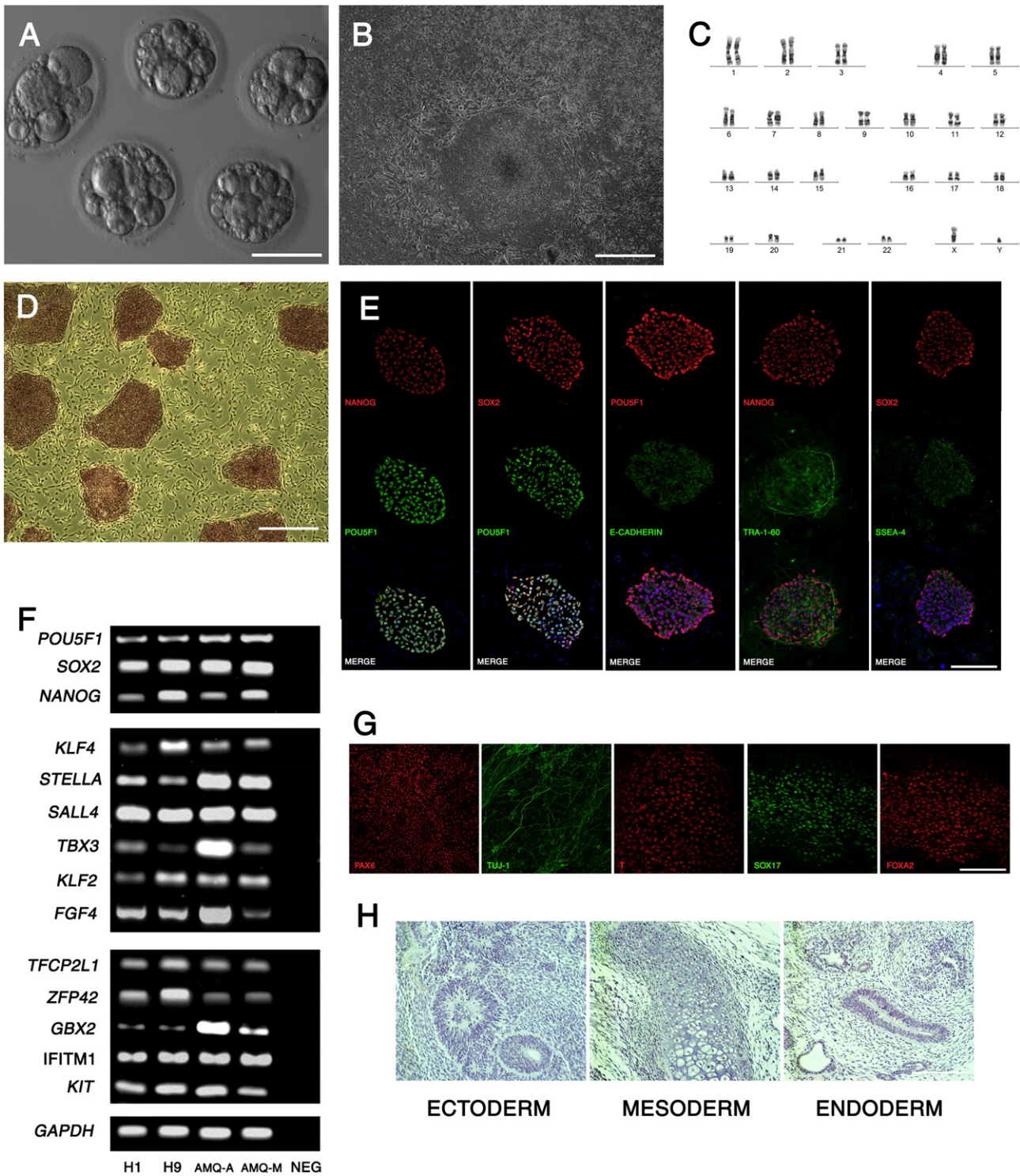


Fig. 1. Characterization of the Amicqui-1 hESC line obtained from a poor-quality embryo using hAEC as feeder layer. A) Representative bright-field micrography of poor-quality, 3-day embryos taken on an Olympus IX81 microscope; Scale bar = 100 μ m. B) Outgrowth of a poor-quality, 3-day embryo on hAEC observed with a Zeiss Axio Vert A1 microscope; Scale bar = 500 μ m. C) Karyotype analysis, Amicqui-1 presents a normal karyotype 46, XY. D) Colonies of the Amicqui-1 line are positive for alkaline phosphatase; Scale bar = 500 μ m. E) Representative confocal micrographs showing double immunostaining for pluripotency markers SOX2 and NANOG colocalize with POU5F1; moreover, these transcription factors and surface antigens are expressed in the same colony (POU5F1 with E-CADHERIN, NANOG with TRA-1-60, SOX2 with SSEA-4). Nuclei stained with DAPI. Scale bar 50 = μ m. F) Detection by RT-PCR of core pluripotency (*POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*), ground-state (*KLF4*, *STELLA*, *SALL4*, *TBX3*, *KLF2*, *FGF4*) and epiblast (*TFCP2L1*, *ZFP42*, *GBX2*, *IFITM1*, *KIT*) genes in the Amicqui-1 cell line maintained on hAEC (AMQ-A) as well as on conventional iMEF (AMQ-M) feeder cell layers; hESC lines H1 and H9 served as positive controls; NEG: negative control. G) Micrographs of immunostaining for differentiation markers (PAX6 and TUJ-1 for ectoderm; T for mesoderm; FOXA2 and SOX17 for endoderm) of tissues derived from embryoid bodies of Amicqui-1. Images were taken by confocal microscopy. Scale bar = 50 μ m. H) Histological sections of teratomas formed by the Amicqui-1 hESC line contain tissues derived from three embryonic layers. Scale bar = 200 μ m.

Finally, we demonstrated that our ESC line maintained on a conventional feeder layer still expressed mRNAs for pluripotency factors (Fig. 1F).

2. Materials and methods

The PQ embryos from *in vitro* fertilization were donated, and the fetal membranes were collected in accord with the INPER Ethics Committee (212250-21071) as well as the Guidelines for the Conduct of hESC Research (ISSCR, 2006).

The hAEC were isolated and cultured from human fetal membranes according to the protocol described previously Miki et al., 2010. The cells were seeded at a density of $3 \times 10^4/\text{cm}^2$ to use as feeder layer in passage (P) 1. Primary and inactive CF-1 mouse embryonic fibroblasts (iMEF) were obtained as described in the literature Lerou et al., 2008b. The hESC lines, H1 and H9 were obtained from WiCell Research Institute, Inc. and were used as controls.

Discarded PQ 3-day embryos were transferred using pipettes (Cook) onto 4-well plates (Nunc) and treated with Tyrode's acid solution (SIGMA) to remove the pellucida zone. The embryos were washed with hESC derivation medium containing KO DMEM, 3% fetal bovine serum (FBS) embryonic stem cell-qualified, 17% KO serum replacement, 100 μM nonessential amino acids, 1 mM Glutamine, 100 μM β -mercaptoethanol (all from Gibco), and 4 ng/ml basic fibroblast growth factor (bFGF) (Peprotech), then plated on a hAEC feeder layer in 4-well dishes and incubated at 37 °C, in a 5% CO₂ and 5% O₂ atm. The cells were undisturbed for two days and subsequently, the hESC derivation medium was changed every day until the embryo outgrowth was observed. After two weeks, the embryo outgrowth was excised using a 27G needle and passaged onto fresh hAEC feeder layers. The initial passages were mechanical until colonies with a hESC-like-morphology were observed. The Amicqui-1 line was maintained on hAEC as well as on conventional iMEF feeder layers using maintenance medium (DMEM/F12, 20% KO serum replacement, 100 μM nonessential amino acids, 1 mM Glutamine, 100 μM β -mercaptoethanol (all from Gibco), and 4 ng/ml bFGF (Peprotech)) until P40.

Alkaline phosphatase was detected with the Alkaline Phosphatase Staining Kit (Stemgent) following the manufacturer's instructions.

2.1. Immunodetection

After fixing cells with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min, primary antibodies were applied as follows: mouse anti-OCT-4 (Becton Dickson, 1:100), rabbit anti-OCT-4 (1:400, Abcam), rabbit anti-SOX2 (1:1000, Millipore), rabbit anti-NANOG (1:500, Peprotech), mouse anti-E-CADHERIN (Becton Dickson, 1:100), mouse anti-SSEA-4 (Abcam, 1:200), mouse anti-TRA-1-60 (Abcam, 1:250), rabbit anti-PAX6 (Abcam, 1:200), mouse anti-TUJ-1 (Covance, 1:1000), mouse anti-SOX17 (Abcam, 1:100), rabbit anti-T (Abcam, 1:200), rabbit anti-FOXA2 (Abcam, 1:1000). Appropriate fluorescently labeled secondary antibodies (Life Technologies) were used. The images were acquired in a LSM 710 confocal microscope (Zeiss).

2.2. RT-PCR

Total RNA was isolated using TRIzol (Life Technologies). Total RNA was reverse-transcribed into cDNA with OligodT (Promega) using AMV Reverse Transcriptase (Promega). PCR was performed Tfl DNA polymerase (Promega). Cycling conditions were as follows: 95 °C for 15 min followed by 35 cycles of amplification (95 °C denaturation for 60 s, 54 to 58 °C annealing for 60 s, 72 °C elongation for 60 s) and a final extension at 72 °C for 10 min.

2.3. Primers

POU5F1_F: GAG GAG TCC CAG GAC ATG AA; POU5F1_R: GTG GTC TGG CTG AAC ACC TT; SOX2_F: GCC GAG TGG AAA CTT TTG TC;

SOX2_R: GTT CAT GTG CGC GTA ACT GT; NANOG_F: TGC AAA TGT CTT CTG CTG AGT; NANOG_R: GTT CAG GAT GTT GGA GAG TTC; KLF4_F: GAT GGG GTC TGT GAC TGG AT; KLF4_R: CCC CCA ACT CAC GGA TAT AA; STELLA_F: GTT ACT GGG CGG AGT TCG TA; STELLA_R: TGA AGT GGC TTG GTG TCT TG; SALL4_F: TGC AGC AGT TGG TGG AGA AC; SALL4_R: TCG GTG GCA AAT GAG ACA TTC; TBX3_F: GCA GCT TTC AAC TGC TTC G; TBX3_R: TGA GGT TCG ATG TCC CTA CA; KLF2_F: CTA CAC CAA GAG TTC GCA TCT G; KLF2_R: CCG TGT GCT TTC GGT AGT G; FGF4_F: CTA CAA CGC CTA CGA GTC CTA CA; FGF4_R: GTT GCA CCA GAA AAG TCA GAG TTC; TFCP2L1_F: CCC CTG CAA TAT GTG TTG TG; TFCP2L1_R: AAA GTC TCC CAG CTT CCG AT; ZFP42_F: GCG TAC GCA AAT TAA AGT CCA GA; ZFP42_R: CAG CAT CCT AAA CAG CTC GCA GAA T; GBX2_F: CAC CAC GTC TAC GGG CAA GAA C; GBX2_R: AGC TGC TGA TGC TGA CTT CTG A; IFITM1_F: ATG TCG TCT GGT CCC TGT TC; IFITM1_R: GTC ATG AGG ATG CCC AGA AT; KIT_F: GGC GAC GAG ATT AGG CTG TT; KIT_R: CAT TCG TTT CAT CCA GGA TCT CA; GAPDH_F: AAG GTG AAG GTC GGA GTC AAC; GAPDH_R: CCT GGA AGA TGG TGA TGG GAT.

2.4. Spontaneous *in vitro* differentiation

Embryoid bodies (EB) were grown in hESC maintenance medium without bFGF on non-adherent plates. The EB differentiations were performed on 0.1% gelatin-coated plates with DMEM medium plus 20% FBS, and the medium was changed daily.

2.5. *In vivo* differentiation assay

For experimental production of teratomas, 1×10^6 hESC were transplanted into the kidney capsule of immunodeficient SCID mice. After 6 weeks, the resulting tumors were collected and fixed in 4% PFA. For histology analysis, sections of the teratomas were analyzed after hematoxylin–eosin staining. All experiments involving laboratory animals were performed under protocols approved by INPER and Instituto de Neurobiología Committees.

3. Verification and authentication

The karyotype was performed by Departamento de Genética at INPER. The analysis through Giemsa-Banding of chromosomes showed a normal karyotype 46, XY.

Acknowledgments

This work was supported by funds from CONACYT [202717 and Scholarships to Daniela Ávila-González (231731)] and INPER 212250-21071. This work was performed by Daniela Ávila-González in partial fulfillment of the requirements for the Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM. The authors would like to thank Francisco Camacho, Martín García and Dr. Dorothy Pless for their excellent technical assistance.

References

- Lerou, P.H., et al., 2008a. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *Nat. Biotechnol.* 26, 212–214.
- Lerou, P.H., et al., 2008b. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality *in vitro* fertilization embryos. *Nat. Protoc.* 3, 923–933.
- Miki, T., Marongiu, F., Dorko, K., Ellis, E.C., Strom, S.C., 2010. Isolation of amniotic epithelial stem cells. *Curr. Protoc. Stem Cell Biol.* (Chapter 1, Unit 1E 3).
- Racowsky, C., et al., 2003. Day 3 and day 5 morphological predictors of embryo viability. *Reprod. Biomed. Online* 6, 323–331.

Capturing the Ephemeral Human Pluripotent State

Daniela Ávila-González,¹ Guadalupe García-López,¹ Irma Lydia García-Castro,¹ Héctor Flores-Herrera,²
Anayansi Molina-Hernández,¹ Wendy Portillo,³ and Néstor Fabián Díaz^{1*}

¹Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, México D.F., México

²Departamento de Inmunobiología, Instituto Nacional de Perinatología, Lomas Virreyes, México D.F., México

³Departamento de Neurobiología Conductual y Cognitiva, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, México

During human development, pluripotency is present only in early stages of development. This ephemeral cell potential can be captured *in vitro* by obtaining pluripotent stem cells (PSC) with self-renewal properties, the human embryonic stem cells (hESC). However, diverse studies suggest the existence of a plethora of human PSC (hPSC) that can be derived from both embryonic and somatic sources, depending on defined culture conditions, their spatial origin, and the genetic engineering used for reprogramming. This review will focus on hPSC, covering the conventional primed hESC, naïve-like hPSC that resemble the ground-state of development, region-selective PSC, and human induced PSC (hiPSC). We will analyze differences and similarities in their differentiation potential as well as in the molecular circuitry of pluripotency. Finally, we describe the need for human feeder cells to derive and maintain hPSC, because they could emulate the interaction of *in vivo* pluripotent cells with extraembryonic structures that support development. *Developmental Dynamics* 245:762–773, 2016. © 2016 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: naïve pluripotency; primed pluripotency; heterogeneity

Submitted 29 October 2015; First Decision 16 March 2016; Accepted 17 March 2016; Published online 23 March 2016

Introduction

Pluripotency is defined as the ability of a single cell to differentiate into all the specialized lineages that make up an organism proper. This transitory cell property present in early embryo stages can be captured in specific conditions *in vitro* to derive embryonic stem cell (ESC) lines. These cells do not only retain their pluripotent ability, but unlike the embryo, can undergo self-renewal in the presence of specific growth factors. The pluripotency and self-renewal characteristics confer a unique nature to ESC, making them suitable as models for developmental biology and regenerative medicine.

The first ESC lines were obtained by the groups of Martin (Martin, 1981) and Evans (Evans and Kaufman, 1981), who cultured the isolated inner cell mass (ICM) from a mouse blastocyst on a feeder layer of mouse embryonic fibroblasts. Derivation of human ESC (hESC) lines from human blastocysts, through *in vitro* fertilization procedures, was later achieved (Thomson et al., 1998).

The Nature of hESC

Due to the essence of the methods to obtain these particular cells, the following question emerged: Are hESC an artifact or an immortal representation of human pluripotency *in vitro*? To explore the

nature of hESC, diverse groups compared the expression profiles of established lines with those of early-stage human embryos. One pioneering study compared gene expression among hESC and human blastocysts and demonstrated the presence of two distinct sets of genes; one set is expressed differentially between human lines and the ICM and another set is expressed only in hESC, and could confer properties of pluripotency and self-renewal (Reijo Pera et al., 2009).

Giritharan et al. demonstrated that hESC derived from a blastomere or ICM exhibited comparable functional and genetic properties. These findings suggested that, during the derivation process, hESC acquired a specific phenotype and that the developmental stage used to obtain pluripotent cells was not relevant (Giritharan et al., 2011). Galan et al. analyzed differential gene expression among various stages of human embryo development (eight-cell stage, ICM-blastocyst) and the conventional hESC (primed pluripotency, see below). Although hESC lines expressed several native transcripts from early human embryos, the whole genome expression profile indicated that hESC lines have a unique transcriptome signature, which could be a consequence of their *in vitro* adaptation process (Galan et al., 2013).

O'Leary et al. described a unique transitory structure that precedes the formation of hESC colonies from a blastocyst. This structure, denominated PICMI (post ICM-intermediate), expressed genes of the human ICM, such as transcription factor CP2-like 1 (TFCP2L1) and ZFP42 zinc finger protein (ZFP42); however, there was a decrease of these markers during the subsequent passages before the acquisition of hESC colonies. These same authors also

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: CONACYT; Grant numbers: 231731; Grant number: 202717; Grant sponsor: INPER; Grant number: 212250-21071.

*Correspondence to: Néstor Fabián Díaz, Departamento de Biología Celular, Instituto Nacional de Perinatología, Montes Urales 800, Lomas Virreyes, México D.F., 11000 México. E-mail: nestor.diaz@inper.mx

Article is online at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dvdy.24405/abstract>

© 2016 Wiley Periodicals, Inc.

reported an up-regulation of genes involved in pluripotency (POU5F1, SOX2, NANOG, LIN28) and the Activin/Nodal pathway (NODAL, LEFTY1, LEFTY3, TDGF1) in the PICMI, which are still expressed at higher levels in human ICM (O'Leary et al., 2012). These results suggest that hESC are indeed derived from pluripotent cells of the ICM; however, they undergo changes in their cellular organization as PICMI, as well as gene expression profile due to culture conditions before stabilizing in a pluripotent state *in vitro*.

Recently, Yan et al. analyzed the transcriptome of early human embryo stages (zygote, two-cell, four-cell, eight-cell, morula, and late blastocyst) and hESC in passage 0 (P0) and P10 using single-cell RNA sequencing (Yan et al., 2013). They found that transcriptomes of human epiblast and hESC P0 showed differential gene expression, concurring with previous studies (O'Leary et al., 2012). Together, these data suggested that changes during the initial process of deriving hESC are a consequence of an exclusive, signature expression profile that does not resemble that of the *in vivo* pluripotent cells. It is important to note that all these studies were performed with conventional hESC maintained on mouse embryonic feeder layers.

So, what is the importance of feeder layers on the biology of hESC? Their importance resides in the finding that maintenance of hESC in conventional conditions (derived and maintained in culture medium supplemented with 20% Knockout Serum Replacement [KOSR] and fibroblast growth factor-2 [FGF-2]) with feeder layers, induces a heterogeneous cell population. However, cell lines present the essential core transcription factors (POU5F1, SOX2, and NANOG), and they produce teratomas (the gold standard assay to evaluate pluripotency in human lines). Thus, hESC are integrated into different subpopulations with distinct cell-cycle properties, clonogenic potential and gene expression, which would impact their pluripotent potential and the design of differentiation protocols (Stewart et al., 2006).

On the other hand, recent studies have described a "homogenous" pluripotent state in mouse ESC (mESC) characterized as having less predisposition for differentiation and more similarities with the epiblast, defined as the naïve ground state.

Introduction of The Terms Naïve and Primed Pluripotency

The concept of "ground state" was introduced by the Smith's group, meaning the ability to self-renewal and unrestrained capacity from developmental specification and epigenetic restrictions of embryonic mouse cells *in vitro* and *in vivo* (Silva and Smith, 2008; Ying et al., 2008). The nonepigenetic restrictions allow cells to have a uniform expression of pluripotent transcription factors, reactivation of both X alleles in female cells, and a global DNA hypomethylation pattern (Marks et al., 2012; Leitch et al., 2013; Hackett and Surani, 2014). Afterward, the same group proposed two pluripotency states in mouse: naïve and primed. During mouse development, an unrestricted potential to produce all embryo lineages, including germline, characterize epiblast cells from preimplantation embryos. This property has been named naïve pluripotency (Nichols and Smith, 2009; Boroviak and Nichols, 2014).

Also, these cells express a set of transcription factors involved in pluripotency (estrogen related receptor beta [Esrrb], Nanog and Kruppel-like factor 2 [Klf2]), which are down-regulated once the

epiblast is implanted (Boroviak and Nichols, 2014). Whereas, during postimplantation epiblast stage, cells acquire a primed nature, express another set of genes (Fgf5, Nodal, T), and become prepared to initiate lineage specification and epigenetic restrictions (Nichols and Smith, 2009, 2012; Boroviak and Nichols, 2014; Hackett and Surani, 2014). The benchmark to classify pluripotent cells in the mouse as naïve or primed is the formation of chimeras. This assay consists in the injection of pluripotent cells into a mouse blastocyst, which is reimplanted into the uterus to continue its development (Hyun, 2015).

On the other hand, Hackett and Surani defined the "ground state" as the "unrestricted naïve pluripotent state" present only *in vivo* mouse epiblasts, and used the term "naïve pluripotency" to name the property of a cell, either *in vitro* or *in vivo*, to contribute to all the embryonic lineages and the chimera formation. However, a clear definition of the terminology remains to be reached in the literature. Smith's group asserts that "naïve preimplantation epiblast" as well as mESC represent the "ground state" (Silva and Smith, 2008; Wray et al., 2010; Nichols and Smith, 2012). Indeed, they use the terms "ground state naïve pluripotency" (Nichols and Smith, 2009), and "naïve ground state" (Nichols and Smith, 2012) to encompass both *in vitro* and *in vivo* pluripotent cells.

Recently, they have described that ground state is a property of mESC on specific conditions. mESC cultured on serum supplemented with leukemia inhibitory factor (LIF) show a heterogeneous population. There is not a uniform expression of pluripotent factors and the cells present a high rate of spontaneous differentiation; thus, these cells are considered naïve but not ground state because of their metastability (Hackett and Surani, 2014; Kumar et al., 2014). Conversely, it has been demonstrated that mESC cultured in serum-free conditions, specifically on defined medium supplemented with LIF and small molecule inhibitors of the ERK2 and GSK3 pathways (2i/LIF condition), form more homogeneous colonies, with a pluripotency stable state that mostly resembles to the naïve preimplantation embryo (Ying et al., 2008). For this reason, it has been considered that the 2i/LIF condition does not only maintain naïve pluripotency but also stabilizes the ground state in mESC (Wray et al., 2010; Boroviak et al., 2014; Hackett and Surani, 2014).

On the other hand, Brons et al. and Tesar et al. reported the derivation of another type of murine pluripotent cells from late stages, postimplantation epiblasts and named them epiblast-derived stem cells (EpiSC) (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007). These present a naturally primed pluripotency, because the *in vivo* counterpart of EpiSC, the postimplantation epiblast, although still pluripotent (as previously mentioned), presents epigenetic restrictions and a state poised to initiate differentiation (Tesar et al., 2007; Guo et al., 2009). While, mESC required exogenous LIF to activate JAK/STAT and suppress the ERK2 and GSK3 signaling pathways to maintain their identity (Ying et al., 2008), EpiSC are dependent on the FGF/ERK2 and Activin/Nodal pathways (Brons et al., 2007; Tesar et al., 2007).

Another difference between naïve mESC and EpiSC is their capacity to integrate into chimeras during their development, mESC contribute to three embryonic layers and germ lineage in preimplantation stages (Marks et al., 2012), while primed EpiSC only contribute in the later postimplantation blastocyst stage (Huang et al., 2012). Remarkably, conventional hESC share several characteristics of mouse EpiSC, such as dependence on FGF/ERK2 and Activin/Nodal signaling routes, low contribution

to the chimera formation, high levels of bivalent epigenetic marks, one inactive X chromosome in female cells, and low expression of naïve markers. Moreover, the LIF/STAT3 pathway is unessential for their maintenance (Daheron et al., 2004; Vallier et al., 2005; Eiselleova et al., 2008; Gafni et al., 2013; Manor et al., 2015).

Furthermore, human pluripotent cells have low contribution to the chimera formation in the early blastocyst (Gafni et al., 2013). However, a recent study has demonstrated that hESC efficiently integrate to chimeras when the cells are injected in later stages of development (gastrula primitive streak) (Mascetti and Pedersen, 2016). All this evidence suggests that hESC are more similar to primed pluripotent cells, although they are not identical to EpiSC. For example, hESC lack the postimplantation marker FGF-5, and they express naïve markers like Kruppel-like factor 4 (KLF4), ZFP42, PR domain-containing 14 (PRDM14), and E-Cadherin (Chia et al., 2010; Bhatia et al., 2013; Manor et al., 2015).

In summary, the generation of mouse pluripotent stem cells resemble different stages of embryonic development which represent different pluripotency stages (Fig. 1). On the other hand, hESC show a pluripotent state that does not represent the *in vivo* human embryo. This characteristic could be explained by the fact that the culture conditions are not optimal to derive and maintain hESC, instead it suggests that these cells are an artifact. As a result, this raises a question: Is it possible to obtain human lines with a naïve phenotype that resembles the ground state?

The State of The Art of In Vitro Human Ground State Naïve Pluripotency

Several groups have reported obtaining naïve hESC-like cells by using small-molecules induction protocols or induced pluripotent stem cells (iPSC) reprogramming. However, the conditions for obtaining human cells with a phenotype similar to mESC/2iLIF were divergent between studies, so there is not yet a consensus about the optimal conditions to capture naïve human pluripotent cells *in vitro* (Fig. 2).

In a pioneering study, the Jaenisch group generated human naïve-like cells through a secondary reprogramming system of fibroblasts genetically modified to overexpress POU5F1, KLF2, and KLF4 using a doxycycline-inducible lentiviral system and cultured them in 2i/LIF conditions. Their cells had characteristics of naïve mESC and could be maintained for over 50 passages. However, the cells began to differentiate once doxycycline was withdrawn; thus, unlike mESC, the 2i/LIF condition was not enough to maintain naïve pluripotency in human cells (Hanna et al., 2010). Gafni et al. supplemented the 2i/LIF medium with inhibitors of JNK, PKC, ROCK, and low doses of FGF-2 and transforming growth factor-beta1 (TGF- β 1) (NHSM, naïve human stem cell medium). When they cultured hESC in NHSM, their colonies presented nuclear expression of TFE3, a lack of H3K27me3, down-regulation of lineage-associated and primed genes, and up-regulation of naïve transcripts; the cells were also able to contribute to the formation of cross-species, nonviable chimeras, all of which are features of ground state naïve cells (Gafni et al., 2013).

On the other hand, Chan et al. described the derivation of hESC that resembled the preimplantation epiblast. They used a combination of three small molecules (inhibitors of GSK3, ERK2, and BMP) together with LIF (3i/LIF) and high doses of FGF-2 and

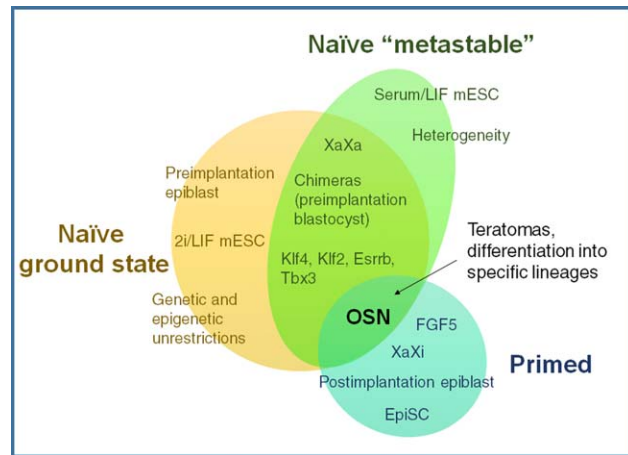


Fig. 1. Mouse pluripotency spectrum. mouse PSC (mPSC) can be subclassified according to their growing response in defined culture conditions, which induce them a representative specific pluripotent state, although all mPSC have in common the expression of master genes Pou5f1, Sox2, and Nanog, and the ability to form teratomas, and differentiate into specific cell lineages. Naïve cells have the ability to give rise to all embryonic lineages and germline, demonstrated by chimeras formation when they are injected in preimplantation embryos. Naïve mESC have both X chromosomes activated, present high clonogenicity, activated self-renewal by the STAT3 signaling pathway, and the expression of mouse naïve specific markers Klf4, Klf2, Esrrb, Tbx3. However, naïve mESC cultured in serum and LIF exhibit a cell heterogeneity with a metastable pluripotency that do not represent a counterpart from the embryo. In contrast, naïve mESC that grown in 2i/LIF conditions are more homogeneous and represent the ground state from the preimplantation epiblast, which it refers as the unrestricted naïve pluripotency, freedom from developmental specification, or epigenetic restriction. The primed EpiSC exhibit an XaXi status and are less readily integrated into the preimplantation blastocyst; but share some characteristics with the postimplantation epiblast, like present epigenetic restrictions and a state poised to initiate differentiation.

TGF- β to maintain the naïve properties of hESC, which expressed intrinsic genes from preimplantation cells such as KLF4, T-box 3 (TBX3) and developmental pluripotency associates 3 (DPPA3). Nevertheless, they did not observe X-gene reactivation in female cells and did not perform assays to demonstrate if the cells could integrate into nonviable mouse blastocysts (Chan et al., 2013). Ware et al. designed a protocol to obtain naïve-like hESC using the 2i/FGF-2 condition plus a mix of histone deacetylase (HDAC) inhibitors. However, withdrawal of FGF-2 induced the differentiation of the cells, even in presence of LIF (Ware et al., 2014).

These reports suggest that addition of FGF-2 is fundamental for the maintenance of the hESC in a state similar to the primed state, but this did not involve the ERK2 pathway. Valamehr et al. generated human induced PSC (hiPSC) by episomal reprogramming, using small molecules to derive and maintain feeder-free hiPSC, which exhibited a pluripotency with similar characteristics to ground state: repression of differentiation associated genes and a high clonality in comparison with hiPSC in conventional medium; however, evidence do not confirm the ground state as blastocyst injection. The novelty of their method consisted in the use of "specific-stage media," i.e., the media FRM (Fate Reprogramming Medium) during process reprogramming and media FMM (Fate Maintenance Medium) for long-term maintenance. FRM was composed by inhibitors of ROCK, GSK3, MEK, and TGF- β pathways, as well as FGF-2 and LIF; while FMM had the same components, except the inhibitor SB431542 (SB) (Valamehr et al., 2014). That

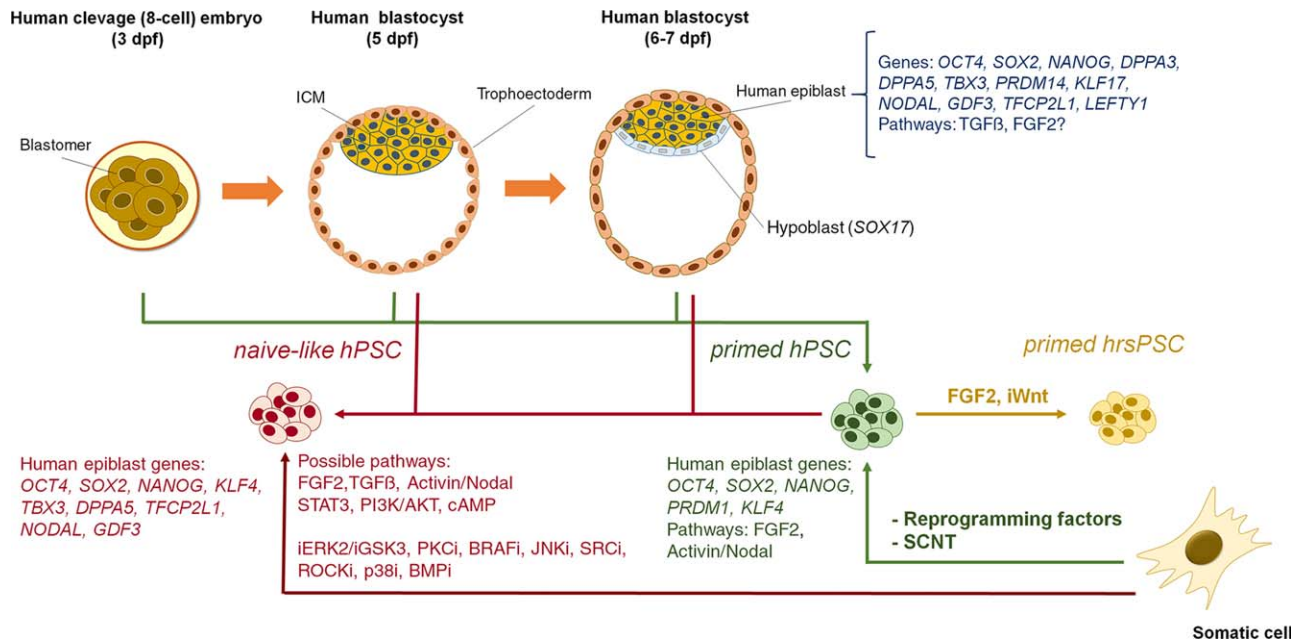


Fig. 2. Spectrum of human pluripotency. hPSC lines derived from different stages of the human pluripotent embryo (eight-cell, ICM-isolated from 5–7 days post fertilization) and by reprogramming methods are similar in their expression profile, and they are considered primed (green line), which suggested that human cells progress to an in vitro adaptation and rewiring of a pluripotent molecular circuitry supported by the FGF-2 and Activin/Nodal pathways. However, some primed lines displayed heterogeneity in their functional potential, probably because the culture conditions for derivation and maintenance. It has been demonstrated that, by using factors and molecules that modulate or enforce pathways different from the conventional FGF-2/ERK2, it is possible to generate novel hPSC lines which have an alternative state to primed human region-selective PSC hrsPSC [gold line] or naïve [red line]). However, the relevance of these signalling pathways in the pluripotent human epiblast is still unknown.

suggested, at least in these reports, the derivation of hiPSC and the maintenance process suggest specific pathways; for example, the inhibition of TGF- β is crucial to enhance reprogramming, but non-essential to support the continuous passage of hiPSC.

Recently, Theunissen et al. described the use of 2i/LIF conditions together with Activin A and inhibitors of the protein kinases BRAF, ROCK, and SRC (5i/L/A). In these conditions, the cells presented a pronounced positive regulation of naïve markers (TFCP2L1, KLF2, and KLF4) as compared with previous reports. Nevertheless, the cells acquired chromosomal aberrations, inactivation of their X-chromosome persisted, and they were not able to form chimeras (Theunissen et al., 2014). Takashima et al. supplemented 2i/LIF medium with a PKC inhibitor (Gö6983) to generate naïve-like hESC, which had high levels of naïve markers (TFCP2L1, KLF2, and KLF4) in comparison with the lines reported by Gafni et al. and Chan et al. Although the “cocktail” was not supplemented with FGF-2 and Activin A, it could not be concluded that the naïve circuitry was dependent on these, because the cells were always maintained on feeder layers (Takashima et al., 2014).

Using a combination of small molecules with growth factors (2i/LIF/FGF-2 plus ascorbic acid and forskolin), Duggal et al. reported to promote the naïve state in hESC independently of KLF2 and NANOG transgenes. As previously reported, the naïve state was dependent on FGF-2, but using PI3K/AKT/mTORC pathway. The human cells obtained expressed diverse naïve markers, but their pluripotent potential was only determined by spontaneous and directed differentiation (Duggal et al., 2015). Finally, Chen et al. analyzed the effect of forced activation of STAT3 induced by LIF in hESC. To this end, cells were transfected with a lentiviral vector expressing the hormone-dependent STAT3; they

demonstrated that constitutive STAT activity together with 2i/LIF induced the naïve phenotype in hESC. Moreover, the addition of an inhibitor of the FGF- receptor (SU5402) did not affect the characterization of human cells as naïve, in contrast to the FGF-2-dependent naïve lines previously reported (Chen et al., 2015).

It is important to note that the current reference to derive human naïve cells is preimplantation epiblasts from mouse; however, it has been demonstrated that human epiblasts do not express all murine epiblast markers, e.g., Klf2 and Esrrb (Blakeley et al., 2015). Furthermore, some reported naïve lines are dependent on and others are independent of the FGF pathway. Therefore, it is necessary to derive human naïve cells using screening markers from early human embryos as reference. Also, the majority of cell lines were maintained on feeder layers, which represents an additional variable for understanding naïve human pluripotency, due to the numerous factors released by the feeder cells that could affect pluripotent cells (Eiselleova et al., 2008).

Considering all this evidence, we can answer the following question: Is there a genuine naïve state of the human cell? It has already been demonstrated in mouse that naïve ESC originate from a specific population in the early embryo, and they are considered a genuine in vitro counterpart captured from the in vivo pluripotent cell population. Boroviak et al. compared the transcriptional profile of established mESC lines with that of early-stage embryos. The analysis showed that mESC in serum-free 2i/LIF conditions correspond to the E4.5 stage, which means that mESC resemble preimplantation epiblasts more than any other development stage (Boroviak et al., 2014, 2015).

On the other hand, the human gene network analysis performed by Huang et al. revealed that the established naïve-like hESC do not overlap in the majority of gene modules with naïve

mESC, except the lines generated by Theunissen and Takashima. Actually, these lines were the most similar to the human blastocyst. These data suggested that the naïve state is not conserved between species; instead the naïve human and mouse lines resemble their respective blastocysts (Huang et al., 2014).

Human vs. Mouse Development

It is probable that the regulation of the naïve state in human cells is different from that of naïve mESC. This discrepancy could be explained by developmental differences among species at the blastocyst and epiblast stages. Smith's group proposed that mESC emulate the ability of the embryo to enter into a state of delay (diapause) in response to specific environmental conditions, staying in "suspended animation," and self-renewing once they wake up from their lethargy (Martello and Smith, 2014). In contrast with human, only mouse embryos can enter into diapause (Rosant, 2015), which would explain the differences between the ESC of the two species. However, it has been suggested that diapause could be a phenomenon characteristic of all mammalian cells, including human (Ptak et al., 2013).

Another key point to consider is the comparison between species of the formation of extraembryonic structures. In human, after blastocyst implantation, the placenta begins to form with a high proliferation of trophoctoderm (TE), which produces syncytiotrophoblasts that invade the decidua and myometrium. In contrast, the TE invades the *decidua basalis* until late stages of development and does not reach the myometrium in mouse (Malassine et al., 2003).

Accordingly, diverse studies suggest that the role of FGF in the human early embryo is different from that in mouse. The inhibition of FGF signaling stimulates epiblast formation, while its activation promotes primitive endoderm (PE) specification (Chazaud et al., 2006), which agrees with the requirement for ERK2 inhibition to maintain the undifferentiated state of naïve mESC in mice. Likewise, the lack of FGF apparently does not affect human PE development; therefore, the participation of this pathway in human embryo development is still not clear (Kuijk et al., 2012; Roode et al., 2012).

Blakeley et al. reported that components of the TGF- β pathway (LEFTY1, NODAL, ALK1) were more enriched in human epiblasts than in mouse ICM. Of interest, inactivation of this pathway by the SB inhibitor eliminated NANOG and reduced POU5F1 expression in human embryos. Furthermore, SB-treated mouse embryos showed no reduction of NANOG/POU5F1 levels. These results suggested that TGF- β signaling is essential for the appropriate maintenance of epiblast and PE markers on human embryos, unlike in mouse (Blakeley et al., 2015). In addition, the authors reported differences in gene expression in human epiblast vs. mouse ICM. For example, in the mouse, *Klf4* was expressed from the two-cell stage, but in human, it was not detected until the eight-cell stage; *Esrrb* was present in mouse zygotes and maintained during preimplantation development, but in human, it was expressed in the morula and blastocyst stages (Blakeley et al., 2015).

Of interest, these differentially expressed genes are key factors for maintenance of the naïve mESC (Dunn et al., 2014). Also, genes associated with mouse epiblasts *Klf4*, *Tbx3*, *Prdm14* were expressed in the human epiblast as well as in primed and naïve-like hESC; however, *Esrrb* and *Klf2* (mouse naïve markers) were not significantly expressed in human epiblasts (Blakeley et al.,

2015), and were up-regulated in human naïve-like lines (Takashima et al., 2014; Theunissen et al., 2014). Interestingly, unique genes enriched in the human embryo were identified, such as Kruppel-like factor 17 (*KLF17*), whose function in human pluripotency is still unknown (Blakeley et al., 2015). This factor along with *NODAL* are expressed in nonhuman primate (marmoset) embryos, which suggests that there are specific factors and signaling pathways involved in pluripotency that are conserved in primates and differs from other species (Boroviak et al., 2015).

Another difference between species is the expression of human endogenous retrovirus (HERV). hESC expressed specific, large noncoding RNAs (lncRNA) derived from the long terminal repeat (LTR) of HERV type H (HERVH). Thus, it has been suggested that LTR7-HERVH elements are required to maintain the identity of hESC (Lu et al., 2014) and to enhance the naïve state through interaction with *LPB9*, also called *TFCP2L1* (Wang et al., 2014). These data, together with recent reports, suggested the participation of these genes in early development and human-derived pluripotent stem cells (Fort et al., 2014; Ohnuki et al., 2014). It is important to mention that murine *Tfcp2l1*, and is involved in the pluripotency circuitry of naïve mESC (Qiu et al., 2015). The most recently acquired human endogenous retrovirus is HERVK; which is expressed from human embryo genome activation to blastocyst preimplantation. HERVK was highly enriched in naïve hESC vs. primed lines. Also, the overexpression of *Rec* (one of the transcripts derived from HERVK) in a pluripotent cell line was sufficient to increase the levels of the epiblast marker *IFITM1*, which suggested a role in pluripotency and early human development (Grow et al., 2015).

This way, these remarkable contrasts between human and mouse development point out the specific need to increase our knowledge about human development to reach a better understanding of the cellular and molecular mechanisms that regulate human pluripotency. If there is an in vivo human naïve state similar to the mouse ground epiblast, the culture conditions required to capture such a novel human pluripotent state are different from the requirements for conventional hESC and mouse PSC (Fig. 3).

Reprogramming Methods to Obtain Human Pluripotency Cells, Equal or Not to HESC?

hiPSC are another type of human pluripotent stem cells. To become pluripotent, these cells are generated from somatic cells through different reprogramming methods (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Although conventional hESC and hiPSC share pluripotent properties, the latter cells present genetic and epigenetic aberrations, including differentially methylated regions (DMRs) (Koyanagi-Aoi et al., 2013), change in copy-number variations of DNA (Hussein et al., 2011), irregular expression of imprinted genes (Pick et al., 2009), and differentiation potential (Kim et al., 2011), which are likely a consequence of the reprogramming process and/or retention of a residual "epigenetic memory" of the donor cell type (Kim et al., 2011; Ma et al., 2014). Nonetheless, recent reports show that hiPSC and hESC do not exhibit differences in expression profile and differentiation potential, for example, a subset of genes can segregate hiPSC from hESC in DNA methylation and gene expression like *FAM19A5* and *TCERG1L* (Lister et al., 2011; Ruiz et al., 2012),

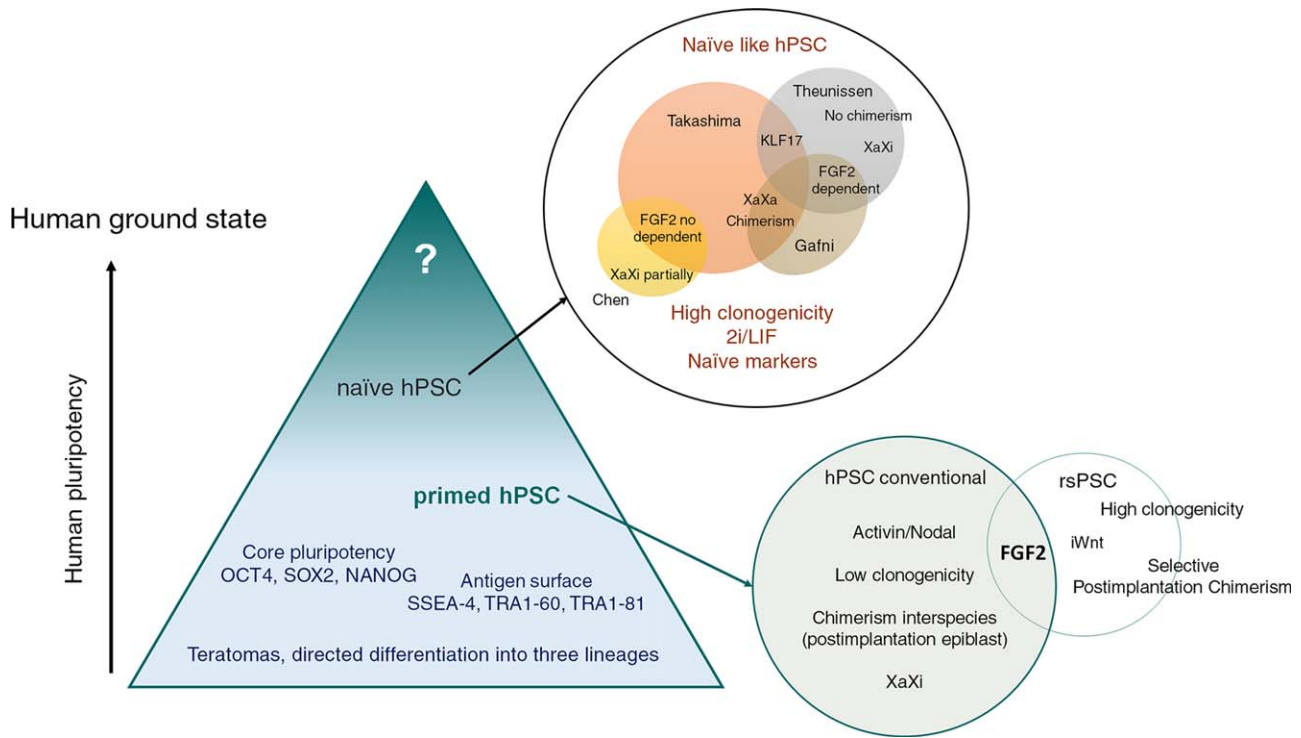


Fig. 3. Human pluripotency. The hPSC share in common core pluripotency POU5F1, SOX2, and NANOG, as well as surface antigen like SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81, and the ability to form teratomas and differentiate into specific lineages. However, hPSC culture in conventional conditions (KOSR and FGF-2) are considered prime pluripotent cells, because of their low clonogenicity, general XaXi status, and a response to FGF-2 and Activin/Nodal to self-renewal instead LIF/STAT3. These cells did not integrate to form chimerism interspecies in early-stages of development, although it has demonstrated that primed hPSC are able to integrate in mouse development in later stages (postimplantation embryo). Culture conditions involved the inhibition of Wnt signaling induced alternative primed hPSC, which have high clonogenicity and a selective integration into postimplantation embryos to form chimeras, denominated "region selective" PSC. In the past years, several groups have established distinct defined conditions to obtain hPSC (hESC and hiPSC) with a naïve phenotype, even with properties that could resemble the ground state from mouse embryo. These naïve-like hPSC share high clonogenicity, a response to LIF/STAT3 and a most uniform expression of naïve markers, in comparison with the conventional hPSC dependent of KOSR and FGF-2. However, some lines do not form chimeras and remain dependent of FGF-2 or have one activated X-chromosome. So actually there is not a consensus about the conditions to obtain the authentic naïve state/naïve ground state in the human.

while, in other studies, these genes are only differentially expressed in some hiPSC lines (Koyanagi-Aoi et al., 2013; Schlaeger et al., 2015). A possibility to explain this discrepancy is that the first studies analyzed hiPSC derived from nonfibroblast somatic cell types and obtained by retroviral reprogramming, while the latter groups compared with most of the hiPSC derived from fibroblasts, and some lines were reprogrammed with nonintegrative methods.

Actually, previous studies have reported differences between hESC and hiPSC lines, which could be attributed to the genetic background rather than the cellular origin or reprogramming method. Thus, Rouhani et al. reported that genetic differences of donor cells have a major impact in the transcriptional variation of hiPSC, while their epigenetic memory has a minimal contribution to hiPSC heterogeneity (Rouhani et al., 2014). Choi et al. generated hiPSC from fibroblast derived from hESC by nonintegrative methods to compare their transcriptional profile, methylation global status, and differentiation potential between matched (same genetic background) hiPSC and hESC lines using a series of elegant experiments. They found that genetic and epigenetic variations were minor between both cell lines genetically matched as compared with unmatched lines, and demonstrated influence of genetic background as possible source of variation between

hiPSC and hESC. Also, they reported that genetically matched lines are similar in their potential differentiation.

The authors concluded that both pluripotent cells types cannot be distinguished from each other, in terms of molecular expression and differentiation potential (Choi et al., 2015). Despite these reports, indicating that hESC and hiPSC share a transcription profile and have the same potential to differentiate, it has been demonstrated that cells derived from hiPSC present functional deficiencies, as well as some hiPSC lines are defective in their differentiation potential. For example, Lanza's group showed that, although hiPSC are able to differentiate into several cell types (blast cells, endothelial cells, hematopoietic cells) with properties similar to those of cells derived from hESC, the derivatives from hiPSC display abnormal molecular and cellular processes, including apoptosis, decreased growth, and senescence (Feng et al., 2010).

Accordingly, Koyanagi-Aoi et al. identified hiPSC lines that maintained undifferentiated cells after a neural differentiation protocol. They named these lines "differentiation-defectives." Intriguingly, most of these defective lines were generated by integrative methods (retroviral), while all the lines (except one) generated by nonintegrative reprogramming were considered as "good" or "intermediate" lines, so it is likely that the abnormal

hiPSC are a consequence of the reprogramming method (Koyanagi-Aoi et al., 2013). Schaleger et al. did not report differences in the potential and transcription profile of hiPSC lines obtained by integrative and nonintegrative methods, although there were significant differences in reprogramming efficiency, reliability, and aneuploidy rate (Schlaeger et al., 2015).

Another key point to consider is the impact of culture conditions on the properties of hiPSC. For example, a study showed that the X-inactivation on hiPSC depends of feeder-layer cells. hiPSC lines derived or maintenance on SLN feeders have an XaXa, but when they were passaged into feeder non-SLN cells, the hiPSC converted into an X-inactivation status. The authors suggested that feeders are an important factor affecting hiPSC state (Tomoda et al., 2012). Therefore, more comparative studies between specific reprogramming methods and culture conditions focusing in the functionality of the cells derived from hiPSC are necessary.

Another alternative route to capture in vitro human pluripotent cells is through somatic cell nuclear transference (SCNT) to an oocyte. Recently, it was reported that SCNT-hESC had been successfully derived from nuclei of human somatic fibroblasts of fetal and adult donors, even from a type I diabetes patient (Tachibana et al., 2013; Chung et al., 2014; Yamada et al., 2014). Assuming that the nucleus of the donor cell undergoes a genetic and epigenetic resetting by oocyte factors, this reprogramming method should be more effective than hiPSC reprogramming, because it recapitulates the earlier stages of embryo development. Actually, when hESC are compared with genetically matched PSC obtained by the reprogramming methods mentioned above, the DNA methylation state and transcriptome profile of SCNT-hESC were similar to that of hESC, while hiPSC showed a major retention DNA methylation pattern of somatic cells.

The authors concluded that SCNT-hESC are significantly more similar to hESC than hiPSC (although only in the characterization methylation patterns) (Ma et al., 2014). However, the same authors established that both hiPSC and SCNT-hESC can offer complementary strategies to derive corrected human pluripotent stem cells from donors with mtDNA diseases (Ma et al., 2015). On the other hand, the studies reported by Johannesson et al. are contradictory from Ma et al. 2014. They did not find differences in expression profile, methylation status, and de novo coding mutations between isogenic hiPSC and SCNT-hESC, remarking that both cell types are very similar (Johannesson et al., 2014). However, these comparative studies were focused in the genetic and epigenetic characterization, without any functional analysis to determine if there are differences in the pluripotent potential of these cells. Therefore, more comparative studies between the hiPSC and hESC with emphasis in the differentiation potential and to compare the functionality of the derived cells from both pluripotent cells are necessary.

Recently, the group of Belmonte described the derivation of PSCs alternative to the naïve and primed lines (Wu et al., 2015). New lines were derived from anterior-posterior and proximal-distal regions from preimplantation and postimplantation mouse embryos, which were derived and maintained with a WNT inhibitor (R1) and FGF (R1/F condition). This indicates that the spatio-temporal embryonic source is not relevant for the derivation of these stem cells, but rather the in vitro culture conditions. Also, the R1/F condition supported the culture of human and nonhuman primate ESC lines, which acquired the same phenotype of the mouse cells. R1/F PSC presented primed characteristics, but in

contrast to conventional EpiSC, they showed high cloning efficiency and higher proliferation. Surprisingly, the R1/F PSC from all species preferentially reintegrate into the posterior region of epiblasts from nonviable embryos. The preference for this region confers a unique property on these cells, for which they were named “region-selective PSC” (Wu et al., 2015).

In conclusion, all these results indicate that the current PSC lines do not represent the full range of pluripotency (Supplementary Table S1, which is available online). Therefore, it is important to characterize and derive new lines of hPSC, which could generate specific cell types through directed differentiation protocols.

Heterogeneity in hESC In Terms of Differentiation Potential

As mentioned before, diverse studies suggested no differences between lines derived from different human developmental stages, because they presented global levels of gene expression and revealed no apparent differences in the teratoma formation assay. However, major scrutiny has indicated intrinsic variations among conventional hESC. For example, Bock et al. compared the transcriptome and DNA methylation profiles among 20 hESC lines with three different methods of genomic analysis. Although their results showed that all lines displayed similar DNA methylation patterns as well as gene-expression levels, there were several genes with variable expression per line, conferring them a unique cell-line-specific profile. These variations could determine the functional potential of hESC (Bock et al., 2011).

Actually, previous reports have demonstrated differences in development potential in both conventional hESC and hiPSC lines. Osafune et al. evaluated the differentiation potential of 17 hESC lines through spontaneous differentiation and specific-lineage protocols. While no significant differences were found in pluripotent markers, the spontaneous differentiation showed that markers from three embryonic layers varied between the lines; this suggested that some lines could have a preference to generate a specific embryonic tissue. These findings were confirmed with protocols of directed differentiation; while some lines had a major expression of genes from pancreatic or cardiac lineages, other lines exhibited a very low detection of the specific markers for these tissues (Osafune et al., 2008).

Furthermore, Bock who identified the variations between different hESC as previously mentioned, also found functional differences during the differentiation process. For example, the H1 and H9 hESC lines were preferentially differentiated into cells of neural lineage, while HUES8 had a predilection toward endodermic differentiation. One possible cause of this heterogeneity would be the culture conditions used to derive and maintain the cell lines. Thus, an important aspect to consider is that, in Bock and Osafune studies, the hESC were maintained in mouse embryonic fibroblasts (MEF). Although MEF release factors such as TGF- β 1 and Activin to maintain hESC in undifferentiated states (Eiselleova et al., 2008), MEF are composed by multiple subpopulations, each identified by differential cell surface proteins and transcriptional profiles (Singhal et al., 2016). Then, this heterogeneity could be having an effect on derivation and maintenance of hESC.

Feeder Layers vs. Feeder-Free Conditions for Cultured hPSC

It is well known that the use of feeder layers is suitable for routine maintenance of hESC and the other hPSC, because they provide growth factors to support self-renewal and pluripotency (Eiselleova et al., 2008). However, although most hESC lines were derived and maintained on inactivated mouse fibroblasts, the use of nonhuman feeder layers had some drawbacks. Besides their heterogeneity, MEF have the potential to transmit xenocomponents to the cell culture and to induce an immune response upon transplantation. Therefore, they present an obstacle for future applications of hESC (Martin et al., 2005). Several research groups have sought alternatives by culturing hESC in a feeder-free environment, such as a basement membrane matrix (Matrigel or Geltrex).

However, recent studies suggest that the long-term culture on feeder-free conditions could induce genetic and epigenetic alterations, which disturb hPSC functionality. For example, abnormal hESC karyotypes have been reported during long-term culture on Matrigel with defined medium (Ludwig et al., 2006). The effects of switching MEF feeder for feeder-free conditions in the culture of four hESC lines have been reported. Adaptation to feeder-free conditions induces DNA methylation changes (hypermethylation, de novo methylation, and demethylation) at least in gene-rich CpG islands (Allegrucci et al., 2007). A study comparing Geltrex vs. MEF feeder demonstrated that feeder-free conditions are associated with recurrent chromosome aberrations and changes in DNA methylation in hESC as well as in hiPSC.

However, the comparison included another variable: mechanical vs. enzymatic passage. Although hPSC cultured on extracellular matrix with enzymatic passage (EcmEnz) presented genetic aberrations (deletions and duplications), the enzymatic passage in feeder condition (MEFEnz) had the largest number of deletions, even in comparison with extracellular matrix with mechanical passage (EcmMech) condition, which suggested that enzymatic passaging could influence the induction of alterations in hiPSC culture. In addition, the assay of teratoma showed a persistence of undifferentiated POU5F1 positive cells in feeder-free conditions. They concluded that feeder-free culture per se was associated with genetic instability and defects at the differentiation potential, although the effects were more severe with an enzymatic passage (Garitaonandia et al., 2015).

All these data suggest that feeder-free conditions could compromise the pluripotent potential of hPSC and functionality of hPSC-derived cells. Ojala et al. evaluated the efficiency of hESC and hiPSC lines to differentiate into a cardiac lineage, under three different culture conditions (MEF or SNL feeders and Matrigel). The hPSC in all three conditions were able to differentiate into cardiomyocytes. However, the highest efficiency was observed in hPSC cultured on both MEF or SNL layers, and the lowest cardiac differentiation was observed in feeder-free conditions (Ojala et al., 2012).

These reports remark the importance of culture conditions, which can affect the integrity and functional properties of hPSC. Indeed, Bhatia's group evaluated the differentiation potential of hESC under feeder-free conditions (TeSR1 media) and with conditioned medium from MEF (CM-MEF). They found that hESC cultures on defined media preferentially differentiated into neural tissue, and a lower proportion had hematopoietic potential as compared to the CM-MEF, which suggests functional differences

in hESC due to culture conditions (Lee et al., 2015). On the other hand, it has been suggested that using clinical-grade human feeder layers in xenocomponent-free conditions would be the safest method to derive and maintain hESC (Unger et al., 2008). However, the interaction between feeders and hPSC to support the pluripotency it is still unknown, as well as the mechanism by which feeders could induce genetic, epigenetic, and functional changes in hPSC, as a result of the adaptation to different culture conditions.

We have previously mentioned the report by Tomoda et al. who analyzed the X chromosome status of hiPSC in specific culture conditions. Usually, female hPSC lines have an inactive X chromosome (denominated XaXi condition), but female hiPSC grown on SLN feeders, immortalized cells derived from mouse fibroblasts STO, acquire X-reactivation (XaXa condition), while MEF or human fibroblasts do not support this phenomenon. SLN expressed LIF; thus, the authors suggested that SNL could maintain the XaXa condition through the role of LIF. To prove this hypothesis, hiPSC were cultured in MEF plus recombinant LIF (rLIF) to verify the X-reactivation. rLIF induced a down-regulation of XIST and up-regulation of some X-linked genes, but not all the evaluated genes were up-regulated; therefore, rLIF did not have the same effect on X-reactivation as the culture with SLN feeders.

The authors concluded that SLN might have more roles other than releasing LIF to maintain the XaXa status in hiPSC (Tomoda et al., 2012). This is one of the first studies to suggest the importance of feeder layers in the regulation of pluripotency, which involves epigenetic changes in hPSC by effect of the feeder cells. It is necessary to elucidate the possible mechanism used by feeder cells to maintain human pluripotency, for example, factor(s) release and physical interactions. Decoding these interactions would allow us to have a better understanding of how the in vitro adaptation of human pluripotency occurs.

The Importance of hPSC-Feeder Layer Interactions

We proposed that hESC required co-culture with a suitable feeder layer to simulate in vivo interactions between pluripotent cells. hPSC retain the epithelial phenotype of the embryonic cells during development, and they express E-Cadherin (ECAD), an important cellular adhesion protein. During development, a series of events result in differentiation of two lineages from blastocysts (ICM and TE). At compaction, blastomers make adherens junctions due to ECAD, whereas outer cells acquire apical-basal polarity and a lower grade of compaction; in contrast, inner cells display a higher compaction and loss of polarity. The outside polar cells will generate an epithelial monolayer that corresponds to the TE enclosing the remnant apolar cells that will originate pluripotent ICM (Stephenson et al., 2012).

Thus, Stephenson et al. reported that embryos lacking zygotic and maternal ECAD have a disorganized polarity that induces an abnormal spatial distribution of TE and ICM, where cells preferentially differentiate into TE (Stephenson et al., 2010). Consistent with the importance of ECAD for pluripotency, several reports have demonstrated that this molecule contributes to the self-renewal and maintenance of hESC (Li et al., 2012). It has been hypothesized that colonies of hPSC grown on fibroblast-like cells lose their pluripotent identity and acquire mesenchymal characteristics because the hPSC interact with fibroblasts at the

periphery where there is no ECAD-mediated cell–cell contact. In contrast, a noncolony monolayer of hPSC will have continuous intercellular adhesions mediated by ECAD and a more stable pluripotent phenotype (Chen et al., 2014).

Unlike other structures that form fetal annexes, it has been suggested that human amniotic epithelial cells (hAEC) derive from the epiblast before gastrulation (stage where cells are spatially segregated from the embryo by amniotic fluid). Thus, it has been hypothesized that amniotic cells are partially isolated from the differentiation pathways and consequently, hAEC would be a remnant from the epiblast (Ilancheran et al., 2009; Miki and Grubbs, 2014). These peculiar features give the hAEC a unique quality as a source of feeder layer. Also, these tissues express pluripotency-associated markers (POU5F1, SOX2, NANOG, REX1, FGF-4) (Miki et al., 2005), and they are positive to ECAD (Garcia-Lopez et al., 2015). Hence, two research groups who reported the derivation of hESC used hAEC as a feeder layer (Avila-Gonzalez et al., 2015; Lai et al., 2015). These results are proof-of-principle that hESC can be derived using a feeder layer that supports ECAD interactions. However, more studies are necessary to evaluate if these cells will maintain the most stable pluripotency and least heterogeneity through cellular adhesion interactions with feeder layers.

Future Perspectives

The importance of hPSC in basic research and their potential use in cell therapy is unquestionable. There have been great advances in this field: the derivation of clinical-grade lines, design of synthetic basement membrane matrices and chemically defined medium, large-scale production of hPSC for possible therapeutic purposes, high-resolution analysis to identify heterogeneity in stem cells and the discovery of novel states of human pluripotency with functional potential. Still unknown, however, are the direct effects of feeder layers or substrates that allow pluripotent cells to adapt to in vitro conditions and establish the rewiring of their pluripotent circuitry; therefore, more comparative studies between the different conditions are necessary to derive hPSC as well as to determine the potential causes of their heterogeneity.

There is no doubt about the usefulness of mice as a model in the areas of development and stem cell research; however, using the mouse embryo as reference in the search for naïve or ground naïve hPSC may not be a good model because of the developmental differences between these species. Thus, a deeper understanding about the signaling pathways and factors to establish proper segregation of different lineages from early human embryo is indispensable to elucidate the spatial and temporal spectra of human pluripotency. This knowledge could be used to design better strategies that allow a fine control of the cell subpopulations that comprise hPSC lines and in this way, will improve the subsequent protocols of directed differentiation.

Acknowledgments

The authors thank Dorothy Pless, Francisco J. Camacho, Martin Garcia, Alejandra Castilla, Adriana Gonzalez, Michael Jeziorski, and Anaid Antaramian for their excellent technical assistance. Daniela Ávila-González is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a fellowship from CONACYT.

References

- Allegrucci C, Wu YZ, Thurston A, Denning CN, Priddle H, Mummery CL, Ward-van Oostwaard D, Andrews PW, Stojkovic M, Smith N, Parkin T, Jones ME, Warren G, Yu L, Brena RM, Plass C, Young LE. 2007. Restriction landmark genome scanning identifies culture-induced DNA methylation instability in the human embryonic stem cell epigenome. *Hum Mol Genet* 16:1253–1268.
- Avila-Gonzalez D, Vega-Hernandez E, Regalado-Hernandez JC, De la Jara-Diaz JF, Garcia-Castro IL, Molina-Hernandez A, Moreno-Verduzco ER, Razo-Aguilera G, Flores-Herrera H, Portillo W, Diaz-Martinez NE, Garcia-Lopez G, Diaz NF. 2015. Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos. *Stem Cell Res* 15:322–324.
- Bhatia S, Pilquill C, Roth-Albin I, Draper JS. 2013. Demarcation of stable subpopulations within the pluripotent hESC compartment. *PLoS One* 8:e57276.
- Blakeley P, Fogarty NM, Del Valle I, Wamaitha SE, Hu TX, Elder K, Snell P, Christie L, Robson P, Niakan KK. 2015. Defining the three cell lineages of the human blastocyst by single-cell RNA-seq. *Development* 142:3151–3165.
- Bock C, Kiskinis E, Verstappen G, Gu H, Boulting G, Smith ZD, Ziller M, Croft GF, Amoroso MW, Oakley DH, Gnirke A, Eggan K, Meissner A. 2011. Reference maps of human ES and iPS cell variation enable high-throughput characterization of pluripotent cell lines. *Cell* 144:439–452.
- Boroviak T, Loos R, Bertone P, Smith A, Nichols J. 2014. The ability of inner-cell-mass cells to self-renew as embryonic stem cells is acquired following epiblast specification. *Nat Cell Biol* 16:516–528.
- Boroviak T, Loos R, Lombard P, Okahara J, Behr R, Sasaki E, Nichols J, Smith A, Bertone P. 2015. Lineage-specific profiling delineates the emergence and progression of naive pluripotency in mammalian embryogenesis. *Dev Cell* 35:366–382.
- Boroviak T, Nichols J. 2014. The birth of embryonic pluripotency. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 369:pii 20130541.
- Brons IG, Smithers LE, Trotter MW, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, Vallier L. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* 448:191–195.
- Chan YS, Goke J, Ng JH, Lu X, Gonzales KA, Tan CP, Tng WQ, Hong ZZ, Lim YS, Ng HH. 2013. Induction of a human pluripotent state with distinct regulatory circuitry that resembles preimplantation epiblast. *Cell Stem Cell* 13:663–675.
- Chazaud C, Yamanaka Y, Pawson T, Rossant J. 2006. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Dev Cell* 10:615–624.
- Chen H, Aksoy I, Gonnot F, Osteil P, Aubry M, Hamela C, Rognard C, Hochard A, Voisin S, Fontaine E, Mure M, Afanassieff M, Cleroux E, Guibert S, Chen J, Vallot C, Acloque H, Genthon C, Donnadieu C, De Vos J, Sanlaville D, Guerin JF, Weber M, Stanton LW, Rougeulle C, Pain B, Bourillot PY, Savatier P. 2015. Reinforcement of STAT3 activity reprogrammes human embryonic stem cells to naive-like pluripotency. *Nat Commun* 6:7095.
- Chen KG, Mallon BS, Johnson KR, Hamilton RS, McKay RD, Robey PG. 2014. Developmental insights from early mammalian embryos and core signaling pathways that influence human pluripotent cell growth and differentiation. *Stem Cell Res* 12:610–621.
- Chia NY, Chan YS, Feng B, Lu X, Orlov YL, Moreau D, Kumar P, Yang L, Jiang J, Lau MS, Huss M, Soh BS, Kraus P, Li P, Lufkin T, Lim B, Clarke ND, Bard F, Ng HH. 2010. A genome-wide RNAi screen reveals determinants of human embryonic stem cell identity. *Nature* 468:316–320.
- Choi J, Lee S, Mallard W, Clement K, Tagliacucchi GM, Lim H, Choi IY, Ferrari F, Tsankov AM, Pop R, Lee G, Rinn JL, Meissner A, Park PJ, Hochedlinger K. 2015. A comparison of genetically matched cell lines reveals the equivalence of human iPSCs and ESCs. *Nat Biotechnol* 33:1173–1181.
- Chung YG, Eum JH, Lee JE, Shim SH, Sepilian V, Hong SW, Lee Y, Treff NR, Choi YH, Kimbrel EA, Dittman RE, Lanza R, Lee DR.

2014. Human somatic cell nuclear transfer using adult cells. *Cell Stem Cell* 14:777–780.
- Daheron L, Opitz SL, Zaehres H, Lensch MW, Andrews PW, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. 2004. LIF/STAT3 signaling fails to maintain self-renewal of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 22:770–778.
- Duggal G, Warriar S, Ghimire S, Broekaert D, Van der Jeught M, Lierman S, Deroo T, Peelman L, Van Soom A, Cornelissen R, Menten B, Mestdagh P, Vandesompele J, Roost M, Sliker RC, Heijmans BT, Deforce D, De Sutter P, De Sousa Lopes SC, Heindryckx B. 2015. Alternative routes to induce naive pluripotency in human embryonic stem cells. *Stem Cells* 33:2686–2698.
- Dunn SJ, Martello G, Yordanov B, Emmott S, Smith AG. 2014. Defining an essential transcription factor program for naive pluripotency. *Science* 344:1156–1160.
- Eiselleova L, Peterkova I, Neradil J, Slaninova I, Hampl A, Dvorak P. 2008. Comparative study of mouse and human feeder cells for human embryonic stem cells. *Int J Dev Biol* 52:353–363.
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, Honig GR, Kim KS, Lanza R. 2010. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 28:704–712.
- Fort A, Hashimoto K, Yamada D, Salimullah M, Keya CA, Saxena A, Bonetti A, Voineagu I, Bertin N, Kratz A, Noro Y, Wong CH, de Hoon M, Andersson R, Sandelin A, Suzuki H, Wei CL, Koseki H, Consortium F, Hasegawa Y, Forrest AR, Carninci P. 2014. Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance. *Nat Genet* 46:558–566.
- Gafni O, Weinberger L, Mansour AA, Manor YS, Chomsky E, Ben-Yosef D, Kalma Y, Viukov S, Maza I, Zviran A, Rais Y, Shipony Z, Mukamel Z, Krupalnik V, Zerbib M, Geula S, Caspi I, Schneir D, Shwartz T, Gilad S, Amann-Zalcenstein D, Benjamin S, Amit I, Tanay A, Massarwa R, Novershtern N, Hanna JH. 2013. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* 504:282–286.
- Galan A, Diaz-Gimeno P, Poo ME, Valbuena D, Sanchez E, Ruiz V, Dopazo J, Montaner D, Conesa A, Simon C. 2013. Defining the genomic signature of totipotency and pluripotency during early human development. *PLoS One* 8:e62135.
- Garcia-Lopez G, Garcia-Castro IL, Avila-Gonzalez D, Molina-Hernandez A, Flores-Herrera H, Merchant-Larios H, Diaz-Martinez F. 2015. [Human amniotic epithelium (HAE) as a possible source of stem cells (SC)]. *Gac Med Mex* 151:66–74.
- Garitaonandia I, Amir H, Boscolo FS, Wambua GK, Schultheisz HL, Sabatini K, Morey R, Waltz S, Wang YC, Tran H, Leonardo TR, Nazor K, Slavin I, Lynch C, Li Y, Coleman R, Gallego Romero I, Altun G, Reynolds D, Dalton S, Parast M, Loring JF, Laurent LC. 2015. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PLoS One* 10:e0118307.
- Giritharan G, Ilic D, Gormley M, Krtolica A. 2011. Human embryonic stem cells derived from embryos at different stages of development share similar transcription profiles. *PLoS One* 6:e26570.
- Grow EJ, Flynn RA, Chavez SL, Bayless NL, Wossidlo M, Wesche DJ, Martin L, Ware CB, Blish CA, Chang HY, Pera RA, Wysocka J. 2015. Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells. *Nature* 522:221–225.
- Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, Smith A. 2009. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* 136:1063–1069.
- Hackett JA, Surani MA. 2014. Regulatory principles of pluripotency: from the ground state up. *Cell Stem Cell* 15:416–430.
- Hanna J, Cheng AW, Saha K, Kim J, Lengner CJ, Soldner F, Cassady JP, Muffat J, Carey BW, Jaenisch R. 2010. Human embryonic stem cells with biological and epigenetic characteristics similar to those of mouse ESCs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9222–9227.
- Huang K, Maruyama T, Fan G. 2014. The naive state of human pluripotent stem cells: a synthesis of stem cell and preimplantation embryo transcriptome analyses. *Cell Stem Cell* 15:410–415.
- Huang Y, Osorno R, Tsakiridis A, Wilson V. 2012. In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation. *Cell Rep* 2:1571–1578.
- Hussein SM, Batada NN, Vuoristo S, Ching RW, Autio R, Narva E, Ng S, Sourour M, Hamalainen R, Olsson C, Lundin K, Mikkola M, Trokovic R, Peitz M, Brustle O, Bazett-Jones DP, Alitalo K, Lahesmaa R, Nagy A, Otonkoski T. 2011. Copy number variation and selection during reprogramming to pluripotency. *Nature* 471:58–62.
- Hyun I. 2015. From naive pluripotency to chimeras: a new ethical challenge? *Development* 142:6–8.
- Ilancheran S, Moodley Y, Manuelpillai U. 2009. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair? *Placenta* 30:2–10.
- Johannesson B, Sagi I, Gore A, Paull D, Yamada M, Golan-Lev T, Li Z, LeDuc C, Shen Y, Stern S, Xu N, Ma H, Kang E, Mitalipov S, Sauer MV, Zhang K, Benvenisty N, Egli D. 2014. Comparable frequencies of coding mutations and loss of imprinting in human pluripotent cells derived by nuclear transfer and defined factors. *Cell Stem Cell* 15:634–642.
- Kim K, Zhao R, Doi A, Ng K, Unternaehrer J, Cahan P, Huo H, Loh YH, Aryee MJ, Lensch MW, Li H, Collins JJ, Feinberg AP, Daley GQ. 2011. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* 29:1117–1119.
- Koyanagi-Aoi M, Ohnuki M, Takahashi K, Okita K, Noma H, Sawamura Y, Teramoto I, Narita M, Sato Y, Ichisaka T, Amano N, Watanabe A, Morizane A, Yamada Y, Sato T, Takahashi J, Yamanaka S. 2013. Differentiation-defective phenotypes revealed by large-scale analyses of human pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:20569–20574.
- Kuijk EW, van Tol LT, Van de Velde H, Wubbolts R, Welling M, Geijsen N, Roelen BA. 2012. The roles of FGF and MAP kinase signaling in the segregation of the epiblast and hypoblast cell lineages in bovine and human embryos. *Development* 139:871–882.
- Kumar RM, Cahan P, Shalek AK, Satija R, DaleyKeyser AJ, Li H, Zhang J, Pardee K, Gennert D, Trombetta JJ, Ferrante TC, Regev A, Daley GQ, Collins JJ. 2014. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature* 516:56–61.
- Lai D, Wang Y, Sun J, Chen Y, Li T, Wu Y, Guo L, Wei C. 2015. Derivation and characterization of human embryonic stem cells on human amnion epithelial cells. *Sci Rep* 5:10014.
- Lee JB, Graham M, Collins TJ, Lee JH, Hong SH, McNicol AJ, Shapovalova Z, Bhatia M. 2015. Reversible lineage-specific priming of human embryonic stem cells can be exploited to optimize the yield of differentiated cells. *Stem Cells* 33:1142–1152.
- Leitch HG, McEwen KR, Turp A, Encheva V, Carroll T, Grabole N, Mansfield W, Nashun B, Knezovich JG, Smith A, Surani MA, Hajkova P. 2013. Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol* 20:311–316.
- Li L, Bennett SA, Wang L. 2012. Role of E-cadherin and other cell adhesion molecules in survival and differentiation of human pluripotent stem cells. *Cell Adh Migr* 6:59–70.
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR. 2011. Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471:68–73.
- Lu X, Sachs F, Ramsay L, Jacques PE, Goke J, Bourque G, Ng HH. 2014. The retrovirus HERVH is a long noncoding RNA required for human embryonic stem cell identity. *Nat Struct Mol Biol* 21:423–425.
- Ludwig TE, Levenstein ME, Jones JM, Berggren WT, Mitchen ER, Frane JL, Crandall LJ, Daigh CA, Conard KR, Piekarczyk MS, Llanas RA, Thomson JA. 2006. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nat Biotechnol* 24:185–187.
- Ma H, Folmes CD, Wu J, Morey R, Mora-Castilla S, Ocampo A, Ma L, Poulton J, Wang X, Ahmed R, Kang E, Lee Y, Hayama T, Li Y, Van Dyken C, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Koski A, Mitalipov N, Amato P, Wolf DP, Huang T, Terzic A, Laurent LC, Izpisua Belmonte JC, Mitalipov S. 2015. Metabolic rescue in

- pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature* 524: 234–238.
- Ma H, Morey R, O'Neil RC, He Y, Daughtry B, Schultz MD, Hariharan M, Nery JR, Castanon R, Sabatini K, Thiagarajan RD, Tachibana M, Kang E, Tippner-Hedges R, Ahmed R, Gutierrez NM, Van Dyken C, Polat A, Sugawara A, Sparman M, Gokhale S, Amato P, Wolf DP, Ecker JR, Laurent LC, Mitalipov S. 2014. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511:177–183.
- Malassine A, Frendo JL, Evain-Brion D. 2003. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. *Hum Reprod Update* 9:531–539.
- Manor YS, Massarwa R, Hanna JH. 2015. Establishing the human naive pluripotent state. *Curr Opin Genet Dev* 34:35–45.
- Marks H, Kalkan T, Menafrá R, Denissov S, Jones K, Hofemeister H, Nichols J, Kranz A, Stewart AF, Smith A, Stunnenberg HG. 2012. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell* 149:590–604.
- Martello G, Smith A. 2014. The nature of embryonic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 30:647–675.
- Martin GR. 1981. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78:7634–7638.
- Martin MJ, Muotri A, Gage F, Varki A. 2005. Human embryonic stem cells express an immunogenic nonhuman sialic acid. *Nat Med* 11:228–232.
- Mascetti VL, Pedersen RA. 2016. Human-mouse chimerism validates human stem cell pluripotency. *Cell Stem Cell* 18:67–72.
- Miki T, Grubbs B. 2014. Therapeutic potential of placenta-derived stem cells for liver diseases: current status and perspectives. *J Obstet Gynaecol Res* 40:360–368.
- Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. 2005. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells* 23:1549–1559.
- Nichols J, Smith A. 2009. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* 4:487–492.
- Nichols J, Smith A. 2012. Pluripotency in the embryo and in culture. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:a008128.
- O'Leary T, Heindryckx B, Lierman S, van Bruggen D, Goeman JJ, Vandewoestyne M, Deforce D, de Sousa Lopes SM, De Sutter P. 2012. Tracking the progression of the human inner cell mass during embryonic stem cell derivation. *Nat Biotechnol* 30:278–282.
- Ohnuki M, Tanabe K, Sutou K, Teramoto I, Sawamura Y, Narita M, Nakamura M, Tokunaga Y, Nakamura M, Watanabe A, Yamanaka S, Takahashi K. 2014. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12426–12431.
- Ojala M, Rajala K, Pekkanen-Mattila M, Miettinen M, Huhtala H, Aalto-Setälä K. 2012. Culture conditions affect cardiac differentiation potential of human pluripotent stem cells. *PLoS One* 7: e48659.
- Osafune K, Caron L, Borowiak M, Martinez RJ, Fitz-Gerald CS, Sato Y, Cowan CA, Chien KR, Melton DA. 2008. Marked differences in differentiation propensity among human embryonic stem cell lines. *Nat Biotechnol* 26:313–315.
- Pick M, Stelzer Y, Bar-Nur O, Mayshar Y, Eden A, Benvenisty N. 2009. Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* 27:2686–2690.
- Ptak GE, Modlinski JA, Loi P. 2013. Embryonic diapause in humans: time to consider? *Reprod Biol Endocrinol* 11:92.
- Qiu D, Ye S, Ruiz B, Zhou X, Liu D, Zhang Q, Ying QL. 2015. Klf2 and Tfc2l1, two Wnt/beta-Catenin targets, act synergistically to induce and maintain naive pluripotency. *Stem Cell Reports* 5: 314–322.
- Reijo Pera RA, DeJonge C, Bossert N, Yao M, Hwa Yang JY, Asadi NB, Wong W, Wong C, Firpo MT. 2009. Gene expression profiles of human inner cell mass cells and embryonic stem cells. *Differentiation* 78:18–23.
- Roode M, Blair K, Snell P, Elder K, Marchant S, Smith A, Nichols J. 2012. Human hypoblast formation is not dependent on FGF signalling. *Dev Biol* 361:358–363.
- Rossant J. 2015. Mouse and human blastocyst-derived stem cells: vive les differences. *Development* 142:9–12.
- Rouhani F, Kumasaka N, de Brito MC, Bradley A, Vallier L, Gaffney D. 2014. Genetic background drives transcriptional variation in human induced pluripotent stem cells. *PLoS Genet* 10: e1004432.
- Ruiz S, Diep D, Gore A, Panopoulos AD, Montserrat N, Plongthongkum N, Kumar S, Fung HL, Giorgetti A, Bilic J, Batchelder EM, Zaehres H, Kan NG, Scholer HR, Mercola M, Zhang K, Izpisua Belmonte JC. 2012. Identification of a specific reprogramming-associated epigenetic signature in human induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 16196–16201.
- Schlaeger TM, Daheron L, Brickler TR, Entwisle S, Chan K, Cianci A, DeVine A, Ettenger A, Fitzgerald K, Godfrey M, Gupta D, McPherson J, Malwadkar P, Gupta M, Bell B, Doi A, Jung N, Li X, Lynes MS, Brookes E, Cherry AB, Demirbas D, Tsankov AM, Zon LI, Rubin LL, Feinberg AP, Meissner A, Cowan CA, Daley GQ. 2015. A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nat Biotechnol* 33:58–63.
- Silva J, Smith A. 2008. Capturing pluripotency. *Cell* 132:532–536.
- Singhal PK, Sassi S, Lan L, Au P, Halvorsen SC, Fukumura D, Jain RK, Seed B. 2016. Mouse embryonic fibroblasts exhibit extensive developmental and phenotypic diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:122–127.
- Stephenson RO, Rossant J, Tam PP. 2012. Intercellular interactions, position, and polarity in establishing blastocyst cell lineages and embryonic axes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:pii: a008235.
- Stephenson RO, Yamanaka Y, Rossant J. 2010. Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development* 137:3383–3391.
- Stewart MH, Bosse M, Chadwick K, Menendez P, Bendall SC, Bhatia M. 2006. Clonal isolation of hESCs reveals heterogeneity within the pluripotent stem cell compartment. *Nat Methods* 3: 807–815.
- Tachibana M, Amato P, Sparman M, Gutierrez NM, Tippner-Hedges R, Ma H, Kang E, Fulati A, Lee HS, Sritanaudomchai H, Masterson K, Larson J, Eaton D, Sadler-Fredd K, Battaglia D, Lee D, Wu D, Jensen J, Patton P, Gokhale S, Stouffer RL, Wolf D, Mitalipov S. 2013. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153:1228–1238.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131:861–872.
- Takashima Y, Guo G, Loos R, Nichols J, Ficiz G, Krueger F, Oxley D, Santos F, Clarke J, Mansfield W, Reik W, Bertone P, Smith A. 2014. Resetting transcription factor control circuitry toward ground-state pluripotency in human. *Cell* 158:1254–1269.
- Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, Davies TJ, Evans EP, Mack DL, Gardner RL, McKay RD. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* 448:196–199.
- Theunissen TW, Powell BE, Wang H, Mitalipova M, Faddah DA, Reddy J, Fan ZP, Maetzel D, Ganz K, Shi L, Lungjangwa T, Imsoonthornruksa S, Stelzer Y, Rangarajan S, D'Alessio A, Zhang J, Gao Q, Dawlaty MM, Young RA, Gray NS, Jaenisch R. 2014. Systematic identification of culture conditions for induction and maintenance of naive human pluripotency. *Cell Stem Cell* 15:471–487.
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282:1145–1147.
- Tomoda K, Takahashi K, Leung K, Okada A, Narita M, Yamada NA, Eilertson KE, Tsang P, Baba S, White MP, Sami S, Srivastava D, Conklin BR, Panning B, Yamanaka S. 2012. Derivation conditions impact X-inactivation status in female human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 11:91–99.
- Unger C, Skottman H, Blomberg P, Dilber MS, Hovatta O. 2008. Good manufacturing practice and clinical-grade human embryonic stem cell lines. *Hum Mol Genet* 17:R48–R53.
- Valamehr B, Robinson M, Abujarour R, Rezner B, Vranceanu F, Le T, Medcalf A, Lee TT, Fitch M, Robbins D, Flynn P. 2014. Platform for induction and maintenance of transgene-free hiPSCs

- resembling ground state pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* 2:366–381.
- Vallier L, Alexander M, Pedersen RA. 2005. Activin/Nodal and FGF pathways cooperate to maintain pluripotency of human embryonic stem cells. *J Cell Sci* 118:4495–4509.
- Wang J, Xie G, Singh M, Ghanbarian AT, Rasko T, Szvetnik A, Cai H, Besser D, Prigione A, Fuchs NV, Schumann GG, Chen W, Lorincz MC, Ivics Z, Hurst LD, Izsvak Z. 2014. Primate-specific endogenous retrovirus-driven transcription defines naive-like stem cells. *Nature* 516:405–409.
- Ware CB, Nelson AM, Mechem B, Hesson J, Zhou W, Jonlin EC, Jimenez-Caliani AJ, Deng X, Cavanaugh C, Cook S, Tesar PJ, Okada J, Margaretha L, Sperber H, Choi M, Blau CA, Treuting PM, Hawkins RD, Cirulli V, Ruohola-Baker H. 2014. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:4484–4489.
- Wray J, Kalkan T, Smith AG. 2010. The ground state of pluripotency. *Biochem Soc Trans* 38:1027–1032.
- Wu J, Okamura D, Li M, Suzuki K, Luo C, Ma L, He Y, Li Z, Benner C, Tamura I, Krause MN, Nery JR, Du T, Zhang Z, Hishida T, Takahashi Y, Aizawa E, Kim NY, Lajara J, Guillen P, Campistol JM, Esteban CR, Ross PJ, Saghatelian A, Ren B, Ecker JR, Izpisua Belmonte JC. 2015. An alternative pluripotent state confers interspecies chimaeric competency. *Nature* 521:316–321.
- Yamada M, Johannesson B, Sagi I, Burnett LC, Kort DH, Prosser RW, Paull D, Nestor MW, Freeby M, Greenberg E, Goland RS, Leibel RL, Solomon SL, Benvenisty N, Sauer MV, Egli D. 2014. Human oocytes reprogram adult somatic nuclei of a type 1 diabetic to diploid pluripotent stem cells. *Nature* 510:533–536.
- Yan L, Yang M, Guo H, Yang L, Wu J, Li R, Liu P, Lian Y, Zheng X, Yan J, Huang J, Li M, Wu X, Wen L, Lao K, Li R, Qiao J, Tang F. 2013. Single-cell RNA-Seq profiling of human preimplantation embryos and embryonic stem cells. *Nat Struct Mol Biol* 20:1131–1139.
- Ying QL, Wray J, Nichols J, Batlle-Morera L, Doble B, Woodgett J, Cohen P, Smith A. 2008. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453:519–523.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318:1917–1920.