



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Activación de los genes *Oct4* y *Sox2* en presencia de los
oncogenes E6 y E7 como mecanismo para desestabilizar
el fenotipo celular de fibroblastos**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Sinaid Martínez Pérez

TUTOR

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

Ciudad Universitaria, CD. CDMX. 2019.





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.

1. Datos del alumno:

Sinaid Martínez Pérez

55 17 11 19 51

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311202337

2. Datos del tutor:

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles

3. Datos del Sinodal 1:

Dr. Victor Julián Valdés Rodríguez

4. Datos del Sinodal 2:

Dra. Viviana del Carmen Valadez Graham

5. Datos del Sinodal 3:

Dra. Celina García Melendrez

6. Datos del Sinodal 4:

Dr. Jean-Louis Joseph Marie Charlie Casalonga

7. Datos del trabajo escrito:

Activación de los genes *Oct4* y *Sox2* en presencia de los oncogenes E6 y E7 como mecanismo para desestabilizar el fenotipo celular de fibroblastos

101 pág.

2019

Lugar de Trabajo

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Genética del Desarrollo y Fisiología Molecular, Laboratorio de Degeneración y Regeneración Tisular, a cargo del Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles.

Financiamiento y Apoyos

Durante la realización de esta tesis se contó con la beca de *Alimentación y hospedaje* otorgada por el Instituto de Biotecnología, UNAM. También se contó con la beca de ayudante de investigador a nivel de licenciatura otorgado por Conacyt por parte del proyecto “*Hacia el relajamiento de las restricciones de linaje de células postmitóticas del sistema nervioso central*” con número de proyecto 1723/2016 y 1000/781/2016.

Agradecimientos

En las siguientes líneas expreso mi sincero agradecimiento a las personas que influyeron en mi para la realización de esta tesis.

Agradezco especialmente a mi madre Amalia y a mi padre Apolinar por enseñarme con el ejemplo los valores de honestidad, empatía, equidad, responsabilidad, respeto y sobre todo amor. Estos valores, su motivación, confianza y apoyo incondicional me han ayudado a crecer personal y profesionalmente. También agradezco especialmente a mi hermana Karla y a mi hermano Fernando, los admiro y estoy orgullosa de ellos.

A mis mejores amigos Erika, Abraham y Eduardo por darme sus consejos en los mejores y peores momentos de la carrera.

Al Dr. Luis Covarrubias por su enseñanza y guía en la realización de este proyecto.

A mis sinodales por las correcciones a esta tesis, el Dr. Víctor Julián, la Dra. Viviana, la Dra. Celina y el Dr. Jean-Louis Charlie.

A la M.C. Concepción por enseñarme todas las técnicas que aprendí en el laboratorio y por las correcciones a esta tesis.

Agradezco a la UNAM, en especial a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología porque en sus instalaciones se han escrito unos de los mejores momentos de mi vida personal y académica.

Por último, agradezco a los ciudadanos que con sus contribuciones y por medio de las becas de *Alimentación y hospedaje* otorgada por el Instituto de Biotecnología y la beca de *Ayudante de investigador a nivel licenciatura* otorgada por el Conacyt pude realizar esta tesis.

A mis padres y hermanos

Amalía, Apolinar, Karla y Fernando

Índice

	Pág.
Índice de figuras	1
Índice de tablas	2
Abreviaturas	3
Resumen	4
I. Introducción	5
1.1 Potencial de diferenciación celular	5
1.2 Pluripotencia celular.....	6
1.3 Control transcripcional de la pluripotencia	8
1.4 Reprogramación celular <i>in vitro</i>	13
1.4.1 Reprogramación celular mediada por factores transcripcionales o moléculas químicas	13
1.4.2 Reprogramación celular mediada por la activación de genes promotores de la pluripotencia	15
1.5 El control de la proliferación en la desdiferenciación y reprogramación celular... ..	18
II. Antecedentes	23
2.1 Reprogramación con el sistema booster por doxiciplina con los genes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i>	23
2.2 Reprogramación con el sistema booster por doxiciplina con los genes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> , en coordinación con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH)	26
III. Justificación	28
IV. Hipótesis	29
V. Objetivos	29
VI. Materiales y métodos	30
6.1 Soluciones	30
6.2 Construcción de vectores	33
6.2.1 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción	33
6.2.2 Preparación del fragmento de DNA a clonar.....	33
6.2.3 Desfosforilación con rSAP (<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>)	34
6.2.4 Ligación de DNA.....	35
6.2.5 Transformación.....	35
6.2.6 Identificación de colonias bacterianas con el plásmido de interés	36
6.2.7 Amplificación de plásmidos	37
6.2.8 Secuenciación	39
6.3 Cultivo celular	40
6.3.1 Obtención de MEFs	40
6.3.2 Subcultivo celular	41
6.3.3 Conteo de células con cámara de Neubauer	41

6.3.4 Criopreservación de células.....	41
6.3.5 Descongelación de células.....	42
6.3.6 Gelatinización de cajas o placas.....	42
6.3.7 Generación de células alimentadoras.....	42
6.3.8 Transfección de MEFs.....	42
6.3.9 Tinción para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina.....	44
6.4 Inmunocitoquímica.....	45
6.5 Análisis de la activación de genes.....	46
VII. Resultados.....	49
7.1 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los genes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> , y <i>Sox2</i> en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7.....	49
7.2 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los oncogenes E6 y E7.....	56
7.3 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los genes <i>Oct4</i> u <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7.....	57
7.4 Características del sistema CRISPR-dCas9: dCas9-VPR y gRNAs para <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i>	68
7.5 Activación de los genes <i>Oct4</i> u <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> mediante el sistema CRISPR-dCas9.....	77
VIII. Discusión.....	80
8. 1 Los oncogenes E6 y E7 aceleran la aparición del fenotipo tipo iPSC de MEFs transfectados con <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> , y <i>Sox2</i> e incrementan la eficiencia de reprogramación.....	80
8.2 Los oncogenes E6 y E7 coordinados con la expresión de <i>Oct4</i> u <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> provocan la formación de cúmulos fibroblastoides.....	84
8.3 Desdiferenciación de MEFs con <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> , y <i>Sox2</i> , y los oncogenes E6 y E7 en condiciones NO reprogramantes.....	87
IX. Conclusiones.....	89
X. Perspectivas.....	90
XI. Referencias.....	91
XII. Anexo.....	98
12.1 Mapas de vectores.....	98
12.1.1 pPB-mOct4.....	98
12.1.2 pPB-mOct4/SOX2.....	98
12.1.3 pPB-pOct4(5)EhD-pOct4(6)P-CBh-Luc2mCherry.....	99
12.1.4 pPB-pOct4(5)EhD-pOct4(2)3.1-CBh-Luc2mCherry.....	99
12.1.5 pPB-pSox2(1)-pOct4(6)P-CBh-Luc2mCherry.....	100
12.1.6 pPBnv-dCas9-VPR.....	100

Índice de figuras

	Pág.
Figura 1. Potencial de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario de ratón.....	6
Figura 2. Control transcripcional de pluripotencia.....	12
Figura 3. Sistemas de activación de genes	17
Figura 4. Moléculas de interacción con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH)	21
Figura 5. Antecedentes de la expresión forzada de <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> en MEFs	25
Figura 6. Antecedentes de la expresión forzada de <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> y los oncogenes E6 y E7 en MEFs	27
Figura 7. Expresión forzada de <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> en MEFs.....	53
Figura 8. Expresión forzada de <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> , y los oncogenes E6 y E7 en MEFs.....	54
Figura 9. Detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en colonias de MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox</i> , y de MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> , y los oncogenes E6 y E7.....	55
Figura 10. Conteo de colonias positivas para la detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina de MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox</i> , y de MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> y los oncogenes E6 y E7.....	55
Figura 11. MEFs transfectados con los oncogenes E6 y E7	59
Figura 12. MEFs transfectados con el transgen <i>Oct4</i>	60
Figura 13. MEFs transfectados con el transgen <i>Oct4</i> y los oncogenes E6 y E7	61
Figura 14. Inmunocitoquímica para la detección del marcador de pluripotencia SSEA-1	62
Figura 15. Colonia resultante de la expresión de <i>Oct4</i> y los oncogenes E6 y E7 en MEFs.....	62
Figura 16. MEFs transfectados con los transgenes <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i>	63
Figura 17. MEFs transfectados con los transgenes <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> y los oncogenes E y E7	64
Figura 18. MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> , y los oncogenes E6 y E7 en condiciones NO reprogramantes	66
Figura 19. Detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en MEFs transfectados con los transgenes <i>c-Myc</i> , <i>Klf4</i> , <i>Oct4</i> y <i>Sox2</i> , y los oncogenes E6/E7 en condiciones NO reprogramantes	67
Figura 20. Método para la construcción de los vectores con gRNAs	75
Figura 21. Detección del gen <i>Oct4</i> endógeno por PCR punto final.....	79
Figura 22. Detección del gen <i>Sox2</i> endógeno por PCR punto final.....	79

Anexo. Figura A. Conteo detallado de las colonias de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox*, y de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y los oncogenes E6 y E7 101

Índice de tablas

	Pág.
Tabla 1. Concentración de plásmidos para transfección de MEFs con el sistema booster	49
Tabla 2. Reporte de los 20mer para <i>Oct4</i> por CRISPRdirect	69
Tabla 3. Reporte de los 20mer para <i>Sox2</i> por CRISPRdirect	71
Tabla 4. Parámetros de PCR para amplificar la secuencia U6 y la secuencia andamio	72
Tabla 5. Secuencia base para la construcción de gRNAs	72
Tabla 6. Parámetros de PCR para amplificar gRNAs	73
Tabla 7. Concentración de transposones y transposasa para la reprogramación celular con el sistema CRISPR-dCas9	77

Abreviaturas

iPSC	Célula troncal pluripotente inducida (del inglés <i>induced Pluripotent Stem Cell</i>)
mESC	Célula troncal embrionaria murina (del inglés <i>Murine Embryonic Stem Cell</i>)
MEFs	Fibroblastos embrionarios murinos (del inglés <i>Murine Embryonic Fibroblast</i>)
OCT4	Proteína de unión al octámero 4 (del inglés <i>Octamer-binding protein 4</i>)
SOX2	Proteína SRY-box 2 (del inglés <i>Sex determining Region Y-box 2</i>)
E6/E7	Oncoproteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano
pRB	Proteína de retinoblastoma (del inglés <i>Retinoblastoma protein</i>)
MKOS	Factores reprogramantes (MYC, KLF4, OCT4 y SOX2)
MEFs-MKOS	MEFs transfectados con el pPB-MKOS
MEFs-MKOS-E6/E7	MEFs transfectados con el pPB-MKOS y el pPB-E6/E7
MEFs-OCT4	MEFs transfectados con el pPB-OCT4
MEFs-SOX2	MEFs transfectados con el pPB-SOX2
MEFs-OCT4-E6/E7	MEFs transfectados con el pPB-OCT4 y el pPB-E6/E7
MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7	MEFs transfectados con el pPB-OCT4/SOX2 y el pPB-E6/E7
dox	Doxiciclina (del inglés <i>doxycycline</i>)
VENUS	Versión mejorada de la proteína amarillo fluorescente (del inglés <i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
ng/mL	Nanogramos por mililitro
ug/mL	Microgramos por mililitro
L	Litro
h	Hora
min	Minuto
seg	Segundo
uL	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico (del inglés <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
LIF	Factor inhibidor de leucemia (del inglés <i>Leukemia Inhibitor Factor</i>)
cDNA	DNA complementario (del inglés <i>complementary DNA</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i>)
sRNA	RNA de guía única (del inglés <i>guide RNA</i>)
p/v	Peso/volumen

Resumen

El proceso de reprogramación celular comienza con la desestabilización del programa transcripcional que mantiene el estado de diferenciación de la célula, teniendo como consecuencia cambios en la función y en el fenotipo. Las células somáticas pueden ser reprogramadas a células pluripotentes inducidas (iPSC) solo mediante manipulaciones. Para lograrlo se ha inducido la expresión de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* que codifican respectivamente para los factores inductores de pluripotencia: MYC, KLF4, OCT4 y SOX2 (MKOS). La expresión de *Oct4* y *Sox2* y una constante proliferación de las células somáticas se ha definido esencial en este proceso.

En este trabajo nos enfocamos en determinar si la expresión de los genes *Oct4* y *Sox2*, y de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH) en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) son suficientes para generar un fenotipo típico de iPSC. La expresión forzada de los oncogenes E6 y E7, que codifican respectivamente para las proteínas de su mismo nombre E6 y E7, en células somáticas se ha reportado que tienen efectos inmortalizantes, la primera promueve la degradación de p53 y la segunda la disociación de la proteína de retinoblastoma (pRB) del complejo pRB-E2F; p53 y pRB son proteínas que actúan como inhibidores de proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular, una de ellas el factor transcripcional E2F. Aquí mostramos que la sobreexpresión de los oncogenes E6 y E7 no produce cambios fenotípicos en MEFs, mientras que en presencia de OCT4 u OCT4 y SOX2 los fibroblastos forman cúmulos proliferativos de células fibroblastoides. En este estudio también se estableció el protocolo de inducción de activación del gen *Oct4* endógeno en MEFs, con el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9-VPR y dos gRNAs, uno con blanco en el *enhancer* distal y otro con blanco en el promotor proximal de *Oct4*, logrando una expresión del transcrito similar al de células troncales embrionarias. Esta herramienta puede ser útil para evaluar si los niveles de expresión de *Oct4* son determinantes en la formación de un fenotipo iPSC.

Los resultados de esta tesis, por un lado remarcan la importancia de KLF4 y MYC en la reprogramación cuyo modo de acción no puede ser compensado por factores inmortalizantes, y por otro lado, abren la posibilidad de estudiar los efectos a nivel transcripcional de OCT4 y SOX2 y de las oncoproteínas E6 y E7 durante la reprogramación de células somáticas a iPSC.

I. Introducción

1.1 Potencial de diferenciación celular

El desarrollo de un vertebrado inicia con la formación del cigoto y concluye en el estado adulto con una variedad de tipos celulares especializados, organizados en tejidos, órganos y sistemas. Durante este proceso las células se dividen, migran y diferencian (adquieren una identidad definida). Los cambios bioquímicos, fenotípicos y funcionales que experimentan para diferenciarse preceden de un proceso de compromiso. Este compromiso requiere de dos estados. El primer estado es el de especificación, en el cual, la célula conserva su destino en condiciones neutrales, pero puede ser cambiado si se modifican las condiciones del entorno. El segundo estado es el de determinación, es un estado irreversible en el que las células adquieren compromiso hacia su destino, independientemente de las condiciones del entorno en que se coloquen (Gilbert 2013).

Hay dos tipos de información por los cuales la célula guía su comportamiento: la intrínseca, dependiente del linaje y la extrínseca, dependiente de la posición. Dicho de otra forma, las células van restringiendo su potencial de diferenciación (capacidad de una célula para dar origen a otras), con la información heredada de la célula madre de la que divide y con la del entorno (Gilbert, 2013). Por ejemplo, durante el desarrollo embrionario de mamíferos, las células transitan desde un potencial de diferenciación totipotente a uno pluripotente. El primer tipo incluye al cigoto y los blastómeros, pues tienen la capacidad de dar origen a todos los tipos celulares del desarrollo del organismo, incluyendo el tejido extraembrionario. El segundo tipo incluye a las células de la masa celular interna (ICM) del blastocisto pre-implantación y las células del epiblasto primitivo del embrión post-implantación, ya que tienen la capacidad de generar células de las tres líneas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo), pero no tejido extraembrionario (**Figura 1**). De la masa celular interna y del epiblasto derivan las líneas celulares conocidas como células troncales embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cell*) y células troncales epiblasticas (EpiSC, del inglés *Epiblast Stem Cell*), respectivamente (Smith *et al.* 2016; Weinberger *et al.* 2017; Atlasi *et al.* 2017).

En el estado embrionario tardío y adulto existen células con dos tipos de potencial de diferenciación: multipotencial y unipotencial. Las células troncales multipotentes son las que mantienen la capacidad de dar origen a otras células del mismo linaje; por ejemplo, las

troncales neurales y hematopoyéticas. Mientras que las unipotentes, solo dan origen a un tipo celular; por ejemplo, las espermatogonias. Finalmente se tiene a las células diferenciadas que han perdido potencial de diferenciación; por ejemplo, las neuronas (Smith *et al.* 2016; Weinberger *et al.* 2017; Atlasi *et al.* 2017).

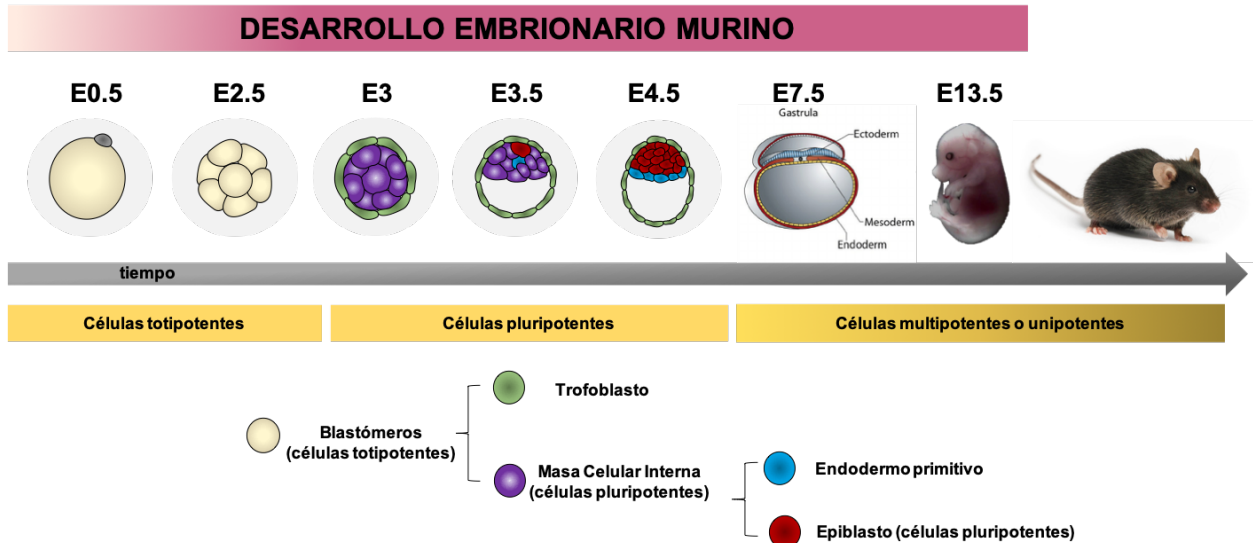


Figura 1. Potencial de diferenciación celular durante el desarrollo embrionario de ratón. Durante el desarrollo embrionario desde el cigoto hasta el estado adulto las células transitan por distintos estados de diferenciación. Durante la etapa embrionaria están presentes células totipotentes (blastómeros) y pluripotentes (células de la masa celular interna y del epiblasto) con capacidad de dar origen a células de las tres líneas germinales (mesodermo, endodermo y ectodermo), con la excepción que las células pluripotentes son incapaces de dar origen a células del tejido extraembrionario (células del trofoblasto). Existen células multipotentes y unipotentes desde el desarrollo embrionario tardío y adulto que son capaces de dar origen a células de un solo linaje o un tipo celular, respectivamente. Figura modificada de Niakan *et al.*, (2013).

1.2 Pluripotencia celular

Usando condiciones de cultivo específicas se ha logrado capturar *in vitro* células con diferentes grados de pluripotencia, debido al periodo del desarrollo y a la carga genética de la especie de donde se derivaron. Se considera que tienen diferentes grados de pluripotencia por los ensayos funcionales a los que son sometidas. Estos ensayos incluyen: la diferenciación a células de las tres líneas germinales *in vitro*, la habilidad para propagarse indefinidamente, la formación de teratomas *in vivo*, la formación de quimeras, la transmisión

a la línea germinal mediante inyección en blastocistos y la complementación tetraploide (Robinton & Daley 2012). Funcionalmente las células pluripotentes bajo condiciones definidas *in vitro* forman cuerpos embrioides, que son agregados tridimensionales que proporcionan un nicho apropiado para la diferenciación a distintos tipos celulares (Lin & Chen, 2014). Por ejemplo, las ESC de ratón (mESC, del inglés *Murine Embryonic Stem Cell*) cumplen con las características anteriores y bajo condiciones adecuadas pueden mantenerse en su estado naíf o virgen (*'naive'* en inglés) o de mayor pluripotencia; mientras que las EpiESC de ratón (mEpiESC), las cuales son ineficientes en la formación de quimeras, complementación tetraploide y formación de cuerpos embrioides, en condiciones adecuadas se mantienen en un estado presto (*'primed'* en inglés) o de reducida pluripotencia (Rugg-Gunn, 2017).

Molecular y fenotípicamente el estado naíf y presto también muestran diferencias. Las diferencias moleculares están determinadas por las vías de señalización que utilizan para que los genes de pluripotencia sean expresados y en el estado de la arquitectura de la cromatina. Algunas vías se comportan de manera pleiotrópica dependiendo de los factores en el medio de cultivo y el estado de diferenciación celular. Es así como las mESC en cultivo dependen del factor inhibidor de leucemia (LIF, del inglés *Leukemia Inhibitor Factor*), el cual activa la vía de señalización JAK-STAT, mientras que en las mEpiESC y ESC humanas (hESC), el LIF tiene un efecto represivo; estos últimos tipos celulares dependen estrictamente del factor de crecimiento de fibroblastos dos (FGF2) que activa la vía MEK/ERK y el factor de crecimiento transformante beta uno (TGFβ1) o la Activina A que activan la vía de las proteínas SMAD (Brons *et al.* 2007; Pauklin & Vallier, 2015; Tesar *et al.*, 2007).

Las células troncales pluripotentes mencionadas se organizan en cultivo en colonias compactas, de células redondeadas con escaso citoplasma. Las colonias de mESC tienen domo refringente, observable en microscopio con contraste de fases. Mientras que las colonias de mEpiESC y hESC, que son muy parecidas, tienen un fenotipo aplanado (Robinton & Daley, 2012).

La derivación de células troncales pluripotentes *in vitro* permitió conocer acerca del ambiente de señalización que promueve la pluripotencia. Por otro lado, estas células sirvieron de herramienta para identificar los factores que promueven la diferenciación *in vitro* a tipos celulares específicos, sobre todo considerando el amplio desconocimiento que había sobre

los cambios moleculares que llevan a una célula indiferenciada a convertirse en una célula especializada. Este proceso fue considerado por muchos años como unidireccional e irreversible, por lo que resultó inesperado la reprogramación de núcleos de células diferenciadas después de su transferencia a ovocitos desnucleados que se desarrollaron hasta generar animales clonados (Briggs & King, 1952; Gurdon, 1986).

Con base a las características moleculares de las mESC y las hESC se identificaron moléculas clave que pudieron ser promotores del estado pluripotente. Sorprendentemente la introducción de pocos de estos factores (i.e., OCT4, SOX2, KLF4 y MYC) fueron suficientes para forzar la desdiferenciación o reprogramación de células somáticas a células pluripotentes (Takahashi & Yamanaka, 2006). Las células resultantes del procedimiento anterior y que han logrado ganar las características de células pluripotentes, tanto fenotípicas como funcionales, se les conoce como células pluripotentes inducidas (iPSC, del inglés *induced Pluripotent Stem Cell*). La generación de iPSC ha permitido capturar los estados moleculares, fenotípicos y algunos funcionales por los que atraviesa una célula diferenciada para alcanzar un estado pluripotente.

1.3 Control transcripcional de la pluripotencia

Existen múltiples factores de transcripción identificados en células derivadas del desarrollo temprano que participan en el mantenimiento de la pluripotencia. Entre ellos los factores OCT4, SOX2 y NANOG, que putativamente, son los más importantes en la red regulatoria de control de pluripotencia. Su importancia recae en su entrecruzada relación en el control transcripcional de otros genes que se activan en células pluripotentes o genes que se reprimen durante la diferenciación (Li & Belmonte, 2018).

Factor de transcripción OCT4. El factor transcripcional 4 de unión a octameros (OCT4, del inglés *Octamer-binding protein*) es definido como un factor esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Este se expresa principalmente en la ICM, ovocitos y células germinales primordiales (Okamoto *et al.*, 1990; Schöler *et al.*, 1990). En el ratón, OCT4 está presente en el ovocito maduro. Después de la fertilización sus niveles de expresión disminuyen y aumentan a su estado más alto en los blastómeros. Posteriormente, su expresión se restringe a la ICM del blastocisto. Una vez que se implanta el blastocisto, la expresión de OCT4 se

encuentra en las células del epiblasto. Finalmente, en el estado postnatal y adulto, la expresión de este factor es casi exclusiva de la línea germinal (Schöler *et al.*, 2000; Pesce *et al.*, 1998).

La eliminación de *Oct4* en el embrión es letal. Su sobreexpresión dirige a las mESC a diferenciarse en células del endodermo primitivo y mesodermo, mientras que su baja expresión, provoca pérdida de la pluripotencia y diferenciación a células del trofoectodermo. Por lo tanto, una cantidad específica de OCT4 parece requerirse para el mantenimiento de la pluripotencia (Niwa *et al.*, 1996; Pesce & Schöler, 2001).

Tres elementos regulatorios controlan la expresión del gen *Oct4*: el *enhancer* distal (ED), el *enhancer* proximal (PE) y el promotor proximal (PP). El primero dirige la expresión del gen *Oct4* en el estado pre-implantacional del blastocisto y en células germinales primordiales, y el segundo dirige la expresión en células del epiblasto en el blastocisto post-implantacional (Yeom *et al.*, 1996). Estos elementos regulatorios de *Oct4* sirven como punto de anclaje de proteínas regulatorias. Existen cuatro secuencias conservadas dentro de estos elementos (de CR1 a CR4), en las que se dan las uniones al DNA por otras proteínas, incluyendo el mismo OCT4. El elemento CR1 se localiza en el PP, el CR2 en PE, y el CR3 y CR4 en el ED (**Figura 2A**). Estos están conservados en el humano, la rata, el bovino y el ratón con un nivel de homología que va de 69% a 96% (Nodhoff *et al.*, 2001).

El factor más relevante que media la expresión de *Oct4* es el mismo factor OCT4, que es capaz de unirse al ED solo o en coordinación con SOX2 y NANOG, otros dos factores reguladores de la pluripotencia. De igual manera estos tres factores se unen a los promotores o *enhancers* de *Sox2* y *Nanog* para activarlos (Okamura-Nakanishi *et al.*, 2005; Loh *et al.*, 2006). La co-ocupancia de OCT4 y NANOG ha sido encontrada en genes que son silenciados e inducen diferenciación (Loh *et al.*, 2006; Liang *et al.*, 2008), mientras que la co-ocupancia de OCT4 y SOX2 está involucrada en la expresión de genes que participan en el mantenimiento de la pluripotencia (Chew *et al.*, 2005; Masui *et al.*, 2007). Este circuito de retroalimentación podría ser perpetuo sino es que se ve interrumpido por señales del ambiente extracelular que lo desestabilizan, como sucede cuando hay diferenciación. En general, se desconoce cuál es el detonante de este cambio en asociación a diferentes vías de diferenciación.

Factor de transcripción SOX2. El factor transcripcional 2 de unión a cajas SRY (SOX2, del inglés *SRY-box protein*) también es esencial en el mantenimiento de la pluripotencia. Este tiene su mayor expresión en la ICM y en el epiblasto, disminuye sus niveles durante la diferenciación, donde se restringe en el linaje neuroectodérmico (Zhang *et al.*, 2014). En mESC, SOX2 forma un complejo con OCT4 (OCT4-SOX2) para activar genes importantes para el mantenimiento de la pluripotencia (Chew *et al.*, 2005). Sin embargo, Masui y colaboradores (2007) descubrieron que SOX2 es dispensable para la regulación de *enhancers* activados por el complejo OCT4-SOX2, pues resulta ser más importante para la transcripción de genes que codifican para factores reguladores de la transcripción de *Oct4*, como *Nanog*. Niveles elevados o bajos de *Sox2* provocan que las mESC pierdan pluripotencia (Koop *et al.*, 2008; Boer *et al.*, 2007). Por lo cual, su nivel de expresión debe estar en equilibrio para mantener a las mESC en estado pluripotente tal que se mantengan los niveles de expresión de *Oct4*.

Los niveles de expresión de *Sox2* están bajo el dominio de distintos *enhancers* río arriba o río abajo del sitio de inicio de la transcripción. El más esencial para mantener los niveles de expresión es la región de control distal de *Sox2* (SRC, del inglés *distal Sox2 control region*) localizado a más de 100 kb río abajo del gen. Este hace contacto físico con el promotor y *enhancers* proximales, río arriba del sitio de inicio de la transcripción, mediante un loop o circuito (Zhou *et al.*, 2017). La estabilidad de este circuito es mantenida por subunidades del complejo Mediator (coactivador de factores de transcripción) y de la cohesina; una disminución en la expresión de los genes que codifican para estas proteínas afecta esta interacción entre dominios distantes de la cromatina (Kagey *et al.*, 2010). Al SRC se unen múltiples factores de transcripción que participan en el mantenimiento de la pluripotencia, incluyendo OCT4, SOX2, NANOG, el factor transcripcional tipo Kruppel (KLF4, del inglés *Kruppel Like Factor 4*), el receptor beta relacionado a estrógenos (ESRRB, del inglés *Strogen-related Receptor Beta*) y el transductor de señal y activador de la transcripción (STAT3, del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*), entre otros (**Figura 2A**). La eliminación de este sitio causa la reducción de *Sox2*, pérdida del fenotipo de mESC en cultivo, cambios en la expresión del genoma, daño en la formación del neuroectodermo *in vivo* y diferenciación espontánea de cuerpos embrioides (Zhou *et al.*, 2017).

Factor de transcripción NANOG. El factor de transcripción NANOG es también importante pero no esencial para el mantenimiento de la pluripotencia. Durante la formación del blastocisto, NANOG y el factor transcripcional de unión a cajas GATA6 (del inglés, *GATA binding protein 6*), mediante la ruta FGF/FGFR/ERK dirige la diferenciación de la ICM a células del epiblasto e hipoblasto. Cuando el blastocisto se implanta en el útero, NANOG se inactiva por ERK mediante fosforilación y las células de la ICM entonces, diferencian a células del hipoblasto. Mientras, GATA6 activa la transcripción del mismo gen que lo codifica y a consecuencia se sobreexpresa y participa como inhibidor de la transcripción de *Nanog*. Cuando hay sobreexpresión de *Nanog* el factor al que codifica, NANOG, reprime a GATA6 y las células de la ICM diferencian a células del epiblasto. NANOG también promueve la transcripción del gen que lo codifica. En el epiblasto como consecuencia de la expresión de NANOG, las células producen FGF4, mientras que en el hipoblasto las células producen FGFR; este último es el receptor de FGF4. De esta manera hay un sistema de retroalimentación mediado por el sistema FGF/FGFR (**Figura 2B**) (Bessonnard *et al.*, 2014; Schrode *et al.*, 2014).

La eliminación de *Nanog* en el embrión causa letalidad, mientras su baja expresión provoca que las células estén inestables, prestas a diferenciarse o sin llegar al compromiso. Su ausencia en cultivo en condiciones de 2i/LIF no afecta la capacidad de autorenovación y contribución a la formación de quimeras (Chamberts *et al.*, 2007). 2i es la combinación de dos moléculas inhibitorias, una inhibidora de GSK-3 β y otra, inhibidora de MEK. En mESC en cultivo se han encontrado fluctuaciones en los niveles de expresión de *Nanog*. Sin embargo, una alta expresión mantiene estable a la población celular (Navarro *et al.*, 2012).

Otros factores importantes en el mantenimiento de la pluripotencia son KLF4 y ESRRB, estos y los anteriores factores se regulan unos a otros y son característicos de la pluripotencia naïf (Nichols & Smith, 2012).

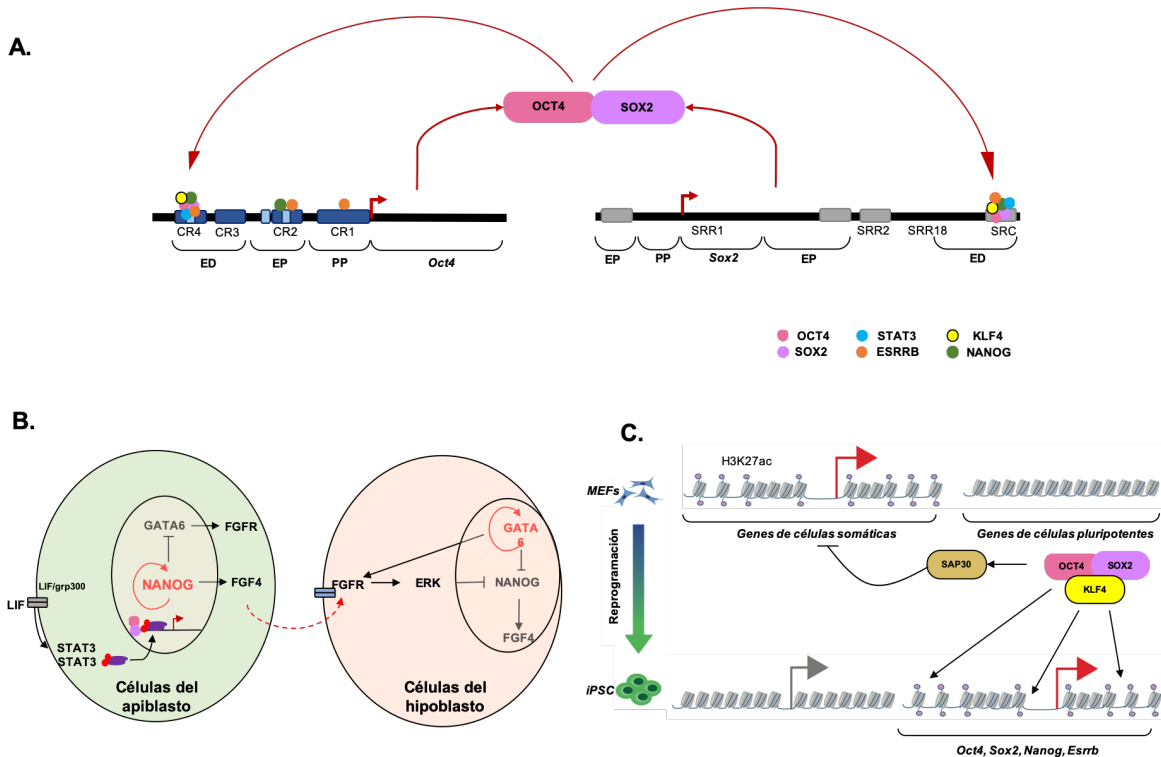


Figura 2. Control transcripcional de pluripotencia. **A)** Los factores transcripcionales OCT4 y SOX2 se unen como dímeros a los *enhancer* distal (ED) de los mismos genes que los codifican. En el esquema se representan los sitios de unión putativos de los principales factores transcripcionales asociados a pluripotencia: OCT4, SOX2, STAT3, ESRRB, KLF4 y NANOG. Para el gen *Oct4*, la región CR4 y CR3 dentro del *enhancer* distal (ED), la CR2 dentro del *enhancer* proximal (EP) y la CR1 dentro del promotor proximal (PP). Para el gen *Sox2* la región SRC dentro del enhancer distal (ED). **B)** La regulación del factor transcripcional NANOG esta controlada por la vía FGF/FGFR/ERK. Cuando el blastocisto se implanta en el útero, algunas células de la masa celular interna producen FGF4 y se convierte en células del epiblasto y otras producen el receptor FGFR y se convierten en células del hipoblasto. En células del hipoblasto, una molécula efectora de FGFR, ERK, impide la activación de NANOG. Mientras, el factor transcripcional GATA6 forma un circuito con NANOG y FGFR. Al igual que ERK, GATA6 regula de manera negativa a NANOG. En células del epiblasto no se produce el receptor FGFR, pero si FGF4, el cual esta regulado de manera positiva por NANOG. En presencia de LIF, se provoca la sobreexpresión de *Nanog*, que codifica para NANOG, esto mediante las moléculas efectoras STAT3. Figura modificada de Schore *et al.*, (2014). **C)** Los factores transcripcionales OCT4, SOX3 y KLF4 interactúan con SAP30, uno de los componentes del complejo de histona deacetilasa, para deacetilar las regiones reguladoras de los genes que se expresan en somáticas y en consecuencia impedir la expresión de estos genes. Por otro lado, los tres factores están asociados en la remodelación de la cromatina del estado cerrado al estado abierto de las secuencias reguladoras de los genes necesarios para el mantenimiento de la pluripotencia. Figura modificada de Li *et al.*, (2017).

1.4 Reprogramación celular *in vitro*

Existen distintas herramientas moleculares con las cuales se puede inducir reprogramación de células somáticas hacia iPSC y cada una ha permitido dilucidar que existen diferentes facilitadores de este proceso.

1.4.1 Reprogramación celular mediada por factores transcripcionales o moléculas químicas. El estudio más relevante en el campo de la reprogramación es el de Takahashi y Yamanaka (2006), el cual descubrió que cuatro factores de transcripción (MYC, KLF4, OCT4 y SOX2, en breve MKOS) son suficientes para generar iPSCs a partir de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs). Las características que comparten las iPSC con las mESC son la expresión de algunos genes de pluripotencia y el fenotipo de las mESC en cultivo, células con escaso citoplasma aglomeradas formando colonias refringentes. La eficiencia promedio de reprogramación que obtuvieron fue de 0.0002%, que resulta de dividir el número de colonias de iPSC generadas entre el número de células a reprogramar. El dato de eficiencia de reprogramación basado en el número de colonias generadas en experimentos posteriores al de Takahashi y Yamanaka se ha utilizado como primera referencia experimental de la capacidad de reprogramación al igual que, la tinción para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (AP). Ninguna combinación de uno o dos de los cuatro factores de reprogramación referidos arriba pudo inducir la formación de colonias iPSC, mientras combinaciones de tres factores donde OCT4 y KLF4 son constantes, logran inducir una cantidad eficiente de colonias iPSC (Takahashi & Yamanaka, 2006).

Un año después Takahashi y colaboradores (2007), reprogramaron con los mismos cuatro factores transcripcionales fibroblastos humanos de la dermis (HDF, del inglés *human dermal fibroblast*). La eficiencia de reprogramación fue similar. Estas colonias expresaron igualmente genes de pluripotencia, sin embargo, esta expresión y su fenotipo se parece más a las de las hESC y de las mEpiESC.

A partir del trabajo de Yamanaka se diseñaron otras técnicas en las que se intentó reducir la introducción de factores de transcripción, y en su lugar se añadieron pequeñas moléculas químicas (<900 Daltons), con el objetivo de aumentar la eficiencia de reprogramación y evitar el uso de las proteínas oncogénicas MYC y KLF4, sobretodo por el riesgo de estas iPSC generadas en la posibilidad de su aplicación clínica. El grupo de Huangful y

colaboradores (2008) fue el primero que indujo reprogramación en MEFs con MKOS y la molécula química ácido valproico (VPA), que es un inhibidor de histona deacetilasas, obteniendo una eficiencia de reprogramación de 0.00089%, poco más de cuarenta veces lo obtenido por Takahashi y Yamanka (2006, 2007). Con el objetivo, en este estudio, de quitar a MYC de la mezcla de factores reprogramantes se introdujeron los factores KLF4, OCT4 y SOX2, y VPA en MEFs. La eficiencia de reprogramación fue superior a la obtenida con los cuatro factores previamente reportados por Takahashi y Yamanka (2006, 2007), aproximadamente 0.0005%, además las colonias tuvieron un fenotipo parecido a iPSC. También, Werning y colaboradores (2008) introdujeron los factores KLF4, OCT4 y SOX2 en MEFs y obtuvieron una eficiencia de 0.00001%, pero las colonias obtenidas se parecían fenotípicamente más a colonias de estados tempranos de reprogramación observados con los cuatro factores.

En el mismo año, Huangful y colaboradores (2008) indujeron reprogramación de fibroblastos de prepucio de neonato humano y fibroblastos de la dermis de neonato, usando la secuencia codificante para OCT4 y SOX2, y VPA. Pese a que las células reprogramaron exitosamente con apariencia en el fenotipo y marcadores de hESC, la eficiencia de reprogramación fue de 0.00005%. Por lo tanto, concluyeron que, aunque KLF4 es dispensable, juega un papel importante en facilitar la reprogramación exitosa de la mayoría de las células que contienen los genes reprogramadores.

En otro estudio publicado, Yanqin Li y colaboradores (2011) generaron iPSC con la introducción del factor OCT4 y con pequeñas moléculas. Las pequeñas moléculas son una combinación de VPA, CHIR9921 un inhibidor de GSK-3 β que activa la vía de señalización WNT y mejora la eficiencia de reprogramación en ausencia de MYC (Marson *et al.*, 2008), E-616452 un inhibidor de TGF- β que es funcional en ausencia de MYC y puede sustituir a SOX2 (Ichida *et al.*, 2009), y tranilcipromina que activa la expresión endógena de *Oct4* en células embrionarias. La eficiencia de reprogramación fue de 0.0003% y la expresión de genes de pluripotencia y las características fenotípicas de las colonias iPSC fueron parecidas a las iPSCs formadas por los cuatro factores. De los resultados que obtuvieron, concluyeron que los factores SOX2, KLF4 y MYC pueden ser sustituibles en la formación de iPSCs por moléculas pequeñas, aunque con una eficiencia muy baja en comparación a los otros experimentos mencionados previamente.

1.4.2 Reprogramación celular mediada por la activación de los genes promotores de la pluripotencia. La reprogramación celular mediada por la activación de genes endógenos resultó de sistemas que se desarrollaron con la maquinaria de activación de genes derivada de sistemas biológicos bacterianos modificados. Dos de ellos son los que han tenido mayor relevancia en el campo de la reprogramación, el sistema TALE y el sistema CRISPR-dCas9.

Sistema TALE. Las proteínas efectoras tipo activadores transcripcionales (TALE, del inglés *transcription activator-like effector*) son secretadas por las bacterias patogénicas de las plantas *Xanthomonas*. Estas proteínas tienen dominios de unión al DNA que pueden ser modificados para el reconocimiento específico de una secuencia. Esta característica ha sido explotada por la ingeniería de proteínas para enlazar dominios activadores o represores de la transcripción a las proteínas TALE (**Figura 3A**) (Moore *et al.*, 2014).

Con la idea de expresar ubicuamente alguno de los factores inductores de pluripotencia ya descritos, Gao y colaboradores (2013) diseñaron proteínas TALE que reconocen elementos reguladores del gen *Oct4* (PP y ED), a las cuales se les enlazó cuatro copias del dominio de activación transcripcional del factor transcripcional VP16 (las cuatro copias se conocen como dominio VP64) del Virus del Herpes Simple tipo 1. La función del dominio de activación de la transcripción VP64 es reclutar proteínas que promuevan la transcripción de *Oct4* (Hirai *et al.*, 2010). La proteína TALE con VP64 (TALE-VP64) que se dirigió al ED (10 nt río arriba de la secuencia conservada CR4), precisamente donde se unen los factores OCT4, SOX2, STAT3, SMAD y TCF3 (Nordhoff *et al.*, 2001), fue la que indujo mayor expresión del *Oct4*. Sin embargo, para reprogramar MEFs fue necesario añadir los factores SOX2, KLF4 y MYC, pero aun así la eficiencia de reprogramación fue baja en comparación con la introducción de los cuatro factores reprogramantes que utilizó Yamanaka (2006). En conclusión, es importante resaltar que el nivel de expresión del gen *Oct4* regulado desde su ED por el TALE-VP64 fue suficiente para generar un patrón de reprogramación con los otros tres factores reprogramantes.

Sistema CRISPR-dCas9. El sistema de proteínas dCas9 asociado a CRISPR (del inglés *cluster regulary interspaced short palindromic repeats*) es una herramienta molecular basada en el sistema CRISPR, este último considerado el sistema inmune adaptativo de

aproximadamente 50% de las bacterias y 90% de las archaeas conocidas. El sistema CRISPR-dCas9 está definido por una versión modificada de Cas9 que tienen mutaciones puntuales en sus dominios nucleasa RuvC1 y HNH (dCas9), por lo que no puede cortar el DNA, solo mantiene la capacidad de unión al DNA mediante el reconocimiento de un RNA de guía única (gRNA). El gRNA tiene dos regiones importantes; el espaciador, que es una secuencia de 20 nucleótidos (20mer) complementaria a un sitio específico del genoma, y el *scaffold* o andamio, que es importante para la interacción con la dCas9. El 20mer está siempre adyacente a la secuencia PAM (del inglés *Protospacer Adjacent Motif*), es una secuencia de tres nucleótidos NGG, donde N puede ser cualquier nucleótido. Para que la dCas9 pueda ser funcional como herramienta transcripcional se le han agregado una serie de dominios, tanto activadores o represores de la transcripción (**Figura 3B**).

Tiempo después de la presentación de la tecnología CRISPR-dCas9, Gao y colaboradores (2014) compararon la eficiencia de activación del gen *Oct4* y eficiencia de reprogramación por activación del gen *Oct4* en presencia de los otros tres factores reprogramantes agregados de manera exógena, con este sistema y el TALE-VP64. Los gRNAs diseñados fueron dirigidos al ED, a la misma región identificada por las proteínas TALE-VP64, y en la presencia de una dCas9. A la dCas9 se le unieron uno o dos dominios activadores de la transcripción VP64, uno en el extremo amino terminal o uno en el extremo carboxilo terminal o en ambos (VP64-dCas9, dCas9-VP64, VP64-dCas9-VP64). Los resultados fueron contrarios a lo que esperaban, pese a que los niveles de expresión de *Oct4* fueron similares entre el sistema VP64-dCas9-VP64 y TALE-VP64, la eficiencia de reprogramación fue cinco veces menor con el sistema VP64-dCas9-VP64. Una de las razones a la que atribuyen este resultado es a la inhibición estérica de los dominios transactivadores de la dCas9.

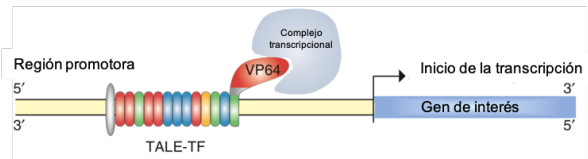
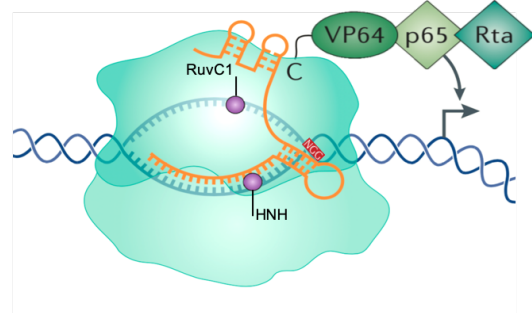
A.**Sistema TALE-TF****B.****Sistema CRISPR-dCas9**

Figura 3. Sistemas de activación de genes. **A)** Las proteínas efectoras tipo activadores transcripcionales (TALE) a las cuales se les enlaza el dominio VP64, que deriva del enlace de cuatro copias del dominio de activación transcripcional del factor transcripcional VP16 del Virus del Herpes Simple tipo 1, se conoce como factor transcripcional TALE (TALE-TF). La proteína TALE es capaz de reconocer un sitio específico del DNA, por ejemplo una región promotora, mientras que el dominio VP64 favorece la unión del complejo transcripcional, formado por proteínas que participan en el proceso de inicio de la transcripción. **B)** El sistema CRISPR-dCas9 esta conformado por una proteína dCas9 que tiene mutaciones en los sitios RuvC1 y HNH que inactivan su función nucleasa, y por un RNA de guía única (gRNA) sintético con dos regiones importantes, el espaciador con una secuencia de 20 nt complementaria a un sitio específico del genoma y el andamio que es importante para la interacción con la dCas9. Las dCas9 modificadas para tener función transcripcional tienen enlazados dominios activadores o represores de la transcripción, por ejemplo la dCas9-VPR tiene tres dominios transactivadores: VP64, p65 y el Rta del virus Ebstein-baar. Figuras modificadas de Dominguez *et al.* (2015) y Sanjana *et al.*(2012).

Es probable que en el trabajo de Gao y colaboradores (2014), el número de gRNAs utilizados o el sitio en el genoma al que fueron dirigidos, o bien la capacidad de inducción de la dCas9 utilizada no haya sido suficiente o la óptima, tal que se generara un patrón transcripcional suficiente para inducir reprogramación en presencia de los otros factores reprogramadores. Esta posibilidad surge porque en 2016 Chávez y colaboradores hicieron una comparación del nivel de expresión provocado por distintas dCas9, con distintos dominios de transactivación (VP64, SAM, VPR y Suntag), en diferentes genes de varios tipos celulares. Descubrieron que la dCas9-VPR y la dCas9-Suntag provocan el mayor nivel de expresión de los genes; a su vez esta expresión también puede ser mayor o menor dependiendo en que tipo celular se valore el sistema. Otra comparación fue utilizar uno o

más gRNAs a distintas distancias del sitio de inicio de la transcripción del gen. Utilizar uno o varios gRNAs si provoca diferencias de nivel de expresión, pero solo para algunos genes, y en cuanto a la influencia de la distancia, mientras más cerca se encuentra el gRNA del sitio de inicio de la transcripción mejor se elevan los niveles de expresión.

Otras versiones de dCas9 han sido utilizadas para la reprogramación, donde la principal variante son los dominios transactivadores utilizados. Por ejemplo, Balboa y colaboradores (2015) obtuvieron una elevada expresión de *Oct4*, con cinco gRNAs dirigidos al PP y con la dCas9-VP48, dCas9-VP96 o dCas9-VP192, que tienen tres, seis y nueve dominios activadores de la transcripción de la proteína VP16, respectivamente. En este último estudio, para inducir reprogramación, además de activarse *Oct4* mediante el sistema CRISPR-dCas9 se introdujeron los factores SOX2, KLF4, LIN28 y MYC y un RNA de horquilla corta (shRNA, del inglés *short hairpin*) para interferir sobre la traducción de p53 (ver abajo). La activación del gen *Oct4* más los factores introducidos mencionados, resultó en una mayor eficiencia de reprogramación que con la introducción del factor OCT4 y los factores mencionados.

Los estudios muestran que el gen *Oct4* puede activarse y generar distintos niveles de expresión, con herramientas artificiales que activan la transcripción específica aun cuando el gen se encuentre silenciado. En esta condición se han logrado niveles de expresión suficientes para generar iPSC en presencia de los otros factores reprogramantes.

1.5 El control de la proliferación en la desdiferenciación y reprogramación celular

La progresión del ciclo celular está controlada por dos grupos de proteínas; las cinasas dependientes de ciclina (CDK) y la familia de factores de transcripción E2F. La primera es regulada negativamente por inhibidores de CDK (iCDK) y la segunda por proteínas tipo bolsillo o “*pocket-protein*”. Los iCDK se dividen en dos grupos, los Ink y los Kips. Los Ink se unen a proteínas CDK e inducen cambios alostéricos que impiden la unión de ciclinas, mientras los Kips como p21^{CIP1} y p27 se unen directamente a ciclinas y CDK, impidiendo su interacción (Miller *et al.*, 2007). Las proteínas tipo bolsillo incluyen a la proteína de retinoblastoma (pRb) y a las proteínas 107 y 130 relacionadas a la pRB. La función de las proteínas tipo bolsillo es prevenir la transición de la fase G1 a S del ciclo celular mediante su unión con los factores de transcripción E2F, por inhabilitación de su capacidad de

activación transcripcional o bien por el reclutamiento de proteínas represoras (Cobrinik, 2005; Gianciti & Giordano, 2006). Los inhibidores Ink y Kips se acumulan durante la diferenciación de las células a la par que restringen su capacidad de dividirse (Miller *et al.*, 2007).

La restricción gradual de la progresión del ciclo celular en muchos tipos celulares, consecuencia del proceso de diferenciación, puede ser acelerada si las condiciones de su ambiente son estresantes. En condiciones de estrés el factor transcripcional p53 es el responsable de desencadenar una serie de señales que concluyen en el frenado del ciclo celular, reparación del DNA y en casos extremos, muerte celular programada. La función de p53 es prevenir que células que presentan desestabilización en su genoma se dividan y transmitan errores a sus células hijas (Spike & Wahl, 2011).

Una barrera en el proceso de reprogramación de células somáticas, son los inhibidores del ciclo celular, y es superada en parte por, MYC o KLF4, dos de los factores reprogramantes, o por el uso de inhibidores de reguladores negativos del ciclo celular. Por ejemplo, KLF4 que tiene la principal función de suprimir a p53 (Rowland *et al.* 2005). Por un lado, existe un estudio en el que se logra sustituir a KLF4 por la inhibición directa de p53 con un shRNA (horquilla corta de RNA que interfiere con la traducción del mRNA) en coordinación con OCT4 y SOX2 en MEFs (Kawamura *et al.*, 2009). Por otro lado, existe otra prueba en el que, en un intento por reprogramar fibroblastos humanos con OCT4, SOX2 y un shRNA de p53 se logran inducir la formación de colonias fosfatasa alcalina positivas, pero no iPSC (Zhao *et al.*, 2008). En cuanto a MYC se encontró dispensable en la mezcla de los factores OCT4, SOX2, KLF4 cuando hay inhibición de p53 y la expresión del factor transcripcional UTF (del inglés, *undifferentiated transcription factor-1*) (Zhao *et al.*, 2008).

Otro inhibidor utilizado en protocolos de reprogramación es el shRNA contra el mRNA de la pRB, pues, su inhibición en coordinación con los cuatro factores reprogramantes mejora la eficiencia de reprogramación. La inhibición del mRNA de la pRB mediante shRNA también ha permitido descubrir que la función de la pRB más importante en la reprogramación recae sobre su actividad represora de los factores OCT4 y SOX2 y no precisamente controlando el ciclo celular (Kareta *et al.* 2015).

La expresión forzada de MKOS en células diferenciadas como MEFs y fibroblastos humanos causa la aparición de algunas características de células senescentes en un porcentaje

de las células en cultivo. Características como arresto en la fase G1 del ciclo celular y alta expresión de los supresores tumorales p16^{INK4a}, p53 y p21^{CIP1}.

La relación que encontramos con la pRB y las moléculas efectoras de senescencia es la siguiente. En condiciones normales la pRB es hiperfosforilada por los complejos de cinasa dependientes de ciclina CDK4/6 o complejos CDK2, en cambio, en condiciones senescentes p16^{INK4a} y p21^{CIP1} inhiben a CDK4/6 provocando el arresto del ciclo celular en la fase G1, pues pRB no se hiperfosforila y por tanto no libera a los factores E2F (Giacinti & Giordano, 2006; Hani *et al.*, 2012). Mientras, p21^{CIP1} inhibe a las CDK2, la transcripción de p21^{CIP1} a su vez es estimulada por p53 (Stein *et al.*, 1999). Sin embargo, en ausencia de p53 en condiciones de estrés p16^{INK4a} y p21^{CIP1} compensan el efecto aumentando su expresión, pues existen otros mecanismos por los cuales están reguladas (**Figura 4**). Un efecto similar podría darse con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH) tipo 16, porque además de promoverse la degradación de p53 se evade uno de los principales efectos de p16^{INK4a} y p21^{CIP1}, la inhibición del ciclo celular. Cuando la oncoproteína E7 esta presente en la célula, su blanco principal es la disociación del complejo pRB/E2F, esto favorece que se transcriban las CDK2. La transcripción es alta porque E7 además promueve la transcripción de Cdc25A, una proteína que remueve los fosfatos que inhiben a las CDK2 o bien puede formar complejos con ellas. Cuando p21^{CIP1} esta presente en condiciones senescentes forma complejos con las CDK2/E, que pueden ser disociados mediante degradación del proteosoma guiada por E7. Cuando la oncoproteína E6 esta presente promueve mediante interacción con la ubiquitina-ligasa E6AP la ubiquitinación de p53 para su degradación por proteosoma (**Figura 4**).

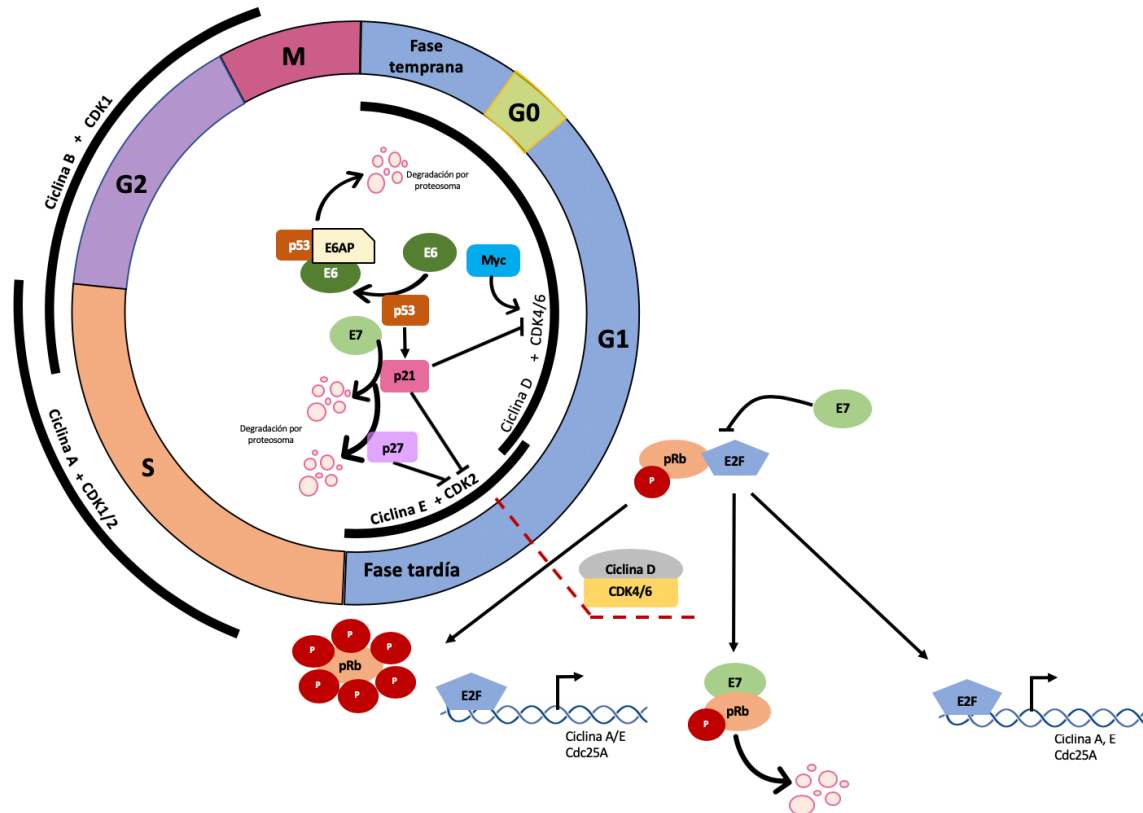


Figura 4. Moléculas de interacción con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). En células en proliferación las cinasas dependientes de ciclina (CDK), junto con sus ciclinas correspondientes, regulan la progresión del ciclo celular. Un punto importante de control es el paso de la fase G1 a S y esta controlado en una fase tardía de la fase G1 por las CDK4 y CDK6 (CDK4/6) que junto con la ciclina D permiten la hiperfosforilación de la proteína de retinoblastoma (pRb) y la liberación del factor E2F. La pRb en su estado hipofosforilado se encuentra unida al factor transcripcional E2F, un factor necesario para la transcripción de las ciclinas A y E (Ciclina A/E), y la fosfatasa Cdc25A. Cuando una célula experimenta senescencia replicativa o estrés aumenta sus niveles de p53, uno de los blancos de regulación positiva de este factor es el promotor de p21^{CIP1}. Cuando p21^{CIP1} aumenta su expresión es capaz de impedir la progresión del ciclo celular mediante inhibición por interacción con las CDK4/6 y la CDK2. El factor p27 también aumenta su expresión e inhibe por interacción a la CDK2. Cuando el oncogén E6 está presente, promueve mediante interacción con la ubiquitina-ligasa E6AP la ubiquitinación de p53 para su degradación por proteosoma. Así, p21^{CIP1} disminuye su expresión y se favorece la progresión del ciclo celular a la fase S por las CDK4/6 y CDK2 que están libres e interaccionan con sus ciclinas. Mientras, cuando el oncogén E7 está presente puede inhibir la interacción de la pRb con E2F al promover la degradación de pRb. E7 también puede inhibir la interacción de p21^{CIP1} y p27 con las CDK4/6 y CDK2 y también, promover la degradación de estos factores. El oncogén MYC promueve mediante distintos mecanismos la inhibición de p21^{CIP1} y p27, y la activación de las CDK4/6.

Banito y colaboradores (2009) fueron los primeros en introducir los MKOS en coordinación con los oncogenes E6 y E7 del VPH tipo 16 en fibroblastos de humano, pero solo como modelo comparativo de la disminución del arresto del ciclo celular. El estudio se enfocó en utilizar shRNAs para p53, p16^{INK4a} y p21^{CIP1} con los factores MKOS resultando en una mayor eficiencia de reprogramación, que con los factores MKOS. Lo interesante del estudio es que identifican que en células en reprogramación la expresión de los genes que codifican para los efectores de senescencia mencionados es mayor en etapas tempranas del proceso y esta disminuye inversamente a la adquisición del fenotipo iPSC. Las células que se quedan estancadas en la etapa temprana y expresan niveles altos de estos genes forman cúmulos, a estos cúmulos los nombran Pre-iPSC. En condiciones inhibitorias de senescencia el porcentaje de Pre-iPSC e iPSC aumenta, reduciéndose la proporción de células que no logran superar la barrera de senescencia.

II. Antecedentes

2.1 Reprogramación con el sistema booster por doxiciclina de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*

Entre los vehículos para introducir las secuencias codificantes de los factores reprogramantes que se han utilizado son; lentivirus (Yamanaka & Takahashi, 2006; Yanqui Li *et al.*, 2011), retrovirus (Huangful *et al.*, 2008) y el transposón *piggyBac* (Yusa *et al.*, 2009; Tesis de maestría de José A. Martínez, 2016). Aunque los dos primeros tienen una mayor eficiencia de integración en las células transducidas en comparación de las células transfectadas por transposones, los retrovirus y lentivirus tienen retos prácticos que involucran experiencia en su uso y contar con la infraestructura específica requerida. Más importante es que los genes reprogramantes, irreversiblemente contenidos en el genoma de las células reprogramadas, representan un riesgo cuando las iPSC se pretenden usar clínicamente. Por otro lado, los transposones como el *piggyBac* muestran eficiencias de integración similares, pero la posibilidad de la remoción de los genes reprogramadores en las iPSC es factible, dejando un genoma íntegro (Woltjen *et al.*, 2009).

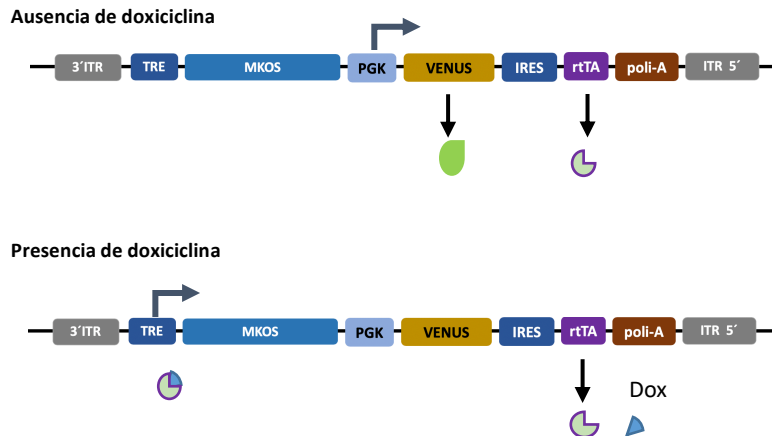
La eficiencia de reprogramación con el sistema *piggyBac* reportada para células somáticas de ratón como de humano es equivalente a los métodos retrovirales o lentivirales, lo cual hace al sistema *piggyBac* seguro y eficiente. La generación de iPSCs con el uso del transposón *piggyBac* fue inicialmente utilizado por Kaji y colaboradores (2009). Ellos colocaron las secuencias codificantes de los cuatro factores reprogramadores (MKOS) en un solo poliestrón, donde cada secuencia codificante fue separada por un péptido autocortante.

El vector pPB-MKOS-booster es un transposón *piggyBac* desarrollado en el laboratorio (Tesis de maestría de José A. Martínez, 2016) que contiene la secuencia diseñada por Kaji y colaboradores (2009), la secuencia de los cuatro genes reprogramantes (*c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*), dentro del circuito TRE-MKOS-PGK-VENUS-IRES-rtTA. La expresión de estos genes está regulada por el sistema Tet-on, donde el promotor de la fosfoglicerato quinasa (PGK, del inglés *phosphoglycerate kinase*) dirige la expresión constitutiva de la proteína fluorescente reportera VENUS (versión mejorada de la proteína amarillo fluorescente, del inglés *Yellow Fluorescent Protein*) y niveles basales del transactivador reverso de tetraciclina (rtTA, del inglés *tetracycline reverse transactivator*). En presencia de doxiciclina (análogo

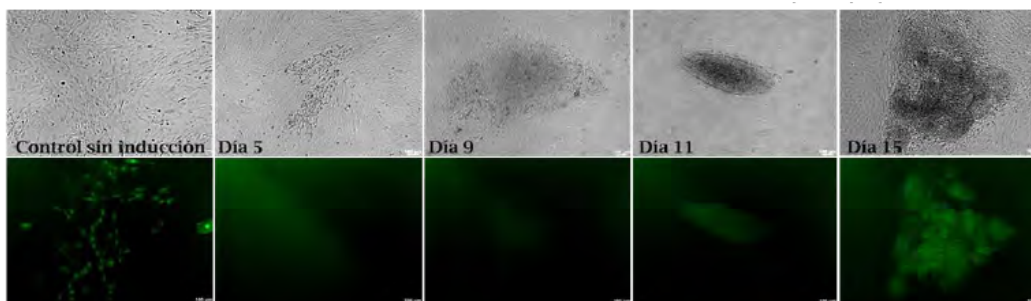
de tetraciclina) el rtTA se une al elemento de respuesta a tetraciclina (TRE, del inglés *tetracycline responsive element*) e induce la transcripción de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* (en breve *MKOS*), mientras que, la traducción de rtTA dirigida por el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES, del inglés *internal ribosome entry site*) también es incrementada. De esta manera se genera un circuito de retroalimentación positiva en el que cada vez se produce más rtTA y en consecuencia una elevada expresión de *MKOS*, a este sistema lo nombraremos el sistema *MKOS-booster* (**Figura 1A**). La integración estable del transposón a las células necesita de la transposasa. Esta reconoce los sitios ITR de los extremos del transposón y lo integra al genoma. La versión que se utilizó en co-transfección con el *MKOS-booster* fue una versión modificada por Yusa y colaboradores (2009) que tiene una eficiencia de transposición 17 veces superior a la silvestre.

En nuestro laboratorio José A. Martínez (2016) observó que MEFs de la cepa CD1 que fueron transfectados con el sistema *MKOS-booster* (MEFs-*MKOS*) mostraron la formación de cúmulos en el día 5 de inducción con doxiciclina y alcanzaron su mayor tamaño al día 15, constituyéndose como una colonia iPSC. Al inicio observó una atenuación de la fluorescencia de la proteína VENUS, proteína reportera de la expresión de los transgenes (**Figura 1B**). La disminución de la expresión de VENUS probablemente se debió a que existe un único sitio de poli-adenilación al final del transcrito, así que, cuando hay doxiciclina (dox) se genera un transcrito largo desde *MKOS* que interfiere con la actividad transcripcional del promotor PGK que dirige la expresión de VENUS. Los niveles de expresión de VENUS observados una vez establecidas las colonias iPSC generadas con este sistema, pudieron deberse a una diferencia de fuerza del PGK entre MEFs e iPSC. Es importante hacer notar que las iPSC derivadas de MEFs de la CD1 no pudieron mantenerse en ausencia de inducción en un medio convencional para mESC, pero en el medio que favorece el crecimiento de las mESC naïf ('2i') crecieron con todas las cualidades de células pluripotentes. También observó que el número de colonias iPSC obtenido es dependiente de la cantidad de doxiciclina (dox), dos dosis con un amplio rango de diferencia, 150 ng/mL y 1.5 ug/mL, fueron capaces de inducir números muy cercanos de colonias. Con 150 ng/mL de dox se obtuvo un promedio de 43.5 colonias con una eficiencia de reprogramación de 0.0031 y con 1.5 ug/mL de dox se obtuvo un promedio de 66.5 colonias iPSC con una eficiencia de reprogramación de 0.0048, siendo 1 el 100% de eficiencia (**Figura 1C**).

A.



B.



C.

Tratamiento con dox	MKOS-booster	
	Núm. de colonias	Eficiencia de reprogramación
150 ng/mL	43.5	0.0031
1.5 ug/mL	66.5	0.0048

Figura 5. Antecedentes de la expresión forzada de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* en MEFs. A) En el sistema MKOS-booster en ausencia de dox (un análogo de la tetraciclina) el transcrito se sintetiza a partir del promotor PGK y en presencia de dox, el rtTA se une a dox e interactúa con TRE y se transcribe el policistron de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* (en breve MKOS). B) Fotografías de las colonias tipo iPSC de MEFs-MKOS y su cinética de surgimiento. En la fila de fotografías superior se muestran colonias en microscopio de campo claro y en la fila inferior se observa la fluorescencia de VENUS en color verde de los MEFs-MKOS. C) Número de colonias y eficiencia de reprogramación en MEFs-MKOS y MEFs-MKOS-E6/E7 con inducción por 15 días con 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de dox. Sembraron 8×10^4 MEFs en cajas de 35 mm de diámetro con una eficiencia de transfección de 17.2%. Modificado de la tesis de Maestría de José A. Martínez. (2016).

Estos resultados concluyeron que el sistema MKOS-booster es capaz de inducir ante dosis de dox con un amplio rango de diferencia eficiencias de reprogramación de MEFs a iPSC equivalentes a los de estudios mencionados anteriormente.

2.2 Reprogramación con el sistema booster por doxiciclina con los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, en coordinación con los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH)

En el laboratorio también se construyó el transposón *piggyBac* pPB-E6/E7-booster, el cual tiene un circuito de retroalimentación igual que el pPB-MKOS-booster, pero con las secuencias de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano tipo 16 (VPH), que codifican para las proteínas con el mismo nombre E6 y E7 (Tesis de maestría de Sergio E. López, 2018), a este sistema lo nombraremos el sistema E6/E7-booster. El sistema MKOS-booster y el E6/E7-booster (MKOS-E6/E7) se utilizaron en conjunto para inducir reprogramación en MEFs (MEFs-MKOS-E6/E7). Las principales características observables fue que la formación de cúmulos comenzó entre el día 3 y 5, estos cúmulos alcanzaron entre el día 7 y 8 un fenotipo similar al de las colonias de MEFs-MKOS del día 15, es decir el fenotipo de una colonia iPSC. Estas observaciones son resultados de un solo experimento. El número de colonias fue mayor en MEFs-MKOS-E6/E7 que en MEFs-MKOS al día 8 de inducción tanto con 150 ng/ml como con 1.5 ug/mL de dox. Los primeros resultados no han sido publicados (M.C. Valencia Concepción, 2017) pero sugieren que los oncogenes E6 y E7 están teniendo un efecto positivo en la aparición temprana de colonias y en el número de estas.

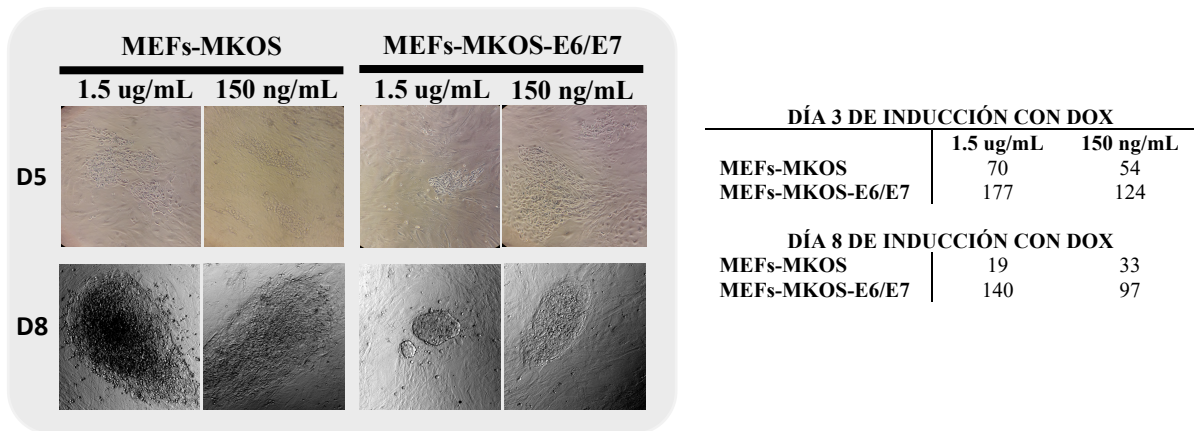


Figura 6. Antecedentes de la expresión forzada de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y los oncogenes E6 y E7 en MEFs. En la parte izquierda podemos ver fotografías de MEFs a los que se les transfecto el vector pPB-MKOS-booster (MEFs-MKOS) o el pPB-MKOS-booster junto con el pPB-E6/E7-booster (MEFs-MKOS-E6/E7). En el día 5 de inducción (D5) tanto para 1.5 ug/mL como para 150 ng/mL de dox los MEFs han formado cúmulos que llegan a constituirse como colonias tipo iPSC al día 8 de inducción con dox (D8). En la tabla de la derecha se muestra el conteo de colonias al día 3 y 8, en ambos casos se contó mayor número de colonias con MKOS-E6/E7 que con el MKOS-booster. Con la dosis de 1.5 ug/mL de dox se obtiene mayor número de cúmulos tanto para MEFs-MKOS como para MEFs-MKOS-E6/E7 que con 150 ng/mL de dox, excepto para MEFs-MKOS en el día 8. Recordemos que el número de cúmulos y colonias puede no estar relacionado, ya que no todos los cúmulos llegan a constituirse como una colonia.

III. Justificación

La expresión forzada de los genes *Oct4* y *Sox2* que codifican respectivamente para los factores transcripcionales OCT4 y SOX2 se ha definido esencial en el proceso de reprogramación de células somáticas hacia células pluripotentes. Estos factores interactúan mutuamente para inducir la activación de los mismos genes que los codificaron y de otros genes de pluripotencia, además promueven la represión de genes expresados en células somáticas. Su expresión forzada se ha inducido en células somáticas en compañía con la de otros genes, como *Klf4* y *c-Myc*, porque la sola expresión de *Oct4* y *Sox2* con los sistemas de expresión, conocidos hasta ahora, son insuficientes para inducir reprogramación hacia células pluripotentes. Una de las barreras que podría estar evitándolo es la salida del ciclo celular de las células somáticas durante la reprogramación, o bien, los bajos niveles de expresión alcanzados de *Oct4* y *Sox2*.

En el laboratorio se cuenta con el sistema MKOS-booster con el que se ha logrado inducir la formación de colonias iPSC con una eficiencia de reprogramación equivalente a los sistemas de expresión utilizados. También se cuenta con el sistema E6/E7-booster que junto con el MKOS-booster incrementa el número de colonias tipo iPSC obtenidas. Se ha reportado que las proteínas E6 y E7 tienen como blancos principales a inhibidores del ciclo celular, por lo cual su presencia puede evitar la salida del ciclo celular de las células en reprogramación aumentando así la eficiencia de reprogramación.

Recientemente se reportó que el sistema CRISPR-dCas9 con el uso de la proteína dCAS9-VP64 induce niveles elevados de los genes reprogramadores endógenos, sin embargo, no son suficientes para inducir reprogramación hacia pluripotencia y se requiere de la expresión de genes exógenos. Por otra parte, el sistema CRISPR-dCas9 con el uso de la proteína dCas9-VPR se ha reportado que induce un incremento en los niveles de expresión de varios genes, superiores en comparación con la dCas9-VP64.

En este trabajo se pretende inducir la expresión de los genes *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* a partir del circuito booster generado en el laboratorio o con el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9-VPR, e inhibir a represores del ciclo celular con las proteínas E6 y E7, para desestabilizar el fenotipo celular de MEFs hacia pluripotencia. Estos nos permitirán saber si evitando la salida del ciclo celular en MEFs que expresan forzadamente *Oct4* u *Oct4-Sox2* es posible inducir reprogramación.

IV. Hipótesis

La expresión de los genes *Oct4* y *Sox2* en presencia de las proteínas E6 y E7 del virus de papiloma humano cooperan para desestabilizar el fenotipo celular de fibroblastos embrionarios.

V. Objetivos

Objetivo general. Inducir la expresión de los genes *Oct4*, *Sox2* y de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano en fibroblastos embrionarios y evaluar la eficiencia de reprogramación.

Objetivos particulares

- Diseñar dos sistemas de expresión para los genes *Oct4* y *Sox2*. Uno basado en el sistema booster inducible por doxiciclina de expresión exógena y otro basado en el sistema CRISPR-dCas9 de expresión endógena.
- Describir el fenotipo de los fibroblastos cuya expresión de *Oct4* y *Sox2* es forzada mediante el sistema booster de expresión exógena y bajo distintas dosis de inducción por doxiciclina.
- Describir el fenotipo de los fibroblastos cuya expresión de *Oct4* y *Sox2* es forzada mediante el sistema booster de expresión exógena, en conjunto con los oncogenes E6 y E7, bajo distintas dosis de inducción por doxiciclina.
- Inducir la activación de los genes *Oct4* y *Sox2* en fibroblastos embrionarios de ratón mediante el sistema CRISPR-dCas9.

VI. Materiales y métodos

6.1. Soluciones

Soluciones para Miniprep “casero”

Solución 1 (30 mL) para almacenar a temperatura ambiente

0.513 g de Glucosa 50 mM

750 uL de Tris-HCl 25 mM (pH 8.0)

600 uL de EDTA 10 mM (pH 8.0)

- *Para 10 mL de EDTA 0.5M agregar 1.86 g a 10 mL de H₂O milliQ.*
- *Para 10 mL de Tris 1M agregar 1.21 g de Tris a 10 mL de H₂O milliQ.*

Solución 2 (5 mL) para preparar al momento de utilizarlo

1 mL de NaOH 1N

0.5 mL de SDS 10%

3.5 mL de H₂O

Solución 3 (5 mL) para almacenar a 4°C y utilizar frío

3 mL Acetato de potasio 5 M

0.575 mL de Ácido acético glacial

1.425 de H₂O

- *Para 10 mL de NaCl 5M agregar 2.922 g de NaCl en 10 mL de H₂O destilada.*
- *Para 10 mL de acetato de potasio 5 M agregar 4.90 g de acetato de potasio en 10 mL de H₂O destilada.*

Solución amortiguadora TAE (Tris acetato EDTA) 50 X (200 mL)

48.1 g de Tris-base 40 mM,

11.42 g de Ácido acético glacial 20 mM

20 mL de EDTA 0.5 M

Aforar a 200 mL con H₂O destilada

Solución amortiguadora TBE (Tris Borato EDTA) 10 X (1 L)

108 g de Tris-base

55 g de Ácido bórico

7.54 g de EDTA

Aforar a 1L con H₂O destilada

Solución amortiguadora de carga para DNA 10X (10 mL)

0.025 g de Xilen Xianol

5 mL de Glicerol anhidro

Aforar a 10 mL con H₂O milliQ filtrada

GPS 100X

Disolver 300 mg de penicilina (SIGMA, número de catálogo P-4687) y 500 mg de estreptomicina (SIGMA, número de catálogo S-1277) en 10 mL de Glutamax (GIBCO, número de catálogo 3505-061) y después filtrar con membrana con poro de 0.22 μ m. Estos 10 mL se disuelven en 90 mL de Glutamax, se alicuotan y almacenan a -20° C para su uso a un mes o a 4° C para su pronto uso.

Medio DMEM

Disolver el contenido de un sobre *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (GIBCO) en 900 mL de agua bidestilada estéril milliQ y adicionar 9.7 g de bicarbonato de sodio, disolver y ajustar el pH a 6.9 con ácido clorhídrico. Aforar a 1 L y filtrar de inmediato a través de una membrana con poro de 0.22 μ m. Almacenar a -20° C para su uso a un mes o a 4° C para su pronto uso.

Medio M10

10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO)

1% de GPS

1% de Piruvato de Na (GIBCO)

1% de Aminoácidos no esenciales (GIBCO)

87% de DMEM

Medio M15

15% de SFB (GIBCO)

1% de GPS

1% de Piruvato de Na (GIBCO)

1% de Aminoácidos no esenciales (GIBCO)

82% de DMEM

- *Para 100 mL de M15 agregar 180 uL de beta-mercaptoetanol*

Gelatina de piel de porcino tipo A (SIGMA, núm. de catálogo G1890)

Para 100 mL al 0.1% disolver 0.100 g de gelatina de porcino en H₂O milliQ y filtrar a través de una membrana con poro de 0.22 um.

Medio de Congelación

60% de DMEM

20% SFB

20% DMSO

PBS (de sus siglas en inglés *phosphate buffered saline*) 10X (500 mL)

40 g de NaCl

0.5 g de KCl

0.6 g de KH₂PO₄

3.6 g de Na₂HPO₄

Verseno

Disolver 0.2 g de EDTA en 1L de PBS 1X y filtrar a través de una membrana con poro de 0.22 um.

Tripsina 2.5 %

Diluir 1 mL del stock de tripsina que esta a 2.5% (Trypsin, GIBCO, núm. catálogo 15090-046) en 9 mL de verseno.

LIF (StemRD)

Diluir 10 ug en 1 mL de PBS 1X más 0.1% de albumina. Se utiliza a una concentración de 10 ng/uL o 1000 unidades/uL.

Doxiciclina (dox)

Disolver 50 mg de doxiciclina en 5 mL de H₂O milliQ y filtrar con una membrana con poro de 0.22 um, quedando a 10 ug/uL.

Ampicilina 200 ug/uL

Disolver 2 g de ampicilina (Gold Biotechnology) en 2 mL de H₂O milliQ estéril y filtrar con una membrana con poro de 0.22 um.

6.2 Construcción de vectores

Para tener dos sistemas de expresión de los genes *Oct4* y *Sox2*, uno de expresión exógena y otro de expresión endógena, ambos inducibles por dox, se hizo la construcción de varios plásmidos. Para ello se utilizaron los siguientes materiales y métodos.

6.2.1 Digestión de plásmidos con enzimas de restricción. Las reacciones de digestión se realizaron en un volumen final de 20 uL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mezclas realizadas se hicieron con 500 ng de DNA, la solución amortiguadora y enzima de restricción correspondiente. El aforo se realizó con agua libre de nucleasas. Cuando se hicieron dobles digestiones si hubo compatibilidad de la solución amortiguadora para las dos enzimas utilizadas se hizo una sola mezcla con la misma solución amortiguadora y si no eran compatibles, fue necesario hacer una purificación del DNA de la primera digestión mediante columna, se utilizaron las columnas de Purificación de DNA de banda en gel. La incubación de todas las enzimas utilizadas fue en una estufa a 37°C de 12 h a 16 h.

6.2.2 Preparación del fragmento de DNA a clonar. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa e identifico el fragmento de interés, el cual sirvió de inserto para la ligación con el plásmido de interés, el fragmento se purificó de acuerdo al siguiente protocolo del Kit de Purificación de DNA de banda en gel de *Thermo Scientific*:

Si el tamaño del fragmento de DNA a purificar es ≤ 500 pb se carga en un gel de agarosa al 2% y cuando es ≥ 500 pb en un gel al 1%.

1. Visualizar el DNA en el gel en un transiluminador de rayos UV, cortar el fragmento de interés y pesarlo en microtubos de 1.5 mL.
2. Agregar al fragmento de gel en proporción 1:1 de p/v, gel/solución amortiguadora de unión, cuando el gel es al 1% y cuando es al 2% en proporción 1:2, e incubar por 20 min o más a 60°C, hasta una total homogenización. Agitar en vórtex si es necesario.
3. Para fragmentos con un tamaño ≤ 500 pb agregar en proporción 1:1 v/v gel disuelto/isopropanol y para fragmentos ≥ 10 kb en misma proporción gel disuelto/H₂O.
4. Cargar 750 uL del gel disuelto en una columna (proporcionada en el kit), centrifugar 60 seg y descartar el sobrenadante. Cuando se tiene más de 750 uL de gel disuelto puede utilizarse la misma columna repitiendo el procedimiento, sin sobrepasar 1 g de gel de agarosa por columna.
5. Adicionar 750 uL de solución amortiguadora de lavado a la columna, centrifugar por 2 min y descartar el sobrenadante.
6. Colocar la columna en un microtubo de 1.5 uL limpio, adicionar 50 uL de H₂O libre de nucleasas, reposar por un minuto y centrifugar 60 seg.
7. Cuantificar el DNA por espectrofotómetro y almacenar a 4°C hasta su uso.

6.2.3 Defosforilación con rSAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*). La reacción de defosforilación se realizó en un volumen de 20 uL. Para defosforilar un plásmido linealizado se mezcló lo siguiente en un microtubo e incubó a 37°C por 30 min: 300 ng del DNA linealizado, 1 volumen de solución amortiguadora CutSmart y 0.2 uL de la enzima rSAP (NEB #M0371S). Para proceder con una reacción de ligación fue necesario inactivar la enzima por 5 min a 65°C.

Nota:

Este método se realizó solo cuando se pretendía evitar la ligación de un plásmido linealizado consigo mismo por tener los extremos libres compatibles, así solo tendría la opción de unirse con el inserto de interés.

6.2.4 Ligación de DNA. La reacción de ligación se hizo en un volumen final de 20 uL. Las mezclas se hicieron siempre con 100 ng de DNA en relación 2:1 (inserto: vector), 1 volumen de solución amortiguadora y la enzima T4 ligasa (*Thermo Scientific*, #EL0011). La mezcla se incubó por 2 h a temperatura ambiente.

Nota:

- *Se mezcló primero el DNA, solución amortiguadora, y H₂O. Se tomo un cuarto de la reacción (50 ng) como control para correr en gel. Se observaron los fragmentos a ligar.*
- *Una vez terminado el tiempo de incubación de la mezcla con la ligasa T4, se tomo un tercio de la mezcla para correr en gel y verificó que ocurrió la ligación. Se observó una banda con el tamaño de la suma de las bandas a ligar.*
- *Una vez que se verificó que ocurrió la ligación se procedió a hacer la transformación de bacterias químicamente competentes o electrocompetentes.*

6.2.5 Transformación. Para una transformación mediante electroporación, primero se preparó un tubo de ensayo estéril con 1 mL de medio Luria Bertani (LB), 10 uL de glucosa 2 M y 10 uL de Mg²⁺ 2 M, mientras se puso a descongelar en hielo el vial de bacterias electrocompetentes *E. coli* One Shot TOP10. Una vez descongeladas se agregaron 10 ng de la ligación en un volumen menor a 5 uL, libre de sales, o 1 ng del plásmido cuando solo se quiso amplificar un plásmido ya construido. La mezcla se transfirió a las celdas de electroporación BIO-RAD de 0.1 cm de espacio para *E. coli*, pkg.50, evitando la formación de burbujas. *Las bacterias permanecieron en hielo hasta su electroporación.* La celda fue colocada en el electroporador, cuidando que los extremos externos de metal de la celda no estuvieran húmedos: se dio un pulso de 180 V, lo óptimo es que ocurra en 4 mseg. Inmediatamente se colocaron 500 uL de medio LB a la celda, del tubo de ensayo previamente preparado. Se recuperó toda la suspensión celular de la celda y coloco en el tubo de ensayo con los otros 500 uL de medio LB e incubó por 1 hora a 37°C a 300 rpm. Después se transfirió el cultivo de bacterias transformadas obtenidas a microtubos de 1.5 mL y centrifugó por 5 min a 7000 rpm. Se retiraron 900 uL del sobrenadante y resuspendio la pastilla suavemente por pipeteo sin hacer burbujas y plaqueo en cajas con agar-LB con ampicilina (100 ug/mL).

Finalmente se incubó de 12 a 16 h a 37 °C. Transcurrido este tiempo se observó la aparición de colonias.

Para una transformación mediante choque térmico se preparan de igual manera las bacterias, en este caso *E. coli* químicamente competentes GCI-5α de GeneCopoeia, sin embargo, la incubación de estas con el plásmido en hielo fue de 30 min. Posteriormente se dio un choque de calor por 45 seg a 42°C, luego se devolvió el vial al hielo por 3 min. Transcurrido el tiempo las bacterias se transfirieron a un tubo de ensayo estéril previamente preparado con 1 mL de medio LB, 10 uL de glucosa 2M y Mg²⁺ 2M. Posteriormente se incubó de inmediato 1 h a 37°C a 300 rpm. De aquí se continuo el procedimiento como en la transformación mediante electroporación.

6.2.6 Identificación de colonias bacterianas con el plásmido de interés. La identificación de las colonias que tienen el inserto se realizó siguiendo el siguiente protocolo de **Miniprep “casero”**:

1. Seleccionar el número de colonias y tomar cada una de manera independiente con un asa de siembra y colocar en 2 mL de medio LB con ampicilina (agregar 2 uL), previamente colocados en un tubo de ensayo estéril, e incubar por 6 h.
2. Pasar 1.5 mL del cultivo en microtubos de 1.5 mL, centrifugar 5 min a 7000 rpm y decantar todo el sobrenadante. Guardar a 4°C los 0.5 mL del cultivo de bacterias restante para una futura amplificación a corto plazo.

Los pasos 1 y 2 se realizan en mechero.

3. Adicionar 100 uL de la solución 1 (ver preparación de soluciones para miniprep casero) al microtubo de 1.5 mL donde quedo la pastilla de bacterias y mezclar por pipeteo suavemente.
4. Adicionar 200 uL de la solución 2 y mezclar suavemente por inmersión (10 veces).
5. Adicionar 150 uL de la solución 3 (debe permanecer en hielo), mezclar suavemente por inmersión (3 veces) y dejar reposar 10 min en hielo.
6. Centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C y recuperar el sobrenadante en microtubos de 1.5 mL limpios.
7. Adicionar fenol/cloroformo (250 uL/200 uL), mover por inmersión fuertemente por 20 seg y centrifugar 5 min a 14000 rpm a 4°C, recuperar fase superior y colocar en

microtubos limpios. *Tener extremo cuidado en no llevarse parte de la fase inferior, es preferible dejar unos microlitros de la fase superior para evitar que ocurra esto.*

8. Adicionar 10 uL de NaCl 5 M y 800 uL de etanol absoluto, mezclar por inmersión, centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C y desechar el sobrenadante.
9. Adicionar 1 mL de etanol frío al 70% y centrifugar 5 min a 13000 rpm a temperatura ambiente. Decantar el sobrenadante y permitir que la pastilla se seque en una incubadora a 37°C. Dejar el microtubo abierto para permitir que se evapore el etanol, monitorear el secado dado que el DNA no debe deshidratarse totalmente o se formaran fibras que impedirán su disolución
10. Resuspender la pastilla en H₂O libre de nucleasas y almacenar a 4°C.

Nota: *La incubación de bacterias en medio líquido se realiza a 37°C a 300 rpm.*

El DNA plasmídico obtenido de cada colonia se digiere con enzimas de restricción, tal que muestre un patron de corte que indique la presencia del inserto.

6.2.7 Amplificación de plásmidos. Una vez que se identifico la colonia que tiene el plásmido con el inserto correcto se procedió a realizar un miniprep de Kit (*QIAGEN QUIAprep Spin Miniprep Kit*) para tener un DNA puro útil para secuenciación, el protocolo se describe a continuación:

1. Tomar una colonia con un asa de siembra y colocar en 1 o 5 mL de medio LB con ampicilina (agregar 1 uL por cada 1 mL de LB) e incubar 12 h.
2. Transferir el cultivo en microtubos de 1.5 mL y centrifugar a 8000 rpm 5 min a temperatura ambiente, decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 250 uL de la solución amortiguadora P1.
3. Agregar 250 uL de la solución amortiguadora P2 y mezclar por inversión del tubo de 4 a 6 veces. La reacción no debe proceder por más de 5 min. La mezcla se torna azul por acción del agente LyseBlue (proporcionado en el Kit) agregado a la solución amortiguadora P1.
4. Agregar 350 uL de la solución amortiguadora N3 y mezclar suavemente por inversión del tubo de 4 a 6 veces hasta que la solución sea totalmente blanca.

5. Centrifugar por 10 min a 13000 rpm. Verter el sobrenadante en la columna del Kit. Centrifugar por 60 seg y descartar el sobrenadante.
6. Agregar 500 uL de la solución amortiguadora PB. Centrifugar 60 seg y desechar el sobrenadante.
7. Agregar 750 uL de la solución amortiguadora PE. Centrifugar 2 min y desechar el sobrenadante.
8. Colocar la columna sobre un microtubo de 1.5 mL limpio y eluir el DNA con la solución EB agregando de 20 a 50 uL al centro de la columna y centrifugar 60 seg.
9. Cuantificar el DNA por espectrofotómetro y almacenar a -20°C hasta su uso.
P1: solución amortiguadora de resuspensión, P2: solución amortiguadora de lisis, N3: solución amortiguadora de neutralización, PB: solución amortiguadora de unión, PE: solución amortiguadora de lavado y EB: solución amortiguadora de elución.

Nota: La incubación de bacterias en medio líquido se realiza a 37°C a 300 rpm.

Cuando se envió a secuenciación e identifiqué que no hubo ninguna mutación se procedió a amplificar el plásmido con los Kits para midiprep (*Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Midiprep Kit*) y maxiprep (*Invitrogen PureLink HiPure Plasmid Maxiprep Kit*), los protocolos se describen a continuación:

Midiprep

1. Agregar 10 uL de células *E. coli* transformadas a 15-25 mL (para plásmidos con alto número de copias) o a 25-100 mL (para plásmidos con bajo número de copias) de medio LB e incubar 12 h.
2. Sedimentar las células por centrifugación a 10 000 rpm por 10 min, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla de bacterias formada en 4 mL de R3.
3. Agregar 4 mL de L7, mezclar por inversión hasta 5 veces e incubar 5 min a temperatura ambiente.
4. Aplicar 10 mL del EQ1 a la columna contenida en el Kit y permitir que se drene por gravedad.

5. Agregar 4 mL del N3, mezclar por inversión hasta homogenizar y centrifugar a 14 000 rpm por 15 min a 4°C.
6. Decantar el sobrenadante en la columna y permitir que se drene por gravedad.
7. Agregar 20 mL del W8 y permitir que se drene por gravedad.
8. Colocar la columna sobre un tubo limpio de centrifuga de 30 mL, agregar 5 mL del E4 y permitir que drene por gravedad.
9. Agregar 3.5 mL de isopropanol, mezclar vigorosamente y centrifugar a 14 000 rpm por 35 min a 4°C. Decantar el sobrenadante, lavar la pastilla con etanol al 70% y centrifugar a 14 000 por 15 min a 4°C. Decantar el sobrenadante y permitir secar la pastilla a temperatura ambiente.
10. Resuspender la pastilla en 100-200 uL de la solución amortiguadora TE, cuantificar por espectrofotómetro y almacenar a -20°C hasta su uso.

R3: solución amortiguadora de resuspensión, EQ1: solución amortiguadora de equilibrio, L7: solución amortiguadora de lisis, N3: solución amortiguadora de precipitación, W8: solución amortiguadora de lavado, E4: solución amortiguadora de elución y TE: solución amortiguadora TE.

Nota: La incubación de bacterias en medio líquido se realiza a 37°C a 300 rpm.

Maxiprep. El procedimiento es el mismo que el anterior, solo cambia el tamaño de la columna y la cantidad de medio de cultivo y soluciones utilizadas.

- 100 mL (para plásmidos con alto número de copias) o 250-500 mL (para plásmidos con bajo número de copias).
- EQ1: 30 mL, R3: 10 mL, L7:10 mL, N3:10 mL, W8: 60 mL, E4:15 mL, 10.5 mL de isopropanol y 5 mL de etanol al 70%.

6.2.8 Secuenciación. Se prepararon dos mezclas de 16 uL con el plásmido de interés, una con el oligo *forward* y otra el oligo *revers* (1 uL del stock que esta a una concentración de 10 uM). Después fueron procesadas por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Todos los oligos mencionados en esta tesis fueron diseñados con

ayuda del programa OligoAnalyzer de IDT *technologies* <https://www.idtdna.com/calc/analyzer/>, y fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM.

6.3 Cultivo celular

En todos los experimentos se utilizaron MEFs del día 13.5 de desarrollo embrionario (E13.5) de la cepa de ratón CD1, elegido por sus excelentes características reproductivas y promedio de crías. Los ratones se obtuvieron del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, institución que se basa en la Norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.

6.3.1 Obtención de MEFs. Primero se identificó que ratonas se encontraban en estro de acuerdo con la presencia de hinchazón y coloración rojiza de los labios mayores en la vagina. Entonces se puso a cruzar ratones, hembra y macho de la misma cepa. Al siguiente día la hembra que fue preñada se separó del macho. *Se dedujo a partir del tapón observado en la vagina de la ratona.* En el día E13.5 post-coito se sacrificó a la ratona, se extrajo el útero y colocó en PBS 1X frío con antibiótico. En zona de precultivo se sacaron los embriones del útero evitando que se rompiera la placenta y lavando con PBS 1X frío varias veces para evitar contaminación proveniente de la hembra. Después colocamos a los embriones en PBS 1X frío y con ayuda de pinzas se eliminaron patas, cola, cabeza y órganos internos. Los 5 cadáveres obtenidos se colocaron en un tubo cónico de 15 mL y lavaron 3 veces más con 5 mL de PBS frío 1X. Los cadáveres se dejaron en 3 mL de PBS 1X y después se pasaron muy despacio por la aguja de una jeringa de 5 mL a 3 cajas de cultivo de 10 cm de diámetro con gelatina (ver gelatinización de cajas o placas) y agregó 10 mL de medio para fibroblastos (M10) por caja. Al día siguiente se observó a los MEFs saliendo de los pequeños fragmentos de tejido. Si aún no habían salido, se lavó con PBS 1X dos veces y agregó medio M10 y espero otro día más. Al segundo día se subcultivaron las células en 6 cajas de cultivo de 10 cm de diámetro. Cuando la población celular llegó a subconfluencia (cubrió aproximadamente el 80% de la superficie) una parte de la población se subcultivo y otra se criopreservó. A este tipo de cultivo, se le conoce como cultivo primario.

6.3.2 Subcultivo celular. Para células adherentes en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro primero se aspiró el medio de cultivo y lavo dos veces con PBS 1X. Después se vertió tripsina al 0.25% previamente atemperada y dejó actuar hasta que todas las células que estaban adheridas a la placa se desprendieron (para cajas de 10 cm de diámetro se vertió 1 mL, para cajas de 6 mm a 35 mm de diámetro, 0.5 mL y para pozos de placas de 24 pozos, 200 uL). *Para fibroblastos el tiempo aproximado es de 3 a 5 min y para colonias iPSC es de 7 a 10 min.* Posteriormente se inactivo la tripsina con medio M10 en una relación v/v con la tripsina. Se retiró toda la suspensión de plato, se colocó en un tubo cónico de tamaño variable según el volumen recuperado y tomo una alícuota de 10 uL para el conteo celular. Se centrifugó a 1100 rpm por 5 min, mientras se contó el número de células obtenidas con la alícuota tomada utilizando la cámara de Neubauer. Finalmente, se aspiró el sobrenadante del tubo cónico y resuspendió la pastilla de células obtenida en un volumen de medio suplementado (M10 o M15 según sea el tipo celular) según la concentración deseada en el plato de cultivo. La transferencia de células mediante este procedimiento a una nueva caja de cultivo es considerada como un pase (P1).

6.3.3 Conteo de células con cámara de Neubauer. De la suspensión celular obtenida de la inactivación por tripsinización se tomo 10 uL y mezcló con 10 uL de azul de tripano. De esta nueva suspensión se tomo 10 uL y colocó en la cámara de Neubauer para su conteo. La cámara de Neubauer tiene nueve cuadrantes principales de los cuales, las células que son contadas son las de los cuatro cuadrantes localizados en los vértices. A partir de este dato se hizo una estimación del número de células de la suspensión total, con la siguiente fórmula.

$$\text{Número de células en una suspensión} = \frac{\text{número de células contadas}}{\text{número de cuadrantes (4)}} \times 2 \times 10^4 \times \text{volumen de la suspensión}$$

6.3.4 Criopreservación de células. Primero se siguió el método anterior de subcultivo hasta la obtención de una suspensión celular en medio suplementado gen un tubo cónico. Después se vertió medio de congelación en una relación v/v a la suspensión celular según la concentración de células deseadas en el criovial (Corning), se mezcló suavemente y vertió

en los crioviales (cada vial soporta 1 mL de volumen). Los crioviales fueron almacenados de inmediato a -70°C por tres días y después en un contenedor con N_2 líquido.

6.3.5 Descongelación de células. Los crioviales fueron sacados del contenedor de N_2 líquido e inmediatamente se incubaron en un baño de agua a 37°C , hasta que la suspensión se descongeló. La suspensión de células contenida en el criovial se disolvió en 9 mL de DMEM basal en un tubo cónico y se centrifugó 5 min a 1100 rpm. Se tomó una alícuota de 10 μL de la suspensión para el conteo por cámara de Neubauer. Finalmente se aspiró el sobrenadante del tubo cónico y resuspendió la pastilla de células obtenida en el volumen requerido de medio suplementado para su cultivo.

6.3.6. Gelatinización de cajas o placas. Se vertió un volumen suficiente de gelatina de porcino tipo A al 0.1% en cajas o placas con pozos tal que cubriera toda la superficie y dejó secar dentro de una campana de flujo laminar por 30 min. Posteriormente se aspiró la gelatina y lavó una vez con PBS 1X frío. Al no ser utilizadas de inmediato las cajas o placas fueron almacenadas selladas con parafilm a 4°C , el lavado con PBS 1X se realizó hasta que se utilizaron.

6.3.7 Generación de células alimentadoras. A un cultivo de MEFs en condiciones confluentes en una caja de cultivo de 10 cm de diámetro se le agregó 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Mitomicina C (ROCHE) y 5 mL de medio M10 para cubrir la superficie de la placa e incubó por un máximo de 5 h. Después se aspiró todo el sobrenadante y lavó dos veces con PBS 1X. Después se hizo un subcultivo en cajas o placas gelatinizadas con gelatina de porcino tipo A al 0.1%. Se requirió de 12 h para que las células se adhirieran a la superficie y pudieran usarse como capa alimentadora para otros tipos celulares. *Si las células alimentadoras no fueron utilizadas a los días siguientes se criopreservaron.*

6.3.8 Transfección de MEFs. Previo a la transfección se sembraron células alimentadoras en cajas de 35 mm de diámetro o placas de 6 pozos gelatinizadas a una densidad de 2×10^5 células por caja o pozo. Para todas las transfecciones se utilizaron MEFs del pase 1 a 3 (P1-P3) para asegurar una tasa de proliferación alta, tanto para aquellos que provenían de un

cultivo primario como para aquellos que provenían de descongelación. Fue necesario que, para el día de la transfección la población celular llegara a subconfluencia. Para cada electroporación se necesitaron 5×10^5 células. La transfección se realizó de acuerdo con el siguiente protocolo de *Electroporación de fibroblastos murinos*:

1. Mezclar en microtubos de 0.5 mL, 100 uL de solución de electroporación BTX y el volumen calculado para los plásmidos, considerando que el volumen total de los plásmidos no debe sobrepasar los 7 uL y que la cantidad total de DNA debe ser de 2 a 5 ug.
2. Realizar el método de subcultivo celular con los MEFs a utilizar hasta el punto de tener la pastilla de células. Esta pastilla se resuspende en PBS 1X y se toma una alícuota para el conteo celular por cámara de Neubauer.
4. Transferir un volumen equivalente a 5×10^5 células de la suspensión celular a microtubos de 1.5 uL y centrifugar a 2500 rpm por 5 min.
5. Aspirar el sobrenadante y colocar los tubos con la pastilla de células en hielo para evitar el deterioro de las células. Colocar en hielo solo si se van a realizar más de 4 electroporaciones. *Los pellets NO deben permanecer por más de 30 min.*
6. Resuspender la pastilla con la solución de electroporación más plásmidos, preparada en el punto 1. *Evitar la formación de burbujas durante la homogenización y evitar que las células estén en la solución de electroporación por tiempo prolongado.*
7. Transferir la suspensión en la celda de electroporación de 2 mm BTX (evitar hacer burbujas) y colocarla en el electroporador de inmediato (ECM 830 de onda cuadrada, Harvard). Dar un pulso de 170 V en 20 milisegundos. Configurar estos parámetros antes de iniciar el protocolo.

Nota: *El voltaje puede variar 1-2 V y 0.5 ms sin modificar significativamente los resultados. Es posible colocar dos celdas en el electroporador de manera simultánea cuidando que la parte metálica de la celda quede en completo contacto con los electrodos del electroporador.*

8. Una vez dado el pulso añadir 200 uL de medio M15 sin β -mercaptoetanol y recuperar toda la suspensión, colocarla en un microtubo de 1.5 uL y centrifugar a 12 000 rpm por 45 seg.

9. Dar un lavado a la celda con 500 uL de medio M15 sin β -mercaptoetanol, para recuperar las células residuales, y colocar la suspensión en una caja de 35 mm de diámetro.

10. Aspirar el sobrenadante de los microtubos y añadir 500 uL de medio M15 sin β -mercaptoetanol. Disgregar la pastilla de células parcialmente e incubar por 20 min. *No resuspender por completo ya que podría afectar la supervivencia celular.*

11. Pasados los 20 min, resuspender completamente la suspensión y transferirla a la caja de 35 mm de diámetro del punto 9. Aforar a 2 mL con M15 sin β -mercaptoetanol e incubar.

Posterior a la transfección, 24 h después, se realizó el cambio de medio con medio M15 sin β -mercaptoetanol y a las 48 h se tomaron 5 fotografías de las células transfectadas de cada pozo, utilizando la cámara AxioCamMR3 con un objetivo EC Plan-Neofluar 10X/0.30 o 5X/ 0.16 del microscopio Axio Observer de ZEISS y un ocular de PL 10X/23 Br. foc., que nos da una magnificación total de 100X y 50X, respectivamente. Para la edición de color, contraste y brillo de las fotografías se utilizó el software Fiji. A partir del número de células totales por campo y células VENUS positivas se determinó la eficiencia de transfección. Una eficiencia de transfección óptima fue considerada cercana al 20%. Si la eficiencia fue menor al 6% no se continuo hacia la inducción con dox.

Después de ser calculado la eficiencia de transfección se continuo con el subcultivo de las células a placas de 6 pozos con células alimentadoras. *Si el conteo fue menor a 2×10^4 células no se continuo con el procedimiento.* Se sembraron 5×10^4 células por pozo del total de células recuperadas y agrego medio M15 con β -mercaptoetanol, LIF (1 uL por mL de medio) y dependiendo el experimento 150 ng/mL o 1.5 ug/mL de dox. El medio y los factores adicionados se cambiaron en días alternados y diario se registraron los cambios observados.

6.3.9 Tinción para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Para teñir iPSC o mESC para detectar actividad de la enzima fosfatasa alcalina se utilizó el kit

Leukocyte Alkaline Phosphatase (SIGMA ALDRICH 86R). El cultivo de iPSC o mESC se preparó con un lavado con PBS 1X frío y se fijó con PFA al 4% a pH 7.4. Luego se lavó con agua destilada a temperatura ambiente. Posteriormente se siguió con el protocolo del Kit, que es el siguiente:

- 1.- Mezclar por inversión en un microtubo de 0.5 mL: 100 uL de la solución de nitrito de sodio con 100 uL de la solución FRV-Alkaline e incubar por dos min a temperatura ambiente.
- 2.- Mezclar 4.5 mL de agua destilada y 100 uL de solución alcalina naftol AS-BI. Después mezclar con la mezcla del paso 1.
- 3.- Añadir la mezcla resultante del paso anterior a las células e incubar por 15 min.
- 4.- Aspirar la solución y lavar con agua destilada a temperatura ambiente y luego con agua destilada, dejando 2 min en reposo esta última.
- 5.- Dejar secar las células. Las colonias fosfatasa alcalina positivas teñirán rojo/violeta.

6.4 Inmunocitoquímica

La detección de marcadores de superficie de células pluripotentes se hace mediante el uso de varios anticuerpos, aquí solo se utilizó el anticuerpo SSEA-1. Primero se fijó a las células adheridas al plato de cultivo con PFA al 4% durante 10 min. Se lavó con PBS 1X frío por 5 min. Después se permeabilizó con 500 uL de tritón 100X al 0.1% en PBS 1X por 8 min y lavó con PBS 1X por 5 min. Se incubó con solución de bloqueo (suero al 10% y tritón al 0.1% en PBS 1X) durante 30 min y después se retiró la solución e incubó con el anticuerpo primario SSEA-1 en relación 1:20 disuelto en una mezcla de suero de cabra al 0.1% y tritón al 0.1% en PBS 1X. Se incubó en cámara húmeda toda la noche a 4° C en suave agitación. Al siguiente día se hicieron 2 lavados con PBS 1X frío por 5 min. Finalmente se tiñeron los núcleos con DAPI a una concentración de 1:2000 por 15 min e hicieron dos lavados con PBS 1X.

6.5 Analisis de la activación de genes

La transfección se realizó como se describió en el protocolo de *Electroporación de fibroblastos murinos* hasta las 48 h después de la transfección en que las células se recuperaron y sembraron en cajas de 60 mm de diámetro. El número de células sembradas estuvo en relación con el número de células que deseamos obtener al día de termino de inducción. Por ejemplo, si sabíamos que la división celular es casi al doble por 24 h y queríamos tener un cultivo confluyente al día 4 de inducción sembramos 62.5×10^3 células para tener aproximadamente 1×10^6 células al día 4.

Después de los días de inducción con dox se recuperaron las células y realizó la extracción del RNA de estas. Posteriormente se realizó el cDNA de este RNA de acuerdo con el siguiente protocolo de extracción de RNA y síntesis de cDNA. Finalmente se hizo un PCR punto final del cDNA obtenido usando los oligos que identifican la secuencia codificante de nuestro gen de interés.

Extracción de RNA

De un cultivo de células adheridas a una caja o pozo de una placa de cultivo. Primero se remueve el medio y añade 500 uL de Trizol (para una caja de 60 mm de diámetro) y utiliza una espátula estéril para despegar las células. Posteriormente se transfiere a un microtubo de 1.5 mL y congela con nitrógeno líquido y almacena a -70°C si no se dea continuar con el protocolo al momento.

- 1.- Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 5 min.
- 2.- Añadir 500 uL de cloroformo por cada 500 uL de Trizol. Agitar por inmersión suavemente por 15 seg e incubar durante 5 min.
- 3.- Centrifugar a 4°C a 10 000 rpm durante 30 min. Esto permite que se formen tres fases: acuosa, interfase y fase fenólica (donde está el Trizol). Tomar la fase acuosa que es donde se encuentra el RNA y transferir a un nuevo microtubo. De ahora en adelante se trabajará con esta fase, el resto se descarta.
- 4.- Añadir 250 uL de isopropanol y mezclar por inversión durante 15 seg suavemente e incubar por 24 h a -20°C .

5.- Centrifugar a 10 000 rpm durante 30 min a 4°C. Se formará una pastilla al fondo, donde se encuentra el RNA. Evitar que se mezcle el contenido del microtubo en el transporte del congelador de -20°C a la centrifuga.

6.- Descartar el sobrenadante con una punta, cuidando de no tocar la pastilla, y añadir 500 uL de etanol al 75%. Mezclar con ayuda de un vortex, mezclar suavemente.

7.- Centrifugar a 14 000 rpm durante 15 min a 4°C. Se formará de nuevo la pastilla donde esta el RNA.

8.- Descartar el sobrenadante con ayuda de una punta y dejar secar a temperatura ambiente dentro de un gabinete de seguridad.

9.- Redissolver la pastilla en 5 a 10 uL de agua libre de RNAsas y almacenar a -20°C para su uso a corto plazo o a -70°C a largo plazo.

10.- Preparar la siguiente mezcla para dar el tratamiento con DNAsa al RNA e incubar a 37°C durante 15 min.

- 5 uL del RNA
- 1 uL de solución amortiguadora para DNAsa10X
- 0.2 uL de DNAsa (Invitrogen)
- Aforar a 10 ul con H₂O libre de RNAsa

11.- Cuantificar el DNA en un espectrofotometro, usar 1 uL para la medición, y ajustar la concentración del RNA en 1 ug/uL.

12.- Evaluar la integridad de nuestro RNA: Mezclar 1 volumen de RNA con 3 volúmenes de urea, calentar a 55°C durante 5 min y poner en hielo y finalmente cargar la muestra en un gel de agarosa al 2%, 100 volts durante 20 min aproximadamente.

Generación de cDNA

1.- Preparar la siguiente mezcla:

- 0.5 a 1 ug de RNA
- 1 uL de random primer (50 ng/uL)
- 1 uL de DNTPs (10 mM)

- Aforar con H₂O libre de RNAsas a 15.5 uL

2.- Incubar a 65°C durante 5 min y agregar lo siguiente a nuestra mezcla:

- 2 uL de solución amortiguadora 10X

- 2 uL de DTT (0.1 M)

- 0.5 uL de HyperScript (GeneAll)

3.- Incubar la muestra durante 5 min a 25°C. Incubar durante 60 min a 55°C e incubar durante 5 min a 85°C.

4.- Para verificar si el cDNA esta integro se hace un PCR para Rplp0, este es el control positivo. Para el control negativo se hace un PCR para TH, su amplificación indica contaminación con DNA genómico.

VII. Resultados

7.1 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, y *Sox2* en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7

Los MEFs transfectados con el vector pPB-MKOS-booster (MEFs-MKOS) funcionaron como control positivo de transfección y de inducción de pluripotencia ante la exposición con dox. Como se mencionó en los antecedentes, el vector pPB-MKOS-booster contiene el transposon *piggyBac* con la secuencia en policistron de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, y *Sox2*, que codifican respectivamente para los cuatro factores transcripcionales inductores de pluripotencia MYC, KLF4, OCT4 y SOX2 (MKOS). El transposon tiene el circuito TRE-MKOS-PGK-VENUS-IRES-rtTA que es inducible por dox. En ausencia de dox el transposon se transcribe a partir del promotor PGK dando como resultado solo la transcripción del mensajero de la proteína fluorescente VENUS y del rtTA, que es una molécula transactivadora. En presencia de dox, el rtTA se une a dox y entonces puede unirse a TRE y permitir la transcripción de los cuatro genes.

Para todas las transfecciones se utilizó una concentración total de DNA plasmídico de 4 ug: 3200 ng fueron del plásmido que contiene el transposon y 800 ng del plásmido de la transposasa, estuvieron en relación transposon: transposasa 5:1 (ver **Tabla1**).

Concentración del plásmido	Nombre del plásmido	Volumen para 3200 ng de transposon	Volumen para 800 ng de transposasa
1 675 ng/uL 3 700 ng/uL	pPBnv-mOCT4 pPBnv-booster	0.95 uL 0.43 uL	1.11 uL
1 675 ng/uL 3 700	pPBnv-mOCT4 pPB-E6/E7	0.95 uL 3.8 uL	1.11 uL
902 ng/uL 3 700 ng/uL	pPBnv-mOCT4/SOX2 pPBnv-booster	1.77 uL 0.43 uL	1.11 uL
902 ng/uL 412 ng/uL	pPBnv-mOCT4/SOX2 pPB-E6/E7	1.77 uL 3.8 uL	1.11 uL
610 ng/uL 3 700 ng/uL	pPB-MKOS-booster pPBnv-booster	2.62 uL 0.43 uL	1.11 uL
610 ng/uL 412 ng/uL	pPB-MKOS-booster pPB-E6/E7	2.62 uL 3.8 uL	1.11 uL

Tabla 1. Concentración de plásmidos para transfección de MEFs con el sistema booster. Se utiliza el pPBnv-booster para introducir en cada transfección la misma cantidad de transposon. El pPBnv-booster tiene solo el circuito TRE-...-PGK-VENUS-IRES-rtTA, por lo que en presencia de dox solo codifica para VENUS y rtTA.

Los MEFs-MKOS tuvieron un fenotipo similar a lo reportado por Ángel Martínez (Tesis de Maestría, 2016). En el día 3 de inducción, tanto con 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL de dox, los MEFs comenzaron a perder su forma fibroblastoide y formaron cúmulos laxos. Algunos cúmulos al día 5 comenzaron a bordearse (i.e., los que dieron lugar a las colonias iPSC), mientras los demás degeneraron. En el día 9 se percibió un crecimiento de las colonias en altura y radio y claramente el domo refringente por microscopía de contraste de fases (i.e., de las colonias iPSC). Se observó asincronía en la aparición de las colonias, pues cercano a las colonias ya bordeadas aparecieron varios cúmulos que comenzaron apenas a bordearse. En el día 10, dado el enorme tamaño de las colonias (i.e., cubrieron todo el campo 5X, con magnificación total de 50X) y a que las células empezaron a migrar y a diferenciar, se realizó el pase de las colonias por disgregación. En el día 8 después del primer pase se constituyeron colonias que solo lograron cubrir el campo 10X (con magnificación total de 100X, ver métodos), se percibió que las colonias formadas con 150 ng/mL de dox son más pequeñas que con la dosis de 1.5 ug/mL de dox y definen mejor sus bordes (**Figura 7**).

Para investigar el efecto de los oncogenes E6 y E7 (E6/E7) en la inducción de pluripotencia en MEFs, se transfectaron MEFs con los vectores pPB-MKOS-booster y pPB-E6/E7-booster (MEFs-MKOS-E6/E7). En el día 3 de inducción, tanto para 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL de dox, los MEFs comenzaron a perder su forma fibroblastoide y formaron cúmulos laxos. Algunos cúmulos comenzaron a definir sus bordes al día 5, como se observó con los MEFs-MKOS, pero, al día 7 se observó el fenotipo de una colonia tipo iPSC (**Figura 8**). En el día 10, las colonias también ya habían adquirido un enorme tamaño (i.e., cubrieron todo el campo 5X, con magnificación total de 50X, ver métodos) y las células empezaron a migrar y a diferenciar, por lo que se realizó el pase de las colonias por disgregación. En el día 8 después del primer pase se constituyen colonias que solo lograron cubrir el campo 10X, se percibió que las colonias formadas con 150 ng/mL de dox tuvieron un borde más definido que con 1.5 ug/mL de dox como se observó con los MEFs-MKOS. Estos resultados sugieren que los oncogenes E6 y E7 aceleran la aparición de un fenotipo semejante al de las mESC.

Al día 10 de inducción, tanto con 150 ng/mL como para 1.5 ug/ml de dox, se realizó una tinción de las colonias de MEFs-MKOS y MEFs-MKOS-E6E7 para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (indicador preliminar de reprogramación). Todas las colonias se tiñeron, la mayoría de manera heterogénea, y solo las más pequeñas y refringentes de manera homogénea (**Figura 9**), lo que indica heterogeneidad en el proceso de reprogramación. La asincronía en el proceso de reprogramación no solo se nota en la forma de las colonias sino también se refleja en la intensidad de la señal de VENUS, es decir, algunos cúmulos presentan más o menos intensidad de fluorescencia proveniente de esta proteína al mismo día de inducción.

El número de colonias fue contado al día 10 de inducción para MEFs-MKOS y MEFs-MKOS-E6/E7, antes y después de la tinción para detectar actividad de fosfatasa alcalina, los resultados son un promedio de dos ensayos de un experimento. El conteo antes de la tinción incluye cúmulos que inician su formación, los cuales, pueden ser resultado de la migración de células de las colonias bien delimitadas. El número de colonias fosfatasa alcalina positivas (AP+) promedio para MEFs-MKOS con 150 ng/mL de dox fue de 37.5 de un total de 45.5 colonias, 82% del total (**Figura 10 A y B**). De las 37.5 colonias AP+, 17.5 fueron colonias muy pequeñas, 11.5 pequeñas, 7.5 medianas y 1 grande (**Figura 10 C**). El número de colonias AP+ de MEFs-MKOS-E6/E7 con 150 ng/mL de dox fue de 90 de un total de 126.5 colonias, 71.2 % del total (**Figura 10 A y B**). La distribución del tamaño de las colonias fue relativamente proporcional con 21 muy pequeñas, 17 pequeñas, 26.5 medianas y 25.5 grandes (**Figura 10 C**). El número de colonias AP+ promedio para 1.5 ug/mL de dox para MEFs-MKOS fue de 50.5 de un total de 60.5 colonias, 83.5% del total (**Figura 10 A y B**); de estas colonias, 23.5 fueron muy pequeñas, 17 pequeñas, 9 medianas y 1 grande (**Figura 10 C**). El número de colonias AP+ promedio para 1.5 ug/mL de dox de MEFs-MKOS-E6/E7 fue de 60.5 de un total de 134.5 colonias, 45% del total (**Figura 10 A y B**) y de estas, 14.5 fueron muy pequeñas, 15.5 pequeñas, 27 medianas y 9.5 grandes (**Figura 10 C**).

Las diferencias en la dosis para MEFs-MKOS es que con 1.5 ug/mL de dox hubo 25% más colonias AP+, mientras, que con 150 ng/mL de dox para MEFs-MKOS-E6/E7 hubo 25% más colonias AP+. Con MEFs-MKOS-E6/E7 hay 42% más colonias AP+ que con MEFs-MKOS a 150 ng/mL de dox y 24% más a 1.5 ug/mL de dox. Por tanto, los resultados en conteo de colonias muestran que hay mayor número de colonias con MEFs-MKOS-E6/E7

(Figura 10 C), si bien con variedad de tamaños en la población, mientras que con MEFs-MKOS, la cantidad de colonias es menor con predominancia de colonias pequeñas y muy pequeñas (Figura 10 C). Estos resultados sugieren, como lo había observado en un experimento la M.C. Concepción Valencia (2017, datos no publicados de nuestro laboratorio), que el efecto de los oncogenes E6 y E7 del VPH en la reprogramación de MEFs esta en acelerar la aparición del fenotipo mESC y en el incremento del número de colonias tipo iPSC.

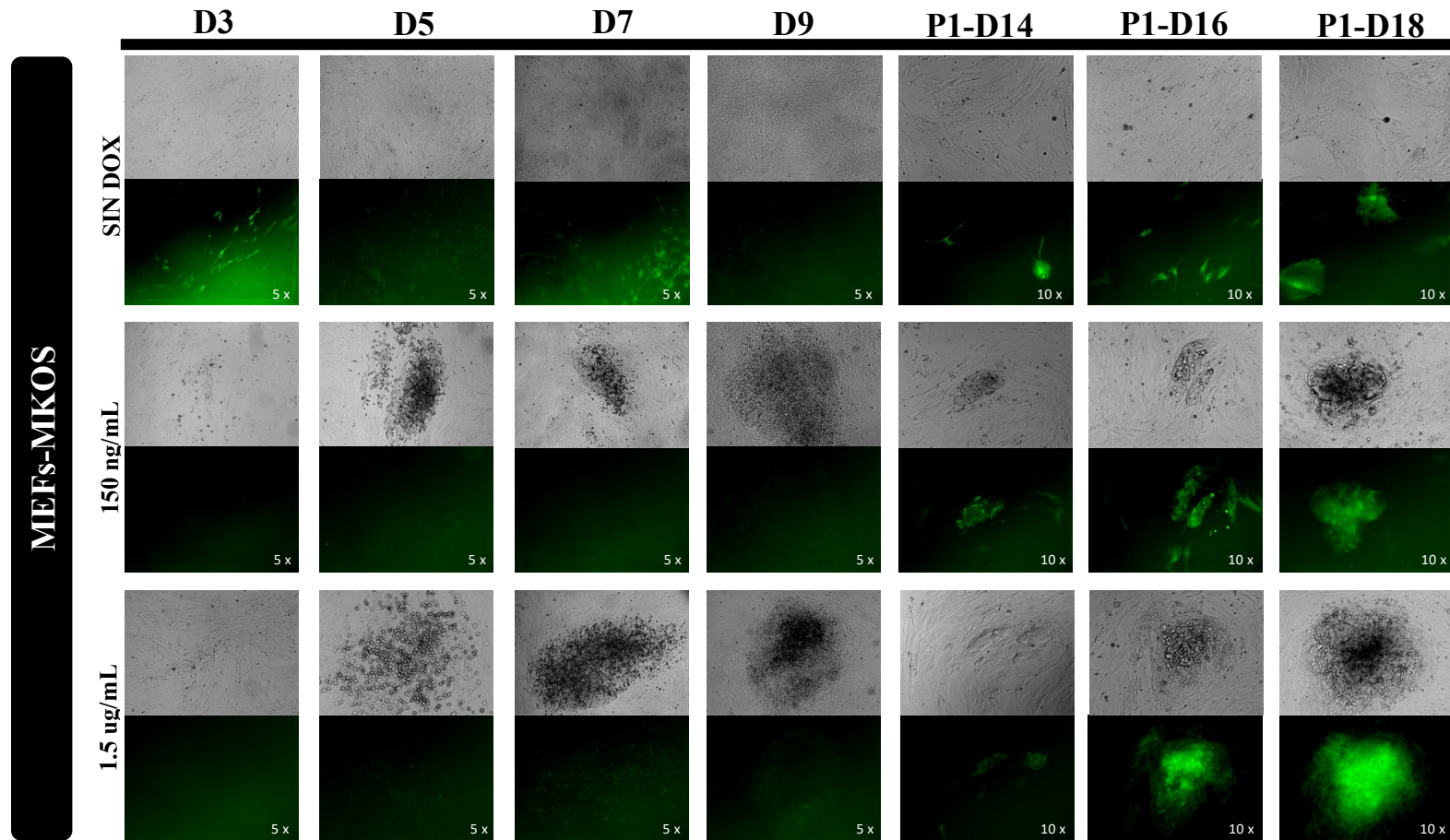


Figura 7. Expresión forzada de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* en MEFs. Los MEFs sin dox cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo y muestran un fenotipo senescente, las células incrementan su tamaño como se observa en el día 8 después del primer pase (P1-D18). En el día 3 de inducción con dox (D3) tanto para la dosis de 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL, los MEFs forman agrupaciones laxas de células redondeadas. En el día 5 (D5) las agrupaciones forman cúmulos de diferentes tamaños. Del día 9 (D9) es cuando algunos cúmulos progresaran hacia una forma tipo mESC, adquieren un crecimiento apical en el centro y se empieza a apreciar el borde de lo que será una colonia tipo iPSC. Las colonias no son estables fenotípicamente al día 10, por lo cual se da un pase, de lo contrario las células se desprenden y diferencian. En el día 8 después del primer pase (P1-D18) se constituyen colonias que solo logran cubrir el campo 10X, crecen de manera apical y se definen bordes. La fluorescencia de VEGENUS, que es la proteína marcadora de expresión del vector de los transgenes, se atenúa al inicio de la reprogramación y comienza a observarse de nuevo una vez que se ha formado la colonia tipo iPSC. En la parte superior se indica el número de días en cultivo.

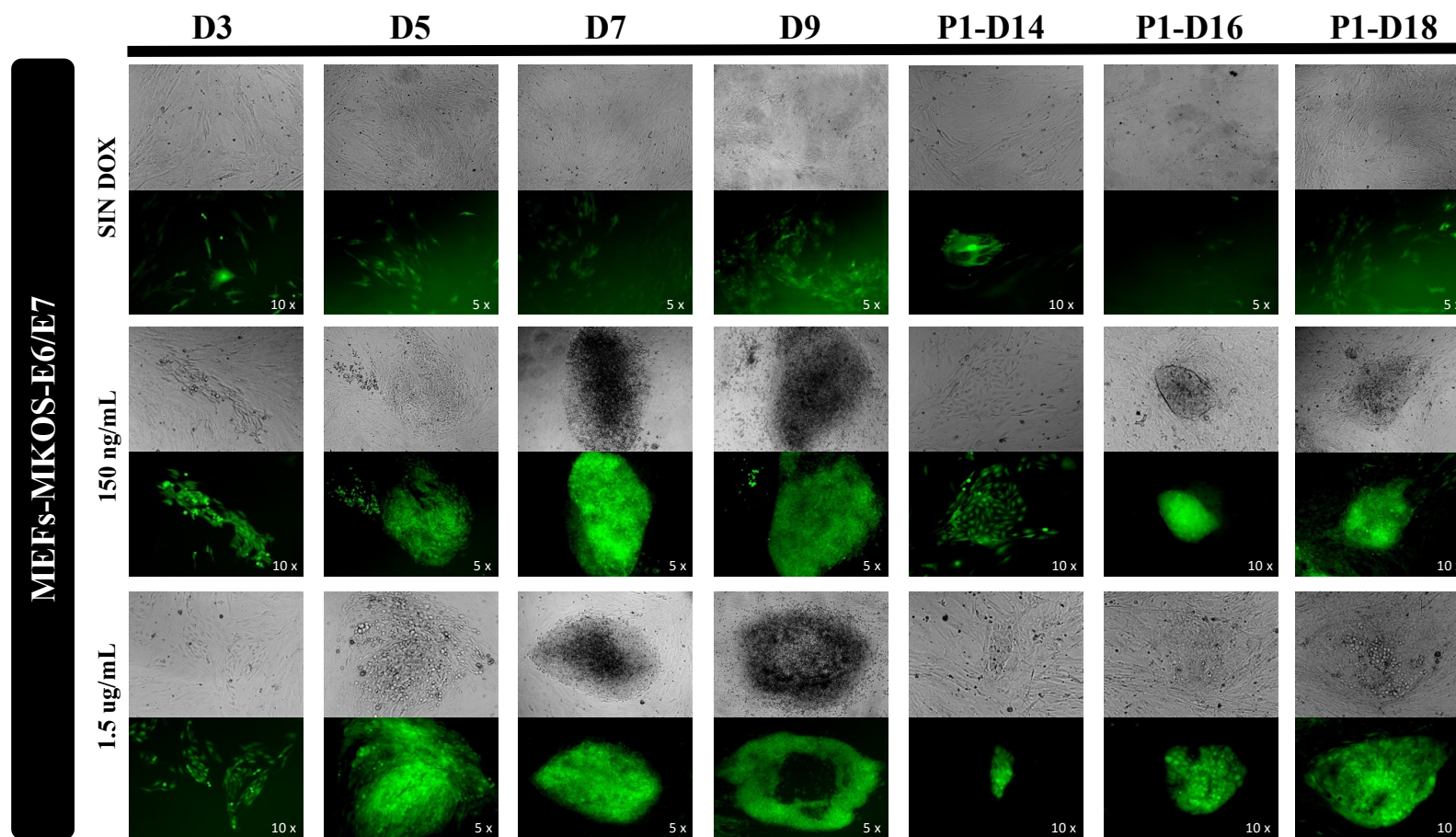


Figura 8. Expresión forzada de *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, y los oncogenes E6 y E7 en MEFs. Los MEFs sin dox cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo y muestran un fenotipo senescente, las células incrementan su tamaño como se observa en el día 4 después del primer pase (P1-D14). En el día 3 de inducción con dox (D3) tanto para la dosis de 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL los MEFs forman agrupaciones similares a los MEFs-MKOS, sin embargo, la formación de colonias tipo iPSC comienza en el día 5 (D5) y al día 7 (D7) ya es una típica colonia iPSC. Debido a que estas colonias alcanzan su tamaño máximo hasta el día 9 (D9), es necesario dar un pase o algunas células se desprenden y diferencian. En el día 8 después del primer pase (P1-D18) se constituyen colonias que solo logran cubrir el campo 10X, el crecimiento apical de las células y los bordes son más definidos en la inducción con la dosis de 150 ng/mL de dox. En la parte superior se indica el número de días en cultivo

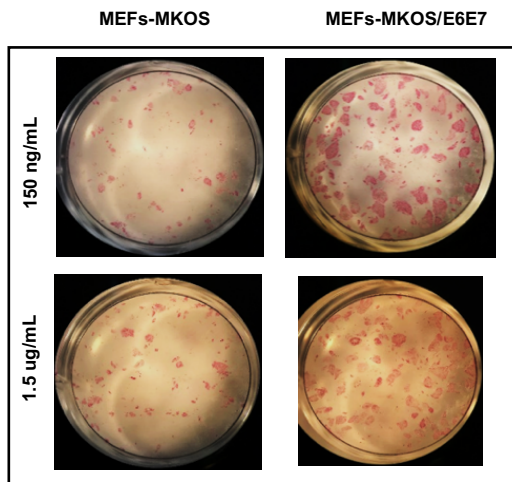


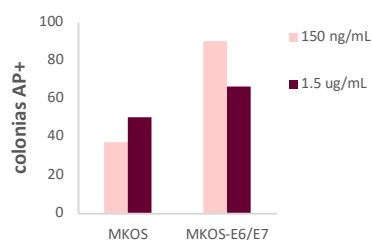
Figura 9. Detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina en colonias de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox*, y de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, y los oncogenes E6 y E7. Las colonias formadas en el día 10 de inducción con 150 ng/mL o 1.5 ug/ mL de dox tanto para MEFs-MKOS como para MEFs-MKOS-E6/E7 se tiñen, las más grandes, de manera heterogénea, y las pequeñas, que son las mas uniformes morfológicamente, homogéneamente.

A.

	MEFs-MKOS		MEFs-MKOS-E6/E7	
	150 ng/mL	1.5 ug/mL	150 ng/mL	1.5 ug/mL
TOTAL	45.5	60.5	126.5	134.5
AP+	37.5	50.5	90	66.5

B.

Colonias AP+



C.

Colonias AP+ por tamaño

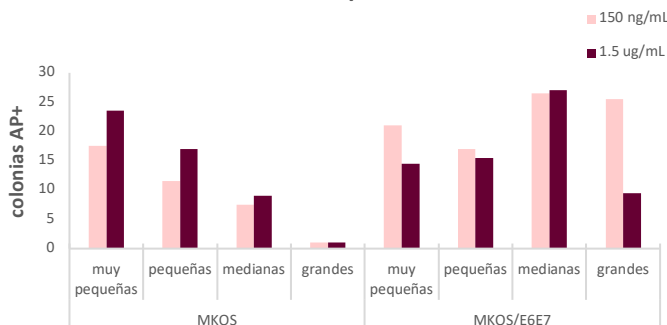


Figura 10. Conteo de colonias positivas para la detección de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox*, y de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y los oncogenes E6 y E7. A) El número de colonias AP+ al día 10 de inducción con 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de dox para MEFs-MKOS-E6/E7 y MEFs-MKOS en todos los casos fue menor al número de colonias total. B) Las diferencias en las dosis de dox usadas para inducir la expresión de los transgenes influyen de manera inversa para los dos casos, con MEFs-MKOS hay menor número de colonias AP+ con 150 ng/mL de dox mientras que para MEFs-MKOS-E6/E7 con esta dosis hay más. C) Las colonias AP+ tienen distintos tamaños (conteo en el Anexo Figura A), en MEFs-MKOS el tamaño predominante es el muy pequeño y pequeño, mientras, en MEFs-MKOS-E6/E7 hay proporcionalidad entre los distintos tamaños.

7.2 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los oncogenes E6 y E7

Los MEFs transfectados con el transposón pPB-E6/E7 (MEFs-E6/E7) inducidos con 150 ng/mL o 1.5 ug/mL de dox no mostraron algún cambio fenotípico, pero cualitativamente se observó mayor proliferación en comparación con el grupo control que no tuvo inducción. La proliferación de los MEFs que tienen los oncogenes es evidente dada la señal fluorescente de VENUS. Estos resultados sugieren que los oncogenes incrementan la proliferación o supervivencia de los MEFs (**Figura 11**).

Para investigar el efecto de E6 y E7 y de la expresión exógena de los genes *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* (*Oct4-Sox2*) en MEFs primero, se construyeron dos vectores basados en el sistema booster. Uno que tiene la secuencia codificante para OCT4 (pPBnv-mOCT4) y otro que tiene la secuencia codificante para OCT4 y SOX2 (pPBnv-mOCT4/SOX2).

Construcción del plásmido pPBnv-mOCT4. La unidad transcripcional de *Oct4* se obtuvo por amplificación mediante PCR usando como templado el plásmido pPB-TRE-MKOS-PGK-VENUS-IRES-RtTA, el oligo FW-Oct4(XbaI) 5'CTTAGTCTAGACCATGGCTGGACACCTGGCTTC 3' con el sitio de restricción XbaI y el oligo RV-Oct4(EcoRI) 5'ACGAATTCTCACGTTTGAATGCATGGGAGAGCC 3' con el sitio de restricción EcoRI. El producto de 1068 pb fue clonado en el vector pPBnv-booster (pPB-TRE-nv-PGK-VENUS-IRES-RtTA) usando los sitios para las enzimas de restricción XbaI-EcoRI (**Anexo 12.1.1**). Los resultados de la secuenciación de este plásmido no muestran mutaciones asociadas al procedimiento de PCR requerido para su obtención. Los oligos que se utilizaron para la secuenciación son el oligo FW-TRE-bwen 5'AACGTATGTCGAGGTAGGCGTG 3' y el oligo RV-PGK-bwen 5'CCACTTGTGTAGCGCCAAGT 3', el primero localizado al término de la secuencia TRE y el segundo al inicio de la secuencia PGK, de esta manera se puede conocer la secuencia insertada.

Construcción del plásmido pPBnv-mOCT4/SOX2. La unidad transcripcional de *Oct4* y *Sox2* se obtuvieron por amplificación mediante PCR usando el templado el plásmido pPB-TRE-MKOS-PGK-VENUS-IRES-RtTA, el oligo FW-Oct4(XbaI) y el oligo RV-Sox2(EcoRI) 5'AGAATTCTCACATGTGCGACAGG 3' con el sitio de restricción EcoRI.

El producto de 2093 pb fue clonado en el vector pPBnv-booster, usando los sitios XbaI-EcoRI (**Anexo 12.1.2**). Los resultados de la secuenciación de este plásmido y el pPBnv-mOCT4 no muestran mutaciones asociadas al procedimiento de PCR utilizado para su obtención. Los oligos que se utilizaron para la secuenciación son el oligos FW-TRE-bwen, FW-Oct4(XbaI) y el RV-PGK-bwen.

7.3 El fenotipo de MEFs asociado a la expresión de los genes *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* en presencia o ausencia de los oncogenes E6 y E7

Los MEFs transfectados con el vector pPBnv-mOCT4 sirvieron de control para investigar el efecto solo de la expresión de *Oct4*. Los MEFs con inducción, tanto para 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL de dox, durante 10 días no mostraron cambios en su fenotipo diferente a lo observado en MEFs sin inducir, incluso después de dos pases, uno al día 10 de inducción y otro al día 20. Se observó cualitativamente que los MEFs en todos los casos a partir del día 6 después del primer pase (P1-D16), mostraron una disminución en su proliferación y presentaron algunas características de células senescentes (i.e. abundante citoplasma con prolongaciones delgadas y extendidas). Se sugiere una disminución en la proliferación porque se observan escasamente células VENUS positivas en el plato de cultivo (**Figura 12**).

En MEFs transfectados con el vector pPBnv-mOCT4 más el pPB-E6/E7 (MEFs-OCT4-E6/E7) inducidos, tanto con 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL de dox, no se observó ningún cambio en la forma de los fibroblastos. Sin embargo, crecieron en monocapa sobre las células alimentadoras y sobre sí mismos, contrario a lo que se observó en los MEFs sin inducir que eran incapaces de permanecer adheridos a la monocapa. En microscopía de fluorescencia cualitativamente se observó que los MEFs inducidos proliferaron de forma radial tipo cúmulo. Estos cúmulos crecieron hasta superar el campo visible 5X (con una magnificación de 50X, ver métodos) y se observaron más compactos al centro, parece que hubo crecimiento vertical. No hubo diferencias entre los cúmulos de 150 ng/mL y 1.5 ug/mL, lo que indica que la dosis tuvo el mismo efecto. Los cúmulos fueron disociados y sembrados sobre células alimentadoras por dos pases, uno al día 10 de inducción y otro al día 20. La formación de nuevos cúmulos ocurrió después de cada pase, después de 4 días de inducción, en el día 14 (P1-D14). La fluorescencia de VENUS permitió rastrear cualitativamente la proliferación de los fibroblastos inducidos hasta el día 29 (**Figura 13**).

El día 17 y 29 se hizo una inmunocitoquímica, solo para MEFs-OCT4-E6/E7 y para MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7 inducidos con 1.5 ug/mL de dox, para identificar si hubo expresión de SSEA-1, un marcador usado comúnmente para identificar pluripotencia detectado en las mESC, mEpiESC, e iPSC; esta proteína se detectó solo en las condiciones control, en MEFs-MKOS y mESC 46C, estas últimas son mESC usadas comúnmente como control positivo de células pluripotentes (**Figura 14**).

Un evento extraordinario fue registrado para los MEFs transfectados con el vector pPB-OCT4 más el pPB-E6/E7, al día 9 de inducción con 150 ng/mL de dox se identificó una colonia bien definida en los bordes (**Figura 15**) pero ésta no se logró propagar.

Los MEFs transfectados con el vector pPB-mOCT4/SOX2 sirvieron de control para investigar el efecto de la expresión de *Oct4* y *Sox2*. Los MEFs con inducción, tanto para 150 ng/mL como para 1.5 ug/mL de dox, al igual que los MEFs-OCT4 durante 10 días no mostraron cambios en su fenotipo diferente a lo observado en MEFs sin inducir, incluso después de dos pases, uno al día 10 de inducción y otro al día 20. También se observó cualitativamente que los MEFs a partir del día 6 (D6) después del primer pase para todos los casos mostraron una disminución en su proliferación, se observan menos células VENUS positivas dentro del mismo campo de visión (**Figura 16**).

En MEFs transfectados con el vector pPB-OCT4/SOX2 más el pPB-E6/E7 (MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7) al igual que los MEFs-OCT4-E6/E7 formaron cúmulos de MEFs que son capaces de formarse de nuevo cuando son disgregados y subcultivados. Sin embargo, los cúmulos que forman los MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7 se observan menos compactos que los MEFs-OCT4-E6/E7 (**Figura 17**).

Estos resultados indican que el efecto de los oncogenes E6 y E7 junto con la expresión de *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* provoca la formación de cúmulos de MEFs que tienen la capacidad de volverse a formar cuando los MEFs son disgregados y subcultivados.

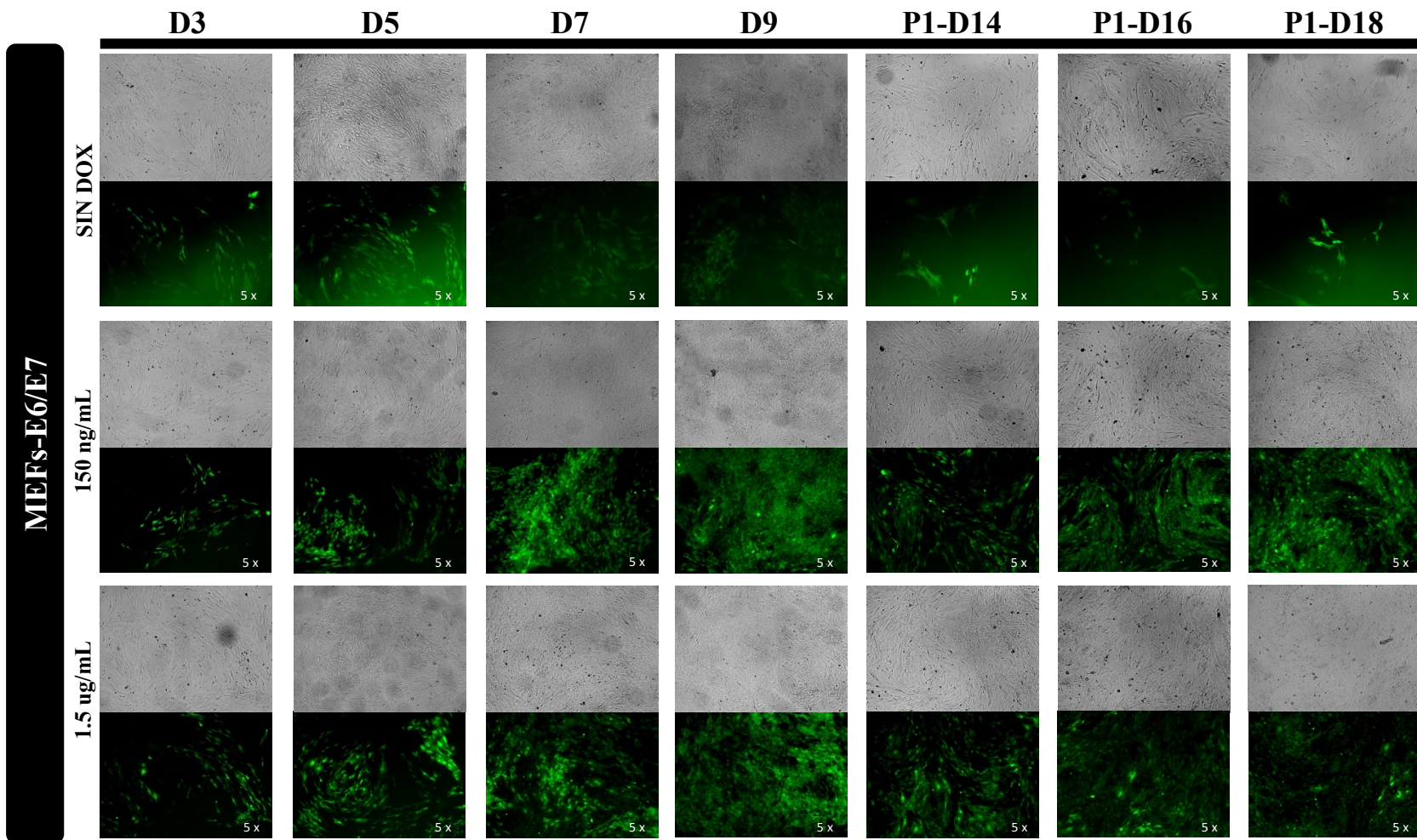


Figura 11. MEFs transfectados con los oncogenes E6 y E7. Los MEFs sin inducción tienen una proliferación basal, las células incrementan su tamaño y mueren conforme pasa el tiempo, por lo cual se nota menor número de células VENUS positivas. Los MEFs con inducción de 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de doxiciclina (dox) tienen una proliferación constante que al día nueve (D9) alcanza a cubrir todo el campo de 5x. A los 8 días de subcultivo (P1-D18), primer pase P1, cualitativamente se observó la misma cantidad de células VENUS positivas que del día siete de inducción (D7) antes del pase. En la parte superior se indica el número de días en cultivo y P1 indica el primer pase.

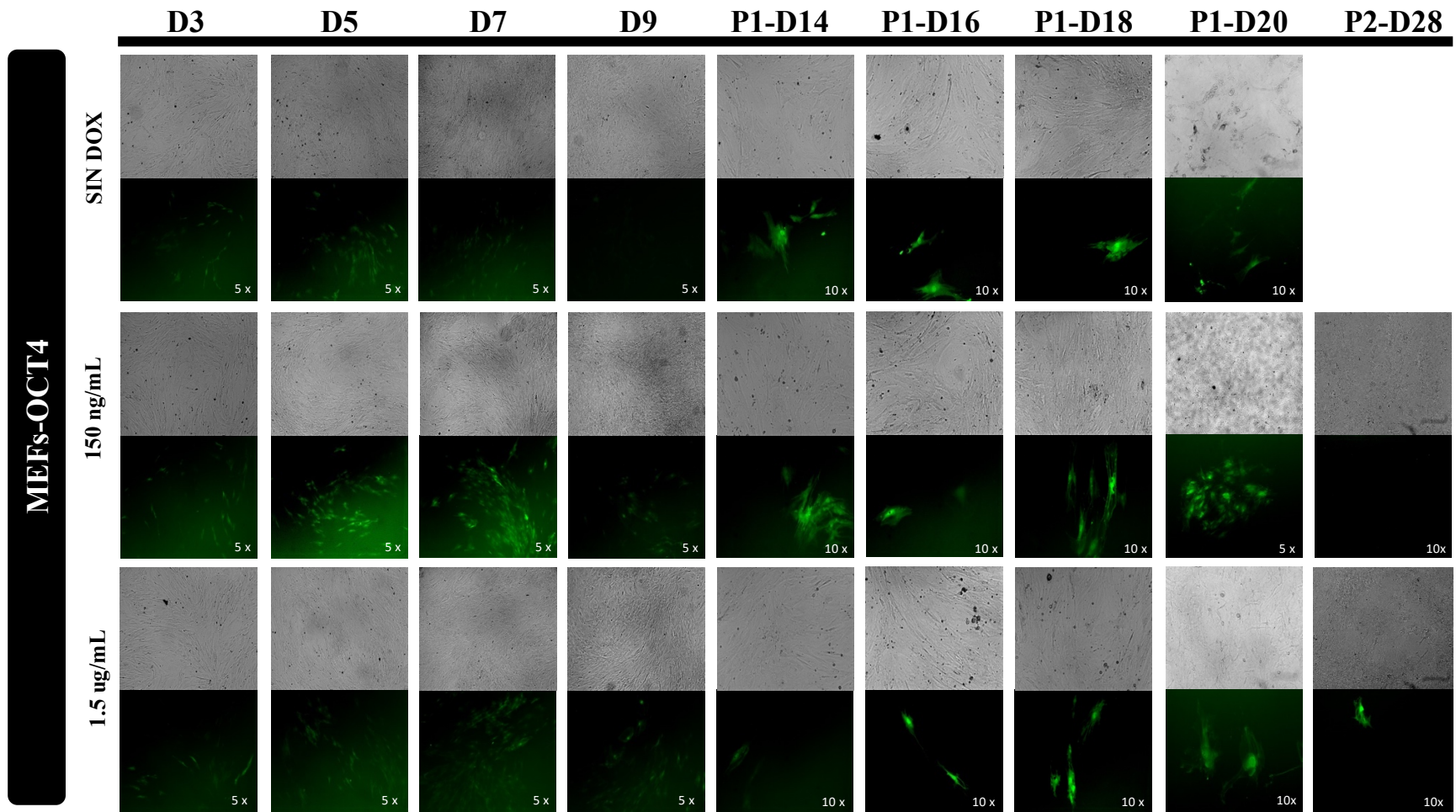


Figura 12. MEFs transfectados con el transgen *Oct4*. Los MEFs transfectados con el transgen *Oct4* SIN DOX y con inducción con 150 ng/mL o 1.5 ug/mL de dox incrementan su tamaño y cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo, por lo cual se observa menor número de células VENUS positivas en el campo de visión a partir del día 7 (D7). Después del primer pase (P1) los fibroblastos adquieren una morfología grande con prolongaciones largas y delgadas. Para el día 8 después del segundo pase (P2-D18) las células son muy escasas.

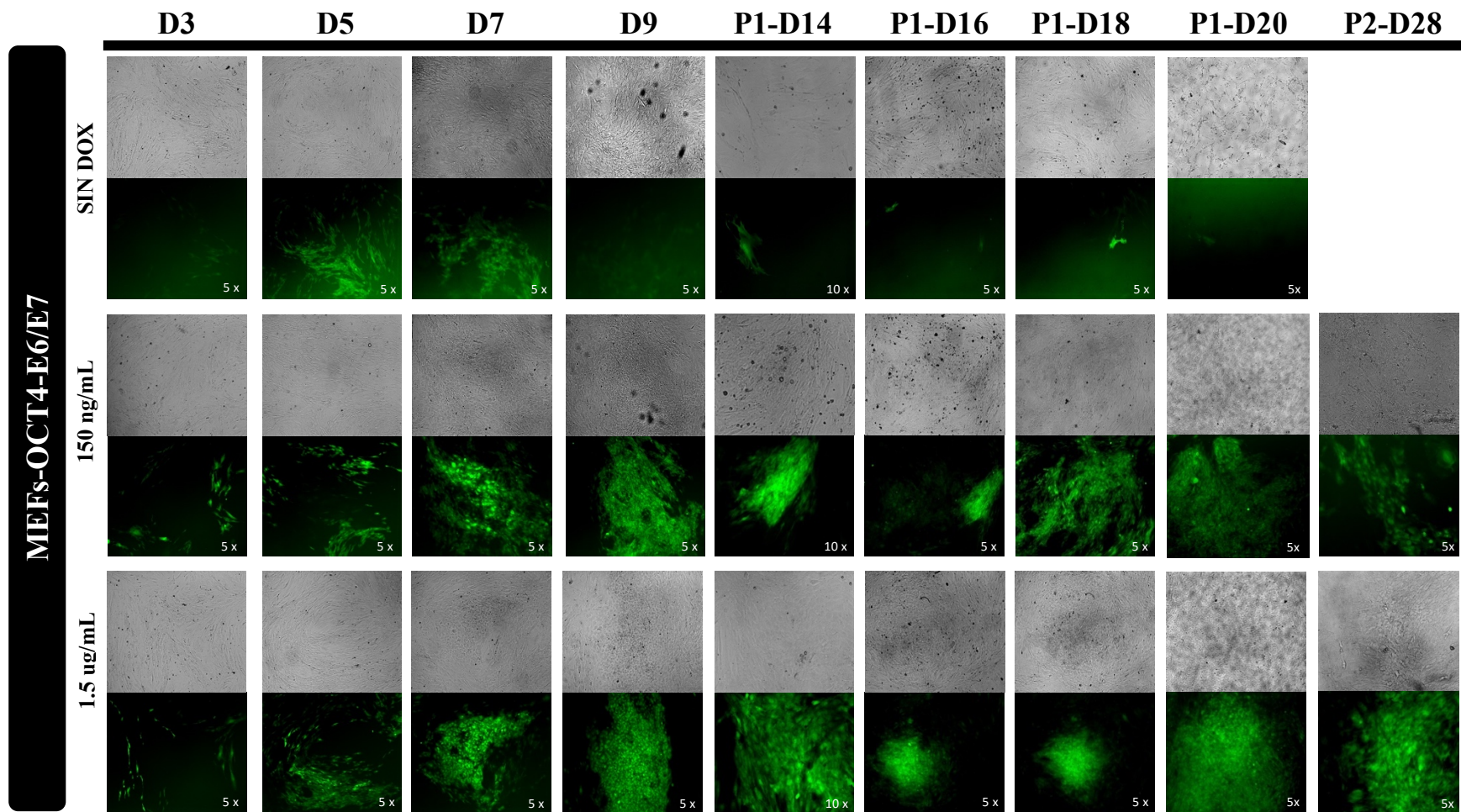


Figura 13. MEFs transfectados con el transgen *Oct4* y los oncogenes E6 y E7. Los MEFs transfectados con el transgen *Oct4* y los oncogenes E6 y E7 SIN DOX incrementan su tamaño y cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo, por lo cual se observa menor número de células VENUS positivas a partir del día 7 (D7). Los MEFs inducidos con 150 ng/mL y con 1.5 ug/mL de dox muestran la formación de cúmulos fibroblastoides, evidentes por la fluorescencia de VENUS en verde, a partir del día 7 de inducción (D7). Los cúmulos vuelven a formarse después de 4 días de inducción del primer pase (P1-D14) y tras el segundo pase también (P2).

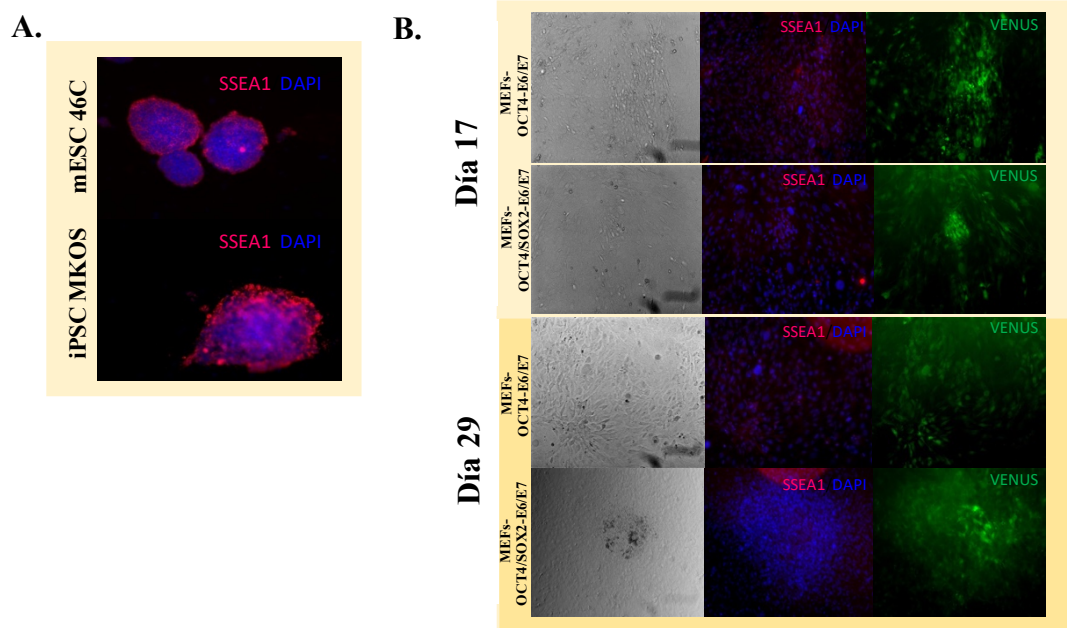


Figura 14. Inmunocitoquímica para detección del marcador de pluripotencia SSEA-1. A) Las colonias de las células mESC 46C y las iPSC MKOS son el grupo control para la detección de SSEA-1. B) MEFs-OCT4-E6/E7 y MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7 inducidos por 17 días y 29 días con 1.5 de dox, se observan a la izquierda en campo claro, al centro inmunoteñidas con SSEA-1 y DAPI, y a la derecha con fluorescencia de VENUS. Los núcleos son marcados con DAPI.

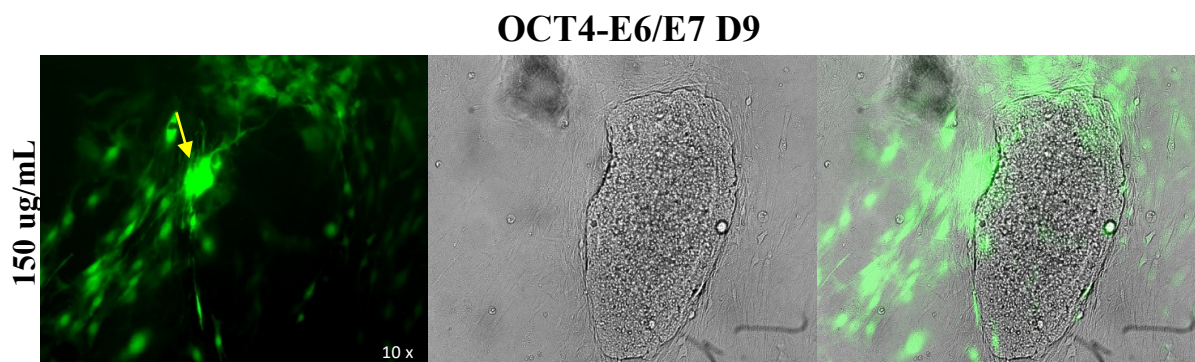


Figura 15. Colonia resultante de la expresión del transgen *Oct4* y los oncogenes E6 y E7 en MEFs. La inducción de MEFs-OCT4-E6/E7 por 9 días (D9) con 150 ng/mL de dox, provocó en un caso excepcional la formación de una sola colonia tipo iPSC. En la primera imagen se observan células VENUS fluorescentes, rodeando a la colonia, incluso se observa una célula con expresión más intensa de VENUS extendiendo sus prolongaciones al extremo izquierdo del borde de la colonia (ver flecha amarilla). Al centro se observa la imagen en campo claro, la colonia presenta bordes definidos y una distribución homogénea de las células, tiene apariencia aplanada. En la tercera imagen se observa el traslape de las imágenes de fluorescencia y campo claro, las células que rodean la colonia mantienen una forma fibroblastoide.

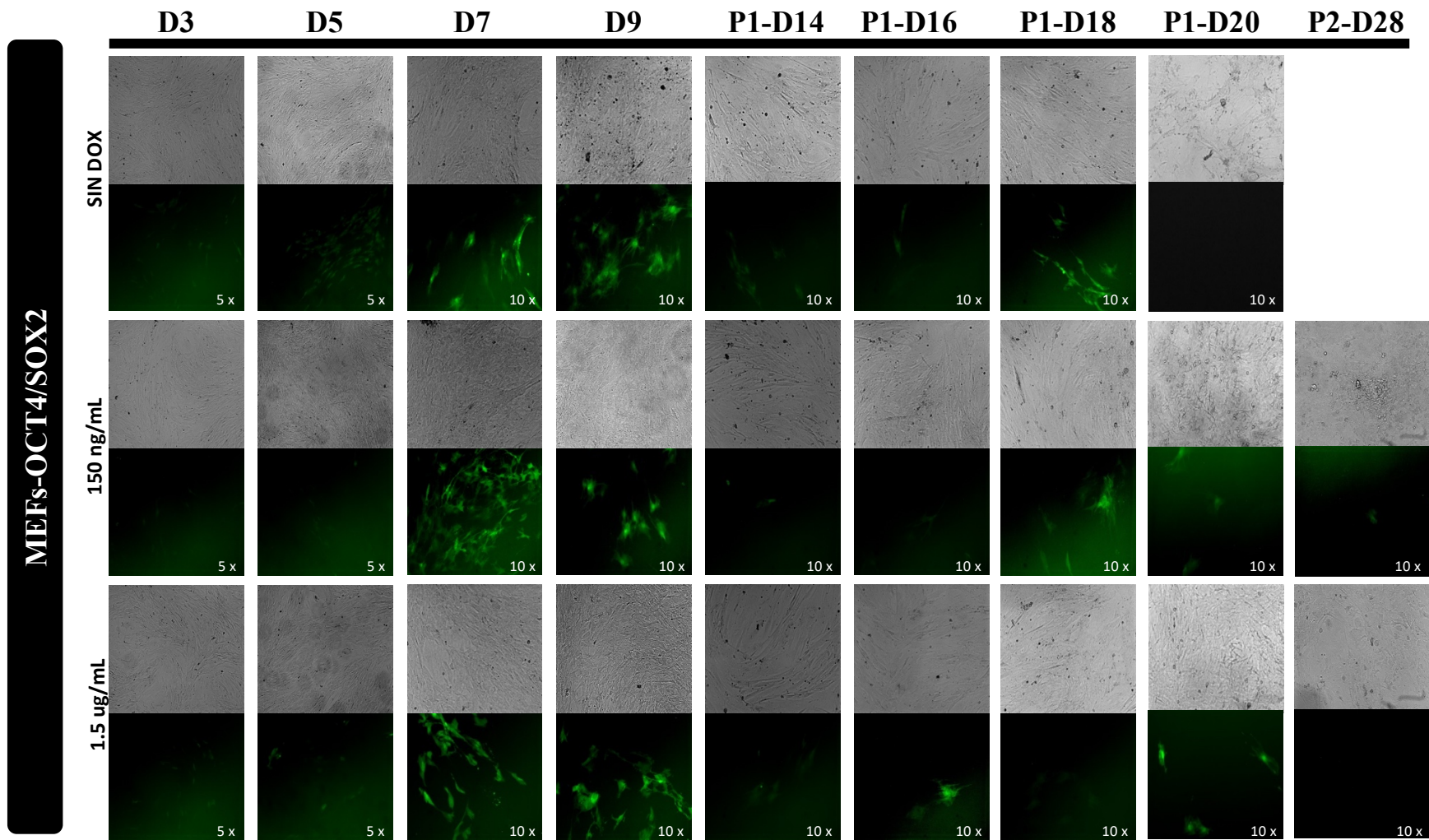


Figura 16. MEFs transfectados con los transgenes *Oct4* y *Sox2*. Los MEFs transfectados con los transgenes *Oct4* y *Sox2* sin y con inducción con 150 ng/mL o 1.5 ug/mL de dox incrementan su tamaño y cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo, por lo cual se observa menor número de células VENUS positivas en el campo de vision a partir del día 7 (D7). Después del primer pase (P1) los fibroblastos adquieren una morfología grande con prolongaciones largas y delgadas. Para el día 8 después del segundo pase (P2-D18) las células son muy escasas.

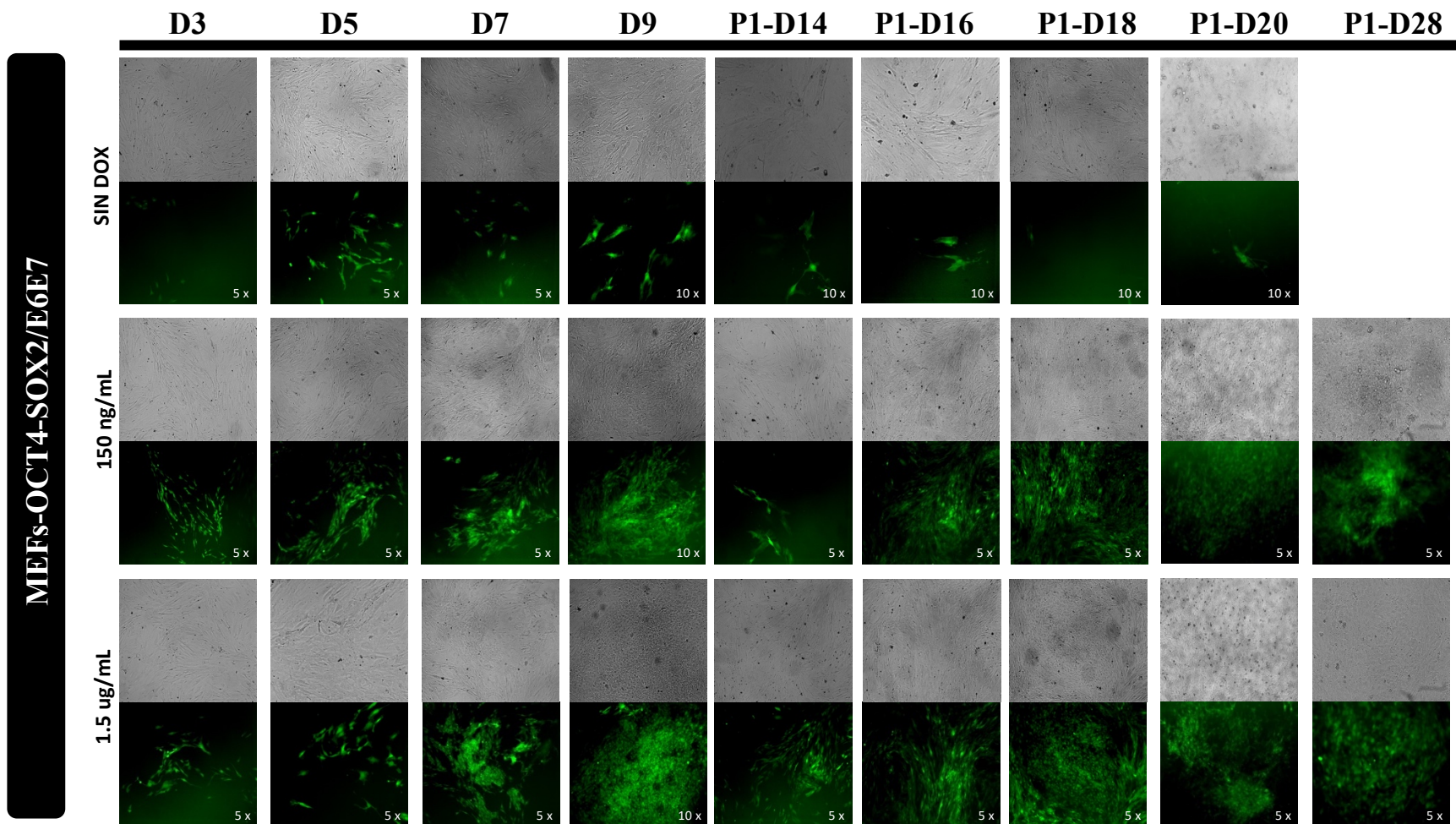


Figura 17. MEFs transfectados con los transgenes *Oct4* y *Sox2* y los oncogenes E6 y E7 Los MEFs transfectados con los transgenes *Oct4* y *Sox2* en coordinación con los oncogenes E6 y E7 sin inducción incrementan su tamaño y cualitativamente disminuyen su proliferación conforme el tiempo, por lo cual se nota menor número de células VENUS positivas a partir del día 7 (D7). Los MEFs inducidos con 150 ng/mL y con 1.5 ug/mL de dox muestran la formación de cúmulos fibroblastoides, evidentes por la fluorescencia de VENUS en verde, a partir del día 7 de inducción (D7). Los cúmulos vuelven a formarse después de 4 días de inducción del primer pase (P1-D14) y tras el segundo pase también (P2).

Un ensayo no considerado en los objetivos iniciales de este trabajo mostró resultados interesantes. MEFs-MKOS-E6/E7 inducidos durante 10 días con 1.5 ug/mL de dox en condiciones NO reprogramantes (medio M10, sin LIF y sin células alimentadoras) generaron cúmulos fibroblastoides muy compactos, si bien estrictamente no con las características de iPSC pero que tiene definidos parte de sus bordes. Su aparición al día 4 es visible como focos proliferativos en monocapa. El crecimiento vertical y horizontal de los cúmulos fue visible entre el día 8 y 10, incluso pudo observarse que comenzaron a definirse bordes refringentes. Estos cúmulos fueron disgregados y parte de la población celular disgregada se cultivo en las mismas condiciones (medio M10, sin LIF y sin células alimentadoras), sin embargo, pese que al día 4 después del pase se observaron nuevos focos proliferativos, fueron escasos y en el día 7 las células comenzaron a adquirir un fenotipo senescente. Otra parte de la población celular fue cultivada en condiciones reprogramantes (M15, LIF y células alimentadoras) y sorprendentemente a los 4 días las células comenzaron a adquirir el fenotipo de una colonia tipo iPSC que se definio completamente al día 25 de inducción, 15 días después del pase (**Figura 18**). Estas colonias fueron positivas para la tinción de la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (**Figura 19**). Estos resultados nos permiten cuestionarnos acerca del potencial de diferenciación de los MEFs-MKOS-E6/E7 bajo este tratamiento de exposición a un medio M10, sin LIF y sin células alimentadoras con 1.5 ug/mL de dox durante 10 días ¿Sera posible que bajo estas condiciones los MEFs hayan ganado potencial de desdiferenciación?

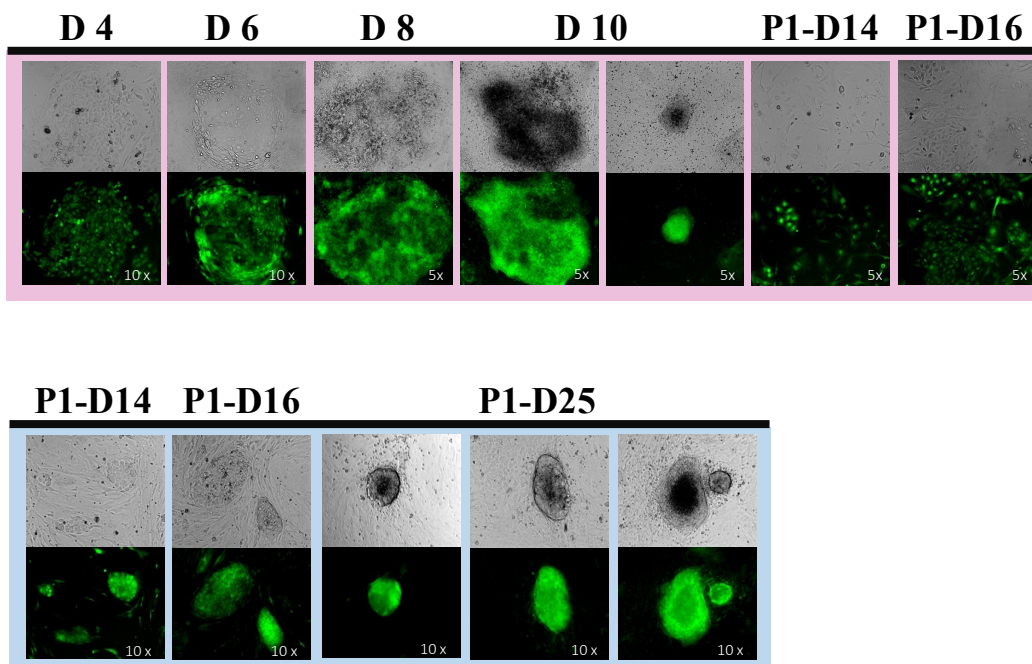
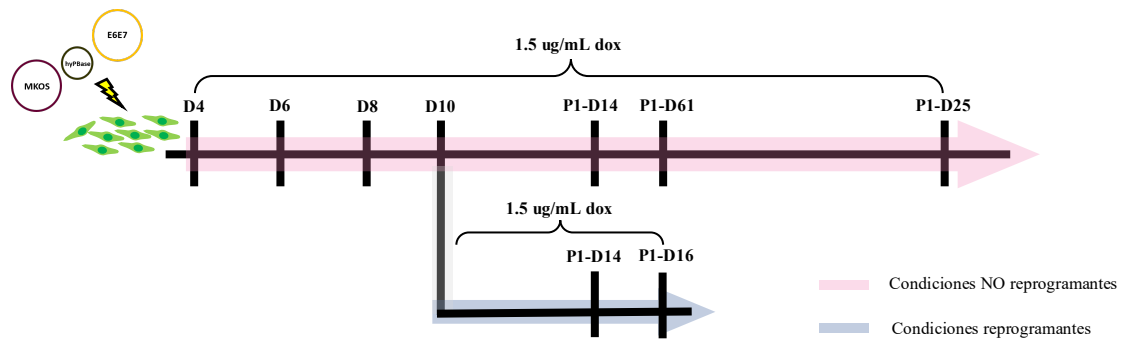


Figura 18. MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, y los concógenes E6 y E7 en condiciones NO reprogramantes. Los MEFs-MKOS-E6/E7 inducidos con 1.5 ug/mL de dox en condiciones no reprogramantes (medio M10, sin LIF y sin células alimentadoras) formaron cúmulos de células que se observan muy compactos en el día 10 de inducción (D10). En este día se dio un pase (P1) y una parte de la población celular se colocó en condiciones NO reprogramantes: hasta el día seis después del pase (P1-D16) no se observa progresión hacia cúmulos compactos, los cúmulos se observan laxos y algunas células presentan fenotipo senescente. Otra parte de la población celular se colocó en condiciones reprogramantes (medio M15, LIF y células alimentadoras) y a los cuatro días después del pase (P1-D14) se observan cúmulos que se constituyen como colonias tipo iPSC al día 15 después del pase (P1-D25).

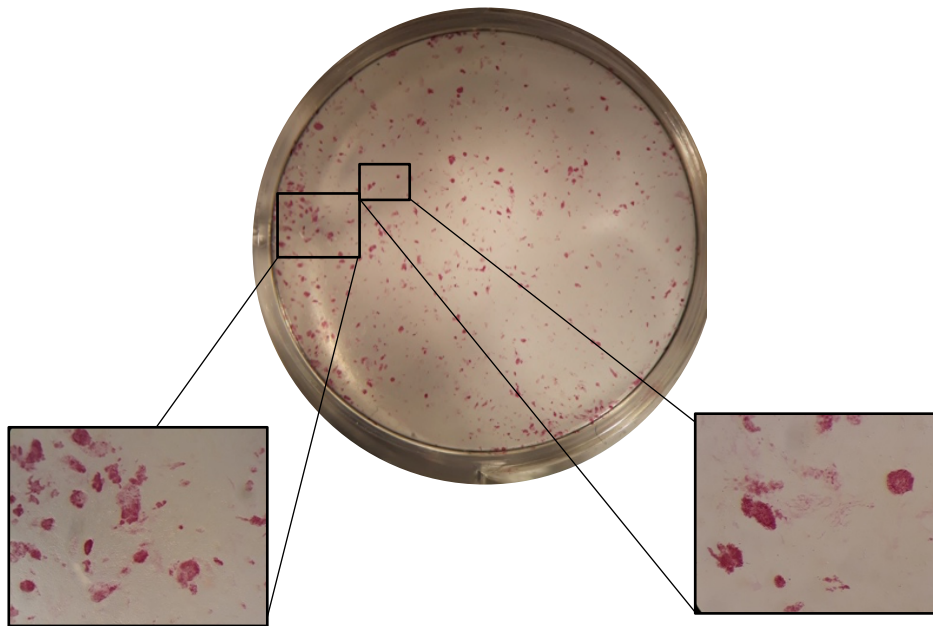


Figura 19. Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*, y los oncogenes *E6* y *E7* en condiciones NO reprogramantes. Los MEFs inducidos con 1.5 ug/mL de dox durante 10 días en condiciones NO reprogramantes (medio M10, sin LIF y sin células alimentadoras) y 15 días más en condiciones reprogramantes (M10, LIF y células alimentadoras) fueron teñidos para detectar actividad de fosfatasa alcalina, mostrando una tinción homogénea rojiza.

7.4 Características del sistema CRISPR-dCas9: dCas9-VPR y gRNAs para *Oct4* y *Sox2*

Considerando que una limitante en la reprogramación puede ser la dosis de las proteínas reprogramantes se utilizó el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9VPR para inducir la activación de los genes endógenos *Oct4* y *Sox2*. Como se mencionó en la introducción, se ha reportado que este sistema con esta variante de dCas9 induce una expresión aumentada de genes en las células y la activación de genes silenciados según el blanco del gRNA, y en consecuencia una mayor dosis de las proteínas a las que codifican esos genes. La dCas9-VPR tiene tres dominios transactivadores: el dominio VP64, p65 y el Rta que son capaces de reclutar a coactivadores de la transcripción y proteínas modificadoras de la cromatina, lo cual permite la activación de genes silenciados.

Para investigar el efecto de inducir de manera endógena al gen *Oct4* y *Sox2* con este sistema, primero se tuvieron que construir los vectores que contienen la dCas9-VPR y los gRNAs con blanco a regiones reguladoras de los genes *Oct4* y *Sox2*.

Construcción del plásmido pKS+U6TER(2)-CBh. La construcción de un vector que contuviera los gRNAs a utilizar por el sistema CRISPR-dCas9 requirió de la construcción de un vector adicional, el vector pKS+U6TER(2)-CBh, que tiene las secuencias codificantes de dos gRNAs y el promotor CBh. El promotor CBh fue elegido porque es pequeño (800 pb aprox.) en comparación con el promotor CAG (1.7 kpb aprox.), y se ha reportado que tiene una fuerte expresión y duración de la expresión similar al promotor CAG (Gray *et al.*, 2011). El plásmido pX333 (Addgen plasmid: 64073) fue digerido con las enzimas de restricción XhoI (NEB #R0146S) y AgeI (NEB #R3525), el fragmento flanqueado por estos sitios incluye las dos unidades transcripcionales del gRNA y la secuencia del promotor CBh. Posteriormente el fragmento se purificó por extracción de banda en gel y se clonó en el vector pKS+ en los sitios compatibles XhoI-XmaI, siendo AgeI compatible con XmaI. Esta construcción sirvió para tener sitios de restricción compatibles en los extremos de la secuencia 5' **XhoI**-gRNAs-CBh-**BamHI** 3' con el vector destino final, el vector pPB-**XhoI**...**BamHI**-Luc2mCherry, al cual previamente se eliminó la secuencia del promotor CAG. A continuación, se explica como se diseñaron los gRNAs para introducirlos.

Construcción del plásmido pPB-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh-Luc2mCherry, pPB-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-Luc2mCherry y pPB-pSox2(1)-(6)P-CBh-Luc2mCherry.

Primero se buscaron las secuencias blanco de 20 nt (20mer) de los gRNAs en las regiones promotoras de los genes *Oct4* y *Sox2* usando el programa CRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp/>) de Naito y colaboradores (2015). La búsqueda se realizó con base en la secuencia ingresada de *Mus musculus* a partir de la secuencia GRCm38/mm10 registrada en NCBI, tanto en dirección 5'-3' como en dirección 3'-5'. Para cada 20mer el software determinó: el contenido de GC% (óptimo cerca del 40%), la Tm (óptima a 60 °C), la presencia o ausencia TTTT (cuatro timinas consecutivas causan la terminación de la transcripción de la polimerasa III, lo óptimo es su ausencia) y el número de sitios fuera de blanco en el genoma del organismo, este último criterio también fue aplicado para los 12 nt y 8 nt adyacentes a PAM. CRISPRdirect señala cuales 20mer más PAM tienen la probabilidad de ser altamente específicos de acuerdo con los criterios mencionados. La búsqueda para *Oct4* se hizo de -1 a -3100 pb del sitio de inicio de la transcripción (**Figura 20 A**). Esta secuencia contiene las regiones reguladoras CR2, CR3 y CR4. Se seleccionaron dos 20mer, uno localizado de -2280 pb a -2260 pb denominada EhD(5) (TTATACTCTAGGCACGCTTAGGG) y otra localizada de -258 pb a -238 pb del sitio de inicio de la transcripción denominada P(6) (CGATGG GGCATCCGAGCAACTGG) (**Tabla 2**). La secuencia blanco del gRNA (2)3.1 se obtuvo del trabajo de Gao X. (2014), en el que se reportó que indujo la mayor expresión del gen. Esta secuencia se encuentra justo río arriba de la secuencia regulatoria CR4A (Nordhoff *et al.* 2001).

position		target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start	end	20mer+ PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
2727	2749	AACAGGCTTTGTGGTGGATGGG [gRNA]	50.00 %	74.24 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	439 [detail]
2743	2765	CGATGGGCGATCCGAGCAACTGG [gRNA]	65.00 %	78.66 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	427 [detail]

position		target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start	end	20mer+ PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
19	41	TAGGTGTGGCATTCCGCATCTGG [gRNA]	55.00 %	75.39 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	433 [detail]
821	843	TTATACTCTAGGCACGCTTAGGG [gRNA]	40.00 %	69.34 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	551 [detail]

Tabla 2. Reporte de los 20mer para *Oct4* por CRISPRdirect. De acuerdo con NCBI (2016) la localización del gen *Oct4* es de 3 550 6032 pb a 35 510 777 pb en el cromosoma 17 de ratón. En las filas superiores el reporte de CRISPRdirect de los 20mer de la secuencia ingresada de -1 pb a -3100 pb del sitio de inicio de la transcripción del gen *Oct4*: posición de 35 503 032 pb a 35 506 032 pb en el cromosoma 17 de ratón. En las filas inferiores el reporte de -2100 a -3100 pb del sitio de inicio de la transcripción: posición de 35 502 932 pb a 35 504 932 pb en el cromosoma. Marcado en el recuadro rojo la mejor secuencia putativa elegida. El sgRNA en el recuadro rojo superior es el P(6) y el gRNA en el recuadro rojo inferior EhD(5).

La búsqueda del 20mer para el gen *Sox2* se hizo de - 3800 pb a +1 pb del sitio de inicio de la transcripción y se seleccionó el 20mer localizado de -373 pb a -395 pb del sitio de inicio de la transcripción denominado Sox2(1) (**Tabla 3**).

position	target sequence	sequence information				number of target sites [?]		
		start - end	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM
161 - 183	- [CCC]CTGCCGTTGGCCCTTCATTTTC [gRNA]	55.00 %	73.28 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	940 [detail]
162 - 184	- [CCC]TGCOCGTTGGCCCTTCATTTTC [gRNA]	55.00 %	74.78 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	881 [detail]
163 - 185	- [CCT]GCOCGTTGGCCCTTCATTTCCA [gRNA]	55.00 %	74.78 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	108 [detail]
373 - 395	+ TTCAGATATATACTGGTGG [AGG] [gRNA]	35.00 %	62.48 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	120 [detail]
1388 - 1410	+ GGCCCTGCCCTTCGTTGGCCGCG [CGG] [gRNA]	80.00 %	87.07 °C	-	BssHII	1 [detail]	1 [detail]	468 [detail]
1394 - 1416	- [CCC]TTCGTTGGCCGCGGACCAATC [gRNA]	65.00 %	78.90 °C	-	BssHII	1 [detail]	1 [detail]	699 [detail]
1475 - 1497	- [CCC]ACTTATCTGGCGGTTCTATG [gRNA]	45.00 %	70.14 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	3849 [detail]
1802 - 1824	+ GTAATAGTACACCCCGATT [AGG] [gRNA]	40.00 %	67.97 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	216 [detail]
1853 - 1875	- [CCA]AATATTTAAGCGTTTCTATA [gRNA]	25.00 %	59.02 °C	-	MluI SspI	1 [detail]	1 [detail]	8705 [detail]
2422 - 2444	- [CCC]TGTAGCGACACACAGAGAAA [gRNA]	40.00 %	67.21 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	327 [detail]
2451 - 2473	+ TACCTAATTGTAAACGACGCT [GGG] [gRNA]	40.00 %	68.30 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	195 [detail]
2499 - 2521	- [CCT]GCOCGATTGAAATCTTTACGT [gRNA]	40.00 %	66.28 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	544 [detail]
2634 - 2656	+ GCGGCTCCTCGGTTGGCC [GGG] [gRNA]	80.00 %	86.64 °C	-	NaeI NgoMIV	1 [detail]	1 [detail]	422 [detail]
2641 - 2663	- [CCT]CGGTTTCGGCCGGCCCTTCTC [gRNA]	75.00 %	84.09 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	217 [detail]
2683 - 2705	+ CTGGACCCCGCGCGCTTCC [AGG] [gRNA]	80.00 %	86.81 °C	-	BssHII	1 [detail]	1 [detail]	1168 [detail]
2727 - 2749	- [CCT]TCGTGACTACCAACCGTGCCT [gRNA]	60.00 %	78.42 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	902 [detail]
2779 - 2801	+ CCCATCCTGAGAAACGCTGCG [TGG] [gRNA]	65.00 %	78.30 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	254 [detail]
2784 - 2806	- [CCT]GAGAACGCTGCGTGGGAGGG [gRNA]	70.00 %	81.14 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	860 [detail]
2836 - 2858	- [CCG]CGCCTCGCGTGGGATGCCA [gRNA]	75.00 %	84.79 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1084 [detail]
3246 - 3268	+ CTCGCTGTACGTTGAGAA [AGG] [gRNA]	55.00 %	71.98 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	7200 [detail]
3434 - 3456	- [CCC]AGCTTCCCGCCGCCATCCA [gRNA]	70.00 %	84.76 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	8522 [detail]
3477 - 3499	+ AGCCAAATATTCGTTGACATG [GGG] [gRNA]	45.00 %	70.69 °C	-	SspI	1 [detail]	1 [detail]	3370 [detail]
3525 - 3547	+ TTTACCCACTTCCTTCGAAC [AGG] [gRNA]	45.00 %	69.55 °C	-	BstBI	1 [detail]	1 [detail]	387 [detail]
3624 - 3646	+ CCCGCCCTCCCGCGCGGTT [CGG] [gRNA]	85.00 %	91.16 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	105 [detail]
3626 - 3648	+ CGCCCTCCCGCGCGGTTCC [GGG] [gRNA]	85.00 %	88.62 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	219 [detail]
3631 - 3653	- [CCC]CCGCGCGGTTCCGGCCACAG [gRNA]	80.00 %	86.34 °C	-	Bme1580I	1 [detail]	1 [detail]	543 [detail]
3632 - 3654	- [CCC]CGCGCGGTTCCGGCCACAG [gRNA]	80.00 %	86.42 °C	-	Bme1580I	1 [detail]	1 [detail]	181 [detail]
3633 - 3655	- [CCC]CGCGCGGTTCCGGCCACAG [gRNA]	80.00 %	86.42 °C	-	Bme1580I	1 [detail]	1 [detail]	149 [detail]
3634 - 3656	- [CCC]CGCGGTTCCGGCCACAG [gRNA]	80.00 %	86.42 °C	-	Bme1580I	1 [detail]	1 [detail]	209 [detail]
3737 - 3759	+ AGGAGCCGCGCCTCGCTGAT [TGG] [gRNA]	70.00 %	84.13 °C	-	HaeII NaeI NgoMIV	1 [detail]	1 [detail]	499 [detail]

Tabla 3. Reporte de los 20mer para Sox2 por CRISPRdirect. De acuerdo con NCBI la localización del gen *Sox2*, de 34649995 pb a 34652461 en el cromosoma 3 del ratón. En la tabla el reporte de -3800 a +1 del sitio de inicio de la transcripción: posición de 34646195 pb a 34649995 pb en el cromosoma 3. Marcado en el recuadro rojo la mejor secuencia putativa elegida, designado como Sox2(1).

Posteriormente se amplificó la secuencia promotora U6 usando como templado el plásmido pGL3 (Adggen: 51133) el oligo FWU6(pGL3) 5' ATCCGCTCGAGGGCCTATTTCCCATGATTC 3' con el sitio de restricción XhoI y el oligo RVU6 5' GGTGTTTCGTCCTTTCCACAAG 3', usando el mismo templado se amplificó la secuencia andamio (TER) con el oligo FW-TER 5' GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG 3' y el oligo RVTER-pGL3(XbaI) 5' TTCAATC

TAGAAAAAAGCACCGACTC 3' con el sitio de restricción XbaI. Los parámetros para la PCR se indican en la **Tabla 4**.

	U6	Andamio	Parámetros del termociclador	
DNA plamídico pGL3 (4.29 ng/uL)	0.74 uL	0.74 uL	95°C	3 min
Mix oligos FW y RV para U6 o Scaffold (5 pM/uL)	0.6 uL	0.6 uL	95°C	30 seg
dNTP's	0.3 uL	0.3 uL	55°C	30 seg
Pfu polymerase	0.25 uL	0.25 uL	72°C	20 seg para U6 y 25 seg para secuencia andamio
Solución amortiguadora +MgSO4	1.5 uL	1.5 uL	Repetir	35 ciclos para U6 y 39 ciclos para secuencia andamio
H ₂ O	11.46 uL	11.46 uL	72°C	5 min

Tabla 4. Parámetros de PCR para amplificar la secuencia U6 y la secuencia andamio.

Después se realizó una PCR usando como plantados a la secuencia amplificada de U6 y andamio (TER); un oligo de 59 pb (secuencia base, ver **Tabla 5**) cuyos primeros 19 pb son compatibles con los últimos 19 pb de la secuencia U6 dirección 5'→3' y sus últimos 19 pb son compatibles con los primeros 19 pb de la secuencia andamio dirección 5'→3'; los oligos FWU6(pGL3) o FWU6-pGL3(XbaI) 5' ATCCGTCTAGAGGGCCTATTTCCCATGATTC 3' con el sitio de restricción XbaI (NEB #R0145S), estos se utilizaron para la PCR del oligo pOct4(5)EhD y pSox2(1); y el oligo RVTER-pGL3(XbaI) o RVTER-pGL3(KpnI) 5' AATAGGTACCAAAAAAAGCACCGACTC 3' con el sitio de restricción KpnI (Fermentas #ER0521) para la PCR del oligo pOct4(6)P (**Figura 20 B**). Los parámetros para la PCR se indican en la **Tabla 6**.

Secuencia base

5' GTG GAA AGG ACG AAA CAC CGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTT TTA GAG CTA GAA ATA G 3'

pOct(3.1)	5' GTGGAAAGGACGAAACACCGGGGAGGAAGTGGGTGTGGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAG 3'
pOct4(5)EhD	5' GTGGAAAGGACGAAACACCGTTATACTCTAGGCACGCTTAGTTTTAGAGCTAGAAATAG 3'
pOct4(6)P	5' GTGGAAAGGACGAAACACCGCGATGGGGCATCCGAGCAACGTTTTAGAGCTAGAAATAG 3'
pSox2(1)	5' GTGGAAAGGACGAAACACCGTTCAGATATAATACTCGTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAG 3'

Tabla 5. Secuencia base para la construcción de gRNAs. Los 20 nt que son el 20mer están seguidos de la G marcada en gris.

	Volumen	Parámetros del termociclador	
U6 templado	1.2 uL	95°C	3 min
Secuencia andamio templado	1.1 uL		
Oligo 59 nt (1M)	0.4 uL	95°C	30 seg
Mis oligos FW y RV	0.6 uL		
dNTP's	0.3 uL	56°C	30 seg
Pfu polymerase	0.3 uL	72°C	40 seg
Solución amortiguadora + MgSO4	3 uL	Repetir	35 ciclos
H ₂ O	22.8 uL	72°C	5 min

Tabla 6. Parámetros de PCR para amplificar gRNAs.

1. Se digirieron y purificaron los productos de PCR con las enzimas que reconocen los sitios de corte agregados, los fragmentos resultantes: XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI, XbaI-pOct4(6)P-KpnI, XbaI-pOct4(3.1)-KpnI y XhoI-pSox2(1)-XbaI.
2. Se digirió el plásmido pKS+U6TER(2)-CBh con la enzima NcoI (NEB #R0193S) y KpnI y purificó el fragmento de 287 pb que pertenece al *enhancer* CAG. De la misma manera se digirió con XhoI y NcoI y purificó el fragmento de 3433 pb.
3. Se realizó la ligación del fragmento de CAG, 3433 pb, el XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI y el XbaI-pOct4(6)P-KpnI para obtener el plásmido pKS+-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh.
4. Se realizó la ligación del fragmento de CAG, 3433 pb, el XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI y el XbaI-pOct4(3.1)-KpnI para obtener el plásmido pKS+-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh.
5. Se digirieron los plásmidos pKS+-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh y pKS+-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh con las enzimas XhoI (NEB #R0146S) y BamHI (NEB #RO136S) y se purificaron los fragmentos XhoI-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-BamHI y XhoI-pOct4(5)EhD-pOct4(3.1)-CBh-BamHI.
6. Se digirió el vector PB-CAG-Luc2mCherry con las enzimas XhoI-BamHI y purificó el fragmento de 7404 pb (pPB-XhoI-...-BamHI-mLuc2Cherry).
7. Se realizó la ligación del fragmento XhoI-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-BamHI en el vector pPB-CAG-Luc2mCherry previamente digerido para obtener el vector pPB-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-Luc2mCherry (**Figura 20 C; Anexo 12.1.3**).
8. Se realizó la ligación del fragmento XhoI-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh-BamHI en el vector pPB-CAG-Luc2mCherry previamente digerido para obtener el vector pPB-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh-Luc2mCherry (**Anexo 12.1.4**).

9. Se digirió el plásmido pPB-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-Luc2mCherry con las enzimas XhoI y BamHI para sustituir el fragmento XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI por XhoI-pSox2(1)-XbaI y obtener el vector pPB-pSox2(1)-(6)P-CBh-Luc2mCherry (**Anexo 12.1.5**).
10. Se corroboró por secuenciación de los plásmidos mencionados la inserción correcta de los 20mer, se utilizaron el oligo RV-UNIGRNAs 5'CAAGTGGGCAGTTTACCGTA3' y el oligo FW-UNIGRNAs 5'TCGGTATTCACGACAGCAGG3'.

Construcción del plásmido pPBnv-dCasVPR. Para tener un sistema de alta expresión de los genes endógenos y que fuera regulable, introdujimos la secuencia codificante para la dCas9-VPR a un vector con el sistema booster, dando lugar al vector inducible TRE-dCas9-VPR-PGK-VENUS-IRES-rtTA (**Anexo 12.1.6**). Los resultados de la secuenciación de este plásmido no muestran mutaciones. Los oligos que se utilizaron para la secuenciación son el oligo FWtrebwen 5'AACGTATGTCGAGGTAGGCGTG 3' y el oligo RVpgkbwen 5'CCACTTGTGTAGCGCCAAGT 3'. Con este vector la cantidad de la proteína dCas9-VPR sería dependiente del tiempo y dosis de exposición a dox.

A. BUSQUEDA DE SECUENCIAS BLANCO

Screening en <https://crispr.dbcsls.io/>
 Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. (2015)



Gen *Oct4* 35506032-35510777 pb

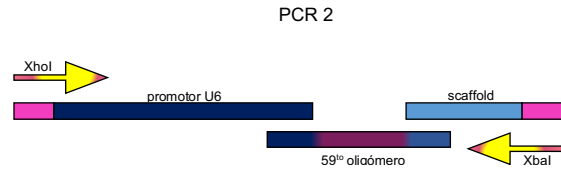
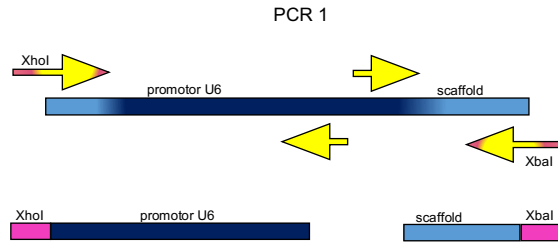
+1 a -3100 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción: 35503032-35506032

position	target sequence	sequence information	number of target sites
start - end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer Tin of 20mer TTTT in 20mer restriction sites	20mer +PAM 12mer +PAM 8mer +PAM
2727 - 2749	+ AACAGACTTTGTGTGGGAT [gRNA]	50.00 % 74.24 °C	1 [detail]
2743 - 2765	+ CCAATGGGCAATCCAGGAA [gRNA]	65.00 % 78.66 °C	1 [detail]

-2100 a -3100 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción: ED: 35502932-35504932 pb

position	target sequence	sequence information	number of target sites
start - end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer Tin of 20mer TTTT in 20mer restriction sites	20mer +PAM 12mer +PAM 8mer +PAM
19 - 41	+ TAGGTGTGGCAATCCAGGAT [gRNA]	55.00 % 75.39 °C	1 [detail]
821 - 843	+ TTATACTTAGGCACGCTTA [gRNA]	40.00 % 69.34 °C	1 [detail]

B. AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA U6 Y ANDAMIO



XhoI o XbaI

5' ATCCGCTGGAGGGCCCTATTTCCCATGATC 3'

5' ATCCGCTGGAGGGCCCTATTTCCCATGATC
 ACAGGCCGTTAGGAGGAAATTTGGAAATTAATTTGACTGTAAACACAAGA
 TATTAGTACAAAATACGTGACGTGAAAAGTAATAATTTGGGTAGTTTTGC
 AGTTTTAAAAATATGTTTTAAAAAGGACTATCAATGCTTACCCTAACCTTGAA
 AGTATTTGATTTCTGGCTTATATATCTGTGGAAAGGACCAACACC

5' CTGAAAGGACCAACACC

CTTTTAGAGCTAGAATAG 3'

GTTTTAGAGCTAGAATAGCAAGTTAAATTAAGCTAGTCGGTTATCA
 ACTTGAANAATGGACCGAATCGTCTTTTTTCTAGATGAAA 3'

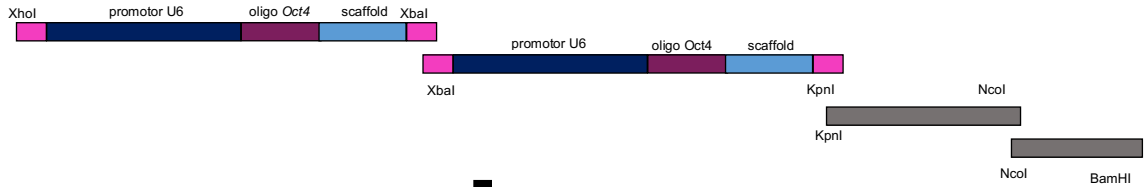
GAGTCGTCGTTTTTCTAGATGAAA

XbaI o KpnI

C.

DIGESTIÓN Y ENSAMBLE

LIGACIÓN EN EL PLÁSMIDO pKS+XhoI-...-NcoI-chA-Actina DE LA SECUENCIA XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI, XbaI-pOct4(6)P-KpnI Y LA SECUENCIA ENHANCER KpnI-CAG-BamHI



LIGACIÓN EN EL PLÁSMIDO pPB-XhoI-...-BamHI-mLuc2Cherry

CASSETTE DE EXPRESIÓN



Figura 20. Método para la construcción de los vectores con gRNAs. A) Búsqueda de secuencias blanco. Se realiza un reporte de las posibles secuencias blanco, en el sitio <https://crispr.dbcls.jp/>, para la secuencia reguladora del gen *Oct4* de -3100 a +1 pb del sitio de inicio de la transcripción. **B) Amplificación de la secuencia U6 y andamio:** Se realiza una amplificación mediante PCR del promotor U6 y la secuencia *Scaffold* o andamio de la unidad transcripcional del gRNA a partir del plásmido pGL3, añadiéndose al extremo 5' del U6 el sitio de restricción XhoI y al 3' del andamio el sitio XbaI. Con los mismos oligos y un oligo de 59 nt, cuyos primeros 19 pb son compatibles con los últimos 19 pb de la secuencia U6 dirección 5'→3' y sus últimos 19 pb son compatibles con los primeros 19 pb de la secuencia andamio dirección 5'→3', se realiza una PCR que permite la unión de ambos mediante la inserción de los 20 nt más una G (en total 21). *El sitio de restricción del extremo 3' de la secuencia andamio puede ser XbaI o KpnI, tal que se desee la clonación de uno o dos gRNAs, este sitio depende del oligo reverso.* **C) Digestión y ensamble:** Las unidades transcripcionales del gRNA y el promotor CBh del plásmido pX333 son clonados en el plásmido pKS+ resultando el vector pKS+U6TER(2)-CBh. Este plásmido es digerido con KpnI y NcoI, el fragmento de 287 pb que pertenece al CBh y el fragmento de 3433 pb (pKS+-XhoI-...-NcoI-chA-Actina) es ligado con los fragmentos XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI y XbaI-pOct4(6)P-KpnI o XhoI-pOct4(5)EhD-XbaI y XbaI-pOct4(3.1)-KpnI o XhoI-pSox2(1)-XbaI y XbaI-pOct4(6)P-KpnI, resultando en los plásmidos pPB-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-Luc2mCherry, pPB-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh-Luc2mCherry y pPB-pSox2(1)-(6)P-CBh-Luc2mCherry, respectivamente.

7.5 Activación de los genes *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* mediante el sistema CRISPR-dCas9

Para investigar si la activación de los genes endógenos *Oct4* y *Sox2* con el sistema CRISPR-dCas9 y el uso de la proteína dCas9-VPR es viable para inducir reprogramación celular. Primero se construyeron los plásmidos previamente descritos: el pPBnv-dCas9VPR dentro de un sistema booster dependiente de dox (dCasVPR-booster) y los que contienen los gRNAs con blanco en las regiones reguladoras de *Oct4* o *Sox2*. Estos últimos son el plásmido pPB-pOct4(5)EhD-(2)3.1-CBh-Luc2mCherry que tiene dos gRNAs con blanco en el *enhancer* distan del gen *Oct4*, uno diseñado mediante el programa CRISPRdirect ((5)EhD) y otro cuyo diseño fue tomado del trabajo de Gao X. (2014) ((2)3.1); el plásmido pPB-pOct4(5)EhD-(6)P-CBh-Luc2mCherry que también tiene el gRNA (5)EhD y un gRNA con blanco en el promotor proximal ((6)P); y finalmente el plásmido pPB-pSox2(1)-(6)P-CBh-Luc2mCherry que tiene un gRNA con blanco en el promotor proximal del gen *Sox2* (1) y el gRNA (6)P.

Se hicieron varias transfecciones de MEFs, cada una con la dCas9-VPR-booster y el plásmido con la correspondiente combinación de gRNAs y la transposasa, como se describe en la **Tabla 7**. Para todas las transfecciones se utilizó una concentración total de DNA plasmídico de 4 ug: 3200 ng fueron del plásmido que contiene el transposon y 800 ng del plásmido de la transposasa, estuvieron en relación transposon: transposasa 5:1.

Concentración del plásmido	Nombre del plásmido	Volumen para 3200 ng de transposón	Volumen para 800 ng de transposasa
1 603 ng/uL	A pPBnv-CasVPR pOct4EhD(5)-(6)P-CBh-Luc2mCherry	1.8 uL	1.11 uL
1 505 ng/uL		0.86 uL	
1 603 ng/uL	B pSox2(1)-pOct4EhD(5)-CBh-Luc2mCherry	1.8 uL	1.11 uL
1 395 ng/uL		0.93 uL	
1 603 ng/uL	C pPBnv-CasVPR pOct4EhD(5)-pOct4(3.1)-CBh-Luc2mCherry	1.8 uL	1.11 uL
2 770 ng/uL		0.47 uL	

Tabla 7. Concentración de transposones y transposasa para la reprogramación celular con el sistema CRISPR-dCas9.

De cada transfección de MEFs se indujo la expresión de la dCas9-VPR con 1.5 ug/mL y 150 ng/mL de dox durante cuatro días. Posteriormente las células fueron procesadas como se

describe en métodos en **Análisis de activación de genes** para obtenerse el RNA y posteriormente mediante RT-PCR el cDNA de cada población de MEFs transfectados, para poder hacer un PCR de las secuencias marcadoras de los genes *Oct4* y *Sox2*. Esto nos permitió determinar si fue suficiente utilizar el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9VPR y la exposición con dox por 4 días de los MEFs transfectados para inducir la activación de los genes *Oct4* y *Sox2*, y también para determinar que gRNAs de los diseñados es capaz de lograrlo. Como control del nivel de expresión del gen *Oct4* y *Sox2* también obtuvimos el cDNA de mESC, ya que estas células al ser las más pluripotentes expresan altos niveles de estos genes. Después del método mencionado obtuvimos una fotografía de un gel de agarosa en la que se observan los productos de PCR de la amplificación de las secuencias marcadoras de los genes *Oct4* y *Sox2* del cDNA obtenido de las transfecciones A, B y C. El único cDNA del cual se amplificó la secuencia marcadora de la expresión de *Oct4* fue del derivado de los MEFs que tienen los gRNAs (5)EhD y (6)P para la dosis de inducción de 1.5 ug/mL de dox, se observa que el nivel de amplificación es similar al de las mESC (**Figura 21**). Este resultado sugiere que los otros vectores con otras combinaciones de gRNAs son incapaces de inducir la expresión del gen *Oct4* y que cualitativamente el nivel de expresión es similar al de las mESC. Es posible que una baja dosis de dox no logre inducir un nivel de expresión de dCas9-VPR suficiente para que se observe el producto de amplificación de la secuencia marcadora de *Oct4* con la dosis de inducción de 150 ng/mL de dox.

En cuanto a la secuencia marcador del gen *Sox2*, ninguna se amplificó de los cDNA obtenidos de las transfecciones A, B y C. Esto sugiere que el vector que contiene los gRNAs para (5)EhD y (6)P, que indujo la expresión de *Oct4*, es incapaz de inducir la expresión de *Sox2* y que el vector que contiene los gRNAs (5)EhD y Oct4(3.1) también es incapaz. El único vector con un gRNA con blanco para el promotor proximal *Sox2* no mostró amplificación de la secuencia marcadora por lo cual se sugiere que también fue incapaz de inducir la expresión del gen (**Figura 22**).

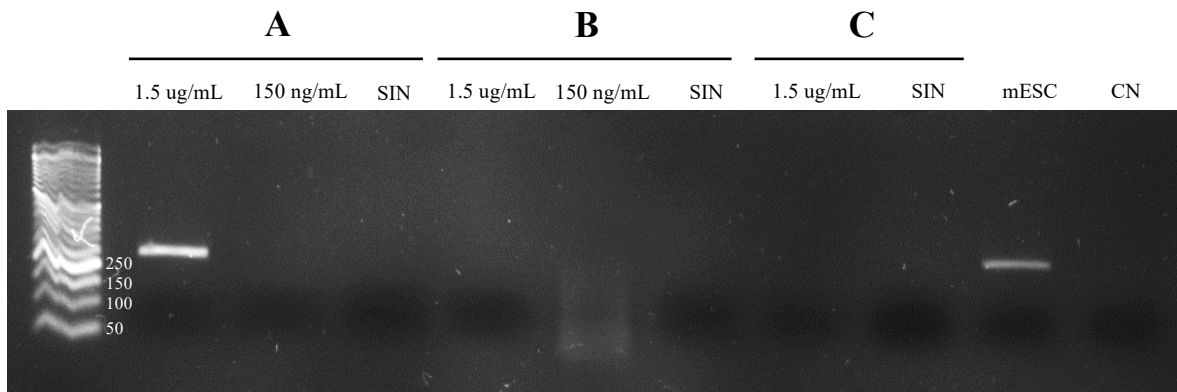


Figura 21. Detección del gen *Oct4* endógeno por PCR punto final. Se observa una fotografía de un gel de agarosa con los productos de PCR para la detección de la secuencia marcadora del gen *Oct4*, del cDNA obtenido de los MEFs transfectados con los vectores A, B y C con inducción con 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de dox o una nula inducción (SIN). En el primer carril se observa el patrón de bandas de DNA del marcador de peso molecular NYZ III (nzytech #MB044). Solo en uno de los siguientes tres carriles (A), para la dosis de 1.5 ug/ml de dox, se observa un producto de PCR que amplificó la secuencia marcadora del gen *Oct4*, corresponde a la combinación de gRNAs EhD(5) y (6)P. CN fue nuestro control negativo de amplificación y cDNA de células mESC nuestro control positivo.

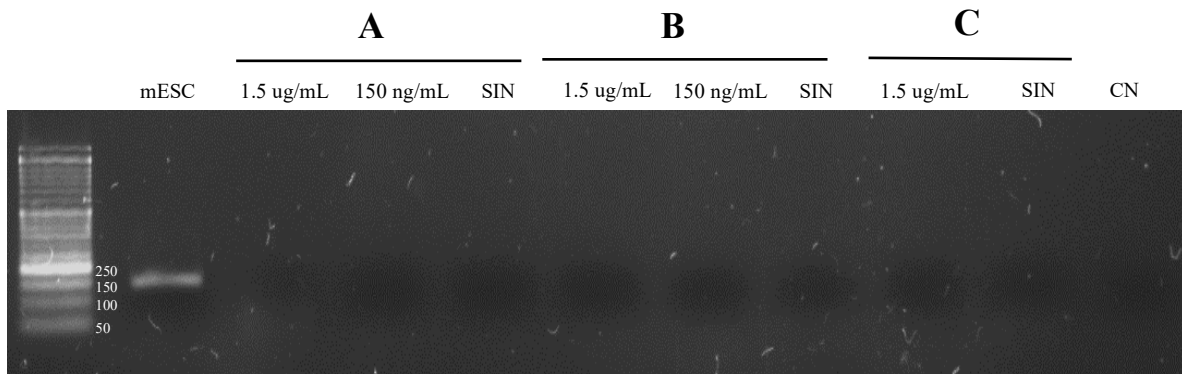


Figura 22. Detección de *Sox2* endógeno por PCR punto final. Se observa una fotografía de un gel de agarosa con los productos de PCR para la detección de la secuencia marcadora del gen *Sox2*, del cDNA obtenido de los MEFs transfectados con los vectores A, B y C con inducción con 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de dox o una nula inducción (SIN). En el primer carril se observa el patrón de bandas de DNA del marcador de peso molecular NYZ III (nzytech #MB044) y en el segundo carril la amplificación de la secuencia marcadora para *Sox2* detectada en mESC. En el resto de los carriles no se observa amplificación en los productos de PCR. CN fue nuestro control negativo de amplificación.

VIII. Discusión

Uno de los primeros pasos en la reprogramación celular de células somáticas a células pluripotentes es la desdiferenciación. Esta comienza experimentalmente con la introducción de factores transcripcionales o moléculas químicas, agentes desestabilizantes de la identidad celular. Los cambios físicos y moleculares que experimentan las células hasta ser una célula troncal pluripotente inducida (iPSC) dependen de la combinación de los agentes desestabilizantes. Los factores transcripcionales mínimos para inducir desdiferenciación son OCT4 y SOX2 y se han introducido o activado los genes que los codifican (i.e. *Oct4* y *Sox2*) en células somáticas, siempre en coordinación con otras moléculas porque pese a que pueden activar a otros factores transcripcionales de pluripotencia, no son suficientes para inducir reprogramación hacia iPSC. Existen barreras epigenéticas que hasta ahora empiezan a conocerse que pueden estar asociadas a los niveles de expresión de genes reprogramadores, la estabilidad del ciclo celular y la presencia de características senescentes. En este trabajo se indujo la expresión del gen *Oct4* y *Sox2* en fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) en coordinación con los oncogenes E6 y E7 para inducir reprogramación hacia pluripotencia. Por un lado, la expresión de los genes desestabiliza el fenotipo celular del estado somático de los MEFs y por otro, la expresión de los oncogenes favorece la progresión del ciclo celular y alivia la barrera de las características senescentes provocada por los factores reprogramantes.

8.1 Los oncogenes E6 y E7 aceleran la aparición del fenotipo tipo iPSC de MEFs transfectados con *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, y *Sox2* e incrementan la eficiencia de reprogramación

Para investigar el efecto que tienen los oncogenes E6 y E7 junto con la expresión de *Oct4* y *Sox2* en MEFs, primero decidimos investigar el efecto solo de los oncogenes E6 y E7. Así que se transfectó el vector pPB-E6/E7-booster inducible por dox en MEFs (MEFs-E6/E7) y se indujo la expresión de E6 y E7 con 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 150 ng/mL dox. Se decidió utilizar estas concentraciones porque en reportes previos del laboratorio se obtuvieron resultados similares de inducción con el vector pPB-MKOS-booster en MEFs con ambas dosis, aunque el rango de la concentración es muy amplio. Recordemos que el pPB-MKOS-booster contiene la secuencia codificante en policistron de los genes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* que codifican

respectivamente para los factores transcripcionales reprogramantes MYC, KLF4, OCT4 y SOX2 (MKOS).

Los oncogenes E6 y E7 en MEFs pueden provocar como se observó en la **Figura 12** con las dos dosis de dox, que haya más células VENUS positivas, lo cual sugiere cualitativamente mayor proliferación celular. Esta característica puede deberse a que los oncogenes impiden la salida del ciclo celular a consecuencia de la degradación de la proteína p53 mediada por E6 y disociación del complejo formado por la proteína de retinoblastoma (pRB) y el factor transcripcional E2F (pRB/E2F) mediado por E7. Recordemos que el factor transcripcional E2F es necesario para la transcripción de proteínas que permiten la progresión del ciclo celular. Si los MEFs sin ningún tratamiento se mantuvieran en fase continuo llegaría el momento en que experimentarían el límite de su capacidad para dividirse y eventualmente senescerían. El límite de replicación está relacionado a las rondas de replicación del DNA y no al tiempo de los pases (Shay & Wright, 2000). Esto concuerda que MEFs-E6/E7 que no fueron inducidos con dox y por tanto no expresaron E6 y E7, mostraron características de células senescentes conforme el tiempo en cultivo y se observaron menos células VENUS positivas. En otros tipos celulares, por ejemplo, en queratinocitos se ha identificado que a consecuencia de la expresión de los oncogenes E6 y E7 estos adquieren la capacidad de dividirse indefinidamente sin perder sus características, es decir se immortalizan (Liu *et al.*, 2008; Nelson *et al.*, 1989).

Existen algunos estudios aislados que relacionan la ganancia de esta capacidad proliferativa por los oncogenes E6 y E7 con la reactivación del gen para la telomerasa, proteína que impide el acortamiento de los telómeros y por consecuencia una completa replicación del DNA durante la proliferación (Liu *et al.*, 2008). Podemos suponer que los MEFs que expresan a los oncogenes E6 y E7 en nuestro experimento se immortalizan, pues su proliferación fue constante hasta el día 29, día en que se concluyó el monitoreo, manteniendo una morfología aún fibroblastoide típica (**Figura 12**). Mientras, los MEFs que no se indujeron con dox experimentaron cambios morfológicos evidentes: estos pasaron de una forma fibroblastoide a células grandes aplanadas con un citoplasma que se distribuye con muchas prolongaciones tipo fibras, y además su proliferación aparentemente fue disminuyendo. Se observaron menos células VENUS positivas conforme paso el tiempo en cultivo en comparación con los MEFs-E6/E7 expuestos a dox.

Los MEFs que fueron transfectados con el pPB-MKOS-booster y el pPB-E6/E7-booster (MEFs-MKOS-E6/E7) e inducidos con 150 ng/mL o 1.5 ug/mL de dox comenzaron a desdiferenciarse aceleradamente en comparación con los MEFs que fueron transfectados solo con el pPB-MKOS-booster (MEFs-MKOS), aunque ambos iniciaron su proceso casi al mismo tiempo. Una característica consecuencia de la expresión de los oncogenes E6 y E7 mencionada anteriormente, es la proliferación, la cual pudo influir en la manifestación de esta característica. Otra, en la que recientemente se ha centrado la atención en experimentos de reprogramación, es la inhibición de la senescencia. Banito y colaboradores (2009) identificaron que la reprogramación con MKOS o cada uno de los factores por separado estimula la respuesta al estrés, la respuesta empata con características moleculares de células senescentes; hay una expresión aumentada de p53, p16^{INK4a} y p21^{CIP1}, factores asociados a la senescencia.

En experimentos *in vivo* en el tejido de estómago y páncreas de un ratón transgénico para MKOS se ha identificado que la reprogramación provoca dos resultados, reprogramación en una fracción de la población celular y senescencia en otra. La coexistencia de las células senescentes en el tejido favorece por secreción de factores como la interleucina 6 (IL-6), la reprogramación de la otra fracción celular (Mosteiro *et al.*, 2016). Mientras, en iPSC en cultivo derivadas del ratón MKOS en comparación con el ratón MKOS nulo para p53 ocurre lo contrario, hay mayor eficiencia de reprogramación (Mosteiro *et al.*, 2016). En breve, lo anterior indica que en condiciones *in vitro* es necesario que células en reprogramación disminuyan la presencia de características senescentes para reprogramarse, mientras, *in vivo* es necesaria la fracción de células senescentes para que las células que no tienen características senescentes reprogramen.

En estudios recientes sobre la función de las moléculas químicas usadas para inducir reprogramación se identificó que estas mantienen interacción con moléculas presentes en la senescencia. Por ejemplo, Zhai y colaboradores (2015) identificaron que otra de las funciones del ácido valproico (VPA), además de ser un inhibidor de histona deacetilasas, en conjunto con MKOS en la reprogramación de MEFs es atenuar la activación de vías de senescencia mediante la supresión de p16^{INK4a} y p21^{CIP1}, y disminuir el número de células en arresto en fase G2/M. Este efecto también se identificó en otros tipos celulares, como células derivadas de la médula ósea de humano (Chen *et al.*, 2015).

Las colonias que se obtuvieron de los MEFs-MKOS y MEFs-MKOS-E6/E7 fueron teñidas para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina y poder determinar en términos preliminares si han ganado pluripotencia. Como se mencionó, una fuerte actividad de la enzima fosfatasa alcalina es indicador de pluripotencia ya que las mESC son las únicas células que tiñen fuertemente. Se observó en la **Figura 10** que la población de colonias obtenida de estos MEFs fue heterogénea, es decir hubo colonias muy pequeñas, pequeñas, medianas y grandes; esto pudo deberse a niveles de expresión diferencial de los genes reprogramadores y/o atenuación diferencial de genes somáticos o de factores promotores de la senescencia.

Del conteo de colonias (**Figura 11 A**) se encontró que hay mayor número de colonias muy pequeñas y pequeñas que grandes en MEFs-MKOS en el día 10 que en MEFs-MKOS-E6/E7. Aunque una mejor comparación sería el día 15 en MEFs-MKOS con el día 10 de MEFs-MKOS-E6/E7 porque el radio de las colonias MEFs-MKOS tienen un crecimiento más lento, probablemente la proporción de células muy pequeñas y pequeñas de MEFs-MKOS disminuiría en el día 15 por el aumento del radio del cúmulo en este día. Los MEFs-MKOS-E6/E7 tuvieron una población notoriamente heterogénea con ambas dosis de dox. También es probable que las colonias muy pequeñas y pequeñas molecularmente no estén sincronizadas con los cambios que han sufrido las colonias medianas y grandes. No sabemos los niveles de expresión de efectores senescentes en las colonias pequeñas y medianas, pero podrían ser evaluados en futuros experimentos, incluso identificar los niveles de expresión de genes reprogramadores y genes somáticos.

El conteo de células fue antes y después de la tinción para detectar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina. Los conteos discreparon cerca de un 20% a excepción de los MEFs-MKOS-E6/E7 para 1.5 ug/mL de dox que discrepa 50%. Teóricamente el conteo tendría que concordar, sin embargo, el conteo antes de la tinción incluye cúmulos que inician su formación como colonias, los cuales pueden derivar de células con un retraso en la reprogramación. Los resultados del conteo de colonias AP⁺ derivan del promedio de un duplicado de un experimento de cinco que se hicieron. No todas las condiciones en las que se realizaron los experimentos fueron los óptimos a excepción del último por criterios de estandarización del protocolo.

A diferencia de las eficiencias de transfección obtenidas en la Tesis de maestría por Ángel Martínez (2016) que rodeaban el 20% para MEFs-MKOS, en este trabajo se obtuvo un 7%. Mientras que para el MEFs-MKOS-E6/E7, 17.24%; para el MEFs-OCT4, 20.23%; para MEFs-OCT4/SOX2, 14.89%; para MEFs-OCT4-E6/E7, 25.21%; y para MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7, 19.50%. La eficiencia de transfección para MEFs-MKOS fue 13% más bajo que las obtenidas en experimentos anteriores en nuestro laboratorio, sin embargo, las eficiencias de reprogramación con relación a 2800 MEFs VENUS positivas sembradas en un área de 3.8 cm², para MEFs-MKOS con 150 ng/mL es de 0.016 y con 1.5 ug/mL 0.022, y para MEFs-MKOS-E6/E7 es de 0.039 y 0.029, respectivamente. Esta eficiencia incluye a todos los tamaños de colonias. Siendo 1 el 100% de eficiencia. Las eficiencias son superiores a las obtenidas de los estudios mencionados. Notese que la eficiencia es mayor en MEFs-MKOS-E6/E7.

8.2 Los oncogenes E6 y E7 coordinados con la expresión de *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* provocan la formación de cúmulos fibroblastoides

En nuestros experimentos, los oncogenes E6 y E7 con los transgenes *Oct4* y *Sox2* en MEFs se esperaba que facilitaran la reprogramación hacia células pluripotentes, sin embargo, no se observó un cambio evidente en el fenotipo. Solo ante fluorescencia se observaron cúmulos compactos de células VENUS positivas con forma fibroblastoide que tras dos pases volvieron a formarse. Una prueba que se hizo para determinar si los cúmulos formados expresaban algún marcador de pluripotencia es la inmunocitoquímica para la detección SSEA-1, sin embargo, los resultados fueron negativos. Los MEFs control, sin los oncogenes, MEFs-OCT4 y MEFs-OCT4-SOX2 proliferaron al parecer hasta su límite replicativo porque adquirieron un fenotipo senescente y tras los pases dejaron de observarse células VENUS positivas. Esto sugiere que los oncogenes E6 y E7 están coordinando sus efectos con los factores OCT4 y SOX2 en MEFs para formar los cúmulos fibroblastoides.

Los niveles de expresión de los MEFs transfectados con el pPB-mOCT4 y pPB-mOCT4/SOX2 se esperaba que fueran altos para las dosis de 150 ng/mL y 1.5 ug/mL de dox por los estudios reportados en el laboratorio sobre el sistema booster y por el nivel de integración en la célula, que es mayor por ser plásmidos pequeños. Los niveles de expresión habían marcado una diferencia en la capacidad de reprogramación, por ejemplo, en el

experimento de Balboa y colaboradores (2016), es por ello por lo que resulta importante destacarlo. Sin embargo, para ese trabajo es de recordar que OCT4 indujo reprogramación con los otros tres factores reprogramadores, es decir que solo no podía generar los cambios transcripcionales necesarios para desdiferenciar. Para este trabajo se esperaba que solo dos factores pudieran inducir por lo menos desestabilización manifiesta en el fenotipo. Ambos, porque son constantes en los protocolos de reprogramación y por su repercusión transcripcional como dímero sobre otras proteínas presentes en células pluripotentes.

Los resultados obtenidos concluyen que con este sistema no es suficiente alterar el fenotipo celular. Aunque eso no descarta que molecularmente las células obtenidas hayan ganado un grado de potencialidad celular (plasticidad) que les permita diferenciarse a otro tipo celular sin pasar por un estado totalmente desdiferenciado. Podría probarse dirigir la diferenciación a otros tipos celulares poniéndolas en condiciones adecuadas. Por ejemplo, Mitchet y colaboradores (2014) a partir de fibroblastos humanos de adulto con la sola expresión de *Oct4* inducen sin formar iPSC, plasticidad celular. Muestran que las células en este estado muestran niveles elevados de genes relacionados al desarrollo asociados con múltiples linajes, pero no con la pluripotencia. Logran desdiferenciar estas células en un medio adecuado en células progenitoras hematopoyéticas y células progenitoras neurales.

Experimentos futuros de desdiferenciación deben enfocarse en estudiar el perfil de expresión de genes y proteínas relacionadas a la pluripotencia en los MEFs-OCT4, MEFs-OCT4/SOX2, MEFs-OCT4-E6/E7 y MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7. De acuerdo con el estudio de Liu y colaboradores (2018), podemos suponer que los niveles de expresión de los transgenes *Oct4* y *Sox2* utilizando el sistema booster no fueron suficientes para inducir un fenotipo iPSC. En futuros experimentos es importante evaluar los niveles de expresión de los transgenes alcanzados con nuestro sistema booster.

Recientemente Schwarz y colaboradores (2018) caracterizaron con distintos anticuerpos poblaciones de células en reprogramación, reconociendo que hay heterogeneidad y asincronía en este proceso. Identifican que hay células parcialmente reprogramadas que no expresan el marcador SSEA-1, pero si otros que son indicadores de su potencial. Experimentos futuros deben considerar esta heterogeneidad en los MEFs-OCT4, MEFs-OCT4/SOX2, MEFs-OCT4-E6/E7 y MEFs-OCT4/SOX2-E6/E7 y caracterizarla.

Mientras se concluían los experimentos de este trabajo fue publicado un estudio en el que se activan en MEFs de manera independiente, los genes *Oct4* y *Sox2* y a consecuencia los MEFs se desdiferencian a iPSC (iPSC-*Oct4* e iPSC-*Sox2*) (Liu *et al* 2018). En ese estudio utilizaron el sistema dCas9-Sun-TagVP64 con dos gRNAs dirigidos para *Oct4*, uno con blanco en el *enhancer* distal a -2026 pb y otro con blanco en el promotor proximal a -127 pb, y un gRNA para *Sox2* dirigido a -84 pb. La reprogramación fue facilitada además por una mezcla de moléculas en el medio de cultivo como: parnate conocido también como tranilcipromina, Chir-9921, A83-01 un inhibidor del receptor TGF-beta y Forskolín que activa a la enzima adenilato ciclasa. Con la mezcla se obtiene una eficiencia de 0.112% y sin esta de 0.0028%. Al introducir el gRNA para *Oct4* en células derivadas del ratón quimérico de las iPSC a las cuales solo se indujo la expresión de *Sox2*, la eficiencia de reprogramación mejoro al doble. Concluyen que la reprogramación con la sola activación de estos genes se debe al alto nivel de expresión de los genes *Oct4* y *Sox2* logrado con este sistema, que es de hasta cien veces para *Oct4* y 15 veces para *Sox2*. El alto nivel de expresión está dado por la remodelación de la cromatina en las regiones reguladoras de los genes consecuencia del sistema utilizado (Liu *et al* 2018).

El sistema dCas9-VPR con los gRNAs diseñados para *Oct4* en esta tesis fueron los únicos que lograron inducir la activación del gen. Coincide la proximidad de los gRNAs diseñados en nuestros experimentos con los de Liu y colaboradores (2018), un gRNA en el ED y otro en el PP. Claramente el gRNA diseñado para *Sox2* no fue suficiente, su localización fue más alejada del sitio de inicio de la transcripción en comparación con el utilizado por el equipo de Liu (2018). El sistema dCas9-VPR sigue siendo una alternativa para inducir reprogramación ya que a diferencia del dCas9-Sun-TagVP64, no se introducen varios componentes a las células, pues en este último se introduce la dCas9, el VP64 y los gRNAs. Nosotros además de tener la dCas9-VPR en un solo vector esta bajo el control del sistema booster inducible por dox, lo cual permite controlar la inducción dosis dependiente de dox, esto nos permitirá en un futuro estudiar los cambios fenotípicos y moleculares en MEFs a distintos niveles de expresión del gen.

8.3 Desdiferenciación de MEFs con *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4*, y *Sox2*, y los oncogenes E6 y E7 en condiciones NO reprogramantes

En el experimento no considerado en los objetivos en el que se expone a MEFs-MKOS-E6/E7 en condiciones NO reprogramantes (sin células alimentadoras, sin LIF y medio enriquecido solo con 10% de suero fetal bovino) con 1.5 ug/mL de dox y luego en condiciones reprogramantes con 1.5 ug/mL de dox, se notó que tras 4 días después del primer pase, las células transitan al fenotipo iPSC rápidamente, comparable al día 15 con MEFs-MKOS-E6/E7 que siempre estuvieron en condiciones reprogramantes. Al día 15 después del pase se delimitan perfectamente las colonias, lo cual indica que, mediante este proceso, los MEFs se desdiferenciaron y ganaron pluripotencia. Es probable que en el periodo (de 10 días) en que las condiciones de cultivo no eran las óptimas (condiciones NO reprogramantes) los oncogenes E6 y E7 y los genes reprogramantes MKOS se estuvieron expresando haciendo susceptibles a los MEFs a transitar hacia iPSC en las condiciones reprogramantes (medio M15 más LIF y células alimentadoras), ya que la dox induce la expresión de los oncogenes y los MKOS. Las condiciones reprogramantes provocaron que tras el pase las células logaran desdiferenciarse completamente a iPSC por lo cual tiñeron fuertemente para el ensayo de la enzima fosfatasa alcalina. Varias preguntas surgieron ante estos hechos; ¿Cuál es el límite de tiempo en que las células pueden estar expresando los oncogenes y genes reprogramantes para seguir siendo susceptibles a una completa desdiferenciación?, ¿Es posible diferenciar a otros tipos celulares a los MEFs-MKOS-E6/E7 que han sido expuestos a condiciones no reprogramantes? y ¿Qué cambios moleculares ocurrieron durante las condiciones NO reprogramantes?

Con estos resultados se puede concluir que el transgen *Oct4* o los transgenes *Oct4* y *Sox2* en coordinación con los oncogenes E6 y E7 con el sistema booster inducen cambios fenotípicos mínimos en MEFs, los cambios moleculares que hayan ocurrido se reflejan en una tendencia de las células a formar cúmulos. Mientras, el sistema booster coordinado con el sistema dCas9-VPR, con los gRNAs diseñados en este caso solo para *Oct4*, puede funcionar como mecanismo viable para inducir distintos patrones fenotípicos y moleculares en células diferenciadas a distintas dosis de dox.

La contribución que se realiza con este trabajo al campo del estudio de las células troncales es la generación de un mecanismo capaz de generar cambios mínimos en células

diferenciadas que permitirá estudiar los cambios y limitaciones durante el proceso de reprogramación. Además de un sistema dCas9-VPR booster viable para la activación del gen *Oct4*.

IX. Conclusiones

- La expresión del transgen *Oct4* o de los transgenes *Oct4* y *Sox2* en coordinación con la expresión de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano, mediante un sistema booster inducible por doxiciclina, en fibroblastos embrionarios murinos es capaz de inducir la formación de cúmulos de células fibroblastoides.
- Los oncogenes E6 y E7 tienen cualitativamente el efecto de extender la capacidad replicativa de los fibroblastos embrionarios murinos.
- La expresión del transgen *Oct4* o de los transgenes *Oct4* y *Sox2* en fibroblastos embrionarios murinos no induce cambios evidentes en el fenotipo.
- Los fibroblastos embrionarios murinos con expresión de los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano se reprograman más eficientemente hacia iPSC, y más temprano que aquellos que solo expresan los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2*.
- Los fibroblastos embrionarios murinos con expresión de los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y de los oncogenes E6 y E7 del virus del papiloma humano son capaces de iniciar el proceso de reprogramación hacia células pluripotentes en condiciones de un medio no reprogramante, es decir, sin células alimentadoras y sin el factor inhibidor de leucemia.
- El sistema CRISPR-dCas9 con el uso de la proteína dCas9-VPR dentro de un sistema booster inducible por doxiciclina con la dosis de 1.5 ug/mL y dos gRNAs, uno con blanco en el *enhancer* distal y otro con blanco en el promotor proximal del gen *Oct4*, es capaz de inducir la expresión del gen edógeno *Oct4*.

X. Perspectivas

- Evaluar los niveles de expresión de los genes *Oct4* y *Sox* y sus respectivas proteínas OCT4 y SOX2, en fibroblastos embrionarios murinos que expresan el transgen *Oct4* o los transgenes *Oct4* y *Sox2* con o sin la expresión coordinada de los oncogenes E6 y E7 del VPH, a distintas dosis y tiempos de exposición con doxiciclina.
- Evaluar los niveles de proteínas efectoras de senescencia en fibroblastos embrionarios murinos que expresan los oncogenes E6 y E7 del VPH, a distintas dosis y tiempo de exposición con doxiciclina.
- Colocar en condiciones de diferenciación hacia otros linajes a los fibroblastos embrionarios murinos que expresan el transgen *Oct4* o los transgenes *Oct4* y *Sox2* con o sin la expresión coordinada de los oncogenes E6 y E7 del VPH.
- Colocar en las condiciones de reprogramación propuestas por Liu y colaboradores (2018) a los fibroblastos embrionarios murinos que expresan *Oct4* u *Oct4* y *Sox2* con o sin la expresión coordinada de los oncogenes E6 y E7 del VPH.
- Evaluar los niveles de expresión de los genes endógenos *Oct4* y *Sox2* en fibroblastos embrionarios murinos en los que se utilizó el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9-VPR para activar el gen *Oct4*, a distintas dosis y tiempos de exposición con doxiciclina.
- Colocar en condiciones de un medio reprogramante a los fibroblastos embrionarios murinos en los que se utilizó el sistema CRISPR-dCas9 con la proteína dCas9-VPR para activar el gen *Oct4*, con o sin la expresión coordinada de los oncogenes E6 y E7.
- Colocar en las condiciones de reprogramación propuestas por Liu y colaboradores (2018) a los fibroblastos embrionarios murinos en los que se utilizó el sistema CRISPR-dCas9 para activar el gen *Oct4*, con o sin la expresión coordinada de los oncogenes E6 y E7.

XI. Referencias

- Atlasi, Y. & Stunnenberg, H. G. (2017). The interplay of epigenetic marks during stem cell differentiation and development. *Nature Reviews Genetic*, 18(11), 643-658. doi: 10.1038/nrg.2017.57.
- Balboa, D., Weltner, J., Euroola, S., Trokovic, R., Wartiovaara, K., & Otonkoski, T. (2015). Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation. *Stem cell reports*, 5(3), 448-459. doi:10.1016/j.stemcr.2015.08.001.
- Briggs, R. & King, T. J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38(5), 455-63. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1063586/>
- 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(7150),191-5. doi: <https://doi.org/10.1038/nature05950>
- Chavez, A., Scheiman, J., Vora, S., Pruitt, B. W., Tuttle, M., P R Iyer, E., Lin, S., Kiani, S., Guzman, C. D., Wiegand, D. J., Ter-Ovanesyan, D., Braff, J. L., Davidsohn, N., Housden, B. E., Perrimon, N., Weiss, R., Aach, J., Collins, J. J. & Church, G. M. (2015). Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nature methods*, 12(4), 326-8. doi: <https://dx.doi.org/10.1038%2Fnmeth.3312>
- Chen H., Guo, R., Zhang, Q., Guo, H., Ynag, M., Wu Z., Gao, S., Liu, L. & Chen, L. (2015). Erk signaling is indispensable for genomic stability and self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(44), E5936-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516319112>
- Chen, Xi y Zhai, Yingying y Yu, Dehai y Cui, Jiuwei & Hu, Jifan & Li, Wei. (2015). Valproic Acid Enhances iPSC Induction From Human Bone Marrow-Derived Cells Through the Suppression of Reprogramming-Induced Senescence. *Journal of cellular physiology*, 231(8), 1719-27. doi: 10.1002/jcp.25270
- Chew, J. L., Loh, Y. H., Zhang, W., Chen, X., Tam, W. L., Yeap, L. S., Li, P., Ang, Y. S., Lim, B., Robson, P. & Ng, H. H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*, 25(14), 6031-46. 10.1128/MCB.25.14.6031-6046.2005
- Dominguez, A. A., Lim, W. A., & Qi, L. S. (2016). Beyond editing: repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 17(1), 5-15. doi:10.1038/nrm.2015.2

- Gao, X., Yang, J., Tsang, J., Ooi, J., Wu, D. & Liu, P. (2013) Reprogramming to Pluripotency Using Designer TALE Transcription Factors Targeting Enhancers. *Stem cell reports*, 1(2), 183-97. doi:10.1016/j.stemcr.2013.06.002
- Gao, X., Tsang, J., Gaba, F., Wu, D., Lu, L. y Liu, P. (2014) Comparison of TALE designer transcription factors and the CRISPR/dCas9 in regulation of gene expression by targeting enhancers. *Rev. Nucleic Acids Research*, 42(20), e155. doi: 10.1093/nar/gku836.
- Giacinti & Giordano. (2006). RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25(38), 5220-7. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209615>
- Gilbert S. F. (2000). *Developmental Biology*. 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9983/>
- Gray, S. J., Foti, S. B., Schwartz, J. W., Bachaboina, L., Taylor-Blake, B., Coleman, J., ... Samulski, R. J. (2011). Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Human gene therapy*, 22(9), 1143–1153. doi:10.1089/hum.2010.245
- Gurdon J. B. (1986). Nuclear transplantation in eggs and oocytes. *J. Cell Sci.*1986: 287-318. doi: 10.1242/jcs.1986
- Hawley-Nelson, P., Vousden, K. H., Hubbert, N. L., Lowy, D. R., & Schiller, J. T. (1989). HPV16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes. *The EMBO journal*, 8(12), 3905-10. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC402081/>
- Hirai, H., Tani, T., & Kikyo, N. (2010). Structure and functions of powerful transactivators: VP16, MyoD and FoxA. *The International journal of developmental biology*, 54(11-12), 1589-96. doi: 10.1387/ijdb.103194hh
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K. & Yamanaka, S. (2009). Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460(7259), 1132-5. doi: 10.1038/nature08235
- Huangfu, Danwei & Maehr, René & Guo, Wenjun & Eijkelenboom, Astrid & Snitow, Melinda & E Chen, Alice & A Melton, Douglas. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nature biotechnology*, 26(7), 795-797. doi:10.1038/nbt1418
- Huangfu, Danwei & Osafune, Kenji & Maehr, René & Guo, Wenjun & Eijkelenboom, Astrid & Chen, Shuibing & Muhlestein, Whitney & A Melton, Douglas. (2008). Induction Of Pluripotent Stem Cells From Primary Human Fibroblasts With Only Oct4 And Sox2. *Nature biotechnology*, 26(11), 1269-75. doi: 10.1038/nbt.1502

- Ichida, J. K., Blanchard, J., Lam, K., Son, E. Y., Chung, J. E., Egli, D., Loh, K. M., Carter, A. C., Di Giorgio, F. P., Koszka, K., Huangfu, D., Akutsu, H., Liu, D. R., Rubin, L. L. & Eggan, K. (2009). A small-molecule inhibitor of tgf-Beta signaling replaces sox2 in reprogramming by inducing nanog. *Cell Stem Cell*, 5(5), 491-503. doi: 10.1016/j.stem.2009.09.012.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna Jennifer A. & Charpentier Emmanuelle. (2012) A programable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in adaptative Bacterial Immunity. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6096), 816-21. doi: 10.1126/science.1225829
- Kagey, M. H., Newman, J. J., Bilodeau, S., Zhan, Y., Orlando, D. A., van Berkum, N. L., Ebmeier, C. C., Goossens, J., Rahl, P. B., Levine, S. S., Taatjes, D. J., Dekker, J. & Young, R. A. (2010). Mediator and cohesin connect gene expression and chromatin architecture. *Nature*, 467(7314), 430-5. doi: 10.1038/nature09380.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., & Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458(7239), 771–775. doi:10.1038/nature07864
- Kareta, M. S., Gorges, L. L., Hafeez, S., Benayoun, B. A., Marro, S., Zmoos, A. F., Cecchini, M. J., Spacek, D., Batista, L. F., O'Brien, M., Ng, Y. H., Ang, C. E., Vaka, D., Artandi, S. E., Dick, F. A., Brunet, A., Sage, J., ... Wernig, M. (2014). Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell stem cell*, 16(1), 39-50. doi: 10.1016/j.stem.2014.10.019
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M. & Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming. *Nature*, 460(7259), 1140-4. doi: 10.1038/nature08311
- Kitajima, S., & Takahashi, C. (2017). Intersection of retinoblastoma tumor suppressor function, stem cells, metabolism, and inflammation. *Cancer science*, 108(9), 1726-1731. doi: 10.1111/cas.13312
- Liu, X., Roberts, J., Dakic, A., Zhang, Y., & Schlegel, R. (2008). HPV E7 contributes to the telomerase activity of immortalized and tumorigenic cells and augments E6-induced hTERT promoter function. *Virology*, 375(2), 611-23. doi: 10.1016/j.virol.2008.02.025.
- Li, Yanqin & Zhang, Qiang & Yin, Xiaolei & Yang, Weifeng & Du, Yuanyuan & Hou, Pingping & Ge, Jian & Liu, Chun & Zhang, Weiqi & xu, Zhang & Wu, Yetao & Honggang, Li & Liu, Kang & Wu, Chen & Song, Zhihua & Zhao, Yang & Shi, Yan & Deng, Hongkui. (2010). Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell research*, 21(1), 196-204. doi: 10.1038/cr.2010.142

- Lin Y., & Chen G. (2014). Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK424234/>
- Li, Dongwei., Li, Jing., Yang, Xuejie. (2017). Chromatin Accesibility Dinamycs during iPSC Reprogramming. *Cell Stem Cell*, Volume 21, Issue 6, 819 - 833.e6
- Liu, P., Chen, M., Liu, Y., Qui, LS. &. Ding, S. (2018). CRISPR-Based Chromatin Remodeling of the Endogenous Oct4 or Sox2 Locus Enables Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 1;22(2):252-261.e4. doi: 10.1016/j.stem.2017.12.001
- López Sergio, E. (2018). Cooperación entre los oncogenes E6/E7 y factores promotores de la angiogenesis en la regeneración de porciones de la oreja de ratón. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Martínez, José. A. (2016). Patrones de pluripotencia Inducida por Reprogramación Celular Utilizando un Sistema Auto-Inducible. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología, UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- Mitchell, R., Szabo, E., Shapovalova, Z., Aslostovar, L., Makondo, K. and Bhatia, M. (2014), Molecular Evidence for OCT4-Induced Plasticity in Adult Human Fibroblasts Required for Direct Cell Fate Conversion to Lineage Specific Progenitors. *Stem Cells*, 32(8):2178-87. doi: 10.1002/stem.1721
- Mosteiro, L., Pantoja, C., Alcazar, N., Marión, R.M., Chondronasiou, D., Rovira, M., Fernández-Marcos, P.J., Muñoz-Martin, M., Blanco-Aparicio, C., Pastor, J., Gómez-López, G., de Martino, A., Blasco, M.A., Abad, M. and Serrano, M. (2016). Tissue damage and senescence provide critical signals for celular reprogramming in vivo. *Science*, 354(6315). Doi: 10.1126/science.aaf4445
- Naito, Y., Hino, K., Bono, H. & Ui-Tei, K. (2015) CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA whit reduced off-target sites. *Bioinformatics*, 31(7), 1120-1123. doi: 10.1093/bioinformatics/btu743
- Nordhoff, V., Hübner, K., Bauer, A., Orlova, I., Malapetsa, A. & Schöler, H. (2000) Comparative analysis of human, bovine, and murine Oct-4 upstream promoter sequences. *Mamalian Genome*, 12(4), 309-317. doi:10.1007/s003350010279
- Jusiak, B., Cleto, S., Perez-Piñera, P., Lu, T. (2016). Engineering Synthetic Gene Circuits in Living Cells with CRISPR Technology. *Trends in Biotechnology*, 34(7):535-547. doi: 10.1016/j.tibtech.2015.12.014
- Pauklin, S. & Vallier L. (2015) Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development*, 142(4):607-19. doi: 10.1242/dev.091769.

- Rayess, H., Wang, M. B., & Srivatsan, E. S. (2011). Cellular senescence and tumor suppressor gene p16. *International journal of cancer*, *130*(8), 1715-25. doi: 10.1002/ijc.27316
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, *481*(7381), 295-305. doi:10.1038/nature10761
- Rowland, Benjamin & Bernards, Rene & S Peeper, Daniel. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature cell biology*, *7*(11), 1074-82. 10.1038/ncb1314.
- Rugg-Gunn, P. (2017). Derivation and Culture of Epiblast Stem Cell (EpiSC) Lines. *Cold Spring Harbor Protocols* *3*;2017(1). doi: 10.1101/pdb.prot093971.
- Sage, J., Mulligan, G. J., Attardi, L. D., Miller, A., Chen, S., Williams, B., Theodorou, E. & Jacks, T. (2000). Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization. *Genes & development*, *14*(23), 3037-50. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114892>
- Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. (2012). A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature protocols*, *7*(1), 171–192. doi:10.1038/nprot.2011.431
- Schrode, N., Saiz, N., Di Talia, S., & Hadjantonakis, A. K. (2014). GATA6 levels modulate primitive endoderm cell fate choice and timing in the mouse blastocyst. *Developmental cell*, *29*(4), 454–467. doi:10.1016/j.devcel.2014.04.011
- Shay, J. W. & Wright W. E. (2000). Hayflic, his limit, and celular ageing. *Nat Rev Cell Biol.* *1*(1):72-6. doi: 10.1038/35036093
- Takashi, K. & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, *126*(4):663-76. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Takashi, K., Tonabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblast by Defined Factors. *Cell*, *131*(5), 861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Tapia, N., & Schöler, H. R. (2010). p53 connects tumorigenesis and reprogramming to pluripotency. *The Journal of experimental medicine*, *207*(10), 2045-8.
- Robinton, D. A. & Daley, G. Q. (2012). Review: The promise of induced pluripotent stem cell in research and therapy. *Nature*, *481*(7381):295-305. doi: 10.1038/nature10761.
- Sokol, S. Y. (2011). Maintaining embrionyc stem cell pluripotency whit Wnt signaling. *Development*, *138*(20), 4341-4350. doi: 10.1242/dev.066209

- Stein, G. H., Drullinger, L. F., Souillard, A., & Dulić, V. (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Molecular and cellular biology*, 19(3), 2109-17. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10022898>
- 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(7150),196-9. doi: 10.1038/nature05972
- Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, Cowling R, Wang W, Liu P, Gertsenstein M, Kaji K, Sung HK, Nagy A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766–770. doi:10.1038/nature07863
- Wright, A. V., Nuñez, J. K. & Doudna, J. A. (2016). Biology and Applications of CRISPR Systems: Harnessing Nature' Toolbox for Genome Engineering. *Cell*, 164(1-2):29-44. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.035
- Yamanaka, S. (2012) Perspective: Induced Pluripotent Stem Cell: Past, Present, and Future. *Cell Stem Cell*, 10(6):678-684. doi: 10.1016/j.stem.2012.05.005.
- 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 (3), 281-292. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14636556>
- Ying, Q. L., Wray, J., Nichols, J., Morera, L. B., Doble, B., Woodgett, J., Cohen, P. & Smith, A. (2008) The ground state of embrionic stem cell self-renewal. *Nature*, 453(7194),519-23. doi: 10.1038/nature06968
- Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., & Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nature methods*, 6(5), 363–369. doi:10.1038/nmeth.1323
- Yim, E. K., & Park, J. S. (2005). The role of HPV E6 and E7 oncoproteins in HPV-associated cervical carcinogenesis. *Cancer research and treatment: Official journal of Korean Cancer Association*, 37(6), 319-24. doi: 10.4143/crt.2005.37.6.319
- Van der Oots, J., Westra, E. R., Jackson, R., N. & Wiedenheft, B. (2014) Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas system. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7):479-92. doi: 10.1038/nrmicro3279
- Zhao Y., Yin X., Qin H., Zhu F., Liu H., Yang W., Zhang Q., Xiang C., Hou P., Song Z., Liu, Y., Yong, J., Zhang, P., Cai, J., Liu. M., Li, H., Li, Y., Qu, X., Cui, K., Zhang, W., Xiang, T., Wu, Y., Zhao, Y., Liu, C., Yu, C., Yuan, K., Lou, J., Ding, M., Deng,

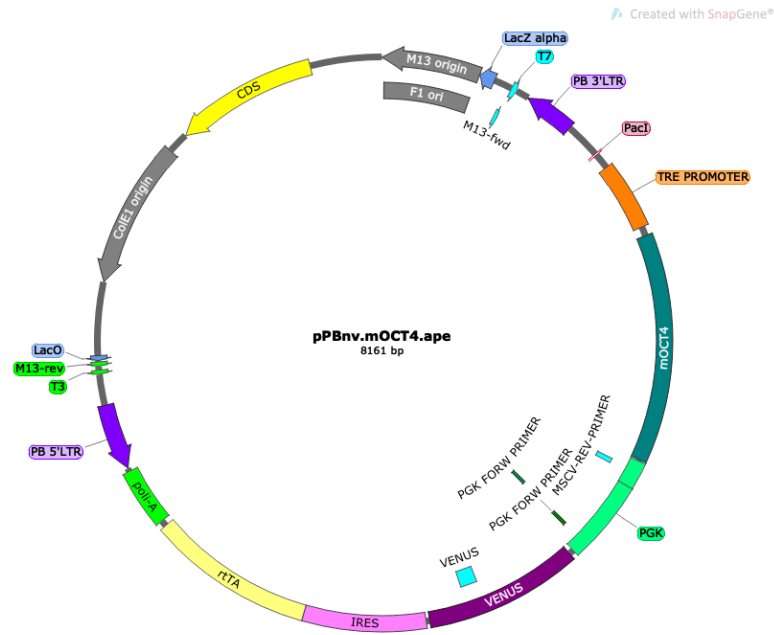
H. (2008). Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation. *Cell Stem Cell*, 3(5),475-9. doi: 10.1016/j.stem.2008.10.002

Zhai, Yingying & Chen, Xi & Yu, Dehai & Li, Tao & Cui, Jiuwei & Wang, Guanjun & Hu, Jifan & Li, Wei. (2015). Histone deacetylase inhibitor valproic acid promotes the induction of pluripotency in mouse fibroblasts by suppressing reprogramming-induced senescence stress. *Experimental Cell Research*, 337(1):61-7. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.003.

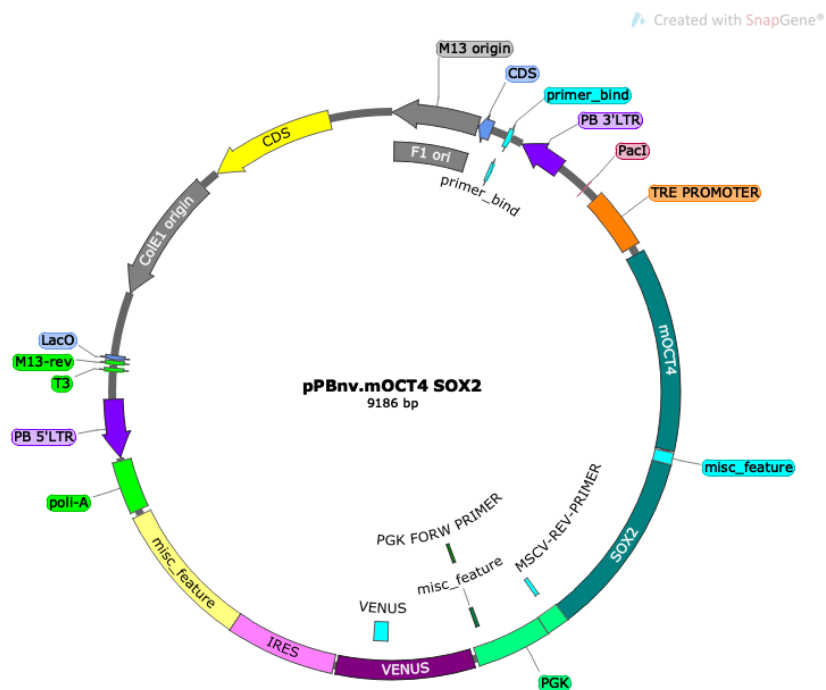
XII. Anexo

12.1 Mapas de vectores

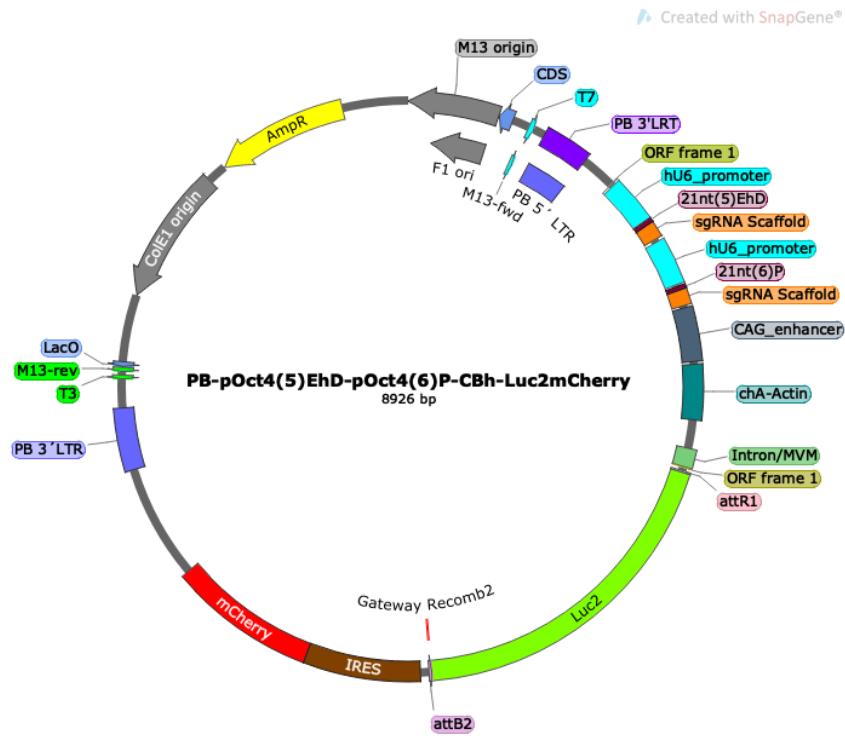
12.1.1 pPBnv-mOCT4



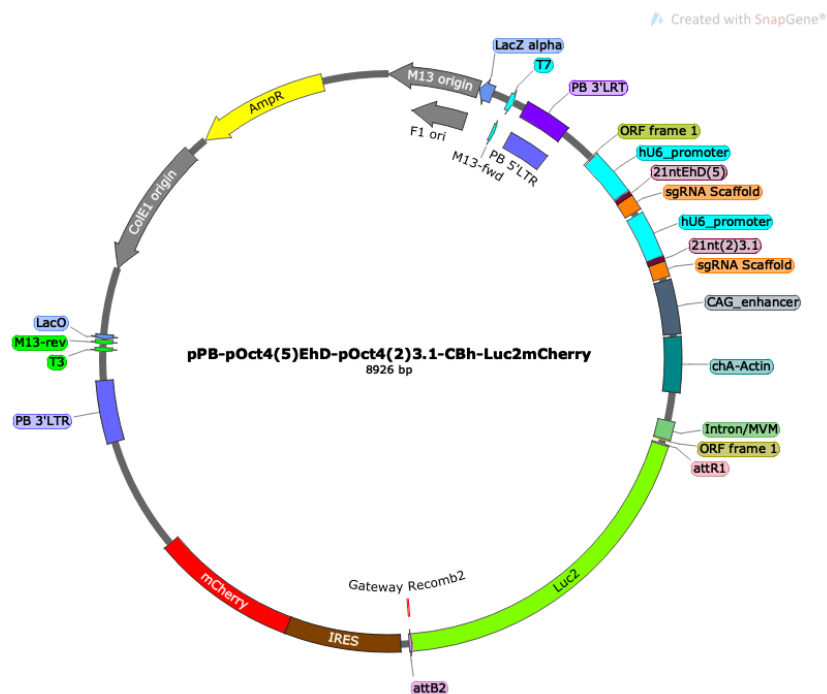
12.1.2 pPBnv-mOCT4/SOX2



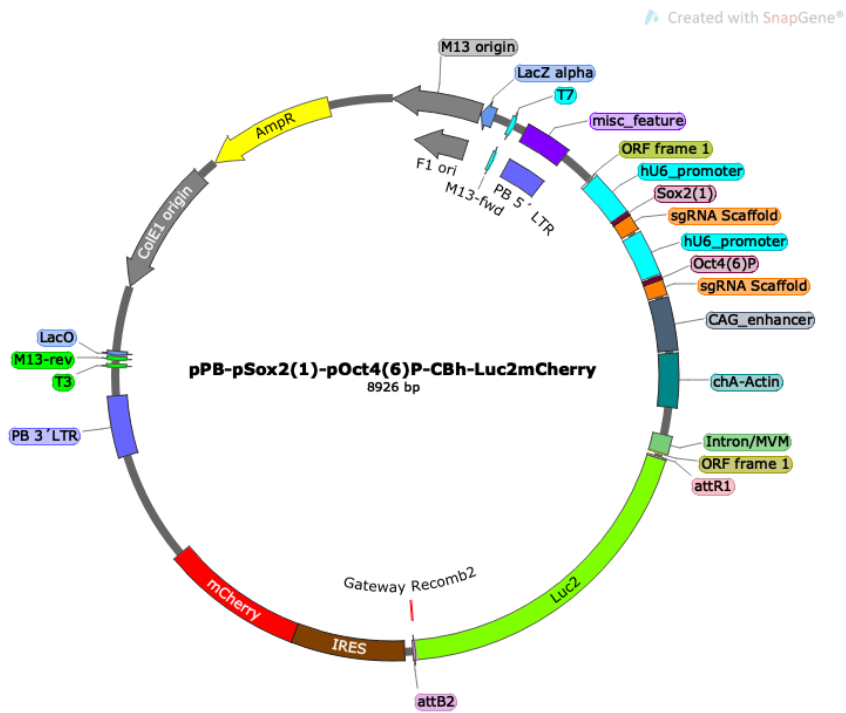
12.1.3 pPB-pOct4(5)EhD-pOct4(6)P-CBh-Luc2mCherry



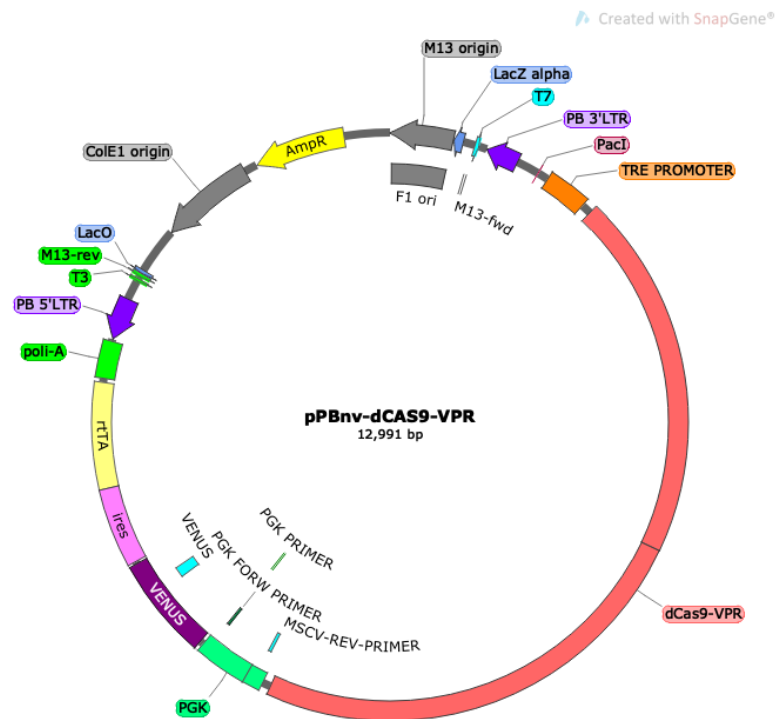
12.1.4 pPB-pOct4(5)EhD-pOct4(2)3.1-CBh-Luc2mCherry

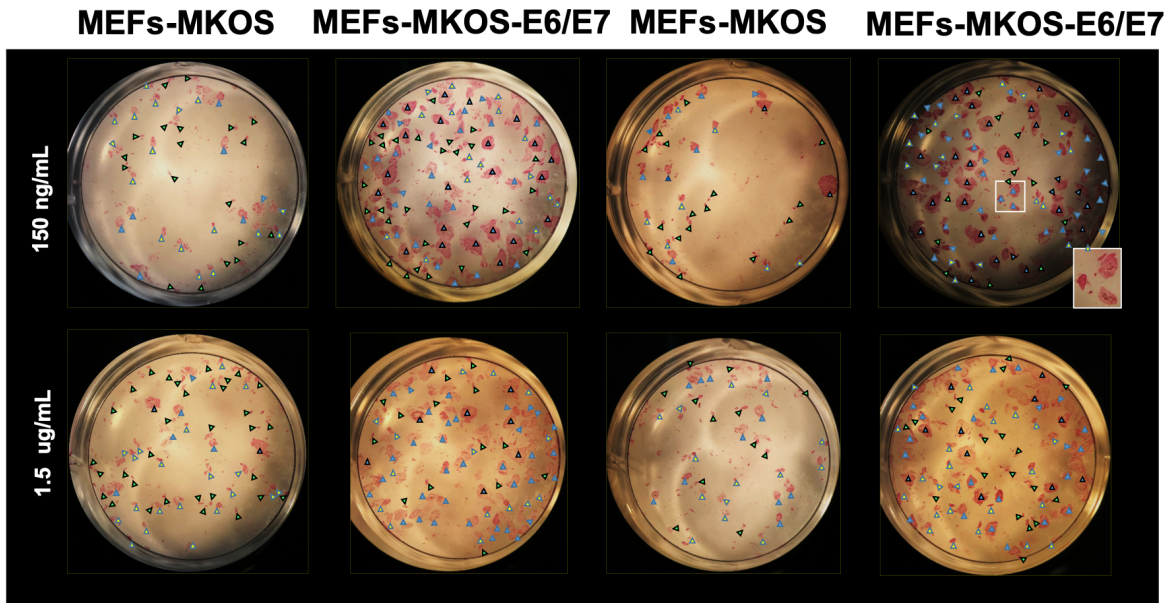


12.1.5 pPB-pSox2(1)-pOct4(6)P-CBh-Luc2mCherry



12.1.6 pPBnv-dCas9-VPR





	MKOS				MKOS/E6E7			
	muy pequeñas	pequeñas	medianas	grandes	muy pequeñas	pequeñas	medianas	grandes
150 ng/mL	17.5	11.5	7.5	1	21	17	26.5	25.5
1.5 ug/mL	23.5	17	9	1	14.5	15.5	27	9.5

Figura A. Conteo detallado de las colonias de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox*, y de MEFs transfectados con los transgenes *c-Myc*, *Klf4*, *Oct4* y *Sox2* y los oncogenes E6 y E7: ▲ colonias muy pequeñas, ▲ colonias pequeñas, ▲ colonias medianas y ▲ colonias grandes. Se determinó el promedio del duplicado de un experimento.