



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES RETINIANOS  
DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS PARA  
GENERAR UN MODELO DE RETINOSIS PIGMENTARIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. NAVA VALDEZ JESSICA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
**DRA. MARTHA ROBLES FLORES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**



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.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOMEDICINA

**DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES RETINIANOS  
DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS PARA  
GENERAR UN MODELO DE RETINOSIS PIGMENTARIA**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. NAVA VALDEZ JESSICA**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUÍZ**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**COMITÉ TUTOR: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO**  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM  
**DRA. MARTHA ROBLES FLORES**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2022**

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/554/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 9 de mayo de 2022 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **Biomedicina** de la estudiante **NAVA VALDEZ JESSICA** con número de cuenta 307221007 con la tesis titulada **“DIFERENCIACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PRECURSORES RETINIANOS DERIVADOS DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENCIALES INDUCIDAS PARA GENERAR UN MODELO DE RETINOSIS PIGMENTARIA”**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN CARLOS ZENTENO RUIZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. ARTURO HERNÁNDEZ CRUZ  
Vocal: DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN  
Vocal: DR. OSCAR FRANCISCO CHACÓN CAMACHO  
Vocal: DR. VÍCTOR MANUEL BAUTISTA DE LUCIO  
Secretario: DRA. MAGDALENA GUERRA CRESPO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 13 de junio de 2022

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



**COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Unidad de Posgrado, Edificio D, 1º Piso. Circuito de Posgrados, Ciudad Universitaria  
Alcaldía Coyoacán. C. P. 04510 CDMX Tel. (+5255)5623 7002 <http://pcbiol.posgrado.unam.mx/>

## **Agradecimientos institucionales**

La realización de esta tesis habría sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que esta llegara a término. Agradezco enormemente al Posgrado en Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo que se me brindó para obtener el grado académico de Maestra en Ciencias Biológicas.

Agradezco al CONACyT por la beca de maestría No. 1034305 que me fue otorgada para poder realizar mis estudios. De igual manera agradezco al proyecto CONACyT 56845 Ciencia Frontera 2019 y al apoyo DGAPA-PAPIIT (IN215720 2019-2021), otorgados al Dr. Juan Carlos Zenteno y este proyecto de investigación.

### **A los miembros de mi comité tutor:**

Quiero extender un enorme agradecimiento a la Dra. Magdalena Guerra Crespo y a la Dra. Martha Robles Flores por todos los comentarios que permitieron enriquecer este trabajo, por su tiempo y dedicación, así como las facilidades para poder finalizar este trabajo.

Debo agradecer de manera especial y sincera al Dr. Juan Carlos Zenteno Ruiz, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo hace ya varios años, y por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo durante estos años de maestría. Le agradezco también el haberme facilitado siempre los medios suficientes para llevar a cabo todas las actividades propuestas durante el desarrollo de esta tesis. Muchas gracias.

## **Agradecimientos a título personal**

En primera instancia, agradezco al Dr. Karlen Gazarian y al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por permitir que esta tesis se desarrollara en el marco de un proyecto de colaboración entre su grupo de trabajo con el grupo del Dr. Juan Carlos Zenteno en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Agradezco la facilidad del uso de las instalaciones del Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental y de sus equipos.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento al Dr. Germán Mora por su importante aporte y participación activa en el desarrollo de esta tesis, sin su presencia no se habría logrado este trabajo. Debo destacar, su disponibilidad, paciencia y apoyo. No cabe duda que su participación ha enriquecido el trabajo realizado. Quiero agradecer también a la Biol. Fedra Suárez por todo el apoyo, y dedicación al trabajo de laboratorio. A este pequeño pero suficiente, equipo de trabajo. Muchas gracias.

Y, por supuesto, el agradecimiento más profundo va para mi familia. A mis padres, Félix y Juanita por su ejemplo de lucha, por su paciencia y tiempo dedicado; a mi hermana por su ejemplo de tenacidad y superación, y a mi hermano por todo el apoyo y comprensión brindado. Y de manera especial quiero agradecer a Jonathan, por todas las buenas palabras, compañía y apoyo en los momentos difíciles, no fue fácil finalizar este proyecto con éxito, no obstante, siempre fuiste muy esperanzador y motivador, siempre estabas ahí para saber que lo iba a lograr. Sin su apoyo, colaboración, dedicación e inspiración habría sido imposible llevar a cabo este trabajo.

*A mis padres.*

# Índice

Listado de figuras y tablas

Índice de abreviaturas

1. RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
2. INTRODUCCIÓN .....	4
2.1. Distrofias retinianas.....	4
2.1.2. Retinosis pigmentaria .....	4
2.1.3. Epitelio pigmentario de la retina.....	5
2.1.4. Genes causantes de RP .....	7
2.1.5. Gen <i>MFRP</i> .....	9
2.2. Modelos animales en enfermedades retinianas.....	11
2.3. Reprogramación celular .....	12
2.3.1. Métodos de reprogramación.....	14
2.4. Métodos de diferenciación celular a progenitores retinianos .....	14
3. ANTECEDENTES .....	16
4. Planteamiento del problema.....	18
4.1. Justificación.....	18
4.2. Hipótesis .....	19
5. OBJETIVOS .....	20
5.1. General .....	20
5.2. Particulares .....	20
6. METODOLOGÍA.....	21
6.1. Sujetos de estudio.....	21
6.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos.....	22
6.2.1. Cultivos primarios .....	22
6.2.2. Criopreservación de cultivos primarios de fibroblastos .....	22
6.3. Células pluripotentes embrionarias .....	23
6.3.1. Obtención y cultivo de células embrionarias humanas H9.....	23
6.3.2. Caracterización de pluripotencia por inmunofluorescencia.....	23
6.4. Generación y caracterización de células troncales pluripotenciales inducidas.....	24
6.4.1. Reprogramación celular de fibroblastos dermales con virus Sendai.....	24
6.4.2. Selección y toma de colonias de células iPCSs .....	26

6.4.3. Cultivo y expansión de células iPSC.....	27
6.4.4. Extracción de DNA de células iPSC .....	27
6.4.5. Caracterización de pluripotencia por inmunofluorescencia.....	27
6.4.6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (AP) .....	28
6.4.7. Análisis de expresión de genes endógenos por RT-PCR .....	28
6.5. Ensayo de diferenciación de EPR.....	29
6.5.1. Análisis de expresión por RT-PCR de genes asociados a diferenciación retiniana .....	31
7. RESULTADOS .....	33
7.1. Sujetos de estudio.....	33
7.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dermales.....	33
7.2.1. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos.....	33
7.3. Caracterización de marcadores de pluripotencia en células H9.....	35
7.4. Generación de células iPSC de un sujeto con RP y caracterización de pluripotencia.....	35
7.4.1. Reprogramación con virus Sendai de fibroblastos de sujeto con RP ...	35
7.4.2. Validación de la variante del gen <i>MFRP</i> en células iPSC-MFRP .....	38
7.4.3. Las colonias de células iPSC-MFRP seleccionadas expresaron marcadores de pluripotencia.....	39
7.4.4. Análisis de expresión de genes endógenos por RT-PCR en línea de células iPSC con mutación en <i>MFRP</i> . .....	40
7.5. Diferenciación de células H9 y células iPSC-MFRP a células del EPR .....	41
7.5.1. Análisis de expresión de genes de EPR por RT-PCR en línea de células iPSC-MFRP y H9 diferenciadas a EPR .....	44
8. DISCUSIÓN .....	48
9. CONCLUSIONES.....	54
9. ANEXO.....	55
9.1 Consentimiento informado. ....	55
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	60

## Listado de figuras y tablas

Figura 1. Apariencia histológica de la retina humana sana y la retina de un paciente con retinosis pigmentaria en un estadio intermedio de la enfermedad.....	20
Figura 2. Representación esquemática del ojo humano, las capas estructurales de la retina y genes asociados a RP.....	22
Figura 3. Fuentes para modelos de retina <i>in vitro</i> . Material de inicio para la diferenciación a retina <i>in vitro</i> y los tipos de resultado de la diferenciación.....	29
Figura 4. Esquema de la estrategia experimental del proyecto de investigación....	35
Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia de células H9 y células iPSC-MFRP.....	38
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a pluripotencia.....	42
Tabla 3. Composición de Medio de Diferenciación (MD) para EPR.....	43
Tabla 4. Composición del medio de mantenimiento de EPR.....	44
Tabla 5. Oligonucleótidos para la caracterización de marcadores de EPR por RT-PCR.....	45
Tabla 6. Relación de las variantes en el gen MFRP de los sujetos de estudio.....	47
Figura 5. Procesamiento de biopsias de los sujetos de estudio.....	48
Figura 6. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos dermales provenientes de un sujeto con RP por mutación en el gen MFR.....	48
Figura 7. Caracterización morfológica y por inmunofluorescencia de la línea de células embrionarias humanas H9.....	49
Figura 8. Fotografías de la reprogramación de fibroblastos dermales con virus Sendai a diferentes tiempos de transducción.....	51
Figura 9. Morfología de células troncales en las células de la línea iPSC-MFRP seleccionadas del ensayo de reprogramación celular en P2.....	52
Figura 10. Validación de la secuencia nucleotídica en la línea celular iPSC-MFRP en el síndrome de RP, nanofthalmos-retinosis pigmentaria-foveosquiasis-drusas del disco óptico.....	53
Figura 11. Caracterización por inmunofluorescencia de la línea iPSC-MFRP.....	54
Figura 12. RT-PCR de genes endógenos del circuito de pluripotencia.....	55
Figura 13. Proceso de diferenciación a células del EPR.....	56

Figura 14. Análisis de expresión de marcadores de progenitores retinianos OTX2, PAX6 y MITF en diferentes estadios de diferenciación celular en la línea H9 y iPSC-MFRP al día 10 y 20 de diferenciación. ....	57
Figura 15. Caracterización morfológica de células H9 diferenciadas a células del EPR.....	59
Figura 16. Caracterización morfológica de células H9 diferenciadas a células del EPR.....	60
Figura 17. Análisis de RT-PCR de genes específicos de células del EPR diferenciadas de H9 y células iPSC-MFRP.....	61

## Índice de abreviaturas

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
ABCA4	Casete de unión a ATP, subfamilia A, miembro 4
AP	Fosfatasa alcalina ( <i>Alkaline Phosphatase</i> )
BBSs	Síndrome de Bardet-Biedl ( <i>Bardet-Biedl Syndrome</i> )
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ( <i>basic Fibroblast Growth Factor</i> )
BEST1	Bestrofina-1 ( <i>Bestrophin-1</i> )
BSA	Albúmina de suero bovino ( <i>Bovin Serum Albumin</i> )
BMP	Proteína morfogénica ósea ( <i>Bone Morphogenetic Protein</i> )
c-MYC	Proto-oncogen de la familia MYC
CNGA1	Subunidad alfa del canal activado por nucleótidos ( <i>Cyclic nucleotide gated channel subunit alpha 1</i> )
CNGB1	Subunidad beta del canal activado por nucleótidos ( <i>Cyclic nucleotide gated channel subunit beta 1</i> )
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos ( <i>C-type carbohydrate recognition domain</i> )
CRXCLRN1	Ligando de quimiocina 1 CXC ( <i>CXC Motif Chemokine Ligand 1</i> )
CTM	Quetomina ( <i>Chetomin</i> )
CUB-LDLR	Dominio de cubilina con repetidos en tándem
DHX38	Caja DEAH helicasa 38 ( <i>DEAH-Box Helicase 38</i> )
Dkk1	Dickkopf inhibidor de la vía de Wnt
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
DR	Distrofia retiniana
DMRE	Degeneración macular relacionada con la edad
E8	Medio Esencial 8 ( <i>Essential 8</i> )
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ESC	Células troncales embrionarias ( <i>Embryonic Stem Cells</i> )
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
hESC	Células troncales embrionarias humanas
IGF1m	Factor de crecimiento similar a la insulina 1 ( <i>Insulin-like Growth Factor mutant</i> )
IMPG2	Matriz interfotorreceptora proteoglicano 2 ( <i>Interphotoreceptor Matrix Proteoglycan 2</i> )
iPSC	Células troncales pluripotenciales inducidas
Klf4	<i>Factor 4 Kruppel-like</i>
LRAT	Lecitina retinol aciltransferasa ( <i>Lecitin Retinol Acyltransferase</i> )
MAB21L2	<i>Mab-21 Like 2</i>

MAK	Quinasa asociada a células germinales masculinas ( <i>Male Germ Cell Associated Kinase</i> )
MD	Medio de diferenciación
MD NC	Medio de diferenciación con nicotinamida y quetomina
MEM NEEA	Solución de aminoácidos no esenciales MEM ( <i>MEM Non-essential Amino Acid Solution</i> )
MEPR	Medio de EPR
MERTK	Proto-oncogen tirosina quinasa Mer ( <i>Proto-Oncogene Tyrosine Kinase</i> )
MFRP	Proteína de membrana relacionada con frizzled ( <i>Membrane Frizzled-related Protein</i> )
MITF	Factor de transcripción inductor de melanocitos ( <i>Melanocyte Inducing Transcription Factor</i> )
MKSs	Síndrome de Meckel ( <i>Meckel Syndrome</i> )
MOI	Multiplicidad de infección ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
NANOG	<i>Nanog Homeobox</i>
NIC	Nicotinamida
Noggin	Nogina
NPHPs	Nefronoftisis
NR2E3	Subfamilia de receptores nucleares 2 grupo E miembro 3 ( <i>Nuclear Receptor Subfamily 2 Group E Member 3</i> )
OCT3/4	Factor de transcripción POU5F1 ( <i>POU Class 5 Homeobox 1</i> )
OTX2	<i>Orthodenticle Homeobox 2</i>
P1	Pase celular 1
PAX6	<i>Paired Box 6</i>
PBS	Tampón fosfato alcalino ( <i>Phosphate buffered saline</i> )
PDE6B	Subunidad beta de la fosfodiesterasa cíclica
PROM1	Prominina 1 ( <i>Prominin 1</i> )
PRPFs	Factor de procesamiento pre-mRNA ( <i>Pre-mRNA Processing Factor 31</i> )
PRPH2	Periferina 2 ( <i>Peripherin 2</i> )
ROM1	Proteína de membrana del segmento externo de la retina 1 ( <i>Retinal Outer Segment Membrane Protein 1</i> )
RP	Retinosis pigmentaria
RP1	<i>Retinitis pigmentosa 1</i>
RP9	<i>Retinitis pigmentosa 9</i>
RPE65	Isomerohidrolasa retinoide ( <i>Retinoid isomerohydrolase</i> )
RPGR	Retinosis pigmentosa regulador de GTPasa ( <i>Retinitis Pigmentosa GTPase Regulator</i> )
SAG	<i>S-Antigen Visual Arrestin</i>
SCNT	Célula somática de transferencia nuclear ( <i>Somatic cell nuclear transfer</i> )

SFB	Suero Fetal Bovino
SNRNP200	Ribonucleoproteína pequeña nuclear U5 subunidad 200 ( <i>Small Nuclear Ribonucleoprotein U5 Subunit 200</i> )
SOX2	<i>SRY-Box Transcription Factor 2</i>
SSEA4	Antígeno embrionario estadio-específico 4 ( <i>Stage-specific embryonic antigen 4</i> )
TRA-1-60	Receptor de células T ( <i>T cell receptor alpha locus</i> )
USH2A	Usherina ( <i>Usherin, Usher Syndrome type II</i> )
Wnt	<i>Wingless/Int1</i>
ZNF513	Proteína de dedos de zinc 513 ( <i>Zinc Finger Protein 513</i> )

## 1. RESUMEN

La retinosis pigmentaria (RP), el tipo más común de distrofia retiniana es una enfermedad hereditaria caracterizada por la degeneración progresiva de fotorreceptores y de células del epitelio pigmentario de la retina (EPR). A la fecha se conocen más de 80 genes que al estar mutados que se asocian a RP con distintos tipos de herencia monogénica. Las mutaciones en el gen *MFRP* originan un síndrome ocular caracterizado por RP autosómica recesiva y nanofthalmos con afectación de las células del EPR. Estos defectos, contribuyen al desarrollo anormal de fotorreceptores que tendrá como consecuencia la degeneración de estas células. Aún se desconoce la causa por la cual algunas mutaciones de *MFRP* causan RP aislada, mientras que otras mutaciones originan un fenotipo del complejo nanofthalmos-RP. Las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) han permitido modelar enfermedades retinianas para la recapitulación *in vitro* del desarrollo embrionario, y sucesivamente de la aparición de los trastornos asociados a la enfermedad. En este trabajo se generaron células iPSCs de fibroblastos dermales provenientes de un sujeto con RP por la variante homocigota c.498\_499insC (p.P165fsX198) en *MFRP*, a partir del método del virus Sendai (línea iPSC-MFRP). Esta línea celular se caracterizó para la expresión de factores de transcripción esenciales para la pluripotencia (SOX2, OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-60). Se realizó la diferenciación a EPR con las moléculas pequeñas nicotinamida y quetomina. Se evaluaron morfológicamente, y por marcadores de expresión de precursores de EPR tempranos (OTX2, PAX6, MITF) y de EPR maduro (MERTK, RPE65, BEST1) mediante qPCR y RT-PCR a los 11, 20 y 82 días de diferenciación. Al día 11 en iPSC-MFRP y células H9 se observa una expresión mayor de OTX2 y PAX6; mientras que en el día 20 se observó una reducción en la expresión de OTX2, el mantenimiento de PAX6 y una baja expresión de MITF. Para el día 30 se observó una baja en la expresión del marcador temprano OTX2 y una expresión mayor de MITF, lo cual concuerda con lo descrito durante la diferenciación *in vivo*. Estos resultados indican que el modelo generado permite recapitular el desarrollo de precursores retinianos del EPR a partir de las células somáticas con la variante en el gen *MFRP*, así mismo, permite el desarrollo de

estas células pigmentarias maduras en monocapa para el estudio de esta enfermedad tan incapacitante.

## ABSTRACT

Retinitis pigmentosa (RP), the most common retinal dystrophy, is a hereditary disease characterized by progressive degeneration of photoreceptor cells and retinal pigmented epithelium cells (RPE). To date, about 80 genes are known to be associated with RP with different types of monogenic inheritance. Mutations in the MFRP gene cause an ocular syndrome characterized by autosomal recessive RP and nanophthalmos with RPE cell involvement. These defects contribute to the abnormal development of photoreceptors that will result in the degeneration of these cells. The cause of why some MFRP mutations cause isolated RP while other mutations cause a nanophthalmos-RP complex phenotype is still unknown. Induced pluripotent stem cells (iPSC) have made it possible to model retinal diseases for in vitro recapitulation of embryonic development, and successively of appearance of the disease. iPSCs were generated from dermal fibroblast from a subject with RP due to the homozygous variant c.498\_499insC (p.P165fsX198) in MFRP, using the Sendai virus method (iPSC-MFRP line). This cell line was characterized by the expression of essential transcription factors in pluripotency (SOX2, OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-60). Differentiation to RPE was performed with the small molecules nicotinamide and ketomine. These cells were evaluated morphologically and by expression markers of early RPE precursors (OTX2, PAX6, MITF) and mature RPE (MERTK, RPE65, BEST1), using qPCR, RT-PCR and immunofluorescence at 11, 20 and 82 days of differentiation. At day 11, a higher expression of OTX2 and PAX6 is observed in iPSC-MFRP and H9 cells; while on day 20 a reduction in the expression of OTX2, the maintenance of PAX6 and a low expression of MITF are observed; by day 30, a decrease in the expression of the early marker OTX2 and a higher expression of MITF is observed, which is consistent with that described during in vivo differentiation. These results indicate that the generated model allows recapitulating the development of RPE retinal precursors from somatic cells with the variant in the MFRP gene, as well as allowing the development of these mature pigment cells in monolayer for the study of a disabling disease.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1. Distrofias retinianas

Las distrofias retinianas (DR) son un grupo heterogéneo de desórdenes neurodegenerativos que presentan un impacto con respecto a la visión y autonomía del paciente, y se caracterizan por una degeneración progresiva de células en las diversas capas de la retina (Ziccardi *et al.*, 2019). Estas enfermedades tienen una frecuencia global de 1 en 2,000 y en conjunto se consideran la causa más frecuente de ceguera de tipo hereditario, ya que afecta a más de 2,000,000 de personas en todo el mundo (Berger *et al.*, 2010). Las DR son además la causa más común de ceguera en individuos en edad laboral en países desarrollados (Francis, 2006). Una característica importante de las DR es que tienen una alta variabilidad clínica. Si bien existen subtipos asociados con cierta preservación visual, la mayoría de ellas es progresiva y ocasiona ceguera legal, incluso en los primeros años de vida (Patel *et al.*, 2016).

Las DR se clasifican de acuerdo con varios criterios, entre los que se encuentran la edad de inicio de la enfermedad (congénitas, infantiles, adultas), el tipo de fotorreceptor retiniano predominantemente afectado (conos, bastones, o ambos), el tipo de herencia de la enfermedad (dominante, recesivo, ligado al X, esporádico) y la presencia o no de anomalías extra retinianas (sindrómicas o no sindrómicas (Chacón-Camacho *et al.*, 2017; Broadgate *et al.*, 2017). Las DR son una de las enfermedades humanas con mayor heterogeneidad genética, ya que la mutación de alguno de cerca de 271 genes origina algún subtipo de la enfermedad (Chen *et al.*, 2021; RetNet, <http://www.sph.uth.tmc.edu/RetNet/>).

### 2.1.2. Retinosis pigmentaria

La forma más común de DR es la retinosis pigmentaria (RP), es la mayor causa de discapacidad visual y ceguera, pues afecta a más de 1.5 millones de pacientes en todo el mundo, con una prevalencia que varía aproximadamente de 1 en 9,000, y puede ir a valores más altos, 1 en 750, dependiendo de la localización geográfica (Verbakel *et al.*, 2018), aunque en general se acepta una frecuencia global de 1 en 3,000 a 4,000 individuos. La RP incluye un grupo de enfermedades

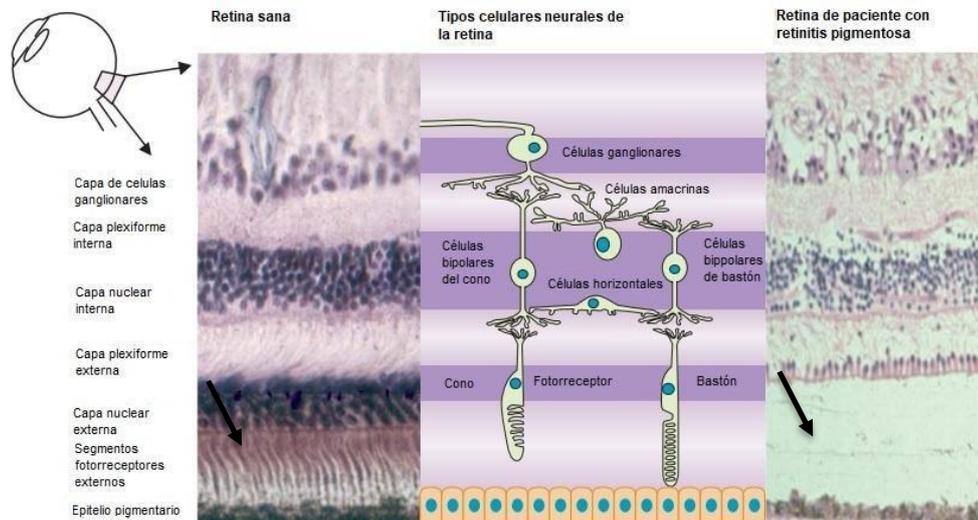
hereditarias degenerativas de la retina que se caracterizan por una degeneración progresiva de fotorreceptores inicialmente bastones, seguido por la pérdida de conos, y de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR), así como por la presencia de depósitos de pigmento predominantemente en la retina periférica. En la mayoría de los casos de RP, hay una degeneración primaria de fotorreceptores de tipo bastones, que median la visión acromática, con degeneración secundaria de conos, que son importantes para la visión a color y para la agudeza visual fina durante el día (Hamel, 2006).

En condiciones normales, la retina tiene una arquitectura bien organizada y está comprendida en diversas capas, donde diferentes células especializadas están conectadas unas con otras. La retina está compuesta de neuronas sensoriales especializadas, los fotorreceptores, que forman la capa nuclear más externa de la retina, y es esta estructura la que se encuentra severamente alterada en pacientes con RP. Los fotorreceptores, y particularmente los bastones, requieren un entorno altamente regulado para funcionar correctamente y cualquier alteración de su entorno puede hacer que estas células sean propensas a apoptosis. Por otra parte, aunque la capa de células ganglionares y la capa nuclear interna (compuesta de células amacrinas, células bipolares y células neuronales horizontales), se encuentran bien conservadas en estadios iniciales e intermedios de la RP, conforme progresa la enfermedad también se presenta degeneración de estas capas celulares (Figura 1) (Hartong, Berson y Dryja, 2006).

### 2.1.3. Epitelio pigmentario de la retina

El EPR es una monocapa de células pigmentadas altamente especializada, localizada entre la capa coriocapilar y el segmento exterior de fotorreceptores (Strauss, 2005). El color café oscuro del EPR es originado por la melanina intracelular, que tiene como función principal proteger a la retina neural de la fotooxidación (Shu *et al.*, 2017). Su función es absorber la luz que no ha sido capturada correctamente por los receptores, y así evita la acumulación de estrés foto-oxidativo que contribuye a la muerte celular de conos y bastones por vía fagocítica (Datta *et al.*, 2017). La pérdida gradual de la melanina en el EPR

compromete el mecanismo de fotoprotección, lo que indica una senescencia ocular y hace susceptible al ojo para las enfermedades degenerativas (Sarna *et al.*, 2003).



**Figura. 1. Apariencia histológica de la retina humana sana (izquierda) y la retina de un paciente con retinosis pigmentaria en un estadio intermedio de la enfermedad (derecha).** El espacio localizado entre el EPR y la capa nuclear externa en la retina afectada está en proceso de degeneración, como se indica con flecha negra. (Tomado de Hartong, Berson y Dryja, 2006).

La interacción entre el EPR y las células fotorreceptoras es importante para el mantenimiento de la integridad funcional y estructural de los fotorreceptores, incluyendo el mantenimiento del ciclo visual en el cual el todo-trans-retinal es reciclado a 11-cis retinal. El EPR también ayuda al mantenimiento de los fotorreceptores por la fagocitosis diurna del segmento externo de los fotorreceptores, por transporte de agua, iones, y productos metabólicos del espacio sub-retinal sanguíneo, por la secreción de factores neurotróficos y por transporte de nutrientes (como glucosa y ácidos grasos) del torrente sanguíneo a los fotorreceptores. La barrera hemato-retiniana existe en el EPR debido a las fuertes uniones entre las células epiteliales que controlan el movimiento de fluidos y metabolitos hacia adentro y afuera de la retina neural (Tonade y Kern, 2020).

La morfología de las células del EPR está afectada en los diferentes estados de enfermedad de los padecimientos retinales y maculares. La ruptura del EPR lleva a la pérdida de la barrera hemato-retiniana. Cuando hay una enfermedad retiniana, el EPR puede presentar una proliferación anormal y cambios que incluyen la transición epitelial-mesenquimal (Rizzolo, 2007). Estos cambios varían desde alteraciones mínimas en la morfología hasta muerte celular.

Se ha descrito, que en modelos de ratones con degeneración macular por la edad (DMRE), el EPR desarrolla una subpoblación celular de células más grandes. Para compensar la pérdida celular, las células adyacentes de EPR expanden su superficie para prevenir uniones de las células adyacentes emergentes, lo que lleva a estas células a ser más grandes y multinucleadas, estas diferencias pueden ser detectadas en etapas tempranas a partir de su morfología y antes de que ocurra algún daño mayor en degeneraciones retinianas hereditarias (Jiang *et al.*, 2014), lo cual podría aplicarse al EPR humano para detectar marcadores tempranos de riesgo para estas enfermedades retinianas.

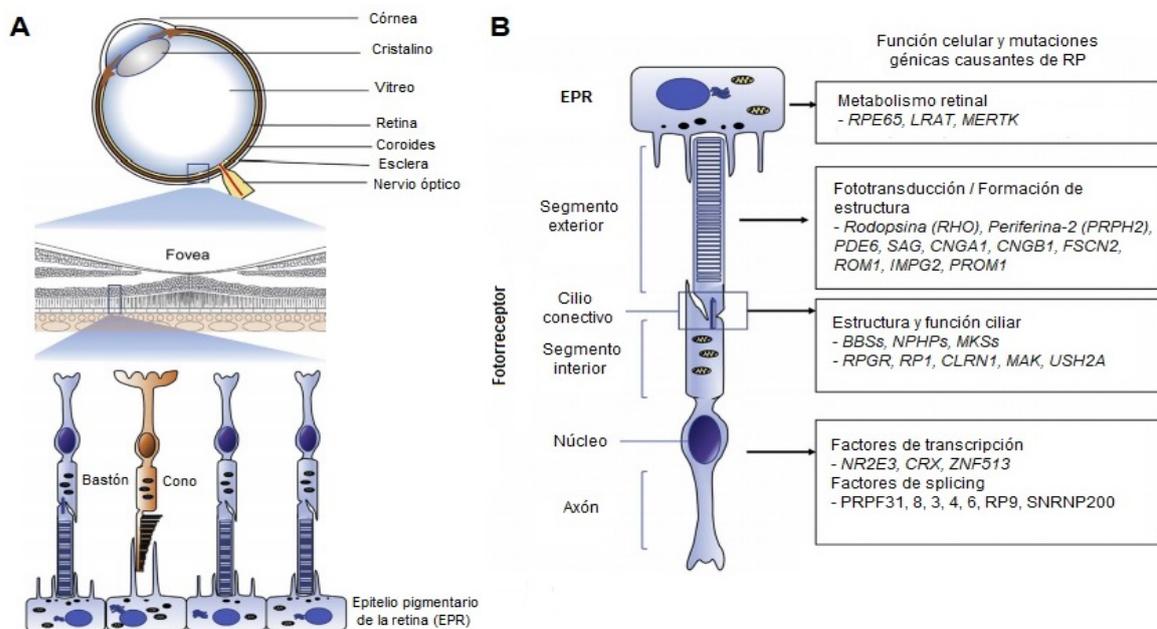
#### 2.1.4. Genes causantes de RP

Dentro de las células del EPR y los fotorreceptores (principalmente bastones), se expresan genes que codifican a proteínas con diversas funciones biológicas, que además contribuyen a la heterogeneidad de la enfermedad (Hartong *et al.*, 2006). La identificación del gen mutado es crítica para mejorar el cuidado de los pacientes con RP, así como a sus familiares, ya que permite una clasificación precisa de la enfermedad y permite establecer un pronóstico (Chacón-Camacho, García-Montaño y Zenteno, 2017).

Los mecanismos celulares asociados con los genes de RP (Figura 2B) en el EPR incluyen a los genes que actúan a distintos niveles. A los genes involucrados en el metabolismo retinoide, como el gen *RPE65* (codifica para la proteína retinol isomerasa) que cataliza el paso inicial en la biosíntesis de vitamina A y que requiere la co-expresión del gen *LRAT* (codifica para Lecitin-retinol acetil transferasa) que cataliza la síntesis de ésteres de retinol y actúa como transportador de retinoides (Den-Hollander *et al.*, 2008). Y a los genes que actúan en proteínas involucradas en la fagocitosis de los fotorreceptores de los segmentos externos como el gen

*MERTK* (receptor de tirosina cinasa Mer), relacionado con la interacción entre fotorreceptores y células del EPR (Smith *et al.*, 2003).

Por otra parte, en los fotorreceptores se expresan preferencialmente genes involucrados en la cascada de fototransducción y en el metabolismo de la retina, entre ellos: el gen que codifica a rodopsina (*RHO*), el de la periferina-2 (*PRPH2*), el gen *PDE6B*, el gen *SAG*, el gen *CNGA1*, el gen *CNGB1*, el gen *ROM1*, el gen *IMPG2* y el gen *PROM1*; genes que codifican proteínas con actividad de factores de transcripción



**Figura 2. Representación esquemática del ojo humano, se muestran las capas estructurales de la retina y genes asociados a RP.** A) Localización de las diferentes capas de la retina, ampliación de fotorreceptores (tipo bastón y cono) y EPR. B) Localización de proteínas traducidas por genes asociados con RP dentro de la célula del EPR y fotorreceptores (bastón). (Tomado de Dias *et al.*, 2018).

(*NR2E3*, *CRX*, *ZNF513*), así como los que codifican proteínas que actúan en la maquinaria de splicing de RNA (*PRPF31*, *PRPF8*, *PRPF3*, *PRPF4*, *PRPF6*, *RP9*, *SNRNP200*, *DHX38*); y los genes que participan en la estructura y funcionamiento ciliar (*BBSs*, *NPHPs*, *MKSs*, *RPGR*, *RP1*, *CLRN1*, *MAK*, *USH2A*) (Dias *et al.*, 2018).

Durante el desarrollo, los tejidos de manera individual sufren una morfogénesis dirigida por movimientos celulares. La morfogénesis de manera general se encarga de que cada tejido tome una forma necesaria con tipos celulares específicos en ubicaciones apropiadas, para que los tejidos puedan llevar a cabo sus funciones apropiadamente (Cavodeassi, 2018). En el caso particular de la embriogénesis del ojo, las vesículas oculares emergen del cerebro anterior y experimentan una morfogénesis extensiva para producir la copa óptica. La región exterior de la copa óptica comprende las neuronas de la retina, mientras que la región anterior consiste en el EPR, y es el soporte de los fotorreceptores (Heermann *et al.*, 2015; Bharti *et al.*, 2011).

Los primeros estudios del desarrollo de fotorreceptores se centraron en ensayos *in vitro*, y demostraron que las interacciones celulares son importantes en la diferenciación de fotorreceptores, principalmente de los bastones. Distintas señales candidatas incluyen el ácido retinoico, taurina, S-laminina y activina, estas señales actúan como factores de transcripción específicos para el desarrollo de los bastones. Más tarde, estudios recientes sobre el desarrollo de los fotorreceptores identificaron relaciones complejas entre factores de transcripción reguladores (entre ellos *OTX2*, *PAX6*, *MITF*, *CRX*, *NR2E3*) que determinan el destino celular de bastones y conos (Swaroop *et al.*, 2010). Los efectos de la manipulación de los distintos factores involucrados en estas vías de diferenciación han sido demostrados en modelos celulares bidimensionales (2D) (para cultivos de monocapa) y tridimensionales (3D) (para organoides) (Eldred *et al.*, 2018), ambos para el estudio del desarrollo de la retina, lo que convierte a este tipo de modelos, clave para el desarrollo de las terapias génicas de DR.

#### 2.1.5. Gen *MFRP*

El gen *MFRP* fue descrito en 2001, está compuesto por 13 exones y se encuentra localizado en el cromosoma 11q23. Codifica para una proteína transmembranal con 579 residuos de aminoácidos que se expresa principalmente en el EPR y el epitelio ciliar del ojo, con una mínima expresión en el cerebro (Won *et al.*, 2008; Mukhopadhyay *et al.*, 2010).

La proteína codificada por el gen *MFRP* está organizada estructuralmente en tres dominios: un dominio rico en cisteína (CRD) en el extremo C-terminal, un dominio transmembranal tipo II y una región extracelular con repetidos en tándem de los dominios CUB-LDLR. El dominio CRD es homólogo al receptor Wnt canónico de unión a Wnt, lo cual sugiere que *MFRP* tiene una función en la señalización de Wnt (Katoh, 2001). La señalización de Wnt regula diversos procesos como el control de la expresión génica, adhesión celular, proliferación y apoptosis, lo que también sugiere que hay una relación entre mutaciones de *MFRP*, la vía de señalización de Wnt y la degeneración del EPR (Burke, 2009; Mukhopadhyay *et al.*, 2010). Sin embargo, el papel funcional de *MFRP* en la retina y otras estructuras oculares no está totalmente establecido (Chekuri *et al.*, 2019).

Se han reportado diversas mutaciones en el gen *MFRP* que originan una amplia variedad de manifestaciones clínicas oculares que incluyen principalmente microftalmia, nanofthalmos, retinitis pigmentosa, atrofia del EPR, edema macular y degeneración de la retina (Sundin *et al.*, 2005; Velez *et al.*, 2017)

Existe evidencia de que la proteína *MFRP* participa en el desarrollo normal de las microvellosidades apicales del EPR y que mutaciones en el gen *MFRP* dan lugar a una reducción en el número de tales estructuras en ratones mutantes (Li *et al.*, 2015; Fogerty y Bershase, 2011). Estos defectos en el EPR contribuyen al desarrollo anormal de fotorreceptores, lo que tiene como consecuencia la degeneración de estas células (Won *et al.*, 2008). El conocimiento de los procesos patológicos del EPR asociados a mutaciones específicas en *MFRP* permitirá no solo un mejor entendimiento de la fisiopatología de las distrofias retinianas sino un abordaje más racional de potenciales opciones terapéuticas.

La naturaleza monogénica de la RP y la compartimentalización y accesibilidad de la retina, han hecho que esta enfermedad sea una candidata idónea a terapias *in situ* para regeneración visual (He *et al.*, 2015; Auricchio *et al.*, 2017; Ovando-Roche *et al.*, 2017). Sin embargo, a la fecha aún no existen tratamientos aprobados para estas enfermedades y los pacientes progresan hacia la ceguera legal en la gran mayoría de los casos. Así, es necesario el desarrollo de

abordajes terapéuticos adicionales que amplíen las posibilidades de los pacientes a acceder a tratamientos de preservación de la visión.

## 2.2. Modelos animales en enfermedades retinianas

Uno de los obstáculos más importantes para el desarrollo de nuevas terapias en la RP es que la mayoría de los genes asociados a la enfermedad se expresan específicamente en el tejido retiniano y por lo tanto existe la dificultad de analizar los mecanismos celulares afectadas por la mutación de un gen individual (Liu *et al.*, 2015), a pesar de que el ojo ofrece muchos beneficios como blanco para terapia génica, al ser un órgano aislado y de fácil acceso.

Se han obtenido numerosos beneficios en investigación de enfermedades oculares en un amplio panel de modelos animales con mutaciones espontáneas, en genes que están involucrados en enfermedades humanas de la retina (Slijkerman *et al.*, 2015).

A pesar de su invaluable contribución en el entendimiento de las enfermedades oculares los modelos animales no han sido idóneos por diversas razones (Eintracht, Toms y Moosajee, 2020): 1) Las diferencias en la expresión de genes en modelos animales no ayuda a nuestro entendimiento de enfermedades humanas. Un ejemplo de ello es el gen *MAB21L2*, importante en la morfogénesis del ojo y la sobrevivencia celular en el desarrollo de copas ópticas y que está asociado con microftalmia en humanos. Sin embargo, aún se desconoce el patrón de expresión más cercano a humanos debido a los diferentes patrones de expresión de este gen en pollo, ratón y pez cebra. 2) Los fenotipos de enfermedades observados en humanos no siempre son similares a los observados en animales. Además, primates y roedores divergieron hace 75 millones de años, y las diferencias inter-especies hacen imposible que los modelos de roedores puedan reproducir de forma precisa o recapitular completamente patologías clínicas humanas (Liu *et al.*, 2018). 3) La letalidad embrionaria descrita en muchos modelos animales, es incomparable con lo observado en humanos. 4) Las estructuras oculares y los eventos durante el desarrollo difieren entre humanos y los modelos animales, por lo que muchos de estos modelos, presentan deficiencias genéticas

que afectan su visión, un ejemplo de ello es que la mayoría de los roedores, como muchos mamíferos, son dicromáticos y tienen solo dos tipos de conos, en contraste a los primates y humanos que tienen tres tipos de conos, mientras que, las aves son tricromáticas y los reptiles son tetracromáticos (Kostic y Arsenijevic, 2016). Todas estas diferencias, en conjunto, hacen complicado extrapolar los hallazgos en eficacia de modelos animales y de uso de fármacos potenciales a humanos, lo que ha contribuido al fracaso de varios ensayos clínicos.

Como resultado, estudiar el desarrollo y las enfermedades oculares utilizando tejidos humanos es más relevante desde el punto de vista fisiológico y prometedor desde el punto de vista terapéutico. Sin embargo, comprender los mecanismos de las malformaciones oculares tempranas utilizando muestras humanas es casi imposible debido a la inaccesibilidad por razones éticas al tejido fetal (Eintracht, Toms y Moosajee, 2020). En consecuencia, el uso de las células troncales pluripotentes inducidas humanas (iPSC) es una opción atractiva para superar estas dificultades.

### 2.3. Reprogramación celular

La reprogramación celular, permite que el núcleo de cualquier célula sea des-diferenciado hasta un estado temprano embrionario del desarrollo. En 1962, el británico John Gurdon, biólogo del desarrollo, demostró que el núcleo celular de un cuerpo celular de un embrión de *Xenopus laevis* adulto con células endodermales totalmente diferenciadas, pudo ser restablecido a un estado embrionario temprano por transferencia nuclear a una célula huevo fertilizada (cigoto). El cigoto se desarrolló con la información genética del núcleo transferido al cuerpo celular, en un renacuajo y más tarde en una rana. Los experimentos mostraron que había factores dentro del citoplasma de la célula del ovocito que restablecen la información genética del núcleo transferido a su estado original (Gurdon, 1962). Tales experimentos fueron llamados transferencia nuclear de células somáticas (SCNT, por sus siglas en inglés, *somatic cell nuclear transfer*). Décadas más tarde en 2006, Shinya Yamanaka demostró en células de ratón y después en humano, que la expresión forzada de ciertos factores de transcripción son suficientes para restaurar células diferenciadas, así como la información genética contenida en su

núcleo, al estado pluripotente (Takahashi y Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007).

Las células iPSC se obtienen por reprogramación genética a partir de células somáticas usando vectores con factores de pluripotencia. Inicialmente, las células iPSC fueron producidas de fibroblastos de embriones de ratón por la introducción de cuatro factores de transcripción: *Octamer-binding transcription factor 3/4* (Oct3/4), *sex-determining region Y-box 2* (Sox2), c-Myc, y *kruppel-like factor 4* (Klf4) por medio de inserción viral para su inducción. La combinación de estos factores generó colonias con morfología y proliferación similar a las células troncales embrionarias (*embryonic stem cells*, ESC) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Las células troncales que tienen la característica de mantener un estado pluripotente, son aquellas que son capaces de diferenciarse en cualquier célula de las tres capas embrionarias (endodermo, ectodermo y mesodermo), capacidad similar a las células troncales embrionarias humanas (hESC) derivadas del estado embrionario temprano de la masa celular interna del blastocisto (Thompson *et al.*, 1998).

La obtención de células iPSC mediante reprogramación ofrece diversas ventajas biológicas y éticas, entre ellas se encuentra reducir la limitante del riesgo de rechazo inmunológico en caso de aplicaciones de terapia celular; además, poseen una capacidad ilimitada de regeneración (debido a que su capacidad de división es alta), al requerir solamente de células somáticas de fuentes accesibles y no invasivas, y evitan de esta manera los dilemas éticos que representa la manipulación de embriones humanos (Zacharias *et al.*, 2011). Las células iPSC permitieron modelar enfermedades y acceder a tejidos a los que anteriormente no se tenía acceso, nos permitieron comprender los procesos de diferenciación en contextos sanos y de enfermedad durante las etapas embrionarias. A la fecha, se ha logrado un entendimiento tal de la biología de la retina que se tiene el potencial de beneficiar a millones de individuos afectados por ceguera hereditaria de origen retiniano mediante células iPSC específicas de pacientes que permiten modelar la enfermedad al ser diferenciadas en células de la retina (Foltz y Clegg, 2018).

La forma más común de desarrollar investigación básica con células troncales *in vitro* es a partir de cultivos celulares, principalmente haciendo uso de una superficie plana que permita el soporte mecánico para la formación de una monocapa celular. Bajo estas condiciones, los nutrientes y los diversos factores de crecimiento se distribuyen de manera homogénea en el cultivo, sin embargo, se han descrito modelos 3D que pueden ser más eficientes dependiendo del objeto de estudio (Liu *et al.*, 2018).

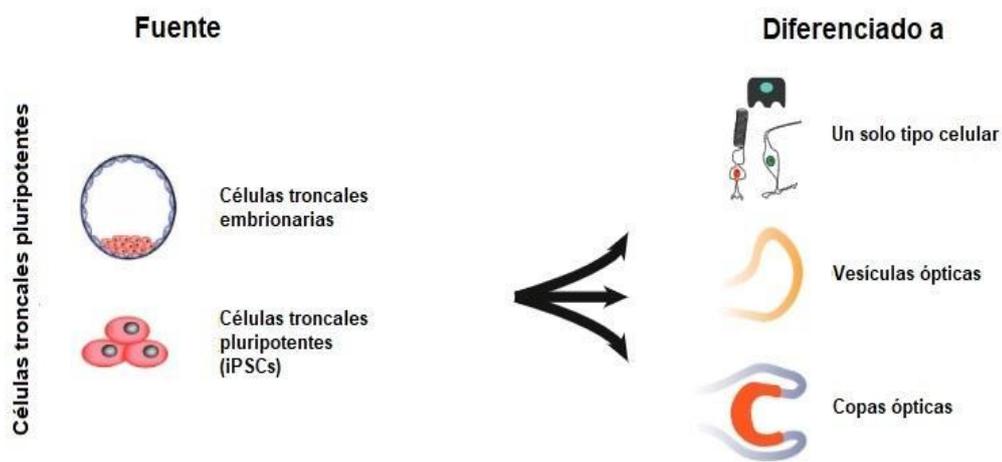
Las células iPSC (Figura 3), pueden ser reprogramadas a partir de tejidos de fácil obtención como sangre periférica, o biopsia de piel, y ser diferenciadas en varios tipos celulares para el modelamiento de enfermedades, en el caso particular del estudio de la retina, pueden ser diferenciadas a un solo tipo celular como son bastones, conos, o a las vesículas y copas ópticas (Borooah *et al.*, 2013; Achberger *et al.*, 2019).

#### 2.3.1. Métodos de reprogramación

Antes de que se induzca la pluripotencia, deben construirse los virus que van a infectar a las células blanco. Se conocen diversos métodos para inducir pluripotencia, principalmente retrovirus integrativos como son los lentivirus, que requieren plásmidos, y los virus Sendai, el cual no requiere preparación de plásmido o transfección viral, por lo que se le conoce como método no-integrativo. Cada enfoque tiene limitaciones, como son la eficiencia de reprogramación, mutagénesis insercional y reprogramación parcial (Salas, Gerami-Naini, y Anchan, 2017). Para los propósitos de modelamiento de enfermedades relacionadas con la retina, se ha descrito que los métodos de reprogramación no-integrativos son altamente recomendables para reducir la posibilidad de producir efectos fuera de las células blanco (Foltz y Clegg, 2017).

#### 2.4. Métodos de diferenciación celular a progenitores retinianos

Existen distintos protocolos para la diferenciación de tipos celulares de la retina, específicamente para la producción de EPR a partir de células hESC. Los métodos directos de diferenciación involucran la adición de factores de crecimiento y



**Figura 3. Fuentes para modelos de retina *in vitro*.** Material de inicio para la diferenciación a retina *in vitro* (izquierda) y los tipos de resultado de la diferenciación. (Modificado de Achberger *et al.*, 2019).

pequeñas moléculas para simular el proceso de desarrollo *in vivo* de la retina (Foltz y Clegg, 2019). Se han descrito diferentes métodos en las últimas décadas, uno de ellos fue la descripción de moléculas pequeñas para promover los factores de diferenciación de EPR como son quetomina, un inhibidor de los factores inducibles por hipoxia, como fuerte inductor de EPR combinado con nicotinamida (Maruotti *et al.*, 2015). Sin embargo, más tarde, se dieron a conocer métodos de diferenciación directa de EPR, que no recapitulan el desarrollo normal de la retina. Estos métodos se basan en un cultivo adherente en monocapa, manipulando la inhibición y activación secuencial de activina y señalización de BMP (proteína morfogenética ósea, *BMP* por sus siglas en inglés), y la adición de moléculas exógenas y proteínas recombinantes (Choudhary *et al.*, 2016).

Para el estudio del desarrollo y patologías del EPR, ha sido esencial la generación de modelos *in vitro* que permiten recapitular de una manera adecuada las características de interés. Es por esta razón que las células iPSC son un modelo idóneo para la regeneración *in vitro* de fotorreceptores y células del EPR (Osakada *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2014; Choudhary *et al.*, 2016; Maruotti *et al.*, 2015), pues son estos tipos celulares los que degeneran predominantemente en individuos con RP.

### 3. ANTECEDENTES

De acuerdo con los diversos autores, las células de pacientes con una mutación específica pueden ser reprogramadas hasta el estado pluripotente y ser re-diferenciadas hacia las células de interés, convirtiéndose así, en un modelo ideal para la recapitulación *in vitro* del desarrollo embrionario, y sucesivamente de la aparición de los signos de la enfermedad (Tsuji, 2010), para el desarrollo de posibles blancos terapéuticos específicos en los pacientes.

Se ha reportado la generación de líneas de células iPSC derivadas de pacientes con enfermedades relacionadas con la retina. Un ejemplo de ello es la línea de células iPSC LEli007 derivadas de un paciente con enfermedad de Stargardt autosómica recesiva, causada por una mutación heterocigota compuesta en el gen *ABCA4*. Esta línea generada a partir de fibroblastos dermales haciendo uso de plásmidos episomales, presentó una morfología y marcadores de expresión típicos de colonias pluripotentes, así como la presencia de las variantes heterocigotas que fueron evaluadas por secuenciación Sanger (Classen *et al.*, 2019). Otro ejemplo es la línea de células iPSC INMi005-A derivada de un paciente con retinosis pigmentaria no sindrómica autosómica recesiva, causada por una mutación heterocigota compuesta en el gen *USH2A* la cual fue generada a partir de fibroblastos dermales con un método no integrativo del virus Sendai, y de igual forma presentó características de pluripotencia y estabilidad genética (Sanjurjo-Soriano *et al.*, 2022).

La generación de este tipo de líneas celulares con fenotipos característicos permitirá elucidar los mecanismos patológicos de las enfermedades retinales por considerarse herramientas valiosas para el entendimiento de patologías asociadas a variantes específicas.

A la fecha, diversos autores han desarrollado modelos de DR con células iPSC de pacientes a partir de fibroblastos obtenidos por biopsia de piel, y con el SV como método de reprogramación, para el desarrollo exitoso, tanto de modelos 2D o 3D, como de organoides, de células fotorreceptoras. Algunos de los ensayos se llevaron a cabo para evaluar la degeneración de bastones en un modelo de RHO en el que se generaron las células precursoras de fotorreceptores de tipo bastón

(Jin *et al.*, 2012); para caracterizar los defectos en fagocitosis en EPR en un modelo de MERTK (Luvikovic *et al.*, 2015); para diferenciar EPR e identificar mutaciones específicas no descritas en RPE65 (Tucker *et al.*, 2015); y para describir los efectos sobre los cilios primarios en un modelo de CEP290 (May-Simera *et al.*, 2018).

En 2008, Osakada y colaboradores, demostraron que es posible la generación *in vitro* de fotorreceptores a partir de células ES de ratón, primates y humanos. Ellos trataron a las células ES bajo condiciones de cultivo definidas libres de sustancias de origen animal, combinado con el tratamiento de inhibidores de Wnt y Nodal, y a las que se les indujo diferenciación de progenitores retinianos para la generación de células del EPR (Osakada *et al.*, 2008). Se propuso después, que este método podía ser aplicado a células iPSC generadas de células somáticas de un humano adulto, por su característica potencialidad.

Li y colaboradores en 2014, utilizaron la tecnología de las células iPSC humanas, para modelar y demostrar el efecto de dos mutaciones en estado homocigoto y heterocigoto, una inserción de 5 pb y una delección de 1 pb respectivamente, en el exón 5 del gen *MFRP* para establecer su asociación con RP. Lo lograron generando células iPSC de pacientes portadores de estas mutaciones a partir de fibroblastos dermales que fueron transducidos con lentivirus, reprogramados y diferenciados. Describieron que las células iPSC derivadas de los pacientes presentaron una expresión menor de *MFRP* comparada con una línea control de células iPSC. Además, demostraron que su modelo de células iPSC-EPR puede ser monitoreado morfológica y funcionalmente para su caracterización, igualmente demostraron que la organización de la actina como blanco río abajo tiene un efecto sobre el gen *MFRP* (Li *et al.*, 2014).

## 4. Planteamiento del problema

En la actualidad, la reprogramación celular es una alternativa atractiva para la generación de células troncales pluripotenciales humanas que no requiere métodos invasivos para su obtención, por lo que pueden ser obtenidas de cualquier célula somática de un individuo y permiten el acceso a los distintos tipos celulares que se ven afectados en las diversas patologías. Las ventajas de los diversos tipos de metodología para reprogramación celular que ofrecen un abordaje no integrativo para el modelamiento de enfermedades relacionadas con la retina, es que permiten reducir los efectos de los transgenes dentro de las células blanco. El poder establecer modelos adecuados para el estudio de la RP a partir de la reprogramación de células adultas y de la diferenciación de células iPSC, permitirá estudiar de forma más eficiente los procesos celulares con el mismo fondo genético, y comprender cómo las mutaciones específicas en el gen *MFRP* originan fenotipos oculares variables, para después identificar cuáles son los mecanismos celulares precisos que llevan a la ceguera y proponer tratamientos más racionales y específicos.

### 4.1. Justificación

Los fenotipos asociados a MFRP son muy variables, pues se han descrito mutaciones en MFRP que derivan en un fenotipo caracterizado por RP de tipo hereditaria autosómica recesiva, nanofthalmos, drusas del disco óptico y cambios en la mácula, originalmente descrito como foveosquisis. En otras mutaciones se han relacionado a un fenotipo aislado de nanofthalmos sin cambios en la retina. Aún se desconoce la causa de por qué algunas mutaciones causan nanofthalmos aislado, mientras que otras mutaciones originan un fenotipo del complejo nanofthalmos-RP-foveosquisis-drusas del disco óptico. Estos fenotipos variados sugieren que el gen *MFRP* tiene una participación en el desarrollo ocular (Ayala-Ramírez *et al.*, 2006; Zenteno *et al.*, 2009; Won *et al.*, 2008). Debido a ello, se necesitan más estudios de mutaciones específicas para identificar mejor los mecanismos involucrados en estas diferencias fenotípicas. Una alternativa para lograr esto, es la generación de un modelo de retinosis a partir de iPSC.

#### 4.2. Hipótesis

Las células iPSC reprogramadas a células del EPR de sujetos con RP por mutación del gen *MFRP* presentarán diferencias fenotípicas, estructurales, y en marcadores de expresión, en comparación con las células reprogramadas sin mutaciones.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Establecer las diferencias fenotípicas y de expresión de marcadores de la línea de células del EPR diferenciadas a partir de células iPSC provenientes de sujetos con RP causada por mutación del gen *MFRP*.

### 5.2. Particulares

- Obtener cultivos primarios de fibroblastos a partir de biopsias dermales de pacientes con RP asociada a *MFRP*.
- Reprogramar fibroblastos dermales con mutación en *MFRP* en células iPSC.
- Diferenciar EPR a partir de células iPSC con mutación en *MFRP*.
- Identificar cambios de expresión en marcadores asociados a progenitores retinianos durante el proceso de diferenciación de las células iPSC con mutación en *MFRP*.

## 6. METODOLOGÍA

Se planteó realizar la reprogramación de fibroblastos dermales provenientes de sujetos con RP por la variante genética c.498\_499insC en *MFRP*, haciendo uso de un virus Sendai que se replica exclusivamente en el citoplasma, sin integración cromosómica. Más adelante, identificamos colonias primarias de células iPSC para su propagación y de forma paralela cultivamos la línea control de células embrionarias humanas H9 hasta su maduración y posterior caracterización, mediante qPCR, RT-PCR e inmunofluorescencia (Figura 4).

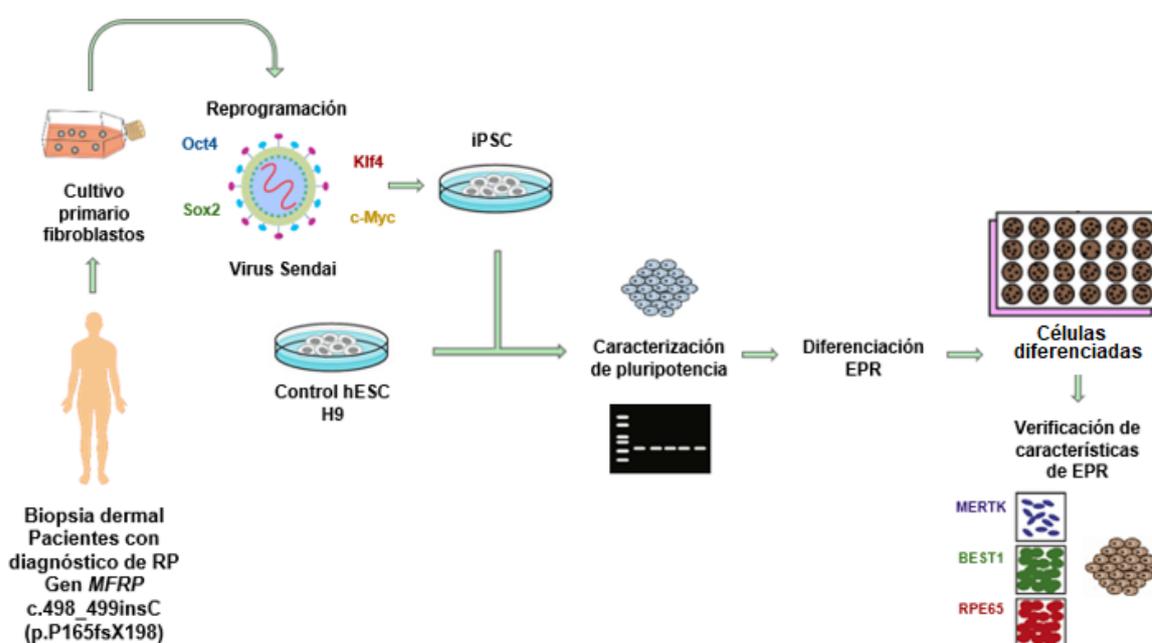


Figura 4. Esquema de la estrategia experimental del proyecto de investigación.

### 6.1. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio presentan un fenotipo característico de RP que se distingue por ser un síndrome de RP, nanofthalmos, y drusas del disco óptico. De estos sujetos de estudio, se realizó previamente la secuenciación Sanger para la región codificante del exón 5 del gen *MFRP* mediante la cual fue identificada la variante c.498\_499insC (p.P165fsX198) (Ayala *et al.*, 2006).

## 6.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos

Las biopsias de los pacientes y donantes fueron obtenidas y colectadas en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana previo consentimiento informado (Anexo 1). Este estudio fue aprobado por la Comisión de Ética de la División de Investigación de la Facultad de Medicina de la UNAM (protocolo No. IN215720). Cada biopsia fue realizada por un dermatólogo profesional, mediante punción en condiciones de esterilidad y fue tomada del antebrazo de cada uno de los sujetos de estudio. Los tejidos obtenidos fueron almacenados en medio fresco Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) 5% y Penicilina-Estreptomicina 0.2% (10,000 U/mL) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) a 4 °C, y fueron procesados en las primeras 24 horas.

### 6.2.1. Cultivos primarios

Cada biopsia se colocó en una caja Petri de vidrio estéril con medio Opti-MEM fresco suplementado, en donde se realizaron de 6 a 9 cortes a cada una. Estos cortes, fueron colocados en placas de 6 pozos de 9.5 cm<sup>2</sup>, previamente tratadas con Matrigel reducido en factores de crecimiento (Growth Factor Reduced-Matrigel, Corning, EUA) diluido 1:20 en medio DMEM F-12 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, EUA), y se colocaron de dos a tres cortes de biopsia por pozo al centro y separadas entre sí. Se agregaron 3 mL de medio Opti-MEM suplementado con SFB 10% y 0.1% Penicilina-Estreptomicina, con cuidado y sin desprender los tejidos, y la placa fue colocada en incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Las células necesitaron un tiempo aproximado de 24 horas para adherirse a la placa, posterior a esto, el medio se cambió cada 48 horas dependiendo de su crecimiento. Después de 20-30 días en estas condiciones, y una vez que las células migraron fuera de los trozos de tejido, el proceso completo de formación de la línea celular de fibroblastos fue establecido, y denominado cultivo primario.

### 6.2.2. Criopreservación de cultivos primarios de fibroblastos

Para su criopreservación, cuando los cultivos de la biopsia alcanzaron una confluencia del 90%, se les adicionó la enzima TrypLE Select Enzyme (1X) (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), y se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante

5 minutos. Posteriormente, las células se cosecharon con PBS 1X, para inactivar la enzima y se centrifugaron a 1,250 rpm durante 5 minutos. Después de este tiempo se retiró el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en una preparación de medio de congelación que contenía 7 mL de medio Opti-MEM, 2 mL de SFB y 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, Alemania) como criopreservante. Las células fueron alicuotadas en criotubos en 1 mL de medio de congelación libre de suero Bamberker (GC LYMPHOTEC Inc., Japón), y se congelaron gradualmente 12 horas a -50°C y a -80 °C hasta su uso.

### 6.3. Células pluripotentes embrionarias

#### 6.3.1. Obtención y cultivo de células embrionarias humanas H9

La línea de hESC Wa09, conocidas como H9 se utilizó como línea celular control y fueron adquiridas a través de WiCell, EUA. Estas células fueron cultivadas en Matrigel reducido en factores, diluido 1:20 en medio DMEM F-12, y fueron utilizadas siempre en una confluencia del 80%, la cual alcanzaron después de 5 días en cultivo cuando presentaron formación de colonias con una alta densidad. De esta línea celular H9, se obtuvieron suficientes cultivos para tener un stock criopreservado en laboratorio, y de igual forma se mantuvieron en propagación, para la subsecuente inducción a diferenciación de EPR.

#### 6.3.2. Caracterización de pluripotencia por inmunofluorescencia

Las células H9 control, fueron caracterizadas por inmunofluorescencia con el kit comercial Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA), para los factores de transcripción esenciales en el mantenimiento de pluripotencia SOX2, OCT4, SEEA4 y del marcador TRA 1-60, así como la tinción nuclear con NucBlue Fixed Cell Stain (DAPI). Para ello, las células se fijaron con solución de fijación (Paraformaldehído al 4%) a temperatura ambiente durante 15 minutos. La solución fue retirada y las células fueron permeabilizadas (0.2% de Tritón) y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Nuevamente, la solución fue retirada y las células fueron bloqueadas con solución de bloqueo (BSA 1%, Tritón 0.2%) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posterior a este tiempo, se adicionaron los

anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo a una concentración final de 1X y las células se incubaron a 4 °C toda la noche. Después, se retiró la solución de bloqueo con los anticuerpos y se prosiguió con una serie de tres lavados con solución buffer (BSA 1%) de 3 minutos cada uno. Luego de los lavados, los núcleos se tiñeron con 1 gota /mL de NucBlue Fixed Cell Stain (DAPI) (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). Se realizaron los análisis de fluorescencia mediante un microscopio Olympus IX71 y el programa QCapture Suite. Los anticuerpos utilizados para el análisis de inmunofluorescencia se muestran en la Tabla 1.

**Tabla 1. Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia de células H9 y células iPSC.**

	<b>Dilución 1:X</b>
<b>Anticuerpos primarios</b>	
anti-OCT4 (host: rabbit)	200
anti-SOX2 (host: rat)	100
anti-SSEA4 (host: mouse IgG3)	100
anti-TRA-1-60 (host: mouse IgM)	100
anti-NANOG (host: rabbit)	100
<b>Anticuerpos secundarios</b>	
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse	250
Alexa Fluor 488 donkey anti-rat	250
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit	250
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG2a	250

#### 6.4. Generación y caracterización de células troncales pluripotenciales inducidas

##### 6.4.1. Reprogramación celular de fibroblastos dermales con virus Sendai

La reprogramación celular de fibroblastos de pacientes con la variante en el gen *MFRP* se logró mediante el uso del kit comercial de reprogramación CytoTune™-iPSC 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific Inc., EUA). La preparación de las células de fibroblastos inició dos días antes de la transducción. Se sembraron en medio de fibroblastos compuesto por DMEM alto en glucosa suplementado con SFB 10% y MEM NEEA (100X) 1%

(Gibco, Thermo Fischer Scientific Inc., EUA), en 4 pozos de una placa de 6 pozos de 9.5 cm<sup>2</sup>, a una densidad de 190,000 células/mL, una densidad apropiada para alcanzar entre 200,000-220,000 células en el día de transducción (Día 0). Uno de los pozos se utilizó para contar y calcular el volumen viral. Las células fueron cultivadas por 2 días más, para asegurar que estuvieran completamente adheridas y extendidas.

El día de la transducción, se colocó 1 mL de medio de fibroblastos en un baño de agua caliente, por cada pozo a ser transducido. Las células de un pozo fueron cosechadas y contadas para estimar el número de células por pozo. Después, las células fueron removidas de la placa usando 0.5 mL de TrypLE 1X (Gibco, Thermo Fischer Scientific Inc., EUA), y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Posteriormente, se agregó 1 mL de medio de fibroblastos a cada pozo y las células se colectaron en un tubo de 15 mL. El volumen necesario de cada virus fue calculado con la información de titulación en el Certificado de Análisis del kit para realizar la transducción con los valores de MOI (multiplicidad de infección) optimizados a: Klf4/Oct3/4-Sox2 MOI=5, hc-Myc MOI=5, hKlf4 MOI=3. Los tubos de cada virus fueron removidos de su almacenamiento a -80 °C. Se descongelaron sumergiendo el fondo del tubo en un baño de agua a 37 °C por 10 s, se permitió continuar su descongelación a temperatura ambiente, y fueron colocados en hielo. Más tarde, los volúmenes calculados de cada uno de los tubos del kit fueron agregados a 1 mL de medio de fibroblastos pre-calentado a 37 °C. La solución se mezcló por pipeteo suave arriba y abajo. Se completó el paso siguiente dentro de los siguientes 5 minutos. Se aspiró el medio de fibroblastos de las células y se agregó la mezcla preparada de virus de reprogramación al pozo que contenía las células y se incubaron toda la noche a 37 °C, en incubadora con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas de la transducción, se reemplazó el medio con medio de fibroblastos fresco. Las células se cultivaron por 6 días más, y el medio fue cambiado por medio de fibroblastos fresco diariamente.

Los fibroblastos fueron cosechados y sembrados en placas de cultivo cubiertas con Matrigel 1:20. Para esto, el medio fue removido y las células se lavaron con solución PBS 1X. Posteriormente, las células fueron removidas con 0.5 mL de TrypLE (1X), y se incubaron a temperatura ambiente durante 3 minutos. Se

colectaron con 2 mL de medio de fibroblastos adicionales por pozo en un tubo de centrífuga cónico de 15 mL y las células recuperadas se centrifugaron a 1,250 rpm por 4 minutos. A continuación, se realizó el conteo de las células y se sembraron en las placas previamente cubiertas con 1 ml de matrigel 1:20 por pozo a una densidad de 100,000 células/mL para ser incubadas.

Después de 24 horas, el medio se cambió a medio *Essential 8* (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) con 10 ng/mL de *recombinant human FGF-basic* (Sigma-Aldrich, EUA) y se removió cada día siguiente. A partir de este momento, las células se monitorearon bajo el microscopio por la aparición de grupos de células indicativas de células reprogramadas (colonias compactas, compuestas de células redondas con núcleo prominente y borde refractante). Tres semanas después de la transducción, las colonias crecieron a un tamaño apropiado para transferirse. Las colonias de iPSC indiferenciadas se eligieron manualmente y fueron transferidas a otra placa de cultivo previamente cubierta con Matrigel diluido 1:20 para su expansión.

#### 6.4.2. Selección y toma de colonias de células iPSCs

Las colonias de células iPSC fueron aisladas después de 3 semanas de cultivo. Para esto, se marcaron previamente por debajo de la placa de cultivo y se seleccionaron al menos 10 colonias diferentes. Haciendo uso de una jeringa con aguja de 25G y bajo el microscopio dentro de la campana de bioseguridad, se cortaron manualmente las colonias delimitando la periferia de cada colonia marcada. Se utilizó una micropipeta de 200  $\mu$ L para recuperar cuidadosamente y transferir los segmentos de las colonias cortadas a tubos de 1 mL con medio fresco *Essential 8* (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) suplementado con FGF 10 ng/mL que posteriormente fue trasladado a placas previamente cubiertas con matrigel diluido 1:20. La placa con la selección de colonias se incubó a 37 °C con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>, por al menos 48 horas antes de reemplazar el medio con medio fresco. Después de esto, el medio fue reemplazado cada día para permitir su crecimiento. Con el transcurso de los días las colonias mostraron un comportamiento más estable, sin diferenciación repentina, con los bordes más

definidos y colonias compactas compuestas de células homogéneas en tamaño, redondas con poco citoplasma y un núcleo grande.

#### 6.4.3. Cultivo y expansión de células iPSC

Las células iPSC se expandieron para asegurar un stock en el laboratorio de la línea celular generada, y de igual manera se mantuvieron en cultivo para su uso. Estas células fueron cultivadas en placas previamente cubiertas de matrigel diluido 1:20. Las células fueron alimentadas con medio E8 suplementado con FGF 20 ng/mL e incubadas a 37 °C con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub>. Al alcanzar una confluencia del 80% se criopreservaron en medio Bambanker.

#### 6.4.4. Extracción de DNA de células iPSC

Para el análisis de la secuencia de DNA de las células iPSC en la región específica de la mutación del exón 5 del gen *MFRP*, las células en cultivo fueron recolectadas en una confluencia del 80-90% con una solución de *Collagenase IV* al 0.1% y se incubaron durante 15-20 minutos, hasta que las colonias comenzaban a levantarse de la matriz por el borde y fueron recuperadas. Después de este tiempo, las células se resuspendieron en medio E8 suplementado con FGF 20 ng/mL y el DNA fue aislado con el kit All-Prep (QIAGEN, EUA) siguiendo las recomendaciones del proveedor. La reacción de PCR con los primers específicos del exón 5 del gen *MFRP*, así como la reacción para la secuenciación Sanger se llevó a cabo en el Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana, siguiendo el protocolo descrito previamente (Ayala-Ramírez *et al.*, 2006).

#### 6.4.5. Caracterización de pluripotencia por inmunofluorescencia

Las células reprogramadas fueron evaluadas por su morfología, es decir la formación de colonias características, la apreciación de la relación núcleo-citoplasma, así como la valoración de bordes redondos brillantes reflectantes en la periferia de cada una de estas colonias. Para comprobar la expresión de proteínas asociadas a la pluripotencia en la línea celular reprogramada, se realizaron análisis de inmunofluorescencia para factores transcripcionales esenciales en el mantenimiento de la pluripotencia con el kit Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit como se mencionó en el apartado 5.3.2. Los análisis de

fluorescencia fueron realizados mediante un microscopio Olympus IX71 (Olympus Scientific Solutions, EUA) y el programa QCapture Suite. Los anticuerpos utilizados para el análisis de inmunofluorescencia se muestran en la Tabla 1.

#### 6.4.6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina (AP)

La actividad de la AP se evaluó por un ensayo colorimétrico, 3 semanas post-transducción en las células que tenían un cambio morfológico y con crecimiento de colonias. El ensayo se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit comercial SIGMAFAST BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Alemania). Brevemente, después de retirar el medio de las células éstas fueron lavadas con solución PBS 1X, y posteriormente se le colocó 1 mL de una solución que fue preparada al momento con una tableta disuelta en 10 mL de agua estéril, y se dejó incubar durante 15 minutos. Al finalizar, la solución de trabajo fue retirada y se realizaron dos nuevos lavados con solución de PBS 1X. Las colonias positivas a AP se mostraron como colonias azul oscuro.

#### 6.4.7. Análisis de expresión de genes endógenos por RT-PCR

Para el análisis de expresión de genes de interés se aisló el RNA total con el kit RNeasy (QIAGEN, EUA) y se siguieron las recomendaciones del proveedor. Las reacciones de RT-PCR se realizaron con el kit Quantinova (QIAGEN, EUA) con la enzima Transcriptasa Reversa y se procesaron en un equipo RotorGene 6000 (Corbett Life Science). Las células se evaluaron en dos estadios, como células pre-iPSC y como células iPSC establecidas del pase 14, para identificar la presencia y/o ausencia de los genes SOX2, OCT4 y Klf4 (Tabla 2). Como control interno se utilizaron primers específicos para el gen GAPDH. El análisis de datos se realizó utilizando el software Roto-Gene Q (QIAGEN) y los gráficos fueron realizados con el programa GraphPad Software (EUA).

**Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para evaluar la expresión de genes asociados a pluripotencia.**

Oligonucleótido	Secuencia
SOX2 Forward	GCCGAGTGGAACTTTTGTCG
SOX2 Reverse	GGCAGCGTGTACTTATCCTTCT

**Continuación Tabla 2.**

<b>Oligonucleótido</b>	<b>Secuencia</b>
NANOG Forward	TTTGTGGGCCTGAAGAAAAC
NANOG Reverse	AGGGCTGTCCTGAATAAGCAG
Klf4 Forward	CCCACATGAAGCGACTTCCC
Klf4 Reverse	CAGGTCCAGGAGATCGTTGAA

**6.5. Ensayo de diferenciación de EPR**

Para la generación del EPR se utilizó el protocolo de diferenciación de Maruotti (Maruotti *et al*, 2015), compartido por el Dr. Shyamanga Borooh de la Universidad de California San Diego, quien es colaborador del grupo de investigación del Departamento de Genética del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana.

De manera general, este protocolo consiste en el establecimiento eficiente de EPR dirigido por moléculas pequeñas como son la nicotinamida (NIC) y quetomina (CTM). Las soluciones fueron preparadas previo a iniciar cada ensayo de diferenciación. Para la solución de NIC 1 M stock (100X), se utilizaron 50 mL de agua para cultivo, a la que se le adicionaron 6.1 g de NIC (Sigma Aldrich, Alemania). Posteriormente, esta mezcla se esterilizó con un filtro para jeringa de 40 mm. Esta solución se mantuvo a 4 °C hasta su uso, durante 1 mes y fue utilizada a una concentración final de 10 nM. Para la solución de CTM (Sigma Aldrich, Alemania) se preparó una solución stock a 1 mM, para esto fue diluido 1 mg de CTM en 1.4 mL de DMSO para cultivo celular (Sigma Aldrich, Alemania) y se utilizó a una concentración de 25-100 nM. La solución se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Adicionalmente se utilizaron dos medios basales, un medio de Diferenciación de EPR (MD) (Tabla 3) y otro medio para el mantenimiento de células del EPR (MEPR) (Tabla 4).

**Tabla 3. Composición de Medio de Diferenciación (MD) para EPR.**

<b>Medio y suplementos</b>	<b>Concentración</b>	<b>500 mL</b>
DMEM/F12		425 mL

**Continuación Tabla 3.**

<b>Medio y suplementos</b>	<b>Concentración</b>	<b>500 mL</b>
Knock Out Serum Replacement	15%	75 mL
Glutamina 100x	2 mM	5 mL
Aminoácidos no esenciales 100x	0.1 mM	5 mL
Antibiótico-Antimicótico 100x	1%	5 mL
b-Mercaptoetanol	0.1 mM	3.5 mL

**Tabla 4. Composición del medio de mantenimiento de EPR.**

<b>Medio y suplementos</b>	<b>Concentración, % (vol/vol)</b>	<b>500 mL</b>
DMEM	70	350 mL
F12	30	150 mL
B27 xenofree, 50x	2	10 mL
Antibiótico-Antimicótico, 100x	1	5 mL

Las células se colocaron en placas de seis pozos previamente cubiertas con Matrigel diluido 1:20 a una alta densidad, y se colocaron 3 mL de medio E8 por pozo, hasta la formación de una monocapa de aproximadamente 80% de confluencia. Al alcanzar esta densidad, el medio se cambió por 3 mL de MD y se utilizaron 3 mL por pozo. Al día siguiente, las células fueron alimentadas con MD adicionado con NIC 10 mM a una concentración de 25-100 nM CTM (MD NC) por dos semanas. El medio fue cambiado diariamente durante este tiempo agregando solución fresca de cada una de las moléculas. Después de dos semanas bajo estas condiciones, el medio se cambió por MD adicionando solo NIC 10 mM por dos semanas y nuevamente el medio fue cambiado diariamente con solución de NIC fresca. Después de dos semanas, el medio se cambió por MEPR, utilizando 2 mL por pozo, y las células fueron alimentadas diariamente con este medio durante 35 días. Al día 35 el MEPR fue removido y se adicionó 1 mL de *StemPro Accutase* (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA) para disociar las células. Se incubaron de 10 a 20 minutos a 37 °C con atmósfera húmeda de 5% de CO<sub>2</sub> hasta que las

células se mostraron redondas. Se adicionaron 2 mL de MEPR y fueron transferidos a un tubo cónico de 15 mL que se centrifugó a 1,250 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue removido y las células se resuspendieron en MEPR, fueron sembradas a una densidad de 250,000 células/cm<sup>2</sup>, y se rotularon como pase 1 (P1). Posteriormente, alrededor del día 15 a 20 de cultivo después del P1, las células se recolectaron con *StemPro Accutase* y fueron sembradas a una densidad de 100,000 células/cm<sup>2</sup>. Finalmente, se realizó 1 pase celular cada 4 semanas bajo las condiciones mencionadas anteriormente, hasta completar un total de 12 semanas.

#### 6.5.1. Análisis de expresión por RT-PCR de genes asociados a diferenciación retiniana

Para evaluar la presencia de marcadores en progenitores retinianos y en células del EPR maduras en las líneas celulares estudiadas, se realizó la extracción de RNA total con el kit RNeasy (QIAGEN, EUA) como se mencionó anteriormente, y las reacciones de RT-PCR se realizaron con el kit Quantinova y se procesaron en un equipo RotorGene 6000 (Corbett Life Science). Las células fueron recuperadas al día 10, 20 y 30 de diferenciación con moléculas pequeñas y en el P2 de células maduras de EPR. Los oligonucleótidos utilizados fueron descritos en otras publicaciones (Meyer *et al.*, 2009; Maruotti *et al.*, 2015), y otros fueron diseñados para este trabajo, OTX2, PAX6 y MITF (Factor de transcripción asociado a microftalmia) (Tabla 5).

**Tabla 5. Oligonucleótidos para la caracterización de marcadores de EPR por RT-PCR.**

Oligonucleótido	Secuencia
OTX2 (Forward)	ACCTTGAACTCCACCTCT
OTX2 (Reverse)	GCTTCTCTTCTCTGACTCTCTTTG
MITF (Forward)	AAATGGCAAATACGTTGCCTG
MITF (Reverse)	ACTCTGTGAGCTCCCTTTTTATG
PAX6 (Forward)	AGTGAATCAGCTCGGTGG

**Continuación Tabla 5.**

PAX6 (Reverse)	TGCAGAATTCGGGAAATGTCGCAC
BEST1 (Forward)	CTGGGCTTCTACGTGACGC
BEST1 (Reverse)	TTGCTCGTCCTTGCCTTCG
MERTK (Forward)	CTCTGGCGTAGAGCTATCACT
MERTK (Reverse)	AGGCTGGGTTGGTGAAAACA
RPE65 (Forward)	GCCAATTTACGTGAGAACTGGG
RPE65 (Reverse)	CCAGATAGTCTCGTCACTGCAC

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Sujetos de estudio

Los sujetos de estudio presentan un fenotipo retiniano característico de RP asociado a otros hallazgos oculares como nanofthalmos y drusas del disco óptico. De estos sujetos de estudio, se realizó previamente la secuenciación Sanger en DNA genómico para la región codificante del exón 5 del gen *MFRP* y se identificó la variante c.498\_499insC (p.P165fsX198) en estado homocigoto (Ayala *et al.*, 2006). Los donantes familiares presentan de igual manera la variante genética en el gen *MFRP* en estado homocigoto (Tabla 6).

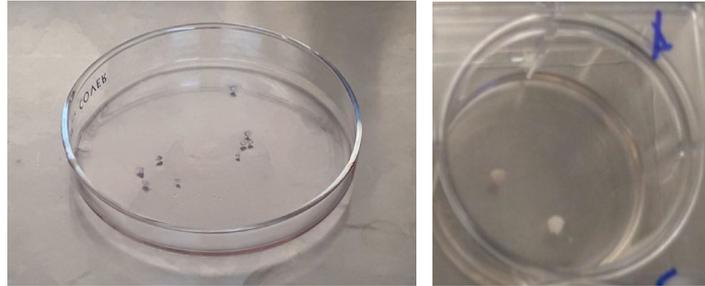
**Tabla 6. Relación de las variantes en el gen *MFRP* de los sujetos de estudio.**

Sujeto #	Cigosidad para c.498_499insC en <i>MFRP</i>	Fenotipo
1	Homocigoto	Afectado (RP, nanofthalmos, drusas)
2	Homocigoto	Afectado (RP, nanofthalmos, drusas)
3	Homocigoto	Afectado (RP, nanofthalmos, drusas)

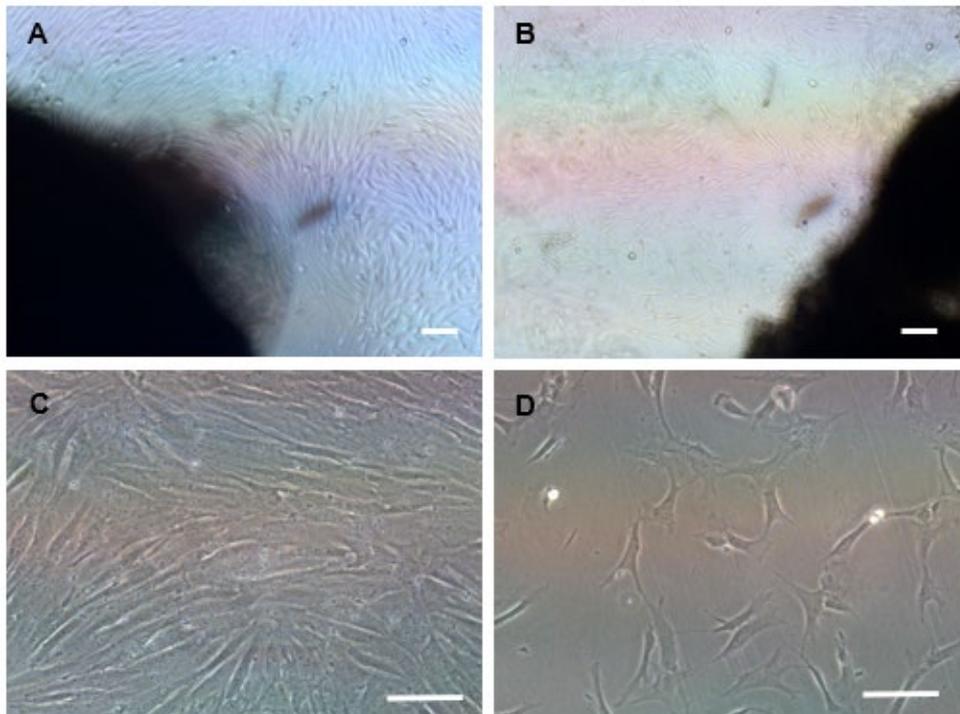
### 7.2. Aislamiento y cultivo de fibroblastos dermales

#### 7.2.1. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos

Previo consentimiento informado, se obtuvieron biopsias cutáneas de los tres sujetos de estudio se les realizaron cortes para poder sembrarlas (Figura 5 izquierda). Posteriormente, los fragmentos fueron colocados en una placa con Matrigel (Figura 5 derecha). El cultivo primario se logró después de 30 días en incubación. En estos cultivos fueron identificadas células de tamaño adecuado con morfología normal de fibroblastos: células fusiformes con prolongaciones citoplasmáticas relativamente cortas y ramificadas (Figura 6).



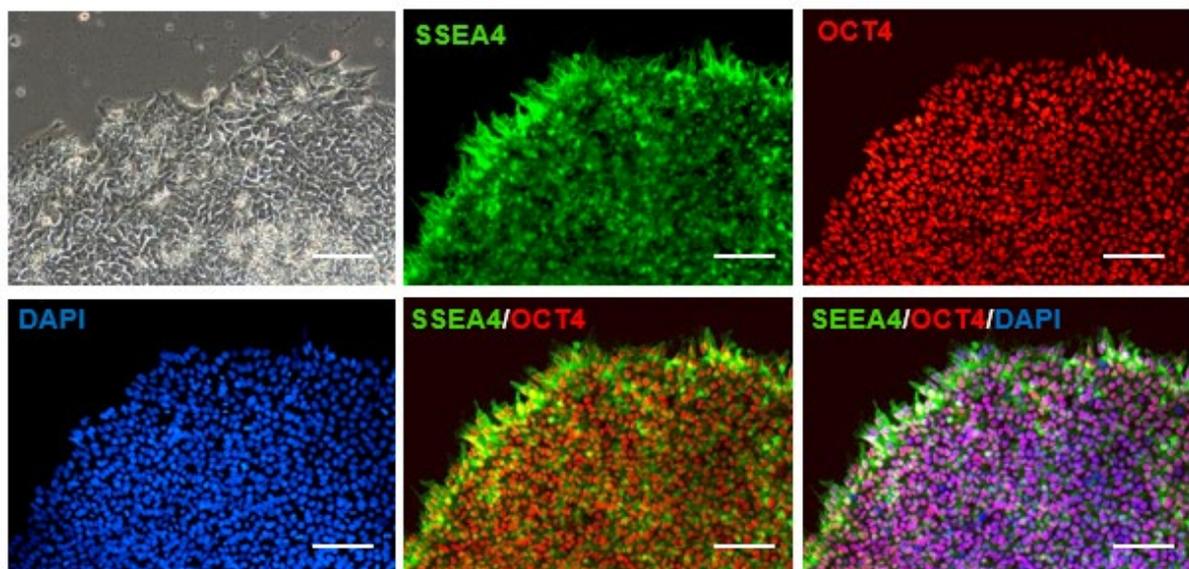
**Figura 5. Procesamiento de biopsias de los sujetos de estudio.** Izq.: se observan los 9 cortes que se realizaron a cada biopsia, se realizó el corte en medio Opti-MEM suplementado. Der.: corte de biopsia en placa con Matrigel para establecer el cultivo de fibroblastos.



**Figura. 6. Establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos dermales provenientes de un sujeto con RP por mutación en el gen *MFRP*.** Biopsias adheridas a la matriz: A y B) Se observa por microscopía de contraste de fases cómo las células comienzan a adherirse a la matriz extracelular, la parte más oscura corresponde al tejido de piel que no logra ser enfocada correctamente por sus dimensiones. Barras de escala: 100  $\mu$ m. Células de fibroblastos de biopsia de piel: C) con una confluencia del 90%, D) acercamiento a estas células, se observan células de buen tamaño, con características morfológicas de fibroblastos. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

### 7.3. Caracterización de marcadores de pluripotencia en células H9

La línea celular H9 se utilizó como línea celular control. Estas células fueron cultivadas, expandidas y criopreservadas, y se generaron suficientes viales para asegurar el stock de las células en el laboratorio. Las células H9 formaron colonias compactas con bordes distintivos y con límites bien definidos, compuestas por células con un núcleo prominente. Fueron caracterizadas por inmunofluorescencia para los factores de transcripción SSEA4 y OCT4, para los que fueron positivas (Figura 7).



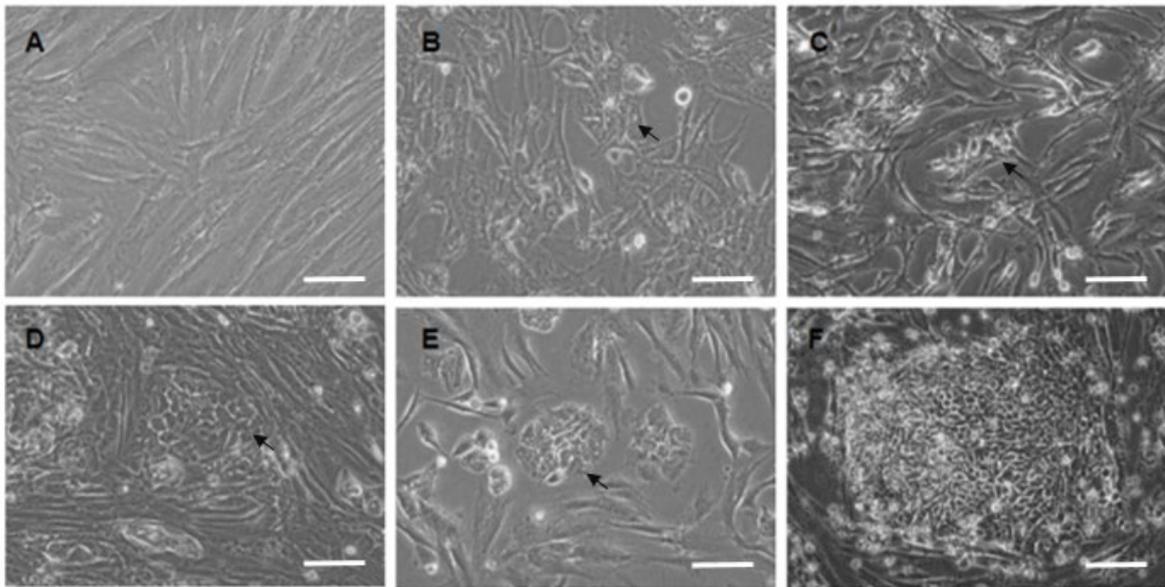
**Figura 7. Caracterización morfológica y por inmunofluorescencia de la línea de células hESC H9.** En el primer recuadro superior izquierdo, se aprecia una morfología típica de colonias troncales pluripotentes. En los siguientes recuadros, la expresión de los marcadores de pluripotencia en células H9 (SSEA4, OCT4) fue demostrada con inmunofluorescencia; los núcleos fueron teñidos con DAPI. Barras de escala: 50µm.

### 7.4. Generación de células iPSC de un sujeto con RP y caracterización de pluripotencia

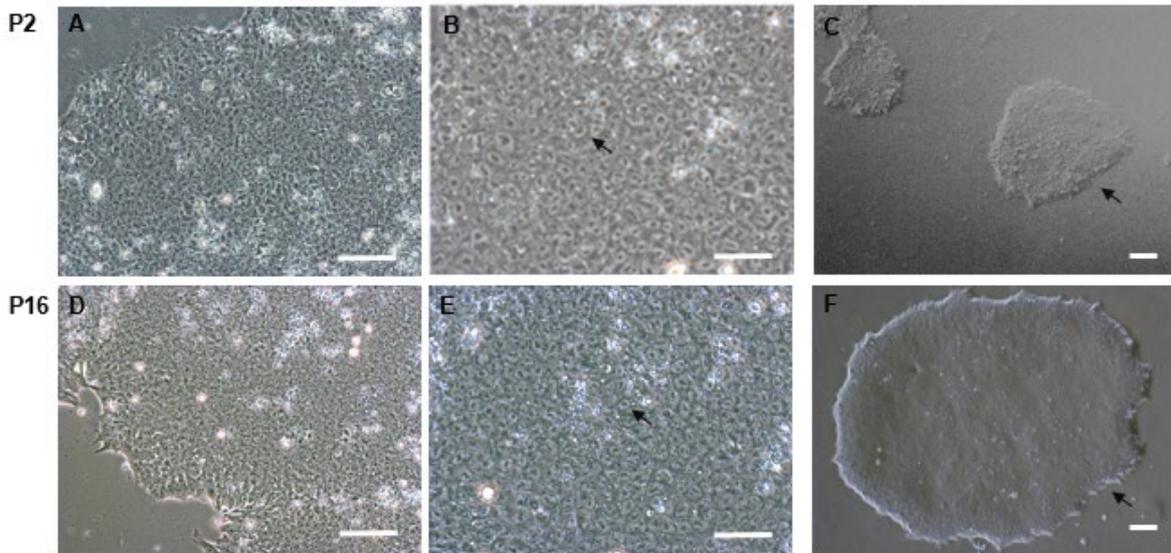
#### 7.4.1. Reprogramación con virus Sendai de fibroblastos de sujeto con RP

La reprogramación de los fibroblastos dermales provenientes del paciente con mutación en el gen *MFRP* se llevó a cabo con partículas de virus Sendai con

los factores esenciales para la generación eficaz de células iPSC. Se utilizó una preparación de vectores policistronicos Klf4-Oct3/4-Sox2, cMyc y Klf4 en un MOI optimizado a 5, 5, 3, respectivamente. Se obtuvo un registro fotográfico para evaluar la morfología y su homogeneidad celular durante los días 3, 5, 7, 10 y 19 post-transducción (Figura 8). A los 21 días las colonias indiferenciadas fueron identificadas y seleccionadas. Se identificaron como colonias compactas (Figura 9A y 9D), compuestas por células con núcleos largos en comparación con el citoplasma, redondas y pequeñas (Figura 9B y 9E), con bordes distintivos y bien definidos (Figura 9C y 9F). Las colonias que mostraron una morfología irregular (un indicador de que la diferenciación fue interrumpida, modificando su estatus de células troncales pluripotentes) no fueron elegidas para su propagación. Las células que tenían la morfología deseada fueron aisladas, expandidas, caracterizadas y denominadas línea iPSC-MFRP. Estas células se criopreservaron para su almacenamiento y uso posterior. Las fotografías mostradas de las colonias aisladas corresponden al pase celular dos (P2), y al pase celular 16 (P16), dónde se observa el mantenimiento de la morfología característica de esta línea celular generada.



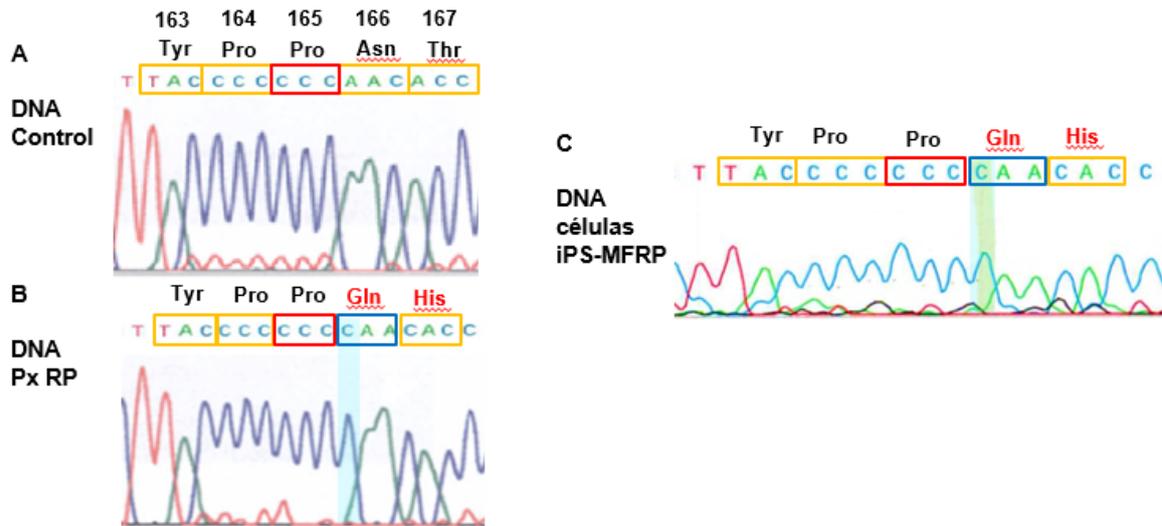
**Figura 8. Fotografías de la reprogramación de fibroblastos dermales con virus Sendai a diferentes tiempos de transducción.** A) Día de la transducción, se observa la morfología fusiforme típica de células de fibroblastos y con núcleos de forma ovoide. B) Día 3 post-transducción, se observa que la morfología empieza a cambiar y pierden su forma fibroblastoide. C) Día 5 post-transducción, se distingue un cambio de morfología a células más redondas, asimismo se observa muerte celular. D) Día 7 post-transducción, se aprecia que los fibroblastos que lograron reprogramarse han cambiado su morfología y se observan grupos de estas células. E) Al día 10 post-transducción, se observa la formación de pequeñas colonias compuestas de células compactas. F) Día 19 post-transducción, se observan colonias de células iPSC más definidas y delimitadas, en las que se aún se distinguen uniones intercelulares. Barras de escala: 50  $\mu$ m.



**Figura 9. Morfología de células troncales en las células de la línea iPSC-MFRP seleccionadas del ensayo de reprogramación celular en P2 (A, B y C) y P16 (D, E y F).** A y D) Se observan las células agregadas en colonias características. Barra de escala: 100 µm. B y E) se puede observar la relación núcleo-citoplasma característica. Barra de escala: 50 µm. C y F) Fotografías de contraste de fase, se observa borde refractante de una colonia de células iPSC. Barras de escala: 100 µm.

#### 7.4.2. Validación de la variante del gen *MFRP* en células iPSC-MFRP

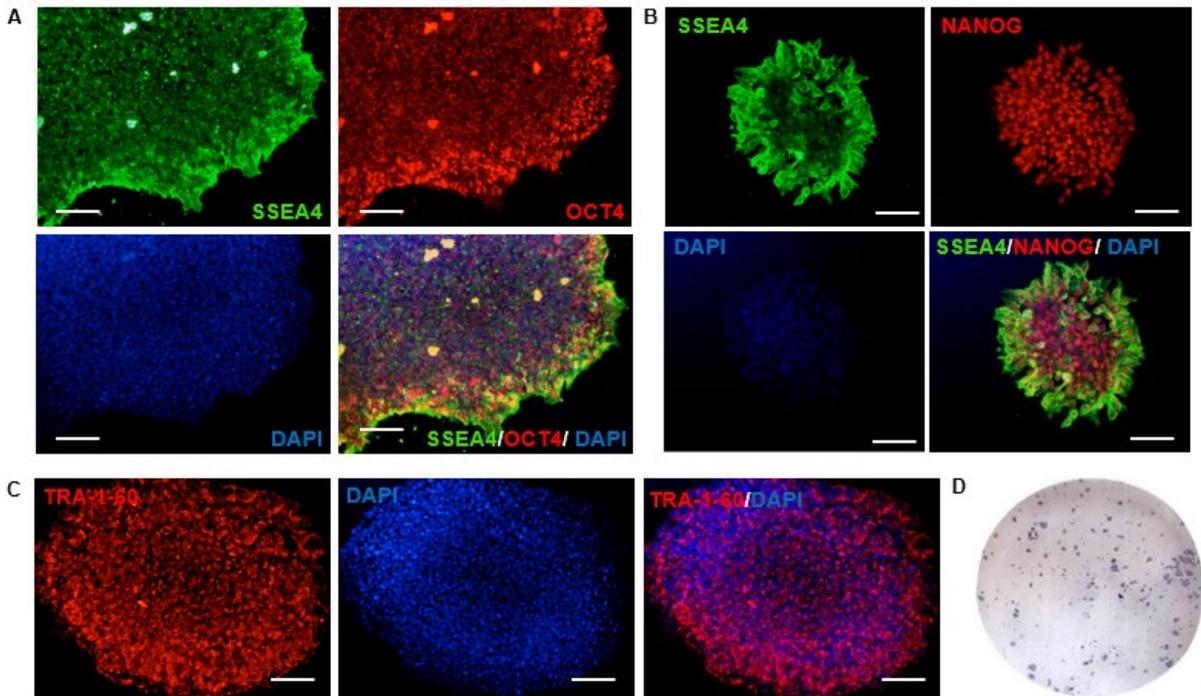
Al haberse establecido la línea de células iPSC-MFRP, se llevó a cabo la expansión de la línea celular, así como su criopreservación. Posteriormente, se realizó la extracción de DNA de la línea celular reprogramada y se validó mediante secuenciación Sanger que la variante del sujeto de estudio con diagnóstico clínico de RP en exón 5 en el gen *MFRP* c.498\_499insC (p.P165fsX198) efectivamente se encuentra presente en estado homocigoto6 (Figura 10).



**Figura 10. Validación de la secuencia nucleotídica en la línea celular iPSC-MFRP en el síndrome de RP, nanofthalmos-retinosis pigmentaria-foveosquiasis-drusas del disco óptico.** A) Secuencia normal de un DNA control en el panel superior. B) Inserción homocigota en la posición del nucleótido 499 (codón 166) en el sujeto afectado en el panel inferior (Ayala-Ramírez *et al.*, 2006); C) Secuencia nucleotídica de la línea celular de iPSC-MFRP con la variante c.498\_499insC (p.P165fsX198) presente.

#### 7.4.3. Las colonias de células iPSC-MFRP seleccionadas expresaron marcadores de pluripotencia

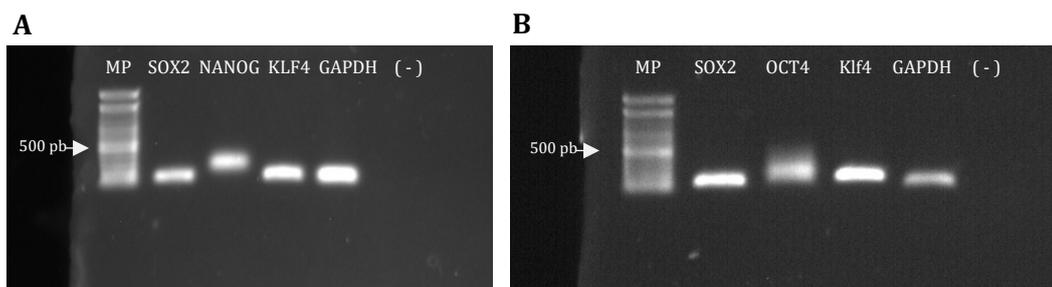
Para constatar la expresión de proteínas asociadas a la pluripotencia en la línea celular reprogramada, se realizaron análisis de inmunofluorescencia para factores transcripcionales esenciales en el mantenimiento de la pluripotencia. Se utilizaron los marcadores establecidos de células troncales pluripotentes humanas (OCT4, NANOG, SSEA4 y TRA-1-60) y se encontró que eran positivas (Figura 11A, B y C), así como la evaluación de la morfología característica de dichas células en estado pluripotente, es decir, con una morfología más redondeada y compacta, típica de células embrionarias, sin señales de diferenciación durante todo el proceso de cultivo. Las colonias seleccionadas evidenciaron la actividad de la fosfatasa alcalina en todas las colonias formadas (Figura 11D). Estos resultados demostraron que las células iPSC obtenidas cumplen con características de pluripotencia.



**Figura 11. Caracterización por inmunofluorescencia de la línea iPSC-MFRP.** Detección de la expresión de los marcadores de pluripotencia (OCT4, NANOG, SSEA4, TRA-1-60) por inmunofluorescencia; los núcleos fueron teñidos con DAPI. A) Inmunotinción de marcador de superficie SSEA4 y nuclear Oct4. B) Inmunotinción de marcador de superficie SSEA4 y nuclear NANOG. C) Inmunotinción de marcador de superficie TRA-1-60. D) Detección de la fosfatasa alcalina en las colonias de células pluripotentes. Barras de escala: 50  $\mu$ m.

#### 7.4.4. Análisis de expresión de genes endógenos por RT-PCR en línea de células iPSC con mutación en *MFRP*.

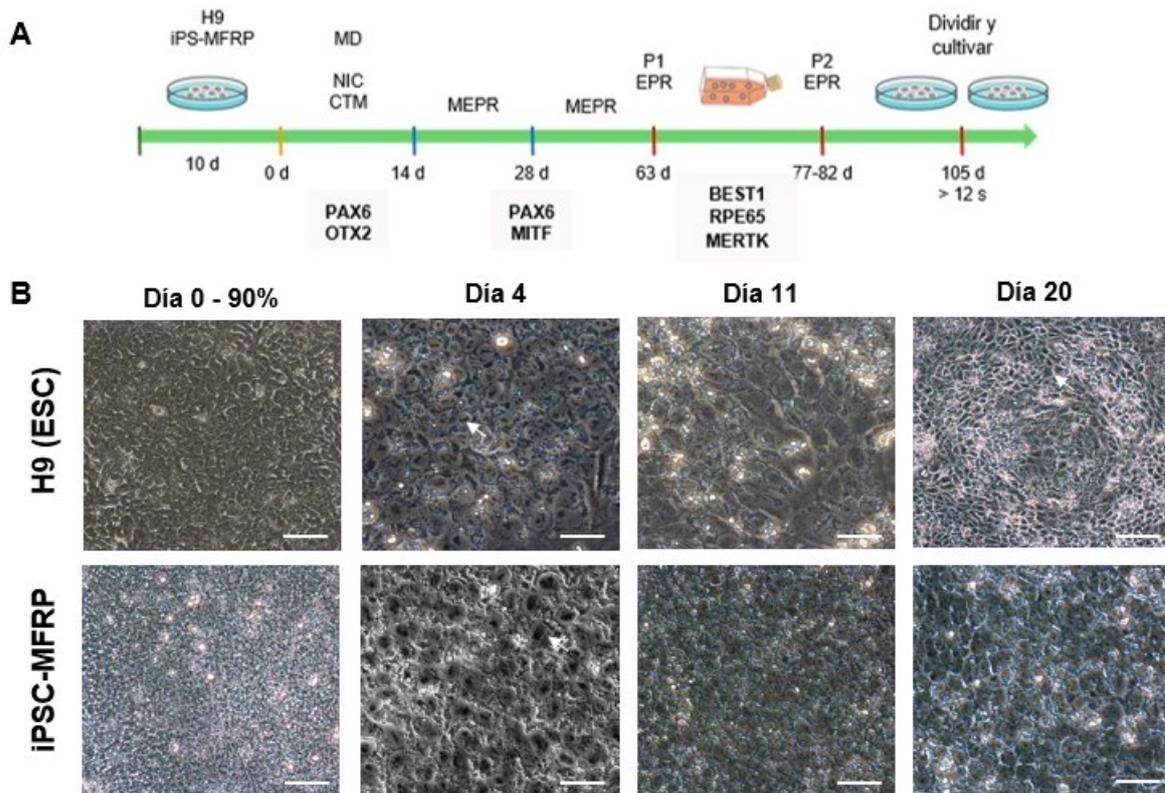
Las células iPSC-MFRP se caracterizaron por la expresión de los genes de pluripotencia SOX2, NANOG y Klf4 por medio de RT-PCR y en este análisis se pudo observar la expresión de los factores (Figura 12A). Paralelamente, se realizó este ensayo en células iPSC del pase 14, para verificar que las células expresan dichos factores (Figura 12B). Estos resultados indican que la línea generada de células iPSC cuenta con la capacidad de pluripotencia ya que expresan los tres factores característicos de pluripotencia.



**Figura 12. RT-PCR de genes endógenos del circuito de pluripotencia.** Expresión endógena de los marcadores de pluripotencia SOX2, NANOG, Klf4 en células iPSC.MFRP. GAPDH fue utilizado como control constitutivo. A) Células pre-iPSC, B) Células de la línea iPSC-MFRP pase14.

### 7.5. Diferenciación de células H9 y células iPSC-MFRP a células del EPR

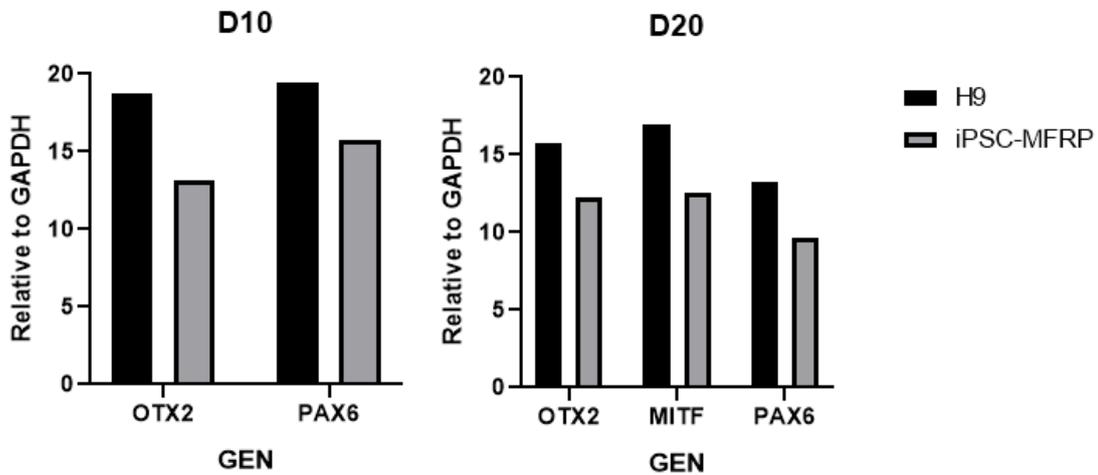
Después de haber establecido que la línea de células H9 y células iPSC-MFRP son pluripotentes, se llevó a cabo su diferenciación a EPR. Las células fueron cultivadas en monocapa hasta una confluencia de 90% a la que fueron utilizadas. Después del tratamiento de diferenciación con moléculas pequeñas NIC y CTM (Figura 13A), se lograron observar células diferenciadas a partir del día 4. En los días siguientes se observaron cambios morfológicos significativos en las células, las cuales perdieron la pluripotencia, desarrollando un espacio intercelular dentro de la colonia, así como también se observa la expansión de la distancia entre células y un núcleo oscuro (Figura 13B). Adicionalmente, se logró observar la aparición de una pequeña cantidad de pigmento (que corresponde a melanina), en las células a partir del día 20, indicando que las células respondían apropiadamente a los estímulos de las moléculas pequeñas, NIC como inductor neural y CTM como promotor de la diferenciación a EPR, lo cual resultó importante para continuar con la diferenciación y la sustitución de medio para células del EPR. Sin embargo, se puede apreciar en la Figura 13B que las células iPSC-MFRP lograron alcanzar la morfología esperada de las H9 del día 11, hasta el día 20. Esto nos indica que las células iPSC-MFRP requieren de un mayor tiempo para su diferenciación.



**Figura 13. Proceso de diferenciación a células del EPR.** A) Esquema general del protocolo de diferenciación de Maruotti *et al.*, 2015 utilizado en este trabajo y los genes blanco evaluados PAX6, OTX2, MITF, BEST1, RPE65 y MERTK en la diferenciación ocular a los 11, 20 y días. B) Registro de la morfología a partir de microscopia de las células H9 control y las células iPSC-MFRP al día 0, 4, 11 y 20. NIC: nicotinamida, CTM: quetomina, d: días, s: semanas. Barras de escala: 50  $\mu$ m. d: días; s: semanas; >12: mayor a 12 semanas.

Simultáneamente, para determinar el potencial de diferenciación hacia progenitores retinianos en el protocolo utilizado, se evaluó la presencia de la expresión de los marcadores tempranos OTX2 y PAX6 al día 10 y 20 de diferenciación, así como de MITF, y fueron comparados con la expresión en la línea celular control (Figura 14). Los marcadores de células progenitoras de EPR mostraron expresión al día 20 con una expresión menor en las células iPSC-MFRP comparadas con la línea H9. De manera particular, en el día 20 se observó una reducción en la expresión de OTX2, pues se pierde durante el proceso de

diferenciación, mientras que la expresión de PAX6 se mantiene durante la diferenciación retinal.



**Figura 14. Análisis de expresión de marcadores de progenitores retinianos OTX2, PAX6 y MITF en la línea H9 y iPSC-MFRP al día 10 y 20 de diferenciación.** Los valores mostrados están normalizados respecto a GAPDH.

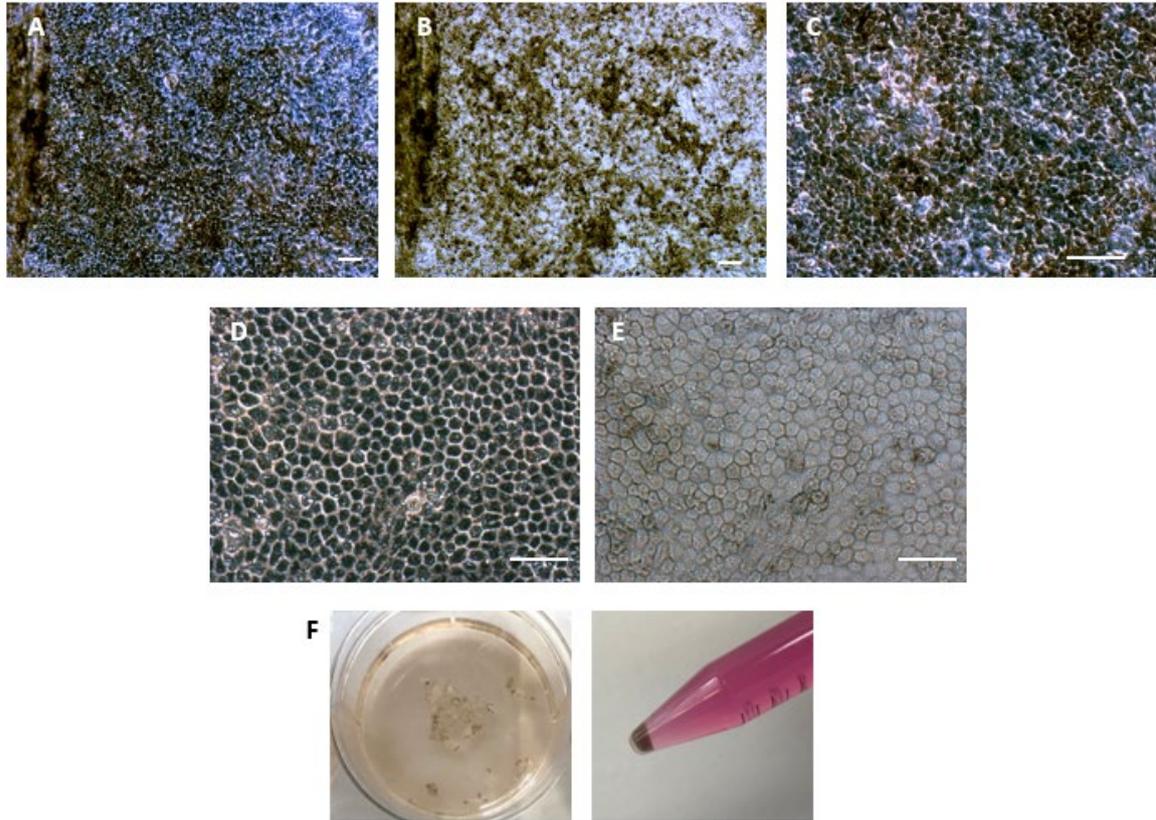
Las células H9 diferenciadas, alcanzaron su desarrollo a células del EPR al día 63, después del pase celular 1. En comparación con las células iPSC-MFRP tardaron más tiempo en alcanzar una morfología similar mediante la diferenciación. Las células H9 diferenciadas, mostraron pigmentación visible (Figura 15A) y una morfología característica de células del EPR, es decir, una conformación estable y homogénea de células del mismo tamaño aparentemente, y se observa una morfología hexagonal de células en monocapa, sin superposición entre ellas (Figura 15B). Las células pueden mostrar pigmento cuando son recuperadas y puede observarse una pigmentación marrón (Figura 15C). Las células se cultivaron por 1 mes adicional, haciendo pase cada 15 días, durante los cuales se mantuvieron estables bajo las condiciones del MEPR suplementado con B27.

En el caso de las células iPSC-MFRP (Figura 16), estas no lograron alcanzar una morfología como la mostrada por las células H9 en los mismos días establecidos para la evaluación de progenitores retinianos desde el día 20, donde se aprecia una morfología distinta a la esperada para las células control. Días más tarde en la línea celular generada, al día 55 (Figura 16A), basados en la morfología

observamos que las células no logran madurar a células del EPR, pues muestran un núcleo prominente. Días después, al día de diferenciación 76 (Figura 16B) y 93 (Figura 16 C), las células logran una morfología más homogénea entre ellas, sin embargo, la forma regular hexagonal de células de EPR no se observa. A pesar de que se observan los parches de pigmento dentro de las células (Figura 16F), no es evidente como en las células control, las cuales si lograron una diferenciación terminal a EPR.

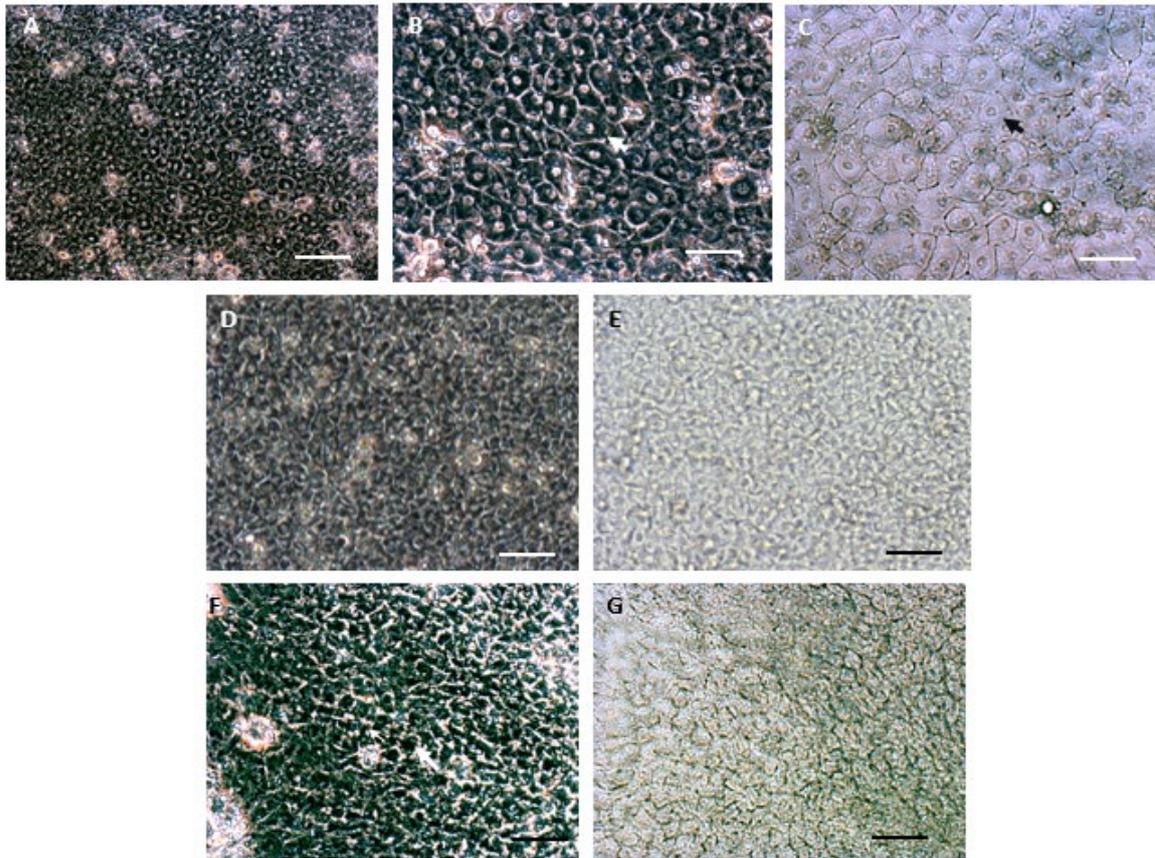
#### 7.5.1. Análisis de expresión de genes de EPR por RT-PCR en línea de células iPSC-MFRP y H9 diferenciadas a EPR

Las células diferenciadas a EPR de la línea generada iPSC-MFRP y la línea de células control H9, se analizaron por la expresión de los genes específicos de EPR por medio de RT-PCR. En este análisis se pudo observar la expresión de los marcadores de EPR (Figura 17). Estos resultados indican y confirman que efectivamente las células diferenciadas están expresando los genes BEST1, RPE65 y MERTK, y que ambas líneas celulares cuentan con la capacidad de diferenciarse hacia un linaje retiniano. Sin embargo, se observa una expresión menor en las células diferenciadas a partir de la línea de células iPSC-MFRP, comparada con las células de EPR derivadas de las células H9.

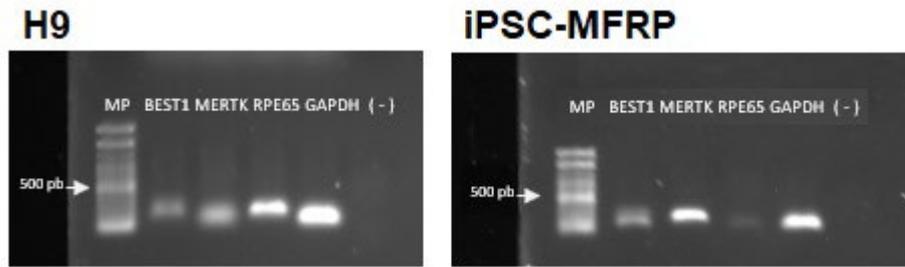


**Figura 15. Caracterización morfológica de células H9 diferenciadas a células del EPR.**

Células al día 67 de diferenciación: A y B) se aprecia que las células muestran pigmentación visible y, C) se observa una morfología hexagonal no homogénea. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Células al día 87 de diferenciación (pase 1): D) las células se aprecian en una monocapa celular más estable y homogénea, con un tamaño similar entre ellas, E) fotografía en contraste de fase, se observa una morfología hexagonal homogénea. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ . F) Se aprecia el pigmento de melanina que presentan las células EPR ya diferenciadas en placa y cuando son recuperadas.



**Figura 16. Caracterización morfológica de células iPSC-MFRP diferenciadas a células del EPR.** Día 55 de diferenciación: A y B) Se observa una morfología homogénea de las células con un núcleo prominente, C) fotografía de contraste de fases, se observa la forma irregular de las células. Barras de escala: 100  $\mu\text{m}$ . Día 76 de diferenciación: D y E) las células se observan más compactas. Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ . Día 93 de diferenciación: F y G) las células continúan compactándose y empiezan a agruparse en formas más redondas y pequeñas con parches pigmentados (señalado con flecha blanca). Barras de escala: 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 17. Análisis de RT-PCR de genes específicos de células del EPR diferenciadas de H9 y células iPSC-MFRP.** Se aprecia la presencia o ausencia de expresión de los marcadores BEST1, MERTK, y RPE65. Se muestran células H9 (pase 3) y células iPSC-MFRP (pase 1). GAPDH fue utilizado como control constitutivo.

## 8. DISCUSIÓN

Por muchos años, la investigación acerca de los procesos fisiopatológicos de numerosas enfermedades retinianas se ha basado en el estudio de células inmortalizadas de retina, en la histología de ojos enucleados, en modelos animales, en estudios genéticos y en ensayos clínicos. En todos estos casos, las alteraciones celulares precisas no pueden ser recapituladas debido a las diferencias interespecies y a la inaccesibilidad de tejidos retinianos *in vivo*. La disponibilidad reciente de las iPSC específicas de pacientes ha permitido agregar una herramienta poderosa para la identificación de alteraciones genéticas que causan enfermedades, para el estudio de correlaciones genotipo-fenotipo, para la realización de ensayos de toxicidad y para el desarrollo de terapias celulares personalizadas. La disponibilidad de la tecnología de iPSC ofrece la posibilidad de obtener tejido retiniano sin la necesidad de realizar una biopsia.

En el presente trabajo, se logró la diferenciación de progenitores retinianos (células del EPR) a partir de iPSC derivadas de fibroblastos de sujetos con retinosis pigmentaria debida a mutación del gen *MFRP*. Estos progenitores constituyen una línea celular única para el estudio de los mecanismos fisiopatogénicos asociados a RP por mutaciones en el gen *MFRP*. Hasta donde sabemos, este es el primer modelo celular derivado de iPSC para el estudio de una enfermedad ocular generado en nuestro país.

Tal y como fue observado después del día 7 post-transducción con el virus Sendai, el cambio morfológico fue el primer indicador de que la reprogramación se estaba efectuando en las células. Los cambios observados en los fibroblastos del paciente con RP asociada a *MFRP* permitió identificar fácilmente las células transducidas de las colonias falsas, para su expansión y el establecimiento de la línea de células iPSC-MFRP.

La línea celular H9 y la línea de células iPSC-MFRP expresaron a nivel funcional los factores de pluripotencia. Se pudo verificar que la línea celular generada en este trabajo expresa los genes SOX2, OCT4, NANOG implicados en el circuito de pluripotencia, tal como ocurre en las células embrionarias H9. Además de que estos genes se encuentren expresados, es necesario verificar que sean

capaces de inducir marcadores de superficie como son TRA-1-60 y SSEA4, los cuales se encontraban expresados en ambas líneas celulares. Estos marcadores son proteínas que se expresan en etapas tempranas del desarrollo de importancia para el mantenimiento de la pluripotencia y el silenciamiento de otros genes que están implicados en la determinación celular (Cevallos *et al.*, 2021).

Durante el proceso general de diferenciación, cuando las células pierden la pluripotencia hacia un estado indiferenciado, morfológicamente desarrollan un espacio intercelular dentro de la colonia, así como la expansión de la distancia entre células y un núcleo oscuro (Wakui *et al.*, 2017). De manera particular, en la línea celular control podemos observar los cambios morfológicos a partir del día 11 a 20, cuando aparecen los primeros progenitores retinianos, es decir las primeras células pigmentadas características, que completaran su desarrollo al día 82.

Hablando del protocolo utilizado con moléculas pequeñas, la NIC es un derivado de la vitamina B3, y ha mostrado mejorar el fenotipo de células EPR y prevenir la transición epitelio-mesénquima (EMT) en múltiples modelos de células EPR (Saini *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2020). Se ha descrito que reduce la expresión de los genes de pluripotencia mientras que incrementa la expresión de genes tempranos de progenitores retinianos Lhx2, Pax6 y Otx2, sugiriendo que estos cambios se deben a que la adición de NIC acelera la diferenciación (Buchholz *et al.*, 2013; Maruotti *et al.*, 2015). Esto concuerda con los resultados obtenidos, pues las células adquirieron gradualmente un destino neural con esta molécula ya que se observó la presencia de los marcadores de expresión OTX2 y PAX6 que están presentes en las células comprometidas a un destino neuroepitelial (Borooah *et al.*, 2013), tal como ocurrió en ambas líneas celulares durante la evaluación al día 10 y 20 de diferenciación, y como ocurre en la diferenciación celular retinal, imitando el orden y tiempo del curso normal de la retinogénesis. Por otra parte, se ha demostrado que la CTM es un fuerte inductor de EPR (Maruotti *et al.*, 2015). Por medio del experimento de diferenciación, se pudo verificar que la línea control H9, fue capaz de diferenciarse a células del EPR utilizando esta molécula, pues presentaron en una etapa tardía, una morfología hexagonal y en mosaico, así como

pigmentación visible y la expresión a nivel de RNA de los marcadores de EPR: BEST1, MERTK y REPE65.

Estos resultados concuerdan con lo descrito por Buchholz *et al.*, 2013 quienes de manera general evaluaron en las células iPSC los marcadores de pluripotencia Oct4 y Nanog, los marcadores de campo ocular Lhx2, Pax6, Rax, Otx2, Mitf, y los marcadores de EPR, Pax6, Mitf, Otx2 PEDF, BEST1 y Tyrp2 en la diferenciación a EPR. En comparación con el presente trabajo, solamente se evaluaron los marcadores tempranos de diferenciación de EPR que ellos reportaron a los 14 días de diferenciación y que corresponden a Pax6, Mitf y Otx2. Sin embargo, este trabajo utiliza moléculas inductoras distintas para llevar a cabo la diferenciación (IGF1m, Noggin, Dkk1, bFGF y Activina). Se trata de un protocolo que obtiene las primeras células pigmentadas a los 14 días, pues al día cuatro dirigen la diferenciación a EPR en vez de retina neural como se realizó en el presente trabajo. En contraste con nuestro protocolo, la inducción neuroepitelial tomó más tiempo y por lo tanto la evaluación de los marcadores de progenitores tempranos fue más tardía, al día 20, debido a que las células estuvieron expuestas a NIC y CTM durante un periodo de 30 días.

Un problema general de los protocolos de diferenciación es que se requiere optimizar cada metodología para líneas celulares individuales. Lo que hace de una producción robusta algo demandante, por la variación de resultados entre líneas celulares. La eficiencia en la generación de EPR de la línea generada iPSC-MFRP fue considerablemente menos eficiente que la línea celular control. Esta diferencia en la diferenciación a células maduras del EPR puede deberse al estado del desarrollo en que se encuentran estas poblaciones celulares. Las células embrionarias humanas presentan una plasticidad mayor comparada con las células reprogramadas del paciente, lo cual podría estar reflejando un estado epigenético más permisivo para el proceso de diferenciación.

A pesar de ello, la causa de la diferencia en la eficiencia de diferenciación entre las líneas celulares no está clara. Se desconoce si la patología asociada a la mutación en el gen *MFRP*, está afectando los genes de diferenciación de EPR tempranos. Se ha descrito que OTX2 codifica para factores transcripcionales

cruciales que se requieren para el desarrollo del cerebro anterior y la determinación del destino de las células de la retina y que la desregulación de este gen da como resultado graves malformaciones del prosencéfalo y los órganos oculares, así como una especificación errónea del EPR (Beby y Lamonerie, 2013). Serían necesarios estudios futuros para determinar las diferencias mostradas por la línea iPSC-MFRP comparada con la línea control.

Se ha demostrado que líneas celulares de células embrionarias humanas y células iPSC varían en la producción de células en monocapa de EPR, además se ha descrito que las células H9 presentan un 60-90% de eficiencia en la diferenciación comparada con células iPSC, con menos del 20% de eficiencia (Reyes *et al.*, 2020). En contraste con los resultados observados al día 86 de las células H9, podemos identificar células con características morfológicas de EPR y que presentan además la expresión de los marcadores BEST1, MERTK y RPE65 representativos de este tipo celular, comparado con las células iPSC-MFRP que tomaron más días en alcanzar esta morfología de forma menos eficiente. No obstante, en el análisis de expresión hay presencia de estos marcadores en menor proporción en los días 10 y 20 de diferenciación, lo cual nos indica que la línea se puede diferenciar, pero a una eficiencia menor.

Estos resultados se confirman con el análisis de los genes BEST1, RPE65 y MERTK, cuya expresión se encontró disminuida en las células mutantes comparada con la expresión de estos genes en el EPR diferenciado de células H9. En este análisis de expresión podemos distinguir una expresión similar de BEST1 y MERTK en ambas líneas celulares, no obstante, para la expresión de RPE65 las células iPSC-MFRP muestran una expresión menor. De manera particular, el gen RPE65 está involucrado en la fase de recuperación de ciclo visual y la conversión de 11-trans-éster retinal a 11-cis retinal después de la excitación del pigmento debido a la luz (Nash *et al.*, 2021). Esto sustenta por qué hubo una expresión menor de RPE65 en la línea celular iPSC-MFRP, que podría deberse a que las células no lograron alcanzar la morfología en mosaico esperada, y a que los parches de pigmentación no fueron suficientes para una correcta expresión de este marcador.

Se ha demostrado que la fracción hexagonal de la superficie de la monocapa de células del EPR es un indicador de la estabilidad mecánica del tejido, la forma de mosaico hexagonal es la forma más eficiente de cubrir el plano con una monocapa celular. El cambio en la morfología indica estrés que genera desequilibrio (Rashid *et al.*, 2015). Aunado a esto, se sabe que la muerte y división celular, pueden afectar la forma de mosaico regular y estos defectos pueden comprometer la fuerza y durabilidad de la capa del EPR, y en consecuencia generar parches de pigmentación más vulnerables a neovascularización y lesiones atróficas (Shirinifard *et al.*, 2012). Esto podría estar ocurriendo en la línea celular iPSC-MFRP pues no hay similitud en la morfología al día 93 de diferenciación, en comparación con la morfología de células H9 al día 87.

El sujeto de estudio descrito en este trabajo presenta la variante homocigota c.498\_499insC en el gen *MFRP*. Localizada en el exón 5, esta mutación deriva en una mutación de desplazamiento del marco de lectura (*frame-shift*), que resulta en la pérdida de los dominios CUB-LDL y CRD; y como consecuencia en la pérdida de la proteína MFRP. Hay evidencia de que la deficiencia de *MFRP* resulta en un malfuncionamiento del EPR (Chekuri *et al.*, 2013). Esta proteína se expresa de manera predominante en el EPR y el cuerpo ciliar dentro del ojo. Los resultados de este trabajo sugieren que la deficiencia de MFRP causada por la mutación c.498\_499insC podría verse reflejada en la menor eficiencia de la línea iPSC-MFRP para generar EPR maduro, a diferencia de lo que ocurre en las células H9, siendo que esta disfunción tiene un rol en la patogénesis de la RP asociada a MFRP principalmente en el EPR. Sin embargo, no está claro por qué los marcadores de expresión propios del EPR en etapas tempranas (PAX6, MITF, OTX2) tuvieron una expresión relativamente menor, esto podría deberse a que no se alcanza la diferenciación terminal funcional de estas células, a diferencia de las células control que si lo logran. Estudios funcionales de la proteína MFRP en las células iPSC-MFRP son necesarios para identificar las causas de la ausencia de pigmento y la diferenciación tardía que mostraron para entender los mecanismos de la diferenciación retinal asociado a esta mutación homocigota.

La generación de modelos a partir de células iPSC derivadas de pacientes con RP, ha permitido una gran amplitud en el entendimiento de las DR. Específicamente, las vías moleculares que se alteran en la enfermedad, qué tipos de células de la retina se ven afectadas y como esas células de la retina pueden ser rescatadas funcionalmente, esto se ha establecido para varias mutaciones en muchas DR hereditarias (Foltz y Clegg, 2018). El desarrollo de modelos de la enfermedad a partir de células iPSC, nos permite obtener información que tiene valor en términos de conocimiento científico básico, así como para futuras terapias de reemplazo celular. Los resultados de este trabajo en la comprensión de la producción de tipos de células retinales permitirán que, en el campo de estudio de las DR, se establezca un modelo de enfermedad robusto e informativo.

En conjunto, estos resultados demuestran la competencia de la línea de células iPSC-MFRP obtenidas para diferenciarse hacia algunas de las células adultas de gran importancia a nivel clínico, en este caso para el entendimiento de la RP y sobre sus mecanismos implicados en la diferenciación celular, para comprender las células de la retina de una manera que puede beneficiar a millones de personas que padecen ceguera hereditaria.

## 9. CONCLUSIONES

Se puede concluir que las células de fibroblastos dermales pueden ser inducidas hacia un estado pluripotente con el método del virus Sendai, facilitando la generación de células iPSC asociadas a la RP a nivel técnico y permitiendo su reprogramación para la obtención de líneas celulares.

Se logró establecer un modelo de RP, en el que se observó la expresión de marcadores de progenitores de EPR incluyendo los genes OTX2, MITF y PAX6, y la expresión de marcadores de expresión de EPR, como los genes BEST1, MERTK y RPE65 en células embrionarias H9 y en células iPSC-MFRP. La expresión de los marcadores indica que las células obtenidas del proceso de diferenciación son efectivamente de linaje retiniano.

El modelo desarrollado en este trabajo permite demostrar que las células iPSC generadas son competentes para diferenciarse a células progenitoras retinianas, las cuales resultan de gran importancia a nivel clínico, pues nos permitirán mejorar el entendimiento sobre los mecanismos implicados en la diferenciación celular de células asociadas a la RP por mutación en el gen *MFRP*.

## 9. ANEXO

### 9.1 Consentimiento informado.

Presentado a la División de investigación, Comisión de Ética de la Facultad de Medicina, y que permitió la participación de los sujetos del presente estudio.



FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN



#### ANEXOS

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN

COMISIÓN DE ÉTICA

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN  
MÉDICA

Título del protocolo: **"Estudios fenotípicos y funcionales de fotorreceptores humanos diferenciados de células pluripotentes inducidas para la implementación de un modelo de distrofia retiniana"**

Investigador principal: Prof. Tit. C TC Dr. Juan Carlos Zenteno Ruíz

Sede donde se realizará el estudio: Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana"

Nombre del paciente: \_\_\_\_\_

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

#### 1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO:

Las enfermedades hereditarias de la retina son causadas por alteraciones en el material genético del paciente. Identificar cuáles son los mecanismos precisos en la célula que llevan a la ceguera es de gran importancia pues permite entender mejor a la enfermedad y proponer tratamientos más racionales.



## 2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivo estudiar células de su piel, transformarlas en células semejantes a la de su retina y comparar cuáles son las alteraciones que sufren esas células cuando se comparan con células de otras personas con o sin mutaciones en genes que causan daño en la retina.

## 3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

En estudios realizados anteriormente por otros investigadores se ha demostrado que es posible una mejor comprensión del daño que se produce en la retina debido a ciertas mutaciones en genes que tienen una participación en la función de la retina. Este conocimiento está impactando positivamente no solo en un mayor entendimiento de lo que les sucede a las células de la retina en las distrofias retinianas, sino que también está permitiendo proponer nuevos tratamientos para detener o revertir la discapacidad visual.

Con este estudio podremos establecer una forma objetiva de estudiar el efecto que tienen ciertas alteraciones genéticas en el funcionamiento de la retina y en la pérdida de la visión. También será posible con este estudio establecer una manera de estudiar el posible efecto benéfico de tratamientos farmacológicos, lo que en la actualidad es imposible pues no se puede estudiar directamente la retina de una persona.

Este estudio permitirá que en un futuro otros pacientes puedan beneficiarse del conocimiento obtenido ya que se conocerá cuáles son las alteraciones a nivel celular causadas por diversas alteraciones genéticas.



#### 4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

En caso de aceptar participar en el estudio se le realizarán algunas preguntas sobre usted, sus hábitos y sus antecedentes médicos, y se le tomará una biopsia de piel en la región del antebrazo. La biopsia será de entre 2 y 3 mm de diámetro, se realizará bajo anestesia local, con técnica quirúrgica siguiendo los procedimientos de asepsia y antisepsia y se realizará sutura para el cierre del sitio de la biopsia. Los puntos de sutura serán retirados 7 días después del procedimiento.

#### 5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

Este estudio consta de las siguientes fases: La primera implica la toma de la biopsia de piel y sutura del sitio de biopsia. Aunque se trata de una biopsia superficial, Usted puede llegar a experimentar dolor en el sitio de biopsia o sangrado escaso. El Investigador principal estará en contacto con Ud. para indicarle medicamentos analgésicos en caso de dolor importante o las acciones a tomar en caso de sangrado. Del mismo modo, el Investigador responsable se encargará de retirarle los puntos de sutura 7 días después del procedimiento.

#### 6. ACLARACIONES

- Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria.
- No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación.
- Si es usted paciente de esta Institución, mantendrá la atención que recibe sin cambios.
- Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-, pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad.
- No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio.
- No recibirá pago por su participación.
- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable.



FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN  
COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN



- La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores.
- La muestra que se obtenga por medio de la biopsia será utilizada solamente para los fines señalados en este estudio.
- En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio.
- Usted también tiene acceso a las Comisiones de Investigación y de Ética de la Facultad de Medicina de la UNAM en caso de que tenga dudas sobre sus derechos como participante del estudio: Teléfono: 5623 2136
- Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.



## 7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, \_\_\_\_\_ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

\_\_\_\_\_  
Firma del participante o del padre o tutor

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Testigo 1

\_\_\_\_\_  
Fecha

\_\_\_\_\_  
Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Fecha

He explicado al Sr(a) \_\_\_\_\_ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

\_\_\_\_\_  
Fecha

## 10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achberger, K., Haderspeck, J. C., Kleger, A., Liebau, S. (2018). Stem cell-based retina models. *Advanced Drug Delivery Reviews*.
- Auricchio, A., Smith, A.J., Ali, R.R. The Future Looks Brighter After 25 Years of Retinal Gene Therapy. (2017). *Human Gene Therapy*, 28(11):982-987.
- Ayala-Ramírez, R., Graue-Wiechers, F., Robredo, V., Amato-Almanza, M., Horta-Diez, I., Zenteno, J. C. (2006). A New Autosomal Recessive Syndrome Consisting of Posterior Microphthalmos, Retinitis Pigmentosa, Foveoschisis, and Optic Disc Drusen Is Caused by a MFRP Gene Mutation. *Molecular Vision*, 4 (12):1483-1489.
- Bharti, K., Miller, S. S., Arnheiter, H. (2010). The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 24(1): 21–34.
- Beby, F, Lamonerie, T. (2013). The homeobox gene Otx2 in development and disease. *Experimental Eye Research*, 111:9–16.
- Berger, W., Kloeckener-Gruissem, B. & Neidhardt, J. The molecular basis of human retinal and vitreoretinal diseases. *Prog. Retin. Eye. Res.* 29, 335–375 (2010)
- Borooah, S., Phillips, M. J., Bilican, B., Wright, A. F., Wilmut, I., Chandran, S., ... Dhillon, B. (2013). Using human induced pluripotent stem cells to treat retinal disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 37, 163–181.
- Broadgate, S., Yu, J., Downes, *et al.* (2017). Unravelling the genetics of inherited retinal dystrophies: Past, present and future. *Progress in Retinal and Eye Research*, 59:53-96.

- Buchholz, D., Pennington, B., Croze, R., Hinman, C., Coffey, Clegg, D. (2013). Rapid and Efficient Directed Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Into Retinal Pigmented Epithelium. *Stem Cells Translational Medicine*, 2:384-393.
- Burke, J. M. (2008). Epithelial phenotype and the RPE: Is the answer blowing in the Wnt?. *Progress in Retinal Eye Research*, 27 (6):579-595.
- Cavodeassi, F. (2018). Dynamic Tissue Rearrangements during Vertebrate Eye Morphogenesis: Insights from Fish Models. *Journal of Developmental Biology*, 6(1), 4.
- Cevallos, R., Hossain, M., Zhang, R., Hu, K. (2021). Evaluating Reprogramming Efficiency and Pluripotency of the Established Human iPSCs by Pluripotency Markers. *Methods Mol Biol*, 2239: 235-249.
- Chacón-Camacho, O. F., García-Montaña, L. A., y Zenteno, J. C. (2017). The clinical implications of molecular monitoring and analyses of inherited retinal diseases. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 17:1009-1021.
- Chekuri, A., Sahu B., Chavali, V. R. M., Voronchikhina, M., Hermida, A.-S., Suk J. J., Alapati, A. N., Bartsch, D., Ayala-Ramírez, R., Zenteno J. C., Dinculescu, A., Jablonski, M., Shyamanga, B., Ayyagari, R. (2018). The long-term effects of gene therapy in a novel mouse model of human MFRP-associated retinopathy. *Human Gene Therapy*, (192):632-650.
- Chen, T.-C., Huang, D.-S., Lin, C.-W., Yang, C.-H., Yang, C.-M., Wang, V. Y., ... Chen, P.-L. (2021). Genetic characteristics and epidemiology of inherited retinal degeneration in Taiwan. *Npj Genomic Medicine*, 6(1).

- Choudhary, P., Booth, H., Gutteridge, A. *et al.* (2016). Directing Differentiation of Pluripotent Stem Cells Toward Retinal Pigment Epithelium Lineage. *Stem Cells Translational Medicine*, 490-501.
- Classen, J., Zhang, D., Shang, C., Sang Yoon, M., Lamey, T., Thompson, A., McLaren, T., De Roach, J., McLenachan, S., Chen, F. (2019). Generation of the induced pluripotent stem cell line from a patient with autosomal recessive ABCA4-mediated Stargardt Macular Dystrophy. *Stem Cell Research*, 34 (2019): 101352.
- Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., y Handa, J. T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in Retinal and Eye Research*, 60, 201–218.
- Den Hollander, A. I., Roepman, R., Koenekoop, R. K., y Cremers, F. P. M. (2008). Leber congenital amaurosis: Genes, proteins and disease mechanisms. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4): 391–419.
- Dias, M., Joo, K., Kemp, J., Ligório, S., da Silva, A., Joon, S., kwon, Y. (2018). Molecular genetics and emerging therapies for retinitis pigmentosa: Basic research and clinical perspectives. *Prog Retin Eye Res*, 63: 107-131.
- Eintracht, J., Toms, M., y Moosajee A. (2020). The use of Induced Pluripotent Stem Cells as a Model for Developmental Eye Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience*.
- Eldred, K. C., Hadyniak, S. E., Hussey, K. A., Brennerman, B., Zhang, P.-W., Chamling, X., ... Johnston, R. J. (2018). Thyroid hormone signaling specifies cone subtypes in human retinal organoids. *Science*, 362(6411), eaau6348.

- Fogerty, J., y Besharse, J. C. (2011). 174delG Mutation in Mouse MFRP Causes Photoreceptor Degeneration and RPE Atrophy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52 (10): 7256-7266.
- Foltz L.P., Clegg D.O. (2019). Patient-derived induced pluripotent stem cells for modelling genetic retinal dystrophies. *Progress in Retinal Eye Research*, 68:54-66.
- Francis, P. J. (2006). Genetics of inherited retinal disease. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 99:189-191.
- Funk, W. D., Labat, I., Sampathkumar, J., Gourraud, P.-A., Oksenberg, J. R., Rosler, E., ... West, M. D. (2012). Evaluating the genomic and sequence integrity of human ES cell lines; comparison to normal genomes. *Stem Cell Research*, 8(2):154–164.
- Hamel, C. (2006). Retinitis pigmentosa. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 1 (1):40.
- Hartong, D. T., Berson, E. L., Dryja T. P. (2006). Retinitis pigmentosa. *Lancet*, 368(9549):1795–1809.
- He, Y., Zhang, Y., Su, G. (2015). Recent advances in treatment of retinitis pigmentosa. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 10(3):258-265.
- Heermann, S., Schütz, L., Lemke, S., Krieglstein, K., Wittbrodt1, J. (2015). Eye morphogenesis driven by epithelial flow into the optic cup facilitated by modulation of bone morphogenetic protein. *eLife*, 2015 (4): e05216.
- Jiang, Y., Qi, X., Chrenek, M. A., Gardner, C., Dalal, N., Boatright, J. H., ... Nickerson, J. M. (2014). Analysis of Mouse RPE Sheet Morphology Gives Discriminatory Categories. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 601–607.

- Jin, Z.-B., Okamoto, S., Xiang, P., & Takahashi, M. (2012). Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Retinitis Pigmentosa Patient for Disease Modeling. *STEM CELLS Translational Medicine*, 1(6): 503–509.
- Katoh, M. (2001). Molecular cloning and characterization of MFRP, a novel gene encoding a membrane-type Frizzled-related protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 282 (1):116-23.
- Kostic C. y Arsenijevic Y. (2016). Animal modelling for inherited central vision loss. *Journal of Pathology*, 238: 300-310.
- Li, Y., Wu, W.-H., Tsang, S., *et al.* (2014). Gene Therapy in Patient-specific Stem Cell Lines and a Preclinical Model of Retinitis Pigmentosa With Membrane Frizzled-related Protein Defects. *Molecular Therapy*, 22 (9):1688-1697.
- Liu, X., Zhang, Y., He, Y., Zhao, J., Su, G. (2015). Progress in histopathologic and pathogenetic research in a retinitis pigmentosa model. *Histology and Histopathology*,30(7):771-779.
- Liu, C., Oikonomopoulos, A., Syed, N., Wu, J. (2018). Modeling human diseases with induced pluripotent stem cells: from 2D to 3D and beyond. *Development*, 145(5): dev.156166
- Lukovic, D., Artero Castro, A., Delgado, A. B. G., Bernal, M. de los A. M., Luna Pelaez, N., Díez Lloret, A., ... Bhattacharya, S. S. (2015). Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Scientific Reports*, 5(1).
- Maruotti, J., Sripathi, S. R., Zack, D. J., *et al.* (2015). Small-molecule-directed, efficient generation of retinal pigment epithelium from human pluripotent stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (35):10950-10955.

- May-Simera, H. L., Wan, Q., Jha, B. S., Hartford, J., Khristov, V., Dejene, R., ... Bharti, K. (2018). Primary Cilium-Mediated Retinal Pigment Epithelium Maturation Is Disrupted in Ciliopathy Patient Cells. *Cell Reports*, 22(1): 189–205.
- Mukhopadhyay, R., Sergouniotis, P.I., Mackay, D.S., *et al.* (2010). A detailed phenotypic assessment of individuals affected by MFRP-related oculopathy. *Molecular Vision*, 16:540-548.
- Nash, B., Loi, H., Fernando, M., Sabri, A., Robinson, J., Cheng, A., Eamegdool, S., Farnsworth, E., Bennetts, B., Grigg, J., Chung, S., Gonzalez-Cordero, A., Jamieson, R. (2021). Evaluation for Retinal Therapy for RPE65 Variation Assessed in hiPSC Retinal Pigment Epithelial Cells. *Stem Cells Int.*, 13: 4536382.
- Osakada, F., Ikeda, H., Takahashi, M., *et al.* (2008). Toward the generation of rod and cone photoreceptors from mouse, monkey and human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 26:215-224.
- Ovando-Roche P., Georgiadis A., Smith A., *et al.* (2017). Harnessing the Potential of Human Pluripotent Stem Cells and Gene Editing for the Treatment of Retinal Degeneration. *Current Stem Cell Reports*, 3(2):112-123.
- Patel, N., Aldahmesh, M. A., Alkuraya, H., Anazi, S., *et al.* (2016). Expanding the clinical, allelic, and locus heterogeneity of retinal dystrophies. *Genetics in Medicine*, 18:554-562.
- Rashid, A., Bhatia, S. K., Mazzitello, K. I., Chrenek, M. A., Zhang, Q., Boatright, J. H., ... Nickerson, J. M. (2015). RPE Cell and Sheet Properties in Normal and Diseased Eyes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 757–763.

- Reyes A., Petrus-Reurer S., Sánchez S., Kumar P., Douagu I., Bartuma H., Aronsson M., Westman S., Lardner E., André H., Falk A., Nandrot E., Kvanta A., Lanner F. (2020). Identification of cell surface markers and establishment of monolayer differentiation to retinal pigment epithelial cells. *Nature Communications*, 11: 1609.
- Rizzolo, L. J. (2007). Development and Role of Tight Junctions in the Retinal Pigment Epithelium. *International Review of Cytology*, 195–234.
- Saini, J. S., Corneo, B., Miller, J. D., Kiehl, T. R., Wang, Q., Boles, N. C., ... Temple, S. (2017). Nicotinamide Ameliorates Disease Phenotypes in a Human iPSC Model of Age-Related Macular Degeneration. *Cell Stem Cell*, 20(5), 635–647.
- Salas, S., Ng, N., Gerami-Naini, B., y Anchan, R. M. (2017). Induced Pluripotent Stem Cells from Ovarian Tissue. *Current Protocols in Human Genetics*, 21.10.1–21.10.22.
- Sanjurjo-Soriano, C., Erkilic, N., Vache, C., Dubois, G., Anne-Francoise, R., Meunier, I., Kalatzis, V. (2022). *Stem Cell Research*, 60(2022), 102738.
- Sarna T., Burke J. M., Korytowski W., Rózanowska M., Skumatz C. M., Zaręba A., Zaręba M. (2003). Loss of melanin from human RPE with aging: possible role of melanin photooxidation. *Exp. Eye Res*, 76(1), 89–98.
- Shirinifard, A., Glazier, J. A., Swat, M., Gens, J. S., Family, F., Jiang, Y., & Grossniklaus, H. E. (2012). Adhesion Failures Determine the Pattern of Choroidal Neovascularization in the Eye: A Computer Simulation Study. *PLoS Computational Biology*, 8(5): e1002440.

- Shu X., Li H., Dong., Sun C., Zhang. (2017). Quantifying melanin concentration in retinal pigment epithelium using broadband photoacoustic microscopy. *Biomed Opt Express*, 8(6): 2851-2865.
- Smith, A. J., Schlichtenbrede, F. C., Tschernutter, M., Bainbridge, J. W., Thrasher, A. J., Ali, R. R. (2003). AAV-Mediated gene transfer slows photoreceptor loss in the RCS rat model of retinitis pigmentosa. *Molecular Therapy*, 8(2): 188–195.
- Swaroop, A., Kim, D., Forrest, D. (2010). Transcriptional regulation of photoreceptor development and homeostasis in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(8): 563–576.
- Takahashi, K., y Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4): 663–676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5): 861–872.
- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., Jones, J. (1998). Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science, New Series*, 282(5391): 1145-1147.
- Tonade, D., & Kern, T. S. (2020). Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 100919.
- Tsuji, O., Miura, K., Okada, Y., *et al.* (2010). Therapeutic potential of appropriately evaluated safe-induced pluripotent stem cells for spinal cord injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107:12704–12709.

- Tucker, B. A., Cranston, C. M., Anfinson, K. A., Shrestha, S., Streb, L. M., Leon, A., ... Stone, E. M. (2015). Using patient-specific induced pluripotent stem cells to interrogate the pathogenicity of a novel retinal pigment epithelium-specific 65 kDa cryptic splice site mutation and confirm eligibility for enrollment into a clinical gene augmentation trial. *Translational Research*, 166(6): 740–749.
- Velez, G., Tsang, S. H., Tsai, Y.-T., Hsu, C.-W., Gore, A., Abdelhakim, A. H., ... Mahajan, V. B. (2017). Gene Therapy Restores Mfrp and Corrects Axial Eye Length. *Scientific Reports*, 7(1).
- Verbakel, S. K., van Huet, R. A. C., Boon, C. J. F., den Hollander, A. I., Collin, R. W. J., Klaver, C. C. W., ... Klevering, B. J. (2018). Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Progress in Retinal and Eye Research*.
- Wakui, T., Matsumoto, T., Matsubara, K., Kawasaki, T., Yamaguchi, H., Akutsu, H. (2017). Method for evaluation of human induced pluripotent stem cell quality using image analysis based on the biological morphology of cells. *J Med Imaging (Bellingham)*, 4(4): 044003.
- Won, J., Smith, R. S., Nishina, P. M., *et al.* (2008). Membrane frizzled-related protein is necessary for the normal development and maintenance of photoreceptor outer segments. *Visual Neuroscience*, 25 (04):563–574.
- Yamanaka, S. (2007). Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 39-49.
- Zacharias, D. G., Nelson, T. J., Mueller, P. S., & Hook, C. C. (2011). The Science and Ethics of Induced Pluripotency: What Will Become of Embryonic Stem Cells? *Mayo Clinic Proceedings*, 86(7): 634–640.

- Zenteno, J.C, Buentello-Volante, B., Quiroz-González, M.A., *et al.* (2009). Compound heterozygosity for a novel and a recurrent MFRP gene mutation in a family with the nanophthalmos-retinitis pigmentosa complex. *Molecular Vision*, 5(15):1794-1798.
- Zhou M., Geathers J., Grillo S., Weber S., Wang W., Zhao Y., Sundstrom J. (2020). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8: 501.
- Ziccardi, Cordeddu, Gaddini, Matteucci, Parravano, Malchiodi-Albedi, & Varano. (2019). Gene Therapy in Retinal Dystrophies. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(22), 5722.