

Tesis Doctoral

Generación de células madre pluripotentes inducidas y estudio de la regulación de la expresión del gen Sod2 en células madre pluripotentes

Solari, Claudia María

2015-03-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Solari, Claudia María. (2015-03-16). Generación de células madre pluripotentes inducidas y estudio de la regulación de la expresión del gen Sod2 en células madre pluripotentes. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Solari, Claudia María. "Generación de células madre pluripotentes inducidas y estudio de la regulación de la expresión del gen Sod2 en células madre pluripotentes". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Generación de células madre pluripotentes inducidas y estudio de la regulación de la expresión del gen Sod2 en células madre pluripotentes

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Claudia María Solari

Director de tesis: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Consejero de Estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación Génica en Células Madre
Departamento de Química Biológica
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
IQUBICEN, CONICET-UBA

Buenos Aires, 16 de marzo de 2015

Generación de células madre pluripotentes inducidas y estudio de la regulación de la expresión del gen Sod2 en células madre pluripotentes

Resumen

Las células madre embrionarias (CME) son células derivadas del macizo celular interno del blastocisto de mamíferos. Poseen la capacidad de auto-renovarse indefinidamente en cultivo en condiciones apropiadas mientras que, ante los estímulos adecuados, pueden dar origen a células de las tres capas germinales, propiedad conocida como pluripotencia. En la última década ha sido posible reprogramar células terminalmente diferenciadas obteniendo así las denominadas células madre pluripotentes (CMP) inducidas (CMPI), que presentan características similares a las CME, como el perfil de expresión génica, las modificaciones epigenéticas, y sus propiedades fundamentales, auto-renovación y pluripotencia. Por esta razón y dado que además presentan ciertas ventajas, las CMPI son consideradas posibles sustitutos de las CME para diferentes aplicaciones. En el área de la medicina regenerativa, la posibilidad de generar células específicas para grupos de pacientes disminuye el riesgo de rechazo en terapias de trasplante. Por otra parte, a partir de estas células pueden desarrollarse modelos de enfermedades y evaluar fármacos en diferentes contextos genómicos. A pesar del gran avance desde el establecimiento de las CMPI, su obtención y propagación aún es un área de gran interés.

Uno de los objetivos de este trabajo de tesis fue desarrollar CMPI, como modelo complementario a las CME para estudiar diversos mecanismos moleculares relevantes para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de estas células. Para tal fin, hemos generado CMPI mediante reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón y comprobado que las líneas obtenidas son capaces de auto-renovarse y son pluripotentes, evaluado tanto *in vitro* como *in vivo*. Una vez validadas, las utilizamos como sistema de estudio en distintos proyectos. En primer lugar, en base a resultados obtenidos previamente en el laboratorio y a la semejanza de las CMPI con las CME,

estudiamos si el medio condicionado por una línea celular de granulosa bovina que permite el cultivo de CME, también proporcionaba un contexto favorable para las CMPI. Mediante la detección de la expresión de marcadores específicos y de protocolos de diferenciación *in vitro* e *in vivo*, determinamos que las CMPI pueden ser propagadas en este medio condicionado, conservando sus propiedades fundamentales.

En una segunda parte de este trabajo nos centramos en el estudio de la regulación de genes relacionados con uno de los mecanismos que aseguran la estabilidad genómica de las CMP, el sistema de defensa frente al estrés oxidativo. A pesar de que ha sido reportado que la actividad antioxidante disminuye a lo largo de la diferenciación, poco se sabe acerca de la regulación transcripcional de los genes involucrados. Dada la importancia de este sistema, nos propusimos estudiar su regulación a partir de la hipótesis de que algunos de estos genes podrían ser modulados por los factores de transcripción (FT) esenciales para la auto-renovación y la pluripotencia de las CMP. Estudiamos el perfil de expresión de genes seleccionados, tanto en líneas comerciales de CME como en las CMPI obtenidas. Si bien hallamos perfiles de expresión muy variados para la mayoría de los genes analizados, observamos que el gen de la superóxido dismutasa 2 (Sod2) fue reprimido durante el proceso de diferenciación, en todos los modelos estudiados. A continuación estudiamos su regulación mediante la modulación de la expresión de los FT. Además generamos construcciones reporteras y evaluamos la actividad del promotor de Sod2 en ensayos de trans-activación. En conjunto, los resultados obtenidos a partir de las diferentes estrategias experimentales empleadas nos permitieron confirmar nuestra hipótesis, concluyendo que el gen de Sod2 es regulado por los factores fundamentales en CMP.

Esperamos que las herramientas generadas y los resultados obtenidos en este trabajo contribuyan a la comprensión de los mecanismos moleculares relevantes en el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CMP, crítico para sus aplicaciones futuras.

Palabras Clave:

Células madre embrionarias, células madre pluripotentes inducidas, auto-renovación, pluripotencia, regulación génica, estrés oxidativo, superóxido dismutasa

Generation of induced pluripotent stem cells and study of the regulation of Sod2 gene expression in pluripotent stem cells

Abstract

Embryonic stem cells (ESC) are derived from the inner cell mass of the blastocyst in mammals. They have the ability to self-renew indefinitely in culture under appropriate conditions whereas, with the appropriate stimuli, they can give rise to cells of all three germ layers, property known as pluripotency. In the last decade, it has been possible to reprogram terminally differentiated cells obtaining the so-called induced pluripotent stem cells (iPSC), which have similar characteristics to the ESC, like the profile of gene expression, epigenetic modifications, and their essential properties, self-renewal and pluripotency. For this reason and since iPSC have some advantages, they are considered as possible substitutes for ESC for several uses. In the area of regenerative medicine, the possibility to generate specific cells for groups of patients decreases the risk of rejection in transplantation therapies. Moreover, disease models can be developed from these cells and drugs can be evaluated in different genomic backgrounds. Despite great progress since the establishment of iPSC, their production and propagation is still an area of great interest.

One aim of this thesis was to develop iPSC as a complementary model to ESC for the study of relevant molecular mechanisms for the maintenance of the fundamental properties of these cells. To this end, we generated iPSC by reprogramming mouse embryonic fibroblasts and found that the obtained lines are capable of self-renew and are pluripotent, and this was tested *in vitro* and *in vivo*. Once validated, we used them in different projects. First, based on results previously obtained in our laboratory and the similarity of iPSC and ESC, we examined whether the conditioned medium by a bovine granulosa cell line that allows the maintenance of ESC, also provided a favorable context for iPSC culture. We detected the expression of specific markers and performed *in vitro* and *in vivo* differentiation protocols, and we determined that iPSC can be propagated in this conditioned medium, while retaining their basic properties.

In the second part of this thesis, we focused on the study of gene regulation related to one of the mechanisms that ensure genomic stability of pluripotent stem cells (PSC), the defense system against oxidative stress. Although it has been reported that the antioxidant activity decreases along differentiation, little is known about the transcriptional regulation of the genes involved. Because of the relevance of this system, we decided to study its regulation based on the hypothesis that some of these genes could be modulated by transcription factors (TF) essential for PSC' self-renewal and pluripotency. We studied the expression profile of selected genes in commercial ESC lines and in the obtained iPSC. Though we found very different expression profiles for most of the analyzed genes, we observed that superoxide dismutase 2 gene (Sod2) was repressed during the differentiation process in all studied systems. Next, we studied its regulation by modulating the expression of the mentioned TF. We also generated reporter constructions and evaluated Sod2 promoter activity in trans-activation assays. Overall, the results obtained from the different experimental strategies allowed us to confirm our hypothesis, concluding that Sod2 gene is regulated by the fundamental factors in PSC.

We hope that the tools generated and the results obtained in this study contribute to the understanding of the molecular mechanisms relevant for PSC's fundamental properties, critical for future applications.

Keywords:

Embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells, self-renewal, pluripotency, gene regulation, oxidative stress, superoxide dismutase

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis forman parte de la siguiente publicación:

“Induced Pluripotent Stem Cells’ self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium”. [Claudia Solari](#), Noelia Losino, Carlos Luzzani, Ariel Waisman, Carolina Bluguermann, María Questa, Gustavo Sevlever, Santiago Miriuka, Lino Barañao, Alejandra Guberman. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011 Jul 1; 410(2):252-7. Epub 2011 May 30. ISSN: 0006-291X

Además, contribuyeron a la siguiente publicación:

“Modulation of chromatin modifying factors’ gene expression in Embryonic and induced Pluripotent Stem Cells”. Carlos Luzzani, [Claudia Solari](#), Noelia Losino, Ariel Waisman, Leonardo Romorini, Carolina Bluguermann, Gustavo Sevlever, Lino Barañao, Santiago Miriuka, Alejandra Guberman. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011 Jul 15;410(4):816-22. Epub 2011 Jun 15. ISSN: 0006-291X

Se encuentra en preparación el siguiente manuscrito que será enviado a la revista PLoS One:

“Sod2 gene expression is induced by Nanog and Oct4”. [Claudia Solari](#), María Soledad Cosentino, Camila Vazquez Echegaray, Ariel Waisman, Carlos Luzzani, María Victoria Petrone, Marcos Francia, Emilly Villodre, Guido Lenz, Santiago Miriuka, Lino Barañao and Alejandra Guberman.



Macanudo #9,
por Liniers

Agradecimientos

A mi familia quiero decirle GRACIAS. A mi mamá Zulema y a mi papá Carlos, gracias por bancarme y apoyarme en mi camino y mis decisiones, por buscar y saber encontrar la manera de acompañarme en cada uno de los momentos por los que uno va pasando a lo largo del doctorado. Gracias por alegrarse y preocuparse conmigo. A mi hermanito Fernando, gracias por ayudarme con las figuras de esta tesis, pero sobre todo, gracias por saber escucharme y aconsejarme a tu manera, dándome una visión completamente distinta de las cosas que enriquecen mi manera de pensar y ver la vida.

Gracias infinitas a Ale, por ser una jefa increíble. Nos entendimos desde el minuto cero. Gracias por todo lo que me enseñás cada día. Me guiás de una manera maravillosa a crecer no sólo en el aspecto profesional y científico, sino como persona. Siendo tan parecidas en tantas cosas y tan distintas en otras, sabés sacar lo mejor de mí, y me ayudas a mejorar y superarme en cada momento. Gracias por ser una amiga paciente, por estar conmigo cuando te necesito. Gracias por alegrarte conmigo en las buenas, y darme la mano y estar en las no tan buenas. Gracias por ponerle onda a todo!

Gracias Noe y a Charly, por acompañarme en mis primeros pasos en el labo. Gracias por compartir mates, charlas, colapsos y risas. Aunque hoy no compartamos la mesada, me acompañan de una mejor manera. Noe, sos una amiga de fierro, incondicional. Gracias por disfrutar de tantos momentos divertidos, pero más que nada, gracias por saber acompañarme y aconsejarme en todo momento. Charly, gracias por enseñarme lo que es una bomba de vacío! Gracias por ayudarme a crecer y mejorar como persona, por tu paciencia, por tus consejos. Gracias por taaantas charlas, pero sobre todo, gracias por caminar conmigo, haciendo que cada día sea maravilloso.

Y el labo creció, y está lleno de personas geniales. Ari, compaaaa, sos un genio de la vida! Gracias por alegrarnos los días a todos, y por aportarnos una visión crítica de las cosas. Gracias Sole por tener siempre la palabra justa, gracias por ser una amiga con la que cuento siempre. Gracias por ser mi compañera de aventuras, se viene el paracaídas! Cami y Vicky, gracias por caminar y crecer conmigo, gracias por tanta alegría que le ponen a cada día. Las quiero! Gracias a Jesi, por compartir tantos lindos momentos y remarla en el labo con la reprogramación. Vamos que se puede! Mark, gracias por tu buena predisposición a dar una mano y por la buena onda.

Gracias a mis amigos y compañeros del labo. Son un montón y perdón que no los nombro a cada uno, no quiero olvidarme de ninguno. Gracias por hacer del 4to piso un lugar con muy buena onda para trabajar. Fer, gracias por compartir paso a paso estos momentos de cierre de una etapa, y gracias por transmitir tanta buena energía.

Gracias a Dani por tener tanta buena onda y paciencia para ayudarnos con la estadística. Gracias a Fer, Fátima y July por bancarme y darme una mano para poner a punto la técnica de luciferasa.

Gracias a los grupos de investigación vecinos por la buena predisposición para dar una mano. Al grupo de Martín Monte, de Adalí Peccí, de Elba Vazquez, de Eduardo Cánepa, de Claudia Pérez Leiros, de Verónica García, de Federico Coluccio, de Diego Laderach y Daniel Compagno, de Adriana De Siervi, de Susana Correa y Mariana Bermúdez, muchas gracias.

Quiero agradecer a Santiago Miriuka por la discusión de resultados y por abrirme las puertas de su labo para trabajar. Gracias a él y a su grupo, por estar dispuestos a ayudar y a colaborar. También quiero agradecer a Marcelo, Estefania, Naomi, al Dr. Gustavo Sevlever y a todo su equipo por el procesamiento y análisis de los teratomas, y por la buena predisposición. Gracias a Guido Lenz y a Emily por la buena onda y la visión constructiva que nos aportan.

Quiero decirles gracias a mis amigas de la facu, a mis amigas irenistas, a mis amigas de la vida. Cada grupo y cada una, supieron acompañarme, alentándome en cada instante. Pao, gracias por estar siempre con una palabra de aliento. Las quiero!

Espero no olvidarme de nadie. Gracias por formar parte de cada día. Gracias a todos por hacer de este camino algo hermoso para disfrutar cada momento.

Por último, quiero agradecer al Conicet por financiar mi Beca Doctoral. A las instituciones que financiaron y/o financian nuestro trabajo diario: ANPCyT, UBA, CONICET y Biosidus.

Muchas gracias a la Universidad de Buenos Aires, a la Facultad de Farmacia y Bioquímica, por ser el lugar donde me formé, y a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, que me dio el un espacio para realizar esta tesis. Por ser una de las mejores universidades que hay. Por ser pública, laica, de alta calidad y gratuita, que es un derecho que todos tenemos que defender para que cada vez pueda llegar a más gente.

Índice

Abreviaturas	1
Introducción	4
<i>Células madre</i>	5
Potencial de diferenciación y el desarrollo	5
Células madre pluripotentes	9
Células madre embrionarias	10
Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia	12
Evaluación de la pluripotencia y la auto-renovación	20
<i>Reprogramación celular</i>	22
Métodos de obtención de CMPI	26
Mecanismo propuesto de reprogramación	29
Aplicación en la clínica	32
<i>Sistema de defensa frente al estrés oxidativo</i>	35
Especies reactivas del oxígeno	37
Células madre pluripotentes y ROS	41
Superóxido dismutasas	46
Hipótesis y objetivos	50
Materiales y métodos	53
<i>Cultivo celular</i>	54
Congelamiento y descongelamiento de células	60
Extracción de ADN genómico para la detección de Micoplasma por PCR	61
Diferenciación de CMP <i>in vitro</i> : método de <i>Hanging drop</i>	62

Diferenciación de CMP in vivo: método de formación de teratomas	64
Transfección de líneas celulares	65
Producción de partículas lentivirales para reprogramación	66
Transducción con partículas lentivirales para obtención de CMPI	70
Aislamiento y amplificación de colonias de CMPI	71
<i>Técnicas para análisis de la expresión génica</i>	71
Extracción de y cuantificación de ARN. Cuantificación de ADN	71
Retrotranscripción	73
PCR a punto final, semi-cuantitativa y qPCR en Tiempo Real	73
<ul style="list-style-type: none"> • PCR a punto final 	73
<ul style="list-style-type: none"> • PCR semi-cuantitativa 	75
<ul style="list-style-type: none"> • PCR cuantitativa en tiempo real 	76
Inmunofluorescencia	78
Análisis <i>in silico</i> de promotores de genes involucrados en la defensa frente a estrés oxidativo	79
Diseño de <i>primers</i> para el estudio de genes involucrados en la defensa frente a estrés oxidativo	80
Construcción del vector pSod2.1-luc	82
<ul style="list-style-type: none"> • Descripción del vector pGL3-Basic 	82
<ul style="list-style-type: none"> • Diseño de <i>primers</i> para clonado del promotor de Sod2 	83
<ul style="list-style-type: none"> • PCR para obtención de los fragmentos del promotor 	84
<ul style="list-style-type: none"> • Clonado en el vector pGL3-Basic 	85
Estudio de la regulación ejercida por los factores de transcripción sobre la expresión de Sod2	87
<ul style="list-style-type: none"> • Modulación de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog en CME 	87
- Modulación por ausencia de LIF	87
- Silenciamiento mediante el uso de <i>short hairpin RNA</i>	88
<ul style="list-style-type: none"> • Sobreexpresión de los FT Oct4, Sox2 y Nanog mediante su co-transfección con pSod2.1-luc en un sistema heterólogo 	88

<i>Análisis estadístico</i>	89
<i>Técnicas microbiológicas</i>	90
Preparación de bacterias ultracompetentes	90
Transformación de bacterias: método de Golpe de calor (Heat shock)	90
Purificación de ADN plasmídico por Miniprep	91
Purificación de ADN plasmídico por Midiprep	92
<i>Soluciones y medios de cultivo</i>	93
Resultados	97
<i>Parte I: Reprogramación celular</i>	98
Obtención de CMPI	99
Caracterización de las CMPI obtenidas	103
Aplicación de las CMPI obtenidas: propagación de CMPI en un medio de cultivo novedoso	109
<i>Parte II: Sistema de defensa frente al estrés oxidativo</i>	116
Búsqueda de genes relacionados con el sistema de defensa frente al estrés oxidativo que puedan ser regulados por los factores de stemness	117
Análisis de expresión de los genes candidato	118
Estudio de la regulación ejercida por los factores de transcripción sobre el gen Sod2	129
• Estudio de la actividad del promotor de Sod2 mediante una construcción reportera	130
• Estudio de la modulación de Sod2 en condiciones de silenciamiento de Oct4 o Nanog	134
Discusión	136
Bibliografía	148

Abreviaturas

AML	α -actina de músculo liso
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
ADNc	ADN Complementario
AFP	α -Fetoproteína
AML	Actina de Músculo Liso
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
AVP	Ácido valproico
β III-T	β III Tubulina
BGC	Línea celular de granulosa bovina
BMP	Proteína Morfogénica del Hueso
BSA	Seroalbúmina Bovina
Cat	Catalasa
CE	Cuerpos Embrioides
CHO	Línea celular <i>Chinese Hamster Ovary</i>
CM	Células Madre
CME	Células Madre Embrionarias
CMPI	Células Madre Pluripotentes Inducidas
CO ₂	Dióxido de carbono
cTnT	Subunidad T de la Troponina cardíaca
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	DimetilSulfóxido
DNasa	Desoxiribonucleasa
dNTP	Nucleótido de ADN
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
bFGF	Factor de crecimiento de fibroblastos básico (<i>Basic Fibroblast growth factor</i>)
FT	Factor de Transcripción

FD	Factor de Dilución
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato Deshidrogenasa
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
Glrx	Glutarredoxina
Gpx	Glutación peroxidasa
GSK3	Glucógeno-Sintetasa Quinasa 3
Gsr	Glutación reductasa
H ₂ O _{dest}	Agua destilada
H ₂ O _{mQ}	Agua Milli Q
HC11	Línea Celular Epitelial Mamaria de ratón
HEK 293-T	Línea celular <i>Human Embryonic Kidney 293-T</i>
hCME	CME Humanas
KSR	<i>Knockout Serum Replacement</i>
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
LIFR	Receptor de LIF
Luc	Luciferasa
ARNm	ARN mensajero
MC	Medio condicionado por la línea celular BGC
MCI	Macizo Celular Interno
MD	Medio de Diferenciación
MEF	Fibroblastos Embrionarios Murinos
MEFi	Fibroblastos Embrionarios Murinos irradiados
miARN	micro ARN
MP	Medio de Propagación estándar
MT	Medio de transducción
NKx2.5	<i>NK2 homeobox 5</i>
PBS	Buffer Fosfato Salino
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PEG	Polietilenglicol
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
Prdx	Peroxiredoxina
qPCR	<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>

RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especia reactivas del oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RPL7	<i>Ribosomalprotein L7</i>
RT-MMLV	Transcriptasa Reversa del Virus de Leucemia Murina Maloney
RT-PCR	Retrotranscripción seguida de PCR
RT-qPCR	<i>Reverse Transcriptase Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>
SEM	Error estándar de la media (<i>Standar Error of the Mean</i>)
SDS	Dodecil Sulfato de Sodio
SFB	Suero Fetal Bovino
Sod	Superóxido dismutasa
STAT3	Transductor de Señal y Activador de la Transcripción 3
TERT	Telomerasa Transcriptasa Reversa
Txn	Tiorredoxina
Txnrd	Tiorredoxin reductasa
UFC	Unidades formadoras de colonias
UTR	Región no traducible (<i>Untranslated región</i>)

Introducción

Células madre

Las células madre poseen dos propiedades fundamentales que las definen. La primera propiedad se denomina auto-renovación, y se refiere a la capacidad de una célula de dividirse por mitosis generando dos células hijas idénticas entre sí e iguales a la que les dio origen. La segunda propiedad esencial es la capacidad de diferenciarse, es decir, producir un cambio fenotípico que la especializa permitiéndole cumplir una función específica.

Potencial de diferenciación y el desarrollo

Existen distintos tipos de células madre que pueden ser clasificadas según su potencial de diferenciación. Este potencial va siendo más acotado a medida que avanza el desarrollo del organismo. En mamíferos, la unión entre un oocito y un espermatozoide genera una célula denominada cigoto. A medida que progresa el desarrollo embrionario, el cigoto pasa una serie de divisiones mitóticas por medio de las cuales el volumen del citoplasma del cigoto es dividido en numerosas células nucleadas pequeñas, llamadas blastómeros. Tanto el cigoto como los blastómeros de hasta el estadio de ocho células poseen el mayor potencial, ya que puede dar origen a un organismo con todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios, capacidad que se conoce como totipotencia. Las divisiones continúan hasta formar una masa compacta de células denominada mórula (Figura I.1) (Jaenisch & Young, 2008).

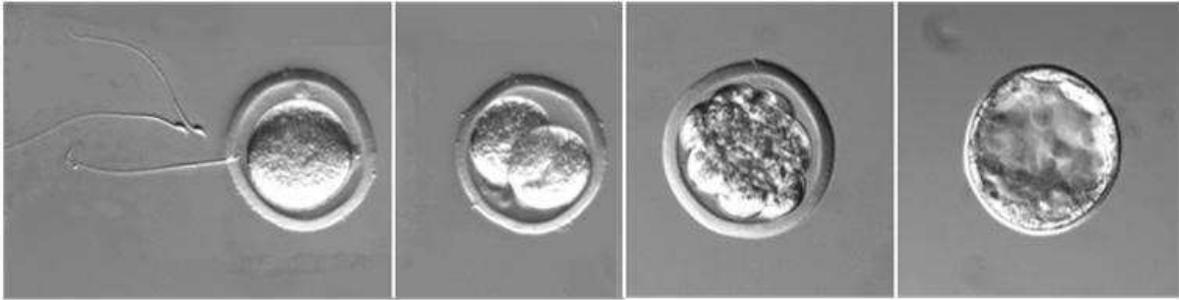


Figura I.1. Desarrollo de un embrión de ratón luego de una fertilización *in vitro*. De derecha a izquierda: Proceso de fertilización *in vitro*, embrión en estadio de 2 células, mórula de 8 células, blastocisto. Extraído de la página de la Universidad de Salud y Ciencia de Oregon, Estados Unidos (<http://www.ohsu.edu/xd/research/research-cores/transgenics/services-costs.cfm>)

Posteriormente, la mórula da origen al blastocisto, una estructura con una cavidad interna, formada por una capa exterior de células llamada trofoblasto y una capa interna de células denominada macizo celular interno (MCI) (Figura I.1 y I.2). Las células en el MCI no son totipotentes sino pluripotentes, ya que pueden dar origen a todos los tipos celulares que conforman a un individuo pero no pueden generar el linaje extraembrionario trofoblástico. De esta última población de células derivan más de doscientos tipos celulares especializados que constituyen el individuo adulto (Hochedlinger & Plath, 2009).

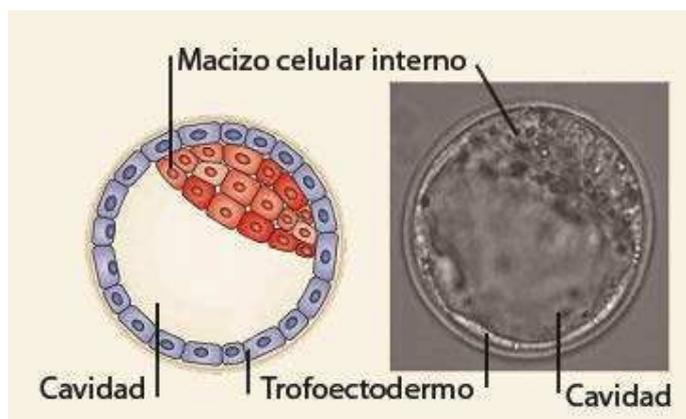


Figura I.2. Esquema y foto de un blastocisto de mamífero. Vista transversal. Adaptado de Wennekamp et al. 2013 (Wennekamp, Mesecke, Nédélec, & Hiiragi, 2013).

Las células del MCI se diferencian en dos capas, una inferior denominada epiblasto o ectodermo primitivo, y una que lo recubre, el hipoblasto o endodermo primitivo que dará lugar al saco vitelino (Figura 1.3). Las células epiblasticas son también pluripotentes, ya que son capaces de generar las tres capas embrionarias, endodermo, mesodermo y ectodermo, que posteriormente generarán todos los tejidos somáticos del embrión (Grubb, 2006). A medida que transcurre el desarrollo, las células se diferencian y se comprometen con un linaje particular, por lo que el potencial de diferenciarse a otros tipos celulares disminuye. Es por esto que las células que componen cada una de las tres capas embrionarias son multipotentes, dado que en este punto del desarrollo, sólo pueden originar células de su mismo linaje.

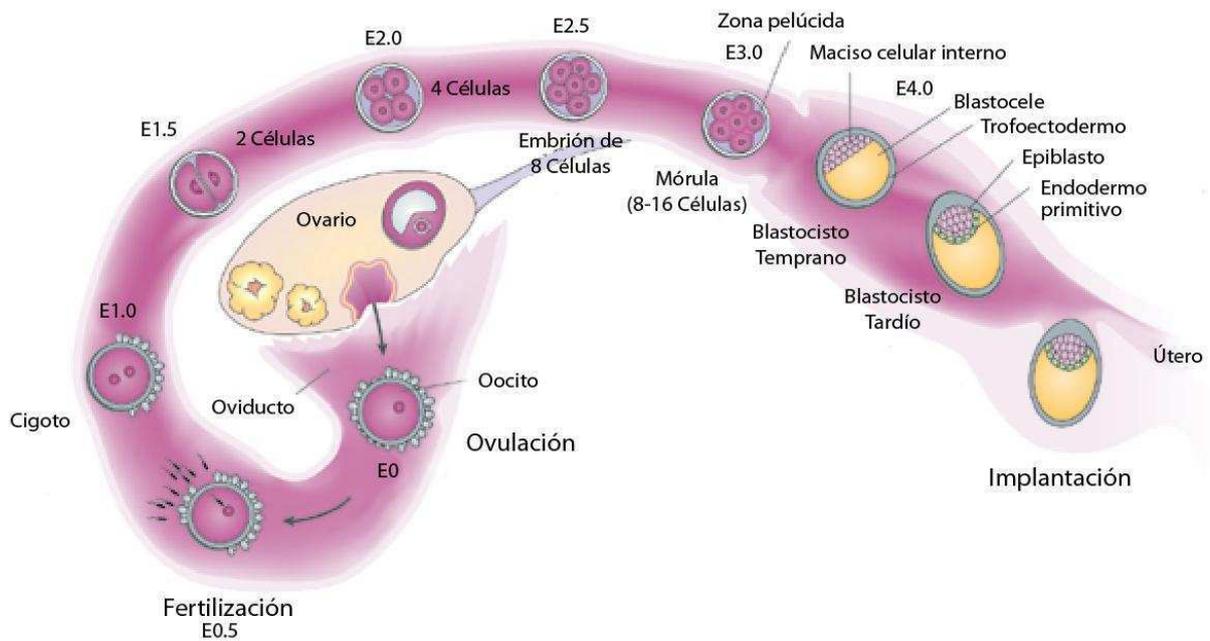


Figura 1.3. Desarrollo e implantación del embrión de ratón. Después de la fertilización en el oviducto, el embrión se somete a varias rondas de división celular, hasta la formación de la mórula. Luego, el embrión entra en el lumen uterino y se transforma en un blastocisto. Antes de la implantación, el blastocisto se libera de su capa externa (la zona pelúcida) y se diferencia a epiblasto y endodermo primitivo. En esta etapa, el trofoectodermo se une a la pared uterina para iniciar el proceso de implantación. Extraído y adaptado de Wang et al. 2006 (H. Wang & Dey, 2006).

El proceso de diferenciación y compromiso celular hacia un determinado linaje clásicamente se divide en dos etapas, donde la primera es una fase débil que puede ser revertida denominada especificación o compromiso, y una segunda etapa llamada determinación, en la cual el destino de la célula no puede ser revertido ni transformado. Luego, continúa la fase de la diferenciación celular que involucra cambios en la bioquímica, estructura y función de la célula, dando como resultado tipos celulares específicos. Estas células terminalmente diferenciadas presentes en los tejidos adultos, en general tienen un tiempo de vida relativamente corto, por lo que deben ser reemplazadas continuamente por nuevas células, que son generadas a partir de diferentes poblaciones de células madre multipotentes que existen en los tejidos adultos, denominadas en conjunto, células madre adultas o células madre somáticas, como las células madre hematopoyéticas que dan origen a células sanguíneas, las células madre mesenquimales de las que derivan osteocitos, adipocitos y condrocitos y los progenitores neurales, entre otros.

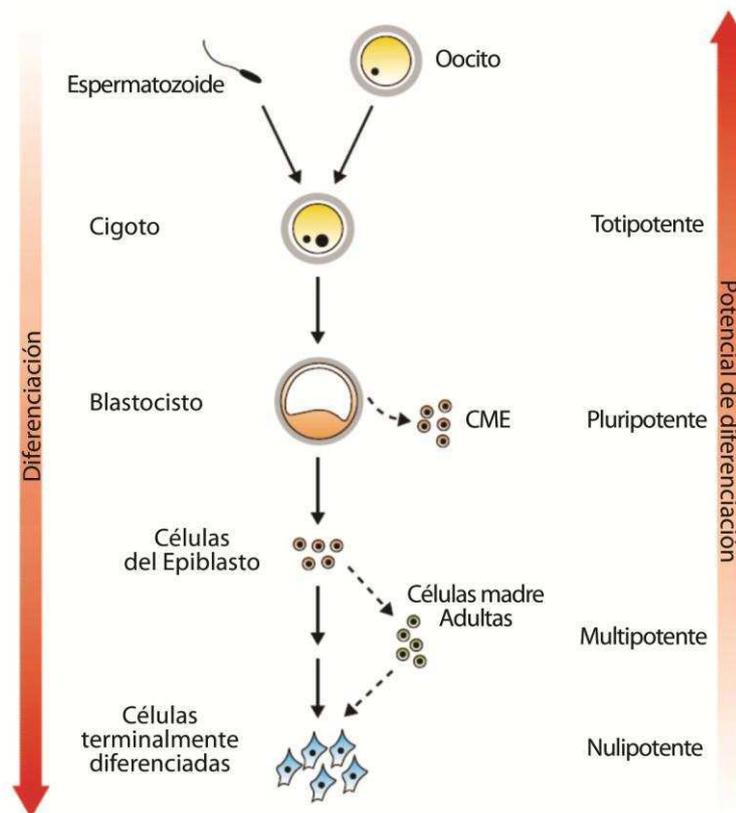


Figura 1.4. Estadios de la diferenciación celular y su potencial de diferenciación durante el desarrollo. Adaptado de Hochedlinger et al. 2002 (Hochedlinger & Jaenisch, 2002).

Como ya hemos mencionado, a lo largo del desarrollo, las células se comprometen y diferencian hacia un linaje particular, por lo que el potencial para diferenciarse a otros tipos celulares disminuye. Encontramos así, células con muy diversos potenciales de diferenciación: desde células con capacidad de dar un organismo completo, como son las células totipotentes como el cigoto, pasando por células pluripotentes como las células del MCI, hasta células terminalmente diferenciadas o nulipotentes (Figura I.4).

Células madre pluripotentes

Como hemos mencionado, a lo largo del desarrollo encontramos células con distinta capacidad de diferenciación. Un tipo celular con mayor potencial de diferenciación son las células pluripotentes. Se han derivado diferentes tipos de células madre pluripotentes a partir de distintas fuentes, como las células madre embrionarias, epiblasticas, células germinales embrionarias, células progenitoras de gametas y células de carcinoma embrionario.

Las células madre epiblasticas (CMEpi) derivan de embriones de 5,5 días, es decir, cuando ya ha ocurrido la implantación. Representan un estadio del desarrollo posterior al de las células madre embrionarias (CME), que derivan del MCI de blastocistos de 3,5 días (Figura I.3). Es por esto que presentan características diferentes, como la morfología de las colonias. Si bien ambos tipos de células madre crecen formando colonias con células que presentan alta relación núcleo/citoplasma, las colonias de CME son compactas y refringentes, mientras que las colonias de CMEpi tienen un aspecto más aplanado. Además, existen otras diferencias en los factores requeridos para su mantenimiento en cultivo y diferencias a nivel transcripcional que serán explicadas más adelante (Nichols & Smith, 2009, 2012).

Las células germinales primordiales (CGP) son un grupo de células pluripotentes que se encuentran en una región extraembrionaria a día embrionario (E) 8,5 y que migran hasta alojarse en las gónadas, donde se diferencian a células progenitoras de

gametas. Las líneas de CGP mantenidas en cultivos se denominan células germinales embrionarias, y también son pluripotentes.

Las células de carcinoma embrionario derivadas de teratocarcinomas tanto humanos como de ratón, fueron las primeras células pluripotentes mantenidas en cultivo. Su manipulación fue extremadamente útil para generar conocimiento sobre este tipo celular y encontrar condiciones que permitieron la derivación de distintos tipos de células madre.

En el año 2006 se generaron otro tipo de células pluripotentes, las denominadas células madre pluripotentes inducidas (CMPI), mediante la desdiferenciación de células somáticas hacia un estado con mayor capacidad de diferenciación.

En este trabajo de tesis, trabajamos utilizando dos de estos tipos de células madre pluripotentes, las células madre embrionarias y las células madre pluripotentes inducidas, que detallaremos a continuación.

Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias son células derivadas del MCI de blastocistos pre-implantatorios. Poseen las propiedades fundamentales de una célula madre, es decir, puede auto-renovarse y diferenciarse. En particular, las CME son células pluripotentes, por lo que su potencial de diferenciación es enorme, pudiendo generar células de las tres capas germinales, incluyendo la línea germinal. Es por estas propiedades que las CME son de gran atractivo no sólo como modelo para estudiar y profundizar en el conocimiento del desarrollo de un organismo, sino también para su aplicación en medicina regenerativa dado su potencial para originar cualquier tipo celular.

Las primeras CME fueron derivadas de MCI de blastocistos de ratón hace más de 30 años, más precisamente, en el año 1981, por dos grupos de investigación que las obtuvieron de manera independiente (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Estas líneas fueron derivadas cultivándolas sobre una capa de células nutritiva o *feeder layer* de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Esto fue fundamental ya que en ese

momento no se conocían las vías de señalización y mecanismos por los cuales se puede mantener estas células en cultivo preservando sus propiedades esenciales de auto-renovación y pluripotencia.

Como ya hemos mencionado, las CME se auto-renuevan, y al ser cultivadas *in vitro*, estas células podrían mantenerse indefinidamente en condiciones adecuadas que permitan preservar su estado indiferenciado y su pluripotencia. Además, presentan una alta tasa de proliferación, con un ciclo celular de aproximadamente 15 horas. Otra característica que permite que las CME se mantengan en cultivo largos períodos de tiempo, es la expresión del gen de la subunidad catalítica de la telomerasa (Hiyama & Hiyama, 2007), lo que evita el acortamiento de los telómeros y la consecuente inducción de la senescencia como ocurre en las células terminalmente diferenciadas, donde este gen se encuentra reprimido. Por otra parte, se observó que las líneas de CME no presentan alteraciones de su cariotipo, a pesar de ser cultivadas continuamente. Asimismo, expresan marcadores que no se expresan en otros estadios del desarrollo, por lo que son específicos del estado indiferenciado.

Las CME poseen un alto potencial de diferenciación dado por su pluripotencia, y de forma similar a lo que ocurre con las células del MCI, pueden dar origen a todas las células de un organismo. Cuando las CME reciben los estímulos adecuados que favorecen su diferenciación, estas células abandonan el estado indiferenciado, siendo entonces susceptibles a mecanismos de envejecimiento celular como cualquier célula diferenciada.

Recién en el año 1998, luego de 17 años de la derivación de las primeras CME de ratón, el grupo de Thompson y colaboradores lograron establecer el primer cultivo *in vitro* de células madre embrionarias humanas (hCME) (Thomson et al., 1998). Para esto, se utilizaron blastocistos generados por fertilización *in vitro* y que no serían implantados. Los mismos fueron donados con el consentimiento informado de los progenitores y la aprobación de la junta ética del instituto en donde se desarrollaron. Las hCME también presentan las propiedades fundamentales de auto-renovación y pluripotencia, además de otras características similares a su contraparte murina como la expresión de ciertos marcadores moleculares y la actividad de telomerasa. Si

bien, existen complicaciones aparejadas a la generación de hCME no solo éticas y morales, sino también legales y políticas, el área de investigación avanzó con gran celeridad en vistas de poder utilizarlas en terapias regenerativas. Sin embargo, las líneas derivadas utilizando MEFs como *feeder layer*, son líneas que presentan la desventaja de haber sido establecidas y mantenidas en cultivos con componentes animales. Esto impide que puedan ser utilizadas en la clínica. Por otro lado, las líneas cultivadas durante largos períodos en condiciones libres de *feeder layer* (*feeder free*) presentan una gran heterogeneidad en la expresión de ciertos marcadores moleculares y una gran inestabilidad cariotípica (Rosler et al., 2004). Esto demuestra que a pesar del potencial de estas células, quedan aún obstáculos por resolver para su uso seguro en la clínica.

Bases moleculares del mantenimiento del estado indiferenciado y la pluripotencia

Como ya hemos mencionado, las CME son células pluripotentes y con capacidad de auto-renovarse. Para mantener estas propiedades del estado indiferenciado, las células reciben señales del entorno que, por medio de un complejo sistema de receptores, modulan vías de señalización que mantienen el programa de transcripción característico de este tipo celular. Existen dos vías principales que participan en el mantenimiento del estado pluripotente de ratón: la vía de LIF/STAT3 y la vía de BMP4.

Las primeras CME fueron derivadas y mantenidas en cultivo sobre una capa de MEFs o *feeder layer*, o mediante el uso de medio condicionado de MEFs o de células de teratocarcinoma embrionario de ratón, es decir, en ausencia de *feeder layer*, preservando sus propiedades esenciales como son la auto-renovación y pluripotencia (Evans & Kaufman, 1981; Martin, 1981). Resultaba evidente que los fibroblastos que utilizaban como *feeder layer* secretaban algún factor que era capaz de mantener las CME en estado indiferenciado. En el año 1988, el grupo de investigación de Smith y el de Williams demostraron que este factor secretado por las MEFs se trataba de una

citoquina de la familia de IL-6, el Factor Inhibidor de Leucemia (LIF, *Leukemia Inhibitor Factor*) (Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Actualmente, las CME pueden ser mantenidas en cultivo en estado indiferenciado en ausencia de MEFs o de su medio condicionado por largos períodos de tiempo, mediante el agregado de LIF al medio de cultivo. La vía de señalización en la que interviene esta citoquina comienza con su unión a un receptor heterodimérico compuesto por el Receptor de LIF (LIFR) y gp130. Esta unión de LIF a su receptor produce la activación de la vía de transducción de señales Jak (*tyrosinekinaseJanus*)/STAT3 (*signal transducer and activator of transcription-3*). Jak fosforila residuos tirosina tanto en gp130 como en LIFR los cuales, a su vez, reclutan y activan a STAT3, mediante su fosforilación. Una vez fosforilado, STAT3 dimeriza y se favorece su retención en el núcleo de la célula donde cumple su función de factor de transcripción uniéndose a los promotores de sus genes blanco. Ha sido propuesto que la activación de STAT3 es necesaria y suficiente para mantener la pluripotencia de las CME cuando son cultivadas en presencia de suero fetal bovino (SFB). Por otra parte, se produce la activación de otras dos vías de señalización mediante la unión de LIF a su receptor heterodimérico LIFR-gp130: la vía de PI3K (*phosphatidyl inositol 3-kinase*) y la vía de MAPK (*mitogen-activated proteinkinase*). Estas cascadas son activadas por múltiples señales, a diferencia de la vía de JAK/STAT3 que es activada en este sistema fundamentalmente por LIF (Figura I.5)(Hitoshi Niwa, Ogawa, Shimosato, & Adachi, 2009) .

La segunda vía de señalización involucrada en conservar las propiedades esenciales de las CME es iniciada por una proteína de la familia de proteínas morfogénicas del hueso (BMP, de *Bone Marrow Proteins*), en particular BMP4. Esta molécula está presente en el SFB que contiene el medio en el cual se cultivan las CME, por lo que generalmente no se agrega como factor recombinante, como es el caso del LIF. BMP4 activa la expresión del factor de transcripción SMAD4, el cual actúa promoviendo la expresión de los genes pertenecientes a la familia Id (*Inhibitor of differentiation*). Ha sido reportado que la expresión de los genes Id1, Id2 e Id3 inhiben la diferenciación neural (Figura I.5). Ying y colaboradores lograron mantener CME en condiciones libres de SFB con el agregado simultáneo de LIF y BMP4 recombinante (Q. L. Ying, Nichols, Chambers, & Smith, 2003). Sin embargo, BMP4 en ausencia de LIF

puede tener un efecto opuesto al activar los factores SMAD1/5/8, los cuales inhiben la expresión de los genes *Id*. Es así como la presencia de BMP4 inhibe la diferenciación hacia ectodermo neural, mientras que LIF actúa inhibiendo la diferenciación hacia los linajes endodermo y mesodermo (H Niwa, Burdon, Chambers, & Smith, 1998; H Niwa, Miyazaki, & Smith, 2000). Esto demuestra que para mantener la auto-renovación de las CME es necesario que coexistan señales que activan la expresión de genes esenciales en el estado indiferenciado y señales que bloquean la expresión de genes que dirigen hacia la diferenciación.

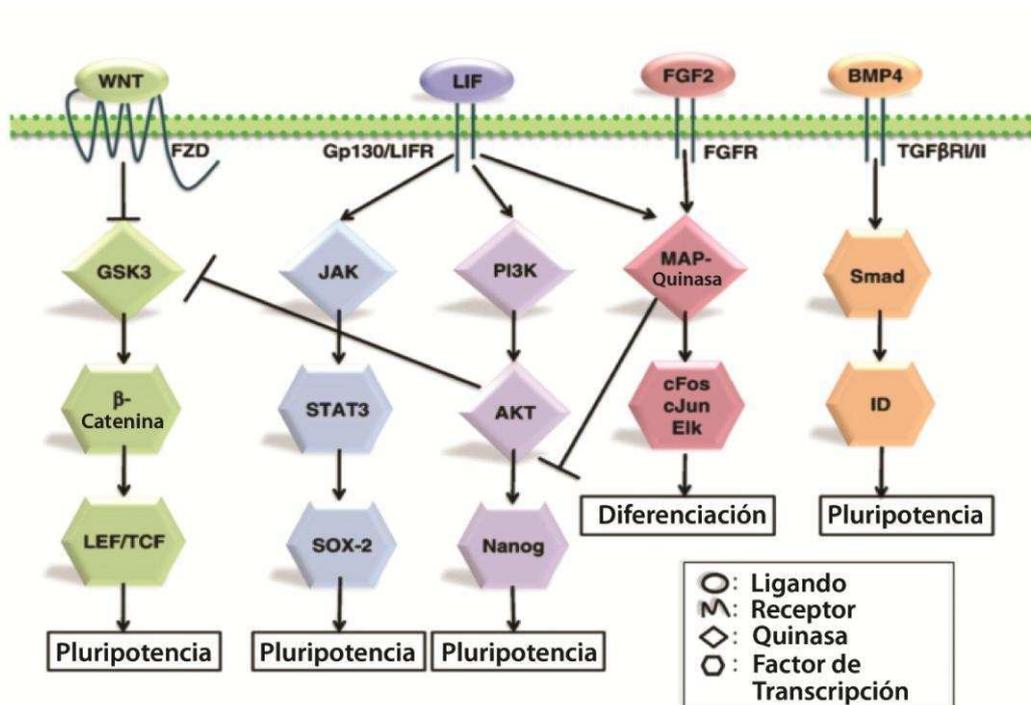


Figura I.5. Vías de transducción de señales implicadas en el mantenimiento de las propiedades básicas de CME de ratón. Adaptado de Callihan et al. 2011 (Callihan, Mumaw, MacHacek, Stice, & Hooks, 2011).

Para mantener las propiedades esenciales de las células madre embrionarias existen otras vías de señalización que colaboran con las vías activadas por LIF y BMP4. Una de ellas es la vía de Wnt/GSK3/ β catenina mantiene el estado pluripotente por períodos de tiempo cortos (Kielman et al., 2002). La unión de Wnt a su receptor inhibe

la actividad de GSK3 (*Glycogen synthase kinase 3*), y esto produce una acumulación de β catenina en el núcleo de la célula, permitiendo la transcripción de genes *target* que favorecen el mantenimiento del estado pluripotente (Figura 1.6) (Aubert, Dunstan, Chambers, & Smith, 2002).

Como hemos mencionado, la citoquina LIF activa no sólo la cascada de JAK/STAT3 que promueve el estado indiferenciado de las CME, sino que también estimula la vía de señalización de MAPK MEK/ERK que actúa favoreciendo la diferenciación (Burdon, Stracey, Chambers, Nichols, & Smith, 1999; Yoshida-Koide et al., 2004). Hace pocos años, se desarrolló un medio de cultivo más definido para mantener CME preservando su auto-renovación y pluripotencia. Este medio contiene inhibidores farmacológicos específicos de MEK (PD0325901) y de GSK3 (CHIR99021), que se lo denomina medio "2i" (Q.-L. Ying et al., 2008), además de LIF, pero no contiene SFB. Las células cultivadas en este medio presentan menor heterogeneidad en la expresión de ciertos factores de transcripción relevantes en la preservación de la pluripotencia, lo que les confiere una mayor resistencia frente a estímulos de diferenciación externos que aquellas cultivadas en presencia de SFB.

Las vías de señalización involucradas en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia en CME humanas difieren respecto a las de CME de ratón. En hCME, la citoquina LIF no es capaz de mantener el estado indiferenciado (Humphrey, Beattie, & Lopez, 2004), y la presencia de BMP4 promueve la diferenciación de estas células, por lo que deben cultivarse en ausencia de SFB. Para preservar el estado pluripotente de las hCME es necesario la activación de las vías de TGF β /Activina/Nodal, Wnt y bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*). Las proteínas Activina y Nodal pertenecen a la superfamilia de TGF β y actúan a través de los mismos receptores. En el caso de Activina, ésta participa activando la producción de bFGF, que es utilizado de rutina para promover la auto-renovación de hCME. La unión de bFGF a su receptor produce la autofosforilación de este último y la activación de las cascadas de RAS/MEK/ERK1/2 y de PI3K (R. Xu et al., 2005) (Figura 1.6). Por otro lado, Activina y Nodal promueven la fosforilación y consecuente activación de los factores de transcripción SMAD2 y 3 que preservan el estado pluripotente. Al diferenciarse las hCME, la actividad de SMAD2/3 decae y se produce un aumento en la activación de los factores SMAD1/5/8, los cuales

son activados por BMP. Más aun, SMAD 2 y 3 en conjunto con la vía activada por bFGF, inhiben la expresión de BMP4 bloqueando así la diferenciación espontánea de las hCME. Además, en hCME la proteína GDF (*Growth differentiation Factor*) también pertenece a la superfamilia de TGF β y participa en la conservación del estado indiferenciado, no sólo a través de la inhibición de BMP, sino también cooperando con Nodal. GDF establece un balance en la activación de los factores SMAD 2/3 y SMAD 1/5/8 (Figura I.6) (Medvedev, Shevchenko, & Zakian, 2010). Originalmente, las diferencias observadas para el mantenimiento del estado indiferenciado entre las CME de ratón y las humanas fueron atribuidas a una diferencia entre especies. Sin embargo, nuevos estudios y el desarrollo de células madre derivadas de epiblastos de ratón post-implantatorios (CMEpi), sugieren que las hCME representan un estadio en el desarrollo distinto del representado por las CME de ratón. Esto se debe a que tanto las hCME como las CMEpi no responden a LIF, y requieren bFGF y Activina para mantener su estado pluripotente. Además, comparten otras semejanzas como la morfología de las colonias aplanadas, el patrón de metilación de distintos genes y, en caso de tener dos cromosomas X, uno permanece inactivo. Sin embargo, se necesitan nuevos y más profundos estudios para conocer la verdadera naturaleza de las hCME (Nichols & Smith, 2012; Yildirim, 2012).

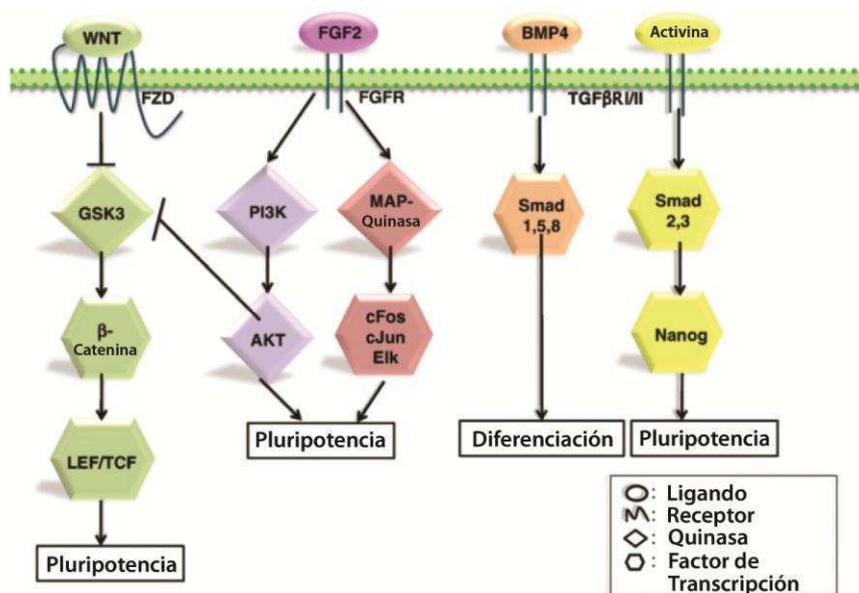


Figura I.6. Vías de transducción de señales implicadas en el mantenimiento de las propiedades básicas de CME humanas. Adaptado de Callihan et al. 2011 (Callihan et al., 2011).

Las vías de señalización descritas interactúan de manera concertada para mantener el programa de expresión génica característico de las CME, mediante la activación de efectores que preservan el estado indiferenciado e inhiben la expresión de genes relacionados con la diferenciación. A pesar de las distintas vías de señalización necesarias para mantener el estado pluripotente de las CME de ratón y las humanas, los factores de transcripción (FT) responsables de la expresión génica propia este estado están conservados, siendo Oct4, Sox2 y Nanog los factores más importantes.

El factor de transcripción Oct4 (*Octamer transcription factor 4*) es el factor esencial en el mantenimiento del estado pluripotente. Se expresa en la etapa temprana de la embriogénesis humana, de ratón y de otros mamíferos. En ratón, su expresión se restringe desde estadio de dos células hasta el MCI y el epiblasto, mientras que en humanos se expresa en el blastocisto y en el trofoblasto. Cambios en los niveles de expresión de Oct4, tanto su aumento como su disminución, producen una diferenciación de las CME generando células con marcadores de endodermo y trofoblasto, respectivamente. Esto demuestra el delicado y complejo balance que se requiere en la regulación génica para mantener el estado pluripotente, además de la importancia de este factor, dado que cambios en su nivel de expresión inducen programas de diferenciación celular (H Niwa et al., 2000). Asimismo, Oct4 forma complejos multiméricos con distintos factores de transcripción que permite activar o reprimir la expresión de sus genes *target*. Uno de los FT mejor caracterizado con el que interactúa es Sox2 (*SRY-type high mobility group box2*). Este factor también es expresado por células del MCI durante el desarrollo y su expresión persiste en el endodermo extraembrionario y en progenitores neurales. En CME, su sobreexpresión induce la diferenciación hacia células del tejido neural, mientras que una disminución en su expresión produce su diferenciación a trofoectodermo. Sox2 forma heterodímeros con Oct4, y esta interacción favorece la estabilización de este último factor (Medvedev et al., 2010; Nichols & Smith, 2012).

Otro factor de transcripción fundamental del estado indiferenciado es Nanog. En el desarrollo embrionario, este factor se expresa en embriones preimplantatorios (en el MCI y epiblasto) (Medvedev et al., 2010). Su sobreexpresión en CME de ratón

permite el cultivo de estas células en estado indiferenciado sin el agregado de LIF, mientras que CME con ambos alelos del gen mutados, se diferencian a células de tejido extraembrionario. Junto con Oct4, Nanog es un factor crítico en el mantenimiento del estado indiferenciado. Se ha reportado que la expresión del gen de Nanog es heterogénea en CME de ratón cultivadas con LIF y SFB, y que aquellas células que presentan una expresión baja o no detectable, expresan transcritos asociados a la diferenciación. Por otro lado, si estas células pasan a ser cultivadas en presencia $2i$, la expresión de este gen se vuelve elevada y homogénea, favoreciendo el estado pluripotente. Estos resultados sugieren que en CME mantenidas en LIF y SFB se encuentran en un estado “metaestable”, donde existe una fluctuación dinámica entre el estado basal de la pluripotencia y aquel que está preparado para diferenciarse (Cahan & Daley, 2013; Yeo & Ng, 2013).

El desarrollo de métodos que permiten un análisis de la distribución de factores de transcripción a lo largo de todo el genoma ha permitido conocer diversos genes blanco de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog. Mediante el uso de técnicas que permiten mapear de manera global los perfiles de unión de Oct4, Sox2 y Nanog al genoma, Boyer y colaboradores en el año 2005 y Loh y colaboradores en el 2006, estudiaron los sitios ocupados por estos FT en el CME humanas y de ratón, respectivamente (Boyer et al., 2005; Loh et al., 2006). Estos trabajos revelaron que Oct4, Sox2 y Nanog comparten un gran número de genes blanco, co-ocupando sitios de unión en sus promotores. Más aun, entre estos genes blanco se encuentran sus propios genes, es decir, Oct4, Sox2 y Nanog se unen a sus propios promotores auto-regulando su expresión mediante un *feedback* positivo (Figura I.7). Es así como forman una red transcripcional donde los niveles de estos FT son finamente regulados para mantener el estado pluripotente. Los genes que son regulados por estos FT pueden ser clasificados en dos grandes grupos. Por un lado se encuentran aquellos genes que son transcritos activamente en CME, entre los que se encuentran factores de transcripción, componentes de vías de transducción de señales y enzimas modificadoras de la cromatina que colaboran para mantener el estado indiferenciado. Por otro lado, el segundo grupo está compuesto por genes relacionados con la

diferenciación hacia los distintos linajes, por lo que su expresión es reprimida en el estado indiferenciado y se induce durante la diferenciación celular (Figura I.7).

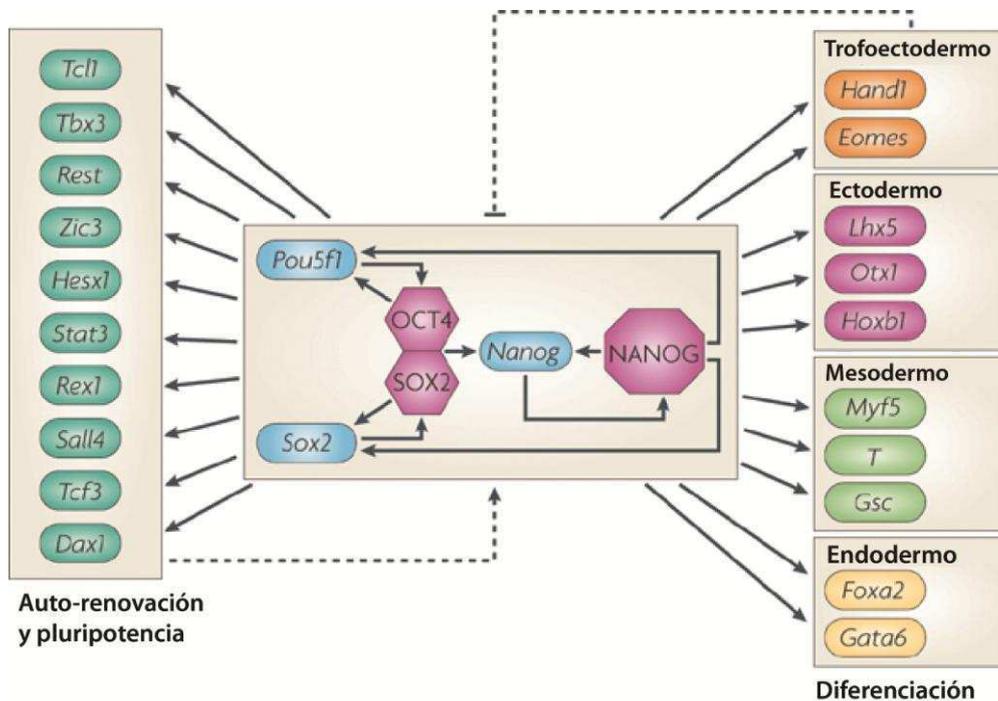


Figura I.7. Red transcripcional del estado indiferenciado. Los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog forman un módulo transcripcional que mantiene la identidad de CME, activando la transcripción de genes asociados con la auto-renovación y pluripotencia, y reprimido la de aquellos genes involucrados en la diferenciación celular. Además, Oct4, Sox2 y Nanog auto-regulan su expresión. Adaptado de MacArthur et al. 2009 (Macarthur, Ma'ayan, & Lemischka, 2009).

Además, estudios de interacción proteína-proteína han revelado que existe interacción entre Oct4, Sox2 y Nanog no sólo con otros FT, sino también con remodeladores de cromatina. Las CME tienen una alta tasa de actividad transcripcional y poseen una cromatina laxa característica. Los remodeladores de cromatina son responsables de introducir cambios en la cromatina que la hace más accesible y plástica permitiendo que los FT puedan unirse a sus *targets*. Al diferenciarse las CME disminuye la actividad transcripcional y la cromatina se compacta, demostrando la

existencia de una regulación interconectada entre estos eventos a través de la epigenética, en el mantenimiento de la auto-renovación y la pluripotencia.

Si bien Oct4, Sox2 y Nanog son tres FT fundamentales para preservar la pluripotencia, el mantenimiento de este estado es sostenido por una compleja red de señales y factores de transcripción que modulan la expresión de diversos genes. En los últimos años se han reportado nuevos FT que participan en esta red, como Esrrb, Sall4, entre otros, como así también microARNs (miARN) que juegan un papel importante en la modulación de genes a nivel postranscripcional para la conservación del estado indiferenciado (Okita & Yamanaka, 2011). Más aun, varios genes que codifican para miARNs poseen sitios de unión para Oct4, Sox2 y Nanog en sus promotores, como por ejemplo, los miARN miR-290 y miR-302. Estos miARNs son activados por los tres FT e inhiben la expresión de represores del estado pluripotente. De la misma manera, Oct4, Sox2 y Nanog reprimen la expresión de miARNs específicos de algún linaje, como miR-9 que promueve la proliferación de progenitores neurales derivados de CME humanas (Cahan & Daley, 2013). También ha sido reportado que ARNs no codificantes intergénicos largos (lincRNAs, del inglés *large intergenic non-coding RNA*), son esenciales en el mantenimiento del estado indiferenciado. Tal es el caso de lincRoR, que une miARNs que se unirían a los ARNm de Oct4, Sox2 y Nanog, y de esta manera evita que estos FT sean reprimidos (Y. Wang et al., 2013).

En conjunto, estos estudios han contribuido a esclarecer parte de la intrincada interrelación que se establece entre distintos factores como FT, remodeladores de la cromatina, miARNs y lincRNAs, para mantener y asegurar la identidad celular y el estado pluripotente.

Evaluación de la pluripotencia y la auto-renovación

Existen distintas formas de analizar las propiedades fundamentales de las CM pluripotentes. Para evaluar la auto-renovación, es decir, la capacidad de ser mantenidas en cultivo en estado indiferenciado a lo largo de los sucesivos pasajes, se

observa la morfología y la presencia de diferentes marcadores del estado indiferenciado. Las CME y CMPI de ratón crecen en colonias compactas y refringentes, con forma de domo, mientras que las humanas presentan una morfología aplanada. Durante la reprogramación, alguna de las colonias que emergen son parcialmente reprogramadas y presentan un aspecto similar a las completamente reprogramadas, por lo que el análisis de la morfología no es suficiente para identificar células madre pluripotentes. Es por esto que además se evalúa la expresión de marcadores moleculares que han demostrado ser importantes en el mantenimiento del estado indiferenciado. Los marcadores fundamentales y mejor caracterizados incluyen a los factores de transcripción Oct4, Nanog y Sox2 (Hitoshi Niwa, 2007). Otros marcadores incluyen la expresión de TERT, que es la subunidad catalítica de la telomerasa, la tetraspanina CD9, y a los carbohidratos CD15 o SSEA-1 (*Stage-Specific Embryonic Antigen 1*) en células de ratón (Ohtsuka & Dalton, 2008), y el antígeno TRA-1-60 en células pluripotentes humanas.

Además de la auto-renovación se debe evaluar la capacidad de dar células de las tres capas germinales, para lo cual existen distintos métodos *in vitro* e *in vivo*. Para estudiar la pluripotencia *in vitro*, las CME y CMPI son diferenciadas por medio de un protocolo de diferenciación no dirigido, ya sea cultivándolas en ausencia de las señales que mantienen el estado indiferenciado o mediante la formación de cuerpos embrioides, y se evalúa la presencia de las tres capas germinales (Hiroshi Kurosawa, 2007), analizando la expresión de marcadores moleculares específicos, como por ejemplo β III-Tubulina que es marcador de ectodermo, Brachyury que identifica derivados del mesodermo y α -fetoproteína, de endodermo (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006). Por otro lado, Cdx2 y Gata6 marcan a los linajes del trofoectodermo y del endodermo primitivo, respectivamente (Hitoshi Niwa, 2007).

Uno de los ensayos *in vivo* realizados para evaluar pluripotencia consiste en la formación de teratomas. Para esto, se inyectan de manera subcutánea CME o CMPI en ratones inmunocomprometidos, en los que forman tumores en los que se analiza la presencia de distintos tipos celulares derivados de los tres linajes. En este caso el tumor se denomina teratoma (Ohtsuka & Dalton, 2008). Actualmente, ésta es la

prueba para pluripotencia más rigurosa que existe para células madre pluripotentes de origen humano.

En el caso de células madre pluripotentes no humanas, hay otras formas de evaluar pluripotencia. Otro experimento *in vivo* consiste en inyectar células en blastocistos receptores (complementación diploide), y se evalúa su habilidad para contribuir en la línea germinal y en todos los tejidos de un animal adulto, formando animales denominados quimera.

La prueba más rigurosa es la complementación tetraploide. En este método primero se generan blastocistos $4n$ a partir de embriones normales. Para esto se fusionan embriones en el estadio de dos células por medio de una corriente eléctrica, generando una célula $4n$ que continuará dividiéndose hasta llegar al estadio de blastocisto. En esta estructura se inyectan las células pluripotentes. El blastocisto tetraploide puede implantarse en las paredes del útero y genera tejidos extraembrionarios, pero no es capaz de contribuir a la formación de los tejidos de un embrión, por lo que el feto que se desarrolle estará compuesto exclusivamente de células que derivan de las que fueron inyectadas (Cahan & Daley, 2013). Tanto esta metodología como la complementación diploide no pueden ser empleadas con células madre pluripotentes humanas por cuestiones éticas.

Reprogramación celular

Todas las células que conforman un organismo contienen la misma información genética. Desde el estadio de cigoto hasta el desarrollo de un individuo adulto, se activan distintos programas transcripcionales que permiten la diferenciación hacia los más de 200 tipos celulares que conforman a dicho individuo adulto. A lo largo de este proceso las células pierden potencial de diferenciación, comenzando con células totipotentes, pasando por la pluripotencia, y llegando a células multipotentes y

unipotentes que mantienen los tejidos adultos. Existe un proceso inverso, donde a partir de células terminalmente diferenciadas se obtienen células pluripotentes, es decir, células con mayor potencial de diferenciación. Este proceso se denomina reprogramación celular y se descubrió y comenzó a estudiar hace más de 50 años.

Las primeras reprogramaciones se realizaron durante la década del 50, cuando dos grupos, Briggs y King, y por otra parte, Gurdon y colaboradores, transfirieron el núcleo de una célula somática a un oocito enucleado de *Rana pipiens* y de *Xenopus leavis* respectivamente (Briggs & King, 1952; GURDON, ELSDALE, & FISCHBERG, 1958). Este procedimiento se denomina transferencia nuclear, donde se produce la reprogramación del núcleo de la célula somática mediante la modificación de ADN y de la cromatina inducida por los factores presentes en el citoplasma del oocito. Treinta años más tarde, se logró la reprogramación de células de mamífero, utilizando núcleos de distintos tipos de células somáticas y oocitos enucleados de oveja. Con este procedimiento fue obtenido el primer mamífero clonado, la oveja Dolly (Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997). Con todos estos estudios quedaba claro que todas las células de un organismo poseen la misma información genética y que cambios en la epigenética eran los responsables del cambio en la expresión génica y la consecuente modificación en la morfología y fisiología de las células.

Otra forma de reprogramar células es mediante la fusión de células somáticas con CME, generando una célula híbrida que contiene los dos núcleos y que es capaz de generar un individuo, demostrando su pluripotencia (Tada, Takahama, Abe, Nakatsuji, & Tada, 2001). Se ha reportado que para que la reprogramación tenga lugar es muy importante que ocurra la demetilación del ADN.

Como ya hemos mencionado, el desarrollo de CME atrajo la atención de los investigadores ya que constituían una fuente sumamente interesante de células para terapias de trasplante en el área de la medicina regenerativa, dada su propiedad de pluripotencia, es decir, que a partir de estas células se podrían obtener distintos tipos celulares con un potencial uso en la clínica. Sin embargo su aplicación tiene algunos obstáculos, no sólo por el problema de histocompatibilidad con el paciente, sino sobre todo, el aspecto ético aparejado al uso de embriones humanos para el desarrollo de las

CME. Es por esto que se buscaron otras formas de obtener o generar células madre pluripotentes, utilizando los distintos métodos para reprogramar células somáticas. Sin embargo, tanto la transferencia nuclear como la fusión celular tienen una tasa muy baja de eficiencia y de reproducibilidad, además de requerir CME en el caso de la fusión celular. Más aun, el mecanismo molecular por el que ocurre la reprogramación no se conocía, por lo que comenzó la búsqueda por identificar los factores responsables de la reprogramación que sufre el núcleo. Es así como en el año 2006, el campo de las células madre fue revolucionado por el trabajo de Takahashi y colaboradores, en él lograron reprogramar células terminalmente diferenciadas de ratón a células pluripotentes, denominándolas células madre pluripotentes inducidas o CMPI o iPSC, su sigla en inglés (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006). Generaron estas células mediante la introducción de cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, y posteriormente seleccionaron aquellas que activaron el locus del gen Fbx15, el cual poseía un gen de resistencia a un antibiótico. Si bien en este trabajo los autores muestran que las células obtenidas expresan marcadores del estado indiferenciado, como SSEA-1 y Nanog, y que son capaces de generar fetos quiméricos, estos ratones quimera no llegaron a la edad postnatal. Además, estas CMPI expresaban bajos niveles de varios genes clave del estado pluripotente comparadas con CME, la demetilación de promotores como el de Oct4 era incompleta. Esto demostró que las CMPI obtenidas no tenían las mismas propiedades que las CME y que la reprogramación había sido parcial. Sin embargo, este trabajo marcó un punto de partida para la obtención de CMPI completamente reprogramadas. Es así como un año después, el mismo grupo generó CMPI completamente reprogramadas, transduciendo con los mismos FT, células que tenían integrada una construcción con el gen de resistencia a un antibiótico bajo el promotor de Nanog (Okita, Ichisaka, & Yamanaka, 2007). La expresión de este gen en el estado pluripotente es fundamental y fue un mejor marcador para la selección que el que previamente habían utilizado. De esta manera, las CMPI generadas permitieron obtener ratones quimera adultos, que además contribuyeron a la línea germinal, obteniéndose posteriormente progenie completamente derivada de las CMPI obtenidas. Estos resultados demostraron que las células somáticas pueden ser reprogramadas mediante factores definidos. Más aun, ese mismo año, el grupo de Yamanaka y el de Yu, reprogramaron células humanas

terminalmente diferenciadas utilizando los mismos cuatro factores, o alguna combinación que incluyó a NANOG y a LIN28 (Kazutoshi Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007). Estos resultados en conjunto, le merecieron el Premio Nobel en Fisiología o Medicina a Yamanaka, junto con Gurdon, en el año 2012 por su aporte revolucionario en el campo de la Biología (Figura I.8).

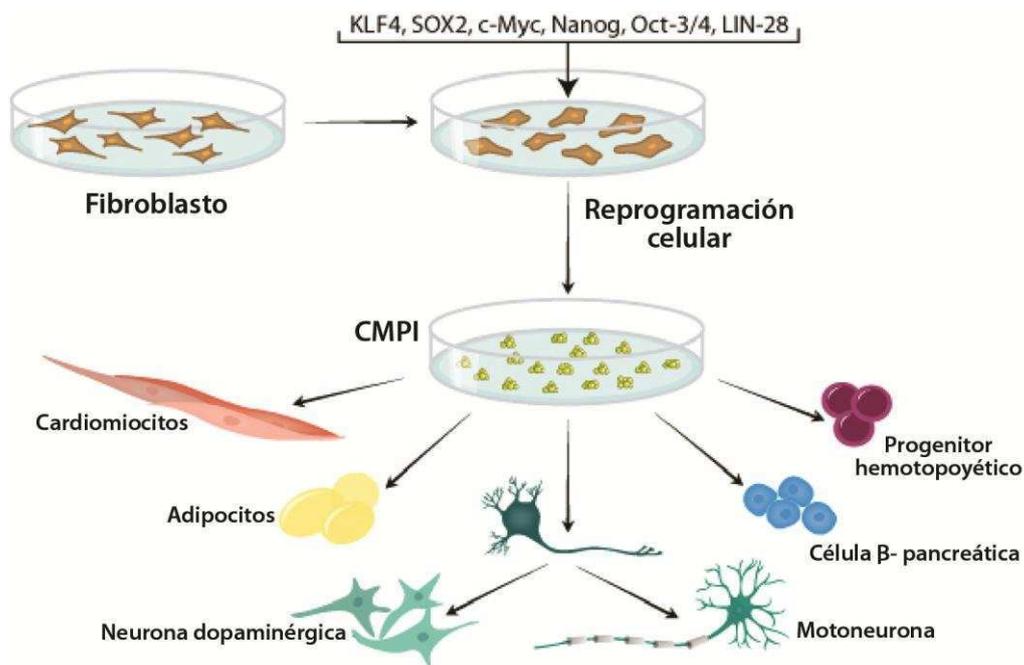


Figura I.8. Obtención y diferenciación de CMPI. Las CMPI se generan por desdiferenciación de células somáticas adultas que expresan de manera ectópica los factores de transcripción asociados con el estado indiferenciado. Por ser células pluripotentes, las CMPI tienen la capacidad de generar todos los tipos celulares. Extraído de R&D systems (http://www.rndsystems.com/Cytokine_cb09i2_induced_pluripotent_stem_cells.aspx).

A partir de estos trabajos, el área de investigación en CMPI creció de manera vertiginosa, y en poco tiempo se reportaron trabajos donde han sido reprogramadas células provenientes de diferentes especies, como células de rata, cerdo y mono rhesus (Esteban et al., n.d.; Liao et al., 2009; Liu et al., 2008), utilizando los mismos

cuatro factores, demostrando que la red transcripcional del estado pluripotente está evolutivamente conservada. Además, se han derivado CMPI a partir de distintas células somáticas incluyendo queratinocitos, hepatocitos, melanocitos, células B terminalmente diferenciadas, precursores neuronales y células β pancreáticas, entre otros (Han & Yoon, 2011; Hanna et al., 2008; Kim et al., 2008; M Stadtfeld, Brennand, & Hochedlinger, 2008) (Figura I.9).

Métodos de obtención de CMPI

En su trabajo original, Takahashi y Yamanaka utilizaron vectores retrovirales para transducir fibroblastos de ratón, integraron los genes de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc al genoma de estas células. Este método demostró ser eficiente y reproducible para la inducción de CMPI. También se han utilizado vectores derivados de lentivirus, que cuentan con la ventaja de ser capaces de transducir tanto células que están dividiéndose como aquellas que no se dividen. Los transgenes introducidos en las células son frecuentemente silenciados, lo que contribuye a una correcta diferenciación de las CMPI. Sin embargo, si esto no ocurre, no sólo puede interferir con la diferenciación de células, sino también a menudo lleva a la formación de tumores en el animal quimérico (Fussner et al., 2011; Ramos-Mejía et al., 2012). Estos métodos integran ADN al genoma de la célula a ser reprogramada, por lo que no son aptos para obtener CMPI en vistas de su potencial uso terapéutico. Es por esto que se han buscado distintas maneras de expresar los FT sin dejar secuelas en el genoma de la célula (Gonzalez et al., 2009; Matthias Stadtfeld, Nagaya, Utikal, Weir, & Hochedlinger, 2008; Yamanaka, 2009), además de evitar los posibles efectos por el *leaking* en la expresión de transgenes y la mutagénesis insercional. Es así como se han reprogramado células utilizando vectores basados en adenovirus, o mediante la transfección con vectores episomales. La eficiencia de reprogramación en estos casos (~0,001%) es de varios órdenes de magnitud menor que la obtenida con los vectores que se integran (0,1-1%), por lo que se desarrollaron distintas estrategias para insertar los genes de los FT y escindirlos una vez que las células completaron la reprogramación. Entre estos métodos están los vectores con sitios loxP y el uso de

transposones *piggyBac*, que pueden escindirse por medio de la expresión transciente de la recombinasa Cre y de una transposasa, respectivamente (Kaji et al., 2009; Woltjen et al., 2009). Sin embargo, ambos métodos presentan desventajas: el uso de sitios loxP deja una secuencia corta del vector en el genoma una vez escindido, y aún se desconoce si la expresión de una transposasa induce alteraciones genómicas inespecíficas (Matthias Stadtfeld & Hochedlinger, 2010).

Con el mismo propósito, también se han introducido los mencionados factores en células terminalmente diferenciadas en forma proteica o de ARNm (H. Zhou et al., 2009; Warren et al., 2010). Si bien estos métodos preservan el genoma de la célula intacto, la eficiencia de reprogramación es sumamente baja (Figura I.9).

Se ha reportado el uso de miARNs (Judson, Babiarz, Venere, & Bluelloch, 2009) o de distintos compuestos químicos con los propósitos de aumentar la eficiencia de reprogramación y/o disminuir el número de factores a transfectar, tratando de evitar el uso de potenciales protooncogenes como c-Myc y Klf4. Dentro de estos compuestos, existen múltiples moléculas que inhiben la actividad de diferentes enzimas remodeladoras de cromatina. Este es el caso del ácido valproico, que por ser un inhibidor de deacetilasas de histonas modifica la estructura de la cromatina, haciéndola más accesible para los factores de transcripción (Huangfu, Maehr, et al., 2008; Lyssiotis et al., 2009; Nakagawa et al., 2008; Yamanaka, 2009).

Por otra parte, se ha reportado que diferentes tipos celulares que poseen niveles endógenos significativos de los factores de transcripción anteriormente mencionados, por lo que pueden ser reprogramados eficientemente prescindiendo del agregado de alguno de estos factores (Eminli, Utikal, Arnold, Jaenisch, & Hochedlinger, 2008; Feng, Ng, Heng, & Ng, 2009).

El potencial uso de las CMPI en la clínica no sólo requiere que los factores que se utilicen en su generación sean seguros, sino también que la forma de generar estas células evite la integración de ADN extraño en su genoma.

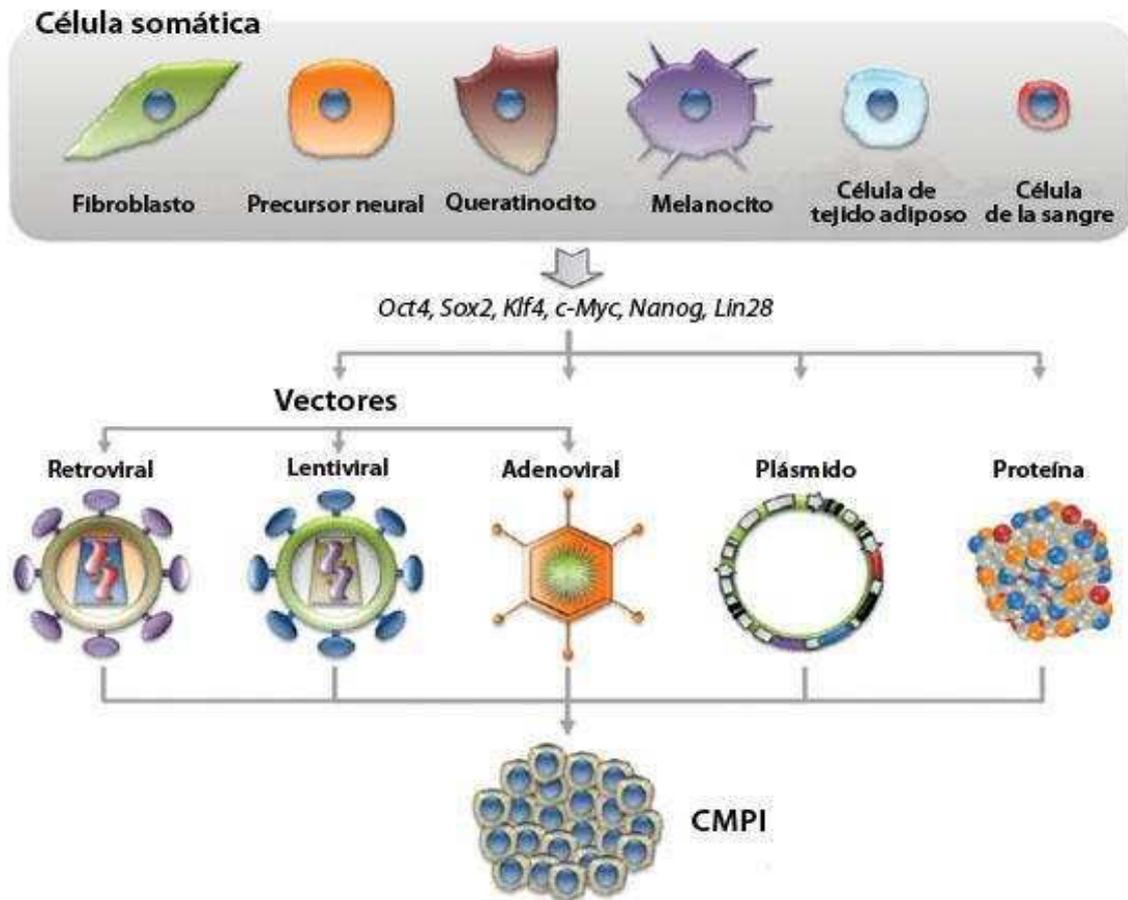


Figura I.9. Diversas fuentes de células y métodos para la generación de CMPI. Las CMPI se derivaron originalmente de fibroblastos, pero se han reprogramado con éxito células madre neurales, queratinocitos, melanocitos, células derivadas de tejido adiposo, y células de la sangre. Se han producido avances en los vectores de suministro de factores de reprogramación desde los primeros vectores virales utilizados que se integran los transgenes al genoma. Se han usado vectores basados en adenovirus, y sistemas no virales de plásmidos para la reprogramación, además de proteínas recombinantes o ARNm (no mostrado en la figura). Adaptado de Han y Yoon et al. 2011 (Han & Yoon, 2011).

Mecanismo propuesto de reprogramación

La baja cinética y eficiencia de reprogramación sugiere que existen varias barreras que la célula debe sortear para completar el proceso, una vez que los factores específicos fueron introducidos. Distintos estudios han demostrado que la reprogramación ocurre como una secuencia de eventos, comenzando por la represión de la expresión de marcadores somáticos acompañado de un cambio morfológico del tipo transición mesenquimal a epitelial. Estos eventos son seguidos de la activación de la expresión de marcadores de pluripotencia tempranos como SSEA-1, fosfatasa alcalina, Fbx15, y luego, cuando los genes de pluripotencia Nanog y Oct4 comienzan a expresarse, ya no hay dependencia de la expresión de los factores exógenos. Es importante mencionar que la transición al estado pluripotente está acompañada de un cambio en la longitud de los telómeros, un cambio global en el perfil de metilación de ADN y la remodelación de la cromatina producida por modificaciones en las histonas. Todos estos cambios llevan a un cambio en el programa transcripcional de una célula somática a una célula pluripotente. Más aun, para adquirir la capacidad de auto-renovación, la proliferación de las células aumenta y se activa la expresión de genes que intervienen en la progresión de ciclo celular y por otra parte, se inhiben los relacionados con senescencia y apoptosis (Matthias Stadtfeld & Hochedlinger, 2010; K Takahashi & Yamanaka, 2006) (Figura I.10).

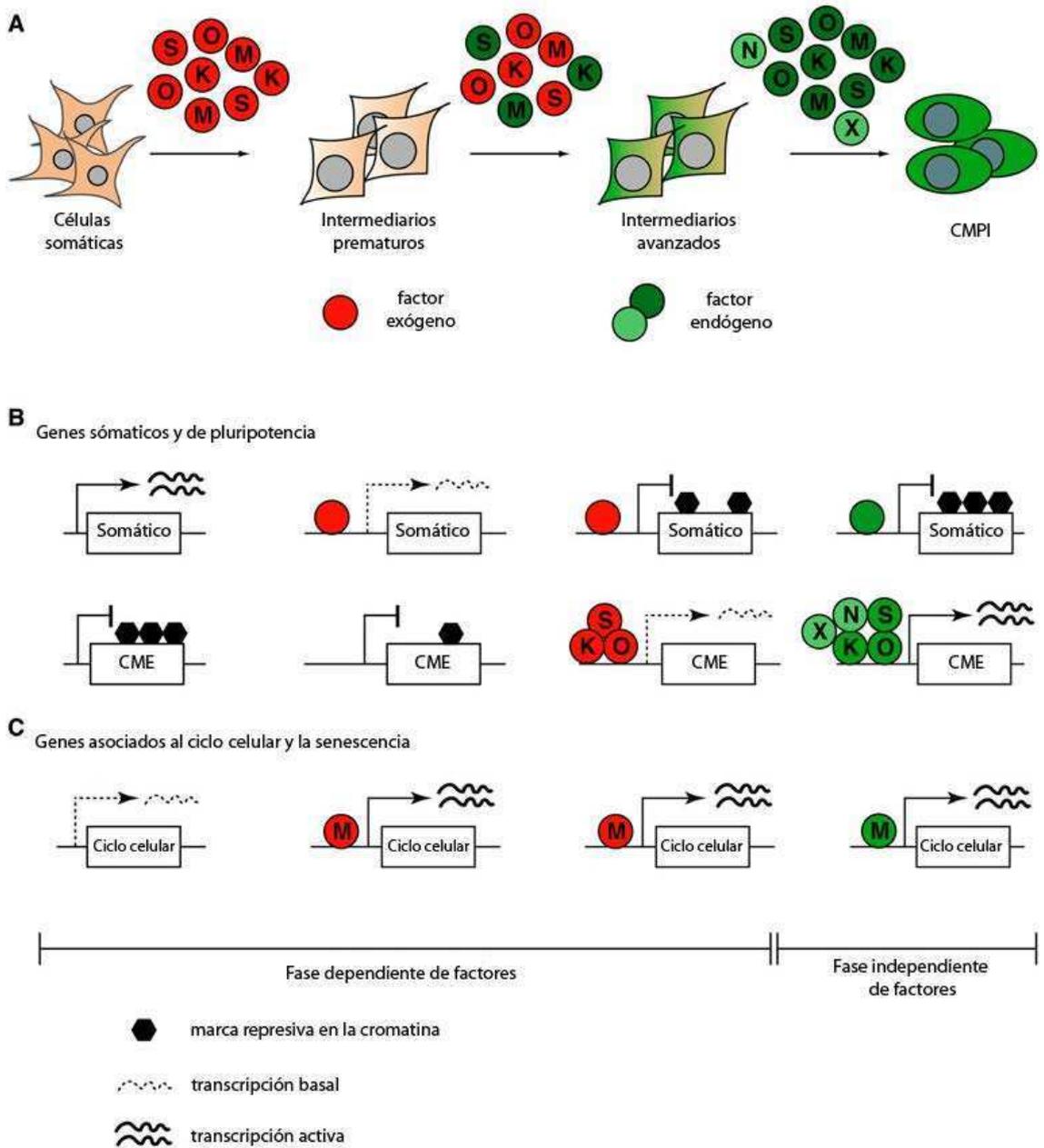


Figura I.10. Modelo del mecanismo de reprogramación celular. (A) Esquema que representa la expresión exógena (círculos rojos) y endógenos (círculos verdes) de los factores de pluripotencia durante diferentes etapas de reprogramación. El proceso es iniciado predominantemente por los factores exógenos, que son reemplazados gradualmente por los endógenos y por sus *targets*, como Nanog (N). Los loci endógenos de algunos factores de reprogramación (tales como c-Myc, Klf4, y Sox2) se expresan en algunos tipos de células somáticas, y las proteínas endógenas correspondientes están disponibles antes de la activación del locus Oct4. (B) Esquema que ilustra cómo los factores de reprogramación puede ejercer la

rápida represión de los genes somáticos y la activación gradual de genes de la pluripotencia (CME), dos procesos supuestamente mediados en gran parte por Klf4, Sox2, y Oct4. (C) Esquema que muestra la activación, principalmente por c-Myc, de genes que promueven la división celular (tales como las ciclinas). Adaptado de Stadtfeld y Hochedlinger et al. 2010 (Matthias Stadtfeld & Hochedlinger, 2010).

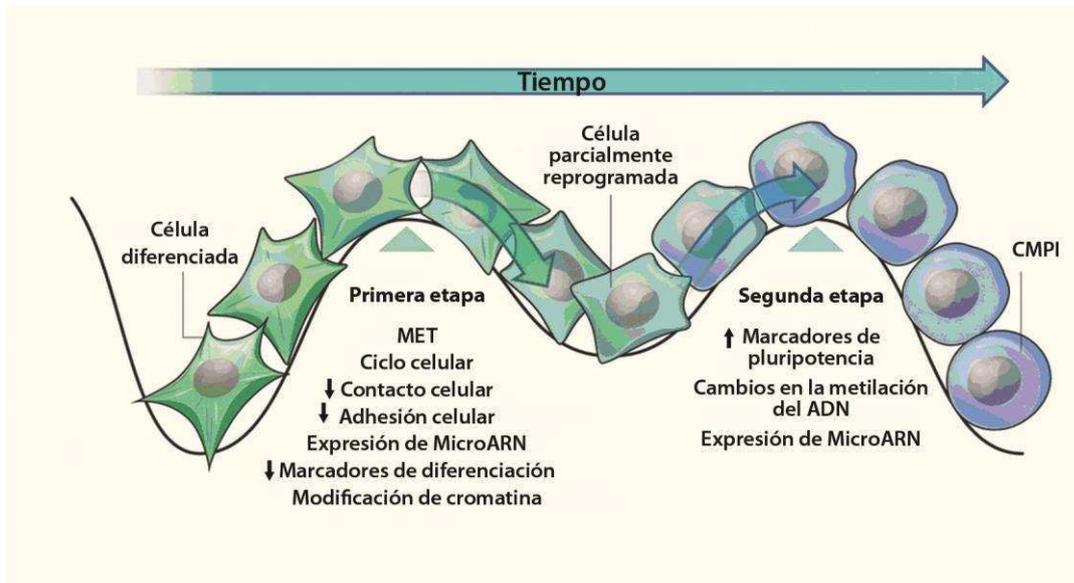


Figura I.11. Eventos subyacentes durante la reprogramación celular. La reprogramación de células diferenciadas a CMPI implica dos etapas principales. Durante la primera, ocurren cambios en el transcriptoma y la estructura de la cromatina, que afectan a la transición epitelio-mesénquima (MET) entre otros aspectos celulares, y que conducen a la supresión de la identidad de células diferenciadas. Las dos etapas se separan por una fase intermedia de cambios graduales que conducen a una mayor expresión de genes implicados en la pluripotencia. Durante la segunda etapa, se produce tanto un aumento en la expresión de genes involucrados en el establecimiento y mantenimiento de pluripotencia, como cambios en la metilación del ADN. Adaptado de Sancho-Martinez et al. 2013 (Sancho-Martinez & Belmonte, 2013).

Si bien, desde el desarrollo de las primeras CMPI en el año 2006, hubo grandes avances en el área, aún no se conoce en detalle el mecanismo molecular implicado en el proceso de desdiferenciación por el cual los factores de transcripción incorporados

por la célula diferenciada inducen las modificaciones en la estructura de la cromatina y en la expresión génica que determinan el cambio de fenotipo celular.

Como ya mencionamos, Oct4 y Sox2 son factores fundamentales para mantener el estado pluripotente en las CME, y conjuntamente con Nanog y Klf4, forman el centro de una red transcripcional que tiene como propósito reprimir genes asociados con la diferenciación y activar genes específicos del estado indiferenciado (Figura I.10). Además, Klf4 participaría antagonizando una de las funciones de c-Myc, la relacionada con la apoptosis vía p53 y p21, que regula negativamente la generación de CMPI. Por otro lado, c-Myc participaría durante el comienzo de la reprogramación, induciendo la proliferación celular. También se ha propuesto que este factor estaría involucrado en el remodelado de la cromatina, de tal manera que facilite la unión de Oct4 y Sox2 a sus genes blanco. Más aun, c-Myc activaría varios genes y miARNs altamente expresados en CME (Okita & Yamanaka, 2011; Pei, 2008; Matthias Stadtfeld & Hochedlinger, 2010).

Aplicación en la clínica

La utilización de células madre en medicina regenerativa es un campo de investigación que ha desarrollado un gran interés en los últimos años. Se presume que mediante su uso como sistema de reparación de diferentes tejidos podrían tratarse diferentes enfermedades o lesiones que requieran una población de células funcionales, como disfunciones cardiovasculares (Itescu, Schuster, & Kocher, 2003; Menard et al., 2005; Rosenstrauch, Poglajen, Zidar, & Gregoric, 2005; Y. S. Yoon et al., 2005; Y.-S. Yoon, Lee, & Scadova, 2005), enfermedades neurodegenerativas (Battista, Ferrari, Gage, & Pitossi, 2006), diabetes (Furth & Atala, 2009) y enfermedades de la sangre (A. Niwa et al., 2009), entre otras. Asimismo, mediante modificación genética, estas células podrían ser usadas como vehículos para terapia génica de diversos tipos de tumores (Studený et al., 2002).

Las CMPI presentan características similares a las CME, dentro de las que se encuentran el perfil de expresión génica, las modificaciones epigenéticas, y su capacidad de auto-renovación y de pluripotencia, es decir, su capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular perteneciente a las tres capas germinales, tanto *in vitro* como *in vivo* (K Takahashi & Yamanaka, 2006). Además, la forma de obtención de este tipo celular cuenta con la potencial ventaja de poder ser desarrolladas a partir de células del propio paciente, evitando el problema de rechazo por falta de histocompatibilidad. Por esta razón podrían ser consideradas como sustitutos de las CME para su uso terapéutico en medicina regenerativa. Es importante mencionar con respecto a este punto, que la aplicación de CMPI-paciente específica en la clínica implicaría un alto costo y tiempos de desarrollo poco compatibles con las necesidades de los pacientes, por lo que la opción más cercana para alcanzar este objetivo sería la creación de bancos de CMPI que tengan representada a la población. Por otro lado, la generación de CMPI a partir de pacientes portadores de mutaciones genéticas que originen una enfermedad, pueden ser fuente para investigación para el desarrollo de modelos de enfermedades *in vitro*. Estas células podrían ser diferenciadas al tipo celular con función anormal y ser utilizadas no sólo en el análisis de la patología, sino también para desarrollo de drogas y la evaluación de su efecto y toxicidad (Robinton & Daley, 2012) (Figura I.12).

Actualmente, los esfuerzos se concentran en importantes cuestiones respecto a la bioseguridad para su aplicación y la eficiencia en su obtención, además de la optimización de los protocolos de diferenciación hacia los distintos tipos celulares de interés terapéutico y la evaluación de la funcionalidad de las células diferenciadas obtenidas.

Si bien algunos aspectos de los mecanismos que tienen lugar en la reprogramación aún no se conocen en profundidad, en los últimos años se ha logrado un gran avance en la calidad y seguridad de las CMPI generadas. Su potencial uso en la clínica para el tratamiento de enfermedades comenzó a dar sus primeros pasos, ya que en septiembre del 2014 empezó el primer ensayo clínico en el Hospital General del Centro Médico de la ciudad de Kobe, Japón. Una mujer de 70 años que padece degeneración macular asociada con la edad, la cual puede derivar en ceguera, recibió el trasplante

de una capa de células pigmentadas de retina, derivada a partir de CMPI que se originaron de células de piel de la paciente. Para llegar a esta instancia, los investigadores han probado la seguridad de estas células en modelos animales, como ratones y monos, y han realizado ensayos de estabilidad genética para descartar que se hayan generado mutaciones en las CMPI obtenidas (Cyranoski, 2015b). Es importante mencionar que es poco probable que el procedimiento llevado a cabo en este ensayo clínico restablezca la visión del paciente, pero es de suma importancia para probar la seguridad y la ausencia de potenciales efectos adversos del uso de CMPI en el área de la medicina regenerativa (Cyranoski, 2015a).

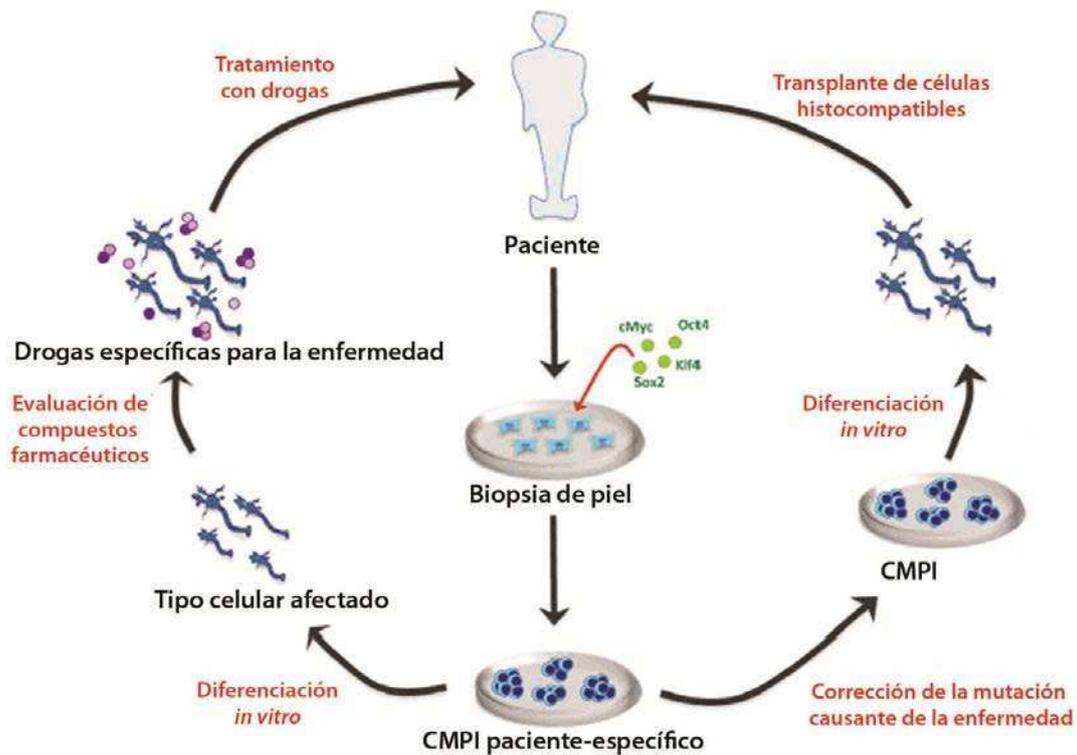


Figura I.12. Aplicaciones de las CMPI a la clínica. Las CMPI tienen el potencial de ser utilizadas para modelar *in vitro* enfermedades humanas, y evaluar nuevos compuestos terapéuticos y su toxicidad para el tratamiento de dichas enfermedades. Adaptado de Robinton y Daley et al. 2012 (Robinton & Daley, 2012).

Sistema de defensa frente al estrés oxidativo

Las células requieren energía para llevar a cabo todas las funciones celulares, para lo cual producen ATP, siendo las mitocondrias la principal fuente generadora. Estas organelas especializadas y dinámicas participan no sólo en la producción de energía, sino también en la homeostasis del calcio, la síntesis de aminoácidos, la oxidación de ácidos grasos y en la muerte celular, entre otros procesos. Para responder a la demanda energética, las células modulan la función mitocondrial a través de la biogénesis y la degradación, así también como mediante la fusión y fisión de las mitocondrias. Es así como pueden encontrarse en estructuras individuales y pequeñas o formando extensas redes tubulares (X. Xu et al., 2013).

Las células producen distintas cantidades de ATP a través de dos procesos, la glucólisis y la fosforilación oxidativa. Durante la glucólisis, se produce la conversión de glucosa a piruvato, con una generación neta de 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa. Las células que dependen principalmente de la glucólisis para la producción de ATP convierten el piruvato a lactato, que luego es excretado. Por otro lado, las células en ambientes con gran disponibilidad de O₂, realizan mayormente fosforilación oxidativa para producir ATP, generando 34 moléculas adicionales de ATP por molécula de glucosa (Figura I.13).

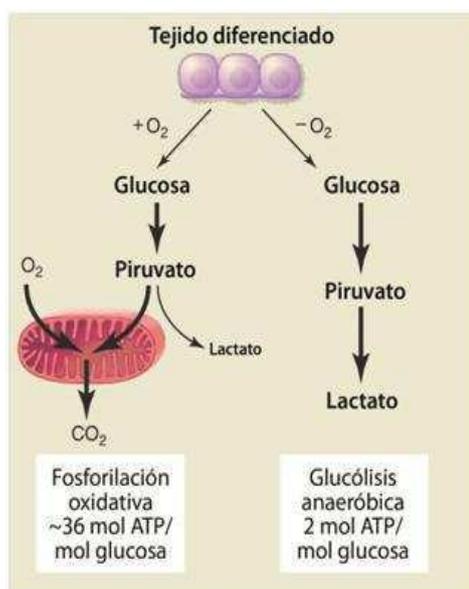


Figura I.13. Metabolismo celular según la disponibilidad de O_2 . En ambientes con baja disponibilidad de O_2 , las células producen ATP mediante glucólisis, mientras que en presencia de O_2 la generación de ATP es a través de la fosforilación oxidativa. Adaptado de Vander Heiden et. al 2009 (Vander Heiden, Cantley, & Thompson, 2009).

El piruvato generado por el metabolismo de la glucosa se convierte en acetil-CoA o en oxalacetato por distintas reacciones enzimáticas, e ingresa a la mitocondria para participar del ciclo de Krebs, generando CO_2 y ATP. Las moléculas de piruvato que ingresan a este ciclo regeneran el NADH y $FADH_2$, los cuales donan electrones a la cadena de transporte de electrones, que se encuentra en membrana interna de la mitocondrias y que tiene comoceptor final al O_2 (Figura I.14). Esta cadena está conformada por cinco complejos, siendo el complejo V o F_0F_1 ATP sintasa que genera ATP a partir ADP y fosfato inorgánico. La actividad de la cadena de transporte de electrones depende de la relación ADP/ATP y de los niveles disponibles de los sustratos del ciclo de Krebs y de los aceptores de electrones (Teslaa, Teitell, Teslaa, & Teitell, 2014). Durante el transporte de electrones a través de dicha cadena, los complejos I, III y IV bombean protones desde la matriz hacia el espacio intermembrana. Esto genera una diferencia de potencial dada por el gradiente de concentración de los protones y la consecuente diferencia de cargas de un lado y el otro de la membrana interna, la cual

es impermeable a los protones. Esta diferencia de potencial permite que el complejo V sintetice ATP acoplado al reingreso de los protones a la matriz a través de su estructura (Figura I.16).

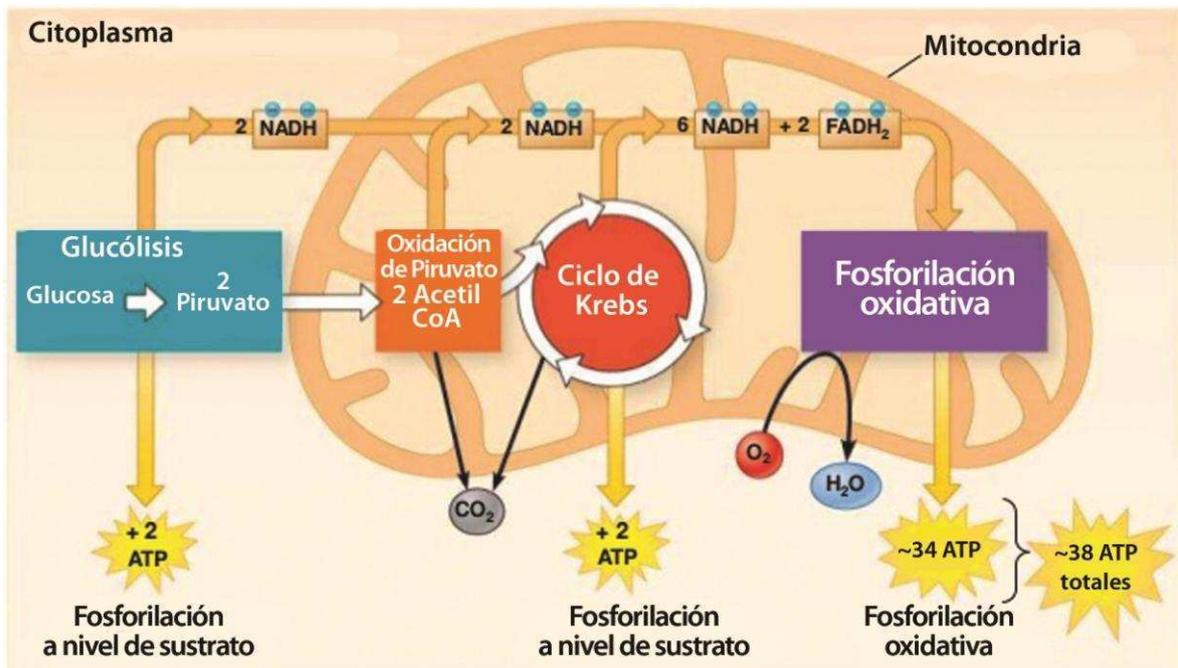


Figura I.14. Obtención de ATP mediante glucólisis y fosforilación oxidativa.

Especies reactivas del oxígeno

Las mitocondrias generan especies reactivas de oxígeno (ROS de su sigla en inglés, *Reactive Oxygen Species*) como subproductos durante el proceso fisiológico del consumo de oxígeno al realizar fosforilación oxidativa. Si bien la cadena de transporte de electrones es la principal fuente de ROS, existen otras reacciones enzimáticas que también las generan, como las llevadas a cabo por la NADPH oxidasa, la citocromo p450 y la lipoxigenasa (Holmström & Finkel, 2014).

Las ROS son radicales libres y moléculas no radicalarias derivados del O₂ e incluyen especies como el anión superóxido (O₂⁻), el radical hidroxilo (OH[·]) y el peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las ROS están involucradas en la señalización sub-celular y celular,

jugando un papel importante como segundos mensajeros en muchas de las vías de transducción de señales en las respuestas celulares frente a los estímulos del entorno, como nutrientes y citoquinas. Su homeostasis es vital para el mantenimiento de las distintas funciones como proliferación, diferenciación y apoptosis. Sin embargo, un aumento en su producción da como resultado estrés oxidativo, determinado por el desbalance entre oxidantes y antioxidantes, alterando la homeostasis de óxido-reducción celular. En este caso, las ROS producen daño a distintos componentes celulares, como proteínas, lípidos insaturados y ADN (Ufer & Wang, 2011).

Si bien las células cuentan con compuestos de bajo peso molecular, como vitaminas antioxidantes y glutatión que convierten a las ROS en sustancias inocuas; también cuentan con un sistema enzimático que minimiza el estrés oxidativo y el daño causado por ROS (Figura I.15), manteniendo estas especies en niveles fisiológicos necesarios para mediar respuestas celulares.

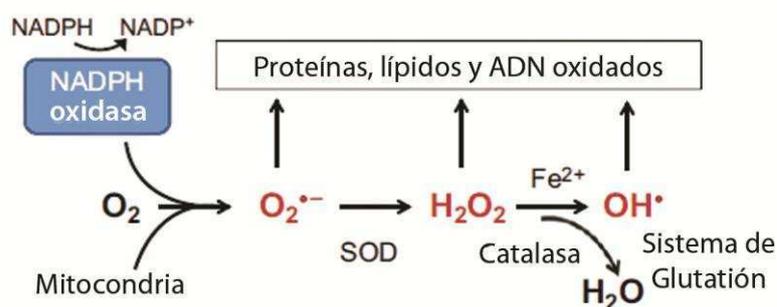


Figura I.15. Generación y eliminación de ROS. Las ROS, que incluyen al anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (mostrados en rojo), son producidas por distintas fuentes como la cadena respiratoria y la oxidación de NADPH llevada a cabo por la NADPH oxidasa. La reducción a H_2O_2 es catalizada por la superóxido dismutasa (SOD). El H_2O_2 puede ser reducido a H_2O por la catalasa o puede espontáneamente oxidar hierro (Fe^{2+}) y formar OH^{\bullet} , una especie altamente reactiva. Bajo condiciones de estrés oxidativo, cuando la generación de ROS supera el sistema de captación de ROS, la acumulación de los niveles de ROS oxidan y dañan varios componentes celulares. Adaptado de Bigarella et al. 2014 (Bigarella, Liang, & Ghaffari, 2014).

Durante el transporte de electrones a través de la cadena respiratoria, los complejos I y III generan $O_2^{\cdot -}$ como subproductos al transferir un electrón al O_2 molecular. El $O_2^{\cdot -}$ producido por el complejo III se libera tanto hacia la matriz como al espacio intermembrana de la mitocondria y es considerado el mayor generador de $O_2^{\cdot -}$, mientras que el producido por complejo I se libera principalmente hacia la matriz (Figura I.16). Esta especie rápidamente es convertida a H_2O_2 por las enzimas superóxido dismutasa 1 (o Cu-Zn-Sod), y 2 (o Mn-Sod) en el citoplasma y en la matriz mitocondrial, respectivamente. El H_2O_2 es una molécula menos reactiva que $O_2^{\cdot -}$, por lo que tiene mayor tiempo de vida media y puede difundir a través de las membranas siendo uno de los segundos mensajeros que integra las señales del entorno y las cascadas de transducción de señales intracelulares (Bigarella et al., 2014). Esta especie es metabolizada por las enzimas catalasa, glutatión peroxidasas o por peroxirredoxinas, según su ubicación celular, generando agua y O_2 como productos. La enzima glutatión peroxidasa utiliza como co-sustrato al glutatión mientras que la peroxirredoxina usa tiorredoxinas. Estas últimas, al igual que las glutarredoxinas, son proteínas con grupos sulfhidrilos capaces de oxidarse y reducirse participando en la reducción de otras proteínas (K. Wang et al., 2013). A su vez, las tiorredoxinas y el glutatión oxidados en las distintas reacciones enzimáticas, son nuevamente reducidos por tiorredoxin reductasas y glutatión reductasa, respectivamente (Figura I.17).

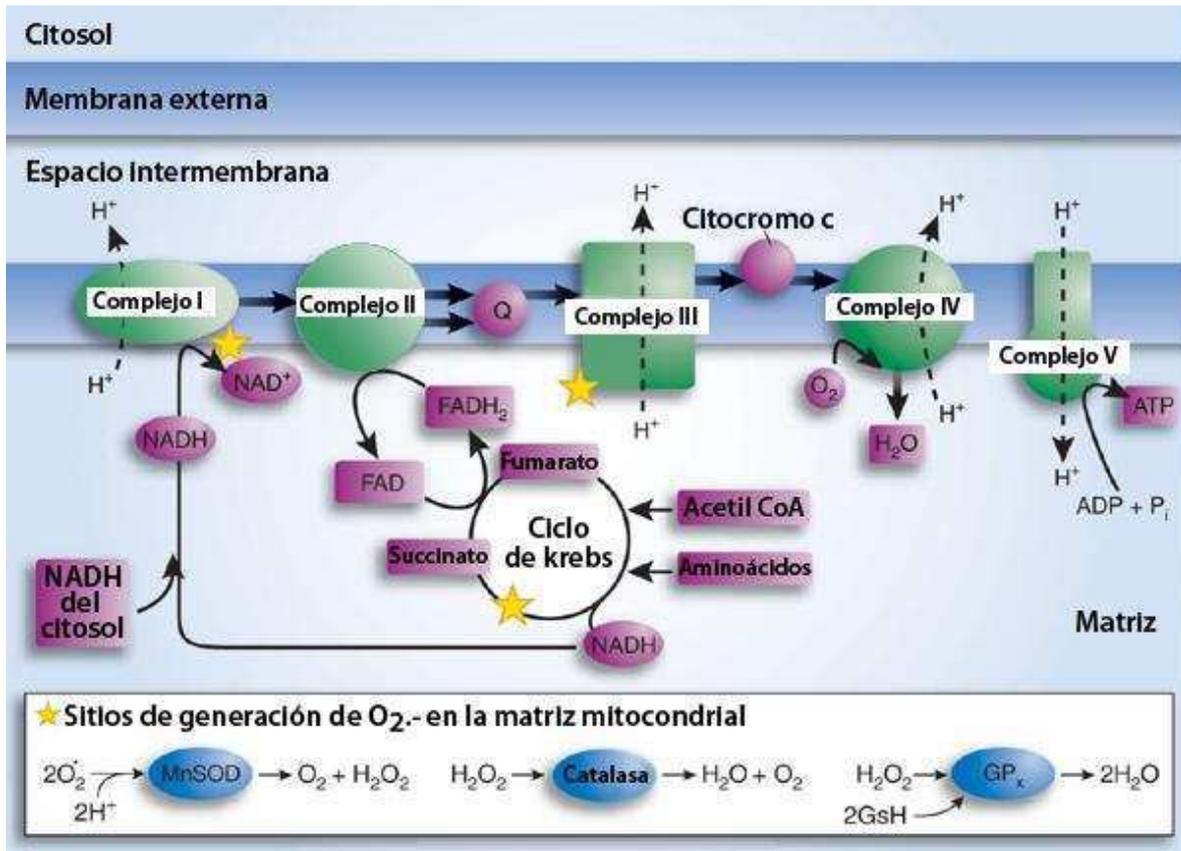


Figura I.16. Generación de ROS en la mitocondria. Los complejos de cadena respiratoria transportan electrones desde el NADH mediante una serie de reacciones de óxido-reducción que están acopladas al bombeo de protones (H⁺) al espacio intermembrana de la mitocondria. Esto genera una fuerza protón motriz que permite la síntesis de ATP por el complejo V. Normalmente, el O₂ es el aceptor de electrones en el complejo IV, pero puede ocurrir una reducción de este compuesto en otros sitios, generando O₂⁻ (sitios indicados con una estrella). Adaptado de Beal et al. 2005 (Beal, 2005).

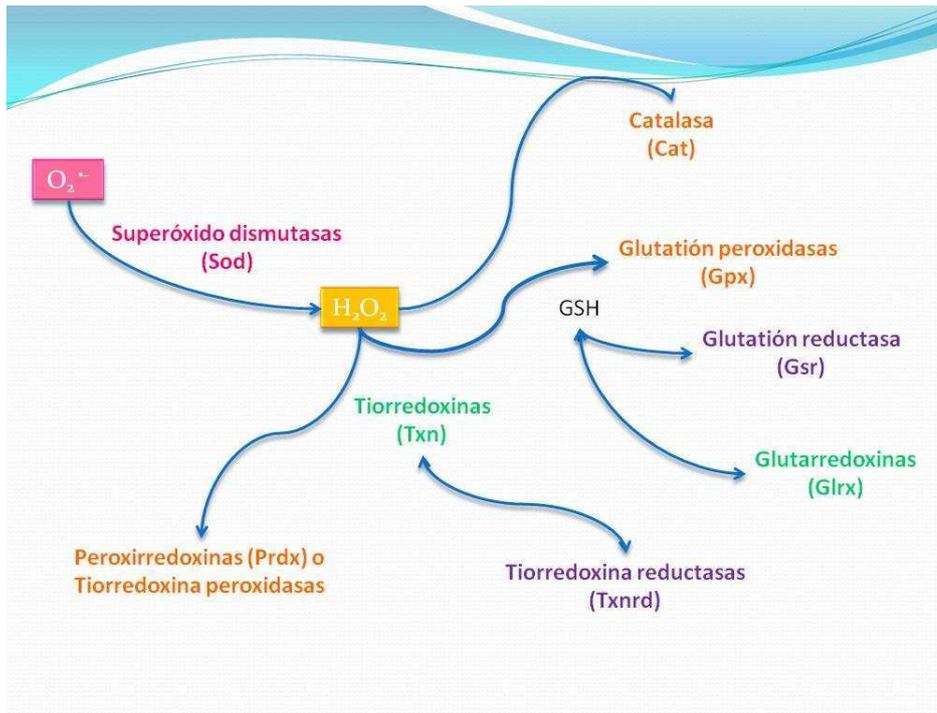


Figura I.17. Sistema de defensa frente al estrés oxidativo. Esquema de la relación de algunos de los componentes del sistema celular, como las superóxido dismutasas, peroxidases (naranja), tiorredoxinas y glutarredoxinas (verde), y reductasas (violeta).

Células madre pluripotentes y ROS

La producción de energía durante el comienzo del desarrollo de los mamíferos depende de varios factores, entre los cuales se encuentran la disponibilidad de sustratos, el consumo y la tensión de O_2 . Las células producen ATP mediante glucólisis y fosforilación oxidativa en distinta proporción, según el estadio del desarrollo y la actividad celular que es controlada por factores intra y extracelulares. En la etapa previa a la implantación durante el desarrollo del embrión de ratón, el ATP es producido principalmente por fosforilación oxidativa, y las mitocondrias originales del oocito son segregadas en las sucesivas divisiones celulares. Si bien estas mitocondrias generan ATP por fosforilación oxidativa, es importante mencionar que son estructuralmente inmaduras, de forma esférica, con crestas poco desarrolladas y se

localizan predominantemente cerca del núcleo. Conforme avanza el desarrollo embrionario, se produce un cambio paulatino en el metabolismo hacia un balance entre glucólisis y fosforilación oxidativa. Luego, ocurre un incremento en el consumo de glucosa por parte del blastocisto implantado que es metabolizada predominantemente por glucólisis en un microambiente con bajo O_2 . Durante las siguientes etapas del desarrollo, la replicación de las mitocondrias, su maduración y su distribución citosólica permite obtener energía a través del metabolismo oxidativo y la glucólisis disminuye (Folmes, Dzeja, Nelson, & Terzic, 2012; Teslaa et al., 2014) (Figura I.18).

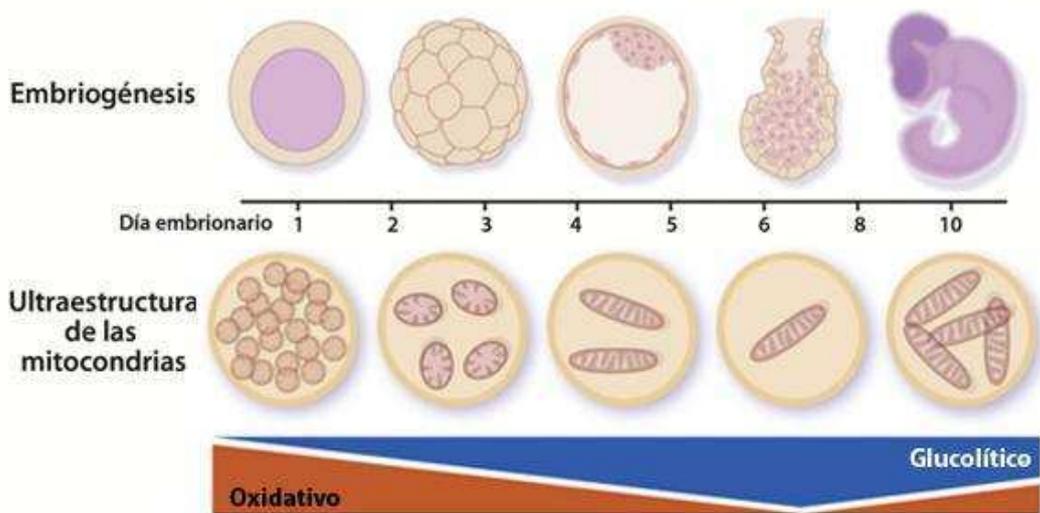


Figura I.18. Dinámica del metabolismo celular durante el desarrollo embrionario. Las mitocondrias y el metabolismo energético experimentan una remodelación dramática durante el desarrollo. Desde la formación del cigoto, el embrión depende del metabolismo oxidativo dado por las mitocondrias maternas heredadas del oocito, que posteriormente son segregadas entre las células hijas, y cuya replicación se inicia después de la implantación. Hay una aceleración simultánea de la glucólisis anaeróbica, que llega a su punto máximo después de la implantación y declina lentamente a medida que el metabolismo oxidativo se reinicia debido a la vascularización. Adaptado de Folmes et al. 2012 (Folmes et al., 2012).

Las células madre embrionarias, derivadas del MCI de blastocistos, tienen una alta tasa de proliferación, por lo que principalmente realizan glucólisis, generando ATP de manera rápida, y la vía de fosforilación de pentosas, que genera precursores necesarios para la biosíntesis de nucleótidos. Las CME no sólo requieren energía (ATP) y cofactores reducidos (NADPH), sino también carbono, nitrógeno e hidrógeno para asegurar la biosíntesis de las moléculas necesarias para la replicación celular. Es por esto que parte del consumo de la glucosa a través de glucólisis y la derivación de intermediarios a través de la vía de fosforilación de pentosas, provee una solución de compromiso entre la generación catabólica de ATP y de cofactores reducidos y la producción de sustratos necesarios para los requerimientos anabólicos.

Las CME presentan un número reducido de mitocondrias distribuidas alrededor del núcleo con una estructura similar a la observada en células de los primeros estadios del desarrollo, es decir, muestran un aspecto inmaduro, de poco tamaño y con crestas poco desarrolladas. Más aun, estas mitocondrias presentan una menor capacidad respiratoria en comparación con las mitocondrias de fibroblastos, pero tienen un mayor potencial de membrana mitocondrial, un componente importante de la fuerza protón motriz. Si bien, un potencial elevado de membrana es un indicador de una actividad incrementada de la cadena de transporte de electrones, las mitocondrias de las células madre son metabólicamente más inactivas con respecto a las de células más diferenciadas, en términos de producción de ATP, pero están listas para responder a un incremento en la demanda de energía durante la diferenciación. Es importante hacer una distinción en el metabolismo entre las CME humanas y de ratón. Como ya hemos mencionado al comienzo de la introducción, las CME humanas representan un estadio del desarrollo posterior al de las CME de ratón, donde la glucólisis es el mecanismo preponderante para obtener energía, mientras que las CME de ratón muestran un metabolismo bivalente que puede variar entre glucólisis y fosforilación oxidativa según la necesidad de cada momento (Bigarella et al., 2014; Folmes et al., 2012; Teslaa et al., 2014) (Figura I.19).

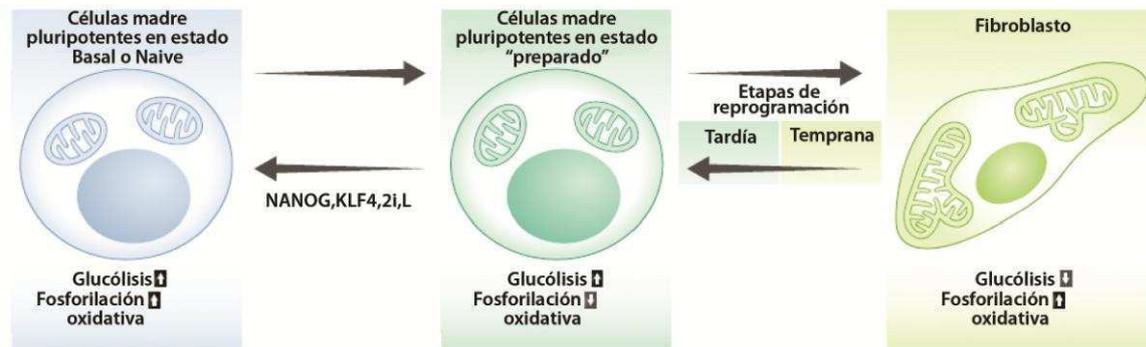


Figura I.19. Dinámica del metabolismo celular en el estado indiferenciado, la diferenciación y la reprogramación celular. Las células madre pluripotentes en estado basal o *naive* muestran un aumento en la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa en comparación con el estado "preparado" para diferenciarse. Puede haber una conversión de este último estado al basal, mediante la expresión ectópica de NANOG y KLF4 y mediante el cultivo en presencia de 2i y LIF (Takashima et al, 2014). Durante la diferenciación celular, hay un aumento de la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP. Los fibroblastos tienen un metabolismo más oxidativo que las CMPI que originan. Adaptado de Teslaa et al. 2014 (Teslaa et al., 2014).

Como ya mencionamos, las CME son un grupo pequeño de células que fisiológicamente dan lugar a todos los tejidos del embrión, incluyendo la línea germinal. Es por esto que se cree que estas células deben contar con mecanismos muy eficientes que garanticen la estabilidad genómica, previniendo daños al ADN, reparándolos si hubiesen ocurrido, y eviten su propagación si no pudieran ser reparados. En concordancia con esto, ha sido reportado que las CME tienen una tasa de mutación 100 veces menor que los fibroblastos embrionarios de ratón (Cervantes, Stringer, Shao, Tischfield, & Stambrook, 2002), lo que podría ser consecuencia de la acción concertada de un mecanismo eficiente que mantiene bajos niveles de estrés oxidativo (Gabriele Saretzki et al., 2008), y mecanismos de reparación de ADN con alta actividad y fidelidad. En caso de acumulación de mutaciones u otros daños en el ADN, las CME son inducidas a sufrir apoptosis o a diferenciarse, eliminando estas células de

la población de células madre, proporcionando de esta manera otra forma más de proteger su genoma (Stambrook, 2007).

Durante el desarrollo, la defensa frente al estrés oxidativo del embrión se ve desafiada por la creciente cantidad de ROS, lo que resulta en una disminución continua de los niveles de glutatión (Winkler et al., 2011). Asimismo, durante el proceso de diferenciación de CME, ha sido reportado que el número de mitocondrias se incrementa cubriendo la demanda de ATP requerida por las células diferenciadas. Se ha demostrado que el número de mitocondrias y la biogénesis mitocondrial es baja en CME y que se produce un aumento tanto en los niveles de ROS (Gabriele Saretzki et al., 2008) como en la proliferación y la actividad mitocondrial durante la diferenciación (St John et al., 2006), de forma concomitante con una mayor demanda de ATP (G Saretzki, Armstrong, Leake, Lako, & von Zglinicki, 2004; Gabriele Saretzki et al., 2008). Más aun, recientemente se ha demostrado que existe una relación entre las mitocondrias, y la determinación y el desarrollo celular. Existen evidencias que altos niveles de ROS promueven la diferenciación en células madre hematopoyéticas (Ito et al., 2006; Jang & Sharkis, 2007) y en células madre embrionarias (Schmelter, Ateghang, Helmig, Wartenberg, & Sauer, 2006), pero en progenitores neurales los ROS son necesarios para mantener su auto-renovación (Bigarella et al., 2014). Esto sugiere un rol de la actividad mitocondrial en el balance entre la auto-renovación y la diferenciación.

Dada la importancia de asegurar el genoma y de mantener los niveles de ROS en un rango fisiológico, las CME no sólo presentan un consumo de oxígeno y una biogénesis mitocondrial reducidos, sino también un sistema de reparación del ADN exacerbado y una alta actividad de las diferentes enzimas antioxidantes. Las CMPI tienen sistemas de defensa frente al estrés oxidativo similares a los de CME, a pesar de ser derivadas de células terminalmente diferenciadas que contienen mayor cantidad de mitocondrias morfológica y metabólicamente distintas. También se ha encontrado que los niveles de ROS en CMPI indiferenciadas son bajos y que se incrementan durante la diferenciación, similar a lo que ocurre en CME. Por otra parte, se reportó que el número de mitocondrias en las líneas de CMPI fue menor que en los fibroblastos de las cuales derivaron (Armstrong et al., 2010). Durante la reprogramación, no sólo se produce una reducción, y un cambio de morfología y

distribución de las mitocondrias, sino también un cambio en el metabolismo pasando de obtener energía mediante fosforilación oxidativa a hacerlo principalmente por glucólisis (Teslaa et al., 2014). Este cambio parece ser indispensable y uno de los primeros en ocurrir durante la reprogramación. En conjunto, estas evidencias sugieren que durante el proceso de reprogramación para la obtención de CMPI, hay una activación de los mecanismos celulares que proporcionan una defensa frente al estrés oxidativo y la posibilidad de conservar a las ROS en niveles adecuados para inducir y mantener las propiedades de auto-renovación y pluripotencia.

Superóxido dismutasas

Como mencionamos, las células cuentan con un complejo sistema de distintas moléculas y enzimas que regulan los niveles de ROS, permitiendo su función como segundos mensajeros involucrados en diversas respuestas celulares como proliferación, diferenciación y apoptosis. Además, la regulación de ROS por parte de este sistema previene los efectos deletéreos que podrían ocurrir en la célula en caso de estrés oxidativo. Dentro de las enzimas involucradas en la defensa frente a este tipo de estrés, se encuentran las superóxido dismutasas (Sod), las cuales constituyen la primera línea de defensa frente a ROS. En particular, las Sod metabolizan el O_2^- , producido principalmente por el complejo I y III de la cadena de transporte de electrones, pero también el derivado de estímulos extracelulares como la radiación ionizante, generando H_2O_2 y O_2 .

Existen tres tipos de isoformas de Sod identificadas en mamíferos: Sod1 o Cu-Zn Sod codificada por el gen Sod1, Sod2 o Mn Sod codificada por el gen Sod2 y Sod3 o EC-Sod codificada por el gen Sod3. Si bien, las tres isoformas poseen funciones similares, las características estructurales, la localización cromosómica, el cofactor que utilizan y la compartimentalización celular en la que se ubican es diferente entre ellas. Tanto las isoformas Sod1 como Sod3 poseen cobre y zinc en sus centros catalíticos, siendo el cobre el metal que participa en la reacción de reducción, mientras que el zinc estabiliza la enzima. Por otro lado, Sod2 posee manganeso como cofactor. Las tres isoformas

tienen una ubicación diferencial, siendo la isoforma Sod1 principalmente citoplasmática, Sod2, mitocondrial y la Sod3 está presente en compartimentos extracelulares. Además, la distribución de las Sod1 y 2 es generalizada, representando la actividad de Sod1 un 70% de la actividad total de la célula, mientras que la expresión de Sod3 está restringida a ciertos tejidos, como pulmones, riñón y tejido adiposo (Miao & St.Clair, 2010; Ookawara et al., 1998; Zelko, Mariani, & Folz, 2002). Las distintas características de estas tres isoformas se resumen en la tabla I.1.

Isoforma	Localización	PM/kDa	Subunidades ensambladas	Cofactor
Cu-Zn Sod	Citoplasma, núcleo, membrana mitocondrial	32	Homodímero	Cu ²⁺ (catalítico) Zn ²⁺ (estabilidad)
Mn Sod	Matriz mitocondrial	88	Homotetrámero	Mn ²⁺ (catalítico)
EC-Sod	Membrana plasmática, fluidos extracelulares	135	Glucoproteína homotetramérica	Cu ²⁺ (catalítico) Zn ²⁺ (estabilidad)

Tabla I.1. Características de las tres isoformas de la enzima superóxido dismutasa. Extraído y adaptado de Miao et al. 2010 (Miao & St.Clair, 2010).

En particular, Sod2 es una proteína que existe como homotetrámero, y cuyas subunidades pesan alrededor de 23 kDa. En ratón, el gen que codifica para Sod2 se encuentra en el cromosoma 17. Dentro de las tres isoformas, Sod2 tiene una organización genética con poca similitud con Sod1 y Sod3, las cuales comparten semejanzas a nivel genético y en secuencia aminoacídica. La secuencia del gen sod2 se encuentra altamente conservada en distintas especies, como humano, ratón, rata y vaca, presentando más del 90% de homología en la secuencia codificante. Este gen está compuesto por 5 exones y 4 intrones. La región promotora no presenta una TATA box o CAAT box río arriba del sitio del inicio de la transcripción. Sin embargo, posee regiones enriquecidas en GC. Por otra parte, presenta secuencias consenso para la unión de los factores de transcripción NF-κB, Sp-1 y AP-2 en la región proximal del

promotor, siendo regulado positivamente por los dos primeros, pero reprimido por AP-2 (Miao & St.Clair, 2010; Zelko et al., 2002). Además, ha sido demostrado que su transcripción es regulada por el factor de transcripción FOXO3a, el cual también funciona como sensor del estado de oxido-reducción de la célula, desencadenando una respuesta en consecuencia sobre sus genes blanco (Bigarella et al., 2014).

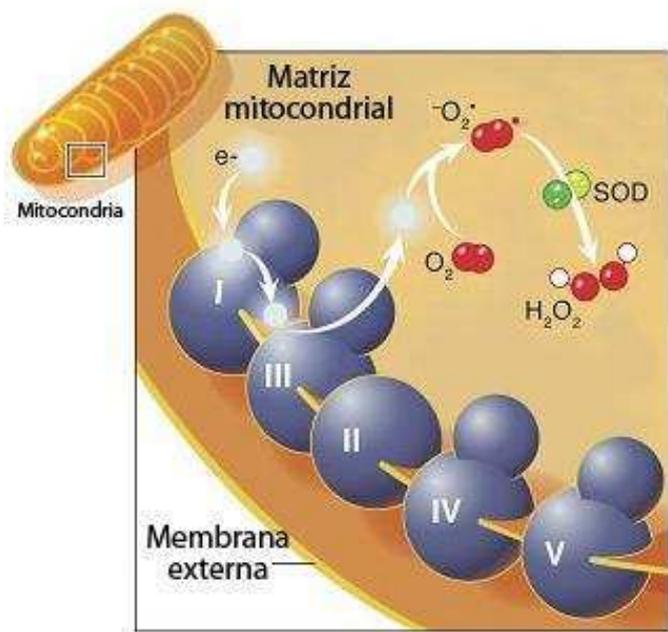


Figura I.20. Ubicación y reacción catalizada por la Mn-Sod. Esta enzima se ubica en la matriz mitocondrial y metaboliza el anión superóxido generando peróxido de hidrógeno y O_2 . Adaptado de "Mutagénesis" 2012 (Vermulst, Khrapko, & Wanagat, 2012).

La expresión de un gen no sólo está sujeta a la regulación transcripcional, sino también puede ser regulada por cambios en la estabilidad y traducibilidad del ARNm y por modificaciones post-traduccionales. A nivel post-transcripcional, se ha identificado en la secuencia del ARNm de *sod2* de rata, un fragmento de aproximadamente 280 nucleótidos que determina la estabilidad del ARNm en ausencia del tránsito de ribosomas (C. a. Davis, Monnier, & Nick, 2001). Además, el ARNm de *sod2* tiene en la región 3'UTR un elemento Alu que podría ser blanco de microARN. Por otro lado, se ha

descripto una proteína que se une a esta región 3'UTR del transcripto de sod2 e incrementa su traducción (Miao & St.Clair, 2010).

Si bien Sod2 es la primera línea de defensa frente las ROS generadas en las mitocondrias y parte de su regulación es conocida, aún no se conoce en profundidad mediante qué mecanismos se regula su transcripción.

Desde su derivación, las CME fueron pensadas como una fuente promisoría de células para terapia regenerativa, atrayendo la atención por su potencial uso en la clínica. El desarrollo de las CMPI marcó un hito en el área de las células madre, siendo además consideradas como un posible reemplazo de las CME en la clínica. Dadas las características similares entre ambos tipos celulares, entendemos que es fundamental el estudio de los mecanismos implicados en la reprogramación celular, así como aquellos involucrados en mantener el estado indiferenciado y en inducir la diferenciación celular. Además, debido al creciente conocimiento de la importancia del rol de las ROS como mediador de respuestas celulares, consideramos esencial la comprensión de los mecanismos con los que cuentan las células madre pluripotentes tanto para mantener los niveles de ROS en un rango fisiológico, así como para asegurar la estabilidad del genoma. Dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en mantener las propiedades esenciales de este tipo de células es fundamental para la comprensión de las etapas tempranas del desarrollo, así como para lograr la optimización tanto de protocolos de diferenciación hacia un linaje de interés, como de dediferenciación para aumentar la eficiencia de obtención de CMPI, necesarios para la futura aplicación de las CMP en el área de la medicina regenerativa y terapias celulares. A través de nuestro trabajo, esperamos poder contribuir en esta área en auge.

Hipótesis y Objetivos

A lo largo de la introducción nos propusimos destacar la importancia de contar con un modelo de CMPI, dado que posee características similares a las de las CME y que además son consideradas como posibles sustitutos de éstas para su uso terapéutico. Por otro lado, es de suma importancia conocer los mecanismos que si bien poseen todas las células, están exacerbados en las CMP, para preservar su integridad y estabilidad genómica evitando la propagación de daños genéticos, siendo uno de estos mecanismos un complejo sistema de defensa frente el estrés oxidativo. El mismo está compuesto por una serie de proteínas que actúan de manera coordinada manteniendo las ROS en niveles apropiados, de tal forma que puedan cumplir su función como segundos mensajeros, pero sin generar daños en la célula. Los genes de algunas de las proteínas que forman parte de este sistema se modulan a lo largo de la diferenciación. Nuestra hipótesis es que algunos de estos genes podrían ser regulados por los factores de transcripción fundamentales de células madre pluripotentes, como son las CME y las CMPI.

El objetivo general del proyecto en que se enmarca este trabajo es estudiar los mecanismos moleculares involucrados en las desdiferenciación para la obtención de CMPI, y en el mantenimiento del estado indiferenciado y diferenciación de las células madre pluripotentes.

En base a la hipótesis planteada y al objetivo general, nos propusimos los siguientes objetivos específicos:

1. Desarrollar y caracterizar CMPI de ratón explorando diferentes condiciones para su obtención con el propósito de establecer un modelo que pueda estudiarse de manera comparativa con las CME.
2. Utilizar las CMPI obtenidas como herramienta para el estudio comparativo con CME con el fin de identificar mecanismos conservados o diferentes

entre los dos tipos de CMP, particularmente, en el estudio del efecto de un medio condicionado que permite el cultivo de CME.

3. Analizar el perfil de expresión de genes involucrados en el sistema de defensa frente al estrés oxidativo, tanto en CME como en CMPI, en el estado indiferenciado y en distintos estadios de diferenciación.

4. Seleccionar genes que presenten perfiles de expresión que sean similares con los perfiles de los factores de transcripción esenciales para mantener el estado indiferenciado y la preservación de la pluripotencia, y estudiar si son regulados por estos factores de transcripción.

a. Estudiar los niveles de transcripción de los genes candidato en CME sometidas a condiciones que modulan la expresión de los factores de transcripción esenciales de CMP.

b. Construir vectores reporteros para estudiar la modulación de los genes de interés mediante una estrategia de transfección transciente, co-transfectando la construcción reportera y los factores de transcripción mencionados en un sistema heterólogo con bajos niveles de expresión de dichos factores.

Creemos que el estudio de esta regulación contribuirá a la comprensión de los mecanismos moleculares involucrados en la preservación de las características fundamentales y en la integridad del genoma de las células madre pluripotentes. La posibilidad de disponer en el futuro de terapias basadas en CMP, depende en gran medida, tanto de su habilidad para mantener un genoma intacto como de la calidad de las células diferenciadas derivadas de éstas. A través del estudio aquí planteado, esperamos poder realizar un aporte a este promisorio campo.

Materiales y Métodos

Cultivo celular

Cultivo de Células Madre Pluripotentes de ratón

Trabajamos con las líneas de CME de ratón Ainv15 y R1, que adquirimos comercialmente (ATCC), y con líneas de CMPI que desarrollamos en el laboratorio como uno de los objetivos de esta tesis. Ambas líneas de CMP pueden ser cultivadas sobre una capa nutricia de células, o *feeder layer*, constituida por fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) inactivados mitóticamente (MEFi) o sobre placas previamente recubiertas con gelatina de piel bovina 0,1% (Sigma) para favorecer la adherencia de las células.

El medio de propagación (MP) de las CMP se compone por *Dulbecco's Modified Eagle Medium (high-glucose DMEM*, Gibco) suplementado con 2 mM L-alanil-L-glutamina (Gibco), 100 mM MEM aminoácidos no esenciales (Gibco), 0,5 mM β -mercaptoetanol, y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/mL estreptomicina, Gibco), 15% de SFB (Gibco). Además, para mantener y propagar las CMP en estado indiferenciado, complementamos el medio de cultivo con la citoquina LIF. Contamos con dos fuentes de esta citoquina. Por un lado, utilizamos rutinariamente el medio condicionado de una línea celular CHO modificada genéticamente de forma tal que sobreexpresa y secreta LIF (CHO-LIF), ampliamente utilizada en la comunidad científica. Por otra parte, disponemos de este factor adquirido comercialmente (Chemicon) para utilizar en casos en que se requieran condiciones más definidas, debido a su alto costo.

La composición de los distintos medios y soluciones empleados en este trabajo se especifican en un apartado al final del capítulo.

Cultivo de CMP sobre *feeder layer*

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular mantuvimos las células en placas de 60 mm de diámetro (p60) sobre MEFi utilizando medio de propagación. El

día previo al pasaje de las CMP sembramos 5×10^5 MEFi en placa p60 previamente recubierta con gelatina. Para esto, cubrimos la superficie de la placa con 1 ml de una solución 0,1% de gelatina bovina en buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4 y la incubamos durante 15 minutos en estufa a 37°C. Luego, descartamos la solución de gelatina y agregamos las MEFi en presencia de medio MEF y las incubamos toda la noche a 37°C con 5% CO₂ para que se adhieran a la placa.

Cultivo de CMP libre de *feeder layer*

Como mencionamos previamente, cultivamos las células en placas p60 recubiertas con gelatina, con el fin de evitar cualquier influencia que pudieran tener las MEF sobre las CMP en el proceso de diferenciación y en los distintos experimentos. Además evitamos la interferencia de las MEF en los resultados, dado que todas estas líneas son de la misma especie. Recubrimos las placas con la solución 0,1% de gelatina bovina como describimos anteriormente, y luego de descartar esta solución, agregamos 1×10^5 de CMP en su medio de propagación, e incubamos la placa durante la noche a 37°C con 5 % CO₂ para permitir que las células se adhieran. A lo largo de los sucesivos pasajes en gelatina, las MEFi no se adhieren o entran en senescencia, y al tercer pasaje la cantidad de éstas es despreciable en comparación con las CMP.

Realizamos el pasaje de las CMP entre 48 y 72 horas luego de cada siembra. Para esto, aspiramos el medio de cultivo, lavamos con 1 ml de PBS pH 7,4 y tratamos las placas con 0,4 ml de Tripsina 0,25% - 0,53 mM EDTA (Gibco) a 37°C de 3 a 5 minutos, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disgregación de las células. Completamos la separación de forma mecánica con pipeta evitando que queden agregados de células, e inactivamos la tripsina agregando igual volumen de medio de propagación. El SFB presente en el MP proporciona compuestos inhibidores de tripsina, además de un importante contenido proteico que compite con las proteínas presentes en el cultivo por el uso de la enzima. Monitoreamos el proceso observándola placa en un microscopio. Finalmente, sembramos una nueva placa de cultivo con el volumen con la cantidad de células adecuadas de suspensión de CMP y agregamos

medio de forma tal que la tripsina quede diluida al menos 10 veces, para asegurarnos su completa inactivación.

Para determinar el volumen de suspensión con la cantidad apropiada de células para la siembra, contamos las CMP en una cámara de Neubauer, utilizando Azul de Tripán 0,4% (Gibco) como colorante vital, el cual es excluido activamente en aquellas células que son viables. Mezclamos 10 μ l de la suspensión celular con un volumen igual de solución de Azul de Tripán, y tomamos 10 μ l de esta dilución para el recuento. Contamos las células no coloreadas en los cuatro cuadrantes de la cámara, estimando el número de células por ml de suspensión de la siguiente manera:

$$\text{N}^\circ \text{ células/ml} = N \times 10.000 \times d$$

donde N es el promedio de número de células contadas en los cuadrantes, d es el factor de dilución realizado y 10.000 corresponde a la capacidad de la cámara (0,1 μ l) por 1000 para la conversión de μ l a ml.

Sembramos 1×10^5 células aproximadamente en una nueva placa p60 a células, en presencia de medio de propagación hasta alcanzar un volumen final de 2,5ml. Realizamos la siembra por goteo de la suspensión celular de forma uniforme y luego mezclamos suavemente en varias direcciones para distribuir las células sobre la superficie de la placa de forma homogénea. Incubamos las placas en una estufa a 37°C con 5% de CO₂ y las controlamos diariamente para verificar el estado de las células, cambiando el medio de cultivo, en caso de ser necesario.

Cultivo de Células Madre Pluripotentes humanas

Utilizamos la línea de células madre embrionarias humanas WA09, trabajando en colaboración con el grupo de Santiago Miriuka del Laboratorio de Biología del Desarrollo Celular, FLENI. La línea WA09 provino del *WiCell Research Institute*. Mantuvimos las líneas de hCME sobre una *feeder layer* de MEFi en un medio que contiene of Dulbecco's *Modified Eagle's Medium/Ham's F12* (DMEM/F12, Gibco) suplementado con 20% KSR (Gibco), 2 mM de aminoácidos no esenciales, 2 mM de L-

glutamina, 100 U/ml de penicilina, 50 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 0,1 mM β -mercaptoetanol y 4 ng/ml de bFGF (Gibco) o sobre una placa de cultivo cubierta con Matrigel (BD *Biosciences*) diluído (1/40) en medio condicionado MEF. Para la obtención de medio condicionado MEF, incubamos 3×10^6 células MEF inactivadas con 25 ml de medio DMEM/F12 suplementado con 5% KSR y 2 ng/ml de bFGF (además de los otros suplementos mencionados anteriormente) por 24 horas. Conservamos el medio condicionado a -20°C y una vez descongelado, le agregamos nuevas alícuotas de KSR y bFGF para alcanzar una concentración final de 20% y 4 ng/ml, respectivamente.

Obtención y cultivo de Fibroblastos embrionarios murinos

Como ya hemos mencionado, cultivamos las CMP sobre placas recubiertas con gelatina bovina o sobre una capa de MEFi, que actúan como una *feeder layer*, aportándoles los nutrientes necesarios que favorecen el mantenimiento del estado indiferenciado de las CMP. Por otro lado, utilizamos las MEF para obtener CMPI, ya que la reprogramación de células derivadas de este tejido es eficiente y la gran mayoría de las investigaciones se realizan con CMPI derivadas a partir de MEF, siendo éste un modelo ampliamente utilizado y aceptado por la comunidad científica.

Para obtener un cultivo primario de MEF, solicitamos 1 ó 2 ratones hembra de la cepa CF1 con 13,5 días de preñez al Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires. Cuando llegan a esa condición, son sacrificadas en cámara de CO_2 gaseoso, por el personal del bioterio, y en condiciones de esterilidad, procedemos a la extracción del útero. Luego, extraemos los embriones, les realizamos un lavado con PBS y extirpamos las extremidades y cabezas. Posteriormente, los disgregamos mecánicamente con bisturíes y/o tijeras y mediante pasaje por pipetas Pasteur de vidrio, en medio de cultivo correspondiente (DMEM 10% suero fetal bovino, 100 UI/ml penicilina - 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomicina). De esta manera generamos explantos de diversos tamaños, sembrando los de menor tamaño a razón de 3 embriones por placa p100 con 10 ml de medio MEF. Las placas son incubadas a 37°C con 5% CO_2 para el establecimiento del cultivo primario.

Cuando la confluencia de las MEF es del 100%, realizamos el pasaje de las células para amplificar el cultivo. Para esto, descartamos el medio de cultivo, lavamos las placas con 5 ml de PBS para eliminar los remanentes de suero, y tratamos con 1 ml de Tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C. Completamos la disgregación de las células mecánicamente con pipeta y agregamos 2 ml medio de cultivo que aporta el suero necesario para detener la digestión enzimática. Distribuimos la suspensión celular en 3 placas p100 (1 ml por placa), completamos con el 7 ml de medio de cultivo e incubamos las placas a 37°C con 5% de CO₂. Una vez que la confluencia vuelve a ser del 100%, procedemos de la misma manera para realizar un nuevo pasaje. Por tratarse de un cultivo primario, realizamos repiques hasta 3-4 pasajes, dado que si las células acumulan más pasajes se induce el proceso de senescencia replicativa. Los procedimientos que realizamos con los ratones se realizaron de acuerdo a las normas éticas locales y el protocolo de obtención de MEF ha sido aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAL) de la FCEN, UBA.

Además del cultivo primario de MEF, contamos con una línea celular de fibroblastos embrionarios, denominada SNL que propagamos utilizando las mismas condiciones de cultivo que las descritas para el cultivo primario. Esta línea celular fue gentilmente cedida por *Wellcome Trust Sanger Institute*.

Preparación de MEF irradiadas

Cuando el cultivo primario de MEF llega al pasaje 3, cosechamos las células como describimos previamente, y colocamos la suspensión de MEF completamente disgregadas en un tubo cónico de 50 ml en 20 ml de medio de cultivo. Para realizar la irradiación de las células, llevamos la suspensión al centro de irradiación CEBIRSA (Fitz Roy 2455, CABA, Buenos Aires), donde son expuestas a 40-80 Gy de radiación γ , lo cual inactiva mitóticamente a las células. Posteriormente, centrifugamos el tubo cónico con MEF inactivados durante 5 minutos a 1100 rpm, descartamos el sobrenadante y resuspendemos las células en 10 ml de medio para realizar el conteo utilizando el colorante vital Azul de Tripán como se describió previamente. Finalmente, en placas de

60 mm de diámetro previamente recubiertas con gelatina bovina 0,1%, sembramos 500.000 células de manera homogénea con 3 ml de medio de cultivo para MEF, y las incubamos a 37°C con 5% de CO₂. Podemos utilizar estas células mitóticamente inactivadas como *feeder layer* para CMP dentro de los 7 días posteriores a la irradiación. Aquellas MEFi que no utilizamos en el momento, las conservamos en N₂ líquido, preservándolas con DMSO 10% y SFB 30%, como se describe más adelante.

Cultivo de células CHO y obtención de LIF

Las células de la línea CHO-LIF contienen el plásmido 8/242 720 LIFD de *Genetics Institute*, Cambridge, que codifica para la hormona LIF que favorece el estado indiferenciado de las CMP. Cultivamos la línea CHO en placas de 10 cm de diámetro con 10 ml *high-glucose* DMEM suplementado con SFB al 10% (PAA), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, Gibco). Mantenemos por lo menos dos placas p100, y una vez que alcanzaron una confluencia del 90%, cosechamos las células de una de las placas y las contamos para condicionar las otras placas con 1 ml de medio fresco por cada 1.10⁶ células. Incubamos las placas con este medio durante 48 horas a 37°C con 5% de CO₂. Luego, cosechamos el medio condicionado con LIF, lo centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos, y lo transvasamos a un tubo cónico estéril de 50 ml. Posteriormente, evaluamos distintas diluciones del medio obtenido en el cultivo CME sobre gelatina, para determinar la dilución en la cual el medio obtenido de las CHO-LIF es capaz de mantenerlas en estado indiferenciado. En paralelo, cultivamos CME en MP suplementado con LIF comercial, y CME en MP sin el agregado de LIF para evidenciar su diferenciación en ausencia de este factor. Como parámetro para evaluar la dilución óptima de uso de CHO-LIF observamos la morfología de las colonias, siendo típicamente colonias compactas y refringentes, con células que presentan una alta relación núcleo/citoplasma.

Cultivo de células BGC-1 y obtención de medio condicionado

Cultivamos la línea BGC-1 en placas de 10 cm de diámetro con 10 ml *high-glucose* DMEM suplementado con SFB al 10% (PAA), 1 mM de piruvato de sodio (Sigma), y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomina, Gibco) (Bernath et al., 1990). Una vez que alcanzaron una confluencia del 90%, reemplazamos su medio de propagación por 12 ml de MP de las CMP, pero sin el agregado de SFB ni de β -mercaptoetanol, y las incubamos con este medio durante 24 horas a 37°C con 5 % de CO₂. Luego, cosechamos el MC, lo centrifugamos a 2000 rpm durante 10 minutos, y lo transvasamos a un tubo estéril de 50 ml, donde lo suplementamos con 15% de SFB y 0,5 mM β -mercaptoetanol antes de utilizarlo.

Para todos los experimentos realizados utilizando este MC o el MP como control, cultivamos las CMP en el medio indicado por lo menos durante tres pasajes.

Cultivo de células HEK 293-T

Cultivamos las células HEK 293-T en placas p100 con 10 ml *high-glucose* DMEM suplementado con SFB al 10% (PAA), y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomina, Gibco), a 37°C con 5% de CO₂. Cuando alcanzan una confluencia del 80% aproximadamente, las cosechamos y sembramos 1/8 de la cantidad de partida en la nueva placa p100.

Congelamiento y descongelamiento de células

Mantenemos un stock de cada línea celular conservadas en N₂ líquido de acuerdo al siguiente protocolo. Tratamos con tripsina las células de una placa p60 como se explicó previamente, inactivamos la tripsina y centrifugamos las células a 1100 rpm por 5 minutos en un tubo cónico de 15 ml. Las resuspendemos en 1 ml de medio de propagación agregándole SFB para alcanzar una concentración final de 25%, y 10% DMSO. Colocamos la suspensión en un criotubo, que incubamos durante toda la noche

en un *freezer* de -80°C , dentro de un recipiente que contiene isopropanol (*Mr. Frosty Freezing Container*, Nalgene), el cual permite lograr un enfriamiento gradual. Al día siguiente, guardamos los criotubos en un termo con N_2 líquido.

Para descongelar células procedemos de manera rápida, calentando un criotubo de stock a 37°C , y las colocamos un tubo cónico de 15 ml con 10 ml de medio de propagación para remover el DMSO, ya que es tóxico. Centrifugamos la suspensión a 1100 rpm durante 5 minutos y resuspendemos las células en un volumen adecuado de medio de propagación para analizar la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión con Azul de Tripán, como describimos anteriormente. Finalmente, sembramos las células en la cantidad necesaria de placas.

Extracción de ADN genómico para la detección de *Mycoplasma* por PCR

Para controlar la ausencia de bacterias del género *Mycoplasma* en nuestros cultivos celulares, periódicamente realizamos una extracción de ADN genómico de una muestra de cada línea celular y lo utilizamos como templado en una PCR con *primers* que evidencian la presencia de varias cepas del género *Mycoplasma*. Este tipo de contaminación no se puede detectar con el análisis microscópico de rutina, y la técnica de tinción de ADN con el intercalante de bases Hoetch y su posterior observación mediante microscopía de fluorescencia, es menos sensible. Como control positivo de presencia de ADN genómico utilizamos *primers* para el gen de *Gapdh* que hibridan en el mismo exón, ya que esperamos un resultado negativo para la PCR de detección de *Mycoplasma*. Brevemente, tratamos con tripsina las células y separamos el equivalente a 1/10 de células de una p60 en un tubo eppendorf y lo centrifugamos 5 minutos a 1100 rpm. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con 200 μl de PBS y volvemos a centrifugar 5 minutos a 1100 rpm. Resuspendemos el pellet en 100 μl de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 0.001% gelatina, 0.5% NP-40, 0.5% Tween-20), al cual previamente le agregamos proteinasa K (Fermentas) a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, e incubamos durante 1 hora a 60°C con agitación intermitente. Precipitamos el ADN con 600 μl de isopropanol durante 5 minutos a temperatura ambiente (TA), y centrifugamos la muestra a $13.000 \times g$ durante 15 - 20

minutos a TA. Descartamos el sobrenadante, lavamos el pellet con etanol 70%, y dejamos secar al aire. Finalmente, resuspendemos el pellet en 30 µl de agua, y rehidratamos el ADN incubándolo durante 1 hora a 65°C. Conservamos los extractos a -20°C. Para realizar la amplificación por PCR, utilizamos 1-2 µl de la preparación como templado, siguiendo el siguiente programa:

95°C	2 minutos	} 39 ciclos
95°C	30 segundos	
55°C	30 segundos	
72°C	40 segundos	
72°C	5 minutos	

<i>Gen</i>		<i>Secuencia del primer (5'-3')</i>
Marcador de Micoplasma	Forward	ACACCATGGGAGYTGGTAAT
	Reverse	CTTCWTCGACTTYCAGACCCAAGGCAT
Gapdh	Forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAG
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG

Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en un gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. El tamaño esperado del producto de PCR para el marcador de Micoplasma es de 400-500 pb aproximadamente.

Diferenciación de CMP *in vitro*: método de *Hanging Drop*

Este método se basa en la formación de agregados de CMP denominados cuerpos embrioides (CE), que inducen la diferenciación de estas células mediante la remoción de las señales que mantienen el estado indiferenciado, además de favorecer el contacto célula-célula que promueven la diferenciación (H Kurosawa, 2007). Este

protocolo no es dirigido, por lo que las células que forman los CE se diferencian a las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo.

El esquema general de este protocolo de diferenciación se muestra en la Figura M.1. Como primer paso, sembramos 1000 células en gotas de 25 μ l de medio en la tapa de placas no adherentes, luego colocamos la tapa sobre una placa que contiene 1 ml de PBS, lo que evita la deshidratación de las gotas. Incubamos las placas a 37°C con 5% de CO₂ por 48 horas. Durante este período, las células se acumulan en el extremo de las gotas por acción de la gravedad, interactuando entre sí y formando las estructuras tridimensionales denominadas cuerpos embrioides (Figura M.2). Posteriormente, aspiramos las gotas que contienen los CE utilizando una pipeta de 5 ml, para evitar romper los CE generados, y los colocamos en suspensión en una nueva placa no adherente con 10 ml de medio por 72 horas para favorecer su crecimiento. Verificamos la integridad de los CE observándolos con un microscopio invertido. Finalmente, los colocamos en placas recubiertas con gelatina 0,1% para cultivarlos en adherencia, permitiendo que las células proliferen y se diferencien a los diferentes linajes. Desde el comienzo del protocolo con la formación de las gotas, los CE están en medio de diferenciación (MD), cuya formulación es similar a la del MP, pero sin el agregado de LIF y además, contiene 20% SFB, en lugar de 15%.

Una vez en adherencia, tomamos CE a distintos días, ya sea para realizar una inmunofluorescencia evidenciando la presencia de marcadores de los distintos linajes germinales, o para extraer ARN y luego analizar la expresión de genes marcadores de las tres capas germinales.

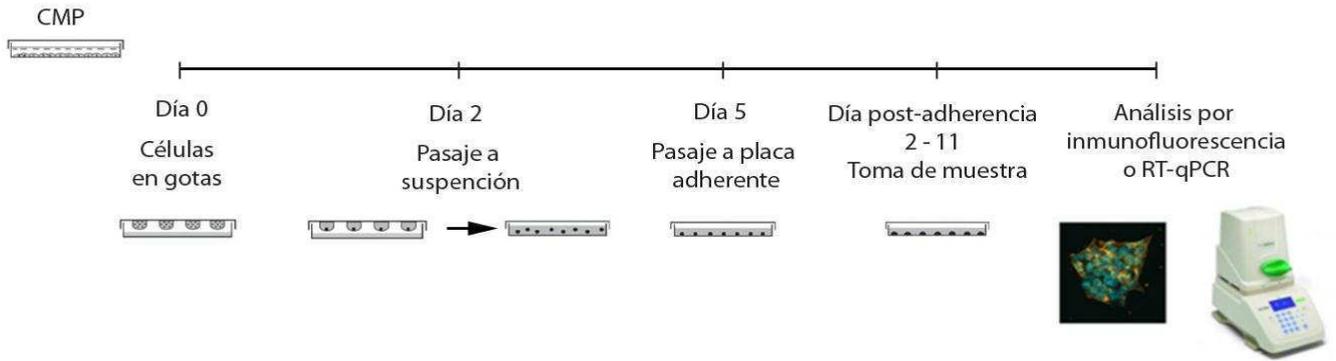


Figura M.1. Esquema de formación de cuerpos embrioides mediante el protocolo de diferenciación de *Hanging Drop*.

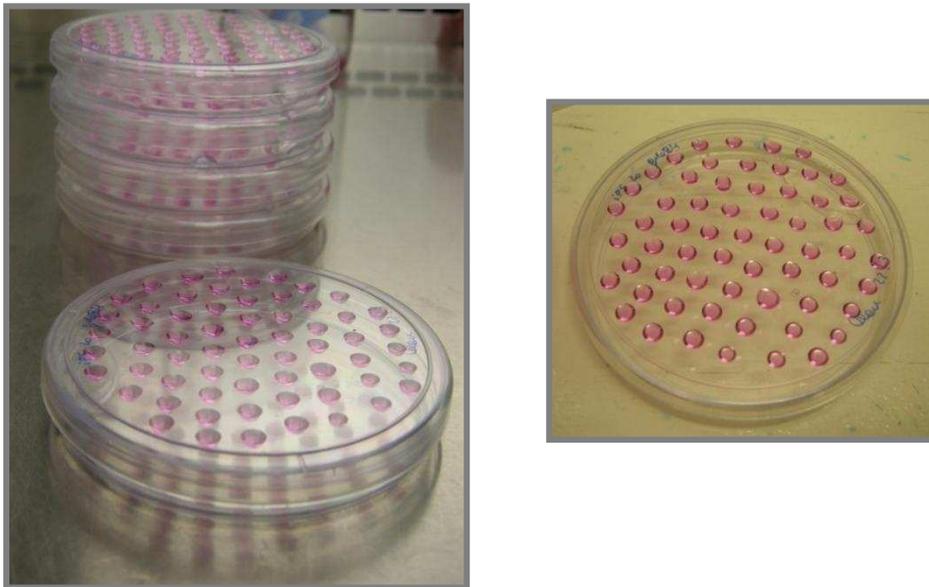


Figura M.2. Diferenciación por el método de *hanging drop*. Placas con gotas conteniendo CMP durante un protocolo de diferenciación.

Diferenciación de CMP *in vivo*: método de formación de teratomas

Cultivamos las CMP por lo menos tres pasajes en placas previamente tratadas con gelatina de piel bovina 0,1%. Cosechamos las células por tratamiento con tripsina, las centrifugamos y las resuspendemos a una densidad de $1 \cdot 10^7$ células/ml en DMEM en ausencia de SFB. Mantenemos las células a 37°C hasta el momento de la inyección.

A continuación, inyectamos 100 μ l de la suspensión celular (1.10^6 células) por vía subcutánea en el flanco dorsal de ratones machos de la cepa nude (*nu/nu*) de 6 - 8 semanas de edad. Controlamos de una a dos veces por semana la aparición de algún tumor en el sitio de inyección. Dos semanas después de la detección del tumor, los animales fueron sacrificados en una cámara con CO₂ y por dislocación cervical. Removimos los tumores quirúrgicamente, los fijamos en formaldehído 4% en PBS, y los incluimos en parafina. Se hicieron cortes de los tacos de parafina (secciones de 4 μ m) y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los procedimientos que realizamos con los ratones, se realizaron de acuerdo a las normas éticas locales y el protocolo fue aprobado por la CICUAL de la FCEN, UBA. El análisis histológico fue realizado por el Dr. Gustavo Sevlever (FLENI), investigador colaborador especialista en patología.

Transfección de líneas celulares

1. Transfección con Fugene6

Realizamos la transfección de células utilizando como agente de transfección Fugene6 (Roche). Este método se basa en la formación de complejos entre el ADN plasmídico y lípidos catiónicos que son endocitados al interior de las células. El día anterior a transfectar, sembramos la cantidad de células necesarias según la superficie de la placa o *well* que utilizemos. La relación ADN : Fugene6 fue optimizada para cada tipo celular a ser transfectado. Preparamos la mezcla de transfección según las indicaciones del fabricante. Como primer paso, diluimos la cantidad necesaria Fugene6 en medio OPTIMEM (*Life technologies*) sin suero ni antibióticos y agregamos el ADN plasmídico necesario. Mezclamos e incubamos a TA durante 15 minutos para favorecer la formación de los complejos. Luego, lavamos con PBS las células y realizamos la transfección en medio sin antibióticos agregando los complejos gota a gota al *well* correspondiente y homogenizamos. Incubamos la placa a 37°C con 5% de CO₂ y cambiamos el medio a las 24 hs por medio fresco.

2. Transfección con PEI

El método de transfección de células utilizando como agente Polietilenimina (PEI, Poliscience Inc.) se basa en la formación de complejos entre el ADN plasmídico y este compuesto polimérico que son endocitados por las células. El día previo a transfectar, sembramos la cantidad de células necesarias según la superficie de la placa o *well* que utilizemos. La relación ADN : PEI fue de 1 µg de ADN total : 10 µl de PEI, o de 1 µg de ADN total : 5 µl de PEI, según el tipo celular a ser transfectado. Brevemente, diluimos el ADN necesario en medio OPTIMEM sin suero ni antibióticos. Mezclamos el PEI con *vortex* durante 10-15 segundos, y agregamos la cantidad necesaria al ADN ya diluido. Mezclamos e incubamos a TA durante 15 minutos. Luego, agregamos los complejos gota a gota a la placa correspondiente y homogenizamos. Incubamos las placas a 37°C con 5% de CO₂ y cambiamos el medio a las 24 hs.

Producción de partículas lentivirales para reprogramación

Produjimos partículas lentivirales defectivas en su replicación como fue previamente descrito (Sommer et al., 2009), con algunas modificaciones. Transfectamos células empaquetadoras HEK 293-T con un sistema de cinco plásmidos, gentilmente cedido por el Dr. Gustavo Mostoslavky y que obtuvimos a través del Consorcio de Investigación en Células Madre (CICEMA). En este sistema, cuatro de estos vectores codifican la cápside y la transcriptasa reversa (*gag/pol*), la envoltura (*vsv-G*) y proteínas regulatorias (*tat* y *rev*). Estos plásmidos aportan la maquinaria necesaria para la replicación del genoma viral, así como para la síntesis de las proteínas estructurales virales y las glicoproteínas que le confieren el tropismo, en este caso, de amplio rango de especies. El quinto plásmido, denominado pHAGE2 EF1α-STEMCCA-Redlight-LoxP, codifica tres factores necesarios para la reprogramación de células somáticas (*Oct4*, *Sox2* y *Klf4*), además del gen reportero fluorescente *mCherry* (Tabla M.2). Además, el vector cuenta con las secuencias en *cis* necesarias para su correcto empaquetamiento, transcripción reversa e integración en las células blanco (Figura M.3).

<i>Plásmido</i>	<i>Codifica para</i>
HDM Hgpm2	Proteínas de la cápside y transcriptasa reversa, gag/pol
HDM vsv	Proteína de la envoltura, vsv-G
HDM tat1b	Proteína regulatoria, tat
RC CMV Rev1b	Proteína regulatoria, rev
pHAGE2 EF1 α -STEMCCA-Redlight-LoxP	Oct4, Klf4, Sox2 y mCherry

Tabla M.2. Sistema de cinco plásmidos para la producción de partículas lentivirales defectivas en su replicación, para reprogramación de células terminalmente diferenciadas.

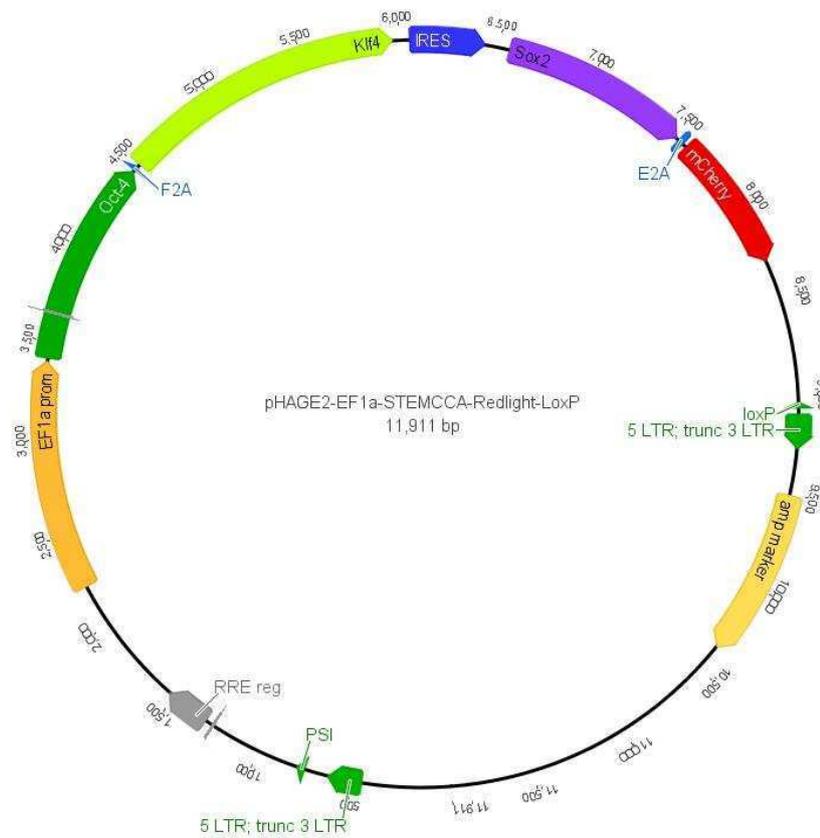


Figura M.3. Esquema del plásmido pHAGE2 EF1 α -STEMCCA-Redlight-LoxP.

Las partículas lentivirales son liberadas por las células empaquetadoras al medio de cultivo, el cual colectamos y utilizamos para transducir las células *target*. Es importante destacar que mediante este sistema se obtienen lentivirus defectivos en su replicación, dado que los genes que codifican para las proteínas virales no pueden ser empaquetados porque carecen de las secuencias necesarias. Esta característica es fundamental, ya que el genoma de las partículas obtenidas no contiene los genes que codifican para la maquinaria necesaria para la multiplicación del virus, generando estas partículas lentivirales que al ser defectivas en su replicación son más seguras. Asimismo, para el trabajo responsable y seguro con este tipo de agente, detallamos a continuación una serie de medidas que se deben tomar para su manipulación (“Lentiviral Biosafety Manual,” 2010, “Lentiviral Vectors Biosafety Guidance & Safety Protocol for Research with Lentiviral Vectors,” 2009, “Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations,” 2000) y que usamos como guía:

- **Vestimenta**

Utilizar barbijo, pelo recogido y calzado cerrado.

Utilizar doble guante / guantes largos.

Asegurar el guante sobre la manga del guardapolvo.

- **Manejo en el flujo laminar**

Utilizar un recipiente de descarte con una solución de hipoclorito de sodio 10 %, preparada en el momento.

Utilizar tips con filtro al utilizar pipetas automáticas.

No utilizar la bomba de vacío.

Para movilizar placas con partículas virales fuera del flujo laminar y las incubadoras, colocarlas en un recipiente plástico recubierto.

Incubar las placas con partículas virales en una incubadora destinada a tal fin.

- **Descontaminación del material**

Utilizar una dilución de hipoclorito de sodio al 10%, la cual debe haber sido preparada dentro de la semana.

Una vez finalizado el trabajo en el flujo laminar, éste debe descontaminarse con etanol 70% y ser irradiado con luz Ultravioleta (UV) durante 30 minutos.

El material que estuvo en contacto con partículas virales debe permanecer por lo menos 2 horas en la solución de hipoclorito de sodio 10%, y luego ser descartado o autoclavado.

En el caso que el material contenga una alta concentración de partículas virales, debe permanecer en dicha solución durante 48 hs y luego se debe descartar o autoclavar.

Las micropipetas y otro material utilizado en la manipulación de partículas virales deben ser tratados con etanol 70% y quedar en el flujo laminar con luz UV durante 30 minutos.

Para la generación de partículas lentivirales defectivas en su replicación utilizando el sistema provisto por el Dr. Mostoslavsky, la relación de los plásmidos usada fue la siguiente:

20 : 1 : 1 : 1 : 2

Backbone+inserto : tat : rev : gag/pol : vsv-g

El agente de transfección utilizado fue Fugene6 (Roche). La relación ADN : Fugene6 fue de 1 µg de ADN total : 6 µl de Fugene6 para transfectar un *well* de un placa MW6. Para encontrar la condición óptima ensayamos las cantidades mencionadas y otra condición donde aumentamos al doble estas cantidades, es decir, utilizamos 2 µg de ADN total: 12 µl de Fugene6 para transfectar un *well* de un placa MW6. Sembramos $6,66 \cdot 10^5$ células/*well* de placa MW6 el día previo a la transfección, para que ese día las células estén entre un 80-90 % de confluencia. Seguimos las indicaciones del fabricante del agente de transfección, preparando la mezcla con los complejos utilizando la cantidad de Fugene6 con la cantidad correspondiente de ADN total en Optimem sin suero y sin ATB. Una vez agregados los complejos gota a gota a los *wells*, incubamos las placas a 37°C con 5% de CO₂, y a las 6 hs les cambiamos el

medio por medio fresco para ser condicionado. Veinticuatro horas posteriores al cambio de medio de la transfección, tomamos el medio condicionado con las partículas lentivirales (MT, medio de transducción) y lo pasamos a través de un filtro 0,45 μm *low binding* (Millipore), el cual evita que los virus queden retenidos. Repetimos la recolección y filtrado de MT a las 48, 72 y 96 hs post-transfección de las células HEK 293-T. Utilizamos los MT en el momento o los conservamos a -80°C hasta 6 meses con una pérdida del título viral luego de un ciclo de congelado y descongelado.

Transducción con partículas lentivirales para obtención de CMPI

Para reprogramar células y generar CMPI, utilizamos como células somáticas fibroblastos embrionarios de ratón, los cuales transdujimos con partículas lentivirales defectivas en su replicación conteniendo el vector pHAGE2 EF1 α -STEMCCA-Redlight-LoxP como fue anteriormente descrito (Sommer et al., 2009), introduciendo algunas modificaciones al protocolo.

Obtuvimos MEF de día embrionario 13,5 como describimos previamente. Recubrimos *wells* de placas MW6 con gelatina bovina 0,1% y sembramos 100.000 células por *well*. Utilizamos MEF preferentemente en pasaje 2 o hasta pasaje 4, ya luego de estos pasajes las células comienzan a sufrir senescencia replicativa. Al día siguiente, complementamos los MT filtrados con 1/3 de medio fresco, y ensayamos distintas condiciones para transducir las células: suplementamos los MT con polibreno 5, 7 y 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ como concentración final; centrifugamos algunas de las placas MW6 a 750 x g durante 45 minutos a TA (*spinfection*). En todos los casos, incubamos las células toda la noche a 37°C con 5% CO_2 . En el caso de utilizar MT fresco, realizamos la ronda de *spinfection* con los MT de 48 y 72 hs post-transfección de la línea empaquetadora. Eventualmente realizamos una *spinfection* con el MT de 96 hs si observamos las células empaquetadoras aún adheridas y saludables. Si utilizamos MT conservado a -80°C , los descongelamos rápidamente a 37°C , suplementamos y empleamos en la *spinfection*. A las 24 hs post-transducción, cambiamos el MT por medio MEF fresco e incubamos las placas toda la noche a 37°C con 5% CO_2 . Al día siguiente reemplazamos el medio de cultivo específico para MEF con medio estándar

para cultivo de CME de ratón, suplementado con ácido valproico (AVP) con una concentración final de 1,9 mM. Cada 2-3 días cambiamos el medio de cultivo, manteniendo el tratamiento con AVP durante 2 semanas. El ácido valproico es un inhibidor de desacetilasas de histonas que aumenta la eficiencia de reprogramación (Huangfu, Maehr, et al., 2008).

Aislamiento y amplificación de colonias de CMPI

Luego de aproximadamente 10 días post-transducción, observamos colonias con una morfología similar a la presentada por las CME. Seguimos en el tiempo estas colonias, no sólo por su morfología, sino también observándolas en un microscopio invertido de fluorescencia (Nikon Eclipse TE2000-S), ya que expresaban el gen reportero mCherry. Una vez que las colonias alcanzaron un tamaño considerable, aproximadamente 17 días post-transducción, recortamos las colonias con una aguja estéril, y sembramos una colonia por *well* de placa MW12 sobre una *feeder layer* de MEF irradiadas (70.000 células/*well*) con medio de propagación estándar para CME. Continuamos con la amplificación de las colonias de la misma manera que para CME, es decir, tratándolas con tripsina, y sembrándolas sobre MEFi en *wells* de placa MW6.

Técnicas para análisis de la expresión génica

Extracción y cuantificación de ARN. Cuantificación de ADN

Realizamos la extracción de ARN total utilizando Trizol (Invitrogen) (Numbers, 2010), según las indicaciones del fabricante. Este reactivo está compuesto por una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros compuestos que

facilitan el aislamiento de los diversos tipos de ARN. Brevemente, descartamos el medio de cultivo de la placa que contiene las células de las que haremos la extracción y agregamos 1 ml de Trizol por placa de 3,5 cm de diámetro, homogeneizamos e incubamos por 5 minutos a TA. Mediante uso de un rastrillo de goma cosechamos el extracto celular y colocamos la muestra en un tubo eppendorf. Agregamos 200 μ l de cloroformo por cada 1 ml de Trizol, agitando vigorosamente por 15 segundos. Incubamos a TA por 2-3 minutos y centrifugamos el tubo a 12000 x g durante 15 minutos a 4°C. El contenido se separa en tres fases, siendo la superior acuosa la que contiene el ARN. Transferimos esta fase a un nuevo tubo eppendorf libre de RNAsas ("RNAsa free"), agregamos 0,5 ml de isopropanol por cada 1 ml de Trizol e incubamos 10 minutos a TA para favorecer la precipitación del ARN. Centrifugamos durante 10 minutos a 12000 x g a 4°C, descartamos cuidadosamente el sobrenadante y lavamos el *pellet* de ARN con 1 ml de etanol 75% por cada 1 ml de Trizol utilizado. Homogeneizamos con *vortex* y centrifugamos a 7500 x g durante 5 minutos a 4°C. Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* durante 5 a 10 minutos a TA. Finalmente, resuspendemos el pellet en 30 μ l de agua RNAsa free y preservamos el ARN purificado a -80°C.

Para realizar la cuantificación del ARN utilizamos el equipo NanoDrop 2000 (*ThermoScientific*), un espectrómetro de amplio espectro (190-840 nm) que mide 1 μ l de muestra con alta eficiencia y reproducibilidad. Brevemente, calibramos al equipo con 1 μ l agua para establecer el blanco de medición y luego, colocamos 1 μ l de cada muestra para realizar las mediciones. La concentración se obtiene por la medición de la absorbancia al excitar a 260 nm, longitud de onda a la que absorben los ácidos nucleicos, por lo que también lo utilizamos para realizar cuantificaciones de ADN. El equipo además mide la absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben también las proteínas debido a sus residuos aromáticos, y calcula la relación 260/280, que debe ser ~ 2 para ser considerada de una pureza aceptable en el caso de muestras de ARN, y en el caso de ADN debe ser $\sim 1,8$.

Retrotranscripción

Para la síntesis del ADNc utilizamos la enzima transcriptasa reversa del virus M-MuLV modificada genéticamente (*Thermo Scientific*). Esta enzima utiliza como molde ARN o ADN simple cadena en presencia de un *primer* para sintetizar la hebra de ADNc. Realizamos la reacción en dos pasos. Primero, colocamos en un tubo *ependorf* “RNAsa free” entre 1 y 3 µg de ARN y llevamos con H₂O a un volumen final de 10 µl.

Incubamos a 65°C por 5 minutos en un termociclador (Bio-Rad) para desnaturalizar el ARN, desarmando las estructuras secundarias que pudieran haberse formado. Luego, agregamos 10 µl de la mezcla de retrotranscripción, compuesta por:

H ₂ O _{mQ}	4 µl
dNTP 25 mM (<i>Life Technologies</i>)	0,8 µl
Random Primers (<i>Life Technologies</i>)	0,2 µl
Buffer 5x	4 µl
RT-M-MuLV	1 µl

Incubamos a 25°C durante 10 minutos, y luego a 42°C por 60 minutos, tiempo en el cual la enzima cataliza la síntesis del ADNc. Por último, calentamos a 70°C por 10 minutos para inactivar la RT M-MuLV.

PCR a punto final, semi-cuantitativa y qPCR en Tiempo Real

1. PCR a punto final

Realizamos la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a punto final utilizando la ADN polimerasa *DreamTaq* (*Fermentas*), utilizando el equipo *Peltier Thermal Cycler DNA* (*BioRad*). Detallamos los *primers* utilizados a lo largo de la tesis en la siguiente tabla:

<i>Gen</i>		<i>Secuencia del primer (5' a 3')</i>	<i>Especie</i>	<i>Producto (pb)</i>
Oct3/4	Forward	TCAGCTTGGGCTAGAGAAGG	ratón	254
	Reverse	TGACGGGAACAGAGGGAAAG		
Nanog	Forward	AGGGTCTGCTACTGAGATGCTCTG	ratón	364
	Reverse	CAACCACTGGTTTTCTGCCACCG		
Sox2	Forward	CACAACCTCGGAGATCAGCAA	ratón	190
	Reverse	CTCCGGGAAGCGTGTACTTA		
Gapdh	Forward	TGCCAAGGCTGTGGGCAAGG	ratón	248
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGG		
β-actina	Forward	GTGGGCCGCTCTAGGCACCA	ratón	245
	Reverse	CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG		
Klf4	Forward	GCGAACTCACACAGGCGAGAAACC	ratón	711
	Reverse	TCGCTTCTCTCCTCCGACACA		
Rex1	Forward	ACGAGTGGCAGTTTCTTCTTGGGA	ratón	287
	Reverse	TATGACTCACTTCCAGGGGGCACT		
Ecat1	Forward	TGTGGGGCCCTGAAAGGCGAGCTGAGAT	ratón	164
	Reverse	ATGGGCCGCCATACGACGACGCTCAACT		
AFP	Forward	CCACGTTAGATTCTCCAGTGCCT	ratón	225
	Reverse	CATACTTGTTAGAGAGTTCCGTCTC		
Brachyury	Forward	GACTTCGTGACGGCTGACAA	ratón	111
	Reverse	CGAGTCTGGGTGGATGTAG		
Nestina	Forward	CTGCAGGCCACTGAAAAGTT	ratón	61
	Reverse	GACCCTGCTTCTCCTGCTC		
OCT4	Forward	CTGGGTTGATCCTCGGACCT	humano	128
	Reverse	CACAGAACTCATACGGCGGG		
NANOG	Forward	AAAGAATCTTCACCTATGCC	humano	110
	Reverse	GAAGGAAGAGGAGAGACAGT		
SOX2	Forward	AGCATGGAGAAAACCCGGTACGC	humano	110
	Reverse	CGTGAGTGTGGATGGGATTGGTGT		
GAPDH	Forward	ACAGCCTCAAGATCATCAG	humano	98
	Reverse	GAGTCCTTCCACGATACC		
RPL7	Forward	AATGGCGAGGATGGCAAG	humano	138
	Reverse	TGACGAAGGCCGAAGAAGC		

Utilizamos el siguiente esquema de ciclos de amplificación:

95°C	2 minutos	} 34 ciclos
95°C	30 segundos	
47°C	30 segundos	
72°C	1 minuto/kb	
72°C	5 minutos	

La temperatura de *annealing* depende de cada par de *primers* que se utilicen en la reacción. Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa 1,5 a 2%, según corresponda, teñidos con el intercalante de bases bromuro de etidio, para poder visualizar las bandas de ADN.

2. PCR semi-cuantitativa

Mediante esta técnica cuantificamos de manera semi-cuantitativa la cantidad de transcritos que hay en las distintas condiciones en estudio. Para esto, en primer lugar establecemos la condición donde las intensidades correspondientes a la banda de ADNc del gen *housekeeping* son similares en las distintas muestras a ser comparadas. Realizamos una reacción de PCR y tomamos muestras a distintos ciclos, por ejemplo en el ciclo 23 y en el ciclo final. Luego, realizamos una electroforesis de las muestras en un gel de agarosa 1,5 ó 2 %, según corresponda y comparamos las intensidades. Si no son similares, ajustamos la cantidad de ADNc de la que partimos para realizar la PCR y repetimos este proceso. Si son similares las intensidades, procedemos a amplificar los transcritos de interés en las mismas condiciones que para el gen *housekeeping*, es decir, partiendo de la misma cantidad de ADNc y tomando muestra en los mismos ciclos. Finalmente, realizamos una electroforesis de los productos en un gel de agarosa y comparamos las intensidades de las bandas obtenidas. En caso de ser necesario, la

intensidad de las bandas puede ser cuantificada utilizando el *software* ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij>).

3. PCR cuantitativa en tiempo real

Utilizamos la técnica de RT-qPCR para evaluar los niveles de expresión de los ARNm de los marcadores en estudio en distintas condiciones. Llevamos a cabo la amplificación de ADNc por *Real Time qPCR* con *primers* específicos en el termociclador *Opticon Real Time DNA Engine* (Bio-Rad), utilizando la mezcla *FastStart SYBR Green Master* (Roche). Esta mezcla cuenta con el buffer adecuado, dNTPs, MgCl₂, la enzima *FastStart Taq* ADN polimerasa, así como el Fluoróforo *SYBR Green*, necesario para detectar el producto de amplificación. La ventaja del uso de esta enzima es que se encuentra modificada para que su actividad comience una vez que haya transcurrido el primer ciclo de desnaturalización de la PCR, debido a que su sitio activo se encuentra bloqueado mediante un anticuerpo. Debido a esto, estas ADN polimerasas evitan la elongación de productos inespecíficos previo al inicio de la PCR.

Realizamos al menos dos duplicados de cada gen que analizamos y al menos dos muestras independientes para cada experimento y un blanco sin ADNc. Previo a la reacción, realizamos una dilución del ADNc de 1/5 o 1/10 en H₂O_{mQ}. En cada *well* de la placa blanca de 96 *wells* (*low profile*, Bio-Rad) utilizada colocamos una mezcla compuesta por los siguientes componentes:

H ₂ O _{mQ}	3,25 µl
<i>Primer Forward</i> 25µM	0,5 µl
<i>Primer Reverse</i> 25µM	0,5 µl
<i>FastStart SYBR Green Master</i>	6,25 µl
ADNcdiluído 1/5 o 1/10	2 µl
Volumen total por reacción	12,5 µl

El esquema de reacción es el siguiente:

95°C	10 minutos	} 40 ciclos
95°C	30 segundos	
60°C	30 segundos	
72°C	2 minuto	
Curva de <i>melting</i>		

Como se indica en la tabla, el esquema de reacción contiene una curva de *melting* inmediatamente finalizada la amplificación, utilizando una tasa de transición de temperatura lineal de 0,3°C/s de 60°C a 90°C con adquisición continua de fluorescencia. Estas curvas presentaron un único pico para todos los *primers* utilizados, indicando la presencia de un único producto de PCR. Más aun, confirmamos el correcto tamaño del producto de amplificación y la presencia de una única banda mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

Extrajimos los datos crudos utilizando el programa *MJ Opticon Monitor Software* 3.1.32 (Bio-Rad) y los analizamos con el software de LinReg PCR (Ramakers, Ruijter, Lekanne Deprez, & Moorman, 2003; Ruijter et al., 2009). Obtenemos los valores de N_0 (Número inicial de moléculas) utilizando el mismo programa, el cual los calcula teniendo en cuenta la intensidad de fluorescencia en el Ct de corte (*threshold*) y la eficiencia específica de cada par de *primers*. Normalizamos la expresión génica a la del gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Gapdh). En el caso de las CME humanas, para estimar la eficiencia de los *primers* usamos diluciones seriadas y la expresión relativa de los genes fue calculada con el *software* REST (Pfaffl et al., 2001). Para normalizar la expresión de los genes analizados, utilizamos la proteína ribosomal L7 (RPL7). Para cada experimento se analizaron duplicados de por lo menos dos muestras independientes. En todos los casos, relativizamos los resultados a la condición del control, como se indica en cada ensayo.

Inmunofluorescencia

Cultivamos las células sobre vidrios cubreobjetos en placas de 12 o 24 *wells* previamente recubiertos con gelatina 0,1% como se explicó previamente. Una vez adheridas las células o llegado al estadio de diferenciación deseado, descartamos el medio de cultivo y realizamos un lavado con PBS. Fijamos las células mediante el agregado de 0,5 ml de metanol a -20°C durante 10 minutos o con paraformaldehído al 3,7% durante 15 minutos a TA, y realizamos tres lavados de 5 minutos con PBS. En el caso de haber usado paraformaldehído, permeabilizamos las células incubándolas con Tritón X-100 0,1% en PBS durante 10 minutos a TA, y luego realizamos tres lavados con PBS-Tween (0,1% Tween 20 en PBS). Bloqueamos las muestras incubando los *Wells* durante media hora a TA con 0,5 ml de una solución de Seroalbúmina Bovina (*BSA*) al 1% en PBS-Tween o con 1% de Suero de cabra en PBS-Tween, dependiendo de los anticuerpos utilizados. Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados se detallan en la tabla M.1. Incubamos con 200 µl de una dilución del anticuerpo primario específico para cada marcador en estudio, preparada en solución de bloqueo, durante una hora a TA o toda la noche a 4°C. Luego, realizamos 3 lavados de 5 minutos con PBS-Tween para remover el exceso de anticuerpo primario e incubamos con 200 µl de una dilución en solución de bloqueo del anticuerpo secundario por una hora a TA. En la mezcla de incubación, además agregamos *4',6-diamidino-2-phenylindole* (DAPI) 0,1 µg/ml para marcar los núcleos de las células. Montamos los cubreobjetos con 5 µl de solución de montaje *Mowiol Reagent* (Calbiochem), dejamos secar durante toda la noche a resguardo de la luz, y sellamos con esmalte transparente. Conservamos en frío y en oscuridad hasta observar al microscopio.

Obtuvimos las imágenes utilizando un microscopio confocal *Olympus IX81/Fluoview FV 1000* y un microscopio invertido de fluorescencia *Olympus IX71*, y las procesamos con los *software PhotoshopCS3* e *ImageJ* (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

Anticuerpo Primario	Especie	Empresa	Dilución empleada
Anti Oct4	Ratón	Santa Cruz	1:500
Anti SSEA-1	Ratón	Santa Cruz	1:500
Anti AML	Ratón	Chemicon	1:200
Anti AFP	Cabra	Santa Cruz	1:200
Anti β III-Tubulina	Ratón	Santa Cruz	1:200
Anti cTnT	Ratón	Santa Cruz	1:200
Anti Nkx2.5	Conejo	Santa Cruz	1:200

Anticuerpo secundario	Especie	Fluoróforo	Empresa	Dilución empleada
Anti IgG Ratón	Cabra	Cy3	Santa Cruz	1:500
Anti IgG Ratón	Cabra	FITC	Sigma	1:100
Anti IgG Conejo	Cabra	Cy2	Santa Cruz	1:500
Anti IgG Cabra	Burro	Texas Red	Santa Cruz	1:200

Tabla M.1. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en inmunofluorescencia.

Análisis *in silico* de promotores de genes involucrados en la defensa frente a estrés oxidativo

Utilizamos la base de datos disponible *on line* de *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para la búsqueda de los 14 genes de ratón y los 11 genes humanos seleccionados para nuestro estudio. Para obtener las secuencias 5000 pb río arriba del sitio +1 de la transcripción de los genes candidato usamos la base de datos de *UCSC Genome Bioinformatics* (<http://genome.ucsc.edu/>). Luego, analizamos estas secuencias mediante el programa *MatInspector* de *Genomatix* (<http://www.genomatix.de/>) para encontrar sitios consenso de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog. Esta herramienta bioinformática utiliza una gran biblioteca de matrices para localizar sitios de unión para factores de transcripción en

secuencias de ADN y además permite el filtrado y selección de los resultados basados en la calidad de dichos sitios.

Diseño de *primers* para el estudio de genes involucrados en la defensa frente a estrés oxidativo

Para el diseño de los *primers* trabajamos con el programa bioinformático *Geneious* desarrollado por *Biomatters Ltd*. Como primer paso, obtuvimos las secuencias de los genes de interés de la base de datos disponible de NCBI. Buscamos tanto las secuencias correspondientes a la especie de ratón como a la de humanos. Con ayuda de este software y mediante alineamientos de secuencia, diseñamos un par de *primers* para cada gen de manera que sean complementarios a todos los transcritos posibles que pudieran generarse por *splicing* alternativo de cada gen, siempre en exones distintos con intrones lo suficientemente largos para evitar amplificar secuencias genómicas, y además que sean complementarios para las dos especies. Asimismo, tuvimos en cuenta la longitud de las secuencias (entre 18 y 22 bases), que el extremo 3' cuente con bases G y C para un mejor apareamiento con la secuencia templado, que la diferencia de temperaturas de *annealing* sean similares, y que el tamaño del amplicón sea menor a 450pb para poder utilizarlos en RT-qPCR. Mediante la herramienta bioinformática de *primer BLAST* del sitio del NCBI verificamos que los *primers* sean complementarios sólo a la secuencia de interés, y mediante el programa *DNAman*, comprobamos que las secuencias de los *primers* no sean complementarias entre sí generando dímeros de *primers*, y que no sean complementarios cada uno consigo mismo generando *loops*. A continuación, detallamos los *primers* diseñados:

<i>Gen</i>		<i>Secuencia del primer (5' a 3')</i>	<i>Especie</i>	<i>Producto (pb)</i>
Cat	Forward	ATACCTGTGAACTGTCCCTACCG	ratón/ humano	283
	Reverse	GGTGGCCGGCAATGTTCTCAC		
Txn1	Forward	TGGTGAAGCTGATCGAGAGC	ratón/ humano	118
	Reverse	GGCTTGATCATTTTGCAAGG		
Txn2	Forward	GGATGGACCTGACTTTCAAG	ratón/ humano	138
	Reverse	ACCTTCCCGTGCTGCTTGGC		
Glx1	Forward	GTTTCATCAAGCCCACCTGCCC	ratón/ humano	206
	Reverse	GATCACTGCATCCGCCTAT		
Gpx4	Forward	CGCTGTGCGCGCTCCATGC	ratón/ humano	106
	Reverse	AGGCCACGTTGGTGACGATG		
Sod1	Forward	GTGTGCGTGCTGAAGGGCG	ratón/ humano	237
	Reverse	GTCTCCAACATGCCTCTCTTC		
Sod2	Forward	AAGCACCACGCGGCCTACG	ratón/ humano	119
	Reverse	CCATTGAACTTCAGTGCAGGCTG		
Txnrd1	Forward	TGTGTGAATGTGGTTGCATACC	ratón/ humano	381
	Reverse	GGAGAAAAGATCATCACTGC		
Txnrd2	Forward	GTGAAATCCTTGAAGTGGGG	ratón/ humano	220
	Reverse	CACTTGTGATTCCATATTCC		
Gsr	Forward	GGGTGGCACTTGCCTGAATG	ratón/ humano	167
	Reverse	GGCGGCTCACATAGGCATCCC		
Prdx1	Forward	CACCATTGCTCAGGATTATGG	ratón/ humano	137
	Reverse	TTCATCCACAGAGCGGCC		
Prdx2	Forward	GTGTCCTTCGCCAGATCAC	ratón	412
	Reverse	CTAATACTTTATTGGTTTCC		
Gpx1	Forward	CGTGGACTGGTGGTGCTCGG	ratón	235
	Reverse	GGTCGGTCATGAGCGCAGTG		
Glx2	Forward	ACAGCACATCGTCGTTTTGG	ratón	296
	Reverse	GTGAAGCCTGTGAGTGTCGG		

2. Diseño de *primers* para clonado del promotor de Sod2

Para el diseño de los *primers* para el clonado de los distintos fragmentos de los promotores nos basamos en las secuencias adquiridas de la base de datos disponible *on line* de *UCSC Genome Bioinformatics*, donde buscamos unas 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción. Es conveniente que la búsqueda abarque hasta el ATG del inicio de la traducción para poder diseñar un *primer Reverse* que incluya parte del 5' UTR. Decidimos diseñar varios juegos de *primers* para la secuencia promotora del gen Sod2 de la especie *Mus musculus* (Gene ID: 20656). Para esto tuvimos en cuenta la posición de los sitios de unión de los factores de transcripción de interés (Oct4, Sox2 y Nanog) obtenidos mediante el *software on line MatInspector* de *Genomatix* (<http://www.genomatix.de/>). Diseñamos tres juegos de *primers* para abarcar distintas regiones, compuestos por un *primer Reverse* compartido y tres *primers Forward* distintos, que son complementarios a diferentes zonas del promotor. Asimismo, a cada *primer* le agregamos en el extremo 5' la secuencia de corte para la enzima de restricción que utilizamos para clonar el fragmento de interés en el vector pGL3-Basic. Para la elección de estas enzimas, tuvimos en cuenta que los sitios de corte de las enzimas elegidas no se superpongan en el sitio múltiple de clonado, que no existan sitios de corte en el fragmento de interés u otro sitio de corte en el vector y que en lo posible los *buffers* para la digestión sean compatibles para evitar realizar digestiones secuenciales. Para los *primers Forward* utilizamos la enzima Mlul y para el *primer Reverse*, la enzima XhoI. Además de la secuencia de corte, al extremo 5' le agregamos algunas bases para que el corte de la enzima de restricción sea eficiente. En el caso de Mlul, agregamos 3 bases (CTA), mientras que para la enzima XhoI agregamos 8 bases (CTAGATAC), como es recomendado. Una vez elegidas las enzimas, las bases extra y las secuencias complementarias de los *primers*, analizamos si cada uno forma dímeros de *primers* o si genera *loops* consigo mismo utilizando el programa *DNAman*. Finalmente, verificamos que la zona que se une a la región del promotor deseada fuera complementaria mediante la herramienta bioinformática *Primer BLAST* de NCBI, utilizando como templatado el genoma de *Mus musculus*. Los *primers* diseñados se detallan a continuación:

Primer 5'-3'	Secuencia	Tamaño del producto (pb)
<i>Forward 1</i>	CTA <u>ACGCGT</u> TGCCATGCCTGCCTGGATACTG	1142
<i>Forward 2</i>	CTA <u>ACGCGT</u> CCCTGGCTGTCTTGGAATC	1533
<i>Forward 3</i>	CTA <u>ACGCGT</u> TAAATACAGGCATGGTGGTAC	2900
<i>Reverse</i>	CTATTGCT <u>CTCGAG</u> GTTTACACGACCGCTGCTCTC	

Nota: Las letras subrayadas corresponden a los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para el clonado.

3. PCR para obtención de los fragmentos del promotor

Realizamos las PCR para obtener los distintos fragmentos correspondientes a las regiones promotoras del gen *Sod2* utilizando la ADN polimerasa *KAPA2G® FastHotStart* (*Kapa Biosystems*), una enzima con alta velocidad de extensión y procesividad. Como templado usamos ADN genómico de células de la línea CME R1, extraído y purificado mediante el kit *AxyPrep™ Multisource Genomic DNA Miniprep* (*Axygen*), siguiendo las indicaciones del fabricante.

Preparamos las mezclas de PCR utilizando DMSO en las muestras para inhibir la formación de estructuras secundarias que pudiesen impedir la obtención de los productos de PCR. En la siguiente tabla se describe la composición de la mezcla para PCR para una reacción de 25 µl como volumen final:

H ₂ O _{mQ}	15,95 µl
dNTP 25 mM (<i>Life Technologies</i>)	0,2 µl
Primers F y R 25 µM	0,5 µl cada uno
Buffer A 5x	5 µl
DMSO	0,75 µl
KAPA2G polimerasa (5 U/µl)	0,1 µl
ADN Templado	2 µl

Los ciclos de amplificación para cada fragmento se detallan en el siguiente esquema:

95°C	1 minuto	} 40 ciclos
95°C	10 segundos	
T óptima	10 segundos	
72°C	15 seg/kb	
72°C	30 seg/kb	

Analizamos una alícuota del producto de amplificación de cada PCR mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8% teñidos con bromuro de etidio, para poder visualizar las bandas de ADN. Obtuvimos un único producto del tamaño esperado, por lo que continuamos el clonado purificando el producto de PCR para su posterior digestión, utilizando el kit *Axyprep™ PCR Clean-up* (Axygen), siguiendo las indicaciones del fabricante.

4. Clonado en el vector pGL3-Basic

A partir del vector pGL3-Basic realizamos las digestiones que se detallan a continuación. Digerimos 3 µg del vector con la enzima MluI durante 30 minutos y luego agregamos a la mezcla la enzima XhoI. El fabricante del vector recomienda el paso de linearización previo al agregado de la enzima XhoI, ya que el superenrollamiento del plásmido puede dificultar el acceso al sitio de corte para esta enzima. Una vez agregadas las dos enzimas a la mezcla de digestión, incubamos los tubos a 37°C durante 2 horas. Luego, realizamos la desfosforilación del vector para evitar su religado. Para esto utilizamos la fosfatasa alcalina (CIAP, Promega), siguiendo las indicaciones del fabricante. Si bien es poco probable que ocurra el religado del vector dado que realizamos una doble digestión y los extremos no son complementarios,

nuestro objetivo es evitar que se ligen los extremos que en el caso de quedar una población de vector parcialmente digerido, con uno único corte.

Purificamos el vector digerido y desfosforilado de la mezcla de enzimas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio, y posteriormente cortamos del gel la banda de correspondiente al vector. Para la purificación del vector del gel de agarosa utilizamos el kit *AxyPrep DNA Gel Extraction Kit* (Axygen), siguiendo las indicaciones del fabricante. El protocolo utilizado se basa en la disolución de la agarosa y la retención del ADN en una columna para su posterior elución en 30 μ l de H_2O_{mQ} .

Empleamos 500 ng del fragmento a ser clonados siguiendo el mismo protocolo de digestión y purificación que usamos para el vector pGL3-Basic. Finalmente, cuantificamos el vector y los fragmentos purificados utilizando el NanoDrop 2000 y, por otra parte, lo corrimos en un gel de agarosa 0,8% para verificar su tamaño y calidad.

Realizamos la reacción de ligación para cada fragmento utilizando la enzima Ligasa de ADN T4 (Promega), según la siguiente tabla:

Inserto a clonar	70 ng-100 ng
100 ng pGL3-Basic digerido	1,1 μ l
<i>Buffer</i> de ligación 10x	1 μ l
Ligasa de ADN T4	1 μ l
H_2O_{mQ}	csp 10 μ l

Además, realizamos una reacción de ligación sin inserto para evaluar el porcentaje de religado del vector. Incubamos las mezclas a 16°C *overnight*. Transformamos bacterias ultracompetentes *E. coli* DH5 α por el método de *heat shock* durante 90 segundos, las sembramos en placas con LB agar-Ampicilina y las incubamos durante toda la noche a 37°C. Armamos *pooles* de colonias transformantes y mediante extracción de baja escala con lisis alcalina (miniprep) obtuvimos el ADN plasmídico. Evaluamos si estos plásmidos contenían clonado el fragmento de interés mediante

digestión con las enzimas utilizadas para los clonados y posterior corrida electroforética en un gel de agarosa 0,8%.

Una vez identificadas las colonias que poseen los plásmidos de interés, los enviamos a secuenciar para corroborar que el inserto y su orientación sean correctos. Para esto se utilizaron en el proceso unos *primers* que son complementarios a la secuencia del vector pGL3-Basic río arriba y río abajo del sitio de clonado, y que se detallan a continuación:

Primer	Secuencia
RVprimer3 <i>Forward</i> (5'-3')	CTAGCAAATAGGCTGTCCC
GLprimer2 <i>Reverse</i> (5'-3')	CTTTATGTTTTGGCGTCTTCCA

Para la secuenciación de los fragmentos clonados utilizamos el servicio de Secuenciación y Genotipificado del Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Estudio la regulación ejercida por los factores de transcripción sobre la expresión de Sod2

Con el propósito de estudiar si los factores de transcripción específicos de CMP, Oct4, Sox2 y Nanog, regulan la expresión de Sod2, estudiamos su modulación mediante distintos abordajes.

1. Modulación de los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog en CME

a. Modulación por ausencia de LIF

Cultivamos CME R1 en placas MW6 previamente recubiertas con gelatina bovina 0,1% en medio de propagación estándar en presencia y en ausencia de LIF durante 4 días, cambiando el MP por medio fresco día por medio. Transcurrido este tiempo,

descartamos el medio de cultivo, lavamos con PBS, extrajimos ARN utilizando Trizol y analizamos los niveles de expresión de los FT y de Sod2 mediante RT-qPCR.

b. Silenciamiento mediante el uso de *short hairpin RNA*

Para el silenciamiento de los distintos FT utilizamos vectores de Sigma, que contienen secuencia para generar *short hairpins* específicos para cada factor río abajo de un promotor constitutivo, y además cuentan con la secuencia del gen de resistencia a puromicina. Sembramos CME R1 en placas p60 previamente recubiertas con gelatina en medio de propagación estándar suplementado con LIF durante. Al día siguiente, transfectamos las células utilizando PEI como agente de transfección, en una relación ADN : PEI de 1 µg de ADN total : 5 µl de PEI, usando 3 µg de ADN total para la superficie indicada. Cambiamos el medio a las 24 y a las 48 hs post-transfección por medio fresco con puromicina en una concentración final de 3 µg/ml, para seleccionar aquellas células que hayan sido transfectadas. A las 72 hs post-transfección descartamos el medio de cultivo, lavamos con PBS, extrajimos ARN y analizamos los niveles de expresión de los FT y de Sod2 mediante RT-qPCR. Como condiciones control, utilizamos células R1 transfectadas con un vector que expresa un *shRNA* dirigido contra el ARNm de GFP (GFPi), y células transfectadas con el vector vacío pLKO.1.

2. Sobreexpresión de los FT Oct4, Sox2 y Nanog mediante su co-transfección con pSod2.1-luc en un sistema heterólogo

Sembramos 16.000 células de una línea MEF SNL en *wells* de placas MW24 y al día siguiente las transfectamos usando 910 ng de ADN total por *well*, con una relación 1 µg de ADN total: 5 µl de PEI. Para sobreexpresar los FT de ratón utilizamos los vectores pMXs-Oct3/4, pMXs-Nanog (Addgene), y para normalizar los niveles de transfección, co-transfectamos el plásmido pRL-TK (Promega), que codifica para la enzima luciferasa de la especie *Renilla reniformis*. Realizamos triplicados de cada condición ensayada en cada réplica biológica. A las 48 hs post-transfección descartamos el medio de cultivo,

lavamos con PBS y lisamos las células utilizando 80 μ l del Buffer de lisis en frío. Colectamos el lisado y lo centrifugamos 2 minutos a 10.000 rpm. En una placa blanca de 96 *wells* (Lumitrac 200, Greiner), sembramos 10 μ l del sobrenadante para medir la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis*, incubándolo con 1 μ l de su sustrato, coelenterazina H 50 μ M (Promega), durante 15 minutos a TA. Medimos su actividad en el luminómetro *Glomax Multi Detection System* (Promega) con 5 segundos de integración. Para medir la actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* incubamos 50 μ l del sobrenadante con 55 μ l de *buffer* conteniendo su sustrato, luciferina (Promega), a TA y realizamos la lectura de los *wells*.

Utilizamos el valor de lectura de la actividad de la luciferasa de *Renilla reniformis* en cada *well* para normalizar los niveles de transfección. Los valores de actividad de luciferasa de *Photinus pyralis* expresan como la relación entre los valores medidos para la actividad de esta enzima y los obtenidos para la actividad de la luciferasa de *Renilla*.

Análisis Estadístico

Los resultados para los ensayos de luciferasa, donde la variable fue intensidad de luz medida, fueron analizados mediante análisis de la varianza en un diseño en bloques al azar con un mínimo de 3 réplicas. Analizamos de esta misma forma los resultados de los ensayos de la modulación de los FT en CME, en los que la variable fue nivel de expresión del gen en estudio. Aplicamos una transformación logarítmica a los datos. Estudiamos el supuesto de normalidad mediante un gráfico Q-Q Plot y la prueba de Shapiro-Wilks, y el de homocedasticidad por la prueba de Levene. Analizamos las comparaciones entre tratamientos utilizando la prueba de Tukey. Consideramos significativas aquellas pruebas con $p < 0,05$. Todos los análisis estadísticos fueron efectuados utilizando el programa estadístico *Infostat* (FCA, Universidad Nacional de Córdoba).

Técnicas microbiológicas

Preparación de bacterias ultracompetentes

Las bacterias ultracompetentes poseen una eficiencia del orden de 10^8 colonias transformantes por mg de plásmido. Para su preparación incubamos en esterilidad, un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 α en medio SOB a 18-22°C con agitación moderada, hasta que alcanza una DO₆₀₀ de 0,55. Transferimos el cultivo a un baño agua-hielo por 10 minutos. Luego cosechamos las bacterias centrifugando a 3220 x g por 20 minutos a 4°C y realizamos un lavado resuspendiéndolas en 80 ml de Buffer Inoue frío. Centrifugamos nuevamente a 2500 x g por 10 minutos a 4°C y resuspendemos las bacterias en 20 ml de Buffer Inoue frío. Agregamos 1,5 ml de DMSO, mezclamos suavemente la suspensión de bacterias y la incubamos en hielo por 10 minutos. Rápidamente, alicuotamos la suspensión en tubos eppendorfs pre-enfriados a -20°C y estériles, y los sumergimos inmediatamente en un baño de nitrógeno. Conservamos el stock de bacterias ultracompetentes a -80°C. Determinamos la eficiencia de transformación de las bacterias transformándolas con un plásmido de concentración conocida, sembrando tres diluciones (1:10, 1:100 y 1:1000), y utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{UFC} \times \text{FD}}{\mu\text{g ADN}}$$

donde UFC corresponde a las unidades formadoras de colonias, FD al factor de dilución realizado y $\mu\text{g ADN}$ a la cantidad de vector utilizado.

Transformación de bacterias: método de Golpe de calor (*Heat Shock*)

Realizamos la transformación de bacterias mediante la técnica de golpe de calor, o *Heat Shock*. Utilizamos bacterias ultracompetentes de la cepa *E. coli* DH5 α , una de las

más utilizadas para la transformación con ADN plasmídico, ya que posee mutaciones inactivantes tanto de enzimas endonucleasas que degradarían al ADN foráneo, como de recombinasas que podrían producir recombinación homóloga entre los vectores y el cromosoma bacteriano.

Utilizamos 50 μ l de bacterias ultracompetentes para cada transformación con vectores, y 100 μ l de estas bacterias en el caso de transformarlas con productos de ligación, debido a la baja eficiencia con la que ocurre la ligación.

Trabajando en esterilidad y en frío, una vez descongeladas las suspensiones, agregamos la solución con plásmidos a transformar e incubamos durante 20 a 30 minutos en hielo para favorecer que los vectores interactúen con las células. Realizamos un control positivo transformando las bacterias con un vector de concentración conocida y con resistencia al mismo antibiótico del plásmido de interés, y uno negativo, sin agregado de ADN, como control de cepa y del antibiótico de selección. Una vez terminada la incubación en hielo, colocamos los tubos en un baño a 42°C durante 90 segundos e inmediatamente los incubamos en un baño de agua hielo durante 5 minutos. Agregamos 1 ml de medio de cultivo LB a cada tubo y los incubamos a 37°C durante entre 30 minutos y una hora.

Luego de la incubación, centrifugamos las células durante 5 minutos a 2700 x g. Descartamos el sobrenadante, resuspendemos en aproximadamente 100 μ l de LB remanente y sembramos las bacterias en placas LB agar conteniendo 100 μ g/ml de ampicilina o 50 μ g/ml de kanamicina, según corresponda. Incubamos las placas *overnight* a 37°C y al día siguiente, evaluamos la presencia de colonias transformantes.

Purificación de ADN plasmídico en escala pequeña (Miniprep)

Utilizamos el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly para purificar ADN plasmídico con fines analíticos a baja escala y de forma rápida. El protocolo utilizado se basa en la lisis alcalina de las bacterias utilizando NaOH y el detergente dodecil sulfato de sodio (SDS).

Trabajando en esterilidad, inoculamos 2 ml de medio LB conteniendo ampicilina 100 µg/ml (o el antibiótico correspondiente según el plásmido) con una colonia de bacterias transformadas con el plásmido a analizar, e incubamos las bacterias a 37°C toda la noche con agitación.

Centrifugamos 1,5 ml de cada cultivo durante 5 minutos a 2700 x g. Descartamos el sobrenadante y resuspendemos las bacterias en 100 µl de Solución 1. Agregamos 200 µl de Solución 2 y mezclamos suavemente por inversión. Luego, agregamos 150 µl de Solución 3, mezclamos por inversión, y centrifugamos los tubos a máxima velocidad durante 15 minutos. Separamos el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico y agregamos 0,6 volúmenes de isopropanol o 2 volúmenes de etanol frío. Centrifugamos los tubos a máxima velocidad durante 30 minutos. Descartamos el sobrenadante y agregamos 100 µl de alcohol 70% para disolver las sales remanentes, sin disolver el *pellet*. Centrifugamos a máxima velocidad durante 5 minutos, descartamos el sobrenadante y dejamos secar los *pellets* a TA por 5 minutos. Por último, resuspendemos los pellets en 30 µl de H₂O_{mQ}.

Purificación de ADN plasmídico a media escala (Midiprep)

En esterilidad, inoculamos 200 ml de medio LB conteniendo 100 µg/ml de ampicilina con 500 µl de un stock de *E. coli* transformada con el plásmido de interés conservado en glicerol 15% a -80°C, e incubamos a 37°C con agitación durante 12-16 horas. Centrifugamos los cultivos de bacterias a 2700 x g durante 15 minutos y descartamos el sobrenadante. Resuspendemos el pellet en 6 ml de Solución 1 y agregamos 6 ml de Solución 2 que produce la lisis de las bacterias, mezclamos por inversión e incubamos en hielo durante 10 minutos. Luego, agregamos 6 ml de Solución 3, mezclamos por inversión e incubamos durante 5 minutos. Centrifugamos a 10.000 rpm durante 30 minutos a 4°C y transferimos los sobrenadantes a nuevos tubos de centrífuga, filtrándolos a través de una gasa para evitar el pasaje de restos de precipitado.

Agregamos 0,6 volúmenes de isopropanol, mezclamos e incubamos 5 minutos a TA. Centrifugamos a máxima velocidad por 15 minutos a 4°C. Descartamos el

sobrenadante y dejamos secar el *pellet*, el cual resuspendemos en 2 ml de Buffer TE e incubamos con una concentración final de 100 µg/ml de RNAsa durante 30 minutos a TA. Finalmente, utilizamos las columnas del kit *Wizard Plus Maxipreps DNA Purification System* (Promega) para purificar los ADN plasmídicos, siguiendo las indicaciones del fabricante. Eluimos el ADN plasmídico de las columnas con 500 µl de Buffer TE o H₂O_{mQ} precalentada a 65°C, lo cuantificamos midiendo su concentración en NanoDrop 2000 y realizamos una electroforesis en gel de agarosa 0,8% de una alícuota para verificar su calidad.

Soluciones y medios de cultivo

PBS 1x

NaCl	8 mg
KCl	200 mg
KH ₂ PO ₄	200 mg
Na ₂ HPO ₄	1,14 mg
H ₂ O _{mQ} estéril	csp 1 litro

Medio de propagación para CMP

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO ₃ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 15%)	7,5 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 µl
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 µl
Penicilina/Estreptomina (100x)	500 µl
β-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
LIF 1000x	50 µl
H ₂ O _{mQ} estéril	csp 50 ml

Medio de diferenciación para CMP

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
----------------------	-------

NaHCO ₃ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 20%)	10 ml
Glutamax 200 mM (100x)	500 µl
Aminoácidos no esenciales 10 mM (100x)	500 µl
Penicilina/Estreptomina (100x)	500 µl
β-mercaptoetanol 0,1 mM (1000x)	50 µl
H ₂ O _{mQ} estéril	csp 50 ml

Medio de propagación para MEF, CHO, HEK y BGC

DMEM Alta Glucosa 5x	10 ml
NaHCO ₃ 7,5 %	2,5 ml
SFB (concentración final 10%)	5 ml
Penicilina/Estreptomina (100x)	500 µl
H ₂ O _{mQ} estéril	csp 50 ml

Para el cultivo de CHO y BGC agregar 500 µl piruvato de sodio 100 mM.

Buffer de lisis para determinación de actividad de luciferasa

Tritón X-100 10%	200 µl
K ₂ HPO ₄ 500 mM pH7,8	20 ml
DTT 100 mM	1 ml
H ₂ O	csp 100 ml

Buffer Luciferasa

Para 12,5 reacciones (incluyendo un 10 % de error)

GGSM*	390 µl
EGTA 100 mM	31,25 µl
Tritón X-100 10%	16,88 µl
K ₂ HPO ₄ 100 mM	93,75 µl
H ₂ O _{mQ}	182,35 µl
ATP 2,5 mM	50 µl
DTT 1M	0,94 µl
Luciferina 1mM	15,63 µl

* glicilglicina 25 mM, MgSO₄ 7,5 mM pH 7,8

Medio LB

Extracto de levadura	5 g
Triptona de carne	10 g
NaCl	10 g
H ₂ O _{dest}	csp 1 litro

Medio SOB

Extracto de levadura	5 g
Triptona de carne	20 g
NaCl	0,5 g
KCl 250 mM	10 ml
MgCl ₂ 2M	5 ml
H ₂ O _{dest} estéril	csp 1 litro

PIPES 0,5 M pH 6,7

PIPES	15,1 g
H ₂ O _{mQ}	csp 100 ml

Ajustar el pH a 6,7 y llevar a volumen final. Esterilizar la solución con filtro 0,22 µm, alicuotar y guardar a -20°C.

Buffer Inoue

MnCl ₂ .4H ₂ O	10,88 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	2,20 g
KCl	18,65 g
PIPES 0,5 M pH 6,7	20 mL
H ₂ O _{mQ} estéril	csp 1 litro

Esterilizar la solución con filtro 0,22 µm.

Solución 1 Preparación DNA plasmídico

Tris-HCl pH 7,5 1 M	2 ml
EDTA 0,5 M	0,8 ml
H ₂ O _{dest}	csp 40 ml

Solución 2 Preparación DNA plasmídico

NaOH 1M	4 ml
SDS 10%	2 ml
H ₂ O _{dest}	csp 20 ml

Solución 3 Preparación DNA plasmídico

Ácido acético glacial 100%	5,75 ml
Acetato de potasio 5M	30 ml
H ₂ O _{dest}	csp 50 ml

Buffer TE

Tris-HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1 mM

Resultados

Parte I

Reprogramación celular

Obtención de CMPI

Nuestro primer objetivo fue generar un modelo complementario para estudiar distintos mecanismos moleculares que ocurren en células que se encuentran en estado indiferenciado y que pueden sufrir un proceso de diferenciación. Además de las CME otro tipo de células madre pluripotentes son las denominadas CMPI, generadas a partir de células somáticas diferenciadas y que poseen las propiedades fundamentales de auto-renovación y pluripotencia.

Existen distintos métodos para introducir los factores de transcripción necesarios para producir la reprogramación de células terminalmente diferenciadas, por ejemplo mediante el uso de vectores derivados de virus modificados que codifican para los genes requeridos y que se integran o no al genoma, o introduciendo las proteínas directamente en las células, entre otros. En nuestro laboratorio utilizamos partículas lentivirales defectivas en su replicación para transducir las células que serán reprogramadas, ya que es el método que hasta el momento demostró tener mayor eficiencia de reprogramación. Entonces, como primer paso para generar CMPI, produjimos partículas lentivirales mediante la transfección de células empaquetadoras. Estas partículas codifican para cuatro proteínas: Oct4, Sox2 y Klf4, factores de transcripción necesarios para reprogramar células terminalmente diferenciadas, y mCherry, una proteína fluorescente reportera. Previamente, se determinó la relación óptima de Fugene6 : ADN, ensayando varias relaciones del agente de transfección Fugene6 y ADN con las cuales transfectar la línea celular HEK 293T. Esta relación resultó ser de 6:1, Fugene6 : ADN. Probamos varias cantidades manteniendo esta relación para mejorar la eficiencia de transfección, siendo la condición óptima la mezcla de 12 μ l de Fugene6 y 2 μ g de ADN para un *well* de una placa MW6 con $6,66 \cdot 10^5$ células/*well* sembradas el día previo a la transfección (Figura R.1).

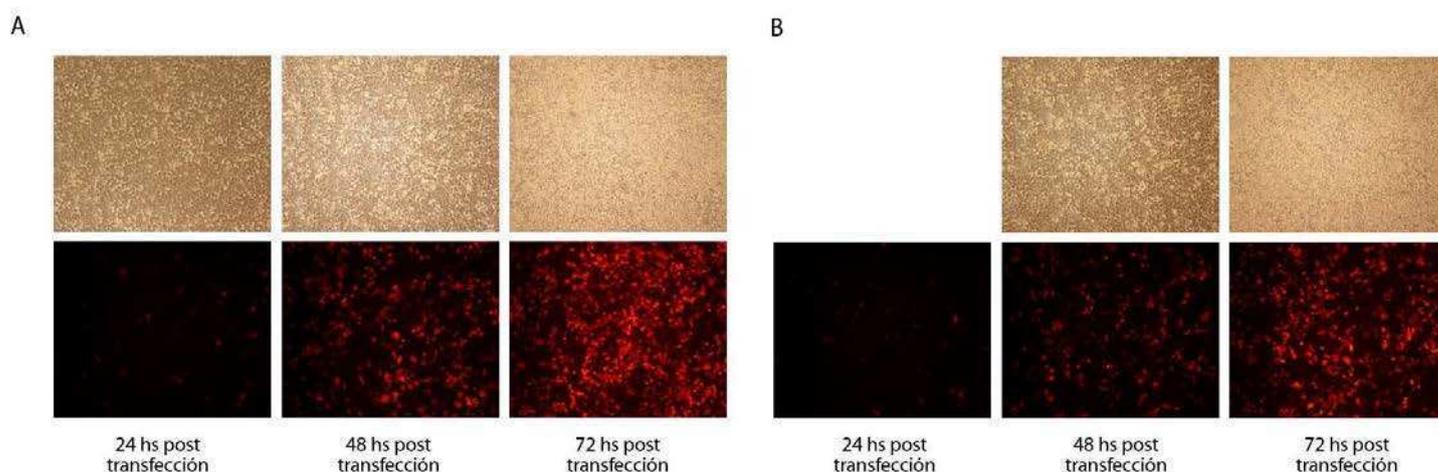


Figura R.1. Puesta a punto de la condición de transfección de la línea empaquetadora HEK 293T para la producción de partículas lentivirales defectivas en su replicación. (A) Imágenes representativas de células transfectadas con dos cantidades distintas de ADN y agente de transfección (A) 12 µl Fugene6 : 2 µg ADN, (B) 6 µl Fugene6 : 1 µg ADN. Los paneles superiores corresponden a imágenes de campo claro; los inferiores, a imágenes de fluorescencia del gen reportero mCherry. Aumento 100x.

Una vez elegida la condición de transfección para las células empaquetadoras, obtuvimos los medios condicionados conteniendo las partículas lentivirales para transducir MEF (Medio de Transducción, MT). Filtramos los MT con un filtro 0,45 µm *low binding*, para evitar que el medio contenga células empaquetadoras que puedan haberse desprendido de las placas. Debido a la composición del material del filtro, evitamos que las partículas virales queden allí retenidas. Sembramos 100.000 MEF sobre *wells* recubiertos con gelatina bovina 0,1%, ya que tanto las CME como las CMPI pueden ser cultivadas de rutina sobre placas con este tratamiento, y por consiguiente, en el caso que las MEF sean reprogramadas deben encontrarse sobre el soporte adecuado. Ensayamos distintas condiciones para la transducción de estas células para encontrar la condición de mayor eficiencia, determinada por generación de una mayor cantidad de células reprogramadas. Como se describió en Materiales y Métodos, suplementamos los MT con distintas concentraciones finales de polibreno (5-10 µg/ml), un polímero catiónico que favorece la agregación de las partículas lentivirales y

disminuye la repulsión que se genera entre sus cargas negativas y las de la superficie celular. Agregamos estos MT a las MEF e incubamos algunas de las placas durante toda la noche a 37°C con 5% de CO₂, y a otras las sometimos a una centrifugación de 45 minutos a 750 x g (*spinfection*), previo a su incubación. Repetimos la ronda de *spinfection* a las MEF, colectando nuevos MT a las 48 y 72 horas post transfección de las células empaquetadoras HEK 293T.

Las CMP pueden ser cultivadas sobre superficies tratadas con gelatina o sobre una capa nutricia de MEF mitóticamente inactivadas (MEFi, MEF irradiadas). A pesar de esto, luego de finalizar las rondas de transducción, no sembramos estas MEF sobre una capa de MEFi, ya que aquellas células que se reprogramen recibirán los factores que secretan las MEF que no lo hagan, y ya fueron sembradas sobre el soporte adecuado. En todos los casos reemplazamos el medio de cultivo para MEF por el de CME suplementado con ácido valproico (AVP, 1,9 mM concentración final) a las 48 hs post-transducción, manteniendo este tratamiento durante 15 días. Este compuesto es un inhibidor de deacetilasas de histonas y ha sido demostrado que su uso aumenta la eficiencia de reprogramación (Huangfu, Maehr, et al., 2008; Huangfu, Osafune, et al., 2008). Transcurridos entre 9 y 17 días aproximadamente post-transducción, comenzaron a emerger colonias con morfología similar a la presentada por las CME: colonias redondeadas con bordes refringentes cuyas células poseen una alta relación núcleo/ citoplasma. Si bien, no se observaron diferencias en el número de colonias que emergieron entre los *wells* que recibieron distinta concentración de polibreno, en el caso de las placas centrifugadas el número de colonias fue superior que en las no centrifugadas. Además, como se muestra en la Figura R.2 A, detectamos la expresión del gen reportero mCherry evidenciado por el color rojo que presentaban las colonias al ser observadas en un microscopio de fluorescencia. La expresión de este gen confirma la integración del vector en el genoma de la célula, y la expresión de los tres factores específicos para reprogramar por la disposición secuencial de éstos en el vector (Sommer et al., 2009). Por otro lado, a lo largo del tiempo, durante el transcurso de los sucesivos pasajes, observamos la disminución de la expresión de este gen reportero, indicando el silenciamiento que ocurre a largo plazo de la construcción integrada y que es necesario para que las células puedan diferenciarse correctamente.

Aislamos algunas colonias en forma manual y las expandimos para poder proceder a su caracterización (Figura R.2).

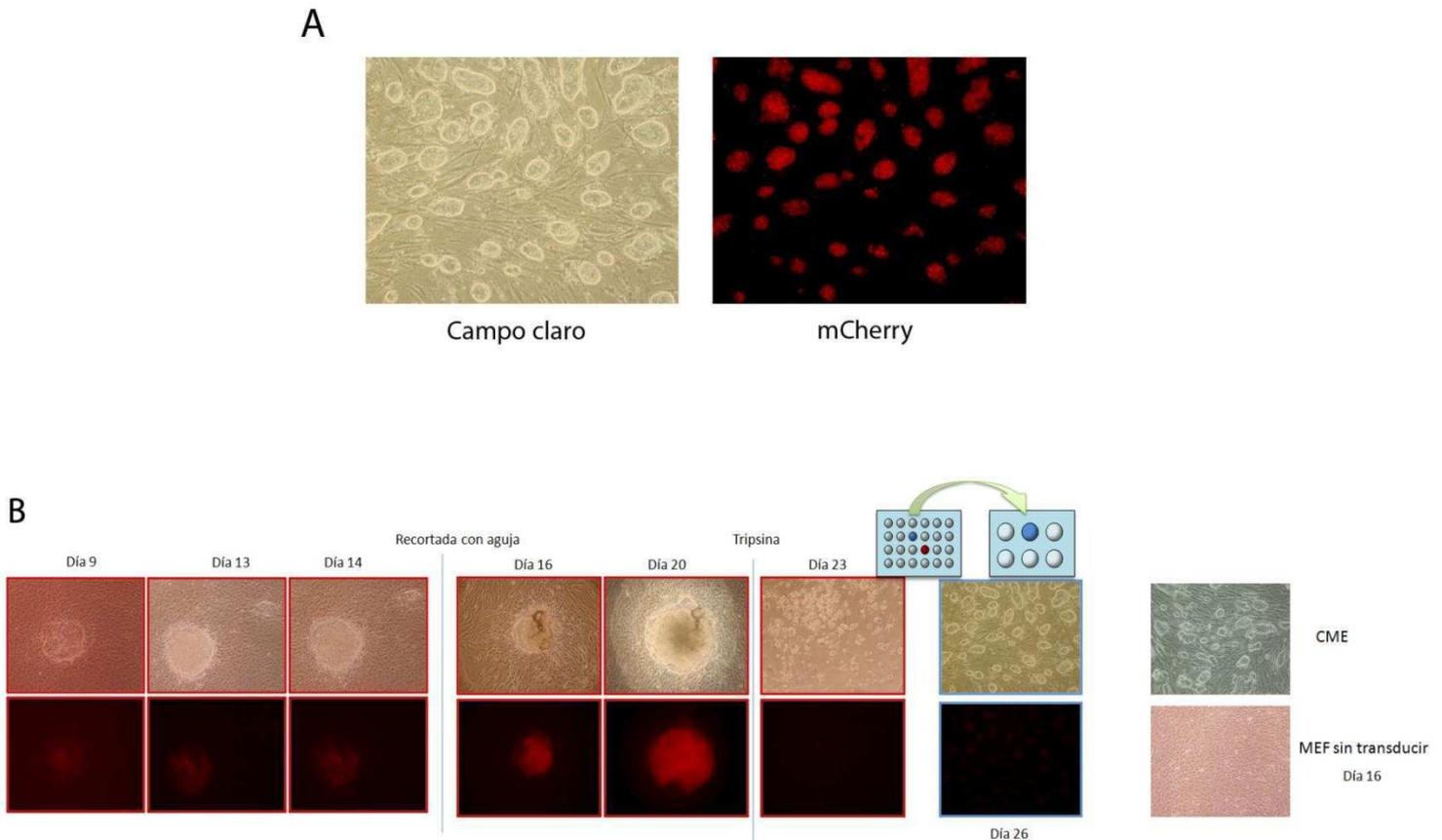


Figura R.2. Obtención de células madre pluripotentes inducidas. (A) Imagen representativa de colonias de CMPI (panel izquierdo) que presentan la morfología típica de una colonia de CME y la expresión del reportero mCherry (panel derecho). (B) Secuencia de imágenes representativa donde se observa la evolución de una colonia de CMPI, que luego aislamos y expandimos en cultivo (paneles superiores). En los paneles inferiores se muestra la expresión del gen reportero mCherry y su silenciamiento. Los paneles a la derecha muestran la morfología de colonias de la línea de CME Ainv15 (panel superior) y de MEF sin transducir (panel inferior). Los días indicados son post-transducción. Aumento 100x. *Continúa en la página siguiente.*

C

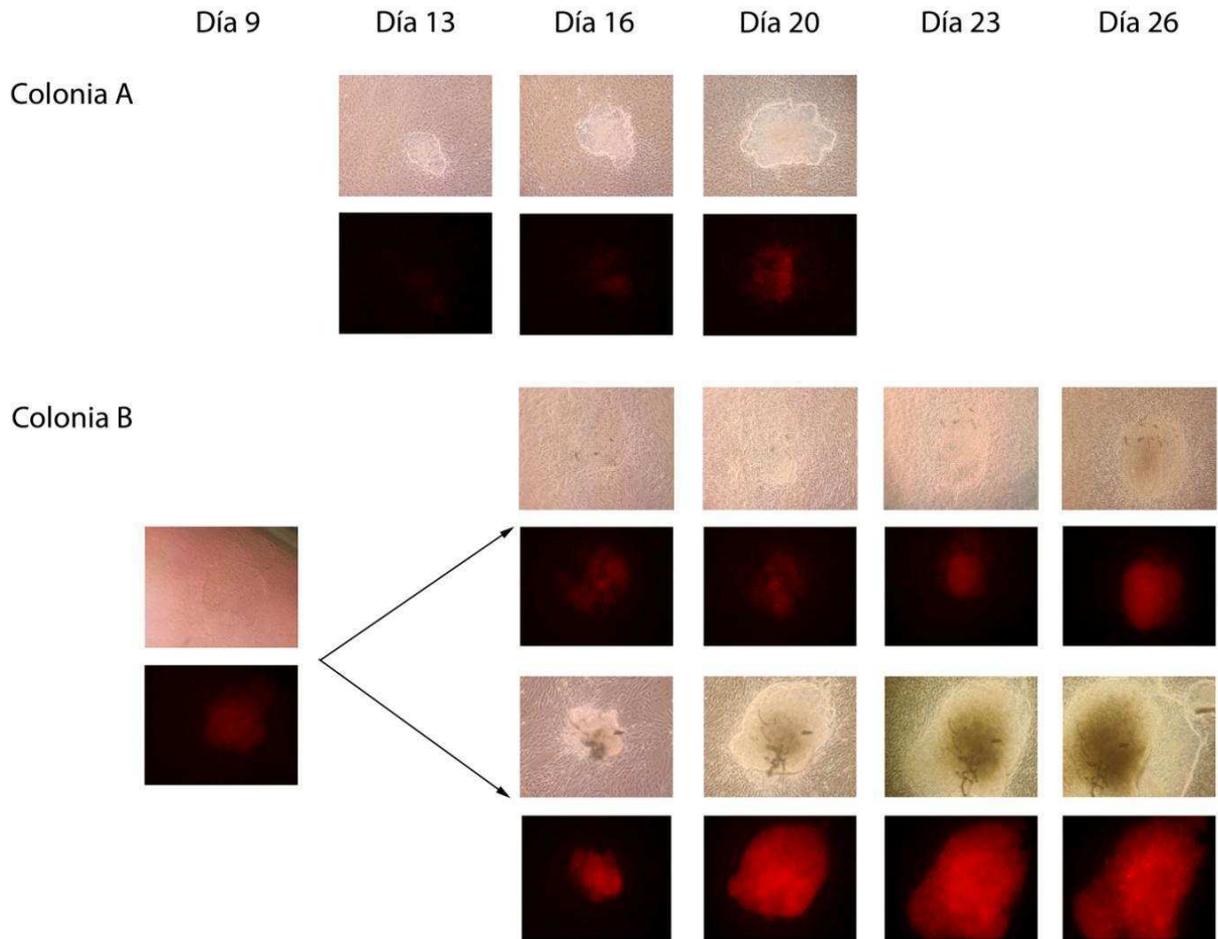


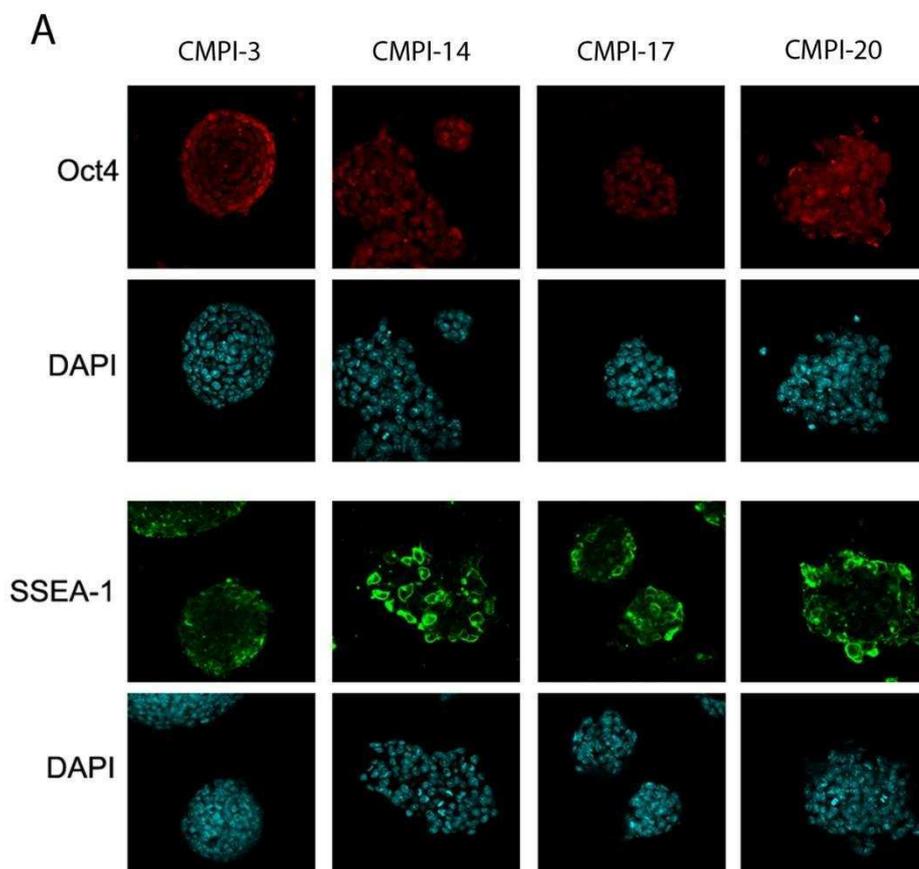
Figura R.2 (Continuación). Obtención de células madre pluripotentes inducidas. (C) Imágenes de dos colonias CMPI seguidas en el tiempo. Aislamos y expandimos la colonia B luego del día 10 post-transducción generando dos colonias. En los paneles superiores se muestra el campo claro, en los inferiores, la expresión del gen reportero mCherry. Aumento 100x.

Caracterización de las CMPI obtenidas

Para caracterizar las colonias generadas y confirmar que son CMPI, debemos evaluar las dos propiedades fundamentales de las células madre pluripotentes: auto-renovación y pluripotencia. La primera implica que las células puedan mantenerse en cultivo a lo largo de sucesivos pasajes conservando su morfología típica y expresando marcadores específicos del estado indiferenciado. Por otra parte, la pluripotencia se

analiza estudiando su capacidad de diferenciación por la que son capaces de generar células de las tres capas germinales (mesodermo, ectodermo y endodermo). Esta propiedad se evalúa tanto *in vitro*, mediante protocolos de diferenciación no dirigidos, como *in vivo*, mediante la formación de teratomas en ratones inmunosuprimidos.

Luego de amplificar las colonias, comenzamos su caracterización analizando la expresión de marcadores específicos del estado indiferenciado utilizando distintas técnicas. Observamos por inmunofluorescencia la presencia de Oct4 y SSEA-1, un antígeno de superficie específico del estado indiferenciado en células de ratón (Figura R.3 A). Utilizando la técnica de RT-PCR semi-cuantitativa, detectamos la expresión de los genes fundamentales del estado indiferenciado, Oct4, Sox2 y Nanog, además de otros genes que se expresan en CME como Rex1 y Ecat1 (Figura R.3 B). Es importante destacar que en las células adultas de las que se partió para efectuar la reprogramación, no detectamos expresión de estos genes, confirmando que la expresión de estos marcadores surgió como consecuencia del proceso de reprogramación.



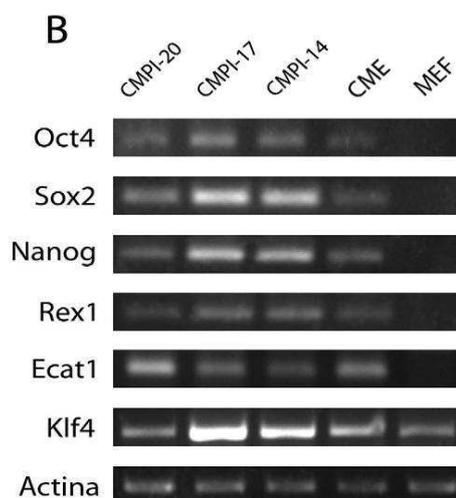


Figura R.3. Caracterización del estado indiferenciado de las colonias de CMPI obtenidas. (A) Imágenes representativas de la detección de marcadores del estado indiferenciado Oct4 y SSEA-1 evidenciados por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento 400x. (B) Análisis de la expresión de los genes marcadores del estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Ecat1 y Klf4 por RT-PCR de ARN total de líneas de CMPI, Ainv15 y de MEF. El gen β -actina fue utilizado como *housekeeping*.

Hasta aquí demostramos que las líneas obtenidas son capaces de proliferar preservando un estado en el que expresan marcadores propios de células pluripotentes indiferenciadas. Sin embargo, para concluir que se trata de CMPI, debemos evaluar su capacidad de originar células de los tres linajes, es decir, debemos evaluar si son pluripotentes. Para esto, mediante el protocolo de diferenciación *in vitro* de *hanging drop* descrito en Materiales y Métodos, generamos cuerpos embrioides (CE) que al adherirlos se diferencian a tipos celulares derivados de las tres capas germinales por tratarse de un protocolo no dirigido. Por RT-PCR e inmunofluorescencia evaluamos la expresión de distintos marcadores de estas capas. Observamos la presencia de α -Fetoproteína como marcador de endodermo, de α -Actina de músculo liso como marcador de mesodermo, y de β III-Tubulina como marcador de ectodermo por inmunofluorescencia (Figura R.4 A). Mediante RT-PCR semi-cuantitativa, detectamos la expresión de α -Fetoproteína como marcador de endodermo, de Brachyury como marcador de mesodermo, y de Nestina como marcador de ectodermo

(Figura R.4 B). Estos resultados confirman que mediante un protocolo de diferenciación *in vitro*, las colonias obtenidas son capaces de generar células de los tres linajes.

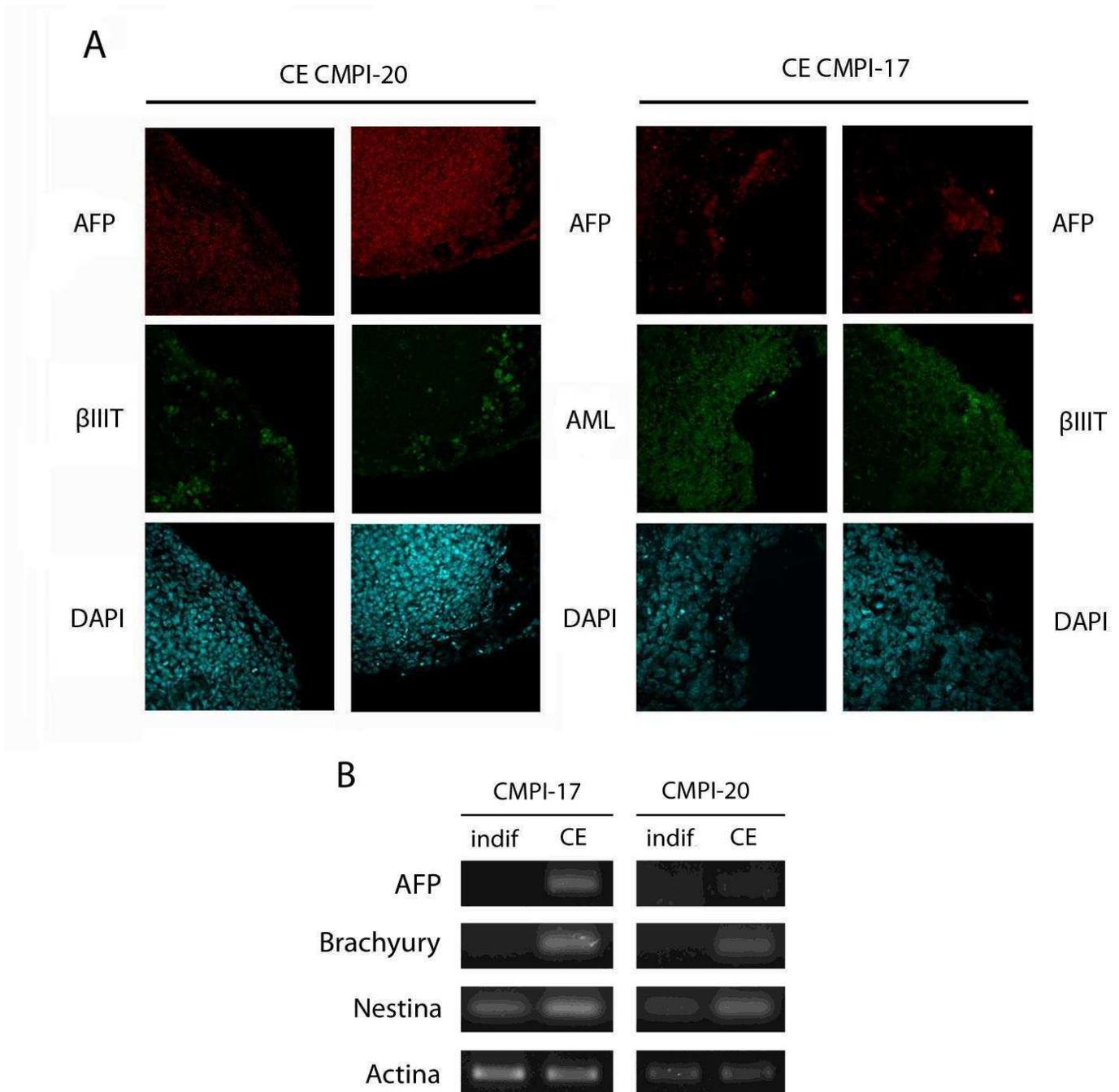


Figura R.4. Diferenciación *in vitro* mediante el protocolo de *hanging drop* de las líneas de CMPI obtenidas. (A) Imágenes representativas de la expresión de marcadores de diferenciación en CE derivados de las CMPI detectados por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal. Alfa-Fetoproteína (AFP, primera fila), marcador de endodermo; α -Actina de Músculo Liso (AML, segunda fila, segunda y tercer columna), marcador de mesodermo; y

Tubulina (β IIIT, segunda fila, primer y cuarta columna), marcador de ectodermo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento 400x. (B) Análisis de la expresión de genes AFP, Brachyury y Nestina por RT-PCR de ARN total de CE derivados de las CMPI y de las CMPI y en estado indiferenciado. El gen β -actina fue utilizado como *housekeeping*.

Asimismo, evaluamos la pluripotencia *in vivo* mediante la formación de teratomas en ratones inmunosuprimidos inyectando 1.10^6 células en cada flanco de forma subcutánea. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1 cm de diámetro aproximadamente, los estudiamos realizando una tinción con hematoxilina y eosina, y posterior análisis patológico. Como muestra la Figura R.5, las células reprogramadas generaron teratomas que contenían estructuras muy diversas y tipos celulares pertenecientes a las tres capas germinales, demostrando así su pluripotencia *in vivo*. Con todos los resultados presentados, podemos concluir que efectivamente las MEF fueron reprogramadas, originando CMPI que presentan las propiedades fundamentales de auto-renovación y pluripotencia.

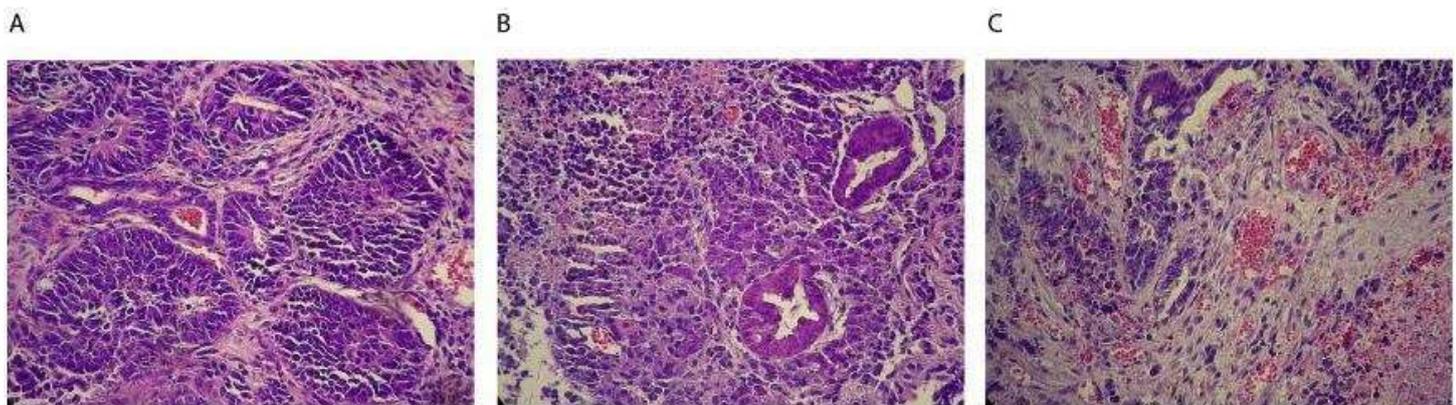


Figura R.5. Diferenciación *in vivo* de CMPI-20 mediante la formación de teratomas. Imágenes histológicas representativas de teratomas de CMPI-20 muestran células diferenciadas hacia los distintos tejidos pertenecientes a las tres capas, A: rosetas neurales (neuroepitelio, ectodermo), B: epitelio intestinal (endodermo), C: vasos sanguíneos (mesodermo). Aumento 200x.

Además de lo expuesto, algunas de las colonias obtenidas luego del segundo pasaje se diferenciaron espontáneamente a estructuras con actividad contráctil. Mediante inmunofluorescencia, observamos la presencia de marcadores de diferenciación cardíaca, como cardiotroponina T (cTnT) y el factor de transcripción de desarrollo cardíaco, Nkx 2.5 (Figura R.6).

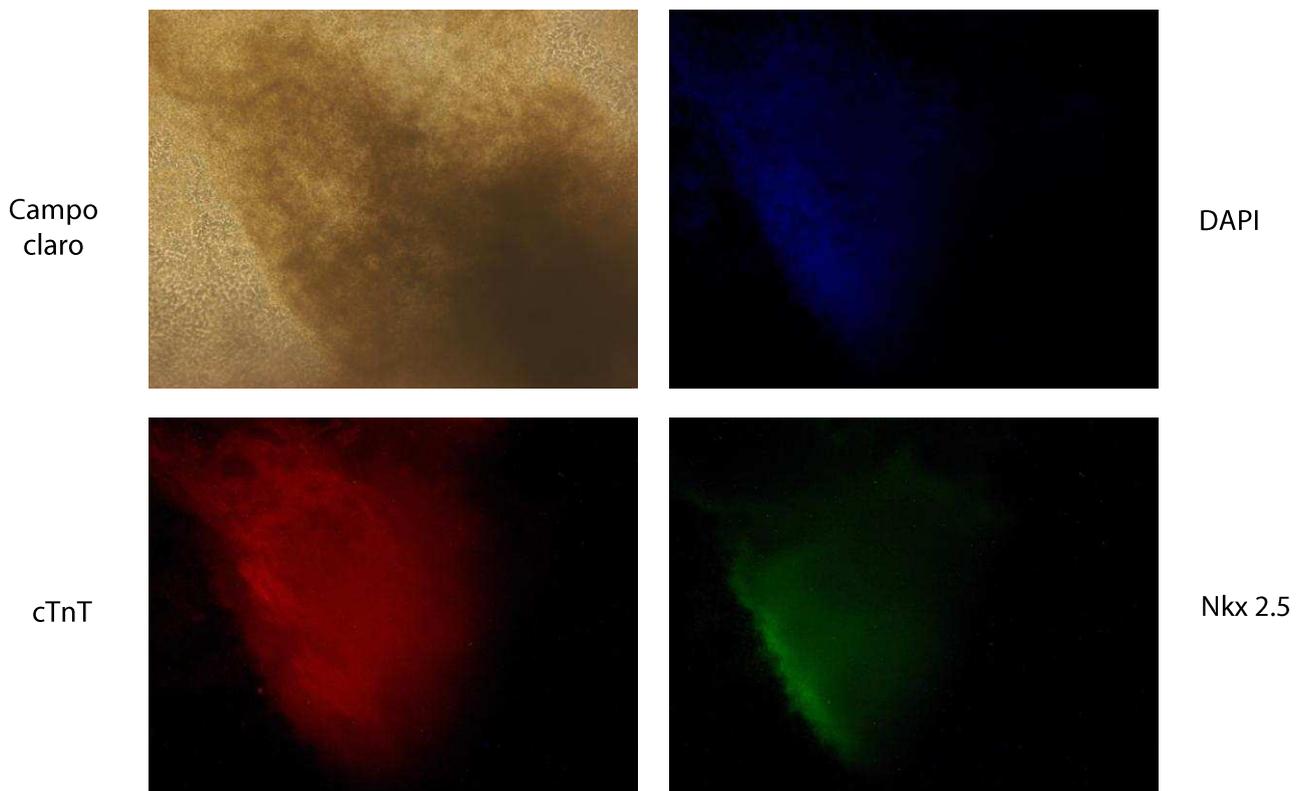


Figura R.6. Diferenciación espontánea a estructuras con actividad contráctil. Imágenes representativas de la expresión de marcadores de diferenciación cardíaca detectados por inmunofluorescencia. Cuerpo con actividad contráctil marcado con anticuerpos para cTnT y Nkx 2.5 (paneles inferiores). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (panel de arriba a la derecha). Aumento 40x.

Aplicación de las CMPI obtenidas: propagación de CMPI en un medio de cultivo novedoso

Una vez completada la caracterización de las CMPI obtenidas, es decir, que comprobamos que estas células son capaces de auto-renovarse y de diferenciarse a células de los tres linajes, el laboratorio alcanzó el objetivo de generar otro tipo de

CMP para contar así con otro modelo de estudio, además de las CME. Esto ha permitido trabajar con dos tipos de CMP para estudiar distintos mecanismos moleculares que tienen lugar en el estado indiferenciado y a lo largo del proceso de diferenciación. Además, la posibilidad de tener ambos modelos de CMP nos ofrece la ventaja de poder comparar estos tipos celulares al analizar si los mecanismos estudiados son conservados o si encontramos diferencias que enriquezcan el conocimiento que se tiene de estas células. Las CMPI generadas en el desarrollo de esta tesis fueron utilizadas en experimentos de distintas líneas del laboratorio (Luzzani et al., 2011; Solari et al., 2011).

Resultados previos de una de las líneas de investigación de nuestro laboratorio demostraron que el medio condicionado (MC) por la línea de granulosa bovina BGC-1 es capaz de mantener en cultivo a las CME en estado indiferenciado por varios pasajes sin el agregado de LIF, es decir, que conservan su capacidad de auto-renovarse. Además, demostramos que estas células cultivadas en MC son pluripotentes, ya que dieron origen a células de las tres capas germinales tanto en protocolos de diferenciación *in vitro* como *in vivo* (Losino et al., 2011). Teniendo en cuenta estos resultados, y dada la similitud de las CMPI con las CME, decidimos estudiar si es posible cultivar las CMPI en presencia de este medio condicionado, manteniendo sus propiedades fundamentales. Parte de los experimentos, cuyos resultados se detallan a continuación, fueron realizados en colaboración con la Dra. Noelia Losino, ya que el estudio del MC en CME formó parte de sus Tesis doctoral.

El objetivo fue evaluar si el MC por la línea de granulosa bovina BGC-1 sin agregado de LIF era capaz de mantener las CMPI en cultivo, manteniendo sus propiedades de auto-renovación y pluripotencia. Comenzamos estudiando si las CMPI podían ser mantenidas en cultivo por varios pasajes en el MC sin agregado de LIF, por lo que luego de haber realizado por lo menos tres pasajes en presencia de este medio, las comparamos con CMPI mantenidas paralelamente en medio de propagación (MP) estándar.

Lo primero que observamos fue la morfología de las colonias de CMPI. Tanto en MP como en MC presentaban la forma típica de las colonias de células madre

pluripotentes, similar a la observada en las CME: colonias con bordes refringentes compuestas de células con alta relación núcleo/citoplasma.

Luego, evaluamos si, al igual que las CME, las CMPI cultivadas en MC preservaban sus propiedades fundamentales. Para esto, estudiamos ambas propiedades cultivando estas células por al menos tres pasajes en dicho MC. Procedimos de la misma manera que lo hicimos para caracterizar las CMPI. Observamos por inmunofluorescencia mediante microscopía confocal, la presencia de marcadores del estado indiferenciado como Oct4 y SSEA-1, en células cultivadas tanto en MC como células cultivadas en MP (Figura R.7 A). Además, detectamos por RT-PCR la expresión de genes fundamentales del estado indiferenciado como Oct4, Sox2 y Nanog, Rex1 y Ecat1 (Figura R.7 B). Asimismo, realizamos un control negativo en paralelo en el que cultivamos las CMPI en MP sin el agregado de LIF. Esta condición no favorece que las células continúen en estado indiferenciado, diferenciándose de manera espontánea y produciéndose una disminución apreciable en la expresión de los marcadores mencionados, comparado tanto con células mantenidas en MP suplementado con LIF como con células cultivadas en MC. Teniendo en cuenta estos resultados, podemos concluir que el MC es capaz de mantener CMPI en cultivo, conservando la capacidad de auto-renovación.

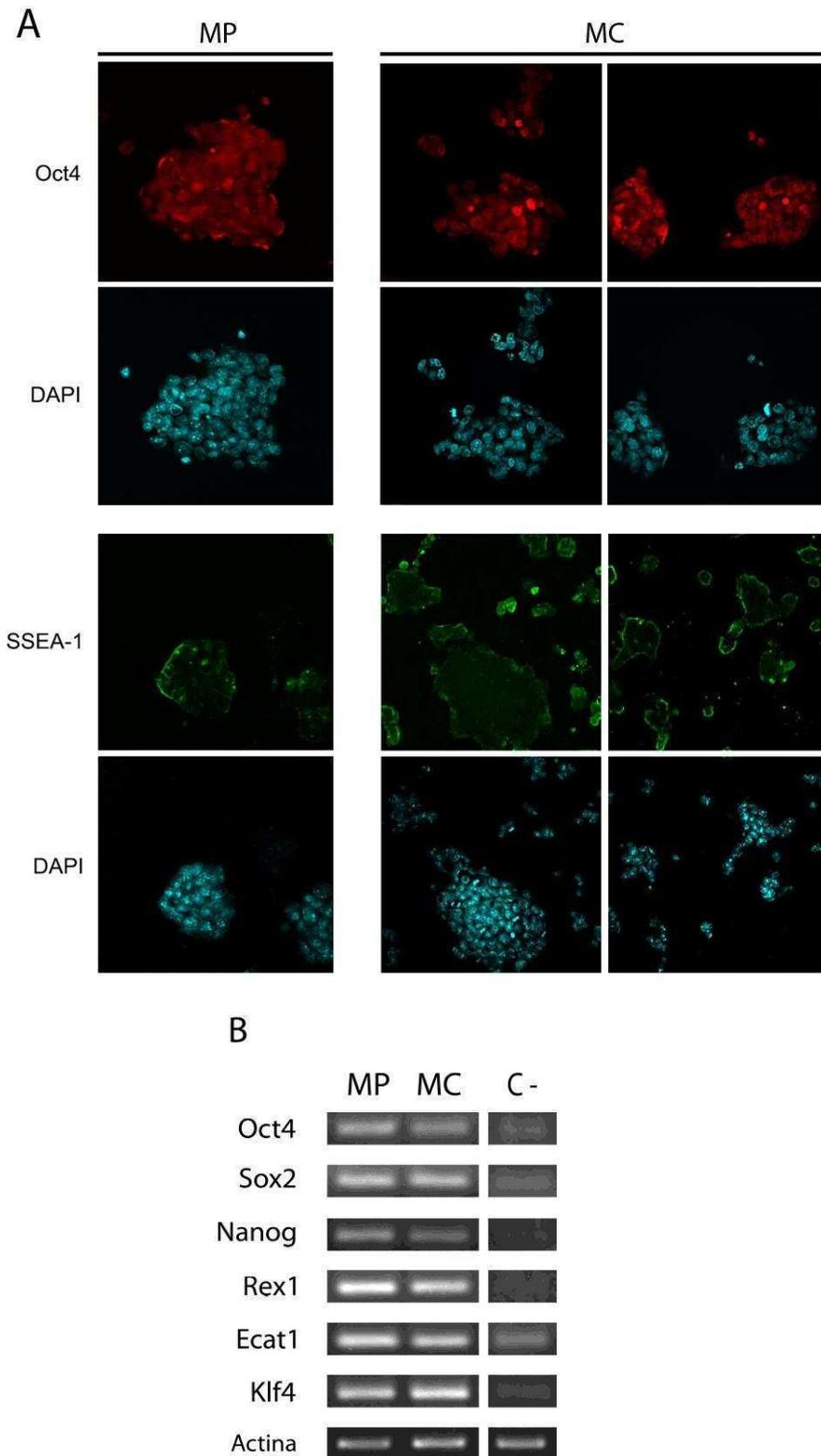


Figura R.7. Caracterización del estado indiferenciado de las colonias de CMPI-20 cultivadas en medio condicionado por la línea BGC-1. (A) Imágenes representativas de la presencia de marcadores del estado indiferenciado Oct4 y SSEA-1 evidenciados por inmunofluorescencia utilizando microscopia confocal en CMPI-20. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento

400x. (B) Análisis de la expresión de los genes marcadores del estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, Rex1, Ecat1 y Klf4 por RT-PCR de ARN total de CMPI-20. El gen β -actina fue utilizado como *housekeeping*.

Habiendo demostrado que las CMPI se auto-renuevan al ser cultivadas en MC, continuamos evaluando si además en este medio las CMPI preservan la otra propiedad esencial de las CMP, es decir, si las células propagadas en este medio son pluripotentes. En primer lugar, estudiamos la formación de cuerpos embrioides *in vitro* de CMPI que habían sido propagadas en MC por al menos tres pasajes, para lo cual sometimos a las CMPI-20 al protocolo de diferenciación de *hanging drop*, descrito previamente en Materiales y Métodos. Generamos CE derivados de células mantenidas en MC y de células cultivadas en MP, y analizamos por distintas técnicas si las células de estos CE expresaban marcadores de las tres capas germinales. Como muestra la Figura R.8 A, observamos por inmunofluorescencia la presencia de un marcador de endodermo, α -Fetoproteína; de un marcador de mesodermo, α -Actina de músculo liso; y de un marcador de ectodermo, β III-Tubulina. Asimismo, mediante RT-PCR detectamos la expresión de α -Fetoproteína como marcador de endodermo, de Brachyury como marcador de mesodermo, y de Nestina como marcador de ectodermo (Figura R.8 B). Con estos resultados demostramos que las CMPI propagadas en MC y luego sometidas a un protocolo de diferenciación *in vitro*, dan origen a CE que se diferencian a células de las tres capas germinales.

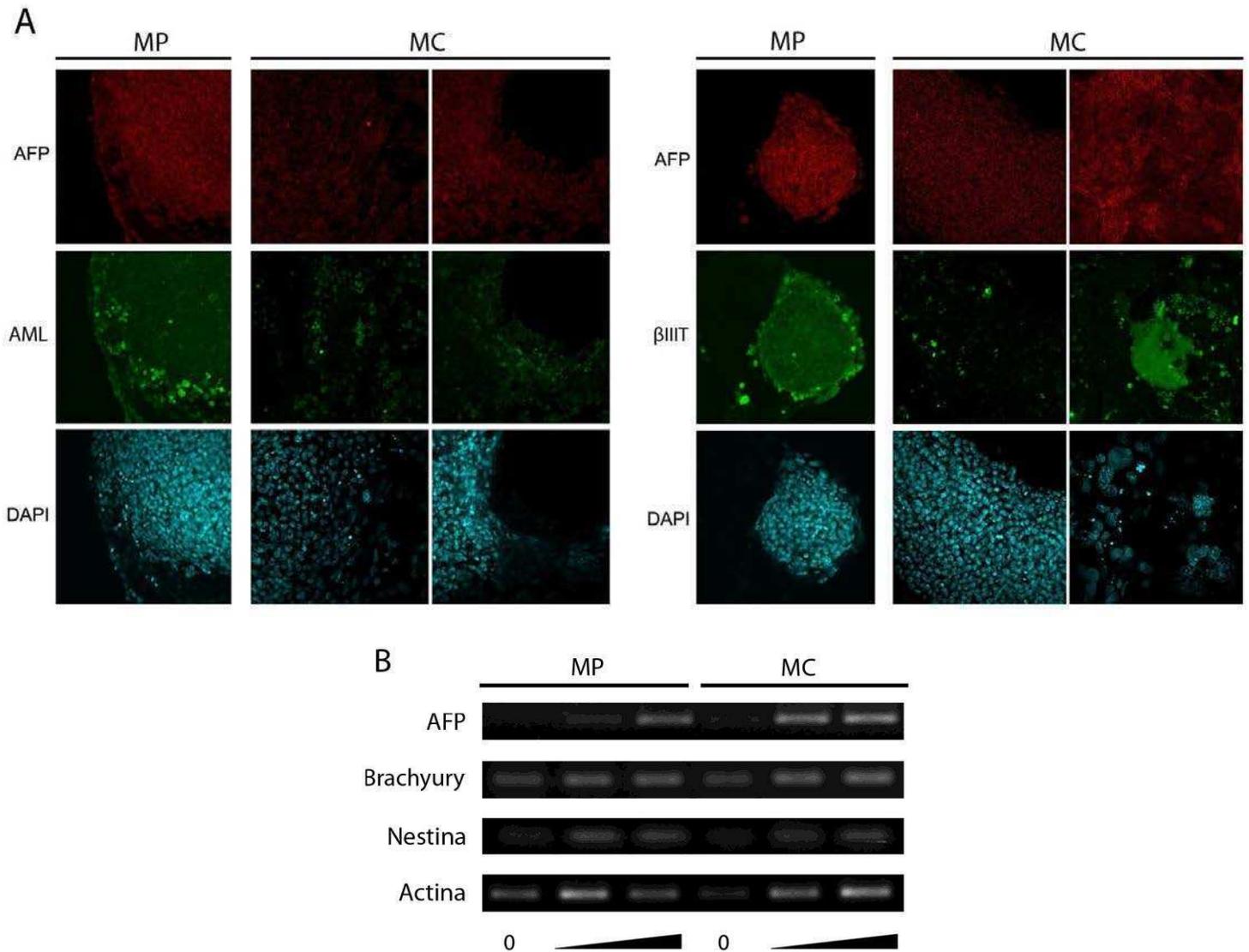


Figura R.8. Diferenciación *in vitro* mediante el protocolo de *hanging drop* de las colonias de CMPI cultivadas en medio condicionado por la línea BGC-1. (A) Imágenes representativas de la expresión de marcadores de diferenciación en CE derivados de las CMPI-20 cultivadas en MP o en MC evidenciados por inmunofluorescencia utilizando microscopía confocal. Alfa-Fetoproteína (AFP) fue utilizada como marcador de endodermo; Alfa Actina de Músculo Liso (AML), como marcador de mesodermo; y β III Tubulina (β IIIT), como marcador de ectodermo. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Aumento 400x. (B) Análisis de la expresión de genes AFP, Brachyury y Nestina por RT-PCR de ARN total de CE derivados de las CMPI-20 a distintos tiempos a lo largo del protocolo de diferenciación. El gen β -actina fue utilizado como *housekeeping*.

Por otro lado, evaluamos si las CMPI cultivadas en el MC preservan su pluripotencia mediante un protocolo de diferenciación *in vivo*, a través de la formación de teratomas en ratones inmunosuprimidos, como se describió en la sección de Materiales y Métodos. Cultivamos CMPI-20 en MC por al menos tres pasajes y las inyectamos por vía subcutánea en ratones nude. Estas CMPI dieron origen a tumores que extraímos luego de dos semanas desde su detección. Posteriormente, los estudiamos mediante una tinción con hematoxilina y eosina, y posterior análisis patológico. Este análisis mostró que los tumores obtenidos, originados de las CMPI mantenidas en MC, presentaron múltiples tejidos donde observamos células que pertenecen a las tres capas germinales (Figura R.9). Esto demuestra que las CMPI propagadas en MC preservan su pluripotencia evaluada *in vivo*.

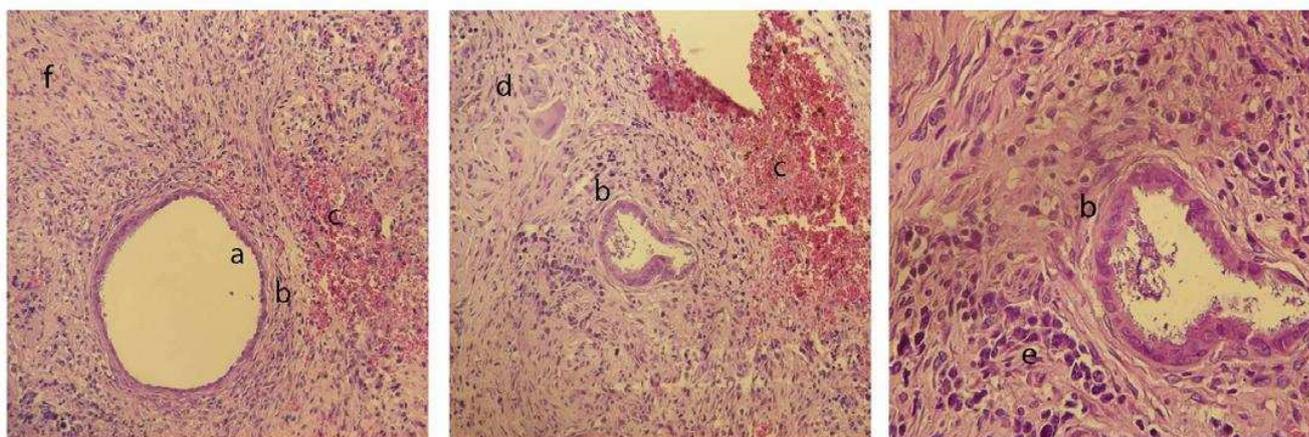


Figura R.9. Diferenciación *in vivo* mediante la formación de teratomas, de las CMPI-20 propagadas en el MC. Imágenes histológicas representativas de teratomas muestran diferenciación de las CMPI-20 a los distintos tejidos pertenecientes a las tres capas germinales, a: tejido epitelial ciliado, b: músculo liso, c: células sanguíneas, d: tejido neuronal, e: tejido primitivo neuronal, f: vasos sanguíneos. Aumento 100x. El tercer panel muestra una imagen ampliada de un corte diferente pero de la misma región del segundo panel. Aumento 400x.

Teniendo en cuenta todos estos resultados en conjunto, podemos concluir que las CMPI pueden ser cultivadas en el MC por la línea de granulosa bovina BGC-1 sin el

agregado de LIF, manteniendo sus propiedades fundamentales de auto-renovación y pluripotencia. Estos resultados dieron lugar a un manuscrito que fue publicado en *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Solari et al., 2011).



La parte II fue retirada a pedido del autor

At author's request part II has been withdrawn

Parte II

Sistema de defensa frente al estrés oxidativo

Como ya hemos mencionado, las CMPI presentan características similares a las CME, dentro de las que se encuentran el perfil de expresión génica, las modificaciones epigenéticas, y su capacidad de auto-renovación y de pluripotencia (Kazutoshi Takahashi & Yamanaka, 2006). Además de estas semejanzas, tanto las CME como las CMPI poseen un conjunto de mecanismos exacerbados que aseguran la estabilidad genómica, evitando la propagación de daños genéticos. Este aspecto es crítico, y en el caso de las CME es fundamental para evitar dañar el material genético, ya que al ser las células que fisiológicamente darían lugar a un individuo, incluyendo la línea germinal, un daño en el ADN en este estadio podría tener graves consecuencias. Como hemos descrito en la introducción, uno de estos mecanismos involucra un complejo sistema de defensa contra el estrés oxidativo, que mantiene los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en un rango fisiológico. Se sabe que la actividad antioxidante disminuye a lo largo de la diferenciación (Gabriele Saretzki et al., 2008; St John et al., 2006; Ufer & Wang, 2011; Winkler et al., 2011), pero la información sobre este sistema de defensa y las CMP aún es escasa, por lo que decidimos estudiar el comportamiento de alguno de sus componentes en el estado indiferenciado y a lo largo del proceso de diferenciación. Nuestra hipótesis es que algunos de los genes modulados durante la diferenciación podrían ser regulados transcripcionalmente por factores de transcripción específicos de células madre pluripotentes.

Búsqueda de genes relacionados con el sistema de defensa frente al estrés oxidativo que puedan ser regulados por los factores de stemness

Teniendo en cuenta evidencias previamente reportadas, comenzamos una búsqueda de genes implicados en la respuesta celular frente al estrés oxidativo, que podrían tener una expresión diferencial en las CMP en estado indiferenciado, en comparación con células diferenciadas. De acuerdo a la hipótesis planteada, en primer lugar elegimos genes candidato en base a la función desempeñada en el sistema de defensa frente al estrés oxidativo de las células, como catalasa (Cat), glutarredoxinas (Glrx), glutatión peroxidasa (Gpx), glutatión reductasa (Gsr), peroxirredoxinas (Prdx), superóxido dismutasa (Sod), tiorredoxinas (Txn) y tiorredoxin reductasas (Txnrd). Una vez seleccionados, analizamos *in silico* la presencia de sitios de unión para factor/es de

transcripción esenciales para mantener el estado indiferenciado, como Oct4, Sox2 y Nanog en sus promotores. Estudiamos las 5000 pb río arriba del sitio +1 de la transcripción, utilizando como herramienta bioinformática el software disponible *on line MatInspector* de *Genomatix*. En la siguiente tabla se detallan los genes seleccionados y la cantidad de sitios de unión putativos encontrados, que contienen la secuencia consenso para estos factores de transcripción:

FT	Región promotora													
	Sod1	Sod2	Prdx1	Prdx2	Gpx1	Gpx4	Cat	Glrx1	Glrx2	Txn1	Txn2	Txnrd1	Txnrd2	Gsr
Oct4	5	8	13	0	5	4	1	9	5	6	8	10	8	8
Nanog	5	6	1	2	4	5	2	1	2	4	1	4	1	8
Sox2	1	3	0	4	1	5	1	3	3	0	1	1	3	1
Stem*	2	2	0	3	3	3	2	1	4	6	1	2	1	1

Tabla R.1. Sitios putativos de unión para factores de transcripción específicos de células madre pluripotentes en las secuencias promotoras de ratón de genes involucrados en la defensa estrés oxidativo.* Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b en células pluripotentes.

Análisis de expresión de los genes candidato

Como podemos observar en la tabla, todos los promotores de los genes analizados presentaron sitios probables de unión para los FT fundamentales para mantener el estado indiferenciado en CMP, por lo que continuamos nuestro estudio evaluando el perfil de expresión de estos genes en el estado indiferenciado y a lo largo de la diferenciación, con el propósito de estudiar si alguno de ellos resulta modulado en este proceso, tanto en CME como en CMPI.

Para este estudio, utilizamos dos líneas comerciales de células madre embrionarias de ratón, la línea de CME R1 y la línea Ainv15, y en una de las líneas de CMPI obtenidas previamente, la línea CMPI-20. Mediante el protocolo de diferenciación no dirigido *in vitro hanging drop*, las CMP generaron cuerpos embrioides que cultivamos en adherencia (Figura R.10), y tomamos muestras a días 0, 4 y 7 para extraer ARNm total para el análisis de los niveles de expresión de los genes en estudio. Las estructuras obtenidas por este protocolo no dirigido contienen diversos tipos celulares, que al

analizarlos como un *pool* nos permite detectar genes cuya expresión haya sido modulada durante el proceso de diferenciación general, y no en un tipo celular particular. De esta manera, este abordaje experimental permite observar diferencias en la expresión de los genes analizados que se deben a una modulación general de su transcripción y no a una regulación linaje-específica.

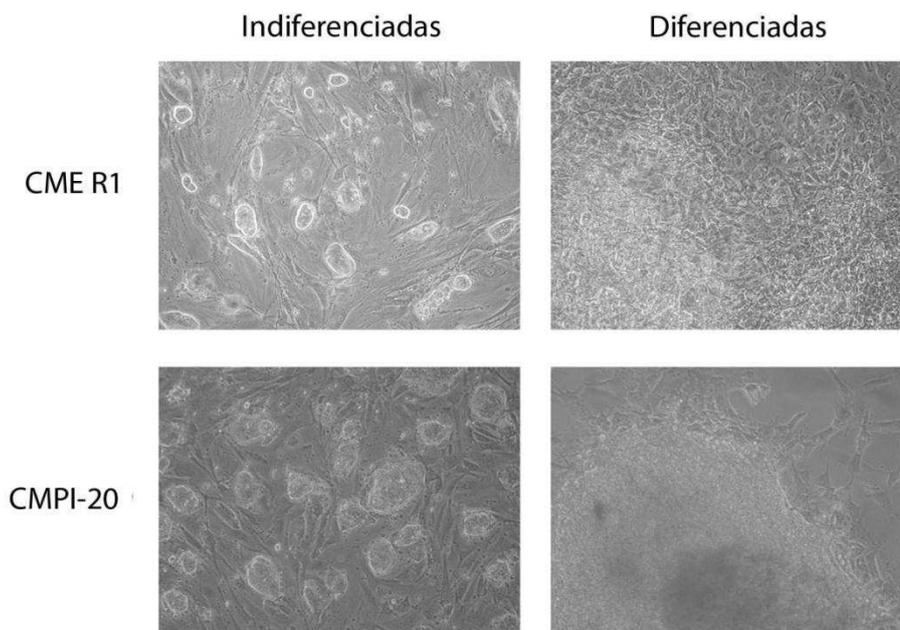


Figura R.10. Imágenes representativas de colonias indiferenciadas (paneles de la izquierda) y de cuerpos embrioides de distintos días post-adherencia, obtenidos mediante el protocolo de diferenciación *hanging drop* (paneles de la derecha), para la línea de CME R1 y CMPI-20. Aumento 100x.

En primer lugar, medimos la expresión de los genes propios del estado indiferenciado Oct4, Sox2 y Nanog a lo largo de la diferenciación mediante RT-qPCR para validar el protocolo de diferenciación utilizado. Relativizamos los resultados al estado indiferenciado, y utilizamos la expresión de Gapdh como gen *housekeeping* para normalizar los niveles de expresión de estos genes. Como esperábamos, la transcripción de estos marcadores de indiferenciación disminuyó a lo largo del proceso

de diferenciación (Figura R.11), demostrando que las células abandonaron el estado indiferenciado.

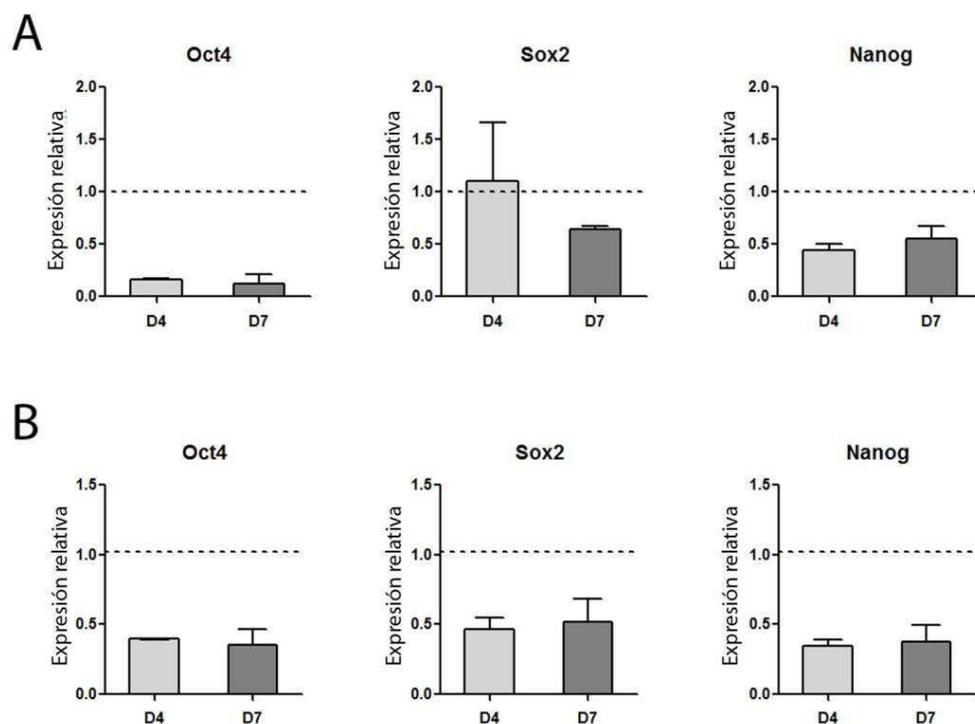
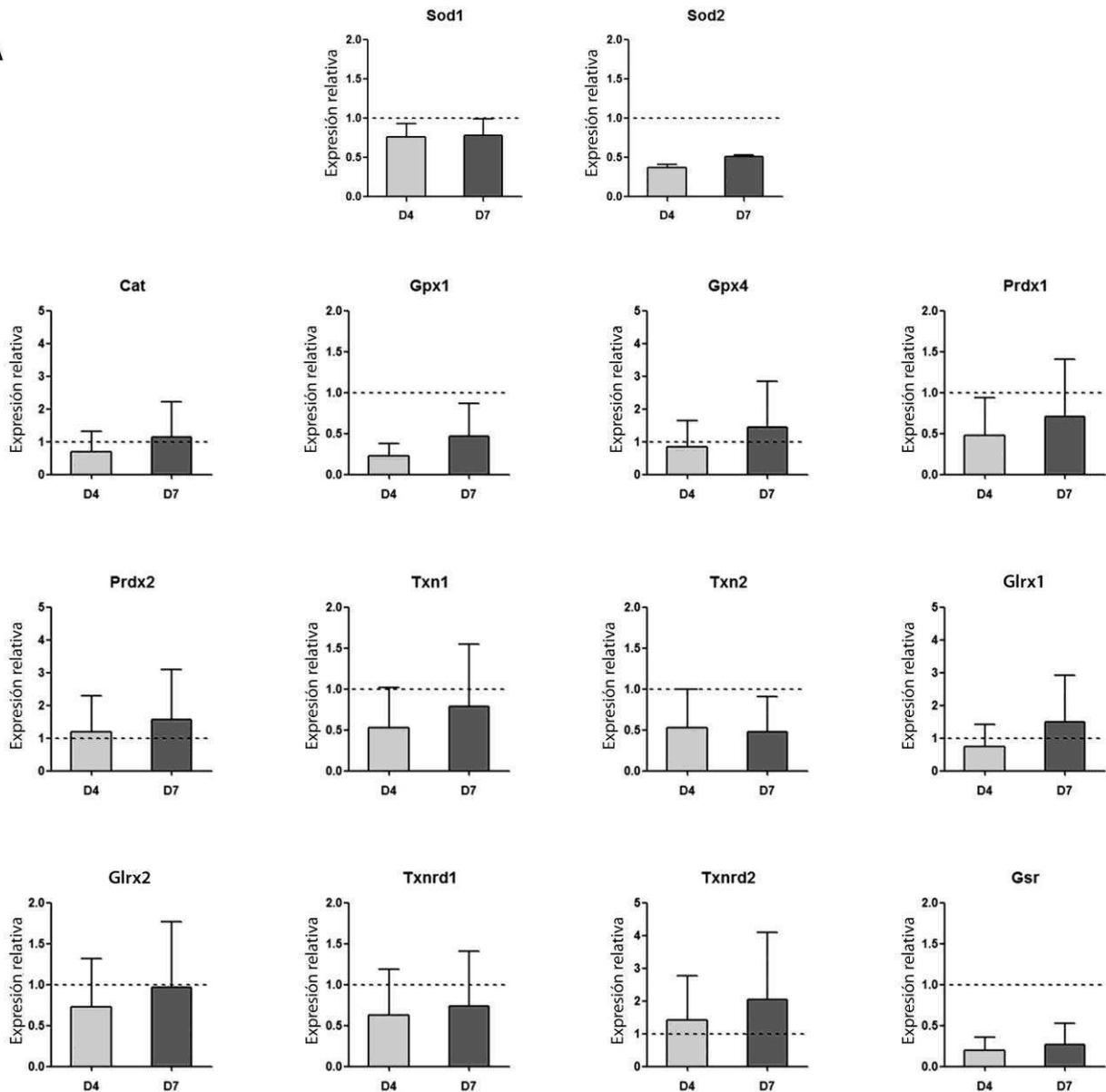


Figura R.11. Nivel de expresión de genes del estado indiferenciado a lo largo de la diferenciación *in vitro* en células madre pluripotentes de ratón. Análisis del perfil de expresión de los genes indicados en (A) línea de CME R1 y (B) línea CMPI-20. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del estado indiferenciado al cual relativizamos los distintos días analizados. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes.

Como paso previo al análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de los 14 genes seleccionados involucrados en el sistema de defensa frente al estrés oxidativo, pusimos a punto las condiciones para realizar RT-qPCR con los *primers* diseñados para este fin. Determinamos las temperaturas de *annealing* adecuadas para cada par de *primers*, y verificamos que en cada reacción de RT-qPCR el producto final sea único y del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa 2%.

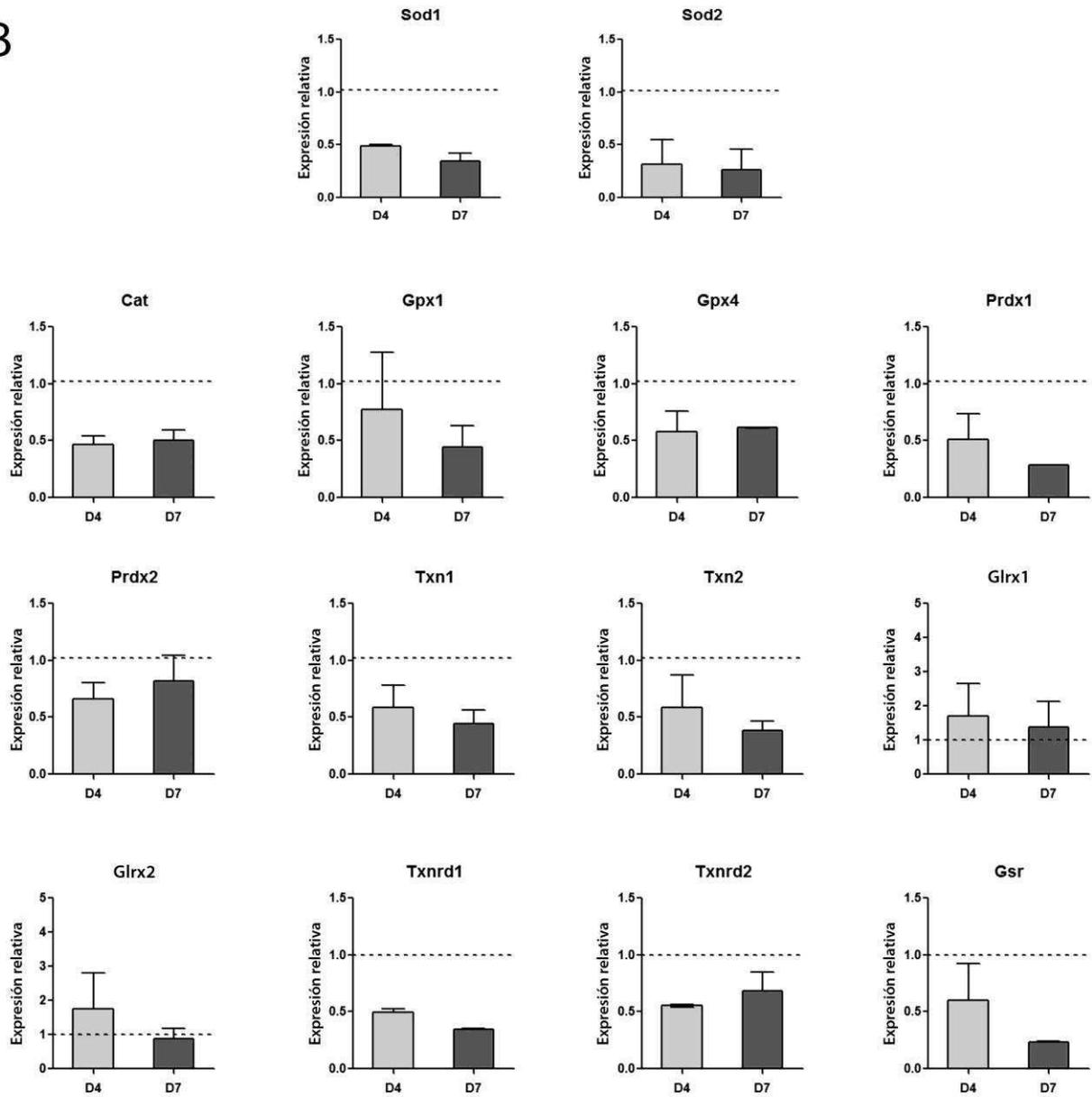
Posteriormente, en las condiciones adecuadas para cada par de *primers*, estudiamos el perfil de los genes involucrados en la defensa frente al estrés oxidativo, y los relativizamos al estado indiferenciado. Nuevamente, utilizamos la expresión de *Gapdh* como gen *housekeeping* para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados (Figura R.12).

A



CME R1

B



CMPI-20

Figura R.12. Niveles de expresión de genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo a lo largo de la diferenciación *in vitro* en células madre pluripotentes de ratón. Análisis del perfil de expresión de los genes indicados en (A) línea de CME R1 y (B) línea CMPI-20. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del estado indiferenciado al cual

relativizamos los distintos días analizados. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de al menos dos experimentos independientes.

Como puede observarse en la figura anterior, encontramos una gran diversidad en los perfiles de expresión de los genes seleccionados para nuestro estudio: algunos genes presentaron su expresión aumentada a lo largo del proceso de diferenciación, como *Glxn1* mientras que otros fueron reprimidos, como *Sod1* y *Sod2*, y en otros casos, algunos genes, como *Txn1*, no mostraron variación en los niveles de transcripción. Es importante mencionar que observamos una alta variabilidad en la expresión de casi todos los genes analizados entre las diferentes réplicas biológicas, incluso dentro de la misma línea celular. Esto sugiere que la expresión de estos genes podría estar influenciada por cada proceso de diferenciación en particular que ocurre en cada ensayo, ya que al ser un protocolo no dirigido presenta alta variabilidad en cada réplica. Aunque no hallamos un perfil definido en la mayoría de los genes evaluados, encontramos que *Sod1* y *Sod2* experimentaron una modulación en su expresión que resultó reproducible en los distintos ensayos. Más aun, al analizar los niveles de ARNm de estos genes a lo largo de la diferenciación en la línea de CME *Ainv15* mediante el mismo protocolo de diferenciación, observamos el mismo perfil de expresión (Figura R.13). Por lo tanto, concluimos que los genes de las superóxido dismutasas 1 y 2 fueron reprimidos durante la diferenciación en todas las líneas de CMP de ratón estudiadas.

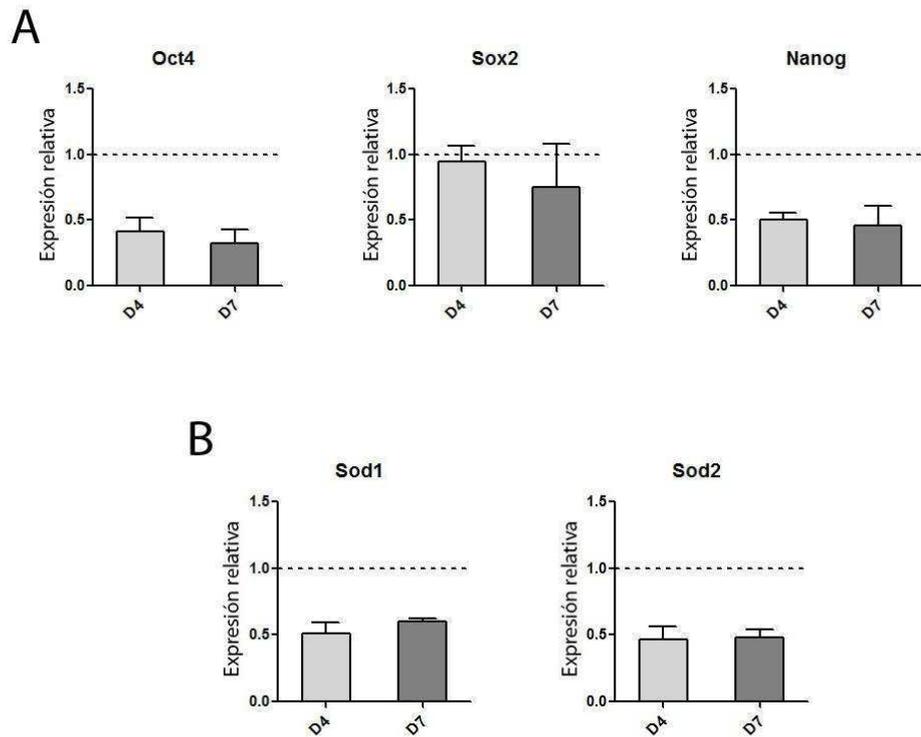


Figura R.13. Nivel de expresión de genes del estado indiferenciado y de los genes Sod1 y Sod2 a lo largo de la diferenciación *in vitro* en CME Ainv15. (A) Análisis de los genes marcadores del estado indiferenciado. (B) Análisis de los genes Sod1 y Sod2. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del estado indiferenciado al cual relativizamos los distintos días analizados. Los resultados se muestran como la media \pm SEM de dos experimentos independientes.

A continuación, decidimos extender nuestro análisis a las células madre embrionarias humanas. Comenzamos analizando *in silico* las regiones promotoras de los genes seleccionados involucrados en el sistema de defensa frente al estrés oxidativo. Nuevamente, utilizamos *MatInspector* para estudiar las 5000 pb río arriba del sitio +1 de la transcripción, y encontramos que todos los promotores de los genes humanos analizados presentaron sitios putativos de unión para los factores de transcripción esenciales para el estado indiferenciado. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla R.2.

<i>Región promotora</i>											
<i>FT</i>	SOD1	SOD2	PRDX1	GPX4	CAT	GLRX	TXN	TXN2	TXNRD1	TXNRD2	GSR
Oct4	0	2	5	1	4	5	11	3	6	4	2
Nanog	2	5	5	2	2	3	2	1	1	1	2
Sox2	3	3	2	1	1	4	3	1	2	1	4
Stem*	2	1	4	3	6	2	0	0	6	1	1

Tabla R.2. Sitios putativos de unión para factores de transcripción específicos de células madre pluripotentes en las secuencias promotoras humanas de genes involucrados en la defensa estrés. * Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b en células pluripotentes.

Con estos resultados, decidimos continuar estudiando los perfiles de expresión de estos genes en el estado indiferenciado y a lo largo de la diferenciación en CME humanas. Para este análisis, trabajamos en colaboración con el grupo de Santiago Miriuka de FLENI. Como modelo de CME utilizamos la línea celular CME WAO9, y generamos CE mediante un protocolo de diferenciación *in vitro* no dirigido para CME humanas. Extrajimos el ARNm total en los días 0, 4 (D4), 7 (D7) y 14 (D14) posteriores a la inducción de la diferenciación. Luego, para validar el protocolo de diferenciación, analizamos los niveles de expresión de los genes marcadores del estado indiferenciado Oct4, Sox2 y Nanog medidos por RT-qPCR, y los relativizamos al estado indiferenciado. Utilizamos la expresión de RPL7 como gen *housekeeping* para normalizar los niveles de expresión de los genes estudiados. Los perfiles fueron los esperados, observando una disminución en la transcripción de estos genes a lo largo de la diferenciación (Figura R.14).

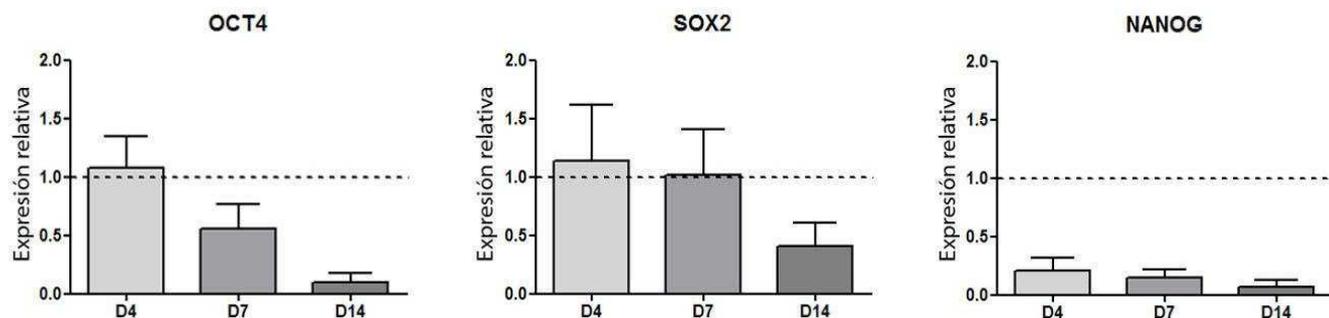


Figura R.14. Nivel de expresión de genes del estado indiferenciado a lo largo de la diferenciación *in vitro* en células madre pluripotentes humanas. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del estado indiferenciado al cual relativizamos los distintos días analizados. Los resultados se muestran como la media y el desvío estándar de al menos dos muestras independientes.

Una vez validado el protocolo de diferenciación, analizamos la expresión de los genes CAT, GLRX, GPX4, GSR, PRDX1, SOD1, SOD2, TXN, TXN2, TXNRD1 y TXNRD2 en cuerpos embrioides derivados de la CME WAO9, de diversos días una vez iniciado el proceso de diferenciación (D0, D4, D7 y D14). Medimos los niveles de expresión de los genes en estudio por RT-qPCR, utilizando los niveles de RPL7 para normalizarlos, y los relativizamos al estado indiferenciado (D0) (Figura R.15).

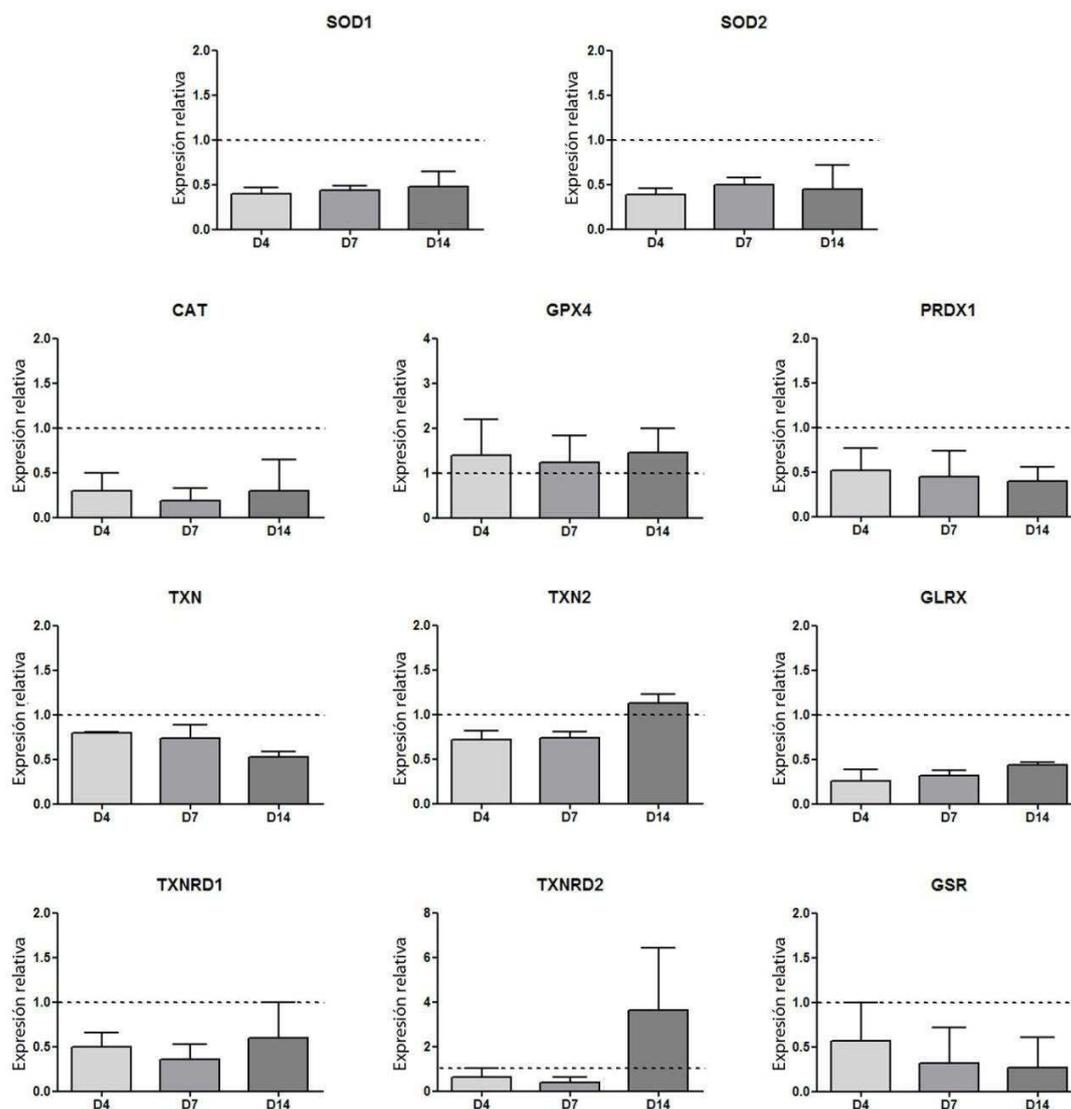


Figura R.15. Niveles de expresión de genes implicados en la defensa frente al estrés oxidativo a lo largo de la diferenciación *in vitro* en células madre pluripotentes humanas. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del estado indiferenciado al cual relativizamos los distintos días analizados. Los resultados se muestran como la media y el desvío estándar de al menos dos experimentos independientes.

Al igual que su contraparte de ratón, las CME humanas mostraron que algunos de los genes seleccionados para nuestro análisis se expresaron diferencialmente en las células indiferenciadas con respecto a CE. En particular, SOD1 y SOD2 al igual que lo que observamos en las CME y CMPI de ratón, fueron reprimidos durante la diferenciación. Los genes CAT, PRDX1, GLRX, TXN, TXNRD1, GSR también mostraron

una disminución en su expresión a lo largo de la diferenciación en todos los ensayos realizados. Por otro lado, GPX4 mostró un comportamiento diferente en cada réplica biológica, lo que sugiere que su expresión depende en particular de cada proceso de diferenciación no dirigido.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los diferentes genes estudiados involucrados en la defensa estrés oxidativo celular, tanto en CME y CMPI de ratón, como en CME humanas, el patrón de expresión de los genes Sod1 y Sod2 fue consistentemente modulado durante el proceso de diferenciación.

Para continuar con el estudio del comportamiento de los genes de las superóxido dismutasas 1 y 2, y estudiar su respuesta a los factores de transcripción de pluripotencia, analizamos su expresión en la línea de CME R1 en condiciones de cultivo que modulan los niveles de estos factores. Cultivamos estas células durante 4 días en condiciones estándar en presencia de LIF como condición control, y en medio estándar en ausencia de LIF, con el propósito de disminuir la expresión de dichos factores. Extrajimos ARN total y comparamos los niveles de expresión de los genes propios del estado indiferenciado Oct4, Nanog y Sox2, y de los genes en estudio, Sod1 y Sod2, medidos por RT-qPCR y los normalizamos teniendo en cuenta los niveles de ARNm de Gapdh utilizado como *housekeeping*. Relativizamos los resultados obtenidos a la condición control. Como se muestra en la Figura R.16, la expresión de los genes analizados disminuyó al cultivar las CME en ausencia de LIF en comparación con células mantenidas con LIF. Si bien detectamos una tendencia a disminuir en los perfiles de expresión de Oct4, Sox2 y Sod1, la diferencia con respecto a la condición control no mostró significancia estadística. Por otro lado, la represión observada en los niveles de ARNm de Sod2 y de Nanog fue estadísticamente significativa.

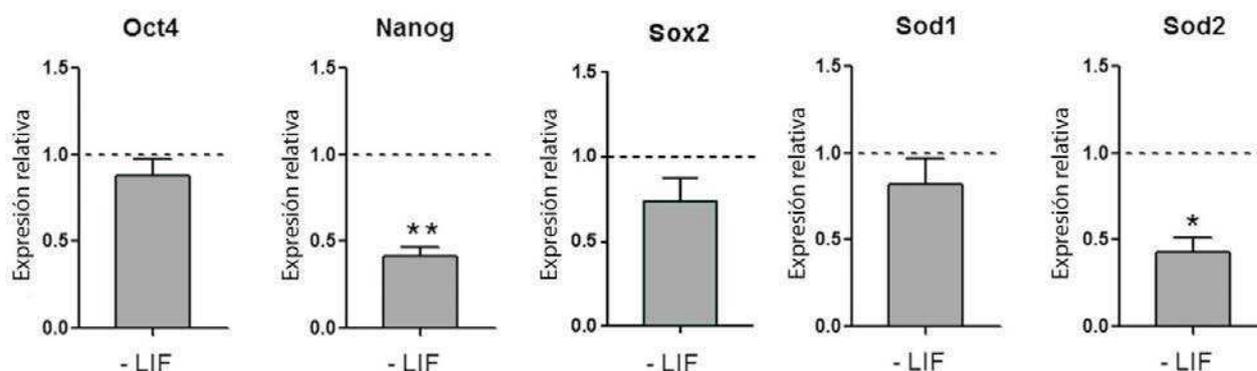


Figura R.16. Perfil de expresión de diversos genes en presencia y ausencia de LIF. Análisis de los niveles de ARNm de Oct4, Nanog, Sox2, Sod1 y Sod2 en la línea de CME R1. La línea punteada corresponde al nivel de expresión del gen indicado en células cultivadas en presencia de LIF (control). Los resultados se muestran como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Estudio de la regulación ejercida por los factores de transcripción sobre el gen Sod2

Dada la respuesta que observamos en el perfil de expresión del gen Sod2 en los distintos ensayos en los que modulamos la expresión de los FT esenciales en el estado indiferenciado, decidimos continuar nuestro estudio centrándonos en la regulación de este gen, evaluando nuestra hipótesis: los factores fundamentales del estado pluripotente son responsables de la regulación transcripcional de Sod2. Para esto nos propusimos abordar el estudio mediante dos estrategias experimentales complementarias y basadas en sistemas más definidos. Una de ellas consistió en la construcción de un vector reportero para evaluar regiones acotadas del promotor de Sod2. La otra estrategia se basa en el análisis de la expresión del gen endógeno en CME con disminución de la expresión de los FT mediante una estrategia de *shRNA*.

Estudio de la actividad del promotor de Sod2 mediante una construcción reportera

En la tabla R.3 mostramos la ubicación de los sitios de unión probables para los FT Oct4, Sox2 y Nanog en un fragmento de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen Sod2, esquematizado en la Figura R.17. Basándonos en esta información, diseñamos *primers* para clonar determinadas regiones del promotor que contienen los diferentes sitios predichos de unión de los factores de pluripotencia, y generar construcciones que expresen el gen reportero de luciferasa bajo el control de estas regiones. Estos *primers*, además de hibridizar con las regiones de interés, incluyen las secuencias de corte para las enzimas de restricción necesarias para el clonado en el vector pGL3.

Factor de transcripción	# Sitio de unión probable	Posición		Secuencia
		Desde	Hasta	Mayúsculas: secuencia central
Oct4	8	546	564	aatgtttCCATaacaatta
		893	911	tccattaTCATtaaggtgg
		1200	1218	gcattttGCATtatgctat
		1961	1979	atcctttGCATgaccctt
		2295	2313	ctcttatACATtaccagt
		2421	2439	tacttaaTCATtactagtt
		2630	2648	gatctctGCATtcaaggtc
		4597	4615	agcatcaGCATgtctcaca
Nanog	6	579	597	tctacttAATGggtttatg
		1041	1059	tggttggAATGggtgtgtc
		1093	1111	gccagggAATGgcaccatc
		3133	3151	ggggcttAATGggtcatcc
		3234	3252	accagggAATGgcaccatc
		4769	4787	ctctctgAATGtgtatgcc
Sox2	3	2902	2926	cattgACAAaggaagttcaaaaaa
		3104	3128	cagcaACAAagtcttccatattcct
		4574	4598	ctgggACAAagaatggtgctgacat
Stem*	2	3783	3801	aatttcaGCATtacaatc
		4788	4806	ttccttgGCATccaaattt

Tabla R.3. Ubicación de los sitios de unión probables para los FT Oct4, Sox2 y Nanog en un fragmento de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen Sod2. * Sitio de unión compuesto para Oct4, Sox2, Nanog, Tcf3 (Tcf7l1) y Sall4b en células pluripotentes.

Como primer paso, pusimos a punto las condiciones para amplificar los distintos fragmentos del promotor de Sod2 con los *primers* diseñados para este fin. Determinamos las temperaturas de *annealing* adecuadas para cada par de *primers*, si era necesario el uso de DMSO en las reacciones de PCR, y verificamos que en cada reacción el producto final sea único y del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

Si bien diseñamos *primers* para clonar tres fragmentos que contengan distintos sitios de unión para los FT, para así evaluar si la presencia o combinación de estos sitios tienen algún efecto en la regulación del gen reportero (Figura R.17), en este trabajo de tesis evaluamos la actividad del primer fragmento. En este momento, estamos estudiando otra de las construcciones que contiene un fragmento de mayor tamaño, abarcando más sitios. Asimismo planeamos realizar y estudiar la tercera construcción reportera.

Clonamos un fragmento de 1142 pb del promotor de Sod2 en el vector pGL3-Basic que carece de un promotor, pero contiene un sitio de clonado múltiple río arriba de la secuencia que codifica para la enzima luciferasa de *Photinus pyralis*. Esto permite evaluar si estas secuencias en estudio cumplen algún papel en la regulación sobre el nivel de transcripción del gen reportero (Figura R.18). Comprobamos el clonado correcto de la secuencia de interés por digestión y por secuenciación como se describió en Materiales y Métodos. Denominamos al vector generado pSod2.1-luc.

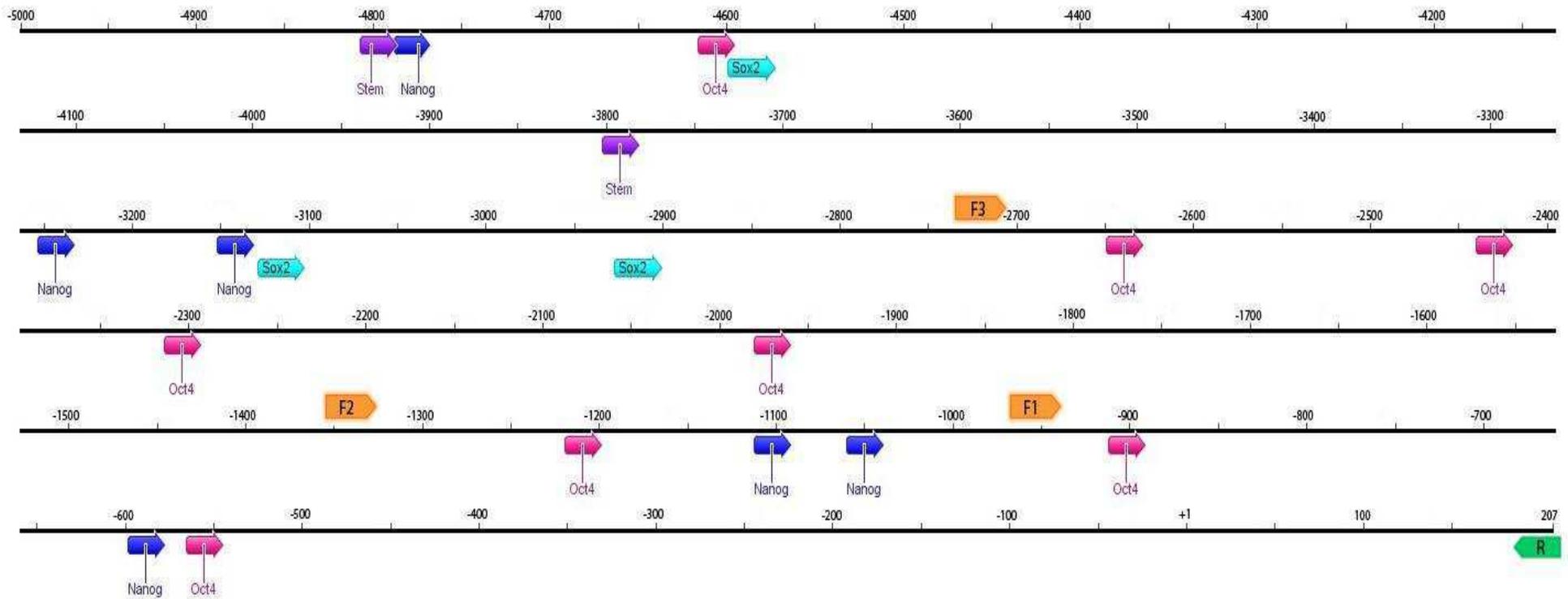


Figura R.17. Esquema de la ubicación de los sitios de unión probables para los FT Oct4, Sox2 y Nanog en un fragmento de 5000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción del gen de Sod2. Además se muestra la posición de los *primers* diseñados para el clonado de los distintos fragmentos.

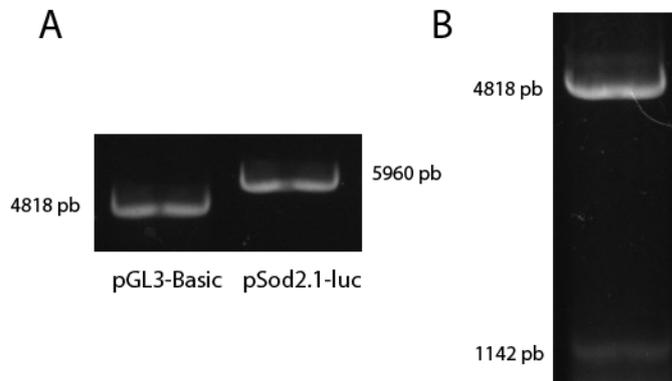


Figura R.18. Verificación del clonado del fragmento del promotor de Sod2 en el vector pGL3-Basic mediante digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en gel de agarosa 0,8 %. Bandas correspondientes a (A) vector pGL3-Basic vacío y vector con el fragmento de 1142 pb clonado (pSod2.1-luc) digeridos con Mlul, (B) vector pSod2.1-luc digerido con Mlul y XhoI.

A continuación, realizamos un ensayo de trans-activación utilizando la línea celular MEF SNL. Transfectamos estas células con el plásmido pSod2.1-luc conjuntamente con el vector pRL-TK, que codifica para enzima luciferasa de *Renilla reniformis*, cuya actividad se utiliza para normalizar los niveles de transfección. Para evaluar si los FT Nanog y Oct4 estimulan la transcripción del gen reportero en la construcción generada, co-transfectamos las células con un vector de expresión de cada uno de los factores. Como se muestra en la Figura R.19, tanto Nanog como Oct4 indujeron la expresión de la luciferasa con respecto a la situación basal, sin co-transfección de vector de expresión, lo que indica que ambos FT estimulan la transcripción de la región promotora de Sod2 clonada en este vector.

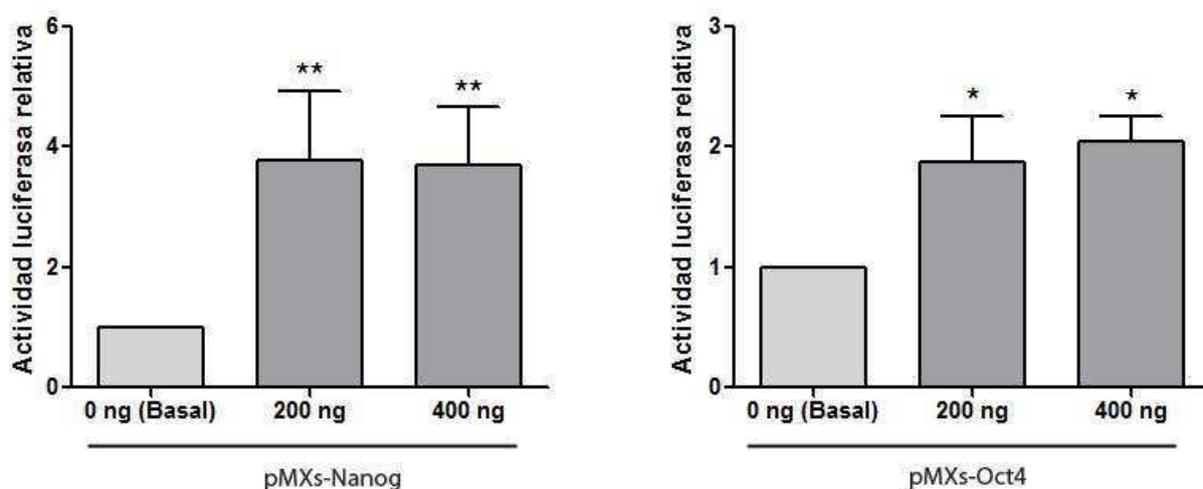


Figura R.19. Análisis de la actividad de luciferasa de la construcción reportera. Análisis de la actividad de luciferasa *Photinus pyralis* de pSod2.1-luc, normalizada a la actividad de luciferasa de *Renilla reniformis*. Células MEF SNL fueron transfectadas con pSod2.1-luc, pRL-TK y 200 o 400 ng de los vectores pMXs-Nanog o pMXs-Oct4, según se indica. El resultado se muestra como la media \pm SEM de cuatro experimentos independientes. ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Estudio de la modulación de Sod2 en condiciones de silenciamiento de Oct4 o Nanog

A continuación, analizamos la expresión del gen Sod2 en la línea CME R1 transfectadas con vectores para disminuir específicamente la expresión de Oct4 o Nanog mediante la estrategia de *shRNA*. Este abordaje, a diferencia de la construcción reportera, nos permite estudiar la respuesta del promotor en su contexto genómico. A las 24 horas de ser transfectadas, tratamos a las células con puromicina, con el fin de seleccionar aquellas que fueron transfectadas, debido a que el vector confiere resistencia a este antibiótico. Luego de 48 horas, extrajimos ARN total y analizamos la expresión de los genes Oct4 y Nanog, para evaluar si efectivamente su expresión disminuyó, como consecuencia de la transfección con los vectores expresa *short hairpin RNAs* dirigidos contra éstos, validando de esta manera el abordaje experimental. En la figura R.20 mostramos la reducción de sus niveles de expresión comparados con los medidos en el control, en el que transfectamos las CME con un vector que expresa un *shRNA* dirigido contra GFP (GFPi). Además, se muestra otra

condición control donde transfectamos con el vector donde están clonados los *shRNA*, pero vacío (pLKO.1). Por otro lado, observamos que el nivel de transcripto de Nanog disminuyó al transfectar con el *shRNA* para Oct4. Luego, habiendo verificado el funcionamiento del sistema, analizamos la expresión de Sod2 a nivel transcripcional. En las células transfectadas con el *shRNA* para Oct4, Sod2 disminuyó su expresión de manera significativa. Por otra parte, si bien no encontramos diferencias significativas respecto de los controles en las células transfectadas con el *shRNA* para Nanog, observamos una tendencia a reducir su cantidad ARNm.

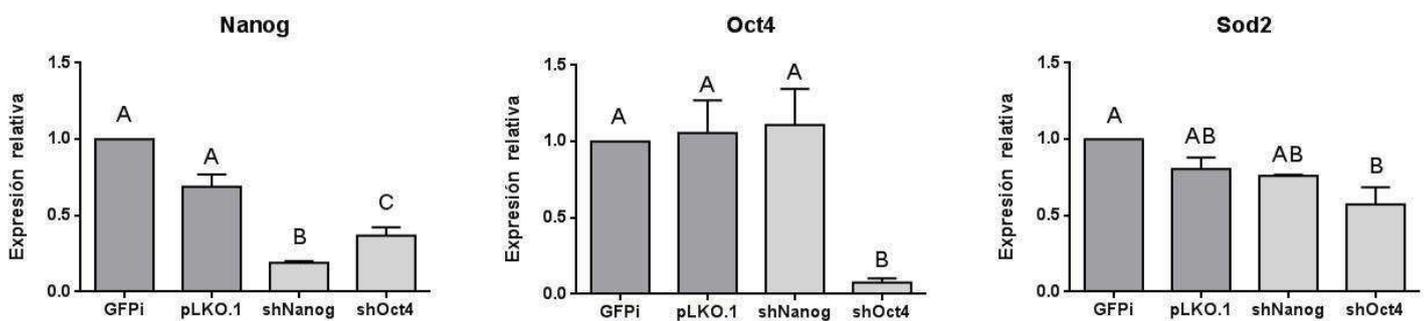


Figura R.20. Nivel de expresión de Nanog, Oct4 y Sod2 en la línea de CME R1 transfectada con vectores para disminuir específicamente la expresión de Oct4 o Nanog mediante la estrategia de *shRNA*. Relativizamos los resultados al control transfectado con GFPi, y utilizamos la expresión de Gapdh como gen *housekeeping* para normalizar los niveles de expresión de los genes analizados. En la parte de superior de cada panel se indica el gen cuya expresión se está analizando y en la parte inferior, debajo de cada barra, se indica el vector con el que fueron transfectadas las células. El resultado se muestra como la media \pm SEM de tres experimentos independientes. Letras distintas representan diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Discusión

Desde su derivación hace varias décadas, las CME revolucionaron el campo de las células madre, atrayendo el interés de la comunidad científica debido a su potencial de generar múltiples tejidos de interés terapéutico, lo que las convierte en una herramienta promisorio para el desarrollo de tratamientos en el campo de la medicina regenerativa. Hace algunos años, el desarrollo de las CMPI mediante la desdiferenciación de células somáticas hacia un estado de pluripotencia, generó un cambio profundo en el conocimiento de este campo de investigación. Ambos tipos de células pluripotentes presentan características comunes, razón por la que las CMPI podrían sustituir a las CME en la clínica, debido a la importante ventaja de la posibilidad de desarrollar CMPI a partir de células del propio paciente, evitando el problema de rechazo por falta de histocompatibilidad. Si bien, desde el desarrollo de las CMPI hubo grandes avances en el área que permitieron conocer parte de los mecanismos involucrados en la reprogramación celular, aún quedan aspectos bioquímicos y moleculares que requieren ser estudiados con mayor profundidad, como los mecanismos por los que se modifica la estructura de la cromatina y la expresión génica que determinan el cambio de fenotipo celular. Actualmente, los esfuerzos se concentran en importantes cuestiones respecto a la bioseguridad para su aplicación y la eficiencia en su obtención y su diferenciación al tipo celular de interés, para su futura aplicación en la clínica.

Con el objetivo de generar una nueva herramienta para el estudio de los mecanismos moleculares que tienen lugar en células madre pluripotentes, en este trabajo de tesis establecimos líneas de CMPI a partir de MEF. Para esto, transdujimos estas células terminalmente diferenciadas utilizando un vector que codifica para los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Klf4, y evaluamos distintas condiciones para realizar dicha transducción. El protocolo original de Yamanaka incluía c-Myc, además de estos factores, pero en vistas de generar CMPI más seguras, este oncogen fue el primero en dejar de ser utilizado. Ha sido reportado que se producía una reactivación del transgen de c-Myc utilizado para generar las CMPI, lo que contribuía a la formación de tumores en ratones quimera derivados de esas CMPI. Por otro lado, las MEF expresan de forma endógena este gen en un 20% respecto a las CME, por lo que los

factores Oct4, Sox2 y Klf4 transducidos reclutarían la proteína c-Myc endógena para inducir la reprogramación celular. Si bien, es posible reprogramar células sin c-Myc, la eficiencia de reprogramación es más baja (<0,001%) y la aparición de las colonias es más lenta (Nakagawa et al., 2008). Para mejorar la eficiencia de reprogramación se han incorporado a los protocolos utilizados distintas moléculas involucradas en modificar la cromatina, como 5'-azacitidina, que es un inhibidor de ADN metiltransferasa, butirato de sodio y ácido valproico, inhibidores de deacetilasas de histonas (Huangfu, Maehr, et al., 2008; Huangfu, Osafune, et al., 2008; Mali et al., 2010). Este último compuesto incrementa la eficiencia de reprogramación más de 50 veces al usar sólo los tres FT sin c-Myc en comparación con MEF reprogramadas sin tratamiento (Huangfu, Maehr, et al., 2008). Esto demuestra que es necesario que ocurra una remodelación global de la cromatina como parte del proceso de reprogramación, siendo más favorable una cromatina relaja o abierta para el acceso de los factores de reprogramación a sus genes *target*. Actualmente, la búsqueda de pequeñas moléculas que favorezcan la eficiencia de reprogramación y que puedan reemplazar uno o más factores es intensa, ya que tiene como objetivo generar de manera más práctica y segura CMPI aplicables a la clínica. En un trabajo de Zang y colaboradores del año 2014, demuestran que el uso de butirato de sodio impide que Oct4 interactúe con una deacetilasa de histonas y facilita la reprogramación celular, debido a que favorece la expresión del *cluster* miARN 302-367, que ha sido reportado que incrementa la reprogramación y sustituye a c-Myc, e incluso es capaz de reprogramar directamente células humanas (Zhang, Xiang, & Wu, 2014). En nuestro protocolo utilizamos ácido valproico para favorecer la eficiencia de reprogramación. Además usamos polibreno, un compuesto cargado positivamente que permite la agregación de las partículas lentivirales y evita la repulsión entre éstas y la superficie de la célula, ambas cargadas negativamente (H. E. Davis, Rosinski, Morgan, & Yarmush, 2004). También, incluimos el paso de *spinfection* que aumenta la eficiencia de transducción (Berggren, 2012). Transcurridos 15 días posteriores a la transducción, observamos colonias que presentaron una morfología similar a la de las CME y expresaron los marcadores específicos del estado indiferenciado Oct4, Sox2, Nanog, SSEA-1 y Rex1, entre otros. La expresión de este último gen es uno de los indicadores de que las CMPI obtenidas son completamente reprogramadas y están en el estado basal o *naive* (Nichols & Smith, 2009; Matthias

Stadtfeld & Hochedlinger, 2010). Por otro lado, el vector utilizado para reprogramar codifica para la proteína fluorescente roja, mCherry. La posición secuencial de los genes en este vector permite que la detección de fluorescencia sea un indicador de la expresión del resto de los genes, dado que el gen reportero está ubicado al final del transcrito policistrónico. Observamos su expresión en las colonias, lo que confirma la integración del vector al genoma de las células reprogramadas. Con el transcurso de algunos pasajes, dejamos de detectar fluorescencia, evidenciando el silenciamiento de los transgenes. Este silenciamiento es un proceso que en general se espera que ocurra para la obtención de CMPI completamente reprogramadas, dado que aquellas que no silencian los transgenes, suelen ser refractarias a ser diferenciadas (Fussner et al., 2011; Ramos-Mejía et al., 2012). En nuestro caso, las células obtenidas mostraron ser pluripotentes, ya que fueron capaces de originar cuerpos embrioides y teratomas que contenían células de endodermo, mesodermo y ectodermo. En conjunto estos resultados indican que reprogramamos MEF generando CMPI exitosamente.

Una vez validadas, utilizamos las CMPI en distintas líneas de trabajo del laboratorio. En una de estas líneas, comprobamos que el MC por la línea celular BGC-1 era capaz de mantener la auto-renovación y la pluripotencia de las CME. Debido a la semejanza de las CMPI con las CME, evaluamos si podíamos cultivar y propagar las CMPI de ratón en este MC preservando sus propiedades fundamentales. Para esto, cultivamos las CMPI obtenidas en el MC y analizamos la morfología y la expresión de marcadores propios del estado indiferenciado, observando la morfología típica de las CME cultivadas en medio estándar y detectando Oct4, Sox2, Nanog y SSEA-1, entre otros. También comprobamos la pluripotencia de las células mantenidas en MC, dado que generaron CE y teratomas que presentaron células de las tres capas germinales. Al haber demostrado que dicho MC es capaz de mantener en cultivo a las CMPI, extendimos los resultados previamente encontrados para CME a otro tipo de CMP, con lo cual constituye el MC como un contexto favorable para propagar CMP preservando sus propiedades básicas: la auto-renovación y pluripotencia.

Finalmente, habiendo adquirido la capacidad de generar CMPI, planeamos reprogramar MEF de ratones genéticamente modificados, mediante trabajo en colaboración con otros grupos de investigación. Esperamos poder concretar la obtención de células pluripotentes a partir de estos modelos de estudio y proporcionar una herramienta útil también para otros grupos.

En la segunda parte de este trabajo de tesis nos abocamos al estudio de regulación transcripcional en CMP de las proteínas del sistema antioxidante con el que cuenta la célula para modular las ROS. Las ROS, generadas principalmente por la respiración mitocondrial, son importantes en el mantenimiento de las funciones celulares. Durante el desarrollo embrionario ocurren cambios en el metabolismo, siendo esencialmente oxidativo en el cigoto, cobrando importancia paulatinamente la glucólisis y finalmente, después de la implantación del blastocisto, comienza la replicación de las mitocondrias y aumenta la expresión y actividad de los distintos componentes de la cadena respiratoria favoreciendo la fosforilación oxidativa (Folmes et al., 2012; Ufer & Wang, 2011; W. Zhou et al., 2012). En este mismo sentido, durante el proceso de reprogramación, las células somáticas cambian su metabolismo desde un estado oxidativo a uno glucolítico, y este cambio es crítico para generar CMPI de manera rápida y eficiente (Panopoulos et al., 2012). Ha sido reportado que tanto la hipoxia, la interrupción de la cadena respiratoria como el uso de compuestos que activan o favorecen la glucólisis facilitan la reprogramación celular, mientras que si se inhibe la glucólisis y/o se estimula el metabolismo oxidativo, se impide la reprogramación (Folmes et al., 2012; Son, Jeong, Kwon, & Cho, 2013; X. Xu et al., 2013). Por otro lado, si se impide el correcto funcionamiento de la cadena de transporte de electrones, se imposibilita la diferenciación celular. Todos estos resultados evidencian la importancia del metabolismo y de la producción de ROS en un rango fisiológico adecuado para los requerimientos de cada momento. Además, muestra un rol fundamental de estas moléculas tanto en la diferenciación como en la desdiferenciación celular, ya que una pequeña variación en el contenido de ROS puede tener grandes efectos en el destino celular. Más aun, es necesario mantener distintos niveles de ROS para mantener el estado de pluripotencia o para inducir la

diferenciación dependiendo del tipo de célula madre (Bigarella et al., 2014). Asimismo, un trabajo muestra que existe un aumento de la producción de ROS durante la reprogramación (Ji et al., 2014), por lo que las células deben contar con la maquinaria necesaria para asegurar la estabilidad genómica. Las CME y las CMPI poseen mecanismos complejos y coordinados que garantizan el mantenimiento de la estabilidad genómica, como un sistema exacerbado de reparación del ADN y de defensa frente al estrés oxidativo (Armstrong et al., 2010; Y M Cho et al., 2006; Gabriele Saretzki et al., 2008; Gabriele Saretzki, Armstrong, Leake, Lako, & von Zglinicki, 2004; Stambrook, 2007). Este último sistema está conformado por múltiples enzimas y proteínas no catalíticas que trabajan conjuntamente para preservar el equilibrio de óxido-reducción celular. Aunque estos componentes han sido ampliamente estudiados durante muchos años, y se ha reportado que la actividad de defensa antioxidante disminuye durante la diferenciación (G Saretzki et al., 2004; Gabriele Saretzki et al., 2008), aún es escasa la información sobre los mecanismos implicados en la regulación de la transcripción de los componentes del sistema.

Durante este trabajo estudiamos el patrón de expresión génica de algunos de los componentes del sistema de defensa frente al estrés oxidativo en las CME y CMPI en el estado indiferenciado y durante la diferenciación. Seleccionamos y analizamos un grupo de catorce genes bajo la hipótesis de que algunos de éstos son regulados a nivel transcripcional por los factores de transcripción críticos para las células madre pluripotentes, Oct4, Sox2 y/o Nanog. Esto surge de la idea de que las CME y las CMPI representan un estadio del desarrollo donde es fundamental preservar y asegurar la integridad del genoma, dado que a partir de estas células derivan todos los tipos celulares, incluso la línea germinal, y una mutación en este estadio podría acarrear grandes problemas.

Seleccionamos genes que codifican para proteínas relevantes de diferentes grupos funcionales pertenecientes al sistema de defensa antioxidante. Decidimos estudiar el sistema glutatión / tiorredoxina, dado que el glutatión es el principal *buffer* de los grupos tiol-disulfuro de la célula (Schafer & Buettner, 2001). Dentro de este sistema estudiamos a la glutatión reductasa, la tiorredoxina 1, que es esencial en la embriogénesis y su ausencia no permite la proliferación del MCI (Matsui et al., 1996), y

la tioredoxina 2 y las tioredoxin reductasas, que también resultaron ser relevantes durante la embriogénesis (Jakupoglu et al., 2005; Nonn, Williams, Erickson, & Powis, 2003). Hemos considerado interesante estudiar el comportamiento de otras enzimas implicadas en el sistema de defensa como glutarredoxinas, fundamentales para el progreso del ciclo celular durante la embriogénesis (Chen et al., 2008), las superóxido dismutasas 1 y 2, y distintas peroxidases, como la catalasa, glutatión peroxidasa (Gpx) 1 y 4, y peroxirredoxinas 1 y 2. La expresión de varios genes del sistema glutatión / tioredoxina y otros relacionados con la defensa frente al estrés oxidativo es modulada durante el proceso de diferenciación (Armstrong et al., 2010; Y M Cho et al., 2006; G Saretzki et al., 2004; Gabriele Saretzki et al., 2008). Por ejemplo, se ha reportado que algunas Gpx, como Gpx2, son reprimidas durante la diferenciación tanto de las CME de ratón (G Saretzki et al., 2004), como en CME humanas (Gabriele Saretzki et al., 2008). También ha sido reportado que la expresión de la glutatión reductasa (Gsr), que restaura el glutatión reducido que fue oxidado por Gpx, disminuye a lo largo de la diferenciación, tanto en CME y CMPI humanas (Armstrong et al., 2010; Gabriele Saretzki et al., 2008). Otro grupo analizó el nivel de expresión de proteínas en lugar de los ARNm durante la diferenciación de CME humanas, y observó una disminución de expresión de catalasa y un aumento en la expresión de PRDX2, que se condice con la tendencia reportada a nivel de ARNm en el proceso de diferenciación en CME de ratón. (Y M Cho et al., 2006; Gabriele Saretzki et al., 2004). Sobre la base de estas evidencias, analizamos las regiones promotoras de los catorce genes seleccionados, en busca de sitios de unión probables para los factores de transcripción Oct4, Nanog y/o Sox2. Todos ellos poseían al menos algún sitio en la región analizada, que si bien no necesariamente son sitios funcionales, tienen la posibilidad de ser regulados por estos FT. A continuación investigamos el perfil de expresión de los genes elegidos del sistema de defensa frente al estrés oxidativo en las CME y CMPI en el estado indiferenciado y durante la diferenciación. Buscamos focalizar en aquellos genes cuyos niveles de expresión mostraban un patrón similar a los niveles de ARNm de los factores de transcripción mencionados. El perfil de la mayoría de los genes analizados no mostró este tipo de patrón, ni tampoco un perfil consistente en las distintas réplicas realizadas, incluso entre las de una misma línea celular. Esto puede deberse a la variabilidad del sistema de estudio, ya que los protocolos de diferenciación utilizados

no son dirigidos a ningún tipo celular en particular. Es decir, que sólo podemos evidenciar un comportamiento consistente y constante que sea a nivel poblacional, porque de otra manera se diluye en la población. De todos modos, en nuestra búsqueda de genes relevantes para el mantenimiento del estado indiferenciado, este tipo de protocolo es de suma utilidad, ya que si bien, en las diferentes réplicas y en distintas zonas de la placa de cultivo, debido a mínimas variaciones en el contexto celular, pueden obtenerse variedad de tipos celulares, en todos los casos las células dejan de estar en el estado indiferenciado. A pesar de la gran variabilidad en la respuesta presentada por los diferentes genes analizados, encontramos que tanto Sod1 como Sod2 se reprimieron consistentemente en las múltiples réplicas durante los procesos de diferenciación, tanto en CME de ratón y humanas, como en CMPI de ratón.

Sod2 es una enzima mitocondrial que convierte el anión superóxido en peróxido, que es sustrato para Prdxs y Gpxs, que a su vez producen H₂O como un producto final. Está reportado que ratones Sod2 ^{-/-} presentan un daño cardiovascular severo, complicaciones a nivel hepático, y además muerte postnatal (Melov et al., 1999). Esto demuestra un rol de importancia durante el desarrollo embrionario. Por otro lado, un grupo de investigación había reportado que la expresión de Sod2 es reprimida durante la diferenciación de CME de ratón mediante el análisis de un *array* de expresión. Este grupo evaluó la expresión a día 4 de diferenciación utilizando un protocolo diferente de los que utilizamos en esta tesis, particularmente confirman la diferenciación hacia el linaje de mesodermo y hematopoyético. (Gabriele Saretzki et al., 2004). El mismo grupo demostró que esta modulación también ocurre en CME y CMPI humanas, pero otro grupo que analizó a nivel proteico varias enzimas del sistema antioxidante en CME humanas, reportó únicamente una sutil variación de SOD2 (Armstrong et al., 2010; Young Min Cho et al., 2006; Gabriele Saretzki et al., 2008). Es importante mencionar que las CME humanas representan un estadio posterior que el de las CME de ratón, y cuentan con diferencias en su metabolismo, siendo en las CME humanas más glucolítico, mientras que las CME de ratón tienen un metabolismo mixto (Folmes et al., 2012; Teslaa et al., 2014; W. Zhou et al., 2012). Es por esto también que presentan un mayor potencial de membrana, a pesar de tener mitocondrias más inmaduras

(Bigarella et al., 2014). Sin embargo, son más activas que las de las CME humanas o las CMEpi debido a que estas últimas tienen una menor expresión del complejo IV de la cadena respiratoria (W. Zhou et al., 2012).

En este trabajo de tesis, mediante dos protocolos de distintos de diferenciación, en los que disminuye la expresión de los FT de pluripotencia, ya sea mediante la diferenciación por *hanging drop* mencionada o por diferenciar las CMP en adherencia y ausencia de LIF, observamos que el patrón de expresión de Sod2 fue similar al mostrado por Nanog. Por esta razón, nos propusimos en este trabajo estudiar con mayor profundidad la regulación de este gen. Para ello, decidimos utilizar dos abordajes experimentales complementarios, donde las condiciones de los sistemas analizados sean más definidas que en los protocolos de diferenciación. Para el primer abordaje generamos un vector con una construcción reportera para evaluar determinadas regiones del promotor de Sod2. Mediante el segundo diseño experimental redujimos la expresión los FT Nanog y Oct4 mediante una estrategia de *shRNA* y analizamos la expresión del gen endógeno en CME.

Como mencionamos, en nuestro primer abordaje, realizamos el clonado de distintos fragmentos del promotor de Sod2 que incluyen tanto sitios para Oct4 como para Nanog, río arriba del gen de luciferasa. En este trabajo de tesis, estudiamos en particular una de las construcciones generadas, pSod2.1-luc. Realizamos ensayos de trans-activación en un sistema celular que no expresa de manera detectable los factores de transcripción Oct4, Sox2 y Nanog. De manera consistente con los resultados obtenidos en sendos protocolos de diferenciación, el factor de transcripción Nanog indujo la actividad del fragmento del promotor de Sod2 evaluado en la construcción reportera. Más aún, no sólo el FT Nanog indujo la expresión de manera significativa, sino también el factor Oct4, evidenciado por un aumento en la actividad relativa de luciferasa.

Por otro lado, mediante nuestro abordaje complementario, analizamos los niveles endógenos de Sod2 en células de la línea de CME R1 transfectadas con vectores a partir de los que se producen *shRNAs* dirigidos contra el ARNm de Nanog o de Oct4. Si bien este abordaje no permite el estudio de una región en particular del promotor

como la estrategia de la construcción reportera, cuenta con la ventaja de permitir el análisis de la respuesta del promotor de *Sod2* en su contexto genómico, lo que implica además una organización específica de la cromatina. Por otra parte, la estrategia de las construcciones reporteras tiene la ventaja, no solo de permitir estudiar regiones acotadas del genoma, como acabamos de mencionar, sino que permiten realizar mutaciones de los sitios de unión de los factores de transcripción, lo que posibilita la identificación certera de elementos regulatorios. En síntesis, ambos abordajes presentan diferentes ventajas y limitaciones, complementándose, por lo que decidimos utilizar ambos.

Mediante la segunda estrategia, en las células en las que redujimos la expresión de *Oct4* o *Nanog* observamos una disminución de la expresión de *Sod2*. Si bien esta disminución sólo fue estadísticamente significativa en el caso de las células transfectadas con el *shRNA* para *Oct4*, la tendencia fue clara en ambos casos, de manera consistente con los resultados del resto de los abordajes experimentales, confirmando el hallazgo. Creemos que la falta de significancia estadística en el caso del silenciamiento de *Nanog*, puede deberse a que la disminución en la expresión alcanzada para este factor no fue suficiente para observar un efecto sobre la expresión de *Sod2*. Durante el transcurso de esta tesis surgieron algunos trabajos donde han estudiado el perfil de expresión de genes mediante *microarrays* en CME en distintas condiciones, y *Sod2* aparece en la lista de genes reportados cuya expresión disminuye a las 24 hs de haber quitado el estímulo de LIF. Además, analizan la modulación de genes en CME donde silencian *Oct4* y *Nanog*. En este contexto también *Sod2* se encuentra en el listado de genes cuya expresión disminuye en estas condiciones. Es importante remarcar que se trata de estudios *genome-wide* donde los datos sobre este gen no han sido validados mediante ensayos individuales (Loh et al., 2006; Trouillas et al., 2009). De todos modos, esta información es consistente con nuestros resultados, lo que le da aun un mayor sustento.

Por otra parte, Guo y colaboradores demostraron *in vitro* que *Oct4* es susceptible de sufrir oxidación en sus cisteínas, lo que impide su dimerización y unión al ADN. En

este estudio *in vitro*, este efecto fue revertido por Trx, sugiriendo la importancia de esta proteína (Guo et al., 2004). Estos hallazgos sugieren que el factor Oct4 podría ser un posible sensor del estado de oxido-reducción de la célula, cambiando su actividad de acuerdo al mismo. De esta manera, podría interpretarse a la regulación por estos FT de los genes de las enzimas involucradas en el metabolismo oxidativo, como un *loop* regulatorio (Bigarella et al., 2014).

La modulación del gen Sod2 parece fundamental no sólo porque la enzima para la que codifica es la primera barrera de defensa frente a la producción de ROS, metabolizando el anión superóxido generado en la cadena respiratoria, sino que además, el H₂O₂ generado como producto de este metabolismo podría cumplir un papel de segundo mensajero debido a su capacidad de difundir a través de las membranas y a su vida media relativamente larga. Teniendo en cuenta esto, la modulación de Sod2 podría tener un rol en la regulación de la producción de H₂O₂, y por consiguiente, en su implicancia en la inducción de la diferenciación celular. En este sentido, ha sido reportado que la diferenciación de CME hacia células musculares de vasos sanguíneos depende de la señalización de H₂O₂ inducida por la incremento en la expresión de NOX4, una NADPH oxidasa (Xiao et al., 2009). Por otro lado, es necesario mantener niveles controlados de ROS para preservar la auto-renovación en células madre adultas, debido a que un aumento de las ROS induce diferenciación por la activación de la vía de p38 MAPK (Gabriele Saretzki et al., 2008). Estas evidencias demuestran que las enzimas aquí estudiadas podrían tener un rol fundamental, no solo en el sistema de defensa sino además en vías de señalización celular.

En síntesis, en esta segunda parte de la tesis, hemos presentado un modesto panorama de la modulación de la transcripción de componentes del sistema de defensa antioxidante en células madre pluripotentes y encontramos que en nuestro modelo, Sod2 es inducida tanto por Nanog como por Oct4, dos de los FT fundamentales en la red de transcripción propia del estado pluripotente. Ha sido reportado que el intrón 2 del gen de Sod2 tiene actividad *enhancer* y su metilación reduce la expresión del gen en algunos tipos de cáncer (Zelko et al., 2002). Planeamos estudiar esta región, con el fin de buscar si existen sitios de unión para los factores de transcripción aquí estudiados y si éstos tienen algún rol en la regulación de este gen.

Asimismo, continuaremos estudiando el resto del promotor con las construcciones que ya hemos generado y la que está en proceso de ser clonada. Finalmente, estamos estudiando la modulación del gen Sod1 y planeamos estudiar la del gen Gsr, dado que su expresión también disminuyó a lo largo de la diferenciación y que sus promotores contienen sitios de unión putativos para Oct4, Sox2 y Nanog. Más aun, la expresión del gen Sod1 mostró un perfil notoriamente similar al del FT Oct4 en el protocolo de diferenciación en adherencia. Esta enzima junto con Sod2, son las encargadas de metabolizar el O_2^- , siendo las primeras líneas de defensa frente al estrés oxidativo, por lo que la regulación de este gen también nos resulta particularmente interesante.

Consideramos que los hallazgos de este trabajo de tesis y de los estudios que planeamos realizar y que surgieron como consecuencia de éste, pueden contribuir a la comprensión del sistema de defensa frente al estrés oxidativo y a la modulación de ROS en los niveles requeridos para cada estadio en las células madre pluripotentes. Esperamos que estos resultados sean un aporte al conocimiento de los mecanismos implicados en la capacidad de las células madre para mantener su genoma intacto, así también como la regulación de las ROS, ambos aspectos críticos para sus futuras aplicaciones en el campo de la ingeniería de tejidos y terapia celular.

Bibliografía

- Armstrong, L., Tilgner, K., Saretzki, G., Atkinson, S. P., Stojkovic, M., Moreno, R., ... Lako, M. (2010). Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells. *Stem Cells*, 28(4), 661–673. doi:10.1002/stem.307
- Aubert, J., Dunstan, H., Chambers, I., & Smith, A. (2002). Functional gene screening in embryonic stem cells implicates Wnt antagonism in neural differentiation. *Nature Biotechnology*, 20(December), 1240–1245. doi:10.1038/nbt763
- Battista, D., Ferrari, C. C., Gage, F. H., & Pitossi, F. J. (2006). Neurogenic niche modulation by activated microglia: Transforming growth factor β increases neurogenesis in the adult dentate gyrus. *European Journal of Neuroscience*, 23, 83–93. doi:10.1111/j.1460-9568.2005.04539.x
- Beal, M. F. (2005). Less stress, longer life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 7671–7676. doi:10.1073/pnas.0409271102
- Berggren, T. (2012). General Spinefection Protocol. *NIH Stem Cell Protocols*, 5–7. doi:10.3824/stembook.1.85.1
- Bernath, V. A., Muro, A. F., Vitullo, A. D., Bley, M. A., Baranao, J. L., & Kornblihtt, A. R. (1990). Cyclic AMP inhibits fibronectin gene expression in a newly developed granulosa cell line by a mechanism that suppresses cAMP-responsive element-dependent transcriptional activation. *J Biol Chem*, 265(30), 18219–18226. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2170405
- Bigarella, C. L., Liang, R., & Ghaffari, S. (2014). Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development*, 4206–4218. doi:10.1242/dev.107086
- Boyer, L. a, Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., ... Young, R. a. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, 122(6), 947–56. doi:10.1016/j.cell.2005.08.020
- Briggs, R., & King, T. J. (1952). Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 38(1951), 455–463. doi:10.1073/pnas.38.5.455
- Burdon, T., Stracey, C., Chambers, I., Nichols, J., & Smith, A. (1999). Suppression of SHP-2 and ERK signalling promotes self-renewal of mouse embryonic stem cells. *Developmental Biology*, 210(1), 30–43.
- Cahan, P., & Daley, G. Q. (2013). Origins and implications of pluripotent stem cell variability and heterogeneity. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(May), 357–68. doi:10.1038/nrm3584
- Callihan, P., Mumaw, J., MacHacek, D. W., Stice, S. L., & Hooks, S. B. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation by G protein coupled receptors, 129

- Pharmacology and Therapeutics 290–306 (2011). Elsevier Inc. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.10.007
- Cervantes, R. B., Stringer, J. R., Shao, C., Tischfield, J. A., & Stambrook, P. J. (2002). Embryonic stem cells and somatic cells differ in mutation frequency and type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 3586–3590. doi:10.1073/pnas.062527199
- Chen, X., Xu, H., Yuan, P., Fang, F., Huss, M., Vega, V. B., ... Ng, H. H. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*, 133(6), 1106–1117. doi:S0092-8674(08)00617-X [pii] 10.1016/j.cell.2008.04.043
- Cho, Y. M., Kwon, S., Pak, Y. K., Seol, H. W., Choi, Y. M., Park, D. J., ... Lee, H. K. (2006). Dynamic changes in mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during the spontaneous differentiation of human embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 348(4), 1472–1478. doi:S0006-291X(06)01821-3 [pii] 10.1016/j.bbrc.2006.08.020
- Cyranoski, D. (2015a). Japanese woman is first recipient of next generation stem cells, 2–4. doi:10.1038/nature.2014.15915
- Cyranoski, D. (2015b). Next generation stem cells cleared for human trial, 2–4. doi:10.1038/nature.2014.15897
- Davis, C. a., Monnier, J. M., & Nick, H. S. (2001). A Coding Region Determinant of Instability Regulates Levels of Manganese Superoxide Dismutase mRNA. *Journal of Biological Chemistry*, 276(40), 37317–37326. doi:10.1074/jbc.M104378200
- Davis, H. E., Rosinski, M., Morgan, J. R., & Yarmush, M. L. (2004). Charged polymers modulate retrovirus transduction via membrane charge neutralization and virus aggregation. *Biophysical Journal*, 86(February), 1234–1242. doi:10.1016/S0006-3495(04)74197-1
- Eminli, S., Utikal, J., Arnold, K., Jaenisch, R., & Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of neural progenitor cells into induced pluripotent stem cells in the absence of exogenous Sox2 expression. *Stem Cells*, 26(10), 2467–2474. doi:2008-0317 [pii] 10.1634/stemcells.2008-0317
- Esteban, M. A., Peng, M., Deli, Z., Cai, J., Yang, J., Xu, J., ... Pei, D. (n.d.). Porcine induced pluripotent stem cells may bridge the gap between mouse and human iPS. *IUBMB Life*, 62(4), 277–282. doi:10.1002/iub.307
- Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7242681
- Feng, B., Ng, J.-H. H., Heng, J.-C. D. C., & Ng, H.-H. H. (2009). Molecules that promote or enhance reprogramming of somatic cells to induced pluripotent stem

- cells. *Cell Stem Cell*, 4(4), 301–312. doi:S1934-5909(09)00106-4 [pii] 10.1016/j.stem.2009.03.005
- Folmes, C. D. L., Dzeja, P. P., Nelson, T. J., & Terzic, A. (2012). Metabolic plasticity in stem cell homeostasis and differentiation. *Cell Stem Cell*, 11(5), 596–606. doi:10.1016/j.stem.2012.10.002
- Furth, M. E., & Atala, A. (2009). Stem cell sources to treat diabetes. *J Cell Biochem*, 106(4), 507–511. doi:10.1002/jcb.22000
- Fussner, E., Djuric, U., Strauss, M., Hotta, A., Perez-Iratxeta, C., Lanner, F., ... Bazett-Jones, D. P. (2011). Constitutive heterochromatin reorganization during somatic cell reprogramming. *The EMBO Journal*, 30(9), 1778–1789. doi:10.1038/emboj.2011.96
- Gonzalez, F., Barragan Monasterio, M., Tiscornia, G., Montserrat Pulido, N., Vassena, R., Battle Morera, L., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2009). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells by transient expression of a single nonviral polycistronic vector. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(22), 8918–8922. doi:0901471106 [pii] 10.1073/pnas.0901471106
- Grubb, B. J. (2006). *Developmental Biology*, Eighth Edition. Scott F. Gilbert, editor. *Integrative and Comparative Biology*, 46(5), 652–653. doi:10.1093/icb/icl011
- Guo, Y., Einhorn, L., Kelley, M., Hirota, K., Yodoi, J., Reinbold, R., ... Hromas, R. (2004). Redox regulation of the embryonic stem cell transcription factor oct-4 by thioredoxin. *Stem Cells*, 22, 259–264. doi:10.1634/stemcells.22-3-259
- GURDON, J. B., ELSDALE, T. R., & FISCHBERG, M. (1958). Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*, 182, 64–65. doi:10.1038/182064a0
- Han, J. W., & Yoon, Y.-S. (2011). Induced pluripotent stem cells: emerging techniques for nuclear reprogramming. *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(7), 1799–1820. doi:10.1089/ars.2010.3814
- Hanna, J., Markoulaki, S., Schorderet, P., Carey, B. W., Beard, C., Wernig, M., ... Jaenisch, R. (2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell*, 133(2), 250–264. doi:S0092-8674(08)00447-9 [pii] 10.1016/j.cell.2008.03.028
- Hiyama, E., & Hiyama, K. (2007). Telomere and telomerase in stem cells. *British Journal of Cancer*, 96(7), 1020–4. doi:10.1038/sj.bjc.6603671
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2002). Nuclear transplantation: lessons from frogs and mice. *Current Opinion in Cell Biology*, 14(6), 741–748.
- Hochedlinger, K., & Plath, K. (2009). Epigenetic reprogramming and induced pluripotency. *Development (Cambridge, England)*, 136, 509–523. doi:10.1242/dev.020867

- Holmström, K. M., & Finkel, T. (2014). Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(6), 411–21. doi:10.1038/nrm3801
- Huangfu, D., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Snitow, M., Chen, A. E., & Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*, 26(7), 795–797. doi:nbt1418 [pii] 10.1038/nbt1418
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., ... Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nat Biotechnol*, 26(11), 1269–1275. doi:nbt.1502 [pii] 10.1038/nbt.1502
- Humphrey, R., Beattie, G., & Lopez, A. (2004). Maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells is STAT3 independent. *Stem ... (Clc)*, 522–530.
- Itescu, S., Schuster, M. D., & Kocher, A. A. (2003). New directions in strategies using cell therapy for heart disease. *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 81, 288–296. doi:10.1007/s00109-003-0432-0
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., ... Suda, T. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat Med*, 12(4), 446–451. doi:nm1388 [pii] 10.1038/nm1388
- Jaenisch, R., & Young, R. (2008). Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, 132, 567–582. doi:10.1016/j.cell.2008.01.015
- Jakupoglu, C., Przemeck, G. K., Schneider, M., Moreno, S. G., Mayr, N., Hatzopoulos, A. K., ... Conrad, M. (2005). Cytoplasmic thioredoxin reductase is essential for embryogenesis but dispensable for cardiac development. *Mol Cell Biol*, 25(5), 1980–1988. doi:25/5/1980 [pii] 10.1128/MCB.25.5.1980-1988.2005
- Jang, Y. Y., & Sharkis, S. J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood*, 110(8), 3056–3063. doi:blood-2007-05-087759 [pii] 10.1182/blood-2007-05-087759
- Ji, J., Sharma, V., Qi, S., Guarch, M. E., Zhao, P., Luo, Z., ... Batada, N. N. (2014). Antioxidant supplementation reduces genomic aberrations in human induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*, 2, 44–51. doi:10.1016/j.stemcr.2013.11.004
- Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M., & Bluelloch, R. (2009). Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol*, 27(5), 459–461. doi:nbt.1535 [pii] 10.1038/nbt.1535

- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A., Mileikovsky, M., Mohseni, P., & Woltjen, K. (2009). Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature*, 458(7239), 771–775. doi:nature07864 [pii] 10.1038/nature07864
- Kielman, M. F., Rindapää, M., Gaspar, C., Van Poppel, N., Breukel, C., Van Leeuwen, S., ... Fodde, R. (2002). Apc modulates embryonic stem-cell differentiation by controlling the dosage of beta-catenin signaling. *Nature Genetics*, 32(4), 594–605.
- Kim, J. B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., ... Scholer, H. R. (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature*, 454(7204), 646–650. doi:nature07061 [pii] 10.1038/nature07061
- Kurosawa, H. (2007). Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*, 103(5), 389–398. doi:10.1263/jbb.103.389
- Lentiviral Biosafety Manual. (2010). OHSU Research Training Courses
- Lentiviral Vectors Biosafety Guidance & Safety Protocol for Research with Lentiviral Vectors. (2009).
- Lentiviral Vectors Information and Biosafety Considerations. (2000). *Human Gene Therapy*, 11(Figure 1), 2159–2192. Retrieved from <http://www.vcu.edu/oehs/chemical/biosafe/lentiviralvectors.pdf>
- Liao, J., Cui, C., Chen, S., Ren, J., Chen, J., Gao, Y., ... Xiao, L. (2009). Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. *Cell Stem Cell*, 4(1), 11–15. doi:S1934-5909(08)00615-2 [pii] 10.1016/j.stem.2008.11.013
- Liu, H., Zhu, F., Yong, J., Zhang, P., Hou, P., Li, H., ... Deng, H. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells from adult rhesus monkey fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 3(6), 587–590. doi:S1934-5909(08)00537-7 [pii] 10.1016/j.stem.2008.10.014
- Loh, Y.-H., Wu, Q., Chew, J.-L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., ... Ng, H.-H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), 431–40. doi:10.1038/ng1760
- Losino, N., Luzzani, C., Solari, C., Boffi, J., Tisserand, M. L., Sevlever, G., ... Guberman, A. (2011). Maintenance of Murine Embryonic Stem Cells' Self-Renewal and Pluripotency with Increase in Proliferation Rate by a Bovine Granulosa Cell Line-Conditioned Medium. *Stem Cells and Development*, 20(8), 1439–1449. doi:10.1089/scd.2010.0336
- Luzzani, C., Solari, C., Losino, N., Ariel, W., Romorini, L., Bluguermann, C., ... Guberman, A. (2011). Modulation of chromatin modifying factors' gene expression in embryonic and induced pluripotent stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(4), 816–822. doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.070

- Lyssiotis, C. A., Foreman, R. K., Staerk, J., Garcia, M., Mathur, D., Markoulaki, S., ... Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine fibroblasts to induced pluripotent stem cells with chemical complementation of Klf4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(22), 8912–8917. doi:0903860106 [pii] 10.1073/pnas.0903860106
- Macarthur, B. D., Ma'ayan, A., & Lemischka, I. R. (2009). Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10, 672–681. doi:10.1038/nrm2766
- Mali, P., Chou, B. K., Yen, J., Ye, Z., Zou, J., Dowey, S., ... Cheng, L. (2010). Butyrate greatly enhances derivation of human induced pluripotent stem cells by promoting epigenetic remodeling and the expression of pluripotency-associated genes. *Stem Cells*, 28, 713–720. doi:10.1002/stem.402
- Martin, G. R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78(12), 7634–7638. doi:10.1073/pnas.78.12.7634
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., & Taketo, M. M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Developmental Biology*, 178(1), 179–185. doi:10.1006/dbio.1996.0208
- Medvedev, S. P., Shevchenko, a I., & Zakian, S. M. (2010). Molecular basis of Mammalian embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Acta Naturae*, 2(6), 30–46. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3347565&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Melov, S., Coskun, P., Patel, M., Tuinstra, R., Cottrell, B., Jun, A. S., ... Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 846–851. doi:10.1073/pnas.96.3.846
- Menard, C., Hagege, A. A., Agbulut, O., Barro, M., Morichetti, M. C., Brasselet, C., ... Menasche, P. (2005). Transplantation of cardiac-committed mouse embryonic stem cells to infarcted sheep myocardium: a preclinical study. *Lancet*, 366(9490), 1005–1012. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16168783
- Miao, L., & St.Clair, D. K. (2010). Regulation of superoxide dismutase genes: implications in diseases. *Free Radic Biol Med*, 47(4), 344–356. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.018.Regulation
- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., ... Yamanaka, S. (2008). Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol*, 26(1), 101–106. doi:nbt1374 [pii] 10.1038/nbt1374

- Nichols, J., & Smith, A. (2009). Naive and Primed Pluripotent States. *Cell Stem Cell*, 4(6), 487–492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015
- Nichols, J., & Smith, A. (2012). Pluripotency in the Embryo and in Culture. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 4. doi:10.1101/cshperspect.a008128
- Niwa, A., Umeda, K., Chang, H., Saito, M., Okita, K., Takahashi, K., ... Heike, T. (2009). Orderly hematopoietic development of induced pluripotent stem cells via Flk-1(+) hemoangiogenic progenitors. *J Cell Physiol*. doi:10.1002/jcp.21864
- Niwa, H. (2007). How is pluripotency determined and maintained? *Development*, 134(4), 635–646. doi:10.1242/dev.02787
- Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., & Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev*, 12(13), 2048–2060. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9649508
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet*, 24(4), 372–376. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10742100
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460(7251), 118–122. doi:10.1038/nature08113
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P., & Powis, G. (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol*, 23(3), 916–922. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12529397
- Numbers, C. (2010). TRIzol® Reagent, (15596026), 18–21.
- Ohtsuka, S., & Dalton, S. (2008). Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Therapy*, 15(2), 74–81.
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313–317. doi:10.1038/nature05934
- Okita, K., & Yamanaka, S. (2011). Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 366, 2198–2207. doi:10.1098/rstb.2011.0016

- Ookawara, T., Imazeki, N., Matsubara, O., Kizaki, T., Oh-Ishi, S., Nakao, C., ... Ohno, H. (1998). Tissue distribution of immunoreactive mouse extracellular superoxide dismutase. *The American Journal of Physiology*, 275, C840–C847.
- Panopoulos, A. D., Yanes, O., Ruiz, S., Kida, Y. S., Diep, D., Tautenhahn, R., ... Belmonte, J. C. I. (2012). The metabolome of induced pluripotent stem cells reveals metabolic changes occurring in somatic cell reprogramming. *Cell Research*.
- Pei, D. (2008). The cell biology of embryonic stem cells. *Cell Research* (Vol. 18, pp. S6–S6). doi:10.1038/cr.2008.96
- Pfaffl M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (2001) e45.
- Ramakers, C., Ruijter, J. M., Lekanne Deprez, R. H., & Moorman, A. F. M. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339, 62–66. doi:10.1016/S0304-3940(02)01423-4
- Ramos-Mejía, V., Montes, R., Bueno, C., Ayllón, V., Real, P. J., Rodríguez, R., & Menendez, P. (2012). Residual expression of the reprogramming factors prevents differentiation of iPSC generated from human fibroblasts and cord blood CD34+ progenitors. *PLoS ONE*, 7(4). doi:10.1371/journal.pone.0035824
- Robinton, D. A. A., & Daley, G. G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. doi:10.1038/nature10761.The
- Rosenstrauch, D., Poglajen, G., Zidar, N., & Gregoric, I. D. (2005). Stem cell therapy for ischemic heart failure. *Tex Heart Inst J*, 32, 339–347.
- Rosler, E. S., Fisk, G. J., Ares, X., Irving, J., Miura, T., Rao, M. S., & Carpenter, M. K. (2004). Long-term culture of human embryonic stem cells in feeder-free conditions. *Developmental Dynamics an Official Publication of the American Association of Anatomists*, 229(2), 259–74. doi:10.1002/dvdy.10430
- Ruijter, J. M., Ramakers, C., Hoogaars, W. M. H., Karlen, Y., Bakker, O., Van Den Hoff, M. J. B., & Moorman, a. F. M. (2009). Amplification efficiency: Linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research*, 37(6). doi:10.1093/nar/gkp045
- Sancho-Martinez, I., & Belmonte, J. C. I. (2013). Stem cells: Surf the waves of reprogramming. *Nature*, 493, 310–311. doi:10.1038/493310b
- Saretzki, G., Armstrong, L., Leake, A., Lako, M., & von Zglinicki, T. (2004). Stress defense in murine embryonic stem cells is superior to that of various differentiated murine cells. *Stem Cells*, 22(6), 962–971. doi:10.1634/stemcells.22-6-962

- Saretzki, G., Walter, T., Atkinson, S., Passos, J. F., Bareth, B., Keith, W. N., ... Lako, M. (2008). Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(2), 455–464. doi:10.1634/stemcells.2007-0628
- Schafer, F. Q., & Buettner, G. R. (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology and Medicine*.
- Schmelter, M., Ateghang, B., Helmig, S., Wartenberg, M., & Sauer, H. (2006). Embryonic stem cells utilize reactive oxygen species as transducers of mechanical strain-induced cardiovascular differentiation. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20, 1182–1184. doi:10.1096/fj.05-4723fje
- Smith, A. G., Heath, J. K., Donaldson, D. D., Wong, G. G., Moreau, J., Stahl, M., & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*, 336(6200), 688–690. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=3143917
- Solari, C., Losino, N., Luzzani, C., Waisman, A., Bluguermann, C., Questa, M., ... Guberman, A. (2011). Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 410(2), 252–257. doi:10.1016/j.bbrc.2011.05.126
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells*, 27(3), 543–549. doi:stemcells.2008-1075 [pii] 10.1634/stemcells.2008-1075
- Son, M. J., Jeong, B. R., Kwon, Y., & Cho, Y. S. (2013). Interference with the mitochondrial bioenergetics fuels reprogramming to pluripotency via facilitation of the glycolytic transition. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 45(11), 2512–2518. doi:10.1016/j.biocel.2013.07.023
- St John, J. C., Amaral, A., Bowles, E., Oliveira, J. F., Lloyd, R., Freitas, M., ... Ramalho-Santos, J. (2006). The analysis of mitochondria and mitochondrial DNA in human embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*, 331, 347–374. doi:10.1385/1-59745-046-4:347
- Stadtfeld, M., Brennand, K., & Hochedlinger, K. (2008). Reprogramming of pancreatic beta cells into induced pluripotent stem cells. *Curr Biol*, 18(12), 890–894. doi:S0960-9822(08)00607-6 [pii] 10.1016/j.cub.2008.05.010
- Stadtfeld, M., & Hochedlinger, K. (2010). Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications, 2239–2263. doi:10.1101/gad.1963910.Freely

- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322(5903), 945–949. doi:1162494 [pii] 10.1126/science.1162494
- Stambrook, P. J. (2007). An ageing question: Do embryonic stem cells protect their genomes? *Mechanisms of Ageing and Development*, 128, 31–35. doi:10.1016/j.mad.2006.11.007
- Studeny, M., Marini, F. C., Champlin, R. E., Zompetta, C., Fidler, I. J., & Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Research*, 62, 3603–3608.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., & Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*, 11, 1553–1558. doi:10.1016/S0960-9822(01)00459-6
- 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. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. doi:S0092-8674(06)00976-7 [pii] 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Teslaa, T., Teitell, M. A., Teslaa, T., & Teitell, M. A. (2014). Pluripotent stem cell energy metabolism : an update, 1–16.
- Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391), 1145–1147. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9804556
- Trouillas, M., Saucourt, C., Guillotin, B., Gauthereau, X., Ding, L., Buchholz, F., ... Boeuf, H. (2009). Three LIF-dependent signatures and gene clusters with atypical expression profiles, identified by transcriptome studies in mouse ES cells and early derivatives. *BMC Genomics*, 10, 73. doi:10.1186/1471-2164-10-73
- Ufer, C., & Wang, C. C. (2011). The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 4(July), 12. doi:10.3389/fnmol.2011.00012
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324, 1029–1033. doi:10.1126/science.1160809
- Vermulst, M., Khrapko, K., & Wanagat, J. (2012). Mitochondrial Mutagenesis in Aging and Disease. *Mutagenesis*, 51–84. doi:10.5772/51099

- Wang, H., & Dey, S. K. (2006). Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat Rev Genet*, 7(3), 185–199. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16485018
- Wang, K., Zhang, T., Dong, Q., Nice, E. C., Huang, C., & Wei, Y. (2013). Redox homeostasis: the linchpin in stem cell self-renewal and differentiation. *Cell Death & Disease*, 4(3), e537. doi:10.1038/cddis.2013.50
- Wang, Y., Xu, Z., Jiang, J., Xu, C., Kang, J., Xiao, L., ... Liu, H. (2013). Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Developmental Cell*, 25(1), 69–80. doi:10.1016/j.devcel.2013.03.002
- Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, Ebina W, Mandal PK, Smith ZD, Meissner A, Daley GQ, Brack AS, Collins JJ, Cowan C, Schlaeger TM, Rossi DJ. (2010). Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 7(5):618-30. doi: 10.1016/j.stem.2010.08.012. Epub 2010 Sep 30
- Wennekamp, S., Mesecke, S., Nédélec, F., & Hiiragi, T. (2013). A self-organization framework for symmetry breaking in the mammalian embryo. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14(7), 452–9. doi:10.1038/nrm3602
- Williams, R. L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., ... Gough, N. M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, 336(6200), 684–687. doi:10.1038/336684a0
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810–813. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9039911
- Winkler, A., Nj??lsson, R., Carlsson, K., Elgadi, A., Rozell, B., Abraham, L., ... Norgren, S. (2011). Glutathione is essential for early embryogenesis - Analysis of a glutathione synthetase knockout mouse. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 412, 121–126. doi:10.1016/j.bbrc.2011.07.056
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Hämäläinen, R., ... Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature*, 458(7239), 766–770. doi:nature07863 [pii] 10.1038/nature07863
- Xiao, Q., Luo, Z., Pepe, A. E., Margariti, A., Zeng, L., & Xu, Q. (2009). Embryonic stem cell differentiation into smooth muscle cells is mediated by Nox4-produced H₂O₂. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, 296, 711–723. doi:10.1152/ajpcell.00442.2008.

- Xu, R., Peck, R. M., Li, D. S., Feng, X., Ludwig, T., & Thomson, J. A. (2005). Basic FGF and suppression of BMP signaling sustain undifferentiated proliferation of human ES cells. *Nature Methods*, 2(3), 185–190. doi:10.1038/NMETH744
- Xu, X., Duan, S., Yi, F., Ocampo, A., Liu, G. H., & Izpisua Belmonte, J. C. (2013). Mitochondrial regulation in pluripotent stem cells. *Cell Metabolism*, 18(3), 325–332. doi:10.1016/j.cmet.2013.06.005
- Yamanaka, S. (2009). A fresh look at iPS cells. *Cell*, 137(1), 13–17. doi:S0092-8674(09)00333-X [pii] 10.1016/j.cell.2009.03.034
- Yeo, J.-C., & Ng, H.-H. (2013). The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Research*, 23(1), 20–32. doi:10.1038/cr.2012.172
- Yildirim, S. (2012). Induced Pluripotent Stem Cells, 11–19. doi:10.1007/978-1-4614-2206-8
- Ying, Q. L., Nichols, J., Chambers, I., & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*, 115(3), 281–292. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14636556
- Ying, Q.-L., Wray, J., Nichols, J., Batlle-Morera, L., Doble, B., Woodgett, J., ... Smith, A. (2008). The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*, 453, 519–523. doi:10.1038/nature06968
- Yoon, Y. S., Wecker, A., Heyd, L., Park, J. S., Tkebuchava, T., Kusano, K., ... Losordo, D. W. (2005). Clonally expanded novel multipotent stem cells from human bone marrow regenerate myocardium after myocardial infarction. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 326–338. doi:10.1172/JCI200522326
- Yoon, Y.-S., Lee, N., & Scadova, H. (2005). Myocardial regeneration with bone-marrow-derived stem cells. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 97, 253–263. doi:10.1042/BC20040099
- Yoshida-Koide, U., Matsuda, T., Saikawa, K., Nakanuma, Y., Yokota, T., Asashima, M., & Koide, H. (2004). Involvement of Ras in extraembryonic endoderm differentiation of embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 313(3), 475–481.
- Yu, J., Vodyanik, M. a, Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., ... Thomson, J. a. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*. doi:10.1126/science.1151526
- Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: A comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radical Biology and Medicine*. doi:10.1016/S0891-5849(02)00905-X

- Zhang, Z., Xiang, D., & Wu, W.-S. (2014). Sodium butyrate facilitates reprogramming by derepressing OCT4 transactivity at the promoter of embryonic stem cell-specific miR-302/367 cluster. *Cellular Reprogramming*, 16(2), 130–9. doi:10.1089/cell.2013.0070
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., ... Ding, S. (2009). Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell*, 4(5), 381–384. doi:S1934-5909(09)00159-3 [pii] 10.1016/j.stem.2009.04.005
- Zhou, W., Choi, M., Margineantu, D., Margaretha, L., Hesson, J., Cavanaugh, C., ... Ruohola-Baker, H. (2012). HIF1 α induced switch from bivalent to exclusively glycolytic metabolism during ESC-to-EpiSC/hESC transition. *The EMBO Journal*, 31(9), 2103–2116. doi:10.1038/emboj.2012.71