



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGÍA, BIOFÍSICA Y NEUROCIENCIAS

**“Obtención de células troncales pluripotentes inducidas para su uso en
modelos experimentales de cáncer”**

TESIS

Que presenta

IBQ. GISELA TOVAR MEDINA

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE

NEUROBIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Director de la tesis:

Dr. José Segovia Vila

Ciudad de México

SEPTIEMBRE, 2019

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, por siempre apoyarme en todo, por brindarme su cariño y enseñarme que siempre puedo lograr las cosas con dedicación y constancia.

A mis hermanas Melany, Conchis y Norma, por su apoyo, cariño y las cosas que cada una me ha enseñado.

A mis sobrinas Melany y Karol, por los momentos que compartimos y su cariño.

Al Dr. José Segovia Vila, por permitirme trabajar en el laboratorio, por su apoyo y confianza.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

A la Dra. Ma. Eugenia Mendoza Garrido y al Dr. Daniel Martínez Fong por sus consejos y apoyo.

Al Dr. Adolfo López Ornelas por su ayuda en el proyecto.

A Paulis, Ara y Rubén, por su ayuda y orientación en el laboratorio.

A mis amigos del laboratorio Nancy, Manuel, Cesar, Liz, Nico, Quetza, Rosy y Luis por sus consejos, ayuda y amistad.

A mis amigos de la maestría Isa, Luis, Alonso, Nicole, Hury, Vicente, Edgar, Sheyla y Jona por su apoyo al inicio de la maestría y su amistad.

ÍNDICE GENERAL

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| ÍNDICE GENERAL..... | 1 |
| INDICE DE FIGURAS..... | 4 |
| RESUMEN..... | 6 |
| ABSTRACT..... | 7 |
| INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| I. ANTECEDENTES..... | 10 |
| 1.1 Células Troncales..... | 10 |
| 1.2 División simétrica y asimétrica..... | 10 |
| 1.3 Clasificación de las células troncales durante el desarrollo..... | 10 |
| 1.4 Limitaciones en el uso de las células troncales..... | 13 |
| 1.5 Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)..... | 14 |
| 1.6 Factores de transcripción involucrados en la reprogramación de células diferenciadas..... | 14 |
| 1.7 Inducción de células troncales pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón mediante factores definidos..... | 16 |
| 1.8 Electroporación..... | 18 |
| 1.9 Aplicaciones de las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)... | 20 |
| 1.10 GAS1 (Growth arrest-specific-1)..... | 22 |
| 1.11 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)..... | 26 |
| JUSTIFICACIÓN..... | 32 |
| HIPÓTESIS..... | 33 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| OBJETIVOS..... | 34 |
| Objetivo General..... | 34 |
| Objetivos específicos..... | 34 |
| II. MATERIALES..... | 35 |
| 2.1 Materiales..... | 35 |
| 2.1.1 Material Biológico..... | 35 |
| 2.1.2 Plásmidos..... | 35 |
| 2.1.3 Medios de cultivo..... | 35 |
| 2.1.4 Antibióticos..... | 35 |
| III. METODOLOGÍA..... | 36 |
| 3.1 Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> con los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL..... | 36 |
| 3.2 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS..... | 36 |
| 3.3 Restricción de ADN plasmídico con la enzima de restricción <i>EcoRI</i> | 37 |
| 3.4 Activación y mantenimiento de células BJ y HFF (Fibroblastos de Humano)..... | 38 |
| 3.5 Inactivación mitótica de Fibroblastos de humano (HFF) para emplearse como células alimentadoras (feeders)..... | 38 |
| 3.6 Electroporación de células BJ con los vectores episomales: pCXLE-hUL, pCXLE-hSK y pCXLE-hOCT3/4..... | 39 |
| 3.7 Caracterización de células iPS por cambios morfológicos..... | 41 |
| 3.8 Procedimiento de tinción con el kit de fosfatasa alcalina..... | 42 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.9 Subcultivo de células iPSCs de humano..... | 42 |
| 3.9.1 Disociación Mecánica..... | 42 |
| 3.9.2 Disociación con Acutasa..... | 43 |
| 3.10 Cambio de medio de las células iPS..... | 44 |
| 3.11 Obtención de lentivirus del elemento represor (TR), proteína verde fluorescente (GFP) y las formas solubles de GAS1 y PTEN-Long | 45 |
| 3.12 Obtención de una línea estable BJ con el elemento represor (TR) y la forma soluble de GAS1 y PTEN..... | 46 |
| 3.13 Aislamiento de ARN total por el método de TRizol..... | 47 |
| 3.14 RT-PCR..... | 48 |
| IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 50 |
| 4.1 Transformación de células químicamente competentes de <i>Escherichia coli</i> con los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL..... | 50 |
| 4.2 Restricción ADN plasmidico con la enzima <i>EcoRI</i> | 52 |
| 4.3 Electroporación de células BJ con los vectores episomales: pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL y caracterización de la obtención de células iPS mediante cambios morfológicos y tinción de fosfatasa alcalina..... | 53 |
| 4.4 Infección de las células BJ con el vector lentiviral plenti6.3tGAS1-P2A-PTEN-L..... | 56 |
| CONCLUSIONES..... | 60 |
| BIBLIOGRAFIA..... | 62 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1.1 División simétrica y asimétrica..... | 11 |
| Figura 1.2 Clasificación de células troncales..... | 12 |
| Figura 1.3 Inducción de células troncales pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón mediante factores definidos..... | 17 |
| Figura 1.4 El principio de electroporación | 19 |
| Figura 1.5 Aplicaciones médicas de las células iPS..... | 21 |
| Figura 1.6 Modelo propuesto de la acción de GAS1..... | 23 |
| Figura 1.7 Representación esquemática de las formas de GAS1..... | 24 |
| Figura 1.8 Evaluación de tropismo y efecto terapéutico de NSC que expresan la forma soluble de GAS1 en un modelo de glioblastoma (GBM)..... | 25 |
| Figura 1.9 Modelo propuesto de la acción de PTEN..... | 27 |
| Figura 1.10 PTEN-Long es una variante traduccional de PTEN..... | 27 |
| Figura 1.11 Tráfico propuesto para PTEN-Long | 28 |
| Figura 1.12. Efecto de la expresión combinada de las formas solubles de GAS1 y PTEN en la inhibición del crecimiento del glioblastoma (GBM)..... | 30 |
| Figura 3.1 Esquema del protocolo de obtención de células iPS con plásmidos episomales | 41 |
| Figura 3.2 Esquema del protocolo de disociación mecánica de las de células iPS..... | 43 |
| Figura 4.1 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hOCT3/4..... | 50 |
| Figura 4.2 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hSK..... | 51 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4.3 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hUL..... | 52 |
| Figura 4.4 Restricción ADN plasmídico con la enzima <i>EcoRI</i> | 53 |
| Figura 4.5 Reprogramación de fibroblastos humanos a células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)..... | 54 |
| Figura 4.6 Colonias de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs).... | 55 |
| Figura 4.7 Tinción de fosfatasa alcalina en células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)..... | 56 |
| Figura 4.8 Infección de células BJ con el vector lentiviral de la proteína verde fluorescente (GFP)..... | 57 |
| Figura 4.9 Gel de agarosa con ARN total de células BJ..... | 57 |
| Figura 4.10 PCR Actina de humano | 58 |
| Figura 4.11 PCR para tGAS1-PTEN-L | 59 |

RESUMEN

Las células troncales, son células no diferenciadas que tienen la capacidad de auto-renovarse y generar células diferenciadas. Estas características han logrado que el campo de investigación de células troncales gane mayor interés en áreas de terapia celular y medicina regenerativa.

El descubrimiento de la reprogramación celular ha logrado la obtención de células troncales propias del paciente (iPSCs) que pueden ser empleadas en modelos *in vitro* en diferentes enfermedades y desarrollo de fármacos.

GAS1, es una proteína que induce arresto del ciclo celular y apoptosis. Por otro lado, PTEN, es un supresor de tumor que se encuentra mutado en diferentes tipos de cáncer. En nuestro laboratorio se ha demostrado que las formas solubles de estas proteínas tienen efectos antitumorales en modelos de glioblastoma (GBM).

En este proyecto, se logró la obtención de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) con el método de electroporación, empleando tres vectores episomales que contienen los factores de transcripción: Sox2, Oct4, Lin28, c-Myc y Klf4. Se logró la estandarización del método de electroporación, también se demostró que las células presentaron cambios morfológicos y tinción positiva para fosfatasa alcalina, marcador específico de pluripotencia. Además, se logró establecer una línea estable de células BJ que expresa de manera regulable tGAS1-PTEN-L.

Por último, una vez que las colonias de células iPS tengan un tamaño mayor, serán infectadas con un vector lentiviral para la expresión de tGAS1-PTEN-L de manera regulable, para su uso en futuras terapias contra el cáncer.

ABSTRACT

Stem cells are undifferentiated cells with the capacity to self-renew and the ability to generate differentiated cells. These characteristics have made stem cell research field gain more interest in areas of cell-based therapies and regenerative medicine.

The discovery of cellular reprogramming has achieved obtaining stem cells from patients (iPSCs) that can serve as an *in vitro* model of various diseases and drug development.

Gas1 is a protein that induces cell cycle arrest and apoptosis. On the other hand, PTEN is a tumor suppressor that is mutated in different types of cancer. In our laboratory it has been shown that soluble forms of these proteins have antitumor effects in glioblastoma models (GBM).

In this project, we obtain induced pluripotent stem cells (iPSCs) with the electroporation method, using three episomal vectors containing the transcription factors: Sox2, Oct4, Lin28, c-Myc and Klf4. We achieved the standardization of the electroporation method, we also demonstrated that the cells presented morphological changes and were positive for staining with alkaline phosphatase, specific marker of pluripotency. In addition, it was possible to establish a stable BJ cell line that expresses tGAS1-PTEN-L in a regulated manner.

Finally, once the colonies of iPS cells have a larger size, they will be infected with a lentiviral vector for the expression of tGAS1-PTEN-L in a regulated manner, for use in future cancer therapies.

INTRODUCCIÓN

El campo de las células troncales ha sido impulsado por el desarrollo de nuevas estrategias para la reprogramación de células somáticas de una manera eficiente. Las células troncales tienen la habilidad de crecer indefinidamente conservando la pluripotencia, además de diferenciarse en células de las tres capas germinales.

Sin embargo, la obtención de este tipo de células ha generado problemas éticos por su derivación a partir de embriones humanos, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para la obtención *in vitro* de células con características similares.

Mediante la combinación de algunos factores de pluripotencia como Sox2, Oct4, Lin28, c-Myc y Klf4, se puede llevar a cabo la reprogramación de células diferenciadas como fibroblastos de humano a células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) que exhiben la forma y las propiedades de crecimiento de las células troncales embrionarias.

Se ha demostrado que diferentes tipos de células troncales y progenitoras tienen la capacidad de migrar a microambientes tumorales. Debido al tropismo que presentan estas células se han empleado células troncales neurales (NSC) como vehículos para la entrega de genes terapéuticos como tGAS1 y PTEN-L en terapias contra diferentes tipos de cáncer (Zhang *et al.*, 2018 ; Lopez-Ornelas *et al.*, 2014).

La manipulación del destino celular a través de la reprogramación ofrece diversas aplicaciones, entre ellas, la oportunidad de modelar y descubrir mecanismos de enfermedades, además de ofrecer propuestas para terapias autólogas (Robinton y Daley, 2012).

En este proyecto se propuso desarrollar células troncales pluripotentes inducidas (iPS) a partir de la reprogramación de fibroblastos de humano para la expresión de tGAS1 y PTEN-L que posteriormente puedan ser empleadas como vehículos en terapias dirigidas a gliomas.

I. ANTECEDENTES

1.1 Células Troncales

Las células troncales son células no diferenciadas, que tienen la capacidad de auto-renovación que les permite replicarse, además de dar lugar a células especializadas con funciones específicas en el organismo (Weissman, 2000; Pelayo *et al.*, 2011).

1.2 División simétrica y asimétrica

La capacidad de auto-renovación de las células troncales ocurre por medio de la división simétrica o asimétrica. Si la división de la célula troncal es simétrica, las dos células hijas se convierten en células troncales, expandiendo el reservorio de células troncales. Sin embargo, postnatalmente, la mayoría de las células troncales se divide asimétricamente, creando una célula troncal y una célula diferenciada o progenitora. Bajo la exposición a determinados factores de diferenciación, las células progenitoras logran concluir la diferenciación. El potencial de diferenciación de las células troncales es dependiente del tiempo y la localización (**Fig. 1.1**) (Roelandt *et al.*, 2013).

A través de divisiones simétricas se incrementa el número de células troncales, mientras que con las divisiones asimétricas dicho número se mantiene (**Fig. 1.1**) (Pelayo *et al.*, 2011).

1.3 Clasificación de las células troncales durante el desarrollo

A lo largo del desarrollo de los mamíferos se generan diversos tipos de células troncales. La primera célula troncal es el huevo fertilizado o cigoto, la cual es una célula troncal totipotente, capaz de producir tanto al embrión como a las estructuras que no formaran parte de él (extraembrionarias), pero

que son fundamentales para su desarrollo, como la placenta, el saco vitelino y el cordón umbilical. Hasta el estadio de mórula, cada célula es idéntica a las otras, lo que ejemplifica la auto-renovación del cigoto (Pelayo *et al.*, 2011).

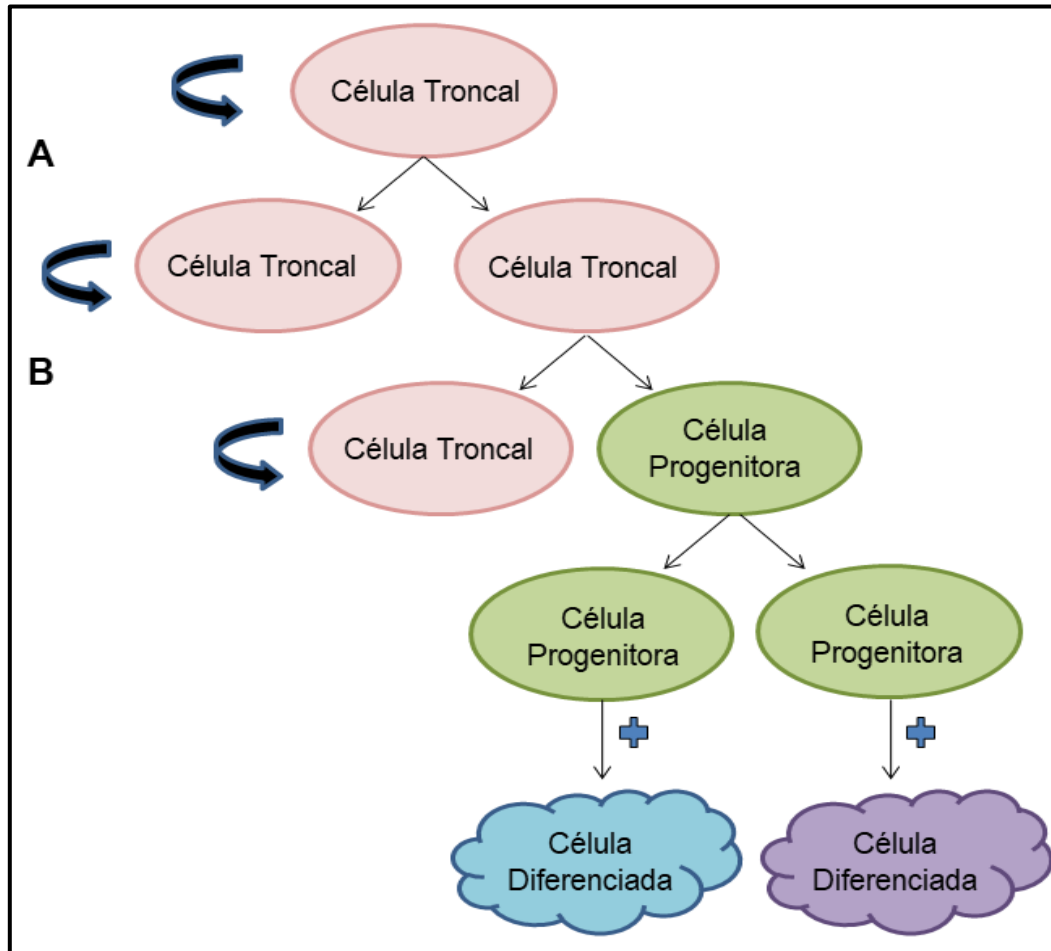


Figura 1.1 División simétrica y asimétrica. Cuando una célula troncal se divide puede dar lugar a dos células troncales (A) o a una célula troncal y a una célula progenitora (B). En el primer caso, se trata de una división simétrica, pues ambas células resultantes son iguales entre sí; en el segundo caso se trata de una división asimétrica, ya que las dos células son diferentes entre ellas (Modificado de Kerrigan *et al.*, 2018).

Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el cual cada una de las células que forma parte de la masa celular interna

es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo, por lo tanto son conocidas como células troncales pluripotentes (Pelayo *et al.*, 2011).

Las células troncales embrionarias y las células troncales pluripotentes inducidas son un ejemplo de células pluripotentes (Takahashi y Yamanaka, 2006). A partir de las células troncales pluripotentes se producen diferentes células troncales somáticas, incluyendo aquellas que dan origen al sistema nervioso central, a los nervios periféricos, la sangre, el hígado, el páncreas, los músculos, los huesos, la piel, el corazón, etc (Pelayo *et al.*, 2011).

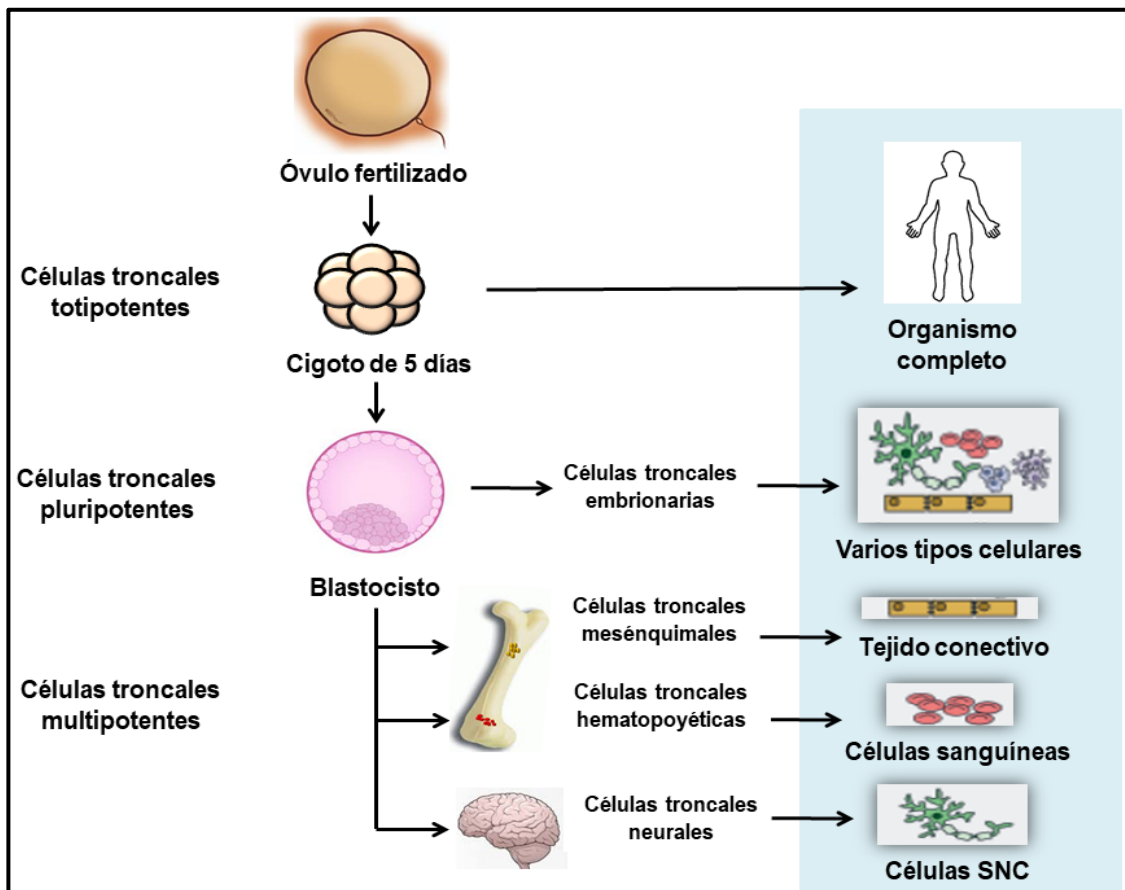


Figura 1.2 Clasificación de células troncales (Kerrigan *et al.*, 2018). Conforme avanza el desarrollo, el embrión alcanza el estadio de blastocisto, en el cual cada una de las células que forma parte de la masa celular interna es capaz de formar células de cualquier tejido del organismo, por lo tanto son conocidas como células troncales pluripotentes (Pelayo *et al.*, 2011).

Dichas células troncales son consideradas multipotentes, ya que pueden generar diversos linajes celulares dentro de un mismo tejido. Además, su potencial de diferenciación es limitado en comparación con las células troncales pluripotentes (Weissman, 2000; Pelayo *et al.*, 2011).

Las células troncales fetales y adultas, son células multipotentes que pueden identificarse en una gran cantidad de tejidos. Las células troncales adultas mejor caracterizadas son las células troncales hematopoyéticas (HSC), que se encuentran en la médula ósea y se pueden diferenciar en cualquier célula sanguínea, incluyendo linfocitos y eritrocitos (Kerrigan *et al.*, 2018).

Las células troncales mesenquimales (MSC), se han identificado en muchos órganos del cuerpo, residen en nichos perivasculares y se piensa que renuevan el mesénquima estromal de la mayoría de los órganos, incluyendo fibroblastos, osteocitos, condrocitos y adipocitos (Kerrigan *et al.*, 2018).

Otras células troncales adultas que también se han caracterizado son las células troncales neurales (NSC), que se encuentran en el sistema nervioso central (SNC) y están destinadas a convertirse en neuronas y células gliales (astrocitos, oligodendrocitos y células endoteliales) (Kerrigan *et al.*, 2018).

Las células troncales exhiben tropismo por sitios de daño tisular, así como a microambientes tumorales donde se secreta una variedad de sustancias, incluidos factores derivados de la inflamación y factores angiogénicos (Namba *et al.*, 2015).

1.4 Limitaciones en el uso de las células troncales

Uno de los primeros avances en el área de la terapia celular fue llevado a cabo por James Thomson en la Universidad de Wisconsin en 1998, quien reportó la generación de las primeras células troncales embrionarias de humano, aisladas de embriones humanos en etapas tempranas (Glicksman, 2018; Thomson *et al.*, 1998).

Encontraron que las células troncales embrionarias son pluripotentes, lo que indicaba podrían diferenciarse *in vitro* en cualquier célula o tejido del cuerpo. El uso de células troncales embrionarias generó mucho entusiasmo, pero al mismo tiempo provocó problemas éticos por lo que se restringió el uso de embriones humanos para la obtención de células troncales embrionarias (Glicksman, 2018).

Otra limitación en el uso de células troncales en terapias celulares es el rechazo inmune. Diferentes grupos han desarrollado estrategias para obtener células que no generen esta respuesta inmune, la mayoría de los estudios más recientes que se han llevado a cabo han utilizado las células troncales propias del paciente, denominando este concepto como autólogo (Glicksman, 2018).

De acuerdo al potencial de las características naturales de las células troncales, la ingeniería genética ha logrado el desarrollo *in vitro* de células con características similares que se obtienen a partir de células diferenciadas, denominadas como células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs).

1.5 Células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)

Las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), son un tipo de células troncales pluripotentes que se obtienen *in vitro* a partir de células somáticas diferenciadas de adulto.

La transformación de células somáticas a células troncales pluripotentes se logró por primera vez mediante la inducción de la expresión forzada de factores de transcripción específicos como OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC (Takahashi y Yamanaka, 2006; Herberts *et al.*, 2011).

1.6 Factores de transcripción involucrados en la reprogramación de células diferenciadas

Estos factores de transcripción son clave para inducir pluripotencia en células somáticas. OCT4, es un factor de transcripción codificado por el gen Pou5f1 y está involucrado en embriogénesis y mantenimiento de células troncales (Van Schaijik *et al.*, 2017).

SOX2, es conocido por sus funciones en el estado de pluripotencia, mantenimiento y auto-renovación de las células troncales y es un factor esencial en la generación de células troncales pluripotentes (Feng y Wen, 2015).

NANOG, es un factor de transcripción que dirige la propagación de células troncales embrionarias humanas (hESC) y median la inducción de la pluripotencia (Van Schaijik *et al.*, 2017).

KLF4, es un miembro de la familia “kruppel” de factores de transcripción de dedos de zinc, que está involucrado en la regulación del ciclo celular, mantenimiento de la pluripotencia y desarrollo epidermal (Van Schaijik *et al.*, 2017).

c-MYC, es una oncoproteína involucrada en regular un amplio número de procesos incluyendo apoptosis, crecimiento celular y división, angiogénesis y diferenciación (Van Schaijik *et al.*, 2017).

Lin28, es una proteína de unión al ARN que desempeña un papel crítico en el desarrollo embrionario, tumorigénesis y pluripotencia, sin embargo, sus funciones exactas son desconocidas (J. Zhang *et al.*, 2016).

En 2006, Takahashi y Yamanaka desarrollaron un experimento donde emplearon 24 genes candidatos que fueron seleccionados por su relación con la pluripotencia de las células troncales embrionarias y descubrieron que estos cuatro factores: OCT4 (también conocido como POU5F1), SOX2, KLF4

y c-MYC son suficientes para reprogramar fibroblastos adultos de ratón en células iPS (Takahashi y Yamanaka, 2006; Robinton y Daley, 2012).

1.7 Inducción de células troncales pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón mediante factores definidos.

El grupo de Yamanaka, examinó el efecto al retirar de manera individual cada uno de los factores y observaron que al remover OCT4 o KLF4 se elimina la aparición de células iPS. Al remover SOX2 o c-MYC se observan algunas células iPS, sin embargo, en el caso de c-MYC las células que se observan no tienen forma similar a las células troncales embrionarias. De acuerdo a estos resultados concluyeron que los cuatro factores son necesarios para la reprogramación (**Fig. 1.3 A**) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

Las células iPS que obtuvieron en estos experimentos exhibieron una morfología similar a las células troncales embrionarias, incluyendo una forma redonda, nucléolos grandes y citoplasma escaso (**Fig. 1.3 B**) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

El análisis mediante RT-PCR reveló que las células iPS expresaban los marcadores de las células troncales embrionarias, incluyendo *Oct3/4*, *Nanog*, *Sox2* (**Fig. 1.3 C**). Además, estas células fueron positivas para fosfatasa alcalina y SSEA-1, que son indicadores del estado de pluripotencia (**Fig. 1.3 D**) (Takahashi y Yamanaka, 2006).

El estado de pluripotencia es un estado dinámico, esto explica como los niveles de SOX2 y OCT4 controlan el desarrollo y el mantenimiento de las células troncales. En las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), que expresan OCT4, SOX2, KLF4, NANOG y c-MYC, se sugiere que estos factores inician una cascada de activación de genes que generan la pluripotencia (Van Schaijik *et al.*, 2017).

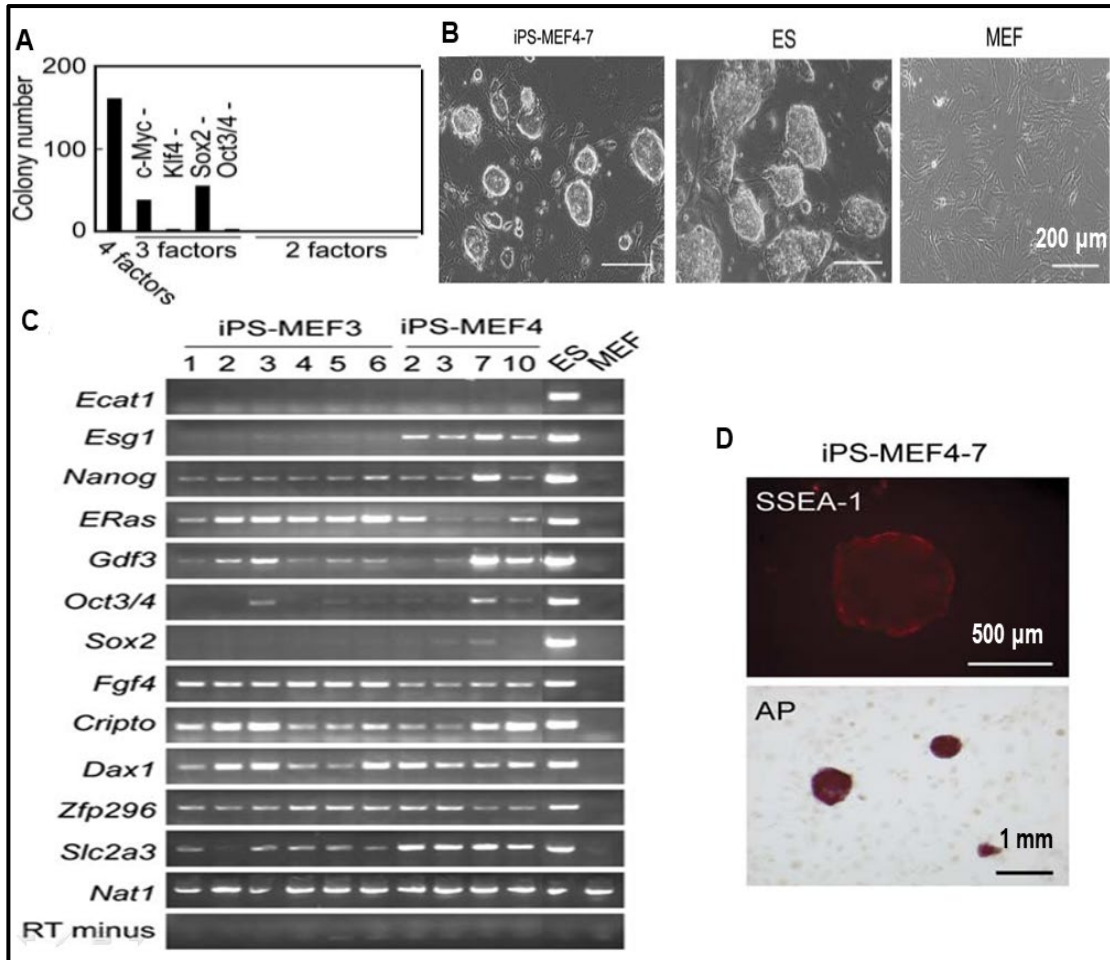


Figura 1.3 Inducción de células troncales pluripotentes a partir de cultivos de fibroblastos de ratón mediante factores definidos. A) Efecto de formación de colonias al retirar de manera individual cada uno de los factores c-MYC, KLF4, SOX2 y OCT3/4. B) Comparación de morfología de las células troncales pluripotentes inducidas (iPS), troncales embrionarias (ES) y fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). C) Análisis de RT-PCR de genes marcadores de células troncales embrionarias (ES) en células iPS, ES y MEFs. D) Las células iPS fueron teñidas con un anticuerpo monoclonal de ratón contra SSEA-1 o con fosfatasa alcalina (Takahashi y Yamanaka, 2006).

La inducción de pluripotencia lograda inicialmente por Yamanaka y sus colegas fue realizada mediante el uso de vectores retrovirales. El uso de vectores retrovirales o lentivirales dan como resultado la integración de DNA exógeno en el genoma de la célula y esto crea un obstáculo para la aplicación terapéutica de las células iPS, ya que estos factores de

transcripción podrían activar o inactivar genes huésped, resultando en tumorigenicidad. (Warren *et al.*, 2010; Okita *et al.*, 2008).

Con el fin de aplicar las características de las células troncales en diferentes tipos de terapias celulares, es importante generar células iPS con métodos no integrativos, por lo tanto, se ha reportado que es posible generar células iPS sin el uso de vectores retrovirales, aunque con una eficiencia menor (Okita *et al.*, 2008).

Por lo tanto, la terapia con células troncales requeriría idealmente la generación de iPSCs a partir de métodos no integrativos como los virus Sendai (Fusaki *et al.*, 2009), el sistema piggyBac (Woltjen *et al.*, 2009), proteínas recombinantes (Kim *et al.*, 2009), ARNm sintético (Yu *et al.*, 2009) y vectores episomales (Okita *et al.*, 2011).

Varios grupos de investigación han reportado que los vectores episomales son capaces de reprogramar fibroblastos humanos a iPSCs (Seok *et al.*, 2018). Entre los diferentes métodos no integrativos, el uso de vectores episomales es técnicamente simple, rápido, y reproducible para generar iPSCs (Seok *et al.*, 2018).

Recientemente, se ha prestado atención a los métodos físicos que emplean fuerza física para perforar la membrana celular e introducir ácidos nucleicos exógenos en la célula, un ejemplo de los métodos físicos es la electroporación (Du *et al.*, 2018).

1.8 Electroporación

La electroporación es una técnica donde se emplean pulsos eléctricos para introducir DNA en las células. Esta técnica puede ser empleada en casi todos los tipos celulares y es posible lograr una transfección estable o transitoria de los genes de expresión. Además, es una técnica sencilla, ya que requiere de pocos pasos para su realización (Potter y Heller, 2018).

La electroporación es un fenómeno físico que resulta de cambios transitorios en la permeabilidad y la conductividad eléctrica en la membrana nuclear y plasmática de la célula (**Fig. 1.4**). Este fenómeno ocurre al aplicar en células o tejidos un pulso corto con un campo eléctrico alto. Una acumulación de cargas debido a la migración de iones ocurre cuando el campo eléctrico es aplicado, la membrana de la célula sufre un reacomodo en su morfología después de exceder el umbral crítico. Por lo tanto, la membrana presenta la formación de poros. Estos poros son suficientemente grandes para permitir el paso de macromoléculas (Rodrigues *et al.*, 2018).

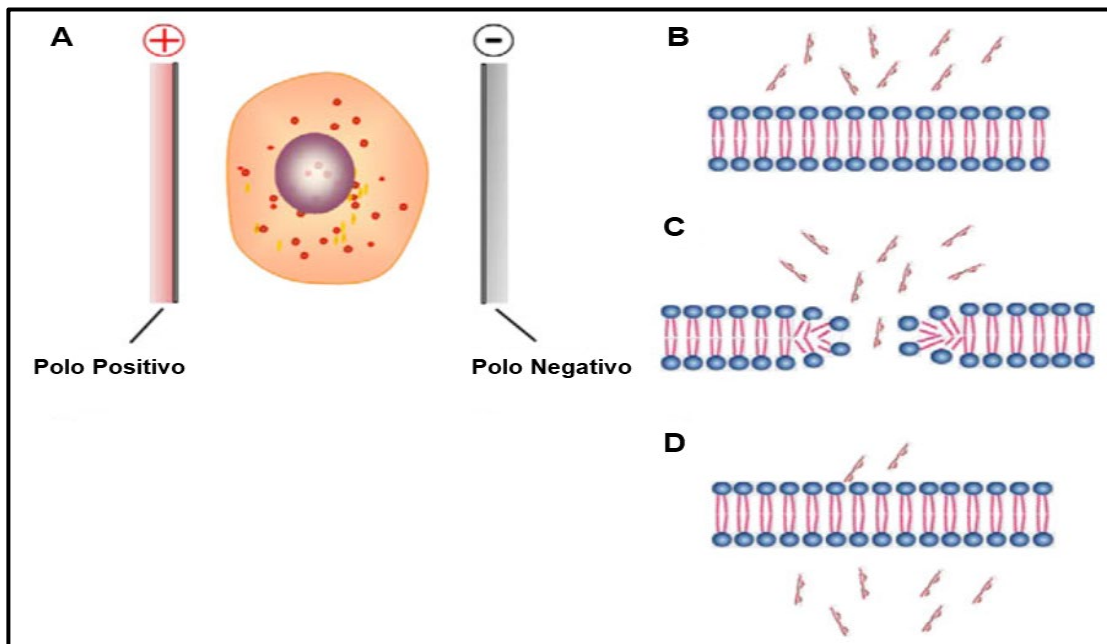


Figura 1.4 El principio de electroporación. A) Una célula es expuesta a un pulso eléctrico corto con un campo eléctrico alto. B-C) Cuando la fuerza del campo eléctrico excede el umbral del voltaje, se forman poros en la membrana celular de manera temporal y los ácidos nucleicos exógenos entran en la célula. D) Después, la membrana de la célula es resellada en un rango de minutos después de que la fuerza del campo eléctrico cae hasta el umbral del voltaje (Du *et al.*, 2018).

Aunque la electroporación ha ganado popularidad para la transferencia génica y es efectiva en una gran variedad de tipos celulares, cada situación requiere de condiciones diferentes que dependen de las características especiales del tipo celular (Potter, 1998).

1.9 Aplicaciones de las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC)

Las aplicaciones terapéuticas de las células troncales se han logrado debido a los avances en tecnologías de cultivo celular, que han hecho posible aislar estas células y cultivarlas de manera *in vitro*. Además, la ingeniería genética ha incrementado la eficiencia terapéutica de las células troncales aumentando las posibilidades de realizar modificaciones y corregir fallas genéticas (Kerrigan *et al.*, 2018).

La tecnología de reprogramación y las células iPS tienen potencial para ser empleadas para modelar y tratar enfermedades humanas (Robinton y Daley, 2012). Estas células potencialmente pueden ser aplicadas en el área de medicina regenerativa personal, terapias celulares y modelos de enfermedades, además de su valor en el estudio del proceso de determinación del destino celular (Yakubov *et al.*, 2010).

Además, la reprogramación de células diferenciadas al estado de pluripotencia es una herramienta que ofrece la obtención de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) propias del paciente, que pueden ser empleadas como modelos de enfermedades o para desarrollar terapias autólogas dirigidas a la reparación de deficiencias derivadas de lesiones, enfermedades y envejecimiento (Warren *et al.*, 2010).

Debido al potencial de auto-renovación y diferenciación, las células troncales se consideran con alto potencial en el área de la medicina regenerativa. Se han realizado pruebas clínicas empleando células troncales, en las que son administradas al tejido u órgano blanco con el objetivo de reparar el tejido lesionado debido a un infarto, insuficiencia renal o traumatismo, etc. Además, se han empleado para generar tejidos u órganos de manera *ex vivo* con el fin de trasplantar estos en los pacientes (Kerrigan *et al.*, 2018).

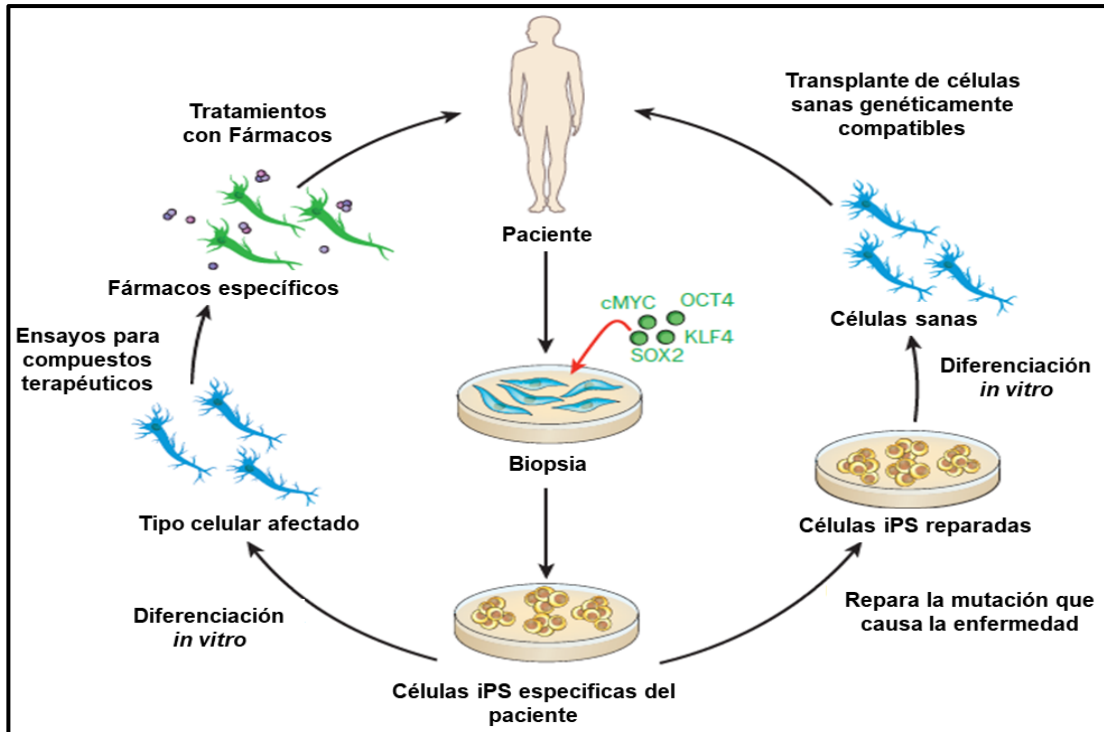


Figura 1.5 Aplicaciones médicas de las células iPS. Las células iPS específicas del paciente (derivadas de la co-expresión ectópica de factores de transcripción en células aisladas de una biopsia de piel) se pueden emplear en una o dos vías. En los casos en que se conoce la mutación causante de la enfermedad, se podrían utilizar los blancos genéticos para reparar la secuencia ADN (derecha). Las células iPS específicas del paciente con la corrección genética se someterían a diferenciación dirigida para obtener el tipo celular afectado para después ser trasplantadas al paciente. Alternativamente, la diferenciación dirigida de las células iPS específicas del paciente en el tipo celular afectado permitirá modelar *in vitro* la enfermedad del paciente y realizar ensayos con posibles fármacos, ayudando al descubrimiento de nuevos compuestos terapéuticos (Modificado de Robinton y Daley, 2012).

La generación de células troncales propias del paciente es una meta importante en el campo de la medicina regenerativa. A pesar de los obstáculos que tiene esta técnica, la generación de células iPS propias del paciente y específicas para enfermedades a través de la reprogramación, se ha convertido casi en rutina. Estas células ofrecen una plataforma única para obtener una visión mecanística de una gran variedad de enfermedades, para llevar a cabo ensayos de medicamentos, evaluar el potencial

terapéutico y explorar la reparación de genes acoplada a terapias de reemplazo celular (**Fig. 1.5**) (Robinton y Daley, 2012).

1.10 GAS1 (Growth arrest-specific-1)

La proteína GAS 1 (Growth arrest-specific-1), es una proteína que induce arresto del ciclo celular y apoptosis en diferentes tumores. La proteína se encuentra anclada a la membrana externa mediante un sitio glicosilfosfatidilinositol (GPI).

Estructuralmente, GAS1 presenta homología con los receptores (GFR α s) (Schueler-Furman *et al.*, 2006) de la familia de receptores a ligandos del GDNF (factor neurotrófico derivado de célula glial), y sus efectos antitumorales son causados por su habilidad de inhibir la vía de señalización mediada por GDNF induciendo un proceso apoptótico intrínseco (Zarco *et al.*, 2012).

Brevemente, GAS1 inhibe la fosforilación de RET y causa una importante disminución en la fosforilación de AKT; este proceso facilita la defosforilación de BAD que se transloca a la mitocondria promoviendo la liberación del citocromo-C al citosol, induciendo la activación de las caspasas-9 y 3 ,por lo tanto, activando el proceso de apoptosis (**Fig. 1.6**) (Zarco *et al.*, 2012).

En nuestro laboratorio se ha desarrollado una forma soluble de GAS1 (tGAS1) que actúa de manera autocrina y paracrina, induciendo la muerte de las células productoras de tGAS1 y de las células en la vecindad del tumor, incrementando así el efecto terapéutico (López-Ornelas *et al.*, 2011; López-Ornelas *et al.*, 2014).

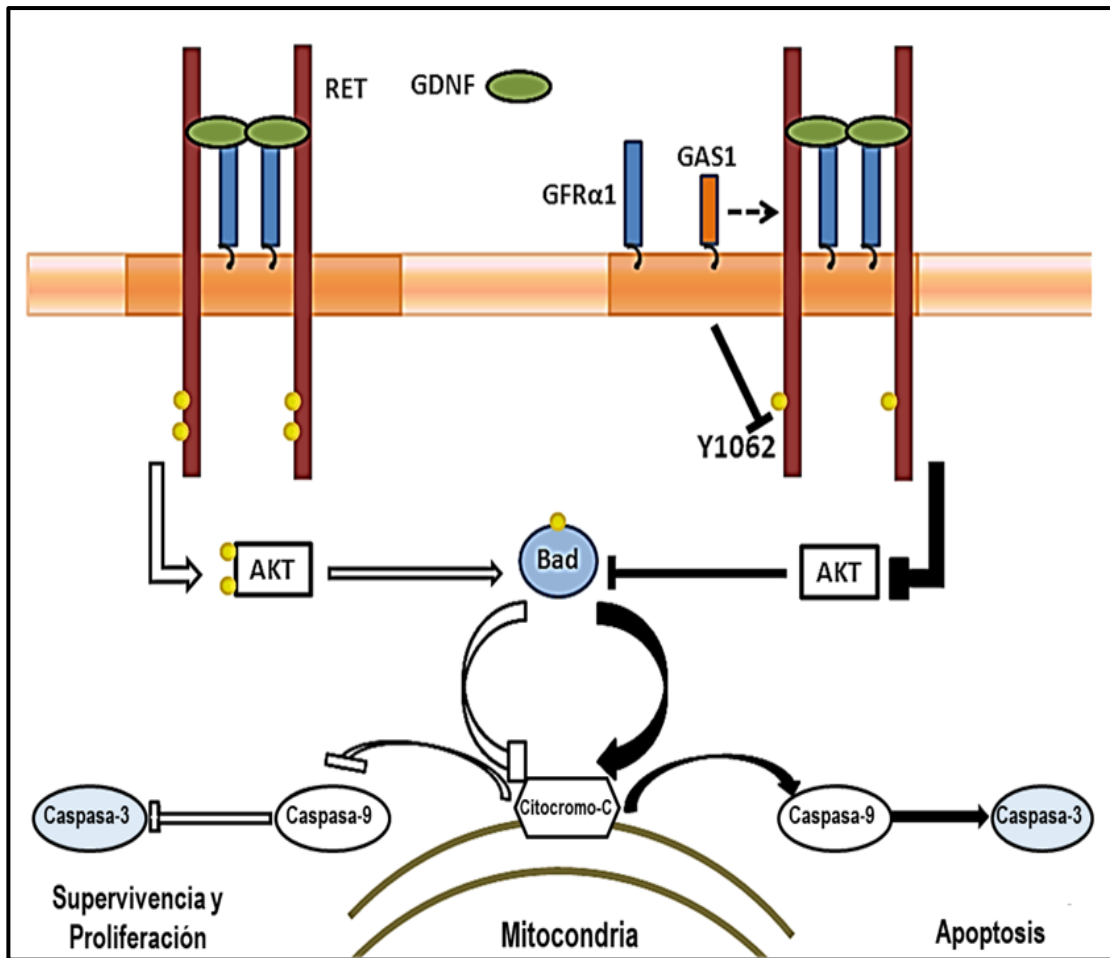


Figura 1.6 Modelo propuesto de la acción de GAS1. Modificado. A) Mecanismo de acción de GAS1 (Modificado de Zarco *et al.*, 2012).

Se generó un vector lentiviral inducible con tetraciclina capaz de expresar una forma de GAS1 que es secretable. El vector lentiviral codifica para la proteína de GAS1 truncada en la Arginina 315, carente de la secuencia consenso GPI, por lo tanto, esta proteína no está anclada a la membrana celular y es secretada de la célula (**Fig. 1.7**) (López-Ornelas *et al.*, 2011).

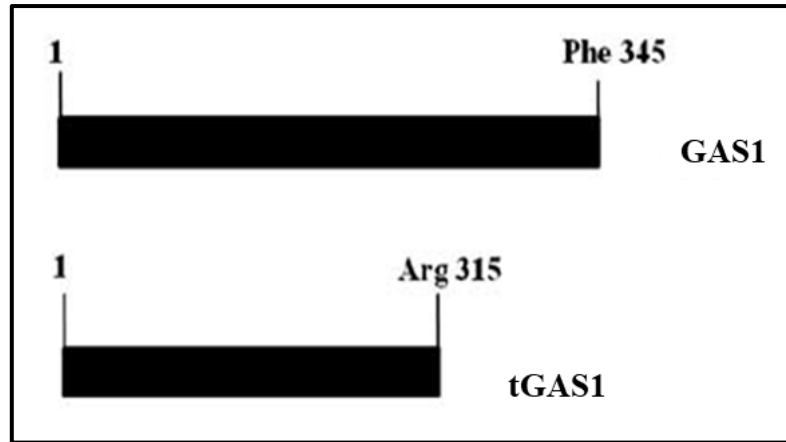


Figura 1.7 Representación esquemática de las diferentes formas de GAS1. Proteína completa, incluyendo Phe 345 (GAS1); la forma soluble truncada, incluyendo Arg 315 (tGAS1) (Modificado de López-Ornelas *et al.*, 2011).

De acuerdo con estos antecedentes, López-Ornelas empleó vectores lentivirales para generar células troncales neurales (NSC) que expresaban la forma soluble de GAS1 bajo la regulación transcripcional de tetraciclina, con el fin de evaluar el tropismo de estas células y la eficiencia en la metodología para la entrega de genes terapéuticos en un modelo de glioblastoma (López-Ornelas *et al.*, 2014).

Para ello se inocularon células C6-pDsRed1 en el hemisferio derecho de ratones desnudos, y una semana después los ratones se dividieron en cuatro grupos: el primer grupo fue tratado únicamente con tetraciclina; el segundo grupo fue inoculado en el hemisferio contralateral con células NSC ReNcell-GFP; el tercer y cuarto grupo se inocularon en el hemisferio contralateral con células ReNcell-GFP/tGAS1/TR (López-Ornelas *et al.*, 2014).

Se permitió que las NSC migraran durante una semana y se administró tetraciclina durante siete días a los grupos 1, 2 y 4. Veintiún días después se observó que las NSC habían migrado hacia el hemisferio contralateral inoculado con células tumorales (C6).

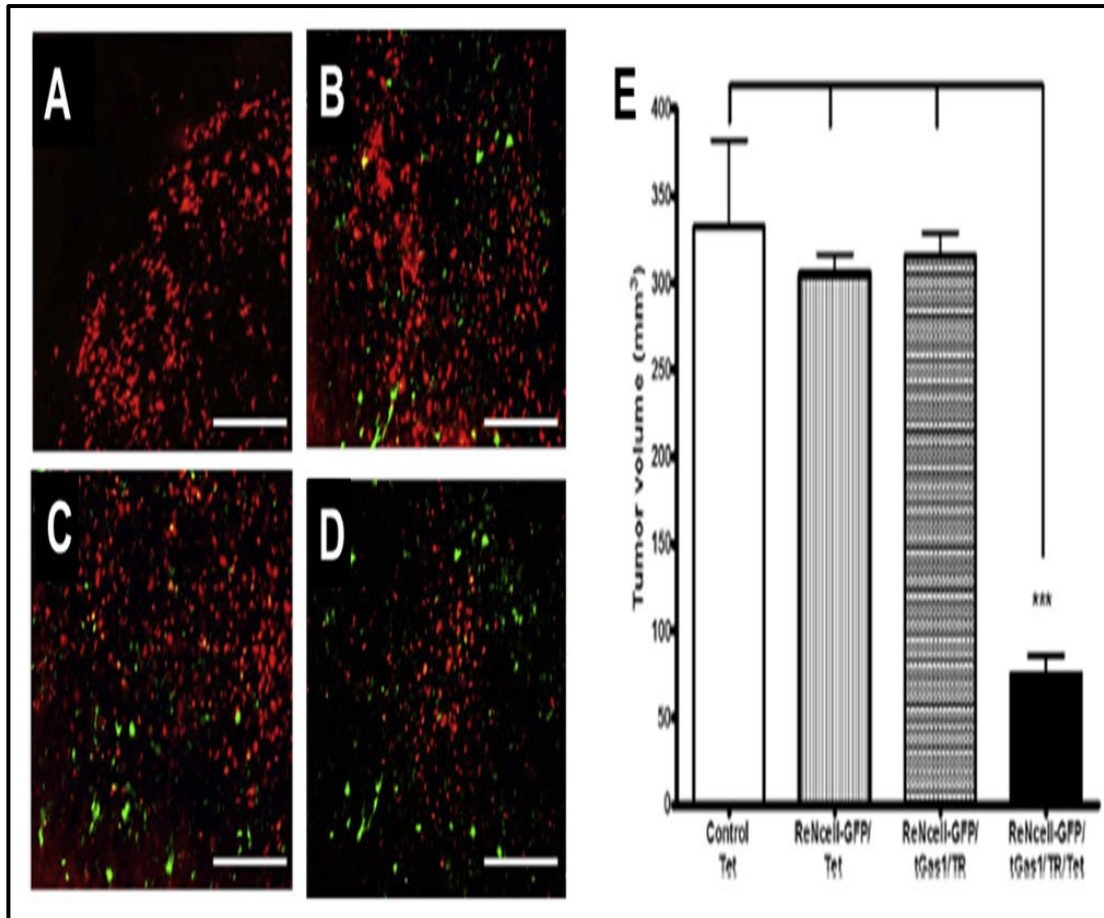


Figura 1.8 Evaluación de tropismo y efecto terapéutico de NSC que expresan la forma soluble de GAS1 y PTEN en un modelo de glioblastoma (GBM). A) Imágenes representativas muestran microscopia de fluorescencia de tumores intracerebrales de diferentes grupos experimentales. Células tumorales se muestran en rojo y células troncales neurales (NSC) se muestran en verde. B) Volumen de los tumores de diferentes grupos experimentales (López-Ornelas et al., 2014).

Se puede observar en las imágenes representativas de la (**Fig. 1.8 A**) a las células tumorales C6 (en rojo) que fueron tratadas únicamente con tetraciclina, (**Fig. 1.8 B y C**) a las células tumorales C6 y las NSC (en verde) que migraron desde el hemisferio contralateral, por último, (**Fig. 1.8 D**) a las NSC que migraron del hemisferio contralateral tratadas con tetraciclina, y una disminución en el número de células tumorales C6 por la expresión de tGAS1 en la zona del tumor (López-Ornelas *et al.*, 2014).

Se determinó el volumen del tumor para evaluar el efecto de tGAS1 y se observó que las NSC que expresaban tGAS1 por la administración de tetraciclina, mostraron una reducción significativa en el volumen del tumor comparado con los controles (**Fig. 1.8 E**). Por lo tanto se puede concluir que las NSC que expresaban tGAS1 tuvieron la capacidad de migrar a zonas tumorales y mostraron un efecto anti-tumoral (López-Ornelas *et al.*, 2014).

1.11 PTEN (Phosphatase and tensin homolog)

Por otra parte, PTEN (Phosphatase and tensin homolog), es un supresor tumoral que se encuentra mutado en diferentes tipos de cáncer, específicamente, PTEN antagoniza la actividad de PI3K (fosfatidilinositol-3 cinasa) por la desfosforilación de PIP3 (**Fig. 1.9**) (Hopkins *et al.*, 2013).

PIP3 recluta a las proteínas AKT y PDK a la membrana, permitiendo la activación la vía de AKT para promover la proliferación celular e inhibir la apoptosis. PTEN disminuye la actividad de AKT, a través de disminuir la concentración en la membrana de PIP3 y la vía de supervivencia/proliferación, haciendo que PTEN sea uno de los más importantes supresores de tumores (**Fig. 1.9**) (Li *et al.*, 1997; Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

La regulación de la localización intracelular y actividad de PTEN no ha sido bien descrita. Sin embargo, diferentes estudios han demostrado que PTEN es capaz de salir y permanecer fuera de la célula (B. D. Hopkins, Hodakoski, Barrows, Mense, & Parsons, 2014).

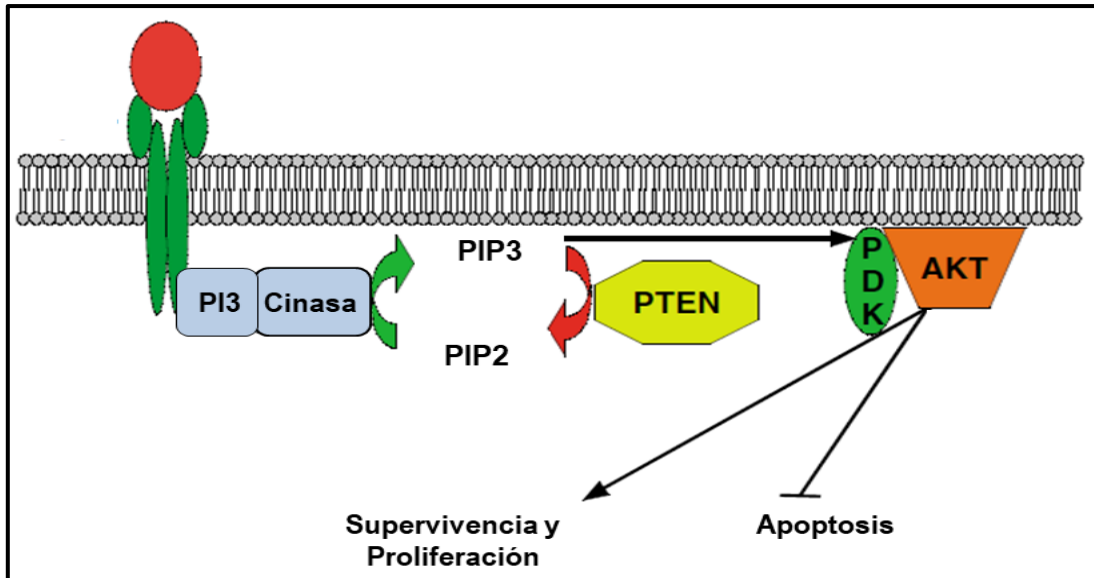


Figura 1.9 Modelo propuesto de la acción de PTEN. Modificado. A) Mecanismo de acción de PTEN. (Planchon *et al.*, 2008).

Se ha reportado una forma secretable de PTEN (PTEN-Long) que también es capaz de disminuir la vía de señalización de PI3K y suprimir el crecimiento tumoral (Hopkins *et al.*, 2013; Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Hopkins *et al.*, analizaron el ARNm de PTEN que revela un codón alternativo de inicio de la traducción (CTG) (**Fig. 1.10**) en el par de base 513 que se encuentra en marco con el codón de inicio de la traducción canónico (AUG) en el par de base 1032 (Hopkins *et al.*, 2013).

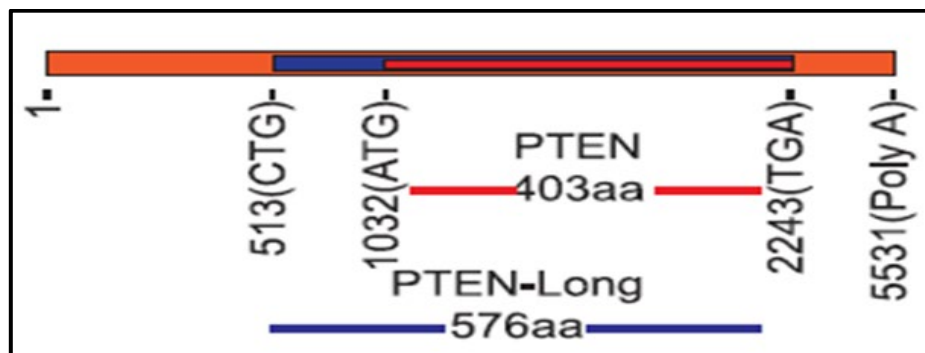


Figura 1.10 PTEN-Long es una variante traduccional de PTEN. ARNm compartido por PTEN/PTEN-Long. Región de PTEN (Rojo) y PTEN-Long (Naranja) (Hopkins *et al.*, 2013).

PTEN-Long contiene 173 amino ácidos en el N-terminal seguido de los clásicos 403 amino ácidos de PTEN, con esta extensión se incluye una secuencia de polialanina que asemeja una secuencia de secreción, y residuos de poliarginina con homología con conocidos péptidos permeables celulares, como el transactivador de la transcripción génica (TAT, por sus siglas en inglés) del virus de la inmunodeficiencia humana (**Fig. 1.11**) que le permite entrar a las células e inhibir la vía de señalización de PI3K de manera *in vitro* e *in vivo* (Hopkins et al., 2014; Leslie y Brunton 2013).

Por tanto, PTEN-Long puede actuar como un agente terapéutico y causar regresión tumoral en diferentes modelos de ratón. La actividad de PTEN-Long comparte el mismo mecanismo de regulación que PTEN canónico. Sin embargo, es posible que existan mecanismos de regulación alternativos (B. D. Hopkins et al., 2014)

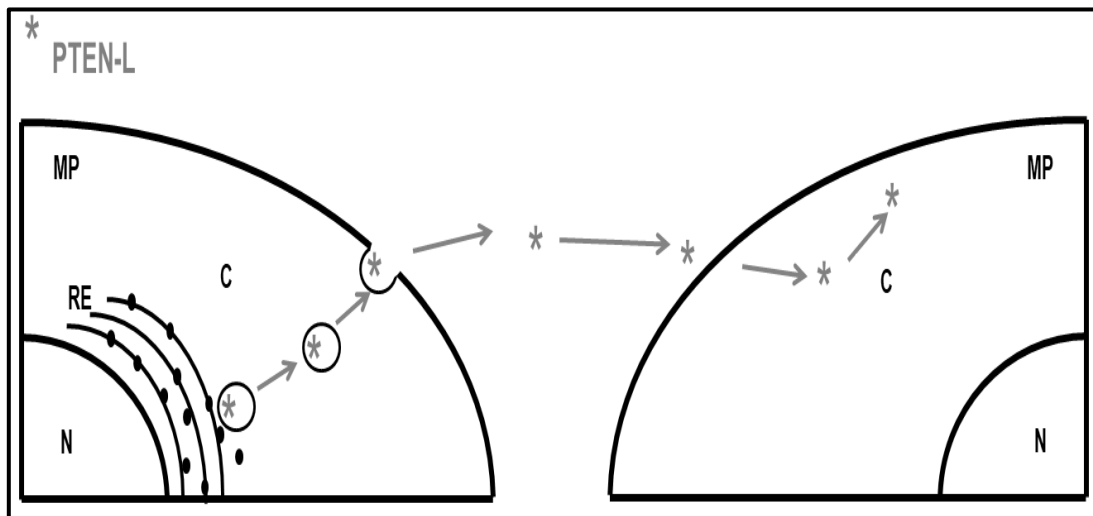


Figura 1.11 Tráfico propuesto para PTEN-Long. La traducción de PTEN-Long (*) ocurre en el retículo endoplásmico (RE) y la proteína sintetizada es transportada en el lumen de vesículas secretoras. Estas vesículas viajan, se fusionan con la membrana y liberan a PTEN-Long al espacio extracelular. Una vez fuera de la célula, PTEN-Long puede interactuar con proteínas y lípidos extracelulares o glicoproteínas en la superficie celular para entrar a la célula. Una vez dentro de la célula, PTEN-Long puede actuar como PTEN canónico en el citoplasma o migrar al núcleo, de cualquier manera la dosis intracelular de PTEN en la célula receptora aumenta (B. Hopkins et al., 2014).

Por otro lado, Sánchez-Hernández desarrolló un trabajo donde propone una estrategia basada en el uso combinado de las formas solubles de GAS1 y PTEN para el tratamiento de glioblastoma (GBM) (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

La evaluación *in vitro* del efecto combinado de GAS1 y PTEN se realizó con la transfección de plásmidos que codifican para GAS1 y PTEN; tGAS1 y PTEN-Long de manera independiente y combinada, se evaluaron los efectos de viabilidad en células U-87 MG (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Se observó que las formas completas y solubles de GAS1 y PTEN reducen el número de células U-87 MG viables, sin embargo, la administración combinada de las formas solubles de GAS1 y PTEN tiene el mayor efecto inhibitorio de la viabilidad celular (**Fig. 1.12 A**) (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

De acuerdo con el efecto observado en la terapia combinada de tGAS1 y PTEN-Long, se generó un vector lentiviral con un sistema de expresión dual con un péptido p2A, que genera dos proteínas solubles a partir de un solo promotor para producir cantidades equimolares de las dos moléculas (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Para evaluar *in vivo* la eficiencia del vector lentiviral de inhibir el crecimiento de tumores, se inocularon subcutáneamente células U-87 MG en ratones desnudos. Cuando los tumores alcanzaron un volumen aproximado a 30 mm³, recibieron el lentivirus productor-tGAS1-p2A-PTEN-Long, un virus productor-EGFP o el mismo volumen de vehículo los días 0, 2 y 4 (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

El crecimiento del tumor se determinó a los 28 días después de aplicado el tratamiento. Se observó una disminución notable en el volumen (**Fig. 1.12 B**) del tumor en los animales tratados con las formas solubles tGAS1 y PTEN-Long, en comparación con los grupos control donde los tumores continuaron creciendo.

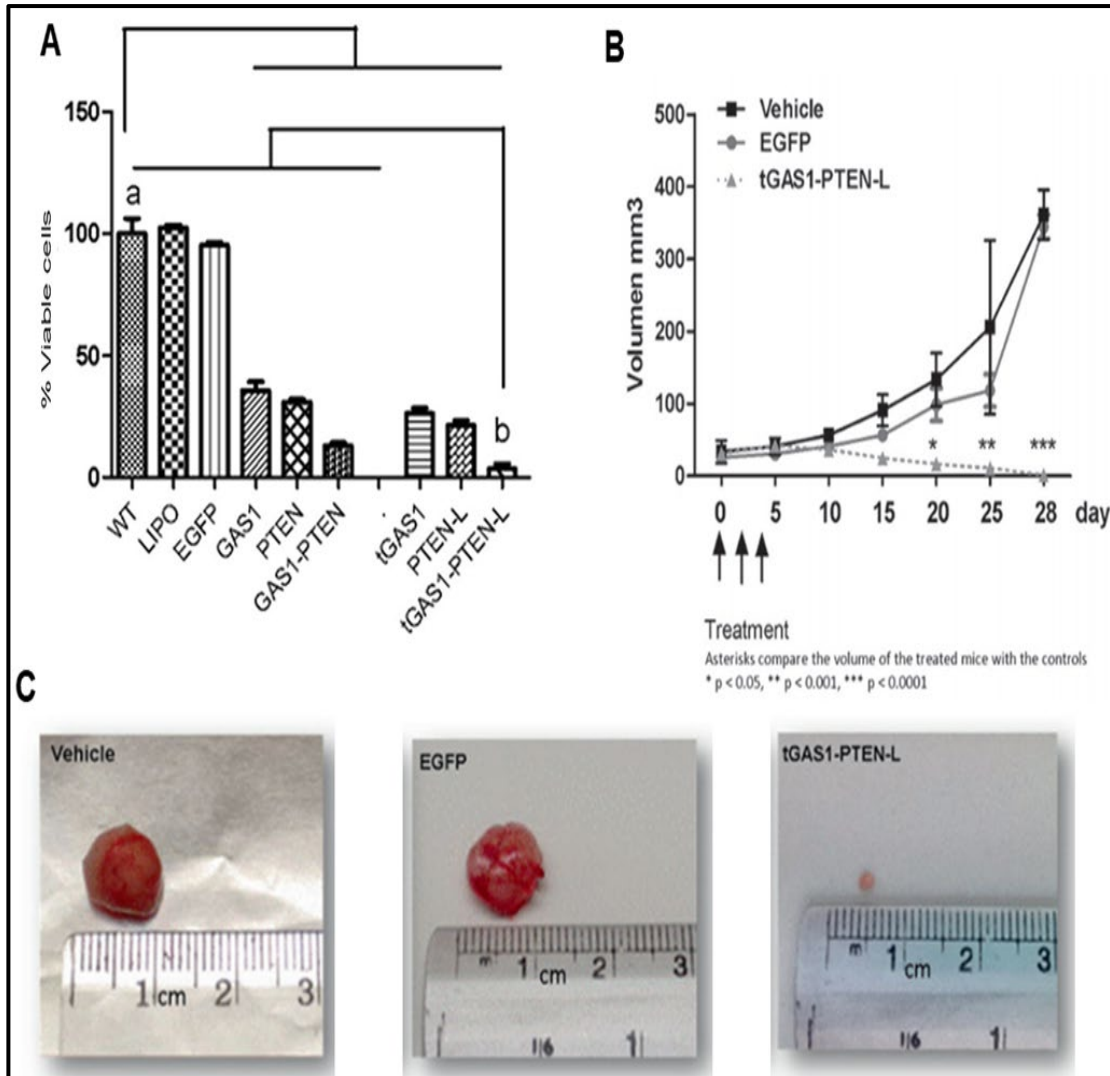


Figura 1.12 Efecto de la expresión combinada de las formas solubles de GAS1 y PTEN en la inhibición del crecimiento del glioblastoma (GBM). A) Comparación de los efectos de la forma completa y soluble de GAS1 y PTEN en la viabilidad celular. B) Disminución en el volumen de los tumores después de los diferentes tratamientos. C) Experimento representativo que muestra el tamaño del tumor después de los diferentes tratamientos (Sánchez-Hernández et al., 2018).

Cuando, se realizó la disección de los tumores, se observó una reducción notable en el tamaño del tumor tratado con tGAS1-p2A-PTEN-L en comparación con los controles (**Fig. 1.12 C**). Estos datos sugieren que el

tratamiento combinado con tGAS1 y PTEN-L es efectivo en la reducción del crecimiento del glioma de manera *in vivo* (Sánchez-Hernández *et al.*, 2018).

Basado en las propiedades naturales de las células troncales y los efectos reportados de tGAS1 y PTEN-Long, se propone desarrollar nuevas estrategias para la entrega de estos genes terapéuticos y su uso en futuras terapias contra glioblastoma (GBM).

JUSTIFICACIÓN

Las células troncales presentan tropismo hacia sitios tumorales, sin embargo, la obtención de este tipo de células ha generado problemas éticos debido al uso de células troncales embrionarias, por lo tanto, se requiere el desarrollo de estrategias para la obtención de células con características similares. Se sabe que al inducir la expresión forzada de genes específicos, es posible llevar a cabo la reprogramación de células somáticas en células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs), que cuentan con las mismas propiedades de las células troncales embrionarias.

Por lo tanto, la presente investigación propone la obtención de células iPS que expresen tGAS1-PTEN-Long, para ser empleadas como posible vehículo en futuras terapias contra el cáncer.

HIPÓTESIS

La infección de las células iPS con el vector lentiviral (plenti6.3tGAS1-P2A-PTEN-Long) permitirá la obtención de células iPS que expresen tGAS1-PTEN-Long

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) que expresen tGAS1-PTEN-LONG a partir de fibroblastos de humano.

Objetivos Particulares

- 1.- Amplificación de los plásmidos pCXLE-hUL, pCXLE-hSK y pCXLE-hOCT3/4.
- 2.- Electroporación de células BJ con los plásmidos pCXLE-hUL, pCXLE-hSK y pCXLE-hOCT3/4.
- 3.- Caracterizar la obtención de las células iPS (cambios morfológicos y detección de fosfatasa alcalina).
- 4.- Infección de las células iPS con tGAS1-PTEN-L.

II. MATERIALES

2.1 Materiales

2.1.1 Material Biológico

- Células químicamente competentes de *Escherichia coli*
- Enzima de restricción *EcoRI* (NEB)
- Células BJ y HFF (Fibroblastos de Humano) (Donadas por el Dr. Adolfo López Ornelas)
- HEK293 FT (Invitrogen)

2.1.2 Plásmidos

- Plásmido pCXLE-hOCT3/4 (Addgene, no. catalogo 27076)
- Plásmido pCXLE-hSK (Addgene, no. catalogo 27078)
- Plásmido pCXLE-hUL (Addgene, no. catalogo 27080)

2.1.3 Medios de cultivo

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) alta glucosa (Gibco®)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) F12 (Gibco®)
- Medio Luria-Bertani (LB) (SIGMA Life Science)

2.1.4 Antibióticos

- Ampicilina (Sigma-Aldrich)
- Penicilina-Estreptomicina (Gibco®)
- Blastidina (Invitrogen)

III. METODOLOGÍA

3.1 Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* con los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL

Para realizar la amplificación de los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL se transformaron células *Escherichia coli* químicamente competentes. Para ello, a un vial de células competentes se agregaron 2 µg del plásmido correspondiente, manteniéndolas en hielo por 30 minutos. Después se incubaron las células por 90s en un baño de agua a 42 °C, el vial se removió del baño y se colocaron inmediatamente en hielo de 2-5 minutos. Después se adicionaron 500 µL de medio nutritivo LB a las células y se incubaron a 37 °C por 1h, con agitación de 225 rpm. Una vez cumplido el tiempo de incubación, las células se sembraron por plaqueo en cajas de medio sólido Luria-Bertani (LB) que contienen 100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich). Las células sembradas se dejaron crecer toda la noche a 37 °C, y una vez cumplido el tiempo de incubación, se analizaron y contaron las colonias.

3.2 Extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina con SDS

Una vez que se seleccionaron las colonias, éstas fueron enumeradas y aisladas en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). Cada clona fue transferida a tubos Falcon de 15 mL estériles conteniendo 5 mL de medio LB con 100 µg/mL de Ampicilina (Sigma-Aldrich). Los tubos inoculados se incubaron a 37 °C con agitación constante por 16 h y los cultivos obtenidos se transfirieron a tubos de 1.5 mL realizando una centrifugación consecutiva por 5 minutos a 8 000 rpm, hasta obtener el pellet bacteriano libre de medio de cultivo.

Posteriormente, el botón celular se resuspendió en 300 μ L de solución I fría por vortex hasta su dilución total. En seguida, se adicionaron 300 μ L de solución II se invirtieron los tubos suavemente y fueron incubados de 2-3 minutos, se agregaron 300 μ L de solución III fría, se invirtieron los tubos 4 veces e incubaron 10 minutos en hielo, después se centrifugaron por 15 minutos a 13 000 rpm a 4 °C. En un tubo estéril nuevo se separó el sobrenadante obtenido por centrifugación y se agregó un volumen de isopropanol al 100%, se invirtieron los tubos 4 veces e incubaron 2 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugaron a 13 000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se removió el sobrenadante y se retiró el exceso de isopropanol. Se agregaron 1000 μ L de etanol al 70 % y se mezcló por vortex para despegar el pellet, se centrifugó a 13 000 rpm durante 10 minutos y se decantó. Finalmente la pastilla se dejó secar y se resuspendió en 300 μ L de agua desionizada estéril. Se verificó la integridad por gel de agarosa y la muestra fue almacenada a -20 °C.

3.3 Restricción ADN plasmídico con la enzima de restricción *EcoRI*

Se realizó una reacción de restricción para los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL. La reacción se preparó en tubos de PCR adicionando: 2.5 μ L de regulador, 2 μ g de ADN plasmídico, 0.5 μ L de *EcoRI* (NEB) y se llevó a un volumen de 25 μ L de agua desionizada estéril, se incubó la reacción a 37 °C por 3 h. El producto de la digestión se observó en un gel de agarosa al 1 % para registrar el tamaño del plásmido linearizado con ayuda de un marcador de tamaño molecular (1Kb DNA Plus Ladder de Invitrogen).

3.4 Activación y mantenimiento de células BJ y HFF (Fibroblastos de Humano)

Todos los pasos se realizaron en una campaña de flujo y en condiciones de asepsia. Se descongeló un criovial con 1×10^6 células/mL en baño maría a 37 °C. Bajo la campana se colocó en una placa de 60 mm, 3-4 mL de medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium)/F12 (Gibco®) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) al 10% y antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 mg/ml)(Gibco®), se agregó el contenido del criovial y se disgregaron las células resuspendiendo suavemente. Fueron incubadas en atmósfera controlada humidificada saturada al 5 % de CO₂ con temperatura de 37 °C. Se realizaron cambios de medio al cultivo para evitar estrés debido a sobrepoblación y escases de nutrientes en el medio hasta que alcanzaron un nivel de confluencia mayor al 70 %. Se etiquetaron incluyendo nombre de la línea, número de pase y la fecha.

3.5 Inactivación mitótica de Fibroblastos de humano (HFF) para emplearse como células alimentadoras (feeders)

El día anterior a la inactivación, se añaden 2 mL de gelatina al 0.1% a placas de 35 mm y se incuban a 37 °C toda la noche. Sacar las placas de la incubadora media hora antes de sembrar las células inactivadas y retirar la gelatina justo antes de sembrar las células.

Se preparó una solución de 5 µl/ml de Mitomicina C (Roche) en medio de cultivo (concentración final del stock 10 µg/ml) y se filtró. Se lavó con PBS la placa de cultivo que se inactivó, 2-3 veces, se añadió a los fibroblastos de humano (HFF) el volumen correspondiente de la solución de Mitomicina C (Roche) y se incubó durante 3 hrs a 37 °C y 5% CO₂. Se lavaron las placas con los fibroblastos inactivados, una vez con medio de cultivo para HFFs y dos veces con PBS. Se añadió 1 mL de tripsina a la placa y se incubó 5

minutos a 37 °C, 5% CO₂. Es importante controlar que los fibroblastos inactivados se despegaron y formaron una suspensión de células independientes. Se añadieron 3 mL de medio para HFFs a la placa para detener la acción de la tripsina y se recuperó la suspensión celular en un tubo Falcon de 15 mL. Se centrifugó a 1 200 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante y el botón de células se resuspendió en medio nuevo para HFFs, se realizó el recuento celular con la cámara de Neubauer y fueron sembradas según lo indicado en la siguiente tabla.

Este protocolo se realizó el día previo a la electroporación.

| Superficie de cultivo | Densidad | Volumen de medio |
|------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Placas de 35 mm | 3.75x10 ⁵ cel/placa | 2 mL |
| Placas de 60 mm | 1.8X10 ⁶ cel/placa | 4 mL |
| Placas de 100 mm | 3.6X10 ⁶ cel/placa | 10 mL |

3.6 Electroporación de células BJ con los vectores episomales: pCXLE-hUL, pCXLE-hSK y pCXLE-hOCT3/4

Antes de realizar el protocolo de electroporación preparar la solución Cytomix.

Materiales:

1. Esterilizar los siguientes stocks a-f por autoclave:
 - a. 2.4M KCl: 17.9 g KCl/100 mL
 - b. 30 mM CaCl₂: 0.44 g CaCl₂ 2H₂O/100 mL
 - c. 200 mM K₂PHO₄/KH₂PO₄, pH 7.6: 4.56 g K₂HPO₄ 3H₂O/100 mL (Solución 1) y 2.72 g KH₂PO₄/100 mL (Solución 2). Mezclar solución 1 con solución 2 a pH 7.6.
 - d. 0.5M HEPES, pH 7.6: 11.92 g HEPES/100 mL; ajustar el pH con 1M KOH.

- e. 80 mM EGTA, pH 7.6: 3.04 g EGTA/100 mL; ajustar el pH con 1M KOH.
 - f. 100 mM MgCl₂: 2.0 g MgCl₂ 6H₂O/100 mL.
2. Solución 2X Cytomix. Mezclar el stock de soluciones a-f en el siguiente orden: 27mL H₂O + 5 mL a + 0.5 mL b + 5 mL c + 5 mL d + 2.5 mL e + 5 mL f. Esta solución puede almacenarse a temperatura ambiente por algunas semanas.

Se aspiró el medio de cultivo y se lavó la placa de cultivo con PBS, se añadió tripsina a la placa y fue incubada 5 minutos a 37 °C, 5% CO₂. Se añadió medio a la placa para detener la acción de la tripsina y se recuperó la suspensión celular en un tubo Falcon de 15 mL. Se centrifugo a 1 200 rpm durante 5 minutos. Se aspiró el sobrenadante y se resuspendió el botón de células en medio nuevo, se realizó el recuento celular con la cámara de Neubauer.

Para la electroporación se emplearon 1.5×10^6 - 2×10^6 células, se realizaron dos lavados con 5 mL de solución Cytomix centrifugando a 1 200 rpm durante 3 minutos. El botón de células se resuspendió en 300 µl de solución Cytomix y el volumen fue transferido a una cubeta de electroporación de 2 mm. Se colocaron 3 µl de los plásmidos: pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL en la cubeta de electroporación, con un volumen final de 309 µl. Empleando el sistema Electroporator II (Invitrogen) se aplicó un protocolo de electroporación estándar (un pulso a 320 V, 500 µF). Después de dar el pulso eléctrico se incubó la cubeta en hielo durante 10 minutos.

Después de la incubación, las células fueron sembradas en placas de 60 mm con medio de cultivo de fibroblastos DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium)/F12 (Gibco®) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco®) al 10% con Antibióticos (Penicilina 100 U/ml y Estreptomicina 100 mg/ml) (Gibco®). El séptimo día las células fueron tripsinizadas y sembradas en células alimentadoras con medio para iPSCs suplementado

con bFGF (0.8 μ l/ml) (Gold Biotechnology) humano y se cambió el medio diariamente.

Medio para iPSCs:

| REACTIVOS | 250 ml |
|-----------------------------------------------|-------------|
| KNOCKOUT DMEM (Gibco®) | 200 ml |
| Reemplazo de Suero (Gibco®) | 50 ml |
| L-glutamina (Gibco®) | 2.5 ml |
| Aminoácidos no esenciales (Gibco®) | 2.5 ml |
| 0.2% 2-mercaptoetanol 50MM (Sigma-Aldrich) | 500 μ l |

3.7 Caracterización de células iPS por cambios morfológicos

Se observaron al microscopio los cambios morfológicos. Estos cambios consisten en observar células redondas, nucléolos grandes y citoplasma escaso.

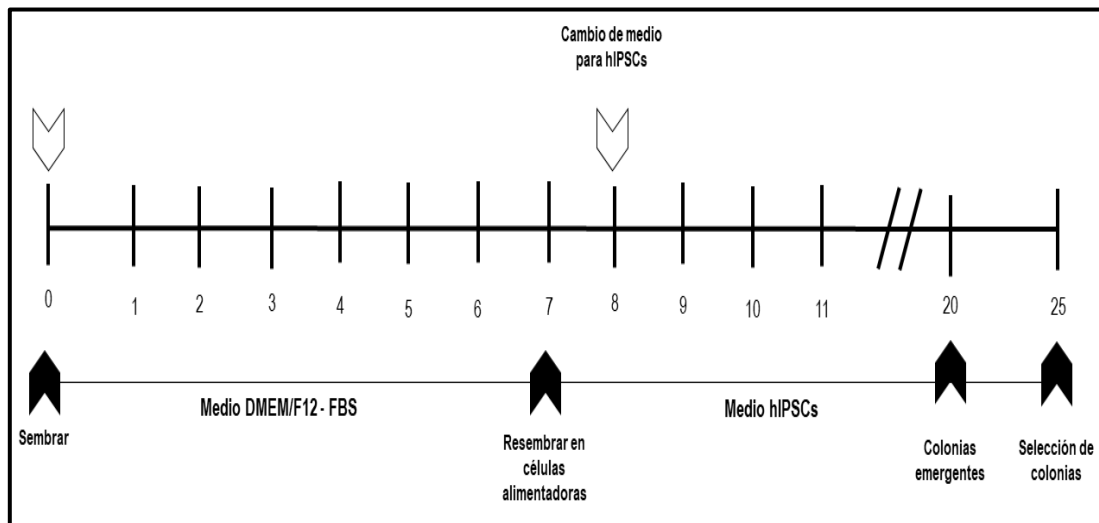


Figura 3.1 Esquema del protocolo de inducción de células iPSC con plásmidos episomales (Modificado de Okita et al., 2011).

3.8 Procedimiento de tinción con el kit fosfatasa alcalina (MerckMillipore)

Las células iPS fueron sembradas cinco días previos a analizar la actividad de fosfatasa alcalina, de baja a media densidad (NOTA: Este periodo de tiempo es crítico para observar los niveles de actividad de fosfatasa alcalina).

El día cinco, se aspira el medio y se fijar las células iPS con paraformaldehído al 4% durante 2 minutos (NOTA: No se debe extender el tiempo de fijación, esto puede resultar en la inactivación de fosfatasa alcalina).

Se aspiró la solución de fijación y se realizó un lavado con solución de lavado al 1X (TBST: 20mM Tris-HCl. pH 7.4, 0.15M NaCl, 0.05% Tween-20). No permitir que la placa se seque. Se prepararon los reactivos para la tinción de fosfatasa alcalina (Mezclar Fast Red Violet (FRV) con solución fosfato Naftol AS-BI y agua en una relación 2:1:1 (FRV: Naftol: Agua)).

Se añadió suficiente solución de tinción para cubrir la placa y se incubó 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se aspiró la solución de tinción y se lavó la placa con solución de lavado 1X. Se cubrieron las células con PBS 1X para prevenir que la placa se seque y se contó el número de colonias que expresaron fosfatasa alcalina (las células iPS en rojo), contar el número de colonias diferenciadas (sin color).

3.9 Subcultivo de células iPSCs de humano

3.9.1 Disociación Mecánica

Se evaluó el cultivo bajo el microscopio con los objetivos 4X o 10X. Las células se pueden dividir en 3-6 placas del mismo tamaño de la placa original, dependiendo de la densidad del cultivo original. Se deben marcar o remover

las colonias que se han diferenciado para que no interfieran en el proceso de disociación.

Se removió el medio de cultivo de la placa y fue reemplazado con medio fresco para hiPSCs. Se diseccionaron las colonias manualmente, dentro de la campana de flujo laminar.

NOTA: Se pueden emplear diferentes objetos para romper las colonias, se recomienda el uso de puntas de 20 μ l o agujas 23G estériles.

La colonia se cortó en tiras (A), después en cuadros (B) y por último, se rompió la colonia moviendo la punta alrededor y a través de cada colonia en forma de espiral (C) como se muestra en la figura 3.2.

3.9.2 Disociación con Acutasa (MerckMillipore)

Se cultivaron en placas de 100 mm tratadas con gelatina al 0.1% (MerckMillipore), sobre los que se sembraron previamente fibroblastos de humano inactivados mitóticamente (células alimentadoras).

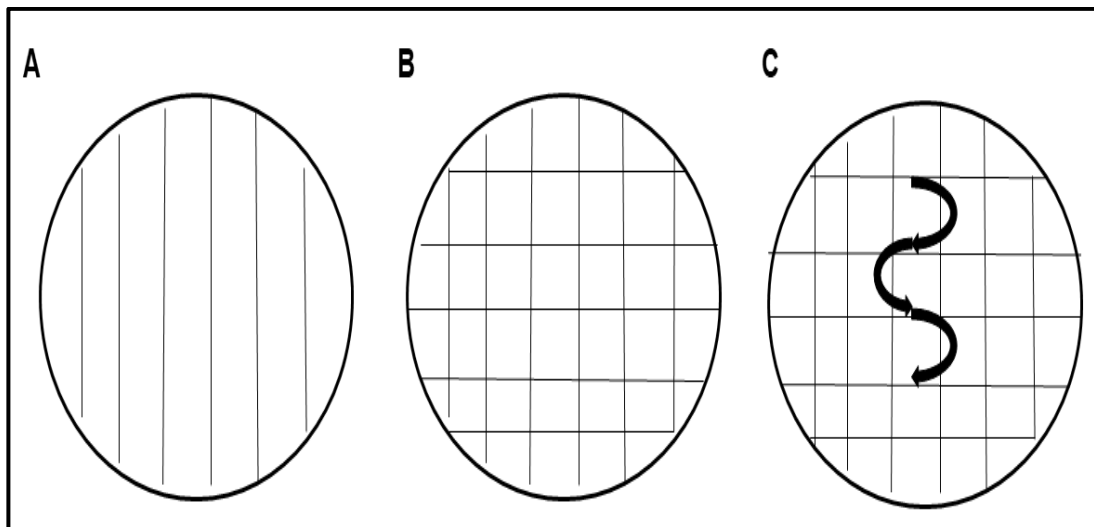


Figura 3.2 Esquema del protocolo de disociación mecánica de las colonias de células iPS.

Se añadió el volumen necesario de medio de cultivo y la cantidad correspondiente de bFGF (0.8 μ l/ml) (Gold Biotechnology). Se aspiró el medio de cultivo de la placa que se va a subcultivar, se añadió a la placa 1-2 ml de la solución de acutasa, precalentada previamente. Se colocó 8-10 minutos en la incubadora a 37°C, 5% CO₂.

*El tiempo exacto de incubación con acutasa se determinó observando colonias al microscopio hasta ver que los bordes de las colonias empiezan a despegarse de la placa.

Se aspiró la acutasa con una pipeta de plástico, se añadió medio de cultivo nuevo (2 ml) y se levantaron cuidadosamente las colonias con la ayuda de una pipeta Pasteur de capilar fino. Se despegaron solo las zonas indiferenciadas de las colonias.

Según el número obtenido de colonias se distribuyeron en las nuevas placas con células alimentadoras y con medio específico para células iPSCs. Depositar cuidadosamente los frascos en la incubadora a 37°C, 5% CO₂, asegurándose de agitar la placa o frasco de derecha a izquierda y desde atrás al frente para obtener una distribución uniforme de las colonias en la placa.

3.10 Cambio de medio de células iPS

Se observaron las placas con células iPS para ver el crecimiento celular y la ausencia de contaminación. Añadir bFGF (0.8 μ l/ml) (Gold Biotechnology).

Se aspiró el medio de los frascos de cultivo utilizando una pipeta de plástico estéril. Se añadió el medio de cultivo nuevo, el cambio de medio debe ser DIARIO. Se puede omitir solo el día 2-3 después del subcultivo. Se colocaron las células en la incubadora a 37°C, 5% CO₂.

El subcultivo de las colonias debe hacerse cuando los frascos tengan un 80-90% de confluencia y evitando pasar las células diferenciadas.

3.11 Obtención de lentivirus del elemento represor (TR), proteína verde fluorescente (GFP) y las formas solubles de GAS1 y PTEN-Long

Día 1: El día previo a la transfección se sembraron las células HEK293 FT (Invitrogen) en una placa de cultivo de 100 mm para que el día de la transfección tuvieran un 90 – 95% de confluencia. El medio que se colocó en esta placa no tenía antibiótico. Se incubaron las células toda la noche en la incubadora a 37°C y 5% de CO₂.

Día 2: El día de la transfección, se removió y desechó el medio de cultivo de las células HEK293 FT (Invitrogen) y fue reemplazado con 5 ml de medio de cultivo completo sin antibiótico.

Para cada transfección, se preparó el complejo DNA-Lipofectamina® 3000 (Invitrogen) como se indica a continuación:

Tubo a. En un tubo estéril, diluir 9 ug de la mezcla de empaquetamiento ViraPower (Invitrogen) y añadir 3 ug del plásmido pLenti de interés (12 ug en total) en 1.5 mL de medio DMEM-F12 (Gibco®) sin suero. Resuspender suavemente.

Tubo b. Por separado, en un tubo estéril diluir 25 µl de Lipofectamina® 3000 (Invitrogen) (resuspender suavemente antes de usar) en 1.5 mL de medio DMEM-F12 (Gibco®) sin suero. Resuspender suavemente e incubar 5 minutos a temperatura ambiente.

Después de la incubación, combinar el contenido del tubo **a** con el contenido del tubo **b**. Resuspender suavemente e incubar 20 minutos a temperatura ambiente, para permitir que el complejo DNA- Lipofectamina® 3000 (Invitrogen) se forme.

Se añadió todo el complejo DNA- Lipofectamina® 3000 (Invitrogen) por goteo a las placas de cultivo que contienen las células HEK293 FT (Invitrogen). Se mezcló suavemente moviendo la placa y se incubaron toda la noche a 37°C y 5% de CO₂.

Día 3: Se removieron las células transfectadas de la incubadora. Se removió y desechó el medio que contiene el complejo DNA-Lipofectamina® 3000 (Invitrogen) y se reemplazó con 10 mL de medio de cultivo completo sin antibióticos. Se incubaron las células 24 – 48 hrs a 37°C y 5% de CO₂.

Día 5-6: Después de la transfección, se removió el sobrenadante que contiene los virus y se transfirió el medio a un tubo estéril de 15 mL.

Se centrifugó el sobrenadante a 3500 rpm durante 5 minutos a 4°C para la formación de un botón que corresponde a las células. Se recuperó el medio sin llevarse el botón de células y fue colocado en tubos de plástico estériles.

Se centrifugan 30 000 rpm por 2 hrs y 30 minutos. Una vez que terminó la centrifugación se observó en el fondo de los tubos el botón donde están contenidos los virus. Se retiró el medio cuidadosamente sin tomar la pastilla. Se resuspendió con un poco de medio el botón y se alicuotaron. El volumen de las alícuotas depende del tamaño del botón de los virus.

3.12 Obtención de una línea estable BJ con el elemento represor (TR) y la forma soluble de GAS1 y PTEN

Se sembraron células BJ en una confluencia del 40% en cajas de 35 mm, al día siguiente se infectaron con el lentivirus que codifica para la expresión del elemento represor (TR) regulado por Tetraciclina. A las 48 horas, el medio con los lentivirus fue aspirado y se aplicó medio fresco con Blasticidina (Invitrogen) (5 µg/µl) durante 2 semanas. Después, esta línea celular fue infectada con un lentivirus con la secuencia de tGAS1-PTEN-L y seleccionada durante 2 semanas con Blasticidina (Invitrogen) (5 µg/ml). El

medio de crecimiento con antibióticos de selección fue cambiado cada día para evitar la degradación de los mismos.

3.13 Aislamiento de ARN total por el método de TRIzol®

Se realizó la homogenización (el volumen de la muestra no debe exceder el 10% del volumen del TRIzol® (Ambion RNA por life technologies™).

Se retiró el medio de cultivo de la placa de crecimiento y se agregó TRIzol® directo a las células (1mL para placas de 35mm), se lisaron las células directamente en la placa de cultivo por pipeteo y se resuspendió varias veces.

Se incubó la muestra homogenizada por 5 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 200 µl de cloroformo por cada mL de TRIzol® usado en la homogenización. Se agitó el tubo vigorosamente por inversión durante 15 segundos y se incubó de 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.

NOTA: la mezcla se separa en una capa menor de fenol-cloroformo color rosa, una interface color blanco y una fase acuosa superior de menor intensidad de color. El ARN permanece exclusivamente en la fase acuosa, la cual corresponde aproximadamente al 50% del volumen total.

Se removió la fase acuosa de la muestra evitando sustraer la interface o la capa orgánica, se colocó la fase acuosa en un tubo nuevo y se procedió de inmediato a la realización del aislamiento de ARN.

Se agregaron 500 µL de isopropanol al 100% a la fase acuosa por cada mL de TRIzol® usado en la homogenización, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos y se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C.

Se removió el sobrenadante del tubo, dejando solo la pastilla y se lavó con 1mL de etanol al 70%, por cada mL de TRIzol® empleado en la homogenización. Resuspender la muestra brevemente y centrifugar a 7500 rpm por 5 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol al 70% para mejorar la pureza del ARN.

Se secó la pastilla de ARN por 5 -10 minutos y se resuspendió la pastilla en 20 µL de agua libre de RNAsas (Gibco®) por resuspensión. Se incubó en baño maría a 55 -60°C por 10-15 minutos. Se midió la absorbancia de la muestra a 260 y 280nm en Nanodrop (Thermo Scientific™) utilizando como blanco el agua libre de RNAsas (Gibco®) para obtener concentración y pureza de la muestra.

3.14 RT-PCR

Una vez que se aisló el ARN de las células infectadas, dicho ARN fue transcrito a ADN por medio de la Transcriptasa Reversa M-MLV (Invitrogen). Bajo el siguiente protocolo.

Se mezclaron los siguientes componentes en un tubo de microcentrífuga:

- 7 µl (2µg) de ARN total
- µl Buffer 10X DNAsa
- µl DNAsa I
- 9 µl de H₂O destilada

Se incubó la muestra a temperatura ambiente por 5 minutos, después se adicionaron 2 µl de EDTA para un volumen final de 22 µl y posteriormente se incubó 10 minutos a 70 °C y se colocó en hielo. Se le añadió 1 µl de oligo dT y 1 µl de dNTPs, se incubó 5 minutos a 65 °C y se pasó 5 minutos a hielo. Se adicionaron 8 µl buffer de M-MLV TR y 4 µl de dTT, se incubó por 2 minutos a 37 °C, se adicionaron 2 µl de enzima M-MLV y se incubó 50 minutos a 37°C. Por último se inactivó la reacción incubando a 70°C por 15 minutos.

Para la amplificación del transgén tGAS1-PTEN-L se emplearon los siguientes oligonucleótidos:

Sentido: 5´- GCCTGGACGACTACTACGATG -3´

Antisentido: 5´- CCGTGTGGAGGCAGTAGAAG-3´

Bajo las siguientes condiciones en el termociclador (BIO-RAD) y reactivos para la enzima AccuPrime™ Taq DNA Polymerase, high fidelity (Invitrogen):

| Reactivo | Cantidad |
|-----------------|-----------------|
| Buffer 10X | 4.0 µl |
| Primer Mix | 1.2 µl |
| ADNc | 1.6 µl |
| Pfx | 0.32 µl |
| Agua | 32.88 µl |

| Condiciones de PCR | |
|----------------------------------------------------|-----------|
| 94°C/ 5 minutos | |
| 94 °C/ 30 seg. 58 °C/ 30 seg. 68 °C/ 22 seg. | 40 ciclos |
| 68 °C/ 5 minutos | |
| 4 °C/ ∞ | |

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Transformación de células químicamente competentes de *Escherichia coli* con los plásmidos pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL.

En este trabajo se emplearon los vectores episomales: pCLXE-hOCT4, pCLXE-hSOX2/KLF4 y pCLXE-hL-MYC/LIN28A que fueron originalmente descritos por (Okita *et al.*, 2011). A continuación, se muestra los esquemas de los vectores episomales.

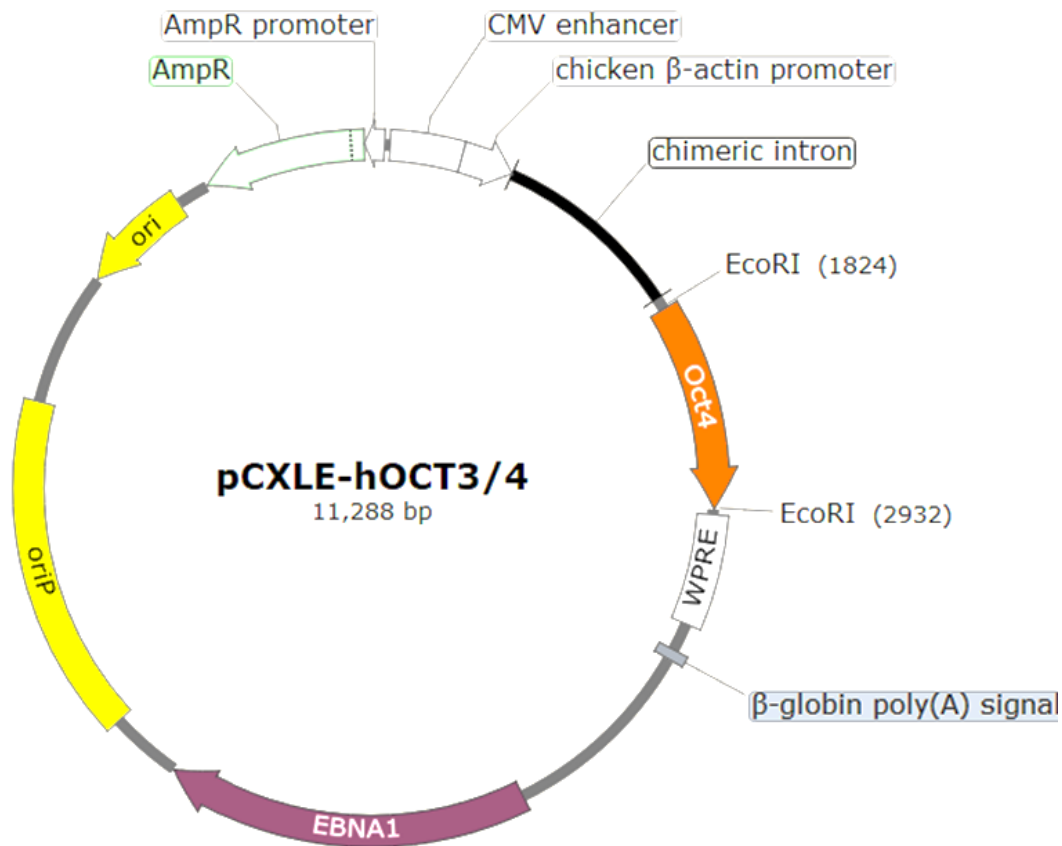


Figura 4.1 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hOCT3/4. El vector episomal tiene las siguientes características: Promotor CAG (Promotor Citomegalovirus/ promotor beta actina pollo), factor de transcripción Oct4, WPRE (elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de marmota) y pA (señal de poliadenilación) (Modificado de Okita *et al.*, 2011).

Diferentes grupos de investigación (Nagel *et al.*, 2018; Seok *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2017) han demostrado que con estos vectores episomales es posible lograr la reprogramación de células diferenciadas, ya que la expresión de estos factores de transcripción puede llevar a la célula a un estado de pluripotencia.

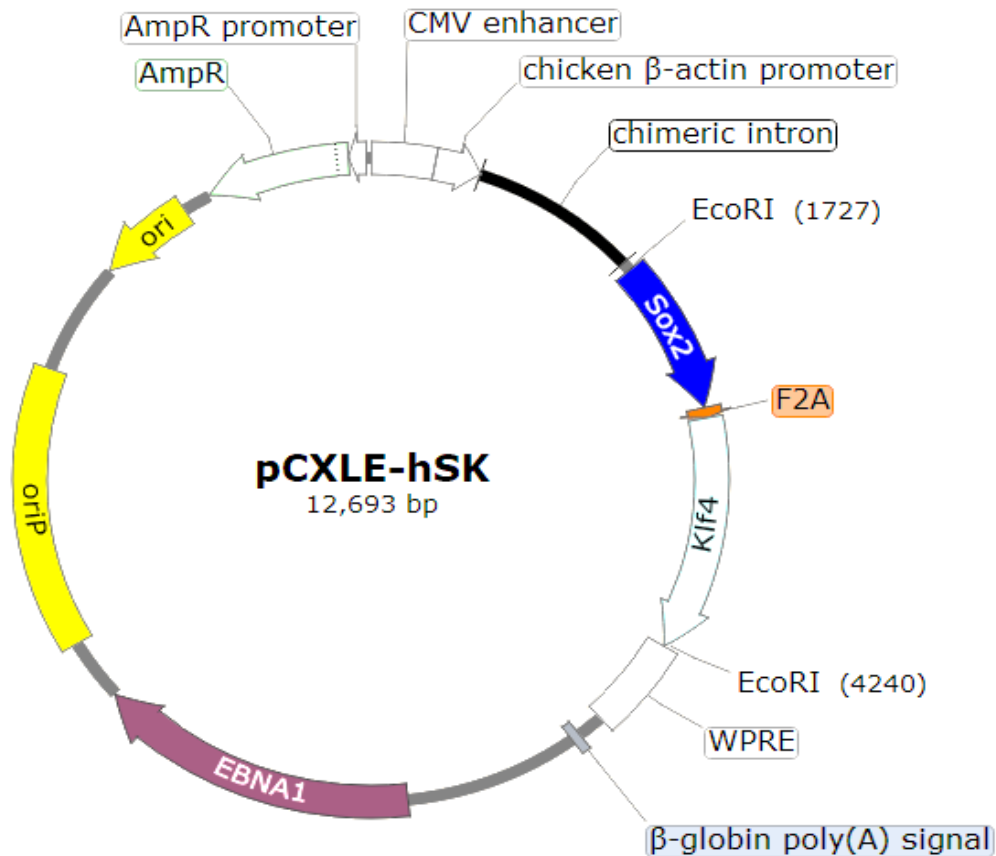


Figura 4.2 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hSK. El vector episomal tiene las siguientes características: Promotor CAG (Promotor Citomegalovirus/ promotor beta actina pollo), factor de transcripción Sox2 y Klf4, WPRE (elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de marmota) y pA (señal de poliadenilación) (Modificado de Okita *et al.*, 2011).

Para lograrlo se realizó la transformación de células químicamente competentes, las cuales se crecieron en placas separadas para cada vector episomal, se eligieron cuatro colonias de cada vector para experimentos posteriores, y se crecieron en medio LB + Ampicilina, se incubaron a 37 °C por 16 h, a 200 rpm.

Una vez cosechadas las células de las colonias seleccionadas se realizó la extracción de ADN plasmídico por lisis alcalina y se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.2 %

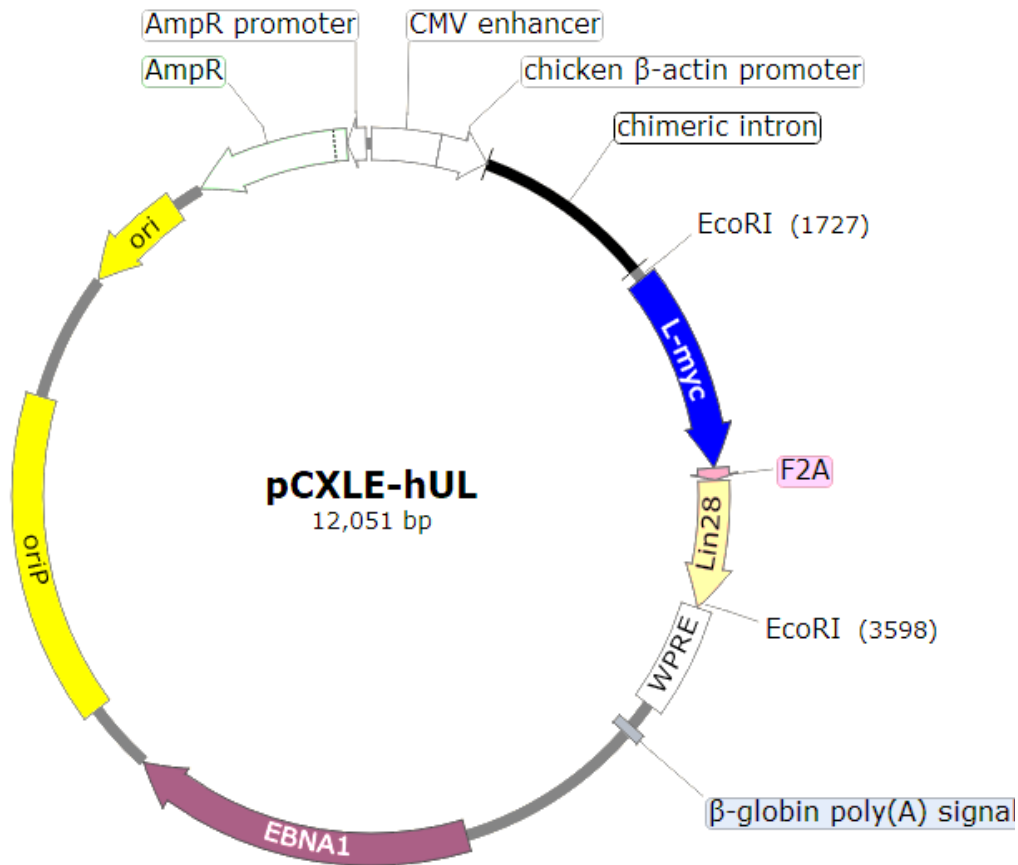


Figura 4.3 Esquema vector episomal de expresión pCXLE-hUL. El vector episomal tiene las siguientes características: Promotor CAG (Promotor Citomegalovirus/ promotor beta actina pollo), factor de transcripción L-myc y Lin28, WPRE (elemento regulador post-transcripcional del virus de hepatitis de marmota) y pA (señal de poliadenilación) (Modificado de Okita *et al.*, 2011).

4.2 Restricción ADN plasmídico con la enzima *EcoRI*

Se realizó la digestión con la enzima *EcoRI*, en la Fig. 4.4 se puede observar en el carril de cada vector episomal, la liberación del fragmento correspondiente. Para el vector pCXLE-hOCT3/4 se libera un fragmento de 1108 pb, para el vector pCXLE-hSK se libera un fragmento de 2513 pb y para el vector pCXLE-hUL se libera un fragmento de 1871 pb. Al realizar la

restricción con la enzima *EcoRI* se corroboró que los fragmentos liberados corresponden con el tamaño de los factores de transcripción que se emplearon para llevar a cabo la reprogramación.

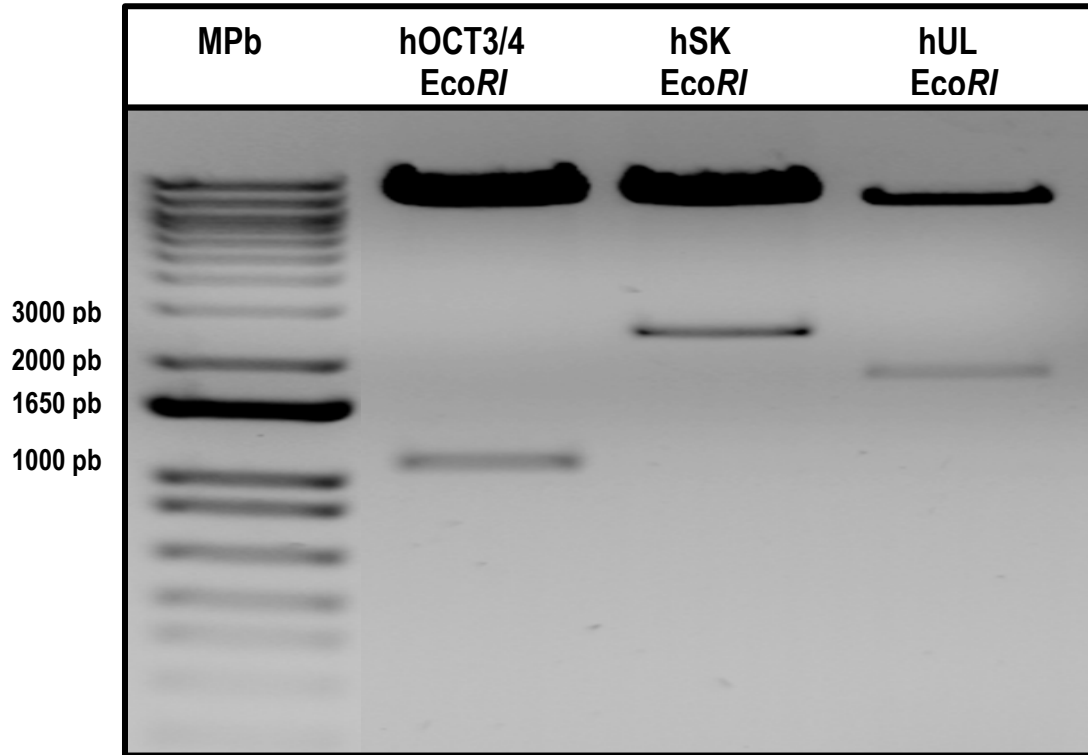


Figura 4.4 Restricción ADN plasmídico con la enzima *EcoRI*. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio. Carriles: MPb; digestión con la enzima *EcoRI* vector pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL.

4.3 Electroporación de células BJ con los vectores episomales: pCXLE-hOCT3/4, pCXLE-hSK y pCXLE-hUL y caracterización de la obtención de células iPS mediante cambios morfológicos y tinción de fosfatasa alcalina.

Se realizó la activación de los fibroblastos BJ y se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium)/F12 (Invitrogen) suplementado con Suero

Fetal Bovino (SFB) al 10% con Antibiótico (Penicilina 100 U/ml y Estreptomina 100 mg/ml) (Gibco®) hasta llegar a una confluencia del 90%.

Se llevó a cabo el protocolo de electroporación descrito en la metodología, e inmediatamente las células fueron sembradas en placas de 60 mm. Al séptimo día de cultivo las células fueron resembradas en células alimentadoras con medio para iPSCs suplementado con bFGF (0.8 ul/ml) (Gold Biotechnology) humano y se les cambió el medio diariamente.

Las células se observaron diariamente para monitorear los cambios en la forma, los cuales fueron detectados a partir del día 30 después de haberse realizado el protocolo de electroporación. Los cambios de forma celular incluyen una forma redondeada, citoplasma escaso y nucléolo grande (Fig. 4.5).

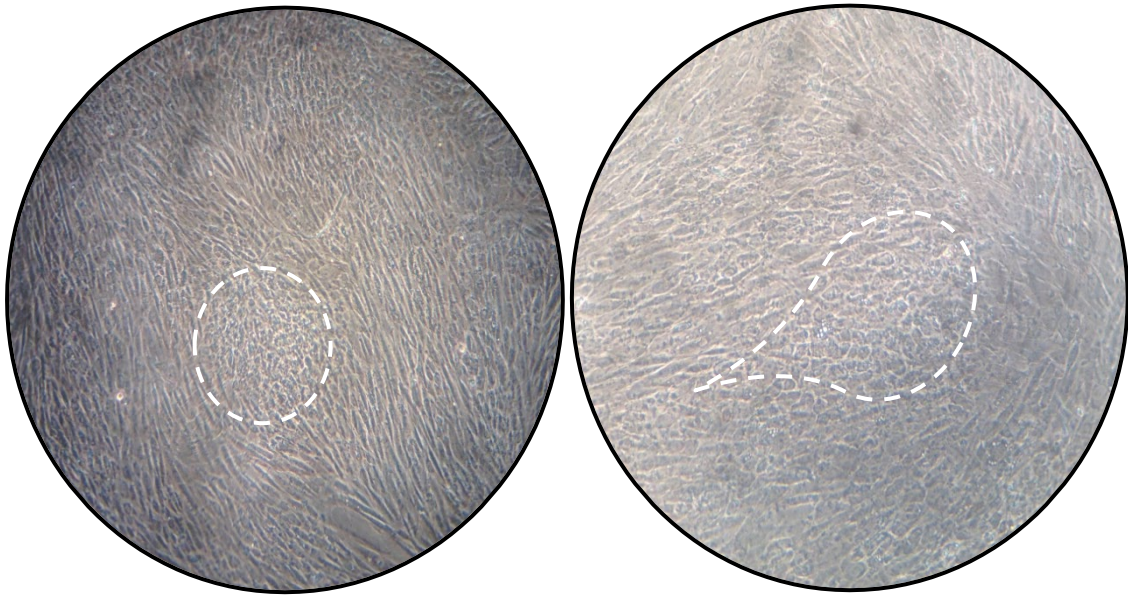


Figura 4.5 Reprogramación de fibroblastos humanos a células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Imagen de las células BJ presentando cambios en su forma al día 30 después de llevar a cabo el protocolo de electroporación.

Las colonias observadas fueron disociadas manualmente según el protocolo descrito en la metodología, y de esta forma se logró expandir el cultivo de las células iPS. En la siguiente imagen se muestran fotografías de las células

iPS después de dos días de ser resembradas sobre células alimentadoras (Fig. 4.6).

Es importante mencionar que la mayoría de las células iPS se duplican cada 31 – 35 horas, por eso el crecimiento de las colonias de células iPS es muy lento (Loring, Schwartz, y Wesselschmidt, 2007).

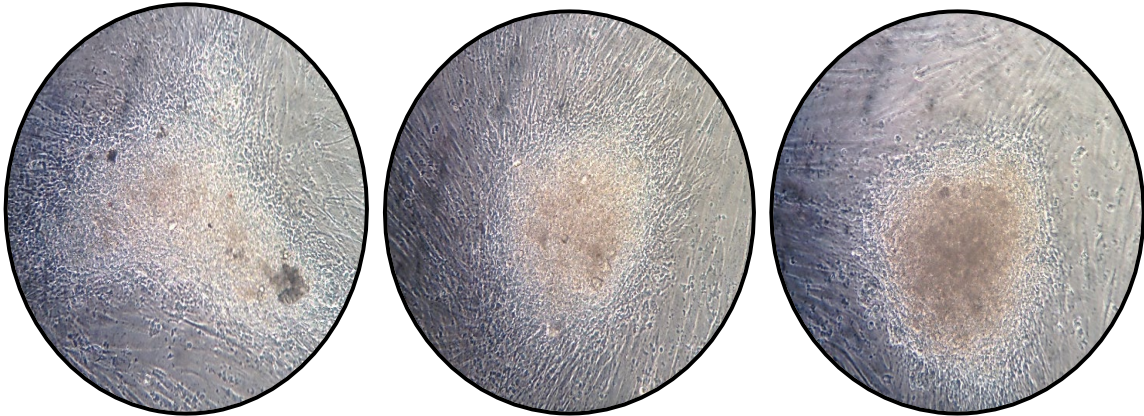


Figura 4.6 Colonias de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Imagen tres colonias de células iPS resembradas en células alimentadoras para expandir cada una de las colonias.

La investigación con células troncales requiere herramientas moleculares y celulares para confirmar la pluripotencia o para determinar la utilidad de las células en experimentos posteriores.

El kit de detección de fosfatasa alcalina es una herramienta específica y sensible para la evaluación fenotípica de la diferenciación de células troncales embrionarias mediante la determinación de la actividad de fosfatasa alcalina, además es un marcador de pluripotencia reportado en una gran variedad de trabajos.

El protocolo de detección de fosfatasa alcalina se realizó al día 35 después del protocolo de electroporación observando señal positiva en algunas de las células (**Fig. 4.7**). Esta etapa es crítica para la detección de fosfatasa

alcalina, ya que después de este tiempo la expresión de fosfatasa alcalina disminuye.

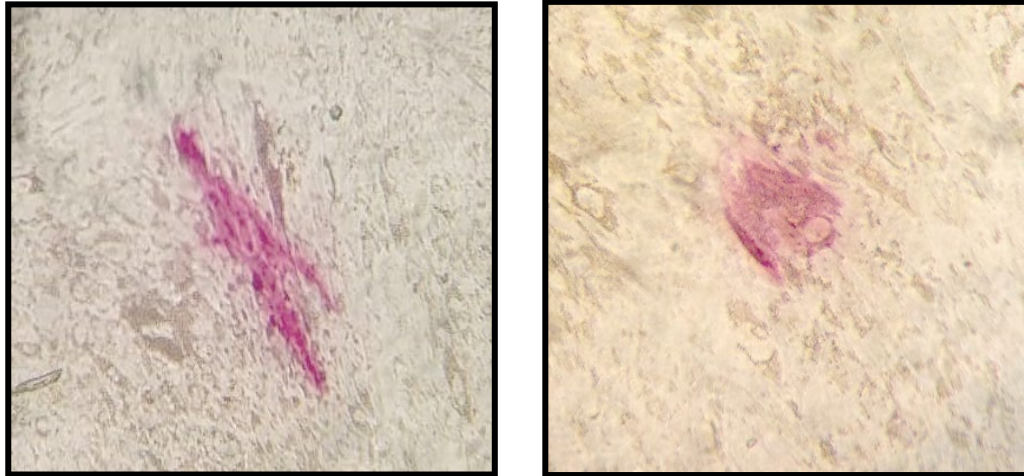


Figura 4.7 Tinción de fosfatasa alcalina en células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Las clonas de células iPS fueron teñidas con el kit de detección de fosfatasa alcalina y se observó señal positiva en células iPS.

4.4 Infección de las células BJ con el vector lentiviral plenti6.3tGAS1-P2A-PTEN-L

Se obtuvieron los vectores lentivirales que permiten la expresión de tGAS1-PTEN-L, el elemento represor (TR) y como control se empleó un vector lentiviral que permite la expresión de la proteína verde fluorescente (GFP). Para comprobar la funcionalidad de los virus se infectaron células BJ con los lentivirus de la proteína verde fluorescente (**Fig. 4.8**) y con los lentivirus de tGAS1-PTEN-L y el elemento represor (TR). Para comprobar la infección de las células BJ con los vectores lentivirales de tGAS1-PTEN-L y el elemento represor (TR), se realizó la extracción de ARN total por el método de TRIzol.

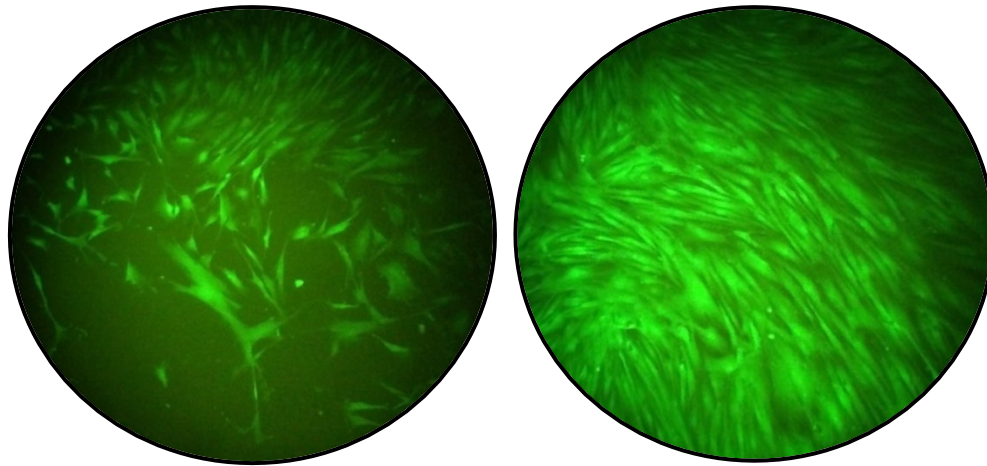


Figura 4.8 Infección de células BJ con el vector lentiviral de la proteína verde fluorescente (GFP). Células BJ expresando la proteína verde fluorescente (GFP) a baja y alta confluencia, después de ser infectadas con el vector lentiviral de la proteína verde fluorescente.

El ARN total de las células BJ infectados con los vectores lentivirales de tGAS1-PTEN-L y el elemento represor (TR), muestra dos bandas características correspondientes a los ribosomas 28 S y 18 S (**Fig. 4.9**). Lo que nos permite usar el ARN total para la síntesis de ADNc.

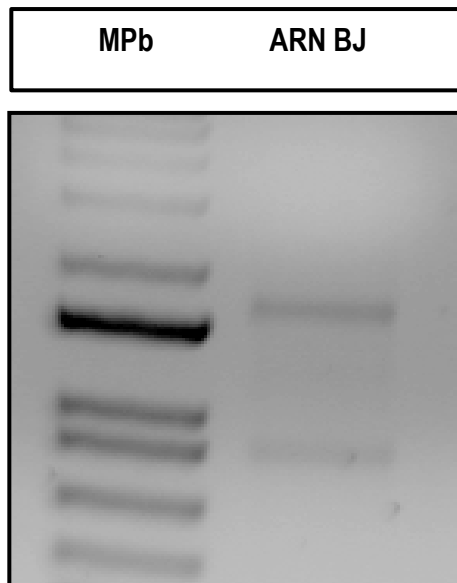


Figura 4.9 Gel de agarosa desnaturizante con ARN total de células BJ. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio, cargado con productos de una extracción de ARN total de células BJ infectadas con vectores lentivirales de tGAS1-PTEN-L y el elemento represor (TR).

Una vez que se obtuvo el ADNc se realizó una PCR para β -actina de humano y comprobar la integridad del ADN, como resultado de la amplificación de actina se observa una banda con un tamaño de 377 pb (**Fig. 4.10**).

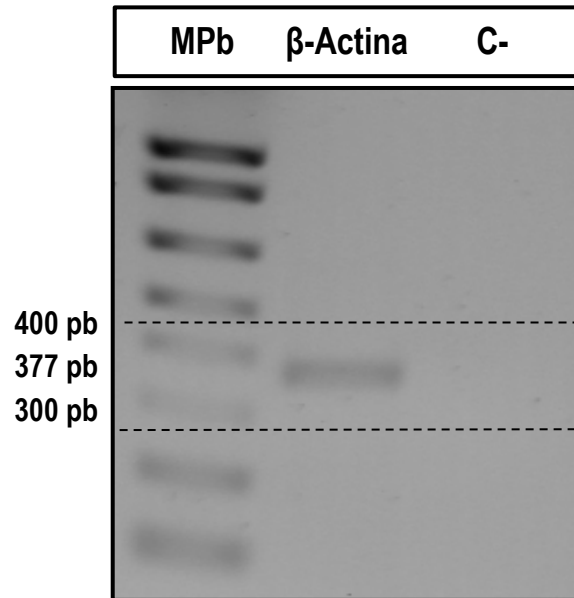


Figura 4.10 PCR β -Actina de humano. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio cargado con productos de una PCR. Carriles: MPb; producto PCR β -Actina de humano y control negativo.

Una vez que se comprobó la integridad del ADNc con la PCR de actina, se realizó la PCR para detectar si las células BJ integraron el transgén de tGAS1-PTEN-L exitosamente y se observó la amplificación de una banda correspondiente a 368 pb, la cual corresponde con el fragmento de amplificación esperado según el diseño de los oligonucleótidos reportados en metodología (**Fig. 4.11**).

Una vez comprobada la obtención de las células iPS mediante detección de fosfatasa alcalina, se permitirá que las colonias tengan un mayor tamaño para realizar la infección con el lentivirus que permitirá la expresión de tGAS1-PTEN-L.

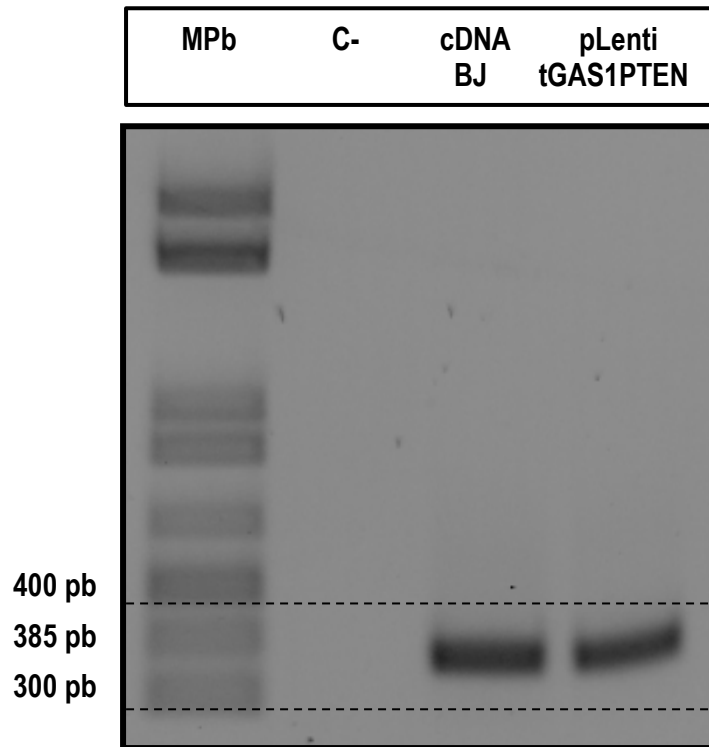


Figura 4.11 PCR para tGAS1-PTEN-L. Gel de agarosa al 1.2 % teñido con Bromuro de etidio cargado con productos de una PCR. Carriles: MPb; control negativo; producto PCR del cDNA de células BJ infectadas con el vector lentiviral tGAS1-PTEN-L y producto PCR empleando el vector lentiviral de tGAS1-PTEN-L.

Es importante esperar a que las colonias de células iPS tengan un mayor tamaño para realizar la infección, ya que la integración del transgén se comprobará mediante una RT-PCR de las células infectadas, para esto es necesario obtener una concentración adecuada al momento de aislar el ARN de las células iPS infectadas.

V. CONCLUSIONES

En este trabajo se planteó como objetivo la obtención de células pluripotentes inducidas (iPSCs) a partir de la expresión transitoria de factores de transcripción como Sox2, Klf4, c-Myc, Lin28 y Oct4, que se sabe están involucrados en el mantenimiento del estado de pluripotencia.

La obtención de las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC) se logró a partir de vectores episomales, con lo que aseguramos una expresión transitoria de los factores de transcripción, un resultado positivo que nos permitirá el uso de estas células como vehículos para la entrega de genes terapéuticos y para el desarrollo de nuevas estrategias en el área de terapia génica, sin implicaciones negativas.

Se logró la estandarización del protocolo para la obtención de células iPS a partir de la técnica de electroporación. Esta técnica ha sido reportada en muchos trabajos, sin embargo, es un protocolo complejo que requiere muchos ensayos para tener las condiciones óptimas para las células que se desean electroporar.

Además, a partir de los resultados obtenidos se puede concluir que existen cambios en la morfología celular (forma redonda y citoplasma escaso) como se reporta en la literatura y se obtuvo señal positiva en el protocolo de tinción de fosfatasa alcalina y con lo que podemos concluir que efectivamente se trata de células troncales.

Se logró establecer una línea estable de células BJ que expresan de manera regulable tGAS1-PTEN-L, con esto se comprobó que los lentivirus obtenidos, del elemento represor (TR) y tGAS1-PTEN-L son funcionales. Esto nos permitirá obtener células iPS que expresen las proteínas de interés tGAS1 y PTEN-Long, además, podremos emplear el tropismo que presentan estas

células hacia sitios de daño tisular y las propiedades antitumorales de las proteínas para el desarrollo de futuras terapias contra el cáncer.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitirán explorar el potencial y el alcance de la terapia que se pretende desarrollar.

BIBLIOGRAFIA

Du, X., Wang, J., Zhou, Q., Zhang, L., Wang, S., Zhang, Z., & Yao, C. (2018). Advanced physical techniques for gene delivery based on membrane perforation. *Drug Delivery*, 25(1), 1516–1525. <https://doi.org/10.1080/10717544.2018.1480674>

Feng, R., & Wen, J. (2015). Overview of the roles of Sox2 in stem cell and development. *Biological Chemistry*, 396(8), 883–891. <https://doi.org/10.1515/hsz-2014-0317>

Fusaki, N., Ban, H., Ishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus , an RNA virus that does not integrate into the host genome, 85, 348–362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>

Glicksman, M. A. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy. *Clinical Therapeutics*, 40(7), 1060–1065. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.004>

Herberts, C. A., Kwa, M. S. G., & Hermsen, H. P. H. (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *Journal of Translational Medicine*, 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-29>

Hopkins, B. D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Rapp, Z., Shaw, J., ... Parsons, R. (2010). A Secreted PTEN Phosphatase That Enters Cells to

Alter Signaling and Survival, 327(June), 1543–1548.
<https://doi.org/10.1126/science.1206034>

Hopkins, B. D., Fine, B., Steinbach, N., Dendy, M., Rapp, Z., Shaw, J., ... Phosphatase. (2013). A Secreted PTEN Phosphatase That Enters Cells to Alter Signaling and Survival, 341, 399–403.

Hopkins, B., Hodakoski, C., Barrows, D., Mense, S. M., & Parsons, R. E. (2014). PTEN function, the long and the short of it, 39(4), 183–190.
<https://doi.org/10.1111/j.1743-6109.2008.01122.x>.Endothelial

Kerrigan, B. C. P., Hossain, A., Yamashita, S., & Lang, F. F. (2018). Stem Cell Therapy of Gliomas. *Progress in Neurological Surgery*, 32, 124–151.
<https://doi.org/10.1159/000469686>

Kim, D., Kim, C., Moon, J., Chung, Y., Chang, M., Han, B., ... Kim, K. (2009). Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Stem Cell*, 4(6), 472–476.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.05.005>

Leslie, N. R., & Brunton, V. G. (2013). Where Is PTEN?, 341(July), 355–356.

Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S. I., ... Parsons, R. (1997). PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast and prostate cancer. *Science*, 275, 1943–1947.

- López-Ornelas, A., Mejía-Castillo, T., Vergara, P., & Segovia, J. (2011). Lentiviral transfer of an inducible transgene expressing a soluble form of Gas1 causes glioma cell arrest, apoptosis and inhibits tumor growth. *Cancer Gene Therapy*, *18*(2), 87–99. <https://doi.org/10.1038/cgt.2010.54>
- López-Ornelas, A., Vergara, P., & Segovia, J. (2014). Neural stem cells producing an inducible and soluble form of Gas1 target and inhibit intracranial glioma growth. *Cytotherapy*, *16*(7), 1011–1023. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.12.004>
- Loring, J. F., Schwartz, P., & Wesselschmidt, R. (2007). *Human Stem Cell Manual a laboratory guide*.
- Nagel, M., Reichbauer, J., Böhringer, J., Schelling, Y., Krägeloh-Mann, I., Schüle, R., & Ulmer, U. (2018). Generation of two iPSC lines derived from two unrelated patients with Gaucher disease. *Stem Cell Research*, #pagerange#. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.10.021>
- Namba, H., Kawaji, H., & Yamasaki, T. (2016). Use of genetically engineered stem cells for Glioma therapy (Review). *Oncology Letters*, *11*(1), 9–15. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3860>
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., ... Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells, *8*(5), 409–414. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1591>

Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors, *322*(March), 949–954.

Pelayo, R., Santa-Olalla, J., & Velasco, I. (2011). *Células troncales y medicina regenerativa. Células troncales y medicina regenerativa.*

Planchon, S. M., Waite, K. A., & Eng, C. (2008). The nuclear affairs of PTEN. *Journal of Cell Science*, *121*(3), 249–253. <https://doi.org/10.1242/jcs.022459>

Potter, H. (1988). Electroporation in Biology: Methods, Applications, and Instrumentation. *Analytical Biochemistry*, *174*, 361–373.

Potter, H., & Heller, R. (2018). Transfection by Electroporation. In *Current Protocols in Molecular Biology* (p. 9.3.1-9.3.13). <https://doi.org/10.1002/cpmb.48>

Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, *481*(7381), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>

Rodrigues, J., Guedert, R., Monte, M., Rangel, M., & Ota, D. (2018). A Quick Guide on Electroporation. *Journal of Scientific and Technical Research*, 2574–1242. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2018.12.002248>

Roelandt, P. R., Roobrouck, V. D., & Verfaillie, C. M. (2013). *Multipotent Adult Progenitor Cells. Essentials of Stem Cell Biology: Third Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409503-8.00018-4>

Sánchez-Hernández, L., Hernández-Soto, J., Vergara, P., González, R. O., & Segovia, J. (2018). Additive effects of the combined expression of soluble forms of GAS1 and PTEN inhibiting glioblastoma growth. *Gene Therapy*, 25(6), 439–449. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0020-0>

Schueler-Furman, O., Glick, E., Segovia, J., & Linial, M. (2006). Is GAS1 a co-receptor for the GDNF family of ligands?, 27(2). <https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.12.004>

Seok, J., Young, N., Lee, M., Ko, K., Jeong, H., & Seps, Y. (2018). Optimization of episomal reprogramming for generation of human induced pluripotent stem cells from fibroblasts. *Animal Cells and Systems*, 22(2), 132–139. <https://doi.org/10.1080/19768354.2018.1451367>

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. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

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. <https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145>

- Van Schaijik, B., Davis, P. F., Wickremesekera, A. C., Tan, S. T., & Itinteang, T. (2018). Subcellular localisation of the stem cell markers OCT4, SOX2, NANOG, KLF4 and c-MYC in cancer: A review. *Journal of Clinical Pathology*, 71(1), 88–91. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2017-204815>
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., ... Rossi, D. J. (2010). Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell*, 618–630. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2010.08.012>
- Weissman, I. L. (2000). Stem cells: Units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*, 100(1), 157–168. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81692-X](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81692-X)
- Woltjen, K., Michael, I. P., Mohseni, P., Desai, R., Mileikovsky, M., Ha, R., ... Nagy, A. (2009). piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells, 458(April). <https://doi.org/10.1038/nature07863>
- Yakubov, E., Rechavi, G., Rozenblatt, S., & Givol, D. (2010). Reprogramming of human fibroblasts to pluripotent stem cells using mRNA of four transcription factors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.02.150>

- Yang, Y., Liu, B., Xu, J., Wang, J., Wu, J., Shi, C., ... Deng, H. (2017). Derivation of pluripotent stem cells with in vivo embryonic and extraembryonic potency. *Cell*, 243–257. <https://doi.org/10.1097/NCN.0b013e3181a91b58>. Exploring
- Yu, J., Hu, K., Smuga-otto, K., Tian, S., Stewart, R., Igor, I., & Thomson, J. A. (2009). Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences, 324(5928), 797–801. <https://doi.org/10.1126/science.1172482>. Human
- Zarco, N., González-Ramírez, R., González, R. O., & Segovia, J. (2012). GAS1 induces cell death through an intrinsic apoptotic pathway. *Apoptosis*, 17(6), 627–635. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0696-8>
- Zhang, J., Ratanasirintrawoot, S., Chandrasekaran, S., Wu, Z., Ficarro, S. B., Yu, C., ... Daley, G. Q. (2016). LIN28 Regulates Stem Cell Metabolism and Conversion to Primed Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 19(1), 66–80. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.05.009>
- Zhang, Q., Xiang, W., Yi, D. Y., Xue, B. Z., Wen, W. W., Abdelmaksoud, A., ... Fu, P. (2018). Current status and potential challenges of mesenchymal stem cell-based therapy for malignant gliomas. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0977-z>