



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

TESIS DOCTORAL

**TRANSDIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS A  
HEPATOCITOS MEDIANTE REPROGRAMACIÓN CELULAR  
-Papel de Gata4 en el bloqueo de la reprogramación de  
células somáticas-**

Felipe Serrano Tejero

Director de tesis: Dr. Roque Bort Martí

Tutor de tesis: Dr. Ramiro Jover Atienza

PROGRAMA DE DOCTORADO 030E: BIOQUÍMICA CLINICOMÉDICA  
E INMUNOLOGÍA. 2ª EDICIÓN

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

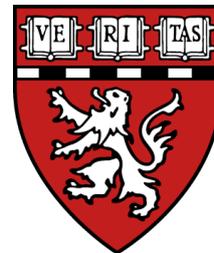
2013



La investigación desarrollada en esta tesis doctoral ha sido llevada a cabo en la unidad de Hepatología Experimental del Instituto de Investigación Sanitaria (IIS) La Fe (Valencia, España), asociado a la Universitat de València; en el departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del *Children's Hospital Boston* (Boston, Massachusetts, U.S.A.), asociado a la Universidad de *Harvard* y en el departamento de Fisiopatología Endocrina y del Sistema Nervioso del Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIBM) Alberto Sols (Madrid, España), asociado a la Universidad Autónoma de Madrid.



Children's Hospital Boston







**Roque Bort Martí**, Doctor en Farmacia, Facultativo Especialista (Investigador Principal) en el Centro de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe)

INFORMA

Que la presente memoria titulada **“TRANSDIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS A HEPATOCITOS MEDIANTE REPROGRAMACIÓN CELULAR.-Papel de Gata4 en el bloqueo de la reprogramación de células somáticas-“**, ha sido realizada por el licenciado en Ciencias Biológicas **Felipe Serrano Tejero**, bajo mi dirección, en el Laboratorio de Hepatología Experimental del Instituto de investigación sanitaria La Fe, y autorizo su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. Roque Bort Martí

Valencia a 20 de Enero de 2013





**Ramiro Jover Atienza**, Doctor en Biología, profesor titular del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

INFORMA

Que la presente memoria titulada **“TRANS-DIFERENCIACIÓN DE FIBROBLASTOS A HEPATOCITOS MEDIANTE REPROGRAMACIÓN CELULAR.-Papel de Gata4 en el bloqueo de la reprogramación de células somáticas-”**, ha sido realizada por el licenciado en Ciencias Biológicas **Felipe Serrano Tejero**, bajo mi tutela académica, en el Laboratorio de Hepatología Experimental del Instituto de investigación sanitaria La Fe, y autorizo su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. Ramiro Jover Atienza

Valencia a 20 de Enero de 2013



A mi familia, sin la cual esta tesis no hubiese sido posible

“...la mente que se abre a una nueva idea,  
jamás regresa a su tamaño original...”

Albert Einstein



## **AGRADECIMIENTOS**

Fue en tercero de BUP, a partir de aquellas clases magistrales de Javier Seguí, un grandísimo profesor de biología de la excelente escuela pública, cuando comenzó mi interés por la biología y la ciencia.

Aunque inicialmente mi propósito era ser un buen profesor que hiciera disfrutar de la biología a mis futuros alumnos, en 2007 me embarqué 6 meses en un programa de investigación en el Hospital Divino Espíritu Santo, en las Islas Azores. Allí me di cuenta que lo que deseaba y me gustaba realmente era hacer ciencia y poder descubrir algo que ayudase a las personas (quien no ha soñado con ser el descubridor del remedio contra el cáncer).

Al volver fui ayudado por mi amigo Francisco Dasí quien me instruyó en la UCIM de la facultad de Medicina en Valencia y me habló de las becas FPI.

Meses más tarde fui admitido en el Hospital La Fe de Valencia por mi director de Tesis, el Dr. Roque Bort, al que le debo algo más que una formación en ciencia.

Tuve la gran suerte de poder hacer una estancia en el *Children's Hospital* en Boston. Y allí, una tarde de lluvia, salí a fumar un cigarro, vi a una mujer mayor que no tenía paraguas, la cubrí con mi paraguas y empezamos a hablar. Me contó que ella y su familia venían de México y que un nuevo fármaco, que tenían en el *Children's Hospital*, estaba funcionando con su nieto, al cual en México no le daban esperanza. Al comentarle que me encontraba en una estancia investigando en el hospital me dijo lo más hermoso que puede oír una persona que se dedica a la investigación:- ¡Sigán investigando, su trabajo salva vidas! Fue la primera vez que me sentí orgulloso de estar investigando. Aunque, evidentemente, yo no curé a su nieto, en aquel momento, me sentí partícipe y esa sensación no la cambio por nada. Aquellas palabras siguen sonando en mi conciencia y no me permiten abandonar en los momentos difíciles.

## AGRADECIMIENTOS

Y aquí estoy, escribiendo mi tesis doctoral, algo que no había pasado por mi mente y de la que estoy especialmente orgulloso de realizar, ya que, este trabajo conlleva el haber conocido a personas maravillosas que han hecho posible la realización de este sueño y a las cuales quiero agradecer en estas líneas.

### **A mi familia.**

A mis padres, Ana María y Felipe, que han trabajado toda su vida para que no me faltase de nada, que me han apoyado siempre y jamás me han dejado rendirme, ya que quitaron esa palabra de mi vocabulario hace mucho tiempo. Gracias, os quiero. Esta tesis está dedicada exclusivamente a vosotros y al hecho de que con trabajo y sacrificio se puede conseguir cualquier cosa. Gracias por enseñarme tan bien.

A mi hermana, Ana Mari, que siempre ha estado a mi lado apoyando cada decisión que he tomado, que han sido muchas y algunas incomprensibles para todos menos para ti. Gracias por tu apoyo incondicional peque, y por cuidar de la familia, te quiero mucho.

### **A la meua familia de Serra.**

A Àngels, la meua dona. Moltíssimes gràcies per aparèixer en la meua vida i fer que tot tinga sentit. Saps que sense tu esta tesi haguera sigut impossible. Gràcies de tot cor per aguantar els meus canvis d'ànim durant aquests anys, per estimar-me sense condicions i estar sempre al meu costat. Ets la millor persona que hi ha al món. T'estime.

A Rosa, gràcies per fer-me sentir com a la meua casa, per obrir-me la porta a la família tan meravellosa que tenim i que has fet que senta com a meua. Gracies pel caliu familiar, bonica. T'estime molt.

A la iaia Vicentica. Gràcies per eixe somriure cada vegada que arribava a ta casa, eixa pau que transmeties i eixos besets. Ulls de mar, mai t'oblidaré, gràcies iaia!!!

## AGRADECIMIENTOS

A Estela, Pepe, Alba, Raquel, Jose, Miquel, Maties, Pilar, Francis, Roberto, Jose, Rosita i la petita Angelet. Gràcies de tot cor a tots per acollir-me com un més de la família. Os vull molt.

### **A mi maravilloso grupo de La Fe.**

A mi director de tesis. Roque, gracias por elegirme, por confiar en mí. Por enseñarme con tanta paciencia, tanto en laboratorio como en escritura científica, por motivarme en los momentos malos y sacar lo mejor de mí. Gracias por tratarme como uno más dentro del grupo tan fantástico que tenemos en La Fe y muchísimas gracias por la oportunidad de ir a Boston, jamás lo olvidaré.

A mi tutor de tesis. Ramiro, muchas gracias por todo el apoyo y la ayuda en estos años, y en el sprint final de esta tesis. Es un placer trabajar con gente tan alegre como tú. ¡No cambies nunca!

A Marina, gracias por ayudarme en la realización de mi tesis doctoral, por estar siempre dispuesta a ayudar, por esa alegría de trabajar cada día y por amenizar nuestras reuniones de grupo con tus continuas bromas, y sobre todo por aguantarnos a Roque y a mí, que muchas veces es difícil. ¡Eskerrik asko Marin!

A Vane, mil gràcies per tota la ajuda que m'has donat tant a nivell personal com al treball. No oblidaré les xarrades divertides, els grans anys que hem passat veient guanyar-ho tot al barça i el vòlei platja. Sense tu no haguera conegut mai a l'Àngels, mai t'ho podré agrair prou. Gràcies bonica de tot cor.

A Marta Benet. Eres una de las personas que más me ha ayudado en el laboratorio y de las más comprensivas e inteligentes que conozco, gracias por enseñarme tanto, por tener tanta paciencia conmigo y siempre estar dispuesta a ayudarme. ¡Ya lo sabes, yo siempre en tu equipo!

## AGRADECIMIENTOS

A Martita y a Carla, gracias por toda la ayuda que me habéis brindado y por la caña que me habéis dado para que sea más ordenado en el laboratorio, de veras que lo agradezco. ¡Gracias peques!

A Sandra, Laura, Agus, Zaca, Guillermo, Salva, Carles, Toni, Aitana y Amado; mil gracias por aguantar mis locuras. Gracias por ayudarme en todo momento y desconectar juntos con esas cervezas de los viernes.

A Cris, Gabi, Juancar, Aitor, Silvia, Nuri, Laia, Alex, Dani, Amparo, Laura N y Dolors; gracias por hacer el día a día más sencillo y alegre.

Dudo mucho que haya un grupo tan genial como todos vosotros, os echaré muchísimo de menos. ¡Gracias!

### **A mis primeros grupos en la Universidad de Valencia.**

A Paco Dasí, gracias por introducirme en la investigación en Valencia, animarme a conseguir una beca y confiar en mis aptitudes.

A Juan Viña y Federico Pallardó, muchísimas gracias por permitirme aprender en la Unidad Central de Investigación (UCIM).

Al grupo de Fisiología de la facultad de Medicina de Valencia y al personal de la UCIM ; Jose Luis, Eva, Jessi, Sonia, Andrés, Ana, Kike, gracias a todos por ayudarme en mis primeros pasos en esto de la ciencia.

A Dolores Corella y al grupo de Medicina Preventiva y Salud Pública de la Universitat de València, gracias por darme la oportunidad de trabajar con vosotros, confiar en mí y enseñarme a trabajar en un laboratorio de genética molecular.

## AGRADECIMIENTOS

### **Aos meus amigos Açorianos.**

Eu quero agradecer à Dra. Luisa Mota-Vieira e ao pessoal da UGPM (Unidade de Genética e Patologia Moleculares) do Hospital Divino Espírito Santo por me ensinar o trabalho de laboratório e fazer que começasse a gostar da ciência. Muito obrigado Rita, Paula, Cidália, Marta, Claudia, Ana, Josep, por fazer do meu estágio o principio d'uma grande aventura.

### **A mi gente de Boston.**

Thank you very much, Dr. Richard Gregory. It was a great honor and pleasure to have the opportunity to work in your lab. Children's Hospital is a terrific place to learn Science from great researchers. Thanks for conveying your enthusiasm for Science, and for the warm hospitality during my stage. Many thanks to James, Bobby, Natalia, Elena, Hao-Ming, Robinson, Andrew and Masaki; thanks for helping me to understand microRNAs mechanisms and sharing happy hour beers!

A Ander, he tenido mucha suerte de conocer a alguien tan autentico y tan noble como tú. Gracias por ser mi familia en Boston, hacerme sentir en casa aun estando tan lejos de ella. Echo de menos esas cervezas en *The Asgard* y esas noches de Jazz en directo en Wally's Cafe. Nunca cambies. ¡La próxima ronda la pago yo!

### **A mis amigos de Madrid.**

A Pilar Santisteban, muchísimas gracias por toda la ayuda recibida. No lo olvidaré. ¡Gracias de todo corazón Pilar!

A Guille, Ana, Ainara, Cande, María, Luismi, Rodrigo, Ramsés, Ana, Ada, Jesús, Alex y Sergi, sois un grupo genial, no cambiéis nunca chicos.

## AGRADECIMIENTOS

### **A mis amigos de Valencia.**

A Toni, Gus, Jovi, Josan, Rudy, Sandra, M<sup>a</sup> Carmen, Marta. Gracias por estar siempre ahí. Muchísimas gracias chicos.

A Paco y Mer. Bueno, ¿qué decir? Sin vuestra ayuda en los comienzos no habría sido posible llegar aquí. Os agradezco mucho que confiarais en mí y agradezco muchísimo lo bien que me habéis tratado. Gracias por estar siempre ahí, incluso cuando tenía que ensayar el DEA o la tesis.

**Y por supuesto, a todas las personas que han confiado en mí durante este trayecto que aunque no estén nombradas siempre estarán en mi corazón. ¡Gracias a todos!**

**ÍNDICE**

**SUMARIO .....1**

**ABREVIATURAS .....5**

**INTRODUCCIÓN.....9**

**I.1. LA REPROGRAMACIÓN CELULAR ..... 11**

**I.1.1. Desarrollo histórico ..... 13**

**I.1.1.1. La reprogramación celular a la pluripotencia ..... 13**

**I.1.1.1.1. La reprogramación nuclear ..... 14**

**I.1.1.1.2. Derivación de las células pluripotentes embrionarias ..... 14**

**I.1.1.1.3. Reprogramación celular por heterocariosis ..... 15**

**I.1.1.1.4. La reprogramación celular mediante la expresión de factores de transcripción específicos ..... 15**

**I.1.1.2. La transdiferenciación..... 17**

**I.1.1.2.1. Transdeterminación ..... 17**

**I.1.1.2.2. Estudios en heterocariontes..... 18**

**I.1.1.2.3. Transdiferenciación inducida por factores de transcripción: MyoD ..... 18**

**I.1.2. La reprogramación de fibroblastos a células pluripotentes inducidas (iPSC) usando factores de transcripción específicos .... 20**

**I.1.2.1. Factores de reprogramación y métodos de expresión ..21**

**I.1.2.2. Fases de la reprogramación a iPSC.....27**

**I.1.2.3. Mecanismos más relevantes que determinan la eficiencia de la reprogramación de células somáticas a iPSC. ....32**

**I.1.3. La reprogramación de fibroblastos a otros linajes celulares usando factores de transcripción específicos ..... 35**

**I.2. DESARROLLO TEMPRANO DEL HÍGADO.....39**

**I.2.1. Del cigoto al endodermo definitivo ..... 41**

**I.2.2. Adquisición de la competencia hepática en el endodermo definitivo..... 43**

**I.2.3. De endodermo definitivo anterior a endodermo hepático. Papel de FGF y BMP..... 45**

## ÍNDICE

I.2.4. De endodermo hepático a primordio hepático.....	47
I.2.5. Diferenciación de hepatoblastos a colangiocitos y hepatocitos embrionarios .....	49
I.2.5.1. Colangiocitos .....	50
I.2.5.2. Hepatocitos .....	51
I.3. FUENTES ALTERNATIVAS DE HEPATOCITOS.....	55
I.3.1. Células madre adultas hepáticas: células ovales.....	57
I.3.2. Células madre embrionarias .....	58
MATERIALES Y MÉTODOS .....	61
M.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS .....	63
M.1.1. Plásmidos retrovirales.....	65
M.1.2. Plásmidos episomales .....	65
M.1.3. Plásmidos reporteros .....	66
M.2. CULTIVOS CELULARES .....	67
M.2.1. Técnicas comunes de cultivos celulares .....	69
M.2.1.1. Tripsinización y cambio de medio.....	69
M.2.1.2. Criopreservación .....	69
M.2.1.3. Descongelación celular .....	70
M.2.1.4. Microscopía .....	70
M.2.2. Líneas celulares .....	71
M.2.3. Aislamiento y mantenimiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) .....	71
M.2.4. Células pluripotentes .....	72
M.2.4.1. Obtención de LIF e Incubación en medio 2i/LIF .....	72
M.2.4.2. Caracterización de células pluripotentes inducidas ....	73
M.2.4.2.1. Tinción con fosfatasa alcalina .....	73
M.2.4.2.2. Formación de cuerpos embrioides.....	74
M.2.5. Reprogramación.....	74
M.2.5.1. Reprogramación a iPSC.....	74
M.2.5.2. Reprogramación a endodermo hepático .....	75
M.2.5.3. Reprogramación a hepatocitos.....	75

<b>M.3. INTRODUCCIÓN DE DNA EN CÉLULAS EUCARIOTAS .....</b>	<b>77</b>
<b>M.3.1. Transfecciones .....</b>	<b>79</b>
<b>M.3.1.1. Transfección de ESC con liposomas .....</b>	<b>79</b>
<b>M.3.2. Infecciones .....</b>	<b>80</b>
<b>M.3.2.1. Generación de retrovirus e infección .....</b>	<b>80</b>
<b>M.3.2.2. Generación de lentivirus e infección .....</b>	<b>82</b>
<b>M.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS .....</b>	<b>83</b>
<b>M.4.1. Aislamiento de RNA .....</b>	<b>85</b>
<b>M.4.1.1. Extracción de RNA .....</b>	<b>85</b>
<b>M.4.1.2. Cuantificación y conservación del RNA.....</b>	<b>85</b>
<b>M.4.2. Extracción de DNA genómico .....</b>	<b>85</b>
<b>M.4.3. Preparación de cDNA .....</b>	<b>86</b>
<b>M.4.4. Preparación de extractos proteicos.....</b>	<b>86</b>
<b>M.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.....</b>	<b>87</b>
<b>M.5.1. PCR cuantitativa a tiempo real .....</b>	<b>89</b>
<b>M.5.2. Western blot .....</b>	<b>89</b>
<b>M.5.3. Hibridación y análisis de microarrays .....</b>	<b>90</b>
<b>M.5.4. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) ..</b>	<b>91</b>
<b>M.5.5. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) ...</b>	<b>92</b>
<b>M.5.6. Ensayos reporteros.....</b>	<b>92</b>
<b>M.6. TABLAS.....</b>	<b>95</b>
<b>M.6.1. Plásmidos .....</b>	<b>97</b>
<b>M.6.2. Combinaciones retrovirales.....</b>	<b>98</b>
<b>M.6.3. <i>Primers</i> .....</b>	<b>100</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>R.1. REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS A LINAJE HEPÁTICO ...</b>	<b>107</b>
<b>R.1.1. Reprogramación de MEF a endodermo hepático .....</b>	<b>109</b>
<b>R.1.1.1. La expresión de Foxa2 y Gata4 no es suficiente para reprogramar MEF a endodermo hepático .....</b>	<b>110</b>
<b>R.1.1.2. MEF reprogramados con Oct4, Sox2, Klf4 y Hhex adquieren una morfología similar a colangiocitos .....</b>	<b>115</b>
<b>R.1.2. Reprogramación de MEF a hepatocitos (iHep) .....</b>	<b>116</b>

## ÍNDICE

<b>R.2. BLOQUEO DE LA REPROGRAMACIÓN A IPSC MEDIANTE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GATA4 .....</b>	<b>125</b>
<b>R.2.1. La expresión de Foxa2 y Gata4 bloquean la inducción de Nanog durante la reprogramación a células pluripotentes inducidas .....</b>	<b>127</b>
<b>R.2.1.1. Los clones aislados de MEF reprogramados con OKSM+F+G no son iPSC parcialmente reprogramadas .....</b>	<b>129</b>
<b>R.2.2. Gata4 y no Foxa2 es responsable del bloqueo de la reprogramación a células pluripotentes inducidas .....</b>	<b>134</b>
<b>R.2.3. Análisis de la función de Gata4 en los procesos clave de la reprogramación a iPSC .....</b>	<b>137</b>
<b>R.2.3.1. Gata4 no influye en la senescencia ni en la proliferación celular.....</b>	<b>137</b>
<b>R.2.3.2. Gata4 no bloquea la MET de los fibroblastos embrionarios durante la reprogramación.....</b>	<b>139</b>
<b>R.2.3.3. Gata4 no silencia los factores de transcripción exógenos ni activa los principales factores de transcripción endógenos relacionados con la pluripotencia.....</b>	<b>141</b>
<b>R.2.4. Gata4 actúa en la fase de maduración de la reprogramación a iPSC.....</b>	<b>144</b>
<b>R.2.5. La expresión de Nanog rescata el bloqueo inducido por Gata4.....</b>	<b>150</b>
<b>R.2.6. El silenciamiento de Gata4 acelera el proceso de reprogramación.....</b>	<b>154</b>
<b>R.2.7. Gata4 inhibe la transcripción de Nanog mediante la unión a un regulador distal de la transcripción (<i>enhancer</i>) .....</b>	<b>159</b>
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>167</b>
<b>D.1. TRANSDIFERENCIACIÓN DE MEF A IHEP MEDIANTE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS .....</b>	<b>169</b>
<b>D.2. PAPEL DE GATA4 EN EL BLOQUEO DE LA REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS .....</b>	<b>175</b>

ÍNDICE

<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>181</b>
<b>ARTÍCULO PUBLICADO .....</b>	<b>185</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>189</b>

## ÍNDICE

SUMARIO

# ***SUMARIO***

## SUMARIO

## SUMARIO

Existe una necesidad urgente de obtener hepatocitos funcionales a partir de células no hepáticas para su aplicación en estudios farmacotoxicológicos, patofisiológicos o en terapia génica. En esta tesis doctoral se muestra la conversión directa de fibroblastos embrionarios de ratón a células con morfología y fenotipo similares al hepatocito mediante la expresión retroviral de seis factores de transcripción hepáticos, Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF6. Los fibroblastos infectados mantenidos durante 3-4 semanas en cultivo adquieren una morfología epitelial y expresan genes típicamente hepáticos como Albumina, Cyp7a1, Tat o Slc10a1 a niveles próximos al hepatocito. Durante la manipulación de los fibroblastos mediante la expresión de los factores de transcripción ya mencionados, observamos que el factor de transcripción Gata4 es capaz de bloquear la reprogramación a células pluripotentes inducidas. La expresión de Gata4 junto con los factores de reprogramación a pluripotencia, Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc, impide la inducción de Nanog en los fibroblastos en reprogramación. La ausencia de Nanog conlleva la imposibilidad de transitar desde la fase de iniciación a la fase de maduración de la reprogramación. En esta tesis describimos como Gata4 es capaz de unirse directamente a un regulador distal (ECR IV) del gen Nanog e inhibir su transcripción, causando un bloqueo permanente en la reprogramación a pluripotencia. Los resultados de esta tesis no solo tienen implicaciones en los estudios de la reprogramación sino también en el descifrado de las redes transcripcionales que permiten la segregación del endodermo primitivo de las células de la masa celular interna durante el desarrollo embrionario.

## SUMARIO

ABREVIATURAS

# ***ABREVIATURAS***

## ABREVIATURAS

## ABREVIATURAS

**ChIP:** Inmunoprecipitación de la cromatina

**ECM:** Matriz extracelular

**ECR:** Región evolutivamente conservada

**EGF:** Factor de crecimiento epitelial.

**EMSA:** Ensayo de cambio de movilidad electroforética

**EMT:** transición epitelio-mesénquima

**ESC:** Células madre embrionarias

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

**GFP:** Proteína verde fluorescente

**HGF:** Factor de crecimiento de hepatocitos

**ICM:** Masa celular interna

**iHep:** Hepatocitos inducidos

**iPSC:** Células pluripotentes inducidas

**MCH:** Medio condicionado hepático

**MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón

**mESC:** Células madre embrionarias de ratón

**MET:** Transición mesénquima-epitelio

**miRNA:** MicroRNA

**OK:** Retrovirus que codifican para Oct4, y Klf4

**OKS/M:** Infecciones retrovirales con OKS y OKSM

**OKS:** Retrovirus que codifican para Oct4, Klf4 y Sox2

**OKS+H:** Retrovirus que codifican para Oct4, Klf4, Sox2 y Hhex

**OKSM:** Retrovirus que codifican para Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc

**OKSM+F+G:** Retrovirus que codifican para Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Foxa2 y Gata4

**OKSM+G:** Retrovirus que codifican para Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc y Gata4

**OKSM+RG:** Infección con retrovirus que codifican para Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc. Reinfeción a día 8 con el

## ABREVIATURAS

retrovirus que codifica para Gata4

**OS:** Retrovirus que codifican para Oct4 y Sox2

**OSM:** Oncostatina M

**pr-iPSC:** iPSC parcialmente reprogramadas

**Ret-:** Retrovirus

**RFP:** Proteína roja fluorescente

**SH3, SH4, SH5, SH6:** lentivirus que expresan distintos shRNA para Gata4.

**SHLUC:** lentivirus que expresa un shRNA para luciferasa

**shRNA:** precursor estable del RNA de interferencia

**siRNA:** RNA de interferencia

**STM:** Mesénquima del *septum transversum*

**TGF:** Factor de crecimiento transformante

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular

INTRODUCCIÓN

# ***INTRODUCCIÓN***

## INTRODUCCIÓN

**I.1. LA REPROGRAMACIÓN CELULAR**

## INTRODUCCIÓN

La reprogramación celular se puede definir funcionalmente como la conversión de un tipo celular diferenciado en otro distinto. Sin embargo, también implica una remodelación completa de su epigenoma.

Para facilitar la lectura de esta tesis, hemos diferenciado entre dos tipos de conversión celular, la reprogramación celular a la pluripotencia, también denominada reprogramación de células somáticas, y la transdiferenciación.

### **I.1.1. Desarrollo histórico**

El descubrimiento de que las células diferenciadas pueden ser reprogramadas a otro tipo celular ha sido un largo proceso que abarca casi 100 años. En esta sección realizaremos un breve viaje por los momentos clave que han culminado con la concesión del premio nobel de medicina y fisiología 2012 a los doctores John B. Gurdon y Shinya Yamanaka por sus estudios en la reprogramación celular y células madre (Figuras I.1, I.2).

#### **I.1.1.1. La reprogramación celular a la pluripotencia**

La **reprogramación a la pluripotencia** se produce cuando una célula somática adulta se convierte en una célula pluripotente [1]. Aunque los experimentos del Dr. Yamanaka supusieron un empuje extraordinario a este fenómeno y sus posibilidades en investigación y terapias regenerativas, el estudio de la reprogramación comenzó hace casi 100 años. A continuación se detallan los hitos más importantes en el descubrimiento y desarrollo de la reprogramación celular a la pluripotencia culminada con el descubrimiento de las células pluripotentes inducidas o iPSC [2].

## INTRODUCCIÓN

### *1.1.1.1.1. La reprogramación nuclear*

En 1918, Hans Spemann se preguntó hasta cuando el núcleo de las células de un cigoto en división permanecía totipotente. Spemann realizó una constricción de un embrión de salamandra de 2 células y de 16 células rodeándolo por la línea media con un pelo de bebé. Cada una de las mitades generó un animal viable, demostrando que el núcleo permanece totipotente durante al menos 4 divisiones. En 1952 se desarrolló la técnica de trasplante nuclear, utilizando *Rana pipiens* [3]. Briggs y colaboradores demostraron que el núcleo de una célula del blastocisto de rana, trasplantado a un oocito enucleado de rana, daba lugar a un renacuajo completamente desarrollado. Por el contrario, si el núcleo provenía de una célula de la gástrula, disminuía sensiblemente la eficiencia del proceso. Este estudio revela que el núcleo de un blastocisto en división permanece totipotente hasta la fase de gastrulación. Gurdon y colaboradores, utilizando *Xenopus Laevis*, demostraron que el núcleo de una célula epitelial adulta completamente diferenciada era capaz de generar animales adultos fértiles, al trasplantarlo a oocitos enucleados [4, 5]. Fueron necesarios 30 años más de estudios hasta que se desarrolló la primera clonación en mamíferos. Ian Wilmut y colaboradores crearon la oveja Dolly después de trasplantar el núcleo de células epiteliales en cultivo en oocitos enucleados [6]. Del compendio de estos experimentos se obtuvo la conclusión que el núcleo de una célula diferenciada mantiene la información necesaria para generar un individuo completo.

### *1.1.1.1.2. Derivación de las células pluripotentes embrionarias*

La pluripotencia se define como la capacidad que tiene una célula de diferenciarse a células de cualquiera de las 3 capas embrionarias: endodermo, mesodermo o ectodermo [7]. Sin embargo, estas células no son totipotentes puesto que por sí solas no pueden originar un organismo adulto, debido a que no tienen la capacidad de formar tejidos extraembrionarios como la placenta. Las células pluripotentes embrionarias (ESC) son células derivadas de la masa celular interna

(ICM) del embrión [8]. En 1981 se establecieron las primeras líneas de ESC de ratón [9, 10] y en 1998 las primeras líneas humanas [8]. El hecho de que las ESC pueden diferenciarse *in vitro* a un enorme número de distintos tipos celulares, permitió la identificación de factores de transcripción esenciales en el mantenimiento de su fenotipo, como Oct4 [11].

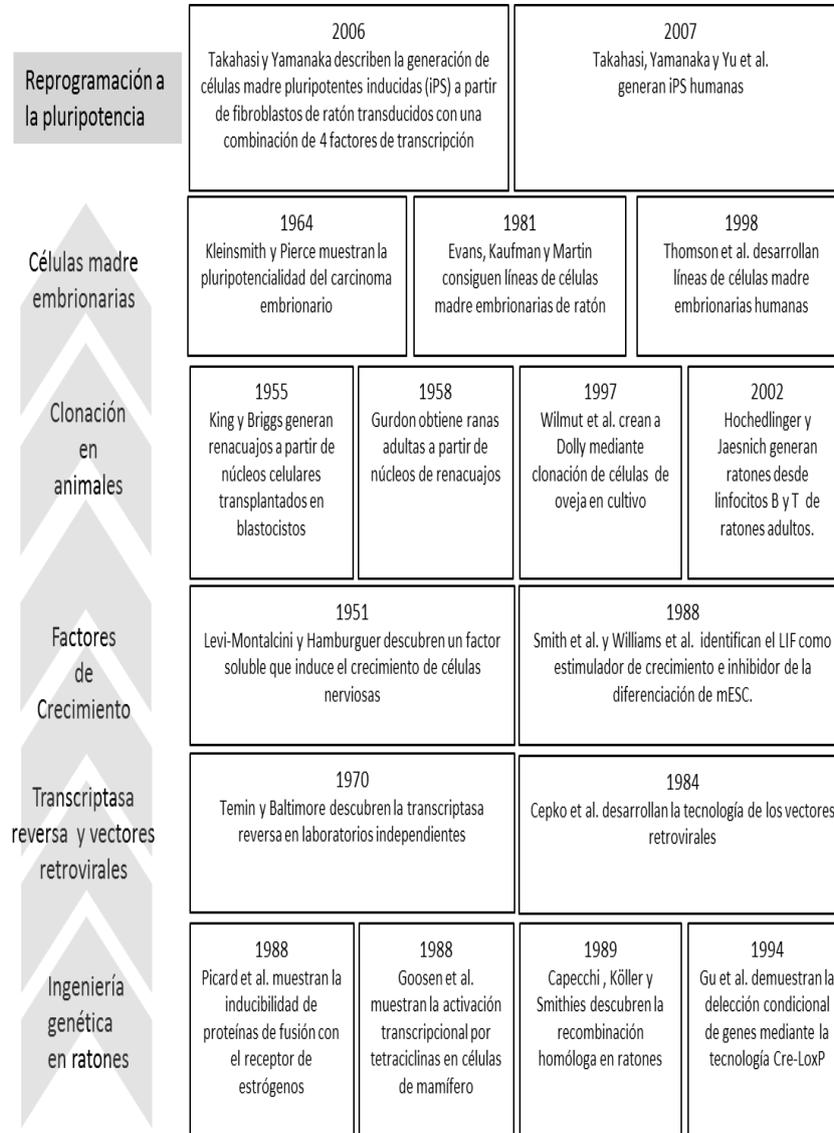
### *1.1.1.1.3. Reprogramación celular por heterocariosis*

El análisis de los heterocariontes (células que contienen núcleos genéticamente distintos) entre células madre embrionarias y varios tipos de células somáticas, tuvieron un fuerte impacto en el posterior descubrimiento de las iPSC. La fusión entre ESC y células T indujo la reprogramación parcial del núcleo de la célula diferenciada hacia un fenotipo pluripotente [12]. La observación de la dominancia de las células madre en los heterocariontes sugirió la posibilidad que tanto las células madre como los oocitos contienen factores de acción *trans* capaces de reprogramar el núcleo de las células somáticas.

### *1.1.1.1.4. La reprogramación celular mediante la expresión de factores de transcripción específicos*

El laboratorio del Dr. Yamanaka publicó en 2006 la reprogramación de fibroblastos de ratón a iPSC (del inglés *induced pluripotent stem cells*) mediante la sobreexpresión retroviral de tan sólo cuatro factores de transcripción, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc [2]. Este estudio y otros posteriores determinaron que las iPSC eran funcionalmente idénticas a las ESC, i.e. puede ser diferenciadas a células adultas de cualquier linaje celular [13-15]. (Ver también apartado 1.1.2).

## INTRODUCCIÓN



**Figura I.1. Principales acontecimientos en el desarrollo de la reprogramación de células somáticas**

### I.1.1.2. La transdiferenciación

La **transdiferenciación** es el proceso por el cual una célula somática madura se transforma en otra célula somática madura de distinto linaje celular sin pasar *a priori* por estadios intermedios pluripotentes [16-18]. Brevemente destacamos los descubrimientos más importantes en el desarrollo de este proceso.

#### I.1.1.2.1. Transdeterminación

A finales de los años 60 se descubrió que células aisladas de un disco imaginal especificado en *Drosophila*, al ser trasplantadas a otros discos imaginales distintos del de su procedencia, pueden cambiar su destino celular [19]. Las células de los discos imaginales son susceptibles a señales ambientales que pueden alterar su destino. [20]. Estudios posteriores demostraron que la expresión ectópica de Pax6 puede inducir la formación del ojo en distintos apéndices de la mosca [21]. Similares efectos se relataron en distintos experimentos con miembros de la familia de genes homeobox Hox [22]. Estos experimentos demostraron que algunos genes controlan el diseño del cuerpo del embrión a lo largo del eje antero-posterior. Estos genes están situados normalmente en *clusters*. El orden lineal que tienen los genes en el *cluster* está directamente relacionado con el orden de las regiones del embrión. Debido a esta relación lineal, los cambios o mutaciones en uno de estos genes afectarán exclusivamente a la región del embrión que controla este gen [23]. Aunque estos experimentos no esclarecen si estos reguladores maestros, más tarde denominados factores de transcripción, actúan únicamente en progenitores o son capaces también de reprogramar células diferenciadas, sí ponen de manifiesto la existencia de reguladores maestros que determinan el desarrollo normal del embrión.

## INTRODUCCIÓN

### *1.1.1.2.2. Estudios en heterocariontes*

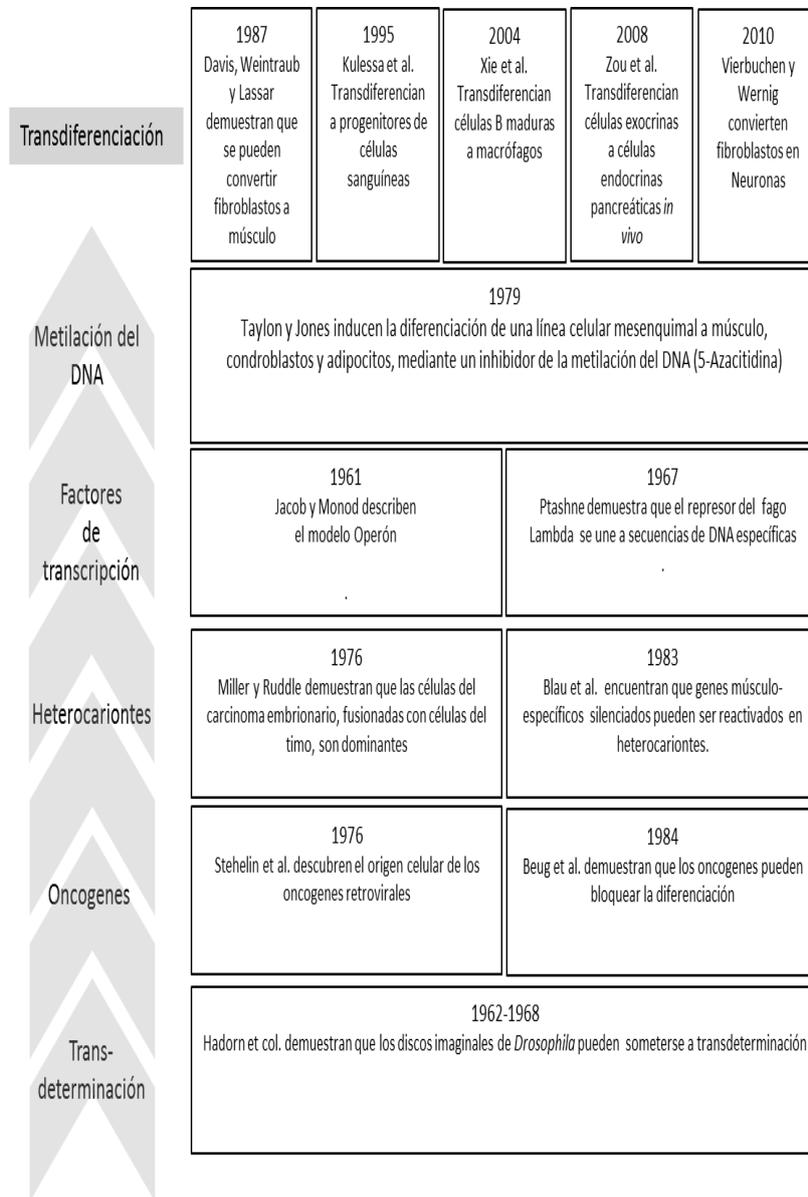
Otra línea de investigación en heterocariontes mostró que genes reprimidos en células diferenciadas podían reactivarse mediante fusión celular. La Dra. Helen Blau fusionó amniocitos humanos con células musculares de ratón y, sorprendentemente, 48 horas después se reactivaron genes músculo-específicos humanos bajo condiciones donde no había replicación de DNA [24]. En experimentos posteriores se obtuvieron resultados similares con hepatocitos y queratinocitos humanos fusionados con células musculares de ratón donde además se observó que la dosis relativa de factores nucleares dirigían la dirección de la diferenciación [25]. En estos trabajos y otros posteriores se pone de manifiesto que el núcleo de una célula diferenciada puede reprogramarse de manera que se comporte fenotípicamente como una célula de un tipo celular distinto [26].

### *1.1.1.2.3. Transdiferenciación inducida por factores de transcripción: MyoD*

Durante el estudio del efecto de fármacos sobre fibroblastos 10T1/2 en cultivo, el Dr. Peter Jones descubrió que la 5-azacitidina, convertía los fibroblastos en un enorme sincitio de células multinucleadas de tipo muscular [27]. Más tarde se descubrió que la 5-azacitina era en realidad un inhibidor de la metilación de DNA [28] que inducía la aparición de un mRNA responsable de su actividad [29]. Un año después se identificó este mRNA como el que codificaba para el factor de transcripción MyoD. De hecho la expresión del cDNA de MyoD en fibroblastos 10T1/2 los reprograma a mioblastos [30, 31].

Este es el primer caso en el que un factor de transcripción consiguió transdiferenciar un tipo celular adulto en otro sin pasar por intermediarios pluripotentes, abriendo así la puerta a la transdiferenciación de células somáticas adultas mediante la expresión de factores de transcripción tejido-específicos.

## INTRODUCCIÓN



**Figura I.2. Principales acontecimientos en el desarrollo de la transdiferenciación**

## INTRODUCCIÓN

### **I.1.2. La reprogramación de fibroblastos a células pluripotentes inducidas (iPSC) usando factores de transcripción específicos**

La reprogramación de células diferenciadas a células pluripotentes inducidas (iPSC), morfológica y funcionalmente idénticas a las células embrionarias pluripotentes, es sin duda uno de los mayores hitos científicos de los últimos años (*Nat Methods Vol 7, "Method of the year 2009"*; Premio Nobel en Medicina y Fisiología 2012). Esta tecnología permite obtener mediante la expresión de factores de transcripción específicos, líneas de células pluripotentes de cualquier individuo a partir de fibroblastos de su piel abriendo así las puertas a la medicina regenerativa personalizada. Además, permitiría obtener células mutantes de individuos afectados de enfermedades congénitas que en otro caso sería imposible (p.e. células nerviosas de un individuo con enfermedad de Huntington) y llevar a cabo estudios de caracterización y búsqueda de fármacos adecuados.

Otro aspecto importante de las iPSC es que permiten caracterizar los mecanismos subyacentes en el establecimiento y mantenimiento de la pluripotencialidad. Sirva como ejemplo que en el periodo 2002-2003 se publicaron tres trabajos en los que se acuñó el término "*stemness*" o genes que caracterizaban a una célula como pluripotente [32-34]. En todos estos trabajos se realizaron *microarrays* de células madre embrionarias, células madre neurales y células madre hematopoyéticas, en busca de genes clave de la pluripotencia. Sin embargo, en cada estudio por separado, se obtuvieron listados de genes *stemness* completamente distintos de los listados de los otros estudios (tan solo 1 gen era común a los 3 listados) [35]. Las iPSC nos ofrecen un marco excepcional para determinar de una manera funcional cuales son los genes que determinan que una célula sea pluripotente y cómo afecta la presencia de otros genes "coadyuvantes".

**I.1.2.1. Factores de reprogramación y métodos de expresión**

Como hemos mencionado anteriormente, el laboratorio del Dr. Yamanaka consiguió reprogramar fibroblastos de ratón a iPSC mediante la expresión de 4 factores de transcripción: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OKSM). Este primer experimento dio pie a una plétora de publicaciones en las que se modificaban los factores empleados. En la siguiente tabla se detallan algunas combinaciones utilizadas en estos últimos años que difieren de la reprogramación clásica

<b>Factores</b>	<b>Origen</b>	<b>Referencia</b>
OKS/M + Shp53	Humano y Ratón	[36]
OS, Nanog, Lin28	Humano	[37]
OK	Células madre neurales Ratón	[38]
OKS+ Utf1	Humano	[39]
OKS+Sall4	Humano y Ratón	[40]
OKSM + Pax5 shRNA + Cebp $\alpha$	Ratón	[41]
OKSM+ Glis1	Humano y Ratón	[42]
mir-302a/b/c/d	Humano	[43]
mir302b/c/a/d/367	Ratón	[44]
mir-200c+mir- 302b/c/a/d/367+mir- 369-3p, -5p	Humano	[45]
OKSM+mir-200b +mir- 200c	Ratón	[46]

También ha habido modificaciones significativas respecto al método de expresión de los diferentes factores de reprogramación. De hecho, una vez se constató que la reprogramación a pluripotencia implicaba el silenciamiento de los transgenes, se pudo emplear métodos de expresión transitorios. A continuación realizaremos una breve

## INTRODUCCIÓN

descripción de los vectores utilizados hasta la fecha para la reprogramación a iPSC.

### Vectores retrovirales

Los vectores retrovirales son de gran utilidad en la reprogramación celular. Los retrovirus poseen unas secuencias repetidas en su genoma cientos o miles de veces (LTR). Estas secuencias flanquean genes funcionales y son utilizadas por los retrovirus para insertar sus secuencias génicas en el genoma del hospedador. Si clonamos el cDNA de los factores de reprogramación en la zona que se encuentra flanqueada por los LTR 5' y 3' del retrovirus, conseguiremos una alta y estable expresión de los transgenes. Estos LTR tienen actividad promotora en muchas células somáticas, sin embargo, su actividad transcripcional se reprime en células pluripotentes a través de modificaciones epigenéticas como la metilación de DNA e histonas. Por tanto, durante el proceso de reprogramación, la expresión exógena de los factores de transcripción es gradualmente silenciada. Este silenciamiento correlaciona con la calidad de las iPSC, si se produce el silenciamiento en la fase de maduración las iPSC son de mejor calidad que si se produce el silenciamiento retroviral en la fase de estabilización [47].

### Vectores lentivirales

Los lentivirus son retrovirus capaces de infectar tanto células en división como quiescentes. Los factores de transcripción insertados mediante lentivirus muestran una alta expresión y estabilidad al igual que los retrovirus. Generalmente son más resistentes al silenciamiento en células pluripotentes que los retrovirus. La adaptación de sistemas de expresión inducibles a los lentivirus [48] fueron especialmente útiles para la investigación básica de los eventos que ocurren durante la reprogramación.

### Virus Sendai

El virus Sendai es un virus de RNA(-) monocatenario. Este virus se replica en el citoplasma, por tanto teóricamente no existe integración viral en el genoma del hospedador. Al clonar los genes que codifican para los factores de reprogramación en este virus obtenemos una alta y estable expresión de los factores de reprogramación en las células infectadas [49]. Sin embargo, se ha demostrado que, utilizando este vector, las iPSC reprogramadas pueden contener el genoma viral incluso después de un largo periodo en cultivo [50]. Para eliminar el virus Sendai de las iPSC se han desarrollado mutantes del virus Sendai sensibles a la temperatura [51]. En otra estrategia para eliminar el virus se utilizaron siRNA contra la secuencia de RNA viral, obteniendo las primeras iPSC sin integración viral [49].

### Vectores basados en el transposón *piggyBac*

El transposón *piggyBac* es un elemento genético móvil que eficientemente se transpone entre vectores y cromosomas vía “cortar y pegar”. Durante la transposición (transferencia de material genético) la *PiggyBac* transposasa reconoce las ITR (secuencias repetitivas terminales de DNA invertidas) localizadas a ambos lados (5' y 3') del transposón y mueve todo el contenido que flanquean estas ITR, del vector donde se encuentra el transposón, al genoma del hospedador en los sitios TTAA. El vector transponible *piggyBac* puede realizar una integración de los factores de reprogramación dentro del genoma de la célula infectada. La inserción *piggyBac* puede ser escindida del genoma de las iPSC formadas utilizando la transposasa. Aunque la escisión de múltiples transposones *piggyBac* es muy laboriosa, es posible combinar un sistema de transcripción inducible por doxiciclina con un vector *piggyBac* generando iPSC humanas y de ratón sin rastro de integración de los vectores de reprogramación [52].

## INTRODUCCIÓN

### Vectores plasmídicos episomales

Los episomas son los equivalentes eucarióticos a los plásmidos bacterianos. En general, en eucariotas, los episomas son moléculas circulares cerradas de DNA bicatenario. Los episomas son mantenidos de manera estable y replicados en el núcleo celular sin integrarse en el genoma del hospedador. Por tanto, se les puede considerar unidades extracromosómicas replicantes que funcionan autónomamente en el núcleo de la célula hospedadora sin insertarse en el genoma.

En 2008 se generaron iPSC de ratón utilizando vectores de expresión plasmídicos con una eficiencia muy baja [53]. Inicialmente se discutió que esta ínfima eficiencia era debida a la inestable expresión de los factores de reprogramación desde plásmidos. Para solucionar este problema Yu et al. utilizaron un sistema de amplificación de plásmidos **episomales** y generaron iPSC humanas [37]. Los vectores episomales que utilizaron tenían un elemento regulador en *cis* oriP y un elemento en *trans* EBNA1 (Epstein-Barr nuclear antigen-1) procedentes del virus de Epstein-Barr. Estos elementos conferían a los plásmidos la capacidad de replicarse extra-cromosómicamente, una vez por cada ciclo celular. Esto hace posible obtener iPSC sin integración genómica. Sin embargo al ser vectores basados en DNA, la integración genómica siempre puede ocurrir a baja frecuencia.

### Introducción directa de RNAs sintéticos.

La introducción directa de mRNAs sintéticos que codifican para los factores de reprogramación ha conseguido inducir iPSC con alta eficiencia [54]. Los mRNAs utilizados en este estudio fueron creados mediante reacciones de transcripción *in vitro*. Para superar la respuesta antiviral de las células transfectadas de este modo, el mRNA sintético fue sujeto a varias modificaciones [54]. Como los mRNA se degradan rápidamente se pueden aislar fácilmente iPSC sin integraciones genómicas. Sin embargo los procedimientos para la modificación de RNA son complicadas. Además el método requiere transfecciones diarias

## INTRODUCCIÓN

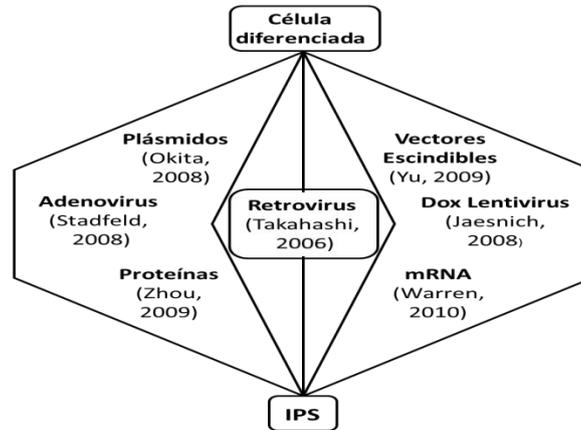
durante dos semanas para mantener un elevado nivel de expresión óptimo de los factores de reprogramación.

Otros RNA que también se han utilizado en la generación de iPSC son los microRNAs [45]. Un microRNA (miRNA) es un RNA monocatenario, de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos [55]. La maduración de miRNAs implica la escisión secuencial de transcripciones primarias llamadas pri-miRNAs que muestran una estructura tallo-lazo (*stem-loop*), donde se encuentran las secuencias de miRNA maduros [56]. El microprocesador está formado por dos enzimas llamados Drosha y DGCR8 [57]. La enzima nuclear RNasa III (Drosha) es la encargada de cortar el pri-miRNA y generar precursores intermedios con una morfología de horquilla (*hairpin*) denominados pre-miRNA (60-80 pb) [58]. Una vez en el citoplasma el pre-miRNA es reconocido por un complejo heterotrimérico compuesto por la RNasa DICER, la proteína de unión a RNA TRBP y la proteína argonauta (Ago) [59]. DICER corta dicho sustrato a 22 nucleótidos de distancia del corte de Drosha, generando así el dúplex miRNA maduro [60]. Un mRNA puede ser diana de múltiples miRNA distintos. Cada uno de estos miRNAs tiene la capacidad de regular la expresión de cientos incluso miles de mRNAs [61].

Así la regulación mediante miRNAs representa un extenso mecanismo de modulación de la expresión génica y por ello son candidatos a considerar para utilizar en reprogramación celular. Es más, en los últimos años se ha conseguido reprogramar a iPSC con una combinación de miRNAs maduros [45] sin la utilización de los factores clásicos OKSM.

La Figura 1.3 resume los métodos de transfección empleados en la reprogramación a iPSC [2, 53, 54, 62-64].

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1.3. Estrategias empleadas en la reprogramación de células somáticas**

Las dos mayores limitaciones para trasladar la tecnología iPSC a la clínica es la baja eficiencia de la reprogramación y la seguridad de las iPSC, esto es, libres de vectores y transgenes.

El rango de eficiencia en la reprogramación varía entre un 0.000006% [63] y 2.5% [65], probablemente como consecuencia de los diferentes métodos de cálculo empleados [66]. La bajísima eficiencia del proceso se atribuyó inicialmente a que la integración de los retrovirus era aleatoria y determinaba la susceptibilidad a la reprogramación. Sin embargo la hipótesis fue rechazada cuando se reprogramaron MEF con métodos de expresión no integrativos y no se observaron mejoras en la eficiencia de la reprogramación [37]. Más tarde se postuló la hipótesis de que la variable estocástica del proceso derivaba de la variabilidad en la expresión relativa de los diferentes factores, de manera que, sólo aquellas células infectadas que alcanzaban un determinado nivel de expresión de cada factor de transcripción exógeno conseguían reprogramarse. Para investigar esta hipótesis se generaron ratones quiméricos a partir de iPSC, en los que todas sus células contenían un *cassette* inducible por doxiciclina que regulaba estrictamente la expresión de los factores OKSM dispuestos en tándem. Se extrajeron MEF de estos ratones y se indujo la reprogramación mediante la adición de doxiciclina para crear iPSC secundarias. Aunque inicialmente se

constató una eficiencia de reprogramación del 1-3% [67], análisis posteriores demostraron que aproximadamente un 100% de las células se reprogramaban [68]. La divergencia procedía del procedimiento de análisis, mientras Wernig lo determinaba a las dos semanas, Hannah prolongó el estudio hasta las 18 semanas. Este resultado sugiere que no existe un subtipo de células susceptible de ser reprogramada, sino que la reprogramación tiene lugar cuando, a parte de expresarse los factores de reprogramación, se dan unas condiciones específicas de *status* epigenético y ciclo celular entre otros. Es decir, la reprogramación no es estocástica por la existencia de subtipos celulares, sino que viene determinada por la estocástica asociada al momento en que se produce; por ello, cuanto más tiempo transcurre desde la inducción de la reprogramación, es más probable que se den las condiciones apropiadas y más colonias de iPSC se generarán.

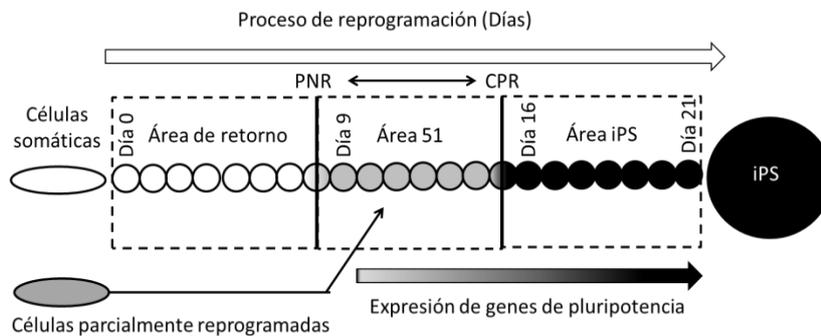
Los vectores basados en métodos de integración genómica pueden inducir la reprogramación a iPSC fácilmente y a una eficiencia aceptable, sin embargo no se consideran *a priori* apropiadas para aplicaciones clínicas, puesto que el *locus* de integración es aleatorio. Los métodos no integrativos suelen ser menos eficientes, aunque recientes estudios muestran mejoras significativas, como las reprogramaciones realizadas con el virus Sendai, plásmidos episomales y RNAs sintéticos.

### **I.1.2.2. Fases de la reprogramación a iPSC**

Durante el proceso de reprogramación de fibroblastos a iPSC, éstos pasan por una serie de formas intermedias más o menos reversibles. Mediante la utilización de un sistema de vectores regulables con doxiciclina, se consiguió monitorizar el proceso de reprogramación y analizar las fases más importantes por las que pasan los MEF hasta convertirse en iPSC maduras [48, 69]. De forma simplista se puede dividir la reprogramación de fibroblastos en tres fases [46, 48, 69, 70] (Figura I.4). Una primera fase llamada fase de iniciación, reversible o área de retorno, donde las células en reprogramación pueden volver al estado inicial si silenciamos la expresión de los factores exógenos [46].

## INTRODUCCIÓN

Una fase de maduración o intermedia, donde las células en reprogramación adquieren la capacidad de expresar genes de pluripotencia tempranos. A esta fase también se le denomina área 51 ya que no se sabe muy bien que ocurre, debido a que las células no pueden volver al fenotipo inicial, pero pueden generarse formas metaestables que no progresan hacia la forma madura. Y una última fase denominada fase de estabilización o área iPS donde se expresan los genes tardíos de pluripotencia. Esta fase lleva a las células en reprogramación a iPSC adultas estables.



**Figura I.4. Esquema de la reprogramación de células somáticas.** En este esquema se muestran las fases por las que pasan las células en reprogramación, durante un proceso aproximado de 21 días, para la adquisición de la pluripotencia. En gris se marca la adquisición de genes tempranos de pluripotencia. En negro se detalla la expresión de genes tardíos de pluripotencia. **PNR:** Punto de no retorno, a partir de este punto los fibroblastos no revierten su fenotipo. **CPR:** células parcialmente reprogramadas, en este punto las células en reprogramación pueden estancarse como formas metaestables inmaduras (pr-iPSC) ó pasar esta barrera y lograr la completa reprogramación a iPSC.

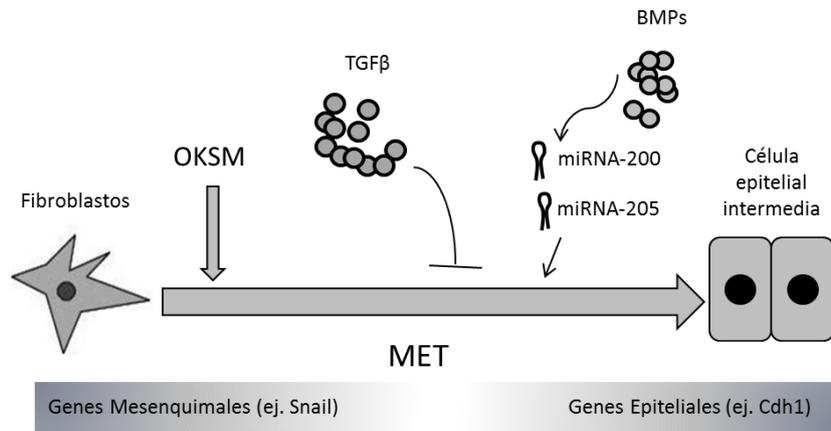
### *La fase de iniciación*

La fase de iniciación comienza con la expresión de los factores de reprogramación y se extiende hasta aproximadamente 5-8 días. Durante la fase de iniciación se induce una **transición mesénquima-epitelio (MET)** caracterizada por inducción de un gran número de genes asociados con el fenotipo epitelial como E-cadherina (Cdh1) [46] y la familia de las ocludinas (Ocln) entre otros [70] (Figura I.5). Al mismo tiempo tiene lugar una regulación a la baja de genes responsables de mantener el fenotipo mesenquimal propio de los fibroblastos, como

## INTRODUCCIÓN

Snail, Slug, Zeb1 y Zeb2 [70]. La transición MET podría no ser más que una consecuencia del proceso de reprogramación, pero de hecho es un fenómeno crucial y necesario para que la reprogramación transcurra normalmente [71]. La adición de miembros de la familia TGF $\beta$ , como TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 y TGF $\beta$ 3, conocidos inductores de la transición epitelio-mesénquima (EMT) [72], bloquea la reprogramación a iPSC [73]; mientras que la adición de BMP, conocido inductor de MET, la favorece [46]. En el periodo comprendido entre el final de la fase de iniciación y el inicio de la fase de maduración (día 7 a día 10) aumentan los niveles de las proteínas relacionadas con la senescencia celular [74]. La **senescencia** es un proceso iniciado como respuesta al estrés y daño celular. Las células en senescencia acumulan cambios moleculares entre los que destacan la expresión del inhibidor kinasa dependiente de ciclina (CDKi,) p16INK4a y el inhibidor Mdm-2, p19Arf. Estas proteínas son capaces de activar procesos de senescencia [75] ya que son parte de las rutas de supresión de tumores asociadas a la proteína p53 [76-78] y a la proteína de retinoblastoma (pRB), que crean focos de heterocromatina asociados a la senescencia (SAHF), lo que silencia genes pro-proliferación [79]. p16INK4a y p19Arf aumentan en cantidad con el paso del tiempo junto con la proteína p53 [74], esta acumulación convierte a las células en senescencia en resistentes a la reprogramación [74]. Las células senescentes acumulan errores en el genoma, pierden la capacidad de dividirse y finalmente mueren. Por tanto se ha postulado que la inhibición de la ruta de señalización de p53 previene la apoptosis, senescencia y arresto del ciclo celular incrementando por tanto la eficiencia de la reprogramación.

## INTRODUCCIÓN



**Figura 1.5. Esquema de la fase de iniciación de la reprogramación a iPSC.**

### *La fase de maduración*

Los estudios de Brambrink y Stadtfeld [48, 69] fueron pioneros en la caracterización transcriptómica de la fase de maduración. Según estos estudios, la fase de maduración se caracteriza por la aparición secuencial de marcadores tempranos de pluripotencia como SSEA (*stage-specific embryonic antigen-1*), AP (fosfatasa alcalina), Cripto o Tcl1. Seguidamente aparece una marcada expresión de marcadores tempranos de pluripotencia como Nanog, Sall4 y Oct4 endógeno [80-83], mientras que desaparece por completo el marcador fibroblástico Thy1 [48, 69]. Esto se debe a cambios en los marcadores epigenéticos y por tanto cambios en la expresión global de estas células, como la desmetilación de los promotores endógenos, que controlan los genes maestros de las células madre Nanog y Oct4, y la trimetilación de la histona H3 en sus residuos de lisina H3K4 y H3K27. La región de eucromatina se caracteriza por tener la lisina 4 de la histona H3 metilada. Los genes no activos, en cambio, están caracterizados por trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3) [67, 84-86].

Una segunda característica de esta fase es el silenciamiento retroviral de los factores de transcripción exógenos. Los fibroblastos han pasado el punto de no retorno (PNR) y no pueden volver a su estado fenotípico

## INTRODUCCIÓN

inicial. El silenciamiento retroviral es, de hecho, una de las características típicas de las células madre embrionarias. Este silenciamiento se puede considerar un marcador o consecuencia de la adquisición de pluripotencia más que un mecanismo de la reprogramación *per se* [87]. El silenciamiento retroviral aparece como un proceso gradual que es iniciado al final de la fase de iniciación y está asociado a la regulación al alza de la metiltransferasa Dnmt3a. En la fase de maduración tardía y fase de estabilización se regulan al alza otras metiltransferasas como Dnmt3b y el factor de silenciamiento retroviral TRIM28 [69], provocando cambios epigenéticos que van modulando secuencialmente el perfil de expresión de las células en reprogramación hacia un perfil de expresión de células pluripotentes [70].

A la fase de maduración también se le conoce como Área 51 [69] en referencia a que se trata de estadios intermedios escasamente caracterizados y muy heterogéneos con diferentes grados de pluripotencialidad. En esta fase es donde podemos encontrar las células parcialmente reprogramadas (pr-iPSC), aquellas que no consiguen activar de forma robusta los genes endógenos de pluripotencia como Nanog [88] y quedan atrapadas en un estadio metaestable de pluripotencialidad. Estas células pueden superar este bloqueo si se cultivan en un medio condicionado para ESC (ver apartado M.2.4) suplementado con los inhibidores PD0325901 y CHIR99021 de las vías de señalización celular MAPK y GSK3, respectivamente (medio 2i/LIF) [88, 89].

### *La Fase de Estabilización*

En la fase de estabilización, se regulan al alza los genes tardíos de pluripotencia como Lin28, Rex1, Dppa4, Dppa5, Stella, Pecam1 [89] y nuevas metiltransferasas como Dnmt3l [70], mientras se estabiliza la expresión de los 3 factores de transcripción maestros en la adquisición y mantenimiento de la pluripotencia (Sox2, Oct4 y Nanog) [2, 90-92]. El perfil epigenético de las células completamente reprogramadas es casi idéntico al de las células madre embrionarias [70]. Estas células

## INTRODUCCIÓN

pluripotentes completamente reprogramadas pueden diferenciarse a cuerpos embrioides retirando el LIF del medio de cultivo [48, 69]. Al inyectarlas en ratones producen teratomas compuestos por células de las 3 capas embrionarias [2, 48, 69]. Las iPSC completamente reprogramadas pueden inocularse en blastocistos dando lugar a ratones adultos y fértiles [48, 69].

### **I.1.2.3. Mecanismos más relevantes que determinan la eficiencia de la reprogramación de células somáticas a iPSC.**

Aunque existe una gran cantidad de procesos que determinan directa o indirectamente la eficiencia de la reprogramación, en este apartado hemos seleccionado aquellos más relevantes o que de algún modo están relacionados con el contenido de esta tesis.

La eficiencia de la reprogramación a iPSC se determina entre la segunda y la cuarta semana desde la inducción de los factores de reprogramación. La eficiencia se define como el número de clones iPSC (identificados con distintos criterios) generados a partir de un número inicial de células somáticas. Estos criterios de selección son variados, aunque los más utilizados son el conteo de colonias en formación con morfología típica de célula madre [93, 94] y el número de clones que expresan fosfatasa alcalina [50, 95].

#### Senescencia/proliferación celular

La senescencia es el arresto del ciclo celular en el transcurso de la fase G1 del ciclo celular, provocado por agotamiento replicativo o en respuesta de señales de estrés como daño en el DNA, drogas quimioterapéuticas, o expresión aberrante de oncogenes. Este arresto celular es implementado primariamente a través de la activación de p53 y de la regulación al alza de inhibidores de las quinasas dependientes de ciclinas (CDK) p16 y p21 [96].

El silenciamiento de p53 combinado con la expresión de Urf1 aumenta en 100 veces la eficiencia de la reprogramación a iPSC [39]. Estos

## INTRODUCCIÓN

autores propusieron que la inhibición de p53 puede bloquear la apoptosis y la senescencia celular aumentando la eficiencia de la reprogramación. Recientemente esta hipótesis ha sido confirmada experimentalmente por varios grupos que obtuvieron aumentos significativos en la eficiencia de reprogramación usando células deficientes en p53 [36, 97, 98]. Existe cierta controversia entre los distintos grupos de investigación acerca del mecanismo por el cual p53 disminuye la eficiencia de la reprogramación celular. Hanna et al. sugieren que la ausencia de p53 da lugar a un aumento de la velocidad de proliferación y esto conlleva un aumento en la eficiencia [68]. Por el contrario, otros autores sugieren que la senescencia es una barrera que los MEF deben superar para poder ser reprogramados, por lo que cuando ésta se limita en MEF procedentes de ratones p53<sup>-/-</sup> la eficiencia de reprogramación aumenta [99]. De hecho, estos autores no encontraron diferencias en la proliferación entre MEF *wild-type* y p53<sup>-/-</sup>. En resumen, aunque parece claro que p53 limita la reprogramación de células somáticas, el mecanismo por el que lo hace no está totalmente descifrado.

### Factores relacionados con MET

Otros factores que afectan a la eficiencia de la reprogramación a iPSC son aquellas moléculas que intervengan en la activación o el bloqueo del MET. Estudios de silenciamiento mediante siRNAs revelaron que el inductor de este proceso es una señalización mediante BMP [46]. Inductores de esta vía de señalización como BMP2, BMP7 o BMP9 estimulan a las células infectadas con OKSM a entrar en MET y mejoran la eficiencia de la reprogramación. Mientras que los antagonistas de BMP como Noggin, dorsomorfina o el dominio extracelular de ALK1 bloquean la reprogramación [46].

### Expresión del factor de transcripción Nanog

La activación del factor de transcripción Nanog durante la reprogramación es imprescindible para la completa maduración a iPSC [88]. Sall4 promueve la adquisición de pluripotencia en células en

## INTRODUCCIÓN

reprogramación, promoviendo la expresión de Nanog [40, 100]. Se ha demostrado que aunque Nanog no es necesario en el *pool* inicial de reprogramación [2], su inclusión en este *pool* mejora la eficiencia de la reprogramación [101]. La ausencia de Nanog hace que las células se estanquen en el proceso de reprogramación, impidiendo adquirir las cualidades de una célula iPSC madura [70, 88, 89]. Por tanto cualquier efector positivo o negativo de la expresión del gen Nanog afectará a la eficiencia de la reprogramación celular a la pluripotencia.

### Inhibidores de la metilación y de las rutas MAPK y GSK3

Estudios epigenéticos en las células pr-iPSC, Nanog negativas, demostraron que el promotor de Oct4 de estas células se encuentra hipermetilado [70, 89]. Inhibiendo la metilación con el inhibidor de la DNA metiltransferasa 5-azacitidina (5-AZA) se consiguió reprogramar estas células Nanog negativas a iPSC maduras [70, 89]. Estas células fueron utilizadas para generar ratones quiméricos con éxito [70]. Por tanto los inhibidores de la DNA metiltransferasa aumentan la eficiencia de la reprogramación a iPSC.

Las células madre embrionarias de ratón son capaces de mantenerse en cultivo sin diferenciarse gracias a la citoquina LIF. Además, esta autorenovación se promueve mediante la eliminación de las señales exógenas de diferenciación que expresan las quinasas de la familia MAPK. Una inhibición adicional de la proteína quinasa GSK3 consolida la supresión de diferenciación residual de estas células [102]. En los estudios epigenéticos comentados anteriormente se demostró que la utilización de inhibidores de MAPK y GSK3 junto con la citoquina LIF (2i/LIF), promovían la expresión de Nanog en células pr-iPSC Nanog-negativas, aumentando así la eficiencia de la reprogramación [70, 89].

### **I.1.3. La reprogramación de fibroblastos a otros linajes celulares usando factores de transcripción específicos**

La transdiferenciación implica la conversión de una célula diferenciada a otra completamente diferenciada de otro linaje celular. Lógicamente, la célula original debe perder su fenotipo original al mismo tiempo que adquiere un nuevo fenotipo. Sin embargo, una verdadera reprogramación, más allá de la transdiferenciación, implica un reinicio o “reseteado” de las marcas epigenéticas, por lo que los cambios fenotípicos deben permanecer en el tiempo en ausencia de los factores que la indujeron [103, 104]. A nivel práctico, la transdiferenciación, sea o no una verdadera reprogramación, puede resultar útil a nivel farmacotológico e incluso terapéutico [105-107].

¿Qué criterios se utilizan para seleccionar los factores ideales para la transdiferenciación? Se escogen factores que se expresan específicamente en el linaje celular al que se quiere reprogramar, imprescindibles en el desarrollo embrionario de este linaje celular y preferiblemente que tengan actividad epigenética. Estos factores incluyen en muchas ocasiones miRNA [104], capaces de alterar la expresión de un gran número de genes. En general, parece que la eficiencia de la transdiferenciación mejora si reducimos el número de factores empleados (Figura 1.6). Este hecho fue demostrado elegantemente en los experimentos de inducción a cardiomiocitos y neuronas [103, 106].

Para evaluar la eficiencia y calidad de la reprogramación, se comprueba que las células inducidas han adquirido las funciones y morfología típicas del linaje celular deseado y han perdido las funciones y morfología típicas de las células de origen. Se debe verificar que se ha producido una remodelación epigenética y el nuevo perfil epigenético ha de ser próximo al de la célula destino. Como ya hemos comentado, en una completa reprogramación, las células inducidas han de estabilizar su fenotipo independientemente de los factores exógenos. Del mismo modo que ocurre en la reprogramación a iPSC, la independencia de la

## INTRODUCCIÓN

expresión de los factores exógenos debería permitir inducir la transdiferenciación con vectores no integrativos e incluso con expresión transitoria. Hay que tener en cuenta que mientras las iPSC son clonales (genéticamente idénticas aunque procedan de infecciones retrovirales), y pueden ser escaneadas para encontrar aquellas con lugares de integración seguros [108], las células transdiferenciadas son policlonales, nunca se aíslan de un clon celular específico. Esto incrementa notablemente la posibilidad de mutagénesis insercional, un factor clave para su uso terapéutico.

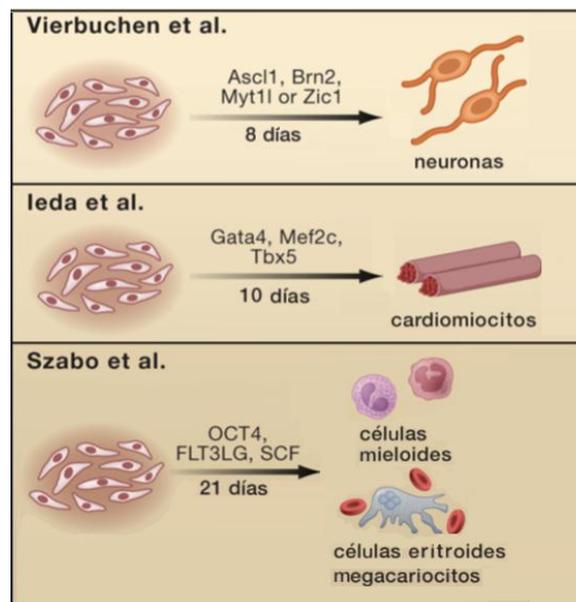
La obtención de células diferenciadas a partir de iPSC autólogas se ha convertido rápidamente en el método más extendido en medicina regenerativa. Sin embargo, la transdiferenciación ofrece algunas grandes ventajas. Se trata de un método más rápido y sencillo *a priori* y permite la transdiferenciación *in situ*, mediante la expresión *in vivo* de los factores de conversión. Esta aproximación se llevó a cabo para convertir células exocrinas en células endocrinas productoras de insulina directamente en el páncreas de ratón [109]. Por tanto la efectiva conversión *in situ* de fibroblastos cardíacos en cardiomiocitos o de glía en neuronas, aunque hoy en día parezca ciencia ficción, puede que se convierta en una estrategia terapéutica para el futuro.

El objetivo final de la medicina regenerativa es utilizar los descubrimientos en el laboratorio de investigación en clínica. Desafortunadamente ni la transdiferenciación ni la diferenciación de linajes celulares a partir de iPSC, están exentas de inconvenientes. La formación de tumores es el mayor de todos ellos en ambas aproximaciones, aunque la transición a partir de iPSC lleva consigo un riesgo adicional de formación de teratomas. Ambas tecnologías precisan de mejora antes de llevarlas a la clínica, ya que en ambos casos sigue existiendo una incompleta reprogramación, diferenciación en tejidos inadecuados o mutagénesis insercional causada por la integración de vectores integrativos que codifican para los factores de reprogramación. Este problema de mutagénesis insercional ha sido en los últimos años

## INTRODUCCIÓN

subrayado mediante ensayos de terapia génica con iPSC [110] impidiendo llevar esta tecnología a la clínica.

Hace 10 años no existía ninguna opción disponible para generar tejidos genéticamente compatibles para terapia celular o para utilizarlos como modelo de enfermedades humanas. Hoy en día tenemos al menos 2 grandes opciones, donde ambas pueden ser aplicables para futuros estudios terapéuticos. Aunque la tecnología iPSC va en cabeza en estos momentos, produciendo gran variedad de tipos celulares distintos, no debemos olvidar que, en el contexto de la medicina regenerativa, esta tecnología lleva 5 años de adelanto a la transdiferenciación.



**Figura I.6. Transdiferenciación de fibroblastos a distintos linajes celulares.** La imagen muestra un esquema de los factores de transcripción utilizados para reprogramar fibroblastos a distintos tipos celulares.

## INTRODUCCIÓN

**I.2. DESARROLLO TEMPRANO DEL HÍGADO**

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

El hígado es uno de primeros órganos en formarse en el embrión. No en vano, una de sus funciones más importantes es la de servir de nicho hematopoyético. De hecho, existe una interrelación entre hígado fetal y hematopoyesis de manera que, mutaciones que afectan al desarrollo de un tejido tiene consecuencias sobre el otro y viceversa. Comprendiendo los mecanismos que gobiernan el desarrollo del hígado podemos idear nuevas terapias para hacer frente a las enfermedades hepáticas en el futuro. Entre los ejemplos de estas aplicaciones, se incluyen la activación de células madre en el hígado adulto [111], el reemplazo de hígados enfermos con células madre embrionarias, que han sido previamente diferenciadas a hepatocitos [112], o la transdiferenciación de células de diferentes órganos, reconstitución de la morfología y función correcta del hígado [113, 114]. La información de las redes transcripcionales y las secuencias morfogenéticas que gobiernan la formación del hígado derivan de estudios en múltiples modelos animales como ratón, pollo, pez cebra, y rana.

A continuación vamos a introducir una breve descripción de las fases tempranas en el desarrollo del hígado, desde la fecundación del oocito (E0) hasta la migración de los hepatoblastos al mesénquima del *septum transversum* (STM) (E9.5: día 9.5 *post coito*, en ratón). El desarrollo y morfogénesis del hígado entre E9.5 hasta el nacimiento se describe en [115-117]. Finalmente, haremos hincapié en los mecanismos moleculares que dan lugar a la diferenciación de los hepatoblastos en células hepáticas.

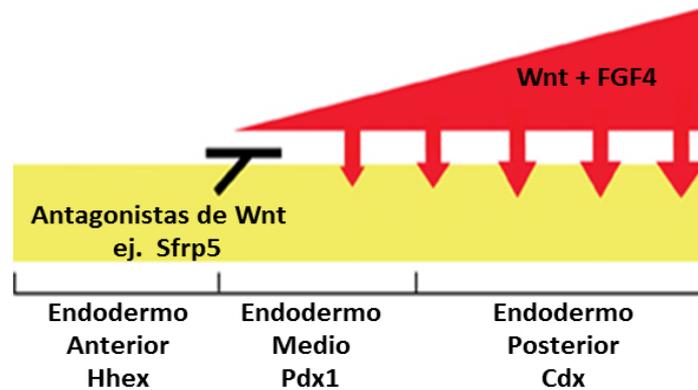
### **I.2.1. Del cigoto al endodermo definitivo**

Durante el desarrollo temprano de los mamíferos, antes de que ocurra la implantación, se produce la segregación entre los tejidos embrionarios y extraembrionarios. El cigoto sufre una serie de divisiones y después de la compactación está formado por una masa de 32 células llamada mórula. En su transición a blastocisto, las células de la mórula secretan un líquido viscoso de manera que, aquellas células que quedan en la superficie se epitelizan y se diferencian a trofoectodermo ya en el blastocisto. Por el

## INTRODUCCIÓN

contrario, las células del interior generan la masa celular interna pluripotente (ICM). En la gastrulación, las células de la masa celular interna, adyacentes al blastocele, dan lugar al hipoblasto, precursor del endodermo primitivo que se diferencia en endodermo parietal y endodermo visceral (endodermo extraembrionario). Estas células extraembrionarias tienen un papel fundamental ya que determinan el eje antero-posterior del embrión y surten de nutrientes a las células embrionarias. Por otra parte, las células de la ICM más próximas al trofoblasto, dan lugar al epiblasto. Estas células comienzan a crecer y migran por la línea primitiva, en el proceso de gastrulación, dando origen a las 3 capas embrionarias y las células germinales. Un grupo de células se ubica entre el epiblasto e hipoblasto (en un lugar virtual), dando origen al mesodermo. Otro grupo permanece dorsalmente en la capa del epiblasto, conformando el ectodermo. Por último, un tercer grupo se dirige hacia el hipoblasto desplazándolo y dando lugar al **endodermo definitivo**.

Inicialmente, el endodermo definitivo es una hoja epitelial que recubre la superficie ventral del embrión. La invaginación de esta hoja epitelial, en la gastrulación, genera la parte anterior y posterior del tubo digestivo primitivo. Cuando estos movimientos morfogenéticos llegan a la mitad del embrión el tubo digestivo primitivo se cierra. Durante este tiempo, el mesodermo adyacente secreta factores de crecimiento que especifica en diferentes tejidos al epitelio del tubo primitivo a lo largo del eje antero-posterior. Estudios en embriones de pollo y *Xenopus* apoyan un modelo donde FGF4 y Wnt son secretados desde el mesodermo posterior, reprimen la especificación a endodermo anterior y promueven el desarrollo del endodermo posterior (Figura I.7). Por lo tanto, en el endodermo anterior, la señalización de la vía Wnt tiene que ser inhibida para su especificación [118-120]. Se han encontrado proteínas antagonistas de la vía Wnt como Sfrp5, que mantienen la señalización de esta vía apagada en la región anterior del endodermo (Figura I.7).



**Figura I.7. Modelo de especificación del endodermo definitivo mediante Wnt y FGF.** Durante la gastrulación y el desarrollo inicial de los somitas, la expresión diferencial de Wnt y FGF a lo largo del eje antero-posterior del tubo gástrico primitivo, induce al endodermo temprano a especificarse en endodermo anterior, medio y posterior. Wnt y FGF se expresan de manera gradual desde el mesodermo posterior y señalizan al endodermo adyacente a reprimir la especificación a endodermo anterior y promover la especificación a endodermo medio y posterior. En el endodermo anterior se expresan antagonistas de la vía Wnt que reprimen la señalización de la vía canónica Wnt/ $\beta$ -catenina inducida por el mesodermo posterior

### **I.2.2. Adquisición de la competencia hepática en el endodermo definitivo**

La competencia es la capacidad de una célula progenitora de adquirir un determinado linaje celular. Para que un dominio embrionario se especifique hacia un determinado tipo celular, no solo tiene que recibir las señales adecuadas, también tiene que ser capaz de interpretarlas. Esta capacidad de la célula de interpretar las señales necesarias para especificarse (en hígado, por ejemplo), se denomina competencia. En este sentido, ¿qué dominio del endodermo definitivo es competente a nivel hepático? LeDouarin et al. Demostraron, utilizando injertos heterotípicos de endodermo de codorniz en embriones de pollo, que únicamente el dominio antero-ventral del endodermo definitivo tiene la capacidad (o es competente) para especificarse a hígado, cuando se trasplanta junto al dominio mesodérmico apropiado [121]. Estudios más recientes con embriones de ratón y ensayos más sensibles de la expresión génica revelaron que, mientras el endodermo dorsal

## INTRODUCCIÓN

normalmente no activa los genes del hígado ni se convierte en hígado, las células del endodermo dorsal inician la expresión de genes hepáticos, cuando se aíslan a estas células de los tejidos mesodérmicos adyacentes [122]. Estudios posteriores demostraron que, la expresión de Wnt desde el mesodermo posterior reprime la activación del programa hepático en el endodermo posterior. De hecho, el bloqueo la actividad de la  $\beta$ -catenina (efector canónico de la vía Wnt), en *Xenopus*, es suficiente para activar Hhex y como resultado encontrar primordios hepáticos ectópicos [119].

Otra aproximación para entender cómo el endodermo adquiere la competencia hepática, es identificar los factores de transcripción que actúan en el proceso. Dos factores de transcripción que se expresan en el ámbito pre-hepático del endodermo anterior ventral son **Foxa2** [123-125] y **Gata4** [126-128]. Las funciones de estos factores de transcripción se pueden discernir comprendiendo cómo estos factores actúan en el contexto de la cromatina. El descubrimiento de que la albumina sérica (Alb1) es uno de los primeros genes que se activa en el endodermo hepático, sirvió de base para una serie de estudios que permitió descifrar el papel de Foxa2 y Gata4 en la inducción de la competencia hepática [129]. Un análisis de los sitios de unión a DNA para Foxa2 y Gata4 mostró que, ambos factores de transcripción están unidos al regulador transcripcional (*enhancer*) de Alb1 en el endodermo, antes de la especificación hepática [122, 130]. Una vez se ha producido la especificación hepática, una variedad de otros factores de transcripción son capaces de ocupar los sitios de unión adyacentes en el regulador transcripcional de Alb1, activándose la expresión de albúmina [131]. En base a estos resultados se elaboró la hipótesis de que, Foxa2 y Gata4 son capaces de descompactar la cromatina, permitiendo el acceso de otros factores de transcripción. Recientemente, se ha obtenido una evidencia genética de estos resultados. Un ratón transgénico con una ablación condicional de Foxa1 y Foxa2 en el endodermo anterior, carece por completo de la inducción de marcadores hepáticos de especificación, como Alb1, Afp o Ttr [132]. Del mismo modo, mientras que el hígado se especifica en embriones de ratón Gata6<sup>-/-</sup> o Gata4<sup>-/-</sup> (aunque el

desarrollo posterior está bloqueado), un doble *knockout* de estos genes, en el pez cebra, revelaron un completo fracaso en la inducción del hígado [133]. Estos resultados proporcionan la evidencia genética que apoya el concepto de que los factores Foxa y Gata son esenciales para la adquisición de competencia en el endodermo definitivo.

### **I.2.3. De endodermo definitivo anterior a endodermo hepático. Papel de FGF y BMP**

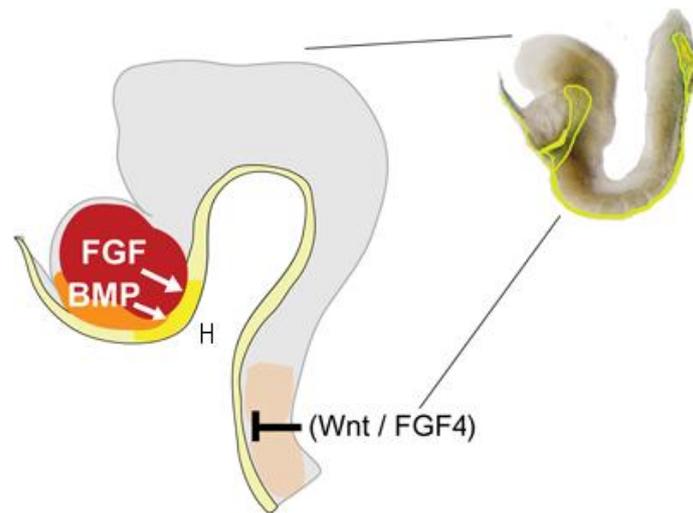
Una vez adquirida la competencia hepatogénica, el endodermo definitivo anterior está capacitado para responder a las distintas señales que lo especificarán a endodermo hepático. Experimentos de explantes de tejidos, llevados a cabo en embriones de pollo, demostraron que, el mesodermo cardíaco instruye al endodermo antero-ventral subyacente a convertirse en endodermo hepático (Figura I.8) [121] ¿Qué factores secretados por el mesodermo cardíaco son los responsables de la especificación del endodermo anterior ventral a endodermo hepático? El cultivo *in vitro* de explantes de embriones de ratón, junto con el uso de embriones de pez cebra y *Xenopus*, han identificado algunas de las señales moleculares secretadas por el mesodermo cardíaco más relevantes, entre las que se encuentran los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) y la familia de citoquinas BMP.

Hay más de 20 genes que codifican para los FGF y únicamente 4 genes que codifican para los receptores de FGF [134, 135]. Cada uno de los receptores de FGF tiene diferentes especificidades de unión para FGF, y la existencia de múltiples isoformas de los receptores proporciona una gran complejidad en las relaciones ligando-receptor. El mesodermo cardíaco expresa FGF1, FGF2, FGF8 FGF10 en el período previo a la inducción hepática en el endodermo [136]. Cuando se aisló tejido endodérmico anterior de ratón y se cultivó en presencia de FGF1 o FGF2, se confirmó que estos factores eran capaces de inducir la especificación hepática. Mientras que, explantes de tejido endodérmico anterior, cultivados junto con el mesodermo cardiogénico adyacente pero con agentes bloqueantes de la señalización vía FGF, bloqueaba la

## INTRODUCCIÓN

especificación [136]. Por lo tanto, parece que, la secreción de FGF1 y FGF2, desde el mesodermo cardíaco, induce la especificación del hígado en el endodermo subyacente. Una combinación de técnicas genéticas *in vivo* y ensayos en explantes de tejidos reveló que, una activación transitoria de la vía MAPK, por la señalización de FGF, es necesaria para la iniciación y la estabilización del programa hepático [137].

BMP4 es un miembro de la superfamilia de los factores de crecimiento transformante (TGF). BMP2, BMP4, BMP5 y BMP7 son altamente expresados en el mesénquima del *septum transversum* (STM), formado por células de mesénquima que rodean los dominios del endodermo cardíaco y ventral [138-141]. Los receptores de BMP, (BMPRIA, BMPRII y ActRIIA), se expresan en el endodermo definitivo [142, 143]. Sistemas de explantes en ratón revelaron que, la señalización de BMP, a partir de células del STM, también es crucial para la inducción génica hepática en el endodermo [144]. Así, la inducción hepática requiere señales positivas (FGF y BMP) a partir de dos fuentes diferentes de células (mesodermo cardíaco y STM), que indica la importancia de las combinaciones de las moléculas señalizadoras. La importancia general de la señalización mediante FGF y BMP para la inducción hepática se han confirmado en otros modelos experimentales [145].



**Figura I.8. La especificación hepática.** La figura representa una sección sagital de la porción anterior de un embrión de ratón de 8.5 días (derecha). El ectodermo embrionario se muestra en gris. En esta etapa, el endodermo definitivo (amarillo) forma una invaginación en la parte anterior ventral. El hígado (H) se especifica en una porción del endodermo anterior ventral mediante señales procedentes del mesodermo cardiogénico (FGF) y del mesénquima del *septum transversum* (BMP).

#### **I.2.4. De endodermo hepático a primordio hepático**

El progreso de endodermo a primordio hepático se ha dividido en tres fases morfogénicas [146]. En una primera etapa, se produce la transición morfológica de un epitelio cuboidal simple, propio del endodermo, a un epitelio columnar hepático. Posteriormente, en una segunda etapa, éste epitelio columnar se convierte en un epitelio pseudoestratificado, formando así el divertículo hepático. En una tercera etapa, la capa basal rica en laminina, que rodea el endodermo hepático, se rompe y las células del epitelio hepático migran al STM (Figura I.9). La masa de células, que surgen del epitelio endodérmico, se mezclan con el STM formando el primordio hepático, compuesto por células endodérmicas (hepatoblastos), células endoteliales y células propias del STM [147]. Los hepatoblastos son los precursores de hepatocitos y colangiocitos [148].

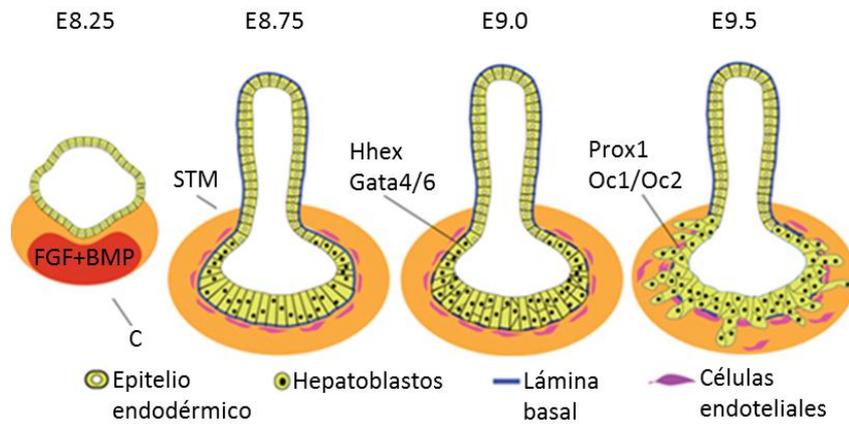
La homeoproteína Hhex parece controlar diferentes aspectos de la formación del primordio hepático, incluyendo la adecuada proliferación

## INTRODUCCIÓN

de las células del endodermo hepático [149], la formación de un epitelio pseudoestratificado [146] y el mantenimiento estable del tipo celular hepático [150]. Cómo Hhex ejerce su papel no se conoce, pero se ha sugerido que reprime la expresión de *Sonic Hedgehog* en el endodermo anterior ventral, contribuyendo a la exclusión del programa intestinal [146].

Otro gen homeobox (Prox1) está directamente implicado en la degradación de la membrana basal [151]. El endodermo hepático embrionario del ratón *knockout* para el gen Prox1, es incapaz de degradar la membrana basal del epitelio, resultando en la agrupación de hepatoblastos en un hígado más pequeño. No se sabe si esta actividad es causada por una lenta degradación de la membrana basal o por la producción de un exceso de componentes de membrana basal por los hepatoblastos embrionarios. Los hepatoblastos, normalmente, regulan a la baja la E-Cadherina y migran hacia el STM. Sin embargo, esto no ocurre en los mutantes para los genes Hnf6 y Oc2 [152, 153] Diferentes estudios sugieren que Prox1 y Hnf6 y Oc2 controlan la migración hepatoblástica mediante la regulación de la expresión de proteínas de la matriz extracelular, como las enzimas metaloproteinasas de la matriz (MMPs) [153, 154]. La importancia de las interacciones célula-matriz extracelular se destaca también por el hecho de que, los hepatoblastos deficientes en el receptor de la laminina  $\beta$ 1-integrina son incapaces de colonizar el STM [155].

En la formación del primordio hepático en mamíferos, las células endoteliales, aun no vascularizadas, están situadas adyacentes al epitelio que forman los hepatoblastos. Este contacto con las células endoteliales persiste durante la migración de los hepatoblastos en el STM (ver Figura I.9) [156]. Embriones mutantes para el gen que codifica para el receptor del factor del crecimiento endotelial vascular Vegfr-2 (también conocido como Flk-1), no poseen células endoteliales y los hepatoblastos no llegan a migrar al STM [156].



**Figura 1.9. Crecimiento del primordio hepático.** Representación esquemática de una sección transversal del tubo digestivo primitivo, a nivel del divertículo hepático, en diferentes etapas del desarrollo embrionario. Una vez especificado el endodermo anterior ventral a endodermo hepático, las células cambian su morfología de epitelio cuboidal a epitelio columnar (E8.75). A continuación se produce una intensa proliferación, de manera que, el epitelio columnar simple pasa a epitelio columnar pseudoestratificado (E9.0). En esta etapa, el epitelio hepático está rodeado por una capa de laminina, precursores de células endoteliales y del propio STM. Aproximadamente a partir de E9.5, la lámina basal es degradada y los hepatoblastos migran al STM para formar el primordio hepático.

### **I.2.5. Diferenciación de hepatoblastos a colangiocitos y hepatocitos embrionarios**

El hígado contiene dos linajes de células endodérmicas: los colangiocitos y los hepatocitos. Los colangiocitos son las células epiteliales de los conductos biliares, ya sean intra o extrahepáticos y los hepatocitos son la célula clave del hígado, la responsable de la mayor parte de sus funciones. Los hepatoblastos del primordio hepático son bipotenciales pudiendo diferenciarse en hepatocitos y colangiocitos. La separación del linaje hepático y biliar tiene lugar alrededor del día 13.5 *post-coito* (E13.5) en el ratón y a las 7 semanas en humanos [148, 157-159].

## INTRODUCCIÓN

### **I.2.5.1. Colangiocitos**

#### *Morfología y función.*

Los colangiocitos son las células epiteliales de los conductos biliares. La morfología de los colangiocitos, al igual que sus funciones, varía dependiendo de en qué conductos se encuentren. Los colangiocitos de los pequeños conductos biliares interlobulares son células epiteliales con morfología cuboidal. Sin embargo, los colangiocitos de los grandes conductos biliares poseen una morfología columnar [160]. Esta heterogeneidad morfológica corresponde con la especialización regional de los colangiocitos. Los colangiocitos pertenecientes a los grandes conductos biliares están más implicados en funciones secretoras (bilis) mientras que, los de los pequeños conductos interlobulares y los que se encuentran en los conductos de Hering, tienen otras importantes propiedades como proliferar en respuesta a daño hepático, participar en la respuesta inflamatoria o someterse a cambios fenotípicos limitados [161]. Es más, se cree que las células progenitoras del hígado surgen de subpoblaciones de colangiocitos que residen en los conductos de Hering [161]

#### *Diferenciación a colangiocitos desde hepatoblastos.*

La morfogénesis de los conductos biliares comienza en el hígado embrionario con el alineamiento de células biliares alrededor de las ramas de la vena porta, constituyendo una monocapa en forma de anillo llamada placa ductal [158]. Esta capa ductal comienza a convertirse en bicapa y forma estructuras laminares que, progresivamente, da lugar a los conductos biliares [159].

A nivel molecular, parece que es necesaria una elevada actividad de la vía Activina/TGF $\beta$ , alrededor de la vena portal, para que los hepatoblastos se diferencien hacia colangiocitos. Estudios realizados en embriones mutantes homocigotos para Hnf6 y Oc2 presentan una alteración de este gradiente TGF $\beta$ , que provoca la diferenciación de los hepatoblastos en células híbridas con características de hepatocitos y

colangiocitos [162]. Recientemente, se ha descrito que el factor de transcripción Sox9 modula la actividad de TGF $\beta$ , durante la maduración de los ductos primitivos [163]. En ausencia de Sox9, la maduración de los conductos biliares se retrasa. Este fenotipo está asociado a una expresión anormal de Cebpa, Hes1, y el receptor tipo II de TGF $\beta$ , en los hepatoblastos situados en la parte parenquimal de la placa ductal. Junto con la señalización por TGF $\beta$ , la señalización de Notch también es requerida para la morfogénesis normal del tracto biliar. El síndrome de Alagille, un trastorno del desarrollo caracterizado por una escasez de conductos biliares intrahepáticos, es causada principalmente por mutaciones en el gen Jagged1 (Jag1), que codifica un ligando para los receptores de la familia Notch [164]. Estudios recientes utilizando ratones y pez cebra con pérdida de función de la vía Notch, indican que, Notch regula la morfogénesis de las vías biliares, más que el destino celular [165-167].

### **1.2.5.2. Hepatocitos**

#### *Morfología y función*

Los hepatocitos constituyen alrededor del 80% de la población celular del tejido hepático. Son células poliédricas con 1 ó 2 núcleos esféricos poliploides con nucléolos prominentes. Presentan el citoplasma acidófilo con cuerpos basófilos y muy ricos en orgánulos. Además, en su citoplasma contienen inclusiones de glucógeno y grasa. Las funciones de los hepatocitos son interminables, como son la síntesis y almacenamiento de proteínas (albúmina, fibrinógeno y lipoproteínas del plasma), el metabolismo de hidratos de carbono, la formación de bilis, el catabolismo de fármacos y tóxicos y el metabolismo de lípidos, purinas, gluconeogénesis y un largo etcétera.

#### *Diferenciación a hepatocitos desde hepatoblastos.*

Existen un sinnúmero de mutantes que presentan un fenotipo hepático tardío asociado bien a disfunciones del tejido mesenquimal (STM, endotelio o células hematopoyéticas) o al parénquima hepático *per se*. Intentar

## INTRODUCCIÓN

resumir los mecanismos que regulan la diferenciación del hepatoblasto a hepatocito excede con creces el objetivo de esta introducción. Por ello, nos vamos a centrar en el regulador maestro del proceso de maduración del hepatoblasto, HNF4 $\alpha$ .

HNF4 $\alpha$  (NR2A1) es un miembro de la superfamilia de los receptores nucleares. Este factor de transcripción fue originalmente identificado en extractos nucleares de hígado de rata (Hnf4 $\alpha$ ) como una proteína que se unía al promotor y activaba la transcripción de dos genes hepato-específicos, la transtiretina (Ttr) y la apolipoproteína C3 (ApoC3) [168, 169]. HNF4 $\alpha$  Está evolutivamente conservado ya que, han sido descubiertos homólogos de HNF4 $\alpha$  en una gran variedad de organismos desde esponjas a mamíferos [170-172]. La inactivación homocigótica de Hnf4 $\alpha$  en ratón provoca la muerte temprana del embrión, antes de la gastrulación, debido a malformaciones en el tejido extraembrionario [173]. Para poder evaluar el papel de Hnf4 $\alpha$  en el hígado embrionario de ratón, se obtuvieron quimeras tetraploides, para evitar el defecto extraembrionario de estos mutantes. Hígados Hnf4 $\alpha$   $-/-$  embrionarios en E12 (día 12 *post coito*), eran morfológicamente indistinguibles de los *wild-type* o heterocigotos. Sin embargo, un análisis por PCR cuantitativa a tiempo real reveló que, no se activaban los genes implicados en funciones hepáticas básicas como la codificación de apolipoproteínas, enzimas metabólicos, etc [174]. Este defecto no estaba asociado a un defecto en la expresión de los factores de transcripción primarios (Foxa, Gata4, Hnf6, Cebpa...), que no se alteraban, a excepción de Pxr y Hnf1 $\alpha$  genes diana directos de Hnf4 $\alpha$  [174]. En resumen, HNF4 $\alpha$  no es necesario para la especificación y morfogénesis temprana del hígado, pero es fundamental en la diferenciación y maduración final desde hepatoblastos. Estudios posteriores confirmaron el papel esencial de HNF4 $\alpha$  en la maduración del hepatocito. Mediante un análisis global de la cromatina del genoma completo en hepatocitos humanos adultos, se investigó la unión de la proteína HNF4 $\alpha$  a las secuencias promotoras de más de 10.000 genes [175]. HNF4 $\alpha$  estaba unido a 1575 promotores, el 12% del *array*. Pero lo más relevante, es que HNF4 $\alpha$  estaba unido al 42% de los promotores donde también estaba unida la RNA polimerasa II,



## INTRODUCCIÓN

**I.3. FUENTES ALTERNATIVAS DE HEPATOCITOS**

## INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

El disponer de una fuente inacabable de hepatocitos funcionales sería de gran interés terapéutico en medicina regenerativa. Sin embargo, el uso de hepatocitos para estudios farmacotológicos, patofisiológicos o en terapia génica, requiere de unos protocolos que permitan la obtención de grandes cantidades de hepatocitos con fenotipo adulto.

El hígado adulto tiene una gran capacidad regenerativa y puede regenerarse completamente, cuando realizamos una hepatectomía del 70% de la masa total hepática. Sin embargo, esta capacidad regenerativa se limita peligrosamente en numerosas enfermedades hepáticas como la cirrosis avanzada y la hepatitis, dando lugar a fallo hepático, para el cual el trasplante del órgano es, actualmente, la única opción clínica para el paciente.

La implantación de hepatocitos aislados o el uso de dispositivos hepáticos bio-artificiales, para promover una limitada función hepática, se están convirtiendo en otras opciones potenciales al trasplante [180-182]. Sin embargo, la escasez de donantes de órganos y la dificultad de cultivar hepatocitos *in vitro*, son graves limitaciones para estas nuevas opciones. Por ello, se han llevado a cabo grandes esfuerzos en generar hepatocitos a partir de una variedad de fuentes, comprendiendo células adultas, células fetales y células pluripotentes.

### **I.3.1. Células madre adultas hepáticas: células ovals**

El hígado adulto se regenera por la proliferación de los hepatocitos maduros. Sin embargo, el hígado adulto también contiene células progenitoras hepáticas (células ovals), que se activan cuando se inhibe la capacidad proliferativa de los hepatocitos, como en el caso de una cirrosis severa [183, 184]. Las células ovals residen en los canales de Hering y cuando se activan, proliferan y pueden diferenciarse a hepatocitos o colangiocitos [184, 185]. La naturaleza bipotencial de estas células sugiere que se originaron de los hepatoblastos fetales indiferenciados y permanecen en un microambiente parecido al fetal [186]. Se han generado líneas estables de células ovals de roedores

## INTRODUCCIÓN

(BMEL) [184, 185], que se utilizan como modelos experimentales muy útiles, pero el origen exacto y las características estas células, *in vivo*, continúa sin dilucidarse [180, 187]. Muchas de las rutas de señalización en el desarrollo, que regulan la hepatogénesis en el embrión, como la señalización mediante HGF, FGF, OSM, TNF $\alpha$  y Wnt, parecen controlar la activación de las células ovas [188-190].

### **I.3.2. Células madre embrionarias**

Las células madre embrionarias, o células pluripotentes embrionarias, (ESC) son células que tienen el potencial de diferenciarse en cualquier tipo celular adulto o fetal, perteneciente a cualquiera de las 3 hojas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo). Las células madre embrionarias derivan de las células presentes en la masa celular interna (ICM) del cigoto en desarrollo, en su fase de blastocisto. Estas células son capaces de renovarse ilimitadamente sin perder su capacidad de diferenciación. Utilizando los conocimientos adquiridos en el desarrollo embrionario del hígado, se han desarrollado protocolos de diferenciación de ESC a hepatocitos, en los que se consigue que hasta el 70% de las células diferenciadas, exhiban un fenotipo parecido a hepatocitos. Estas células presentan muchas de las características de los hepatocitos incluyendo: (1) expresión de enzimas hepáticas, (2) morfología, (3) almacenamiento de glucógeno, (4) capacidad de metabolismo de fármacos y (5) secreción de albúmina.

En los primeros protocolos de diferenciación se obtuvieron resultados muy variables, con bajas eficiencias, resultando en cultivos muy heterogéneos [191]. El salto cualitativo en estos protocolos se produjo al llevar a cabo una diferenciación secuencial, recapitulando el proceso embrionario: ESC  $\rightarrow$  meso-endodermo  $\rightarrow$  endodermo definitivo  $\rightarrow$  endodermo hepático  $\rightarrow$  hepatoblasto  $\rightarrow$  hepatocito. Estos experimentos se llevaron a cabo cultivando las células madre embrionarias con distintos medios de cultivo, enriquecidos con los efectores de las rutas de señalización involucrados en cada una de las etapas del desarrollo hepático. El primer paso fue la diferenciación de ESC (murinas y

## INTRODUCCIÓN

humanas) a endodermo definitivo de manera eficiente (~80% de las células) [192, 193]. Para ello se trataron los cultivos de ESC con altas concentraciones de Activina, perteneciente a la superfamilia de TGF $\beta$ . La Activina mimetiza el rol de Nodal en la fase de gástrula del embrión, por lo que las ESC se diferencian a endodermo definitivo, pasando previamente por meso-endodermo. Después de unos pocos días, las células en diferenciación expresaban genes del endodermo definitivo como Sox17 y Foxa2, mientras los genes de pluripotencia, mesodérmicos y del endodermo extraembrionario, eran regulados a la baja. Utilizando estas células como punto de partida, varios grupos han generado células parecidas a hepatocitos (*hepatocyte-like cells*) humanas y de ratón [112, 194]. Algunos grupos han demostrado que, la transfusión de estas células, en ratones modelo para ciertas enfermedades hepáticas, provoca un modesto rescate de la función hepática, aunque la colonización del hígado huésped es muy baja [194-198]. Mientras los detalles de la diferenciación (15–20 días) varían de un grupo de investigación a otro, el protocolo seguido consiste en términos generales en sembrar las células del endodermo definitivo en una matriz para mimetizar la ECM hepática y añadir al medio FGF y BMP, para mimetizar la inducción hepática. Posteriormente se añade un nuevo medio de cultivo, conteniendo una combinación de los factores HGF, OSM, FGF y dexametasona para expandir la población hepatoblástica y promover la maduración hepática. Protocolos similares se han descrito para la diferenciación de iPSC [199, 200].

## INTRODUCCIÓN

MATERIALES Y MÉTODOS

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.1. CONSTRUCCIÓN DE PLÁSMIDOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.1.1. Plásmidos retrovirales**

#### **pMIGR1-Hhex.**

El vector retroviral pMIGR1-Hhex se construyó mediante amplificación por PCR del fragmento codificante de Hhex usando el vector adenoviral pAC-HhexHA (plásmido del stock de nuestro laboratorio) como molde. Para ello se añadieron sitios de restricción para XhoI y EcoRI en el extremo 5' de los *primers* de clonación directo y reverso respectivamente. Una vez amplificado, el fragmento fue digerido con XhoI y EcoRI e insertado en el fragmento XhoI-EcoRI de pMIGR1-GFP (cedido amablemente por el doctor Ángel Pellicer, NYU Medical Center, New York, USA ).

#### **pMIGR1-HNF1 $\alpha$ y pMIGR1-HNF6**

Los fragmentos de DNA codificantes para los factores de transcripción HNF1 $\alpha$  y HNF6 fueron amplificados mediante PCR a partir de cDNA de hepatocitos humanos. Los sitios de restricción XhoI y EcoRI fueron añadidos a los extremos 5' de los *primers* de clonación (Tabla TM7). Una vez digerido el cDNA amplificado con XhoI y EcoRI, estos fragmentos fueron clonados en el sitio XhoI-EcoRI del vector retroviral pMIGR1-GFP.

### **M.1.2. Plásmidos episomales**

#### **pPYCAG-HAGata4**

El vector episomal pPYCAG-IP (cedido amablemente por el Dr. Dr. Austin Smith, *Wellcome Trust Centre for Stem Cell Research, U.K.*) se diseñó de forma específica para conseguir altos niveles de expresión en células madre embrionarias [80]. El cDNA codificante para Gata4 se obtuvo por PCR usando como molde el vector retroviral pBABE-Gata4 (cedido amablemente por el Dr. Ken Zaret, *University of Pennsylvania, USA*). Los *primers* se diseñaron con sitios de restricción en 5' para XhoI (*primer* directo) y NotI (*primer* reverso). Así mismo, la secuencia correspondiente a la etiqueta HA (hemaglutinina) fue introducida

## MATERIALES Y MÉTODOS

artificialmente en el extremo 5' del *primer* directo. El producto de PCR fue digerido con XhoI y NotI y ligadas al fragmento XhoI-NotI del vector pPYCAG-IP.

### **M.1.3. Plásmidos reporteros**

#### **Nanog-pGL3-*enh/prom***

El plásmido reportero Nanog-pGL3-*enh/prom* se obtuvo clonando un *enhancer* distal de Nanog en el vector Nanog-pGL3, cedido por el Dr. Paul Robson (Genome Institute of Singapore, Singapore). El *enhancer* distal de Nanog se trata de una región evolutivamente conservada (ECR) en diferentes especies (Figura R.37). Esta región comprende 732 pb y contiene 66 posibles sitios de unión de factores de transcripción, incluido uno para los factores Gata (analizado con el software rVista 2.0.) Por otra parte, el plásmido Nanog-pGL3 contiene el promotor proximal de Nanog insertado *upstream* al cDNA de la luciferasa en el vector comercial pGL3-Basic [91].

El *enhancer* distal de Nanog se amplificó por PCR desde DNA genómico aislado de células madre embrionarias de ratón (línea CGR8). Los *primers* de clonación fueron diseñados para introducir artificialmente los sitios de restricción KpnI-SacI en el amplicón. El vector Nanog-pGL3 posee sitios de restricción KpnI-SacI *upstream* del promotor de Nanog. Así pues, se llevó a cabo una clonación direccional KpnI-SacI del *enhancer* distal en el vector Nanog-pGL3, para obtener el vector reportero Nanog-pGL3-*enh/prom*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.2. CULTIVOS CELULARES**

## MATERIALES Y MÉTODOS

En nuestro laboratorio contamos con 2 campanas de flujo laminar (*MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinets, ThermoScientific*), una dedicada a cultivos y expansión celular y otra utilizada exclusivamente para cultivo de células infectadas con virus. Las células se mantienen en incubadores de CO<sub>2</sub> (*Heracell 150, ThermoScientific*) a 37 °C en atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>. La presencia de micoplasmas en células en cultivo fue regularmente monitorizada por PCR cuantitativa.

### **M.2.1. Técnicas comunes de cultivos celulares**

#### **M.2.1.1. Tripsinización y cambio de medio**

Se lava la placa a tripsinizar con PBS para eliminar los restos de medio y se añade la tripsina. Se incuba durante 5-10 minutos a 37<sup>o</sup> C para dejar actuar a la tripsina. Una vez comprobado por microscopía que las células se han despegado, se procede a añadir medio fresco a las células en suspensión. Una vez resuspendidas las células en medio son transferidas a un tubo de 15 ml estéril. Se centrifuga a 1500 rpm durante 3 minutos, obteniendo el *pellet* celular. Se descarta el sobrenadante y se añaden 5 ml de medio fresco. Tras contar las células con un contador automático de células (*BioRad*), se siembran a la densidad requerida en nuevas placas de cultivo. Los cambios de medio se realizan cada 1-3 días dependiendo del tipo celular. Se aspira el medio antiguo y se añade medio fresco precalentado a 37<sup>o</sup> C.

#### **M.2.1.2. Criopreservación**

El proceso de congelación celular es similar para todas las líneas celulares utilizadas, la única diferencia reside en que las iPSC y células madre embrionarias se congelan con su medio de cultivo con un 10% de Dimetilsulfóxido (DMSO), mientras que las demás líneas celulares se congelaron con FBS conteniendo un 10% de DMSO.

Una vez tripsinizadas y contadas las células se resuspenden en medio de congelación sin DMSO y se alicuotan en crioviales de 2 ml (1.8 ml por

## MATERIALES Y MÉTODOS

vial). A continuación se añade 200 µl de DMSO, se agita bien y se transfieren a un contenedor de congelación (*Nalgene*) que contiene 250 ml de isopropanol a temperatura ambiente. Inmediatamente después se guarda a -80 °C durante 24 horas y finalmente se transfieren los crioviales a un contenedor de Nitrógeno.

### **M.2.1.3. Descongelación celular**

El proceso de descongelar células, desde los viales almacenados en nitrógeno líquido, es un proceso que hay que realizar cuidadosamente, ya que en gran parte, la viabilidad de estas células depende de una correcta descongelación.

Una vez extraídos los crioviales del contenedor de nitrógeno líquido, se introducen en un baño a 37 °C hasta su descongelación. Inmediatamente después se añade gota a gota a un tubo estéril de 15 ml conteniendo 10 ml de medio de cultivo a 37 °C. Centrifugamos el tubo a 1000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante se descarta y se resuspende el *pellet* celular en 1 ml de medio fresco. La suspensión se distribuye en placas según la densidad deseada.

### **M.2.1.4. Microscopía**

Las células fueron observadas regularmente con un microscopio óptico invertido (*CKX41, OLYMPUS*) para examinar la morfología, viabilidad, posibles contaminaciones, etc. Las fotografías fueron tomadas con una cámara digital (*Leica DFC350 FX*), acoplada a un microscopio (*Leica DMI 4000 B*) con equipamiento de fluorescencia y con el software de captura de imagen (*Leica Application Suite v 3.6.0*). Las placas de 10 cm teñidas con el kit comercial (*Alkaline phosphatase detection kit, Millipore*) fueron fotografiadas con una cámara Reflex digital (*Nikon D40*).

### **M.2.2. Líneas celulares**

Las líneas celulares empleadas en esta Tesis se mantuvieron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con Glutamax (*Gibco*), suplementados con 4.5 g/l glucosa, 10% FBS y 1X penicilina/estreptomicina (*Gibco*).

### **M.2.3. Aislamiento y mantenimiento de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF)**

Los MEF se aislaron de embriones de 13 días extraídos de hembras de ratón de las cepas CD1 y Tg(*Nanog-GFP,Puro*)1Yam-BRC. Las hembras CD1 preñadas fueron compradas a la compañía *Charles River* ([www.criver.com](http://www.criver.com)), mientras que la cepa Tg(*Nanog-GFP,Puro*)1Yam-BRC fueron adquiridas en RIKEN ([www.riken.jp](http://www.riken.jp)).

Las hembras preñadas fueron sacrificadas mediante dislocación cervical y se roció el abdomen con etanol al 70%. Con un bisturí se realizó una incisión ventro-caudal en el abdomen, se extrajo el útero y se lavó en una placa de 10 cm con 10 ml de solución tamponada Hank's (*GIBCO, Invitrogen*) con 5% de penicilina/estreptomicina (*GIBCO, Invitrogen*) y 2 µg/ml de *amphotericin B* (*Invitrogen*). Seguidamente se procedió a un segundo lavado en Hank's con 2% de penicilina/estreptomicina y 1 µg/ml de *amphotericin B*. Se extrajeron individualmente los embriones en PBS sin Ca<sup>+2</sup> ni Mg<sup>+2</sup>. Una vez retiradas cabeza, órganos viscerales y gónadas, se lavaron las carcasas de los embriones en PBS y se cortaron en pequeños trozos hasta obtener fragmentos de tejido lo más reducidos posible. Los fragmentos correspondientes a 3 embriones se digirieron en un tubo estéril de 50 ml (*Greiner*) con 3 ml de tripsina. Tras incubarlos 20 minutos a 37 °C se añadieron otros 3 ml de tripsina y se incubaron 20 minutos adicionales a 37 °C. Entonces, se añadieron 12 ml de medio de cultivo DMEMc y se mantuvo en reposo 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los fragmentos no digeridos. El sobrenadante se centrifugó a 200 x g durante 5 minutos y el precipitado celular se resuspendió en DMEMc. El número de células se determinó

## MATERIALES Y MÉTODOS

mediante un contador automatizado (*Bio-Rad TC10 Automated Cell Counter*), ajustando la concentración a  $10^6$  células/ml. Las células se sembraron a  $10^6$  células por frasco T75 con medio DMEMc y se transfirieron al incubador. Al día siguiente se cambió el medio por medio fresco y se mantuvieron en el incubador hasta alcanzar una confluencia del 80-90% para su congelación.

### **M.2.4. Células pluripotentes**

Las células madre embrionarias de ratón, CGR8 y CCE 1.19, fueron amablemente donadas por el Dr. A. Smith y la Dra. E. Robertson, respectivamente [201, 202]. Las células pluripotentes inducidas (iPSC) fueron generadas en nuestro laboratorio mediante el método original descrito por el Dr. S. Yamanaka [2].

Las células pluripotentes se crecieron en placas previamente tratadas con gelatina al 0.1% en PBS con medio de cultivo ESC el cual consta de medio comercial *Glasgow Minimum Essential Medium* (GMEM) (*Gibco*), suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), 0.1mM  $\beta$ -mercaptoetanol, 1x aminoácidos no esenciales, 1x piruvato de sodio, 1X penicilina/estreptomicina (*Gibco*), 2mM glutamina y 600  $\mu$ l de una dilución 1:5000 de nuestro stock original de medio con LIF (ver apartado M.2.4.1.)

#### **M.2.4.1. Obtención de LIF e Incubación en medio 2i/LIF**

Para la obtención de un stock de LIF se transfectó mediante lipofección (ver apartado M.3.1) el plásmido *pC10-6R human DIA/LIF* en células Cos7. Para ello sembramos  $3 \times 10^6$  células COS7 en una placa de 10 cm con medio DMEMc. Al día siguiente se transfectó el plásmido *pC10-6R human DIA/LIF* con lipofectamina 2000, siguiendo las instrucciones del fabricante. Veinticuatro horas después de la transfección, se cambió el medio de las células COS7 (DMEMc) por medio ESC sin LIF. Se mantuvo este mismo medio sin cambiar durante 5 días, ajustando el pH, para evitar la muerte de las células, en este tiempo las células COS7 excretan

## MATERIALES Y MÉTODOS

al medio el LIF. Transcurridos estos 5 días se filtró el medio de las COS7 con un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  y se procedió a determinar la dilución de trabajo utilizando el protocolo que se describe a continuación. Se sembraron 600.000 mESC en cada pocillo de una placa de 6 pocillos. Uno de estos pocillos se mantuvo con medio control (medio con LIF validado) como control positivo. Los demás pocillos fueron mantenidos con diferentes diluciones del medio stock de LIF (desde una dilución 1:10 a 1:100000). La dilución más alta de nuestro stock que mantenía la morfología típica de mESC, comparada con nuestro control positivo, es la que se eligió como concentración de trabajo, en nuestro caso 1:5000.

### *Medio 2i/LIF*

Para inducir/acelerar la reprogramación completa de células pluripotentes inducidas (iPSC), se incubaron durante 10-12 días en medio 2i/LIF. Este medio consiste en medio ESC, descrito anteriormente suplementado con PD0325901 (1  $\mu\text{M}$ ) y CHIR99021 (3  $\mu\text{M}$ ), inhibidores de las vías de señalización MAPK y GSK3, respectivamente.

### **M.2.4.2. Caracterización de células pluripotentes inducidas**

#### *M.2.4.2.1. Tinción con fosfatasa alcalina*

Las células infectadas con las distintas combinaciones retrovirales y lentivirales de la Tabla TM6 fueron reprogramadas durante 28 días. En el transcurso de la reprogramación, estas células fueron fijadas a los 8, 15 y 28 días, con 4% de paraformaldehído en PBS y teñidas con el kit comercial (*alkaline phosphatase detection kit, Millipore*) para la detección de colonias positivas para esta tinción. Para ello utilizamos una combinación de: 750  $\mu\text{l}$  de *Naphthol (AS-BI phosphate solution (4 mg/ml)* en *buffer AMPD (2 mol/l)*, pH 9.5); 750  $\mu\text{l}$  de agua destilada (*Braun*) y 1500  $\mu\text{l}$  de *Fast Red Violet solution (0.8 g/l stock)* para cada placa de 10 cm. Incubamos con estos 3 ml de mezcla durante 15 minutos a temperatura ambiente y lavamos con TBS-T. Visualmente podemos reconocer las colonias iPSC en formación, teñidas en rojo, y así poder calcular la eficiencia de la reprogramación. (Figura R.35)

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *M.2.4.2.2. Formación de cuerpos embrioides*

Una de las características más relevantes de las células pluripotentes es la formación de cuerpos embrioides, una vez retiramos el LIF del medio de cultivo. Para ello se sembraron 200.000 células pluripotentes (ESC o iPSC), en placas de 10 cm sin gelatinizar y con medio ESC sin LIF. A las 48 horas las células fueron analizadas en el microscopio óptico para la observación de cuerpos embrioides.

### **M.2.5. Reprogramación**

#### **M.2.5.1 Reprogramación a iPSC**

En la reprogramación a iPSC se emplean combinaciones de retrovirus que expresan Oct3/4, Sox2 y Klf4, en presencia y ausencia de c-Myc (OKS/M). Los retrovirus ecotrópicos se generaron mediante la transfección en células 293T del plásmido empaquetador pCL-Eco y el plásmido retroviral correspondiente i.e. pMXs-Oct3/4, pMXs-Sox2, pMXs-Klf4 y pMXs-c-Myc tal y como se describe en detalle en M.3.2.1.

Una vez se generan los retrovirus en el medio de las células 293T cotransfectadas, se coinfectan los MEF con volúmenes iguales de cada sobrenadante retroviral. Dos días después de la infección los MEF fueron tripsinizados y pasados a placas de 10 cm, previamente tratadas con PBS suplementado con 0.1% gelatina. El medio de cultivo fue sustituido por medio de cultivo ESC (ver M.2.4) y renovado diariamente durante la reprogramación. Al cabo de tres y cinco semanas después de la infección, las colonias adquieren un tamaño suficiente para ser aisladas individualmente.

Para aislar las colonias de las placas de 10 cm, se retira el medio de cultivo, se lava con PBS y se mantiene con 2 ml de PBS. Las colonias se aspiran con una micropipeta de 2  $\mu$ l y se transfiere a un pocillo de una placa de 96 pocillos con 20  $\mu$ l de tripsina ya añadidos en cada pocillo. La placa de 96 pocillos se introduce en el incubador 15 minutos y se añade 180  $\mu$ l de medio ESC. Posteriormente se transfiere todo el volumen a un

pocillo de 24 previamente gelatinizado conteniendo 250 µl de medio ESC. Las colonias fueron expandidas y transferidas, secuencialmente, a placas de mayor área renovando el medio diariamente.

### **M.2.5.2. Reprogramación a endodermo hepático**

En los experimentos de reprogramación a endodermo hepático se utilizaron las combinaciones retrovirales descritas en la tabla TM2. Los retrovirus ecotrópicos se generaron tal y como se describe en la sección M3.2.1 utilizando el plásmido empaquetador pCL-Eco y el plásmido retroviral correspondiente i.e. pBABE-Foxa2, pBABE-Gata4 y pMIGR1-GFP.

Una vez se generan los retrovirus en el medio de las células 293T cotransfectadas, se coinfectan los MEF con volúmenes iguales de cada sobrenadante retroviral de acuerdo con la tabla TM2. Dos días después de la infección los MEF fueron tripsinizados y pasados a placas de 10 cm, previamente tratadas con PBS suplementado con 0.1% gelatina.

El medio de cultivo empleado fue DMEMc que consta de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) con Glutamax, suplementado con 4.5 g/l glucosa (*Gibco*), 10% FBS y 1X penicilina/estreptomicina (*Gibco*).

El medio de cultivo fue cambiado todos los días durante la reprogramación. Al cabo de tres y cinco semanas después de la infección, las colonias adquieren un tamaño suficiente para ser aisladas individualmente. Las colonias se aislaron tal y como se describe en el apartado anterior.

### **M.2.5.3. Reprogramación a hepatocitos**

Las distintas combinaciones retrovirales empleadas en los experimentos de reprogramación a hepatocitos se muestran en la Tabla TM3. Los MEF fueron infectados con volúmenes equivalentes de cada retrovirus. Dos días después de la infección, cada placa de células infectadas con las distintas combinaciones retrovirales fueron tripsinizadas y pasadas a 2

## MATERIALES Y MÉTODOS

placas de 10 cm, previamente gelatinizadas con 0.1% de gelatina en PBS. De tal forma que, al pasarlas, la mitad de las células continuarían creciendo en una placa de 10 cm con medio DMEMc mientras que, la otra mitad de células crecerían en una placa de 10 cm donde en vez de DMEMc cambiamos el medio de cultivo por un medio de cultivo condicionado hepático, MCH. Éste medio **MCH** consta de una mezcla de los medios comerciales IMDM y F12 (*Gibco*) en un *ratio* 1:3, suplementado con 10% suero bovino fetal (FBS), 1X penicilina/estreptomicina (*Gibco*), y los siguientes factores de crecimiento (Sigma): factor de crecimiento epitelial (EGF) 10 µg/ml, factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF2) 100 µg/ml, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) 50 µg/ml, factor de crecimiento hepático (HGF) 10 ng/ml y el factor de crecimiento transformante (TGFβ) 100 µg/ml. Los factores de crecimiento se seleccionaron de acuerdo con la bibliografía [112, 192, 199].

**M.3. INTRODUCCIÓN DE DNA EN CÉLULAS EUCARIOTAS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.3.1. Transfecciones**

La transfección se refiere a la introducción de material genético externo, generalmente en forma de DNA plasmídico, en células eucariotas mediante métodos no virales. El DNA plasmídico se purificó con el kit comercial (*Maxiprep kit, QIAGEN*) y se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (*ThermoScientific*).

#### **M.3.1.1. Transfección de ESC con liposomas**

El reactivo para la transfección mediante liposomas utilizado es la Lipofectamina 2000 (*Life Technologies*). Este reactivo contiene subunidades de lípidos que forman liposomas en un medio ambiente acuoso que rodea el material genético a transfectar, i.e. DNA plasmídico, siRNA, miRNA, shRNA, etc. La formación del complejo DNA:Lipofectamina se realizó siguiendo las instrucciones facilitadas por el fabricante (*Invitrogen*). A continuación se detallan los protocolos específicos para cada tipo celular. Dos horas antes de la transfección se cambia el medio de cultivo a las células por medio fresco sin antibiótico.

Se sembraron 500.000 células madre embrionarias de ratón /pocillo en placas de 6 pocillos el día anterior a la transfección. El complejo de transfección se generó mezclando 200  $\mu$ l de OptiMEM (*Gibco*) conteniendo 4  $\mu$ g de DNA total (plásmido, o mezcla de plásmidos a transfectar), con otros 200  $\mu$ l de OptiMEM conteniendo 4  $\mu$ l de Lipofectamina 2000. Tras mezclar el DNA con la lipofectamina se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente, para que se forme el complejo de transfección. Una vez transcurrido este tiempo los 400  $\mu$ l de mezcla fueron añadidos a cada pocillo. Las células fueron incubadas durante toda la noche con el complejo de transfección, que se retiró al día siguiente para añadir medio nuevo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.3.2. Infecciones**

Una infección consiste en la introducción de material genético externo en células eucariotas mediante partículas virales generadas artificialmente en el laboratorio. En nuestros experimentos se utilizaron dos tipos de partículas virales para realizar las infecciones, retrovirus en células de ratón y lentivirus en células humanas.

#### **M.3.2.1. Generación de retrovirus e infección**

Las partículas retrovirales se generan mediante la cotransfección de varios plásmidos en células empaquetadoras. Un plásmido “helper” proporciona en trans los diferentes componentes del virus, mientras que otro plásmido retroviral contiene secuencias esenciales para el empaquetamiento del virus junto con el cDNA de la proteína a expresar. Las células empaquetadoras 293T expresan el proto-oncogen *SV40 large T antigen*, que permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación SV40. Esto permite la amplificación y expresión extendida en el tiempo de los productos de los genes deseados y por tanto la generación de retrovirus a un título alto. El uso de pCL-Eco como plásmido “helper” da lugar a partículas retrovirales infectivas exclusivamente para células murinas. La transfección de los plásmidos en la línea celular 293T se llevó a cabo mediante el método del fosfato cálcico tal y como se describe a continuación.

El día anterior a la transfección, se siembran las células 293T en placas de 10 cm a una densidad de  $3 \times 10^6$  células/placa (una placa por cada retrovirus a generar). Dos horas antes de la transfección, se cambió el medio de cultivo. En tubos de 15 ml se mezclan 10 µg del plásmido retroviral, 10 µg de pCL-Eco (*replication-incompetent helper vector*), 100 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M y H<sub>2</sub>O estéril hasta alcanzar un volumen final de 1 ml. Esta solución se añade gota a gota sobre 1 ml de 2X HBS (1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 273 mM NaCl, and 54 mM HEPES; pH 7.05) estéril. Al mismo tiempo que se añade, se burbujea la solución de HBS 2x con una pipeta

## MATERIALES Y MÉTODOS

Pasteur de vidrio acoplada a una pro-pipeta automática (*Drummond*). Esta mezcla se deja reposar un mínimo de 2 minutos y un máximo de 15 minutos para facilitar la formación del precipitado y se añade cuidadosamente a una placa de 10 cm de células 293T mientras movemos la placa en círculos para que la mezcla se disperse perfectamente en la placa. Las células se mantienen en el incubador durante toda la noche (máximo 20 horas) y al día siguiente se cambia el medio de cultivo y se incuban durante 24 horas más. A las 48 horas de la cotransfección se recoge el sobrenadante que contiene el retrovirus, se filtra a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$ , se le añaden 4  $\mu\text{g/ml}$  de *polybrene*, un polímero catiónico que incrementa la eficiencia de la infección, evitando la agregación de retroviral, y ya está listo para usarse. La congelación de este medio con retrovirus reduce notablemente el título viral, por lo que debe prepararse fresco cada vez que se necesite.

El día anterior a la infección, se siembran las células a infectar en placas de 10 cm a una densidad de  $10^6$  células/placa. Al día siguiente, se retira el medio de cultivo de las células a infectar y se sustituye por 4 ml de sobrenadante retroviral. En el caso de infecciones con varios retrovirus y/o lentivirus simultáneamente (combinaciones retrovirales), se realizaron mezclas de volúmenes equivalentes de cada virus hasta un volumen total de 4 ml. Cinco horas después de la infección se añaden 6 ml de medio fresco a los 4 ml de mezcla retroviral/lentiviral. Las células se incuban a 37 °C durante toda una noche. Por otra parte, se añade 10 ml de medio de cultivo fresco a las células 293T transfectadas y se vuelven a incubar un día más. Si se requieren niveles de infección más altos, se repite el proceso de infección tal y como se ha descrito usando el sobrenadante de 72 horas de las placas de 293T. Estas células continúan produciendo retrovirus hasta 72 horas después de la transfección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### M.3.2.2. Generación de lentivirus e infección

La estrategia para generar partículas lentivirales es idéntica a la estrategia utilizada para generar retrovirus, con la salvedad que en lugar de un plásmido “helper” se usan tres. El día anterior a la transfección se siembran  $3 \times 10^6$  células/pocillo en placas de 10 cm (una placa por cada lentivirus a generar). Dos horas antes de la transfección, se cambió el medio de cultivo por medio fresco. El complejo de transfección se generó mezclando 500  $\mu$ l de OptiMEM conteniendo 25  $\mu$ g de DNA total (5  $\mu$ g pLP1, 5  $\mu$ g pLP2, 5  $\mu$ g pVSVG y 10  $\mu$ g de plásmido lentiviral), con otros 500  $\mu$ l de OptiMEM conteniendo 60  $\mu$ l de Lipofectamina 2000. Tras mezclar el DNA con la lipofectamina, se dejó incubar un mínimo de 20 minutos, a temperatura ambiente, para que se forme el complejo de transfección. Una vez transcurrido este tiempo, se añadieron los 1000  $\mu$ l de mezcla a cada placa de 10 cm de 293T. Se incubaron las placas durante toda la noche y al día siguiente se cambió el medio por medio fresco DMEMc. Las células se mantienen en el incubador durante las siguientes 48 horas para facilitar la acumulación de lentivirus en el sobrenadante. Transcurrido este tiempo se recoge el sobrenadante, se filtra a través de un filtro de 45  $\mu$ m, se añaden 4  $\mu$ g/ml de *polybrene* y se distribuye en alícuotas en tubos *ependorf* (1 ml/tubo). Al contrario que los retrovirus, los lentivirus pueden congelarse sin pérdidas significativas de título, por lo que las alícuotas no utilizadas se guardan a  $-80^{\circ}$  C.

El día anterior a la infección, se siembran las células a infectar, en placas 6 pocillos, a una densidad de  $5 \times 10^5$  células/placa o placas de 10 cm a una densidad de  $1 \times 10^6$  células. Al día siguiente se retira el medio de cultivo a las células a infectar y se añade 1 ml de DMEMc conteniendo 100  $\mu$ l de cada suspensión lentiviral concentrada a cada pocillo. Las distintas combinaciones lentivirales se muestran en la Tabla TM6. Las células infectadas fueron incubadas durante 5 horas a  $37^{\circ}$  C, 5%  $\text{CO}_2$ . Transcurrido este tiempo se añadió 1 ml de medio fresco y fueron incubadas durante toda la noche.

**M.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.4.1. Aislamiento de RNA**

La abundancia relativa de los diferentes mRNA presentes en las células en cultivo se determinó mediante PCR cuantitativa a tiempo real, para lo cual se extrajo el RNA total.

#### **M.4.1.1. Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó en una campana de extracción de gases (*Köttermann*). Las placas se mantuvieron en un soporte a 4°C para evitar la degradación del RNA. Se añadieron 350 µl de tampón de lisis RLT (*QIAGEN*) suplementado con β-mercaptoetanol (1:100) directamente a las placas. Para conseguir una buena homogeneización, se recogió el lisado celular tras rascar la placa con la base de la aguja de una jeringa de 1 ml y posteriormente se pasó al menos 5 veces a través de una aguja acoplada a una jeringa de 1 ml estéril. Cuando la muestra está perfectamente homogeneizada se transfirió el lisado a un *eppendorf* de 1.5 ml colocado previamente en hielo. El aislamiento del RNA del lisado celular, fue realizado mediante el kit comercial (*RNeasy Mini Kit, QIAGEN*), con el protocolo automatizado *RNeasy mini standard*, programado en *Qiacube (QIAGEN)*.

#### **M.4.1.2. Cuantificación y conservación del RNA**

La cuantificación de RNA para su posterior utilización en PCR cuantitativa a tiempo real se realizó inmediatamente después de su extracción, en un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (*ThermoScientific*). Su pureza se determinó mediante el cociente de absorbancia (A260/A280). Una vez cuantificado el RNA es almacenado a -80° C hasta su utilización.

### **M.4.2. Extracción de DNA genómico**

El DNA genómico se extrajo mediante el kit *illustra™ triplePrep (GE Healthcare)* siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA fue

## MATERIALES Y MÉTODOS

cuantificado mediante el espectrofotómetro Nanodrop 2000c (*ThermoScientific*) y posteriormente almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **M.4.3. Preparación de cDNA**

La conversión de RNA a cDNA se realiza mediante la enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa. La retrotranscripción (RT) se realiza usando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina M-MLV (*Invitrogen*). La mezcla de reacción habitual, para un volumen final de 20  $\mu\text{l}$  es la siguiente: *Buffer* 1X para RT, 10 mM DTT, 500  $\mu\text{M}$  dNTPs, 3  $\mu\text{M}$  oligo d(T)14, 60 U de inhibidor de RNasas A, B y C (*RNaseOUT, Gibco BRL*) y 250 U de transcriptasa reversa M-MLV. A esta mezcla se le añaden 10  $\mu\text{l}$  de una solución acuosa que contiene 1  $\mu\text{g}$  de RNA total. La mezcla se incubó durante 75 min a  $42^{\circ}\text{C}$ . El cDNA obtenido se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **M.4.4. Preparación de extractos proteicos**

Los extractos proteicos totales se obtienen usando el reactivo comercial M-PER (*Pierce*) siguiendo las instrucciones del fabricante. La extracción del extracto proteico nuclear y citoplásmico se realizó mediante el reactivo comercial NE-PER (*Pierce*) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los extractos proteicos se cuantificaron mediante el método de Bradford. Una vez cuantificado, el extracto proteico fue alicuotado y conservado a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilizaci

**M.5. TÉCNICAS ANALÍTICAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.5.1. PCR cuantitativa a tiempo real**

El cDNA obtenido tras la transcripción reversa fue amplificado con un termociclador a tiempo real *Light Cycler 1.5 (Roche Diagnostics)*. Cada reacción consta de 7.5  $\mu$ l de *LightCycler-DNA FastStart Master SYBR Green I 2X (Roche)*, cloruro de magnesio (2-4 mM), 3  $\mu$ l de una dilución 1/20 de cDNA, los correspondientes *primers* a una concentración final de 0.3  $\mu$ M y agua hasta un volumen final de 15  $\mu$ l totales. Tras una etapa de 8 min a 95 °C (para desnaturalizar el DNA y activar la Taq polimerasa), el cDNA se amplificó mediante 32-46 ciclos de PCR de 1 segundo a 95 °C, 5 segundos a la temperatura de hibridación (52-65 °C) y 10-20 segundos a 72 °C. El seguimiento a tiempo real de la reacción de PCR y la cuantificación exacta de los productos en la fase exponencial de la amplificación se llevaron a cabo de acuerdo con el software de cuantificación de *LightCycler* y según las recomendaciones del fabricante. Las reacciones de amplificación de cada cDNA se realizaron por triplicado. Los datos se expresaron relativizados al valor del control y se normalizaron con respecto al valor de expresión del gen ubicuo Actina.

La especificidad de los *primers* se comprobó mediante electroforesis del producto de PCR en un gel de agarosa. La obtención de una banda única del tamaño esperado confirmó dicha especificidad. Los *primers* se diseñaron, en la medida de lo posible, flanqueando intrones para evitar la amplificación de DNA genómico. Las secuencias de los *primers* se muestran en la Tabla TM8.

### **M.5.2. Western blot**

El Western blot, o *immunoblot*, es una técnica analítica utilizada para la detección de proteínas específicas en un extracto celular complejo. Los extractos proteicos fueron mezclados con 4X *Laemmli buffer (Bio-Rad)*, calentados a 100°C durante 5 minutos, cargados en un gel SDS-PAGE con diferentes concentraciones de acrilamida (dependiendo del peso

## MATERIALES Y MÉTODOS

molecular de la proteína) y sometidos a electroforesis a 100 V en 1X *running buffer* (25 mM Tris-base, 200 mM glicina, 0,1% SDS).

Seguidamente las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa mediante *iBlot Gel Transfer system (Invitrogen)*, siguiendo las indicaciones del fabricante. La transferencia proteica a la membrana fue verificada mediante tinción con el reactivo Rojo *Ponceau (Sigma)*. La membrana fue incubada para su bloqueo con un 5% (peso/volumen) de leche desnatada en TBS-Tween-20 (10 mM Tris-HCl, pH 7.5; 100 mM NaCl y 0.1% Tween-20) durante una hora. Posteriormente, la membrana fue incubada toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario diluido en 5% de leche desnatada en TBS-Tween-20 (TBS-T). El día siguiente la membrana fue lavada con TBS-T (3 lavados de 10 minutos cada uno) y posteriormente incubada con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa, diluido en 0.5% de leche desnatada en TBS-T, durante 45 minutos. Una vez cumplido el tiempo de incubación, se procedió a lavar la membrana con TBS-T tres lavados de 10 minutos. Finalmente la detección de la proteína fue realizada mediante el reactivo de quimio-luminiscencia *ECL blotting detection (Amersham Life Sciences)*.

### **M.5.3. Hibridación y análisis de microarrays**

Un *chip* de DNA (*DNA microarray*) es una superficie sólida a la cual se une una librería de fragmentos de DNA. Los chips de DNA se utilizan para analizar la expresión diferencial de genes, monitorizándose los niveles de miles de ellos de forma simultánea.

El análisis mediante *microarrays* fue realizado a partir del RNA total de mESC, MEF y clones aislados de MEF infectados con distintas combinaciones retrovirales (ver Figuras R.13 y R.14). Se analizó la viabilidad y la calidad de este RNA mediante un bioanalizador (*Agilent 2100 Bioanalyzer, Agilent*). El número de la integridad del RNA (*RIN*) oscila entre 10 (intacto) y 1 (totalmente degradado), La totalidad de las muestras analizadas tenían un  $RIN > 9$ . El análisis de expresión génica

fue realizado en el servicio de *microarrays* de la *Universitat de València*, de acuerdo con el protocolo recomendado por *Affymetrix* usando el *array Mouse Gene 1.0 ST (Affymetrix)* a partir de 300 ng de RNA total. Los *arrays* hibridados fueron digitalizados en un escáner *Affymetrix GeneChip 3000 7G (Affymetrix)*. Tres muestras diferentes por grupo fueron examinadas. Los datos se normalizaron utilizando el algoritmo *multiarray (RMA)*. Acto seguido, se excluyeron los datos de las sondas que no alcanzaron un valor de la expresión  $\log_2$  de 5 unidades de fluorescencia en al menos una muestra, que resultó en la selección de un total de 19621 sondas de la serie original de 28853. Para identificar los genes expresados diferencialmente entre los diferentes grupos de estudio de *microarrays*, se emplearon modelos lineales para datos de *microarray*.

#### **M.5.4. Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)**

Un ensayo de cambio de movilidad electroforética (*EMSA*), es una técnica de electroforesis de afinidad utilizada para estudiar las interacciones proteína-DNA o proteína-RNA. Con este procedimiento se puede determinar si una proteína o una mezcla de proteínas es capaz de unirse a una secuencia de DNA o RNA determinada.

Para la realización de este ensayo se utilizaron extractos nucleares de CCE1.19 (línea de ESC murinas), obtenidos mediante el reactivo de extracción de proteínas NE-PER siguiendo las instrucciones del fabricante. El marcaje de la sonda, la transferencia y la detección se realizó mediante el kit comercial *DIG Gel Shift kit, 2nd Generation (Roche)*, con modificaciones menores. Las reacciones de unión a DNA incluyeron 15  $\mu\text{g}$  de extracto nuclear, 157 fmol de sonda marcada, 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  *Poli Lysine* y 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  *of poly (dIdC) (Roche)* en 20  $\mu\text{l}$  de tampón *EMSA*. Este tampón contenía *HEPES* 12 Mm, pH 7.9; 4 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 12 mM de glicerol, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 60 mM KCl, 0.6 mM de EDTA pH 7.9, 0.28 mg/ml de BSA y 0.6 mM de DTT. Las reacciones de unión se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Donde se especifica, se añadieron 2  $\mu\text{l}$  del anticuerpo anti-Gata4 (sc-9053, *Santa Cruz*

## MATERIALES Y MÉTODOS

*Biotechnology*) después de 10 minutos de incubación y la reacción continuó 10 minutos más. Las reacciones de unión se resolvieron en un gel no desnaturalizante al 6% TBE-poliacrilamida (16,5 x 20 cm) 0,5X Tris-borato-EDTA (TBE) a 20 mA (corriente constante). El gel se electrotransfirió en tampón TBE 0.4% usando una membrana de transferencia *Hybond N+* durante 2 horas a 400 mA mediante un tanque de transferencia (548 x 480 - *Semi-dry blotter*, *Sigma*). La reacción de unión del DNA a la membrana (*DNA-crosslinking*) fue realizada mediante la exposición de la membrana a la luz UV durante 12 minutos (306 nm) con un transiluminador *Gel-Logic 200*. Los *primers* utilizados se muestran en la Tabla TM9

### **M.5.5. Ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

La inmunoprecipitación de la cromatina es una técnica experimental utilizada para investigar la unión de proteínas al DNA genómico. Éste ensayo fue realizado utilizando el kit comercial *Low cell number ChIP (Dianogenode)* tal y como se describe en [203]. La línea CCE1.19 fue cultivada en placas de 10 cm. El DNA inmunoprecipitado se analizó utilizando el *LightCycler 480 Real-Time PCR*. Los *primers* diseñados para el ChIP se muestran en la Tabla TM10

### **M.5.6. Ensayos reporteros**

Este ensayo se emplea para estudiar la regulación de genes, situando un gen reportero (luciferasa) tras el promotor en estudio. Para ello se cotransfectan en una línea celular determinada dos plásmidos reporteros. Un plásmido contiene el promotor a analizar regulando la expresión de la enzima luciferasa (de luciernaga). El segundo plásmido contiene un promotor constitutivo del virus del sarcoma de *Rous (RSV) SV40* controlando la expresión de otra enzima luciferasa (de *Renilla reniformis*) comúnmente denominada “*renilla*”.

Mediante una reacción de detección por quimioluminiscencia se puede medir la actividad de la luciferasa/*renilla* y así poder analizar la actividad

## MATERIALES Y MÉTODOS

del promotor en estudio. La actividad del promotor en estudio será directamente proporcional a la cantidad de luciferasa (*firefly luciferase*) producida en dichas células transfectadas. Los niveles de actividad de la *renilla* son utilizados para normalizar los datos de la luciferasa.

Una vez transfectadas las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. El ensayo reportero se realizó mediante el kit comercial (*Dual-luciferase reporter assay*, Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se midió la actividad de la luciferasa y de la *renilla* en un luminómetro de placa (Berthold) mediante el software Simplicity 2.1. Finalmente se normalizaron los datos de la luminiscencia de la luciferasa con los datos de luminiscencia de la *renilla*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**M.6. TABLAS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

**M.6.1. Plásmidos**

<b>Plásmidos empleados en reprogramación a pluripotencia</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Fuente</b>	<b>Tipo de Vector</b>	<b>sitios de clonación</b>
pMXs-c-Myc	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pMXs-Klf4	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pMXs-Nanog	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pMXs-Oct3/4	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pMXs-Sox2	<i>Addgene</i>	Retroviral	
<b>Plásmidos empleados en conversión a endodermo</b>			
pBABE-GATA4	Dr. K. Zaret	Retroviral	
pBABE-FOXA2	Dr. K. Zaret	Retroviral	
pMIGR1-Hhex	Esta Tesis	Retroviral	XhoI-EcoRI
pPYCAG-HA-GATA4	Esta Tesis	Episomal	XhoI-NotI
<b>Plásmidos empleados en conversión a hepatocitos</b>			
pBABE-HNF4 $\alpha$	Dr. K. Zaret	Retroviral	
pMIGR1-HNF1 $\alpha$	Esta Tesis	Retroviral	XhoI-EcoRI
pMIGR1-HNF6 $\alpha$	Esta Tesis	Retroviral	XhoI-EcoRI
<b>Plásmidos reporteros</b>			
Nanog-pGL3	Dr. P. Robson	Reportero	
Nanog-pGL3- <i>enh/prom</i>	Esta Tesis	Reportero	KpnI-SacI
pGL3-Basic	<i>Promega</i>	Reportero	
<b>Plásmidos selección celular</b>			
pMIGR1-GFP	Dr. A. Pellicer	Retroviral	
pMXs-dTomato	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pPYCAG-IP	Dr. A. Smith	Episomal	
<b>Plásmidos empaquetadores</b>			
pCL-Eco	<i>Addgene</i>	Retroviral	
pLP1	Dr. R. Gregory	Lentiviral	
pLP2	Dr. R. Gregory	Lentiviral	
pVSVG	Dr. R. Gregory	Lentiviral	
<b>Plásmidos shRNA para Gata4</b>			
pLKO.1-shLuc	Dr. Y-M. Jeng	Lentiviral	
pLKO.1-shGata4-3	<i>Open Biosystems</i>	Lentiviral	

## MATERIALES Y MÉTODOS

pLKO.1-shGata4-4	<i>Open Biosystems</i>	Lentiviral	
pLKO.1-shGata4-5	<i>Open Biosystems</i>	Lentiviral	
pLKO.1-shGata4-6	<i>Open Biosystems</i>	Lentiviral	

**Tabla TM1. Plásmidos utilizados en esta tesis**

### M.6.2. Combinaciones retrovirales

Factores de Yamanaka	Factores de transcripción endodermo	Abreviaturas
	Hhex	H
	Foxa2+Hhex	F+H
	Foxa2+ Gata4	F+G
Oct4, Klf4, Sox2	Hhex	<b>OKS+H</b>
	Foxa2+Hhex	OKS+ F+H
	Foxa2+ Gata4	<b>OKS+F+G</b>
Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc	Hhex	OKSM+H
	Foxa2+Hhex	OKSM+ F+H
	Foxa2+ Gata4	<b>OKSM+F+G</b>

**Tabla TM2 Combinaciones retrovirales utilizadas en la reprogramación a endodermo hepático.**

Factores de Yamanaka	Factores de transcripción hepáticos y endodérmicos	Abreviaturas
	HNF1 $\alpha$ + HNF4 $\alpha$ + HNF6 +Hhex + Foxa2 + Gata4	<b>Pool Hepato</b>
Oct4, Klf4, Sox2	HNF1 $\alpha$ + HNF4 $\alpha$ + HNF6 +Hhex + Foxa2 + Gata4	<b>OKS Pool Hepato</b>
Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc	HNF1 $\alpha$ + HNF4 $\alpha$ + HNF6 +Hhex + Foxa2 + Gata4	<b>OKSM Pool Hepato</b>

**Tabla TM3 Combinaciones retrovirales utilizadas en la reprogramación a hepatocitos.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

Factores de Yamanaka	Factores de transcripción endodermo	Abreviaturas
Oct4, Klf4, Sox2		OKS
	Foxa2	OKS+F
	Gata4	OKS+G
	Gata4 + Nanog	OKS+G+N
Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc		OKSM
	Foxa2	<b>OKSM+F</b>
	Gata4	<b>OKSM+G</b>
	Gata4+ Nanog	<b>OKSM+G+N</b>

**Tabla TM4. Combinaciones retrovirales utilizadas para estudiar el papel de Gata4 en la reprogramación a pluripotencia.**

Factores de Yamanaka	Infección a día 0	Reinfección a día 8	Abreviaturas
Oct4, Klf4, Sox2	OKS	Gata4+ret-GFP	OKS+RG+ret-GFP
		ret-RFP	OKS+ret-RFP
Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc	OKSM	Gata4+GFP	OKSM+RG+ret-GFP
		ret-RFP	OKSM+ret-RFP

**Tabla TM5. Combinaciones retrovirales utilizadas para la reinfección con Gata4.**

Plásmido lentiviral		pLKO.1-shLuc	pLKO.1-shGata4-3	pLKO.1-shGata4-4	pLKO.1-shGata4-5	pLKO.1-shGata4-6
Lentivirus		SHLUC	SH3	SH4	SH5	SH6
Factores de Yamanaka (Retrovirus)	OKS	<b>3SHLUC</b>	<b>3SH3</b>	<b>3SH4</b>	<b>3SH5</b>	<b>3SH6</b>
	OKSM	<b>4SHLUC</b>	<b>4SH3</b>	<b>4SH4</b>	<b>4SH5</b>	<b>4SH6</b>
<b>Abreviaturas de las combinaciones virales</b>						

**Tabla TM6. Combinaciones retrovirales y lentivirales utilizadas para el silenciamiento de la proteína Gata4 en la reprogramación a iPSC.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **M.6.3. Primers**

<b>Primers utilizados en la clonación por PCR en plásmidos retrovirales</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
pMIGR1HhexXhoI FP	AAC TCG AGA TGC AGT TCC CGC ACC CGG GG
pMIGR1HhexEcoRI RP	GGG AAT TCT CAT CCA GCA TTA AAG TAG CC
pMIGR1HNF1αXhoI FP	AAC TCG AGA CCA TGG TTT CTA AAC TGA GCC AG
pMIGR1HNF1αEcoRI RP	GGG AAT TCT TAC TGG GAG GAA GAG GCC AT
pMIGR1HNF6αXhoI FP	AAC TCG AGA CCA TGA ACG CGC AGC TGA CCA TG
pMIGR1HNF6αEcoRI RP	GGGAATTCT CAT GCT TTG GTA CAAGTG C
<b>Primers utilizados en la clonación en plásmidos episomales</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
pPYCAGHAGata4 FP	AAC TCG AGC CAC CAT GTA CCC ATA CGA TGT TCC AGA TTA CGC TTA CCA AAG CCT GGC CAT GGC CGC
pPYCAGHAGata4 RP	AAG CGG CCG CTT ACG CGG TGA TTA TGT CCC CAT G
<b>Primers utilizados en la clonación en plásmidos reporteros</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
Nanog-pGL3- <i>enh/prom</i> FP	AAG GTA CCG CTG GGG CTA CAC AGA GAA ACC
Nanog-pGL3- <i>enh/prom</i> RP	ATG AGC TCG TCC TTT CCT CTG GCG GCA GC

**Tabla TM7. Parejas de primers utilizados en la clonación de plásmidos mediante PCR.**

<b>Primers utilizados en PCR cuantitativa a tiempo real</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
Actin FP	GAC CAA GCT GCG GCT CAG CA
Actin RP	CGC AAT CTG CTC CAC GCG GT
Afp FP	CTG GAG TGT CTG CAG GAT GG
Afp RP	CAC AGC CGG ACC ATT TCT C
Alb FP	GCA TGG GCA GTA GCT CGC CT
Alb RP	GGC AAG GTC CGC CCT GTC AT
Cdkn2a (p16) FP	AGG GCC GTG TGC ATG ACG TG
Cdkn2a (p16) RP	TCA TCA CCT GAA TCG GGG TAC GAC
Cdkn2a (p19) FP	CTC AAC GCC GAA GGG GCT GG
Cdkn2a (p19) RP	TGC CCA TCA TCA TCA CCT GGT CC

## MATERIALES Y MÉTODOS

c-Myc FP endógeno	TGA CCT AAC TCG AGG AGG AGC TGG AAT C
c-Myc RP endógeno	AAG TTT GAG GCA GTT AAA ATT ATG GCT GAA GC
c-Myc FP total	CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CGC
c-Myc RP total	TTA TGC ACC AGA GTT TCG AAG CTG TTC G
c-Myc FP exógeno	CAG AGG AGG AAC GAG CTG AAG CGC
c-Myc RP exógeno	TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG
Foxa2 FP	CGA ACA AAG CGG GCC TGG AT
Foxa2 RP	CCT CTC ATT TCC CTT GTC CCC AGT
Gata4 FP exógeno	GCA TGG ACA CCC AGA CCA GGT C
Gata4 RP exógeno	GGA GCA CTG GAA AAG CCT GCG
Gdf3 FP	TCT GCG GTC TGT CCC TGG GC
Gdf3 RP	AGC AGC CGG TCA CAG GGG TT
Gsc FP	CGG AGA AGA GGG AAG AGG AAG GTA AAA
Gsc RP	ATA AAT ACT ACG GTG GGG GAC GAG GCT CAC
Klf4 FP endógeno	CCA ACT TGA ACA TGC CCG GAC TT
Klf4 RP endógeno	TCT GCT TAA AGG CAT ACT TGG GA
Klf4 FP total	CAC CAT GGA CCC GGG CGT GGC TGC CAG AAA
Klf4 RP total	TTA GGC TGT TCT TTT CCG GGG CCA CGA
Klf4 FP exógeno	GCG AAC TCA CAC AGG CGA GAA ACC
Klf4 RP exógeno	TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG
Lin28 FP	GGA GTG AGC GGC GGC CAA AA
Lin28 RP	GCT GGG GTG GCA GCT TGC AT
Nanog FP endógeno	CCA CTA GGG AAA GCC ATG CGC
Nanog RP endógeno	AGG AAC CTG GCT TTG CCC TGA C
Nanog FP total	CCA CTA GGG AAA GCC ATG CGC
Nanog RP total	CAC CTG GTG GAG TCA CAG AGT AGT
Nanog FP exógeno	CCA CTA GGG AAA GCC ATG CGC
Nanog RP exógeno	TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG
Ocln1 FP	CCT CCA ATG GCA AAG TGA ATG GCA
Ocln1 RP	TGT TTC ATA GTG GTC AGG GTC CGT
Oct4 FP endógeno	TCT TTC CAC CAG GCC CCC GGC TC
Oct4 RP endógeno	TGC GGG CGG ACA TGG GGA GAT CC
Oct4 FP total	CTG AGG GCC AGG CAG GAG CAC GAG

## MATERIALES Y MÉTODOS

Oct4 RP total	CTG TAG GGA GGG CTT CGG GCA CTT
Oct4 FP exógeno	TTG GGC TAG AGA AGG ATG TGG TTC
Oct4 RP exógeno	TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG
Perp FP	TCG CCC TGT GTG GAC CCC AG
Perp RP	TGG CGG CCC CCA AAA GGT CA
Slc8a5 FP	GAA CTT TGC CGC CCC ACC CA
Slc8a5 RP	GCC ACA TGG CGT AGC CAG CT
Snai1 FP	TTG TGT CTG CAC GAC CTG TGG AAA
Snai1 RP	TCT TCA CAT CCG AGT GGG TTT GGA
Sox2 FP endógeno	TAG AGC TAG ACT CCG GGC GAT GA
Sox2 RP endógeno	TTG CTT TAA ACA AGA CCA CGA AA
Sox2 FP total	GGT TAC CTC TTC CTC CCA CTC CAG
Sox2 RP total	TCA CAT GTG CGA CAG GGG CAG
Sox2 FP exógeno	GGT TAC CTC TTC CTC CCA CTC CAG
Sox2 RP exógeno	TTA TCG TCG ACC ACT GTG CTG
Sox7 FP	CTC GCT GCT GGG CGC CTA TC
Sox7 RP	GGT CCG GGT TCT GCA CTG CC
Sparc FP	ACA TCG CCC CCT GCC TGG AT
Sparc RP	GCA GTG GGG CCA GCT CAG TG
Syne2 FP	GAG CAG CTG GCC ACT TTA AC
Syne2 RP	TCT TCA CCC TGA GCG CTA TT
Ttr FP	GAG AGC TGC ACG GGC TCA CC
Ttr RP	TGA CGA CAG CCG TGG TGC TG
Zeb1 FP	TGC TCA CCT GCC CGT ATT GTG ATA
Zeb1 RP	AGT GCA CTT GAA CTT GCG GTT TCC

**Tabla TM8. Parejas de *primers* utilizados para análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

<b>Primers EMSA</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
Gata4 Site ECR IV FP	CAG GAT TTC TTC <b>TGA TAG</b> CTT TAT GGA ACG
Gata4 Site ECR IV RP	CGT TCC ATA AAG <b>CTA TCA</b> GAA GAA ATC CTG
Gata4 Site ECR IV FP Mut <sup>1</sup>	CAG GAT TTC TTC <u>GCG CGC</u> CTT TAT GGA ACG
Gata4 Site ECR IV RP Mut	CGT TCC ATA AAG <u>GCG CGC</u> GAA GAA ATC CTG

**Tabla TM9. Primers utilizados en el ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA).** El sitio de unión consenso para factores Gata está marcado en negrita. <sup>1</sup>Mut: primers con una mutación en el sitio de unión de Gata4 (subrayado).

<b>Primers ChIP</b>	
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5'3'</b>
ECR IV-Gata4 ChIP FP	GTC AGC CCA CGC ATT TCT CTG TG
ECR IV -Gata4 ChIP RP	TCC TAC TGG GTT GGT GAA GAT TCC A
ECR III -Gata4 ChIP FP	CAG CTA GTT CCA ACC AGG TCT AA
ECR III -Gata4 ChIP RP	TGA GAG TCT CTG GTG AAA GAT CC
CYP17a1-Gata4 ChIP FP	AGC TCC TCC TCC AGG AGT TC
CYP17a1-Gata4 ChIP RP	GCA AGA GAC CCA CAA GTT CC

**Tabla TM10. Primers utilizados en el ChIP de Gata4.**

## MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

# ***RESULTADOS***

## RESULTADOS

**R.1. REPROGRAMACIÓN DE FIBROBLASTOS A LINAJE  
HEPÁTICO**

## RESULTADOS

El uso de hepatocitos humanos en estudios farmacotxicológicos, patofisiológicos o en terapia génica requiere de unos protocolos que permitan la obtención de grandes cantidades de hepatocitos con fenotipo adulto. Los hepatocitos humanos en cultivo pierden su capacidad proliferativa y su fenotipo a los pocos días de su aislamiento, lo que restringe el uso de hígados humanos como una fuente ilimitada de hepatocitos adultos. Con el fin de desarrollar un protocolo de diferenciación a hepatocitos, dividimos el proceso en dos fases, una primera fase de diferenciación a endodermo hepático con capacidad proliferativa y una segunda fase que permita la obtención de hepatocitos adultos a partir de endodermo hepático.

Estudios de ganancia y pérdida de función en diferentes modelos animales han puesto de manifiesto que miembros de la familia de factores de transcripción **Foxa** son esenciales para la formación del endodermo definitivo y su posterior especificación a hígado [123, 132]. Paralelamente, la expresión de los factores de la familia **Gata** también parece ser esencial en la formación del primordio hepático [133, 204, 205]. La expresión del factor de transcripción **Hhex**, se requiere para adquirir la competencia hepatogénica del endodermo definitivo, paso fundamental para el posterior desarrollo del hígado [146, 150, 206-208].

### **R.1.1. Reprogramación de MEF a endodermo hepático**

Para reprogramar fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) a endodermo hepático, se siguieron dos estrategias.

1. **La reprogramación directa** de MEF a endodermo hepático mediante la expresión retroviral de Gata4, Foxa2 y Hhex.
2. **La reprogramación indirecta** de MEF a endodermo hepático a través de formas metaestables de células pluripotentes, combinando la expresión retroviral de Gata4, Foxa2 y Hhex con retrovirus que expresan los factores de reprogramación a pluripotencia, esto es, Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc.

## RESULTADOS

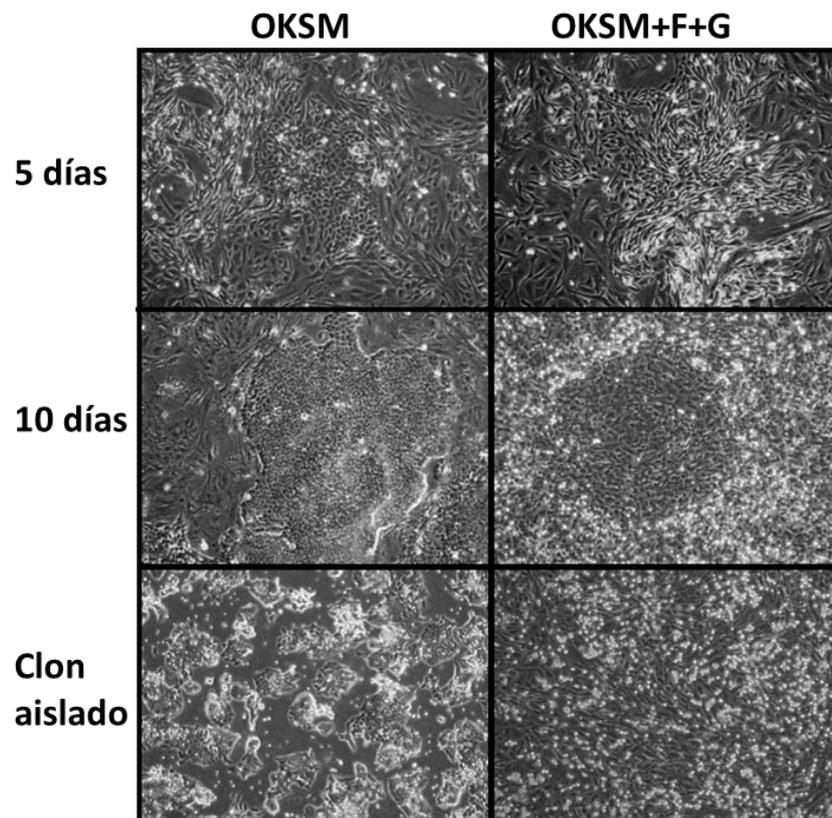
### **R.1.1.1. La expresión de Foxa2 y Gata4 no es suficiente para reprogramar MEF a endodermo hepático**

Los MEF infectados con combinaciones de retrovirus que expresan los factores de transcripción Gata4, Foxa2 y Hhex se volvieron senescentes a las dos semanas de reprogramación sin apreciar cambios morfológicos que indicaran su reprogramación hacia endodermo hepático (Tabla TM2).

Con el fin de llevar a cabo la reprogramación indirecta, infectamos los MEF con los factores de transcripción ya utilizados en la reprogramación directa junto con los factores usados por Yamanaka para reprogramar a iPSC, esto es, Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Nuestra hipótesis de trabajo era reprogramar los MEF a formas tempranas o metaestables de iPSC y que posteriormente los factores pro-endodérmicos las redirigieran a endodermo hepático (Tabla TM2).

Tras infectar los MEF con las distintas combinaciones retrovirales, comenzó a observarse la formación de colonias entre la segunda y la tercera semana de infección. Aquellas combinaciones que incluían Hhex fueron las primeras colonias en aparecer. A nivel morfológico, las colonias formadas en las placas OKS+F+G, OKSM+F+G y OKS+H resultaron muy distintas de la morfología típica de iPSC. Las colonias de la combinación que incluía Foxa2 y Gata4 poseían una forma granular con bordes irregulares y no bien definidos, conteniendo células con morfología fibroblástica, muy compactas, de menor tamaño (Figura R.1). La combinación OKS + Hhex produjo estructuras celulares similares a colangiocitos (ver apartado R.1.1.2)-

El tiempo post-infección necesario para la formación de clones/colonias de un tamaño óptimo para su aislamiento y expansión fue variable en función del tratamiento, oscilando entre tres y cinco semanas. En total se aislaron 6 clones de cada tratamiento retroviral, escogiendo aquellos que siendo de morfología similar diferían de la morfología típica de las colonias de iPSC.



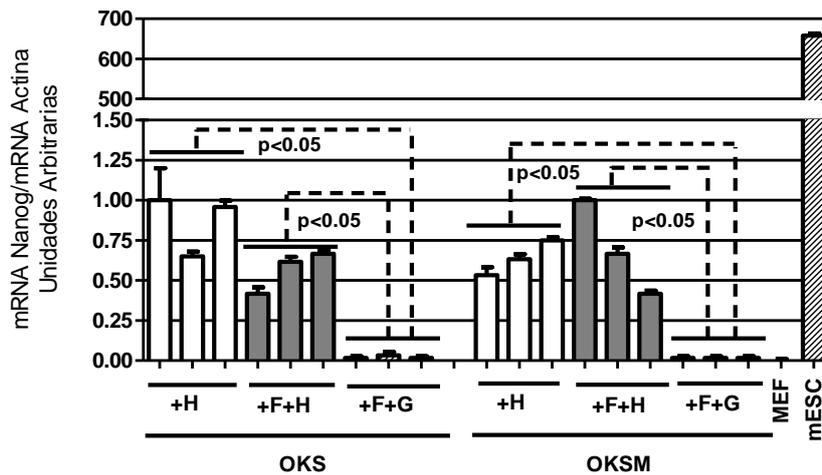
**Figura R.1. Morfología de colonias representativas y clones aislados de MEF reprogramados con OKSM y OKSM+F+G.** Imágenes de contraste de fases mostrando la morfología de colonias en formación a días 10 y 15 después de la infección. Los paneles inferiores muestran la morfología de clones aislados. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc; **OKSM+F+G:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Foxa2 y Gata4.

Nanog es el marcador esencial de pluripotencia; su ausencia es síntoma claro de una falta de pluripotencia y viceversa [88, 209, 210]. Está bien documentado que la diferenciación de células pluripotentes se acompaña de un silenciamiento en la expresión del factor de transcripción Nanog [210-212].

Para determinar qué clones contenían células diferenciadas no pluripotentes, requisito indispensable para la reprogramación a endodermo, se aisló RNA total de los diferentes clones seleccionados y

## RESULTADOS

se analizó por PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de Nanog (Figura R.2).

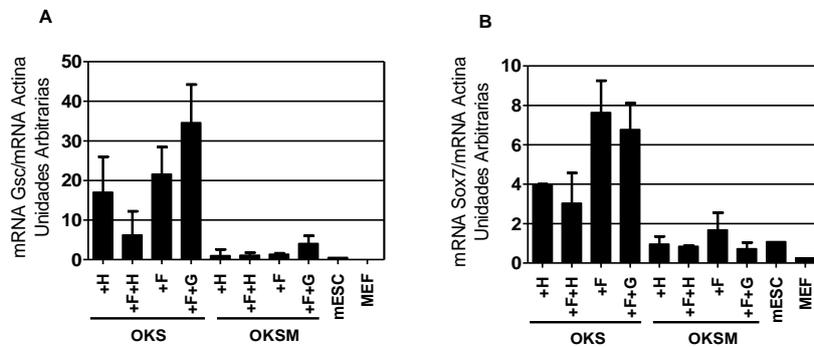


**Figura R.2. Expresión del factor de transcripción Nanog en clones aislados.** Los niveles de mRNA de Nanog fueron determinados mediante PCR cuantitativa a tiempo real en 3 de los clones aislados de MEF infectados con cada combinación retroviral. **OKS**: Oct4, Klf4, Sox2; **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+F**: Foxa2; **+G**: Gata4; **+H**: Hhex; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC**: Células madre embrionarias de ratón.

Todos los clones aislados muestran niveles marginales (escasamente por encima del fondo) de Nanog cuando se compara con ESC, indicando que todos ellos carecen de una pluripotencia verdadera y por tanto debe tratarse de células diferenciadas. Sea como fuere, los niveles de expresión de Nanog en las infecciones que incluían Foxa2 y Gata4 son inferiores al resto de manera estadísticamente significativa.

Para determinar si los clones se habían diferenciado hacia endodermo, se llevó a cabo un análisis limitado por PCR cuantitativa a tiempo real, de la expresión de dos marcadores típicamente endodérmicos: *Goosecoid* (Gsc) y Sox7 (Figura R.3). Gsc se expresa en la línea primitiva del embrión temprano y en las células precursoras del endodermo definitivo anterior y notocordio [213]. Sox7 se expresa en el endodermo visceral [214].

## RESULTADOS

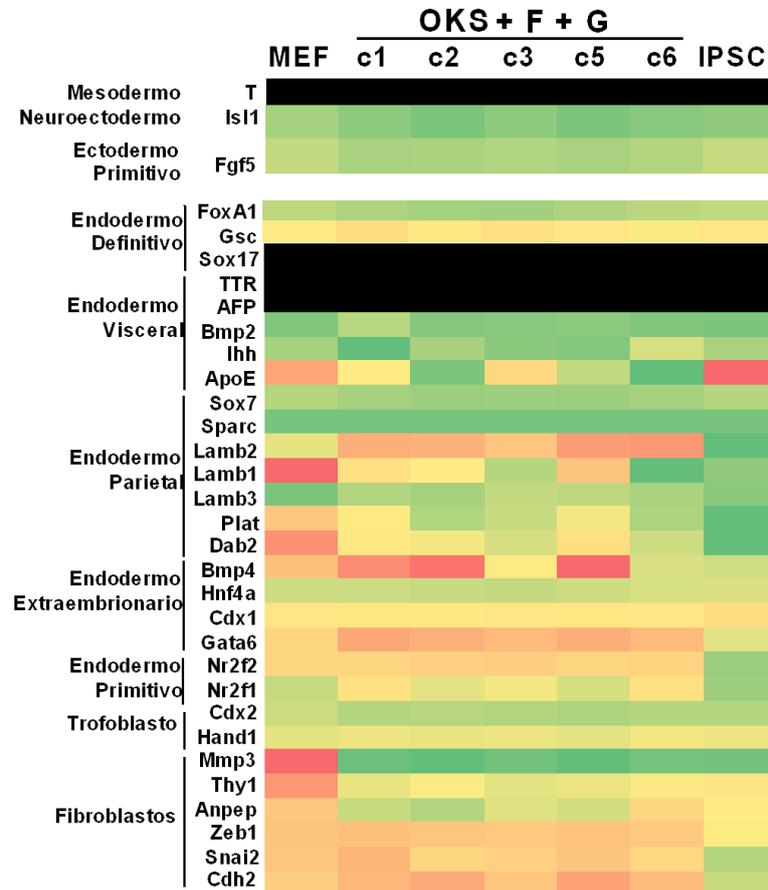


**Figura R.3. Niveles de expresión de los marcadores endodérmicos Gsc y Sox7.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los marcadores endodérmicos Gsc (A) y Sox7 (B) en clones aislados y expandidos de MEF infectados con diferentes combinaciones retrovirales. Se muestra la media aritmética de 3 clones seleccionados de cada infección retroviral junto con su desviación típica. **OKS**: Oct4, Klf4, Sox2; **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+F**: Foxa2; **+G**: Gata4; **+H**: Hhex; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC**: Células madre embrionarias de ratón.

Tal y como se observa en la Figura R.3, la expresión de Gsc y Sox7 resultó heterogénea. Sin embargo, parece claro que todas las combinaciones retrovirales que incluyen OKS parecen expresar niveles de Gsc y Sox7 más elevados que los correspondientes a OKSM. Puesto que los niveles de expresión de Gsc y Sox7 no nos permitía *a priori* seleccionar clones para un estudio más exhaustivo, decidimos llevar a cabo un análisis global de expresión por *microarray* (ver apartado M.5.3) centrándonos en los clones procedentes de OKS+F+G y OKS+H puesto que estos clones presentaban una morfología diferencial.

A continuación se muestra en un gráfico de código de color (*Heat map*) una selección de los marcadores más característicos de cada endodermo embrionario (Figura R.4) para 5 de los clones aislados de OKS+F+G.

## RESULTADOS



**Figura R.4. Heat map de marcadores endodérmicos en clones aislados de MEF infectados con OKSM+F+G.** Se representan los niveles de mRNA relativos de distintos marcadores endodérmicos en MEF, iPSC y MEF reprogramados con Oct4, Klf4, Sox2, Foxa2 y Gata4. **OKS+F+G:** Oct4, Klf4, Sox2, Foxa2 y Gata4; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **c1-c6:** clones 1 al 6; **iPSC:** Células pluripotentes inducidas.

La ausencia de marcadores tan característicos como Sox17, Ttr y Afp, así como los bajos niveles de Lamb1, Sparc y Sox7 [215] confirmaron que los MEF no se habían reprogramado hacia ninguno de los linajes endodérmicos embrionarios.

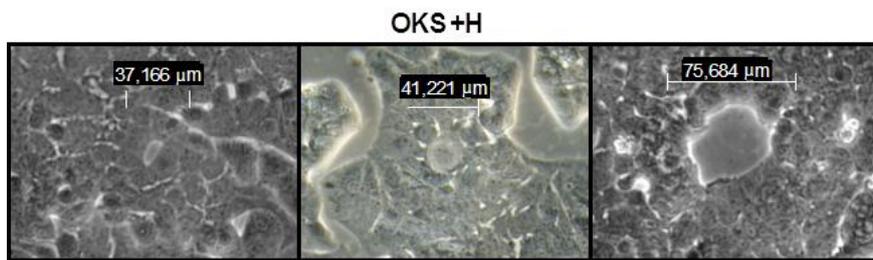
Estos resultados en su conjunto sugieren la posibilidad de que Gata4 y/o Foxa2, podían estar reprimiendo de manera específica la expresión de Nanog (Figura R.2). Ahora bien, se trata de una observación preliminar puesto que los MEF infectados con OKS+F+G no siguieron un protocolo

## RESULTADOS

de reprogramación a iPSC ya que se cultivaron en DMEMc y no en medio ESC que contiene LIF. Describiremos detalladamente esta observación y su mecanismo molecular en el apartado R.2 de Resultados.

### **R.1.1.2. MEF reprogramados con Oct4, Sox2, Klf4 y Hhex adquieren una morfología similar a colangiocitos**

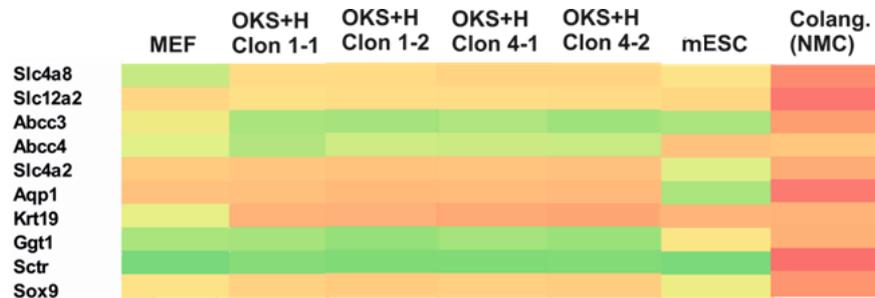
La infección OKS con Hhex dio lugar a formaciones celulares morfológicamente muy diferentes a las demás combinaciones y a las propias iPSC (Figura R.5). Las células se agrupaban de forma similar a como lo hacen los colangiocitos en las fases iniciales del desarrollo de las vías biliares [163], esto es, formando una corona celular alrededor de un espacio central. El tamaño del espacio central es compatible con el tamaño de los canalículos interlobulares [216].



**Figura R.5. Morfología de los clones aislados de la infección OKS+H.** De izquierda a derecha: Imágenes de contraste de fases tomadas con un objetivo 20X del clon 1, de la infección con OKS+H. A la derecha de la serie de imágenes se muestra una microfotografía de contraste de fases tomada con un objetivo 40x del clon 1 de la infección con OKS+H. **OKS+H:** Oct4, Klf4, Sox2 y Hhex.

Del mismo modo que con los clones aislados de las combinaciones OKS+F+G se llevó a cabo un análisis de expresión mediante *microarray* de clones aislados de las infecciones con OKS+H.

## RESULTADOS



**Figura R.6. Heat map de marcadores específicos de colangiocitos en clones aislados de los MEFs infectados con OKSM+H.** Niveles de expresión relativa de los mRNA seleccionados de MEF, mESC, y dos clones de MEF reprogramados con OKS+H. Los genes de estudio fueron seleccionados basándonos en los marcadores típicos de colangiocitos. **OKS+H:** Oct4, Klf4, Sox2 y Hhex; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC:** Células madre embrionarias de ratón; **NMC:** Colangiocitos de ratón.

Los clones presentaban una elevación de Sox9, Slc4a2 o Krt19 que los MEF, aunque no llegaban a ser tan elevados como en los colangiocitos (Figura R.6). Podríamos concluir que estas células están más próximas a los colangiocitos que a los MEF, pero la expresión de marcadores no nos permite concluir que se haya producido la reprogramación a colangiocitos.

### **R.1.2. Reprogramación de MEF a hepatocitos (iHep)**

Los resultados obtenidos en el apartado anterior indican que nuestros protocolos de reprogramación de fibroblastos a endodermo hepático no eran óptimos. Sin embargo, los cambios morfológicos observados en algunas combinaciones retrovirales nos permitían aventurar que los factores endodérmicos eran apropiados, pero eran necesarios nuevos factores. En esta nueva serie de experimentos optamos por diferenciar fibroblastos a hepatocitos (iHep) añadiendo factores de transcripción hepato-específicos (Tabla TM3) y medios de cultivo condicionados (Ver M.2.5.3).

Los nuevos factores de transcripción seleccionados fueron **HNF4 $\alpha$** , **HNF1 $\alpha$**  y **HNF6** (Figura R.7). Estos 3 factores nucleares regulan la transcripción de alrededor de la mitad de todos los genes activos en un

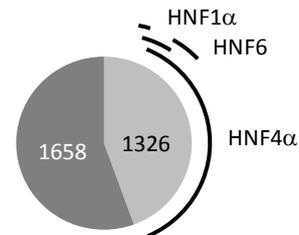
## RESULTADOS

hepatocito adulto, formando una red transcripcional básica en el desarrollo y función de los hepatocitos [175].

Diseñamos experimentos de reprogramación directa e indirecta en los que combinamos los factores de transcripción endodérmicos ya utilizados con hepáticos (*pool-hepato: Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4α, HNF1α y HNF6*). Otro aspecto importante del proceso de diferenciación es el uso de medio condicionado. Durante la reprogramación de MEF a iPSC se usa medio específico de células madre tras la infección (medio ESC).

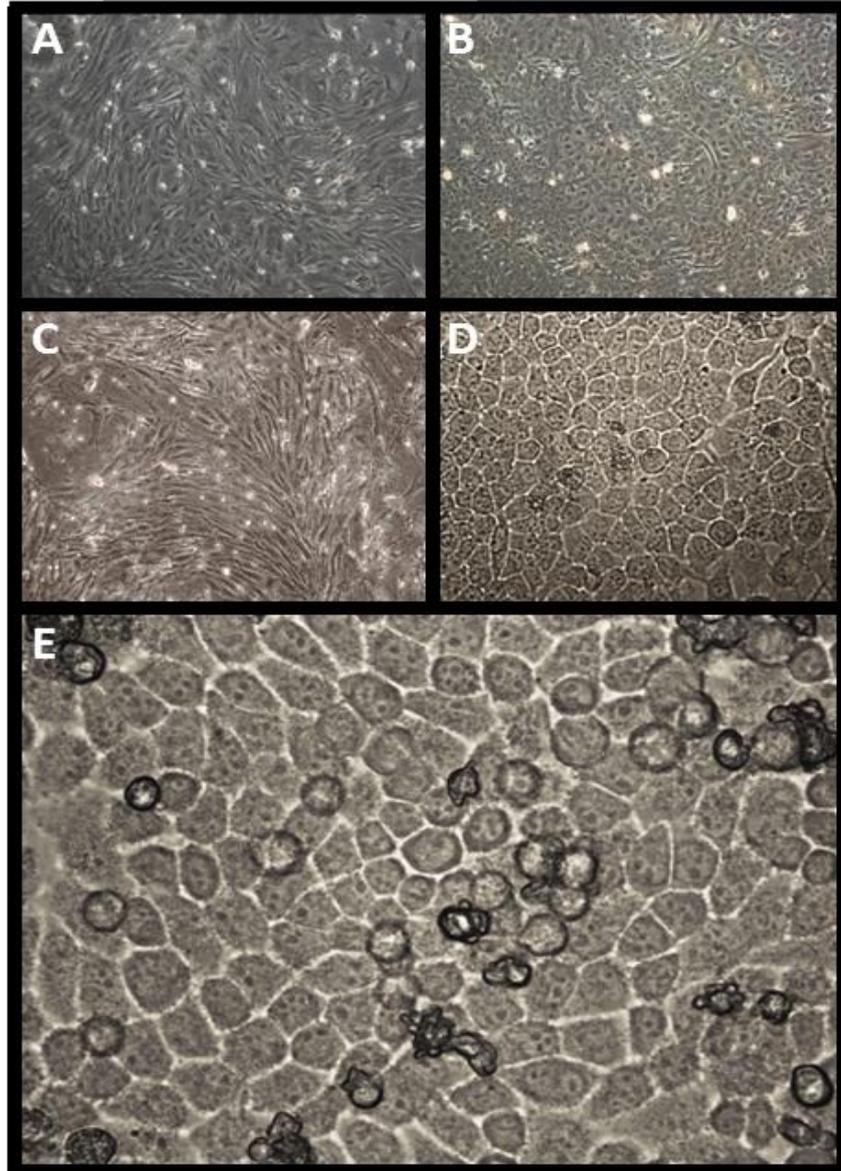
Parecía pues lógico, que en nuestros experimentos utilizáramos medio de cultivo hepático. De este modo, la mitad de las placas infectadas se mantuvieron en medio propio de MEF (DMEMc) mientras que la otra mitad se mantuvo en medio condicionado hepático (MCH) (Tabla TM3 y apartado M.2.5.3).

Todas las combinaciones retrovirales, independientemente del medio de cultivo (DMEMc o MCH), dieron lugar a cambios morfológicos muy significativos. Los MEF perdieron su forma típicamente mesenquimal para adoptar una disposición celular de empedrado que recuerda a un epitelio; estas células poseen una morfología poligonal similar a hepatocitos; muchas de ellas son binucleadas (flechas), con grandes núcleos y con nucléolos prominentes (Figura R.8).



**Figura R.7. Genes activos en hepatocitos adultos.** En la figura se muestra un diagrama circular representando los genes a los que se encuentra unida la RNAPol II en un hepatocito adulto. HNF4α, HNF1α y HNF6 se encuentran unidos a un total de 1326 genes, lo que supone el 44,44% del total de los genes activos en un hepatocito [175].

## RESULTADOS



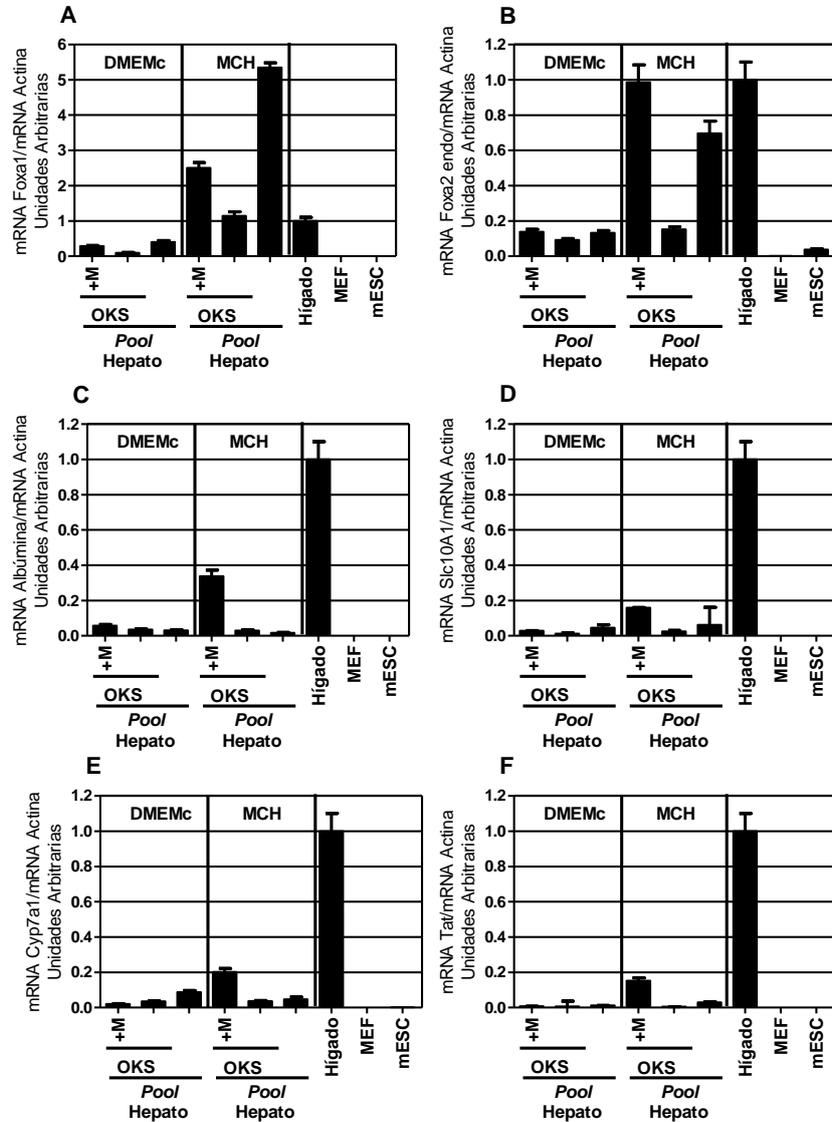
**Figura R.8. Morfología de los MEF infectados con un retrovirus control y con OKSM + Pool Hepato en MCH durante 4 semanas.** (A, C). Imagen en contraste de fase de MEF infectados con retrovirus control (10X y 20X respectivamente) mantenidos en MCH durante 28 días. (B, D) Imagen en contraste de fase de MEF infectados con OKSM +Pool Hepato (10X y 20X, respectivamente) mantenidos en MCH durante 28 días. (E) Imagen (40X) de MEF infectados con OKSM + Pool Hepato. **OKSM + Pool Hepato:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Hhex, Gata4, Foxa2, HNF4 $\alpha$ , HNF1 $\alpha$  y HNF6.

## RESULTADOS

Estos cambios morfológicos sugerían que los MEF habían adquirido un fenotipo hepático. Para determinar el grado de diferenciación de los MEF infectados, extrajimos el RNA y analizamos la expresión de marcadores hepáticos y/o endodérmicos mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se seleccionaron dos tipos de marcadores: factores de transcripción esenciales para el desarrollo del hígado como *Foxa1* y *Foxa2*, y marcadores hepato-específicos de la función hepática: Albúmina, *Slc10a1* (transportador de ácidos biliares), *Cyp7a1* (primer enzima de la ruta sintética de ácidos biliares desde colesterol) y *Tat* (enzima implicado en el metabolismo de la tirosina) (Figura R.9).

En todas las combinaciones retrovirales empleadas e independientemente del medio de cultivo, se produjo una cierta activación de la expresión de los marcadores evaluados. En términos generales, el uso de MCH favoreció la conversión. Así mismo, la presencia de *c-Myc* junto con OKS también favoreció la expresión de marcadores hepáticos. Para poder contextualizar los cambios de expresión producidos incluimos en el análisis RNA procedente de un pool de 5 hígados adultos de ratón.

## RESULTADOS



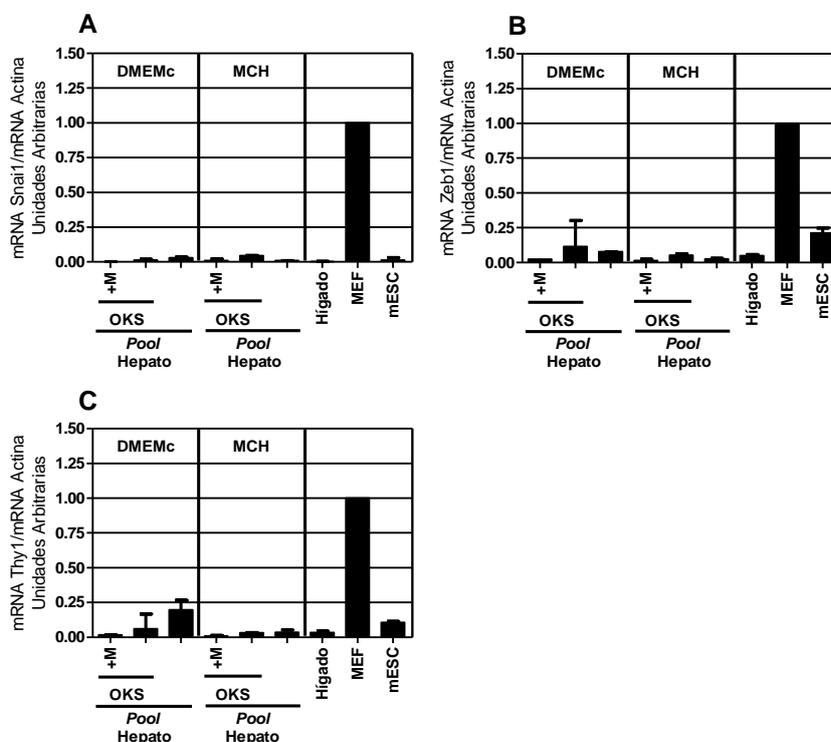
**Figura R.9. Niveles de expresión de marcadores hepáticos en MEF reprogramados de forma directa e indirecta.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los marcadores endógenos Foxa1 (A) y Foxa2 (B), así como de los marcadores hepáticos Alb (C), Slc10a1 (D), Cyp7a1 (E) y Tat (F). A los niveles de expresión de los mRNA en hígado de ratón (n=5) se les asignó un valor igual a 1.0. **OKS:** Oct4, Klf4, Sox2; **+M:** c-Myc; **Pool Hepato:** HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, Hhex, Foxa2, Gata4; **mESC:** células madre de ratón; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **MCH:** medio condicionado hepático.

## RESULTADOS

Los niveles del mRNA de Foxa1 y Foxa2 alcanzados con OKSM+ *pool-hepato* o *pool-hepato* son comparables a los del hígado adulto (Figura R.9A-B) Los niveles de expresión de genes considerados hepato-específicos o mayoritariamente hepáticos no resultaron tan abrumadores, aunque la combinación OKSM+ *pool-hepato* alcanzó niveles próximos al hepatocito adulto. El mRNA de la albúmina alcanzó valores correspondientes al 30% del hígado adulto, mientras que los mRNA de Slc10a1, Cyp7a1 y Tat se mantienen aproximadamente un 20% respecto al nivel en el hígado adulto.

La reprogramación celular, o mejor dicho la conversión de un tipo celular a otro, no sólo implica la expresión *de novo* de marcadores del tipo celular obtenido sino también la pérdida de los marcadores de la célula origen. Por tanto decidimos evaluar por PCR cuantitativa a tiempo real la expresión de algunos marcadores de los MEF. Se seleccionaron Snai1 y Zeb1, represores transcripcionales de genes epiteliales como la E-Cadherina [217, 218] e involucrados en el desarrollo del mesodermo [219, 220] y Thy1, una glicoproteína de la superficie celular involucrada en adhesión local, organización del citoesqueleto y migración celular en fibroblastos [221] (Figura R.10).

## RESULTADOS



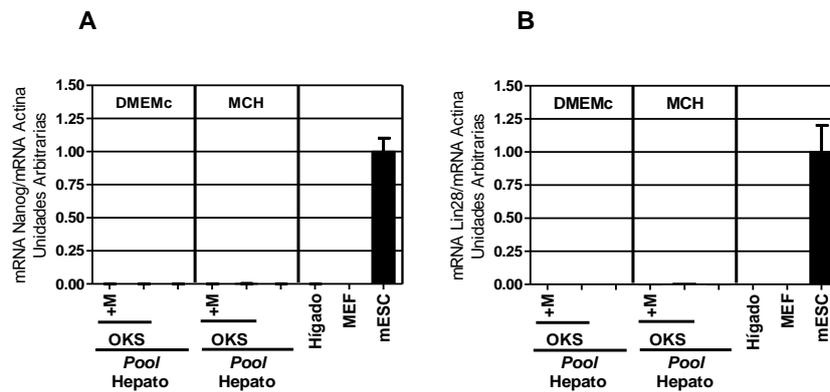
**Figura R.10. Niveles de expresión de marcadores fibroblásticos en MEF reprogramados a iHep de forma directa e indirecta.** . Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los marcadores mesenquimales Snai1, Zeb1 y Thy1. **OKS:** Oct4, Klf4, Sox2; **+M:** c-Myc, **Pool Hepato:** HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, Hhex, Foxa2, Gata4; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC:** Células madre de ratón; **MCH:** Medio condicionado hepático.

En todas las combinaciones retrovirales utilizadas, independientemente del medio de cultivo, se produjo una represión de entre un 80 y un 95% de la expresión de Snai1, Zeb1 y Thy1, siendo máxima para OKSM+ *pool hepato*. Podemos concluir que en paralelo a la inducción más o menos pronunciada de marcadores hepáticos se produce la pérdida del fenotipo fibroblástico (morfología y marcadores).

La inclusión de OKS en algunas de nuestras combinaciones retrovirales podría inducir la formación de células híbridas que expresaran simultáneamente marcadores hepáticos y de pluripotencia. Para poder

## RESULTADOS

evaluar esta posibilidad, se cuantificaron los niveles de expresión de dos factores clave en la adquisición y mantenimiento de la pluripotencia, Nanog y Lin28 [88, 222]. La ausencia de ambos marcadores indican que nuestras células no han sido reprogramadas a formas pluripotentes (Figura R.11).



**Figura R.11. Niveles de expresión de marcadores de pluripotencia en MEF reprogramados a iHep de forma directa e indirecta.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de Nanog (A) y Lin28 (B). **OKS:** Oct4, Klf4, Sox2; **+M:** c-Myc, **Pool Hepato:** HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ , HNF6, Hhex, Foxa2, Gata4; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC:** Células madre de ratón; **MCH:** Medio condicionado hepático.

Aun cuando pudimos extraer RNA suficiente para nuestros análisis, los cultivos infectados exclusivamente con el *pool hepato* comenzaron a envejecer a la cuarta semana de reprogramación y nunca pudieron llegar a congelarse las células. Este resultado pone de manifiesto que **limitar la senescencia celular es un factor clave para la reprogramación.**

En resumen, la reprogramación indirecta de MEF a hepatocitos nos ha permitido obtener líneas celulares con morfología parenquimal no fibroblástica, con pérdida de expresión de marcadores fibroblásticos y ganancia de marcadores hepáticos.

## RESULTADOS

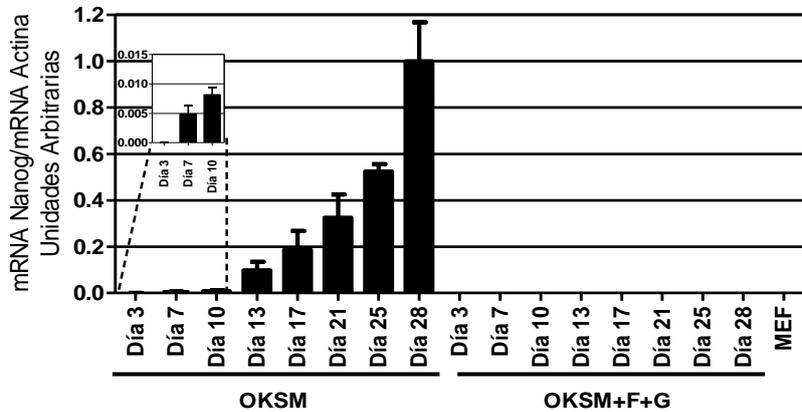
**R.2. BLOQUEO DE LA REPROGRAMACIÓN A IPSC  
MEDIANTE EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN GATA4**

## RESULTADOS

**R.2.1. La expresión de Foxa2 y Gata4 bloquean la inducción de Nanog durante la reprogramación a células pluripotentes inducidas**

Tal y como se mostró anteriormente, los clones aislados de los MEF infectados con Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc junto con Foxa2 y Gata4 (OKSM+F+G) presentaban una expresión significativamente inferior de Nanog (Figura R.2, apartado R.1.1.1). Los bajos niveles de Nanog pueden simplemente ser consecuencia de que el protocolo de reprogramación no incluía LIF en el medio de cultivo. Así mismo, la ausencia de Nanog en los clones expandidos procedentes de la infección con OKSM+F+G puede ser debida a que pierdan su expresión durante el proceso de reprogramación o bien que nunca se induzca Nanog. Con el fin de responder ambas preguntas, se realizó una cinética de expresión de Nanog durante las cuatro semanas de reprogramación a pluripotencia usando el protocolo original de Yamanaka [2] Las colonias observadas en las infecciones con OKSM mostraban la morfología típica de células madre embrionarias con bordes bien definidos, conteniendo células con forma redondeada, nucléolos bien visibles y escaso citoplasma mientras que las colonias de las células infectadas con OKSM+F+G presentaban una morfología fibroblástica, con bordes irregulares no bien definidos, y de menor tamaño.

## RESULTADOS



**Figura R.12. Bloqueo de la inducción de Nanog en MEF infectados con OKSM+F+G.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de Nanog. MEF fueron infectados con OKSM y OKSM+F+G. Cuarenta y ocho horas después de la infección, las células fueron tripsinizadas y sembradas en 8 placas de 3.5 cm. Cada 3-4 días se congelaron las células de una placa de cada combinación para su posterior extracción de RNA. Los valores están relativizados al nivel de expresión a los 28 días. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2y c-Myc; **OKSM+F+G:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, Foxa2 y Gata4.

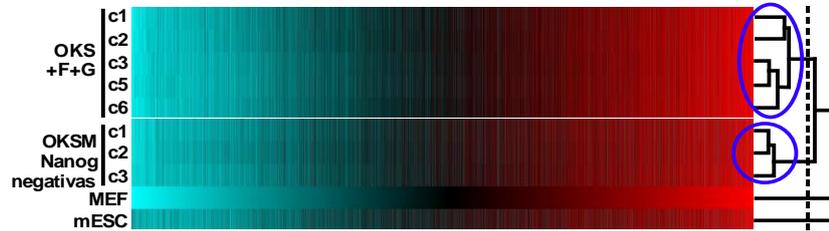
La expresión de Nanog comenzó a ser detectable a partir del día 7 de infección en MEF infectados con OKSM; los niveles fueron incrementando progresivamente hasta el día 28 (Figura R.12). Estos resultados son similares a otros estudios publicados anteriormente [48, 69]. Sin embargo, la expresión de Nanog fue indetectable durante todo el transcurso de la reprogramación cuando se infectó con OKSM+F+G. En resumen, estos resultados confirman que el bloqueo de Nanog es específico de Foxa2 y Gata4 y no está asociado a la ausencia de LIF en los experimentos iniciales. También descartamos la hipótesis de que los clones OKSM+F+G transitan a través de formas metaestables Nanog-positivas, sino que Foxa2 y Gata4 son capaces de bloquear la inducción de Nanog durante la reprogramación a iPSC.

### **R.2.1.1. Los clones aislados de MEF reprogramados con OKSM+F+G no son iPSC parcialmente reprogramadas**

Durante los experimentos de reprogramación, se generan formas celulares que muestran una activación de un pequeño grupo de genes relacionados con ESC y una incompleta represión de marcadores fibroblásticos. Estas formas parcialmente reprogramadas o pr-iPSC pueden quedarse bloqueadas de forma más o menos estable debido a la incompleta represión o activación de factores de transcripción específicos [70]. Las pr-iPSC presentan algunas características funcionales de iPSC como la formación de colonias morfológicamente similares a ESC, independencia fenotípica de los factores de transcripción exógenos (inductores de la reprogramación), activación de los correspondientes genes endógenos y activación de genes tempranos de pluripotencia. Sin embargo, **no expresan Nanog** [68, 69]. Es decir, estas células permanecen bloqueadas en el paso de activación de Nanog, fundamental para la completa reprogramación a iPSC maduras [88].

Con el fin de caracterizar los clones aislados de MEF infectados con OKS+F+G a nivel transcripcional, realizamos un perfil global de expresión (*microarray*) y lo comparamos con el obtenido de clones aislados de MEF infectados con OKSM que mostraron expresión muy baja o nula de Nanog (OKSM Nanog negativas) (Figura R.13 y apartado M.5.3).

## RESULTADOS

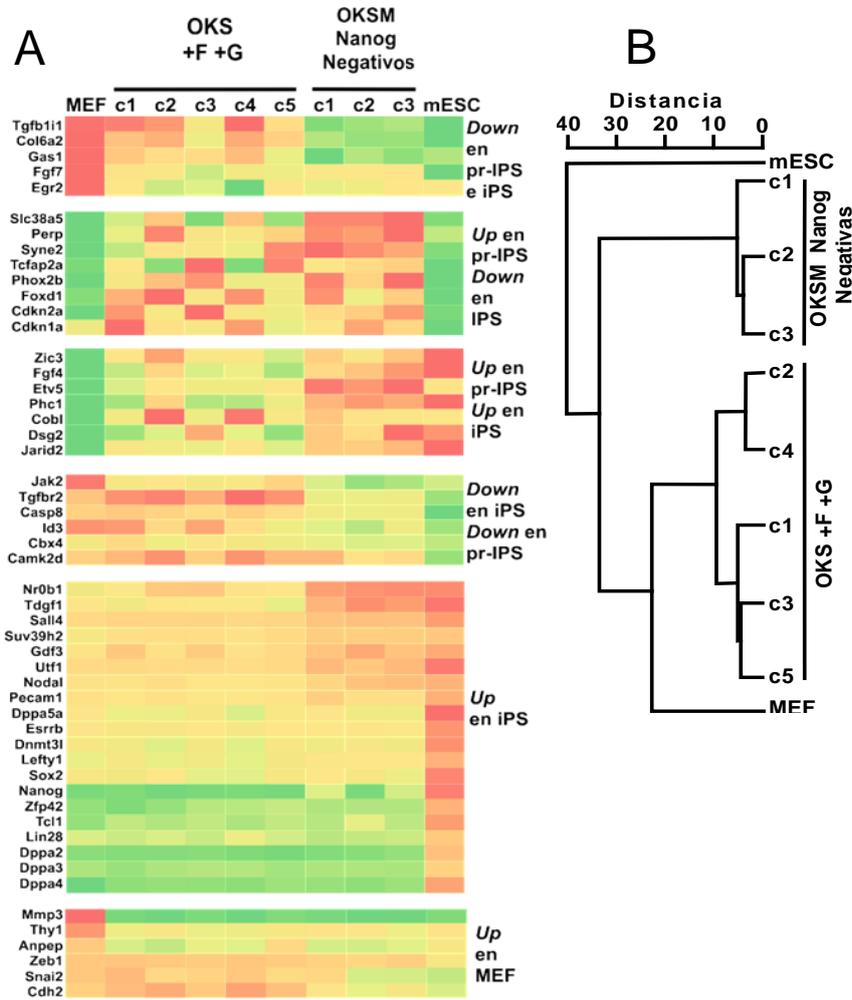


**Figura R.13. Heat map del perfil total de transcripción y dendrograma basado en el promedio de vinculación, mostrando los agrupamientos jerárquicos de los distintos tipos celulares en estudio.**

Basándose en la distancia Euclídea [223] se muestra un dendrograma jerárquico agrupando los distintos tipos celulares (MEF, mESC, 3 clones OKSM Nanog negativos y 5 clones OKS+F+G) por similitud de los niveles de mRNA (19621 sondas). **OKS+F+G**: Oct4, Klf4, Sox2, Foxa2 y Gata4; **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC**: Células madre embrionarias de ratón.

Un análisis de agrupamiento jerárquico, basándonos en la expresión de 19621 sondas expresadas por encima del nivel de fondo (Figura R.13), agrupó los clones procedentes de OKS+F+G, lo que indica que sus patrones de expresión son más similares entre sí que con cualquiera de los otros tipos celulares. La corta distancia en el dendrograma entre los MEF reprogramados (OKS+F+G y OKSM Nanog negativos) y la ramificación entre MEF y mESC sugieren que su expresión global es intermedia entre MEF y mESC. Como podemos observar en la Figura R.13, todos los clones OKS+F+G se agruparon juntos en un mismo *cluster*, claramente separados del *cluster* que formaron los clones OKSM Nanog negativos, sugiriendo que se trata de tipos celulares muy distintos.

Para tener una visión más profunda de la reprogramación y estado de pluripotencia de los clones OKS+F+G, realizamos un nuevo análisis de los datos basado en la expresión de un grupo específico de genes descrito por Mikkelsen et al. [70] (Figura R.14).



**Figura R.14. Heat map del perfil de transcripción de 52 genes específicos y dendrograma basado en el promedio de vinculación, mostrando los agrupamientos jerárquicos de los clones en estudio.**

(A) Heat Map representando los niveles relativos de mRNA seleccionados de MEF, mESC, tres clones de MEF reprogramados con OKSM que no expresan Nanog y cinco clones aislados de MEF reprogramados con OKS, Foxa2 y Gata4 (OKS+F+G). Los genes fueron seleccionados según se describe en un artículo previo [70]. Podemos observar que los clones OKSM Nanog negativos presentan todos los marcadores de pr-iPSC, mientras que los clones OKS+F+G no comparten estos marcadores. (B) Dendrograma basado en la distancia Euclídea [223] y promedio de vinculación, mostrando los agrupamientos jerárquicos o cercanía de los niveles de mRNA expresados (52 sondas) entre los tipos celulares del apartado (A). *Up*: regulación al alza; *Down*: regulación a la baja. **OKS+F+G**: Oct4, Klf4, Sox2, Foxa2 y Gata4; **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC**: Células madre embrionarias de ratón.

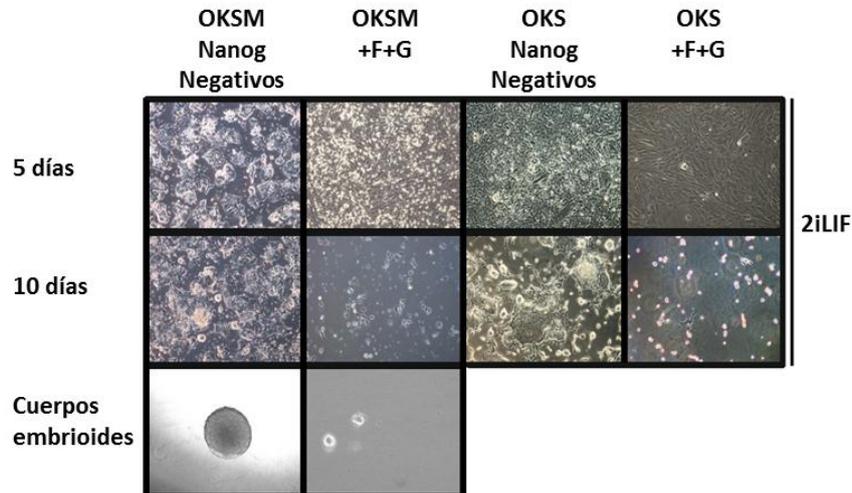
## RESULTADOS

La Figura R.14A indica que los clones OKSM Nanog negativos son en realidad pr-iPSC. Por el contrario los clones reprogramados con OKS+F+G no silenciaban genes estructurales como Col6a2 o mediadores de la inhibición del crecimiento celular como Gas1. La expresión al alza de genes tempranos directamente relacionados con la pluripotencia como Zic3 y Fgf4 estaban ausentes, mientras que la expresión al alza de genes específicos de pluripotencia como Utf1, Gdf3 o Nodal fue muy limitada. En resumen, de acuerdo con este perfil específico de expresión génica los clones OKS+F+G no son células pr-iPSC, aunque expresan algunos marcadores de pluripotencia.

Un nuevo análisis jerárquico basado en este subgrupo de genes (Figura R.14B) re-agrupó las clases de forma substancialmente diferente al análisis de la Figura R13. Los clones OKSM Nanog negativos quedaron más próximos a mESC, mientras que el *cluster* formado por los clones OKS+F+G se aproximaron a los MEF. Esta nueva clasificación confirma que los clones Nanog negativos son células pr-iPSC mientras que los clones OKS+F+G no solo no son pr-iPSC sino que su perfil “pluripotente” está más próximo a MEF.

Para determinar a nivel funcional si unas células son pr-iPSC pueden ser inducidas a reprogramarse a iPSC maduras mediante el cultivo en medio 2i/LIF [102]. Este medio se compone del medio ESC, suplementado con PD0325901 y CHIR99021, inhibidores de las vías de señalización celular MAPK y GSK3, respectivamente [224]. Las células sin ningún grado de pluripotencia o aquellas bloqueadas en un estado de pluripotencia parcial, no sobreviven a este medio condicionado [224]. Para definitivamente determinar si nuestros clones OKS/OKSM+F+G eran células pr-iPSC, los incubamos en medio condicionado 2i/LIF (Figura R.15).

## RESULTADOS



**Figura R.15. MEF reprogramados con OKSM, Gata4 y Foxa2 no crecen en medio 2i/LIF.** Imágenes de clones representativos aislados de MEF reprogramados con los factores de transcripción indicados. Estos clones se cultivaron durante 10 días con medio 2i/LIF. Se observa que las combinaciones OKS/M +F+G no crecen en este medio, mientras que las combinaciones OKS/M forman colonias con morfología clásica de mESC. **OKS:** Oct4, Klf4, Sox2; **M:** c-Myc; **+F+G:** Foxa2 y Gata4.

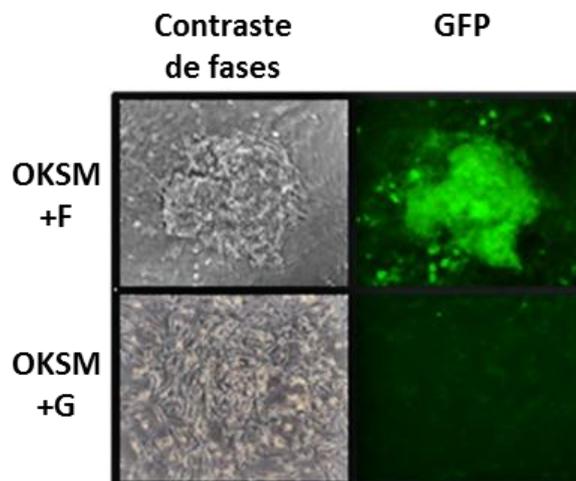
Los clones Nanog negativos, obtenidos de las infecciones con OKS/OKSM, crecieron en presencia de 2i/LIF confirmando su identidad como pr-iPSC. Estos clones dieron lugar a colonias con morfología típica de mESC, niveles de expresión de marcadores de pluripotencialidad tardíos como Lin28, Nanog u Oct4<sub>endo</sub> (Figura R.23) similares a iPSC maduras y formaron cuerpos embrioides al retirar el medio 2i/LIF del medio de cultivo. Estas características son típicas de iPSC y mESC [225]. Sin embargo, los clones infectados con OKS/OKSM+F+G murieron en medio selectivo 2i/LIF y no fueron capaces de formar cuerpos embrioides.

En conclusión, los clones aislados mediante la co-infección de Foxa2 y Gata4 junto con OKS/OKSM no son iPSC parcialmente reprogramadas.

## RESULTADOS

### **R.2.2. Gata4 y no Foxa2 es responsable del bloqueo de la reprogramación a células pluripotentes inducidas**

Para identificar cuál de los dos factores de transcripción, Foxa2 o Gata4, es responsable del bloqueo en la reprogramación inducida por Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc, se infectaron MEF con OKSM junto con Foxa2 y Gata4 de forma independiente. Para monitorizar la expresión de Nanog, se utilizaron MEF extraídos del ratón transgénico homocigótico Tg(Nanog-GFP,Puro) 1Yam-BRC [86] (Ver apartado M.2.3). Las células del ratón Tg(Nanog-GFP,Puro) contienen un cromosoma artificial de bacteria con el gen Nanog de ratón completo en el que se ha insertado un *cassette* GFP-IRES-PuroR en la región 5'. Las células madre aisladas de dicho ratón expresan GFP (Nanog-positivas), mientras que pierden la expresión cuando se diferencian (Nanog-negativas). La experimentación con MEF procedentes de este ratón permite monitorizar fácilmente el proceso de reprogramación analizando la expresión de GFP con un microscopio de fluorescencia (Figura R.16). Las combinaciones retrovirales utilizadas se encuentran en la Tabla TM4.

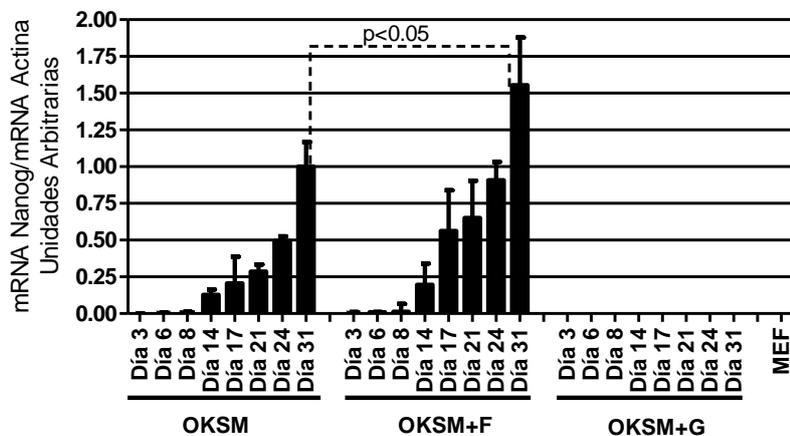


**Figura R.16. Inducción de Nanog-GFP en MEF reprogramados con OKSM+F.** MEF transgénicos Tg(Nanog-GFP,Puro) fueron infectados con OKSM+F u OKSM+G. Se muestran imágenes de contraste de fases y fluorescencia de las células reprogramadas a día 28. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+F:** Foxa2; **+G:** Gata4.

## RESULTADOS

Los MEF (Nanog-GFP) infectados con OKSM+F formaron agregados celulares que crecían en colonias morfológicamente idénticas a las iPSC y que expresaban GFP (Figura R.16). Por el contrario, la infección con OKSM+G dio lugar a agregados celulares que formaban colonias con bordes poco definidos, no tenían morfología de iPSC y no expresaban GFP (Figura R.16). Las células dentro de estas agrupaciones celulares mantenían una naturaleza fibroblástica, aunque no senescente como los fibroblastos que rodeaban la colonia. Nuestros intentos de aislar estas colonias fue infructuoso (n=20), ya sea porque nunca alcanzaban el tamaño crítico para su aislamiento o por su falta de crecimiento una vez aisladas. Estos resultados indican que Gata4 y no Foxa2 es responsable del bloqueo en la reprogramación.

Para determinar si la expresión de Gata4 es paralela a la ausencia de Nanog evaluamos la expresión de Nanog durante el proceso de reprogramación en MEF infectados con OKSM, OKSM+F y OKSM+G (Figura R.17).

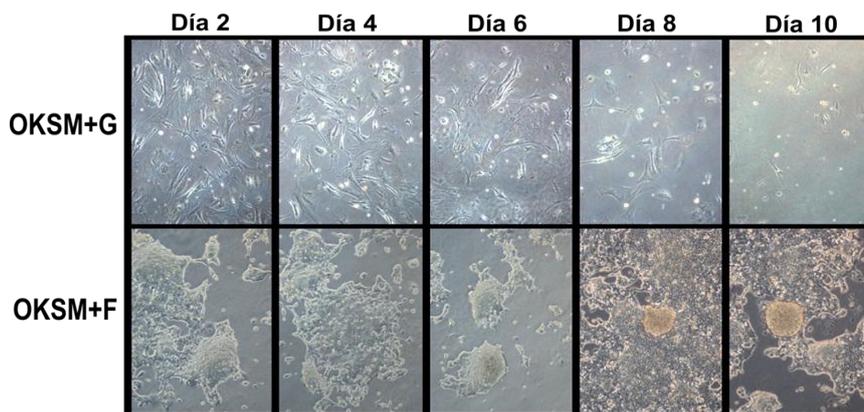


**Figura R.17. Gata4 y no Foxa2 es el responsable del bloqueo de Nanog en la reprogramación a iPSC.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión del marcador de pluripotencia Nanog. MEF fueron infectados con los factores de transcripción indicados en el eje de ordenadas. Cuarenta y ocho horas después de la infección, los MEF fueron pasados a 8 placas de 3.5 cm. El RNA fue extraído a los días indicados en la figura. Los niveles de expresión están relativizados con respecto al nivel determinado a los 31 días de reprogramación con OKSM. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+F:** Foxa2; **+G:** Gata4.

## RESULTADOS

Como se observa en la Figura R.17, la infección con OKSM+G no activó Nanog durante las cuatro semanas de la reprogramación. En la infección con OKSM+F los niveles de Nanog fueron significativamente mayores que con OKSM.

La adición de medio 2i/LIF en la infección con OKSM+F, favoreció el crecimiento de múltiples colonias, con morfología de iPSC (Figura R.18). Sin embargo, las células infectadas con la combinación OKSM+G se volvieron senescentes y finalmente murieron en este medio condicionado. La muerte celular en medio 2i/LIF se ha descrito en experimentos de reprogramación con células deficientes en Nanog [224].



**Figura R.18. Las células infectadas con OKSM+G no sobreviven en medio 2i/LIF.** En la fila superior se muestran imágenes en contraste de fases MEF infectados con OKSM+G. Tras cuatro semanas se sustituyó el medio ESC por medio 2i/LIF y se tomaron fotografías a los días indicados en la figura. En la fila inferior se observan las células infectadas con OKSM+F en las mismas condiciones. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+F:** Foxa2; **+G:** Gata4.

En resumen, el análisis morfológico, activación de Nanog y crecimiento en medio 2i/LIF apuntan a Gata4 como responsable de la acción inhibitoria en la reprogramación a iPSC inducida por FoxA2 y Gata4.

### **R.2.3. Análisis de la función de Gata4 en los procesos clave de la reprogramación a iPSC**

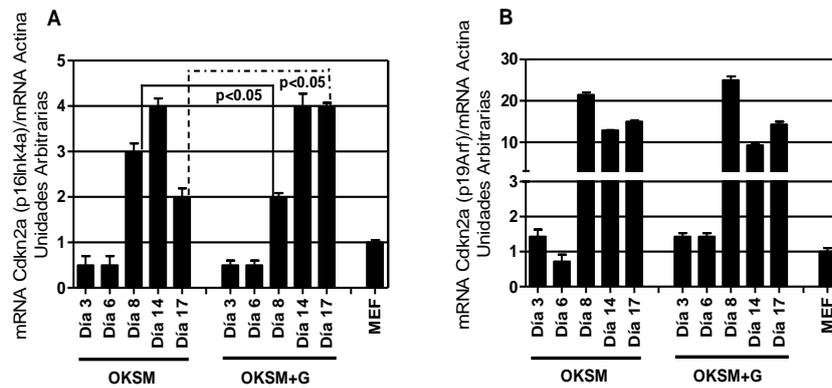
La reprogramación de MEF a iPSC es un proceso muy ineficiente cuya iniciación depende en gran medida de limitar la **senescencia celular** [36, 97, 98] y favorecer la **proliferación celular** [68]. Cronológicamente, los MEF en reprogramación a iPSC pasan por tres estadios distintos: iniciación, maduración y estabilización (ver introducción) [48, 69, 70, 226]. En la fase de iniciación los MEF sufren una transición de célula mesenquimal a epitelial, proceso conocido como **MET** (*mesenchymal-to-epithelial transition*). A continuación, durante la transición a la fase de maduración, los MEF pasan por estados intermedios donde comienzan a expresar algunos marcadores de pluripotencia. En la fase de maduración tiene lugar el **silenciamiento de los factores de transcripción exógenos (OKSM)** y la **activación robusta de los genes endógenos** clave para la adquisición y mantenimiento de la pluripotencia como Nanog, Oct4 o Lin28 [226]. La alteración de cualquiera de estos procesos puede dar lugar al bloqueo de la reprogramación. Con el fin de identificar el mecanismo ejercido por Gata4 para bloquear la reprogramación a iPSC, decidimos estudiar su función en cada uno de los pasos cruciales del proceso.

#### **R.2.3.1. Gata4 no influye en la senescencia ni en la proliferación celular.**

La primera barrera que hay que superar en la reprogramación de MEF a iPSC es la **senescencia celular** [227]. Estudios recientes subrayan que la eficiencia de la reprogramación mejora considerablemente minimizando la senescencia celular al silenciar p53 [36, 97, 98] o el gen Cdkn2a, que codifica para las proteínas p16Ink4a y p19Arf [74]. Para determinar si Gata4 bloquea la reprogramación al estimular la senescencia celular,

## RESULTADOS

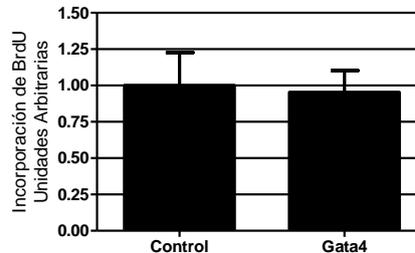
monitorizamos la expresión de los mRNA de p16Ink4a y p19Arf [228] durante la reprogramación con OKSM+G. (Figura R.19).



**Figura R.19. La senescencia de los MEF en reprogramación no está aumentada por la expresión de Gata4.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de mRNA de los marcadores de senescencia celular Cdkn2a (p16Ink4a y p19Arf). MEF fueron infectados con OKSM en presencia o ausencia de Gata4. Cuarenta y ocho horas después de la infección, las células fueron pasadas a placas de 3.5 cm. Las células se congelaron a los días especificados en las gráficas para su extracción de RNA. Los niveles de mRNA fueron normalizados con los obtenidos de MEF del mismo pase infectados con virus vacío (pase 2), **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G**: Gata4; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón.

Entre los días 6 y 8 se induce intensamente la expresión de los mediadores de senescencia p16Ink4a y p19Arf independientemente de la presencia de Gata4 (Figura R.19), lo cual sugiere que Gata4 no favorece la senescencia en las fases iniciales de la reprogramación. Sin embargo, a partir del día 17, cuando la reprogramación está en su última

fase o fase de estabilización, tiene lugar una disminución de los niveles de p16Ink4a en los MEF reprogramados con OKSM a diferencia de aquellos reprogramados con OKSM+G en los que permanecen elevados.



**Figura R.20. Gata4 no disminuye la proliferación de los MEF.** MEF infectados con Gata4 fueron incubados con BrdU durante 24 horas. La incorporación de BrdU se analizó mediante luminómetro. Los datos fueron normalizados con la tasa de proliferación de las células infectadas con el retrovirus vacío.

Otro proceso celular clave en la reprogramación es la proliferación celular. Una disminución de la proliferación celular puede dar lugar a menores eficiencias de reprogramación e incluso a una reprogramación incompleta [229]. Para comprobar si Gata4 induce un arresto del ciclo celular se realizó un ensayo de incorporación de BrdU (bromodeoxiuridina), en MEF infectados con Gata4 (Figura R.20). Los resultados excluyen un posible bloqueo de la transición G1-S inducida por Gata4. En resumen, Gata4 no favorece la senescencia ni impide la normal proliferación de los MEF.

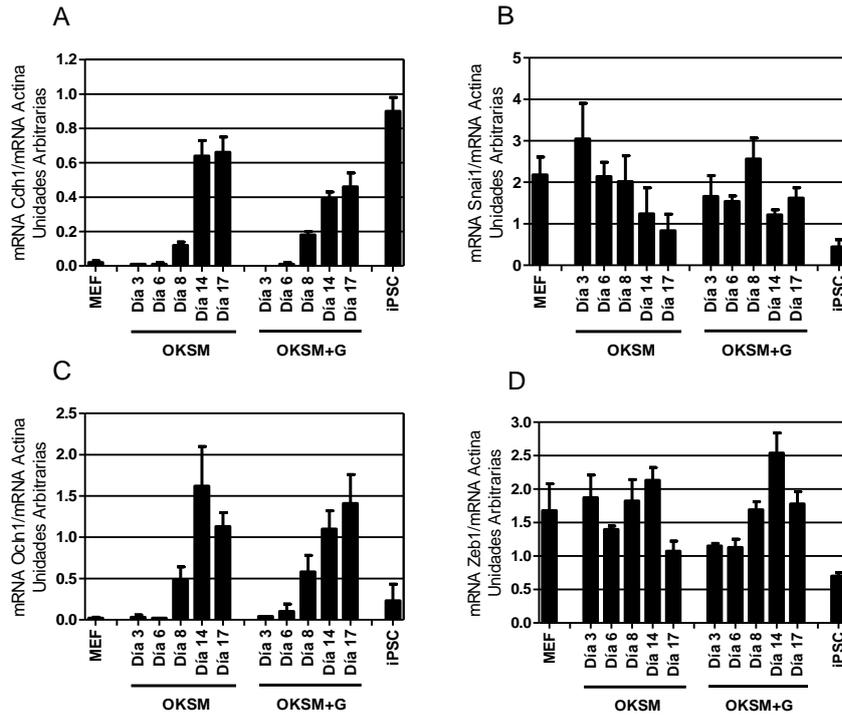
#### **R.2.3.2. Gata4 no bloquea la MET de los fibroblastos embrionarios durante la reprogramación**

La transición mesénquimo-epitelial (MET) es un proceso biológico reversible que implica la transición de células mesenquimales, (células móviles, con morfología alargada, sin contactos célula-célula ni polaridad) a células epiteliales (células estacionarias, unidas a otras células circundantes mediante estrechas uniones intercelulares, con polaridad apical-basal). La transición MET es un proceso crucial en la reprogramación a iPSC y tiene lugar en los primeros estadios del proceso [46, 71]. Aproximadamente 5 días después de la infección con OKSM, los MEF comienzan a expresar genes asociados a células epiteliales como la E-cadherina (Cdh1) y Ocludina (Ocln1) [217-219] (Figura R.21), mientras regulan a la baja marcadores mesenquimales como Snai1 y Zeb1.

Para analizar si la sobreexpresión de Gata4 es capaz de bloquear MET impidiendo la reprogramación, se analizaron, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, los niveles de transcripción de Cdh1, Ocln1, Snai1 y Zeb1 (Figura R.21). La inducción de Cdh1 y Ocln1 indica que la MET se inicia normalmente en presencia de Gata4. Sin embargo, Snai1 no se reprimió en igual intensidad cuando Gata4 estaba presente. La inducción de marcadores epiteliales en paralelo con la no represión de marcadores mesenquimales, confirman el mantenimiento de la morfología fibroblástica de las colonias detectadas en las infecciones con OKS/M+G, tal y como hemos descrito anteriormente. En cualquier caso, podemos

## RESULTADOS

concluir que Gata4 no bloquea específicamente la reprogramación al inhibir la MET.



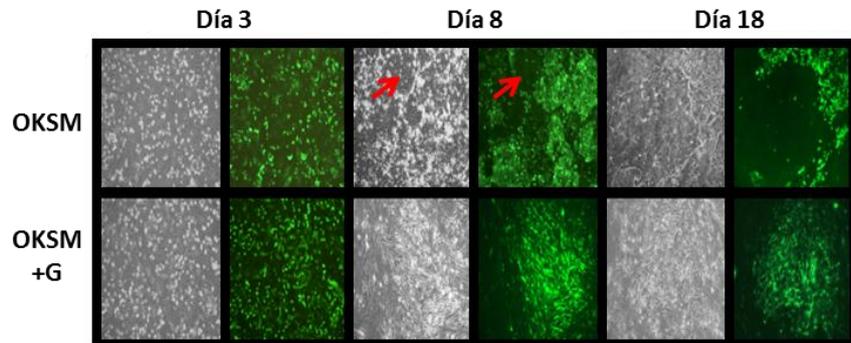
**Figura R.21. La transición mesénquimo-epitelial transcurre normalmente en presencia de Gata4.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los marcadores epiteliales E-Cadherina (Cdh1) y Ocludina (Oc1n1), y los marcadores mesenquimales Snai1 y Zeb1. MEF fueron infectados con OKSM en presencia o ausencia de Gata4. Cuarenta y ocho horas después de la infección las células fueron pasadas a 5 placas de 3.5 cm. Las células se congelaron los días especificados en las gráficas para su posterior extracción de RNA. Los niveles de mRNA fueron normalizados respecto a un pool de mRNA de embrión de ratón. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc; **+G:** Gata4; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **iPSC:** Células pluripotentes inducidas.

**R.2.3.3. Gata4 no silencia los factores de transcripción exógenos ni activa los principales factores de transcripción endógenos relacionados con la pluripotencia**

Los vectores retrovirales son transcripcionalmente silenciados en células madre embrionarias [230]. Este hecho ha sido aplicado para la monitorización de la adquisición de características propias de células madre en la reprogramación de células somáticas a iPSC [67, 231, 232]. El silenciamiento retroviral comienza muy temprano en el proceso de reprogramación a iPSC. Los primeros indicios de silenciamiento los podemos observar a día 4-5 de reprogramación [48, 69] y refleja la activación de reguladores epigenéticos y ciertos genes relacionados con la pluripotencia [69]. Para monitorizar fácilmente el silenciamiento retroviral incluimos un retrovirus que expresa GFP en las diferentes combinaciones retrovirales, ya que está demostrado que el silenciamiento retroviral no es específico de los transgenes reprogramadores sino que afecta a todos los retrovirus [231].

Ocho días después de la infección, se observa el silenciamiento de GFP en algunas agrupaciones celulares de la placa OKSM+GFP (Figura R.22, flecha rojas). Las células que silencian la expresión de GFP presentan una morfología epitelial, distinta a aquellas que seguían expresando GFP dentro de la misma placa. A día 18 post-infección las MEF infectadas con OKSM+GFP habían formado colonias con morfología típica de iPSC con un silenciamiento total de GFP. Por el contrario en la infección OKSM+G+GFP nunca se observó la formación de verdaderas colonias claramente diferenciada y nunca silenciaron la expresión de GFP (Figura R.22).

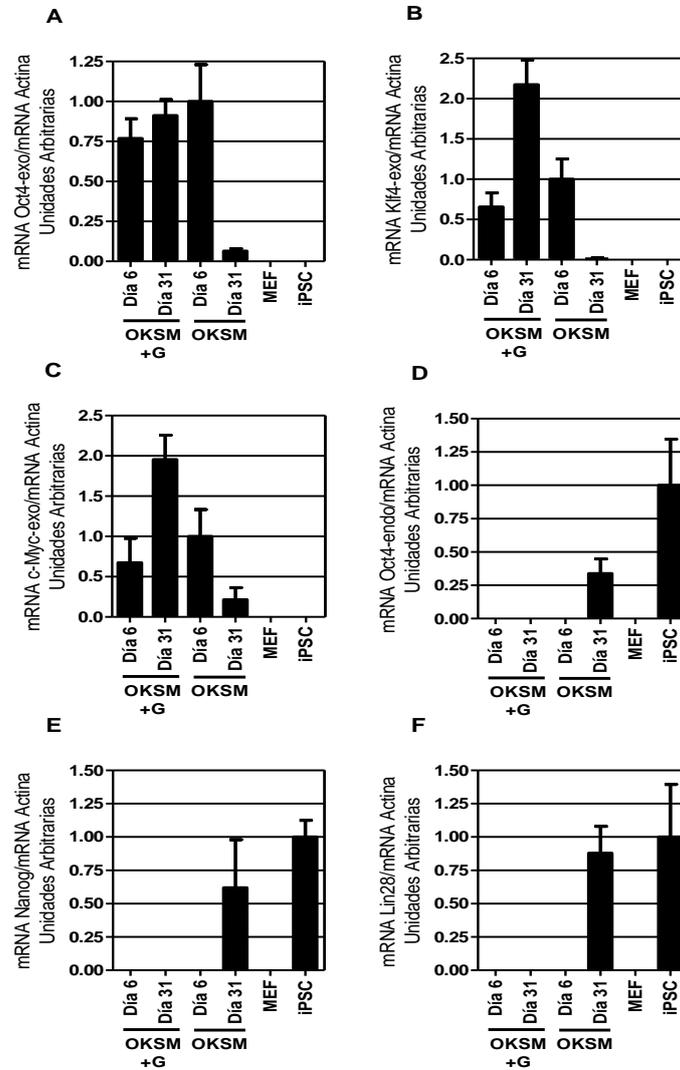
## RESULTADOS



**Figura R.22. Gata4 impide el silenciamiento de GFP durante la reprogramación inducida por OKSM.** MEF fueron infectados con OKSM en presencia o ausencia de Gata4 y un retrovirus que expresa GFP para monitorizar el silenciamiento retroviral. Las imágenes de contraste de fases y fluorescencia muestran la expresión de GFP a días 3, 8 y 18 de la reprogramación. **OKSM**, Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G**, Gata4.

Para ampliar este estudio de silenciamiento retroviral, monitorizamos la expresión exógena de los factores Oct4, Klf4 y c-Myc a los 6 y 31 días después de la infección (Figura R.23A-C). La cuantificación de los niveles de mRNA mostró que en la infección con OKSM, los transgenes Oct4, Klf4 y c-Myc se expresan a día 6 mientras que están silenciados a día 31. En la infección con OKSM+G, los transgenes Oct4, Klf4 y c-Myc mantienen una elevada expresión tanto a día 6 como a día 31 post infección. Por tanto estas células no silencian los retrovirus exógenos.

## RESULTADOS



**Figura R.23. Gata4 no silencia Oct4, Klf4 ni c-Myc expresados a la vez que no activa la expresión endógena de Oct4, Nanog ni Lin28.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los factores de transcripción exógenos en MEF reprogramados con OKSM en presencia o ausencia de Gata4 (A-C). Los niveles de mRNA de los MEF infectados con OKSM fueron normalizados respecto a los niveles a día 6. (D-F) Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real, de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia Oct4<sub>endo</sub>, Nanog y Lin28 en MEF reprogramados con OKSM en presencia o ausencia de Gata4. Los niveles de mRNA de los MEF infectados con OKSM fueron normalizados respecto a los niveles de iPSC. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G:** Gata4; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **iPSC:** Células pluripotentes inducidas.

## RESULTADOS

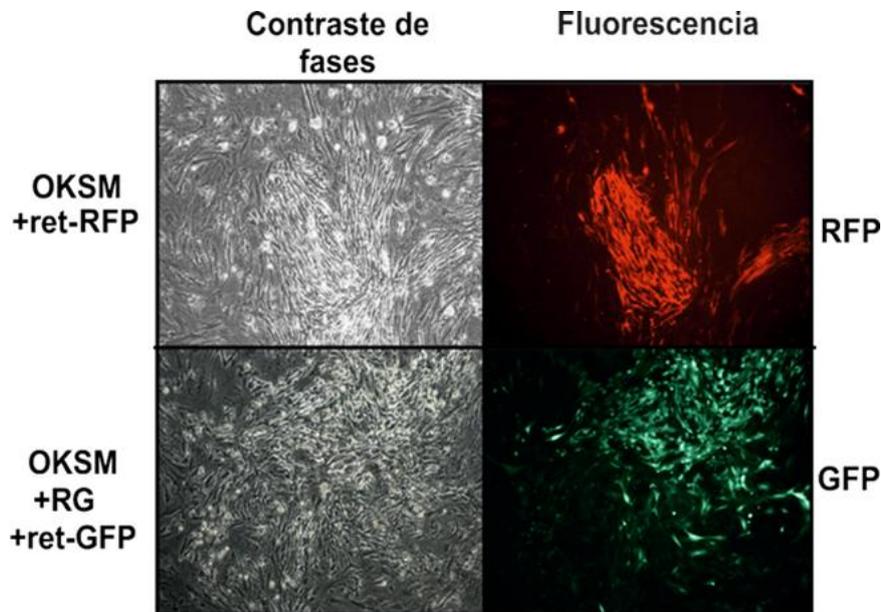
A continuación evaluamos la inducción de genes clave para garantizar una completa reprogramación, Oct4<sub>endo</sub>, Nanog y Lin28, puesto que deben mantener el nuevo fenotipo de las células reprogramadas después del silenciamiento retroviral. A día 31 post-infección observamos una clara inducción de dichos genes en las infecciones con OKSM, mientras que no pudimos detectar su expresión a día 31 post-infección, cuando Gata4 se expresó con OKSM.

En resumen, Gata4 no interfiere en ninguno de los procesos claves del inicio de la reprogramación, esto es, senescencia, proliferación o la transición mesénquima epitelio. Sin embargo, inhibe el silenciamiento retroviral y la inducción de los marcadores de pluripotencia clave que tiene lugar en la fase de maduración.

### **R.2.4. Gata4 actúa en la fase de maduración de la reprogramación a iPSC**

Los experimentos anteriores sugieren que Gata4 no bloquea la reprogramación a iPSC interfiriendo en los procesos iniciales, sino durante la fase de maduración. Para confirmar definitivamente esta hipótesis, introdujimos Gata4 en la fase de maduración de la reprogramación (día 8). Si nuestra hipótesis es correcta, Gata4 debería bloquear la reprogramación de forma similar a cuando se introduce desde el inicio.

En primer lugar verificamos que los MEF en reprogramación eran susceptibles de infectarse con retrovirus y expresar los transgenes. Para ello infectamos MEF con OKSM, y a día 8 de reprogramación se infectaron con retrovirus que expresaban la proteínas fluorescentes. Tres días después de la infección con las proteínas fluorescentes (a día 11 de reprogramación) detectamos células fluorescentes en ambas infecciones (Figura R.24).

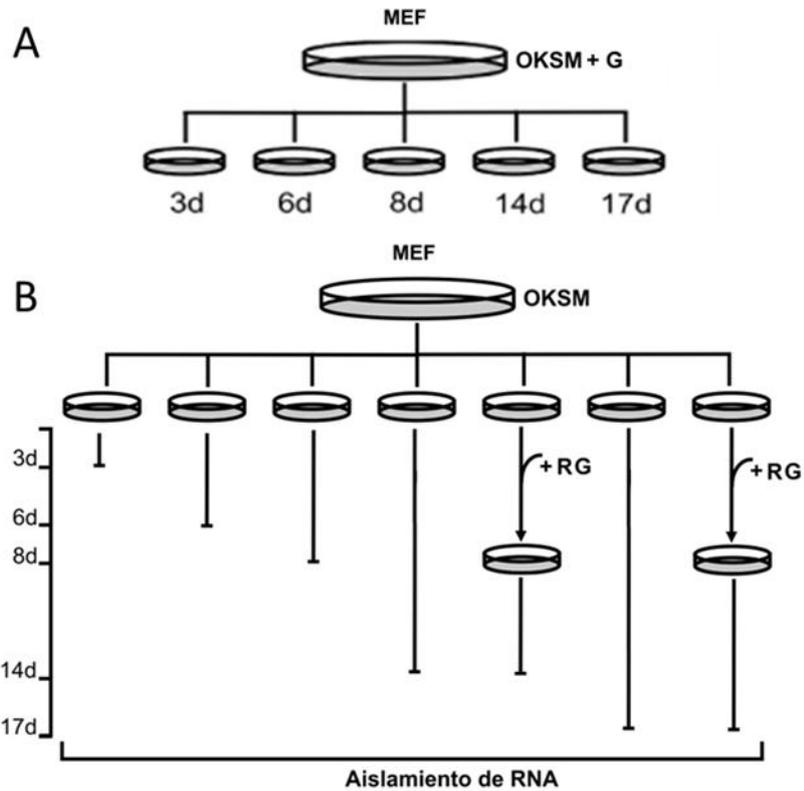


**Figura R.24. Los MEF en reprogramación son susceptibles de ser infectados a los 8 días.** MEF fueron infectados inicialmente con los factores de transcripción OKSM. Cuarenta y ocho horas después se tripsinizaron y se sembraron en 2 placas de 10 cm. A día 8 de la reprogramación se re infectó una placa con Gata4+GFP (OKSM+RG+ret-GFP) y la segunda placa con RFP como control (OKSM+ret-RFP). La expresión de RFP y GFP 72 horas después, confirman la susceptibilidad a la infección de los MEF en reprogramación. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+RG:** Re infección con Gata4 a los 8 días, **+ret-RFP:** Retrovirus que codifica para la proteína fluorescente roja; **+ret-GFP:** Retrovirus que codifica para la proteína fluorescente verde.

Además, pudimos observar que el retrovirus vacío no afecta a la reprogramación, ya que, las células OKSM, re infectadas con RFP, formaban colonias de células compactas tipo iPSC. La re infección con Gata4 y GFP da lugar de nuevo a colonias poco definidas con células de morfología fibroblástica, lo que sugiere que Gata4 actúa durante la fase de maduración de la reprogramación.

A continuación quisimos profundizar en los cambios moleculares inducidos por Gata4 cuando se expresaba a día 8 (OKSM+RG) comparado con su expresión desde el inicio de la reprogramación (OKSM+G). En la Figura R.25 se esquematiza el protocolo de infección seguido para realizar estos estudios.

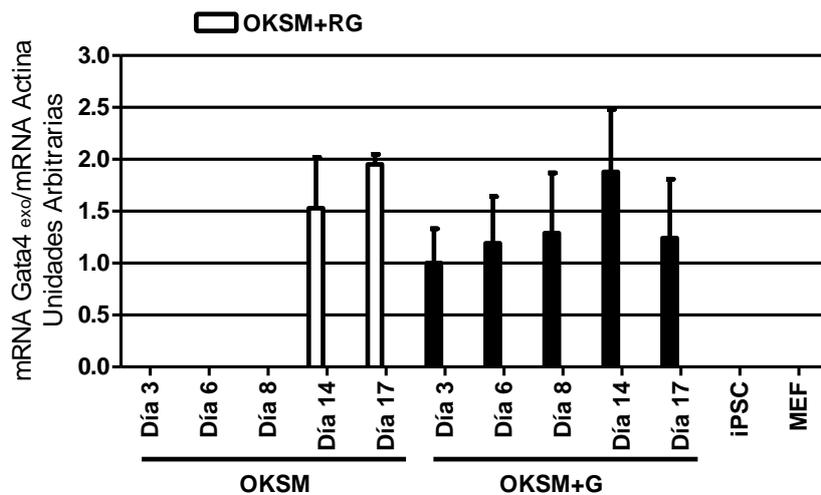
## RESULTADOS



**Figura R.25 Esquema del experimento de re-infección con Gata4** (A) MEF fueron infectados con OKSM en presencia de Gata4. Cuarenta y ocho horas después de la infección los MEF fueron pasados a 5 placas de 6 cm. El RNA fue extraído a los días indicados en la figura (OKSM+G). (B) MEF fueron infectados inicialmente con OKSM. Cuarenta y ocho horas después de la infección los MEF fueron pasados a 7 de placas de 6 cm (OKSM). A día 8 de la reprogramación se re infectó un grupo de placas con Gata4 (OKSM+ RG). El RNA fue extraído a los días indicados en la figura. **OKSM+G:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc y Gata4; **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+RG:** Reinfeción con Gata4 a los 8 días de la infección con OKSM; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón.

## RESULTADOS

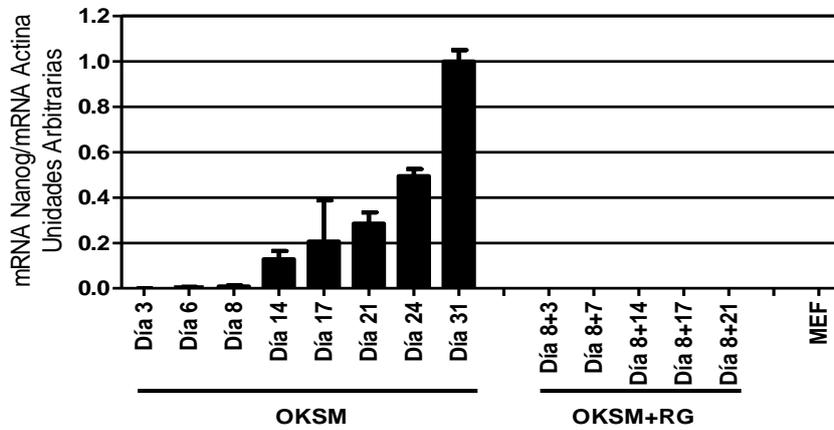
Previamente al análisis completo de reprogramación en los MEF infectados con OKSM+RG, confirmamos la expresión de Gata4 desde el vector retroviral mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando *primers* específicos de Gata4 exógeno ( $Gata4_{exo}$ ; Figura R.26).



**Figura R.26. Los niveles de expresión de Gata4 expresado ( $Gata4_{exo}$ ) son similares en la infección OKSM+G y OKSM+RG.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real, de los niveles de expresión de  $Gata4_{exo}$  en las infecciones OKSM, OKSM+G y OKSM+RG. MEF fueron infectados siguiendo el esquema de la Figura R.25. **OKSM+G:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc y Gata4; **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+RG:** Reinfeción con Gata4 a los 8 días de la infección con OKSM; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón, **iPSC:** Células pluripotentes inducidas

Durante la reprogramación con OKSM, los niveles de mRNA de Nanog fueron detectables a partir de los 6-8 días de infección y sus niveles de expresión fueron aumentando progresivamente (Figura R.27). Sin embargo, solo tres días después de la reinfeción con Gata4 (OKSM+RG/8+3) no se detecta Nanog en las células. En resumen, la cinética de expresión de Nanog confirmó que Gata4 es capaz de bloquear la expresión de Nanog cuando se introduce a los 8 días de la reprogramación. Estos resultados confirman que Gata4 no actúa antes de la fase de maduración.

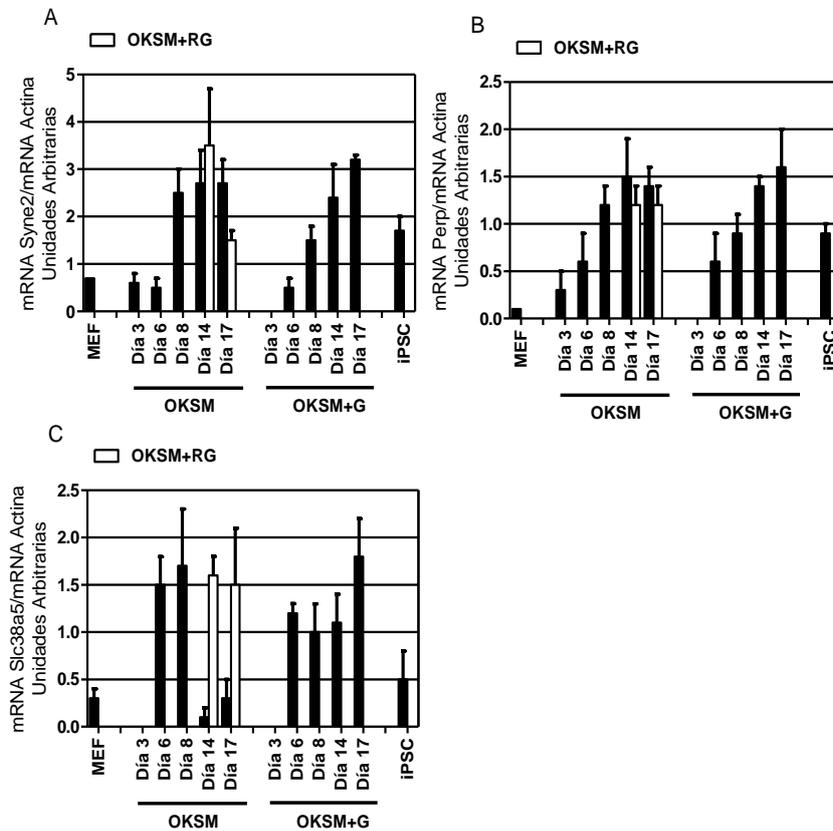
## RESULTADOS



**Figura R.27. Gata4 es capaz de inhibir la inducción de Nanog cuando se expresa en la fase de maduración.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión del marcador de pluripotencia Nanog. MEF fueron infectados siguiendo el esquema de la Figura R.25. La gráfica muestra la cinética de los niveles de expresión de Nanog, relativizados con el nivel de expresión de Nanog a los 31 días de la reprogramación a iPSC. **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc, **+RG**: Reinfeción con Gata4 a los 8 días de la infección con OKSM; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón.

Para comparar los mecanismos de acción de Gata4 cuando se introducía en la fase inicial o en la fase de maduración, monitorizamos la expresión de genes de activación temprana como *Syne2*, *Perp* o *Slc38a5* [70] (Figura R.28). Los niveles de expresión de estos genes se inducen en la fase de iniciación, pero mientras *Syne2* y *Perp* continúan elevados en la fase de maduración y estabilización, *Slc38a5* se reprime a partir del día 11 de la reprogramación [46].

## RESULTADOS

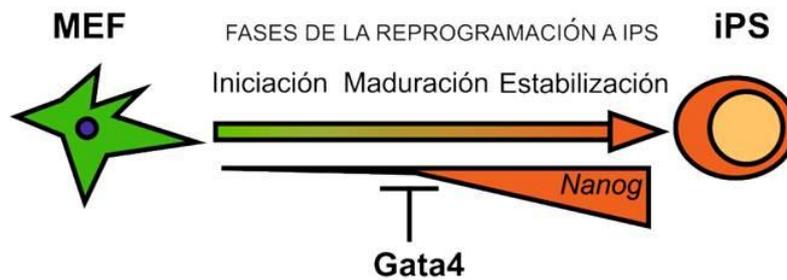


**Figura R.28. Cinética de expresión de marcadores de reprogramación a iPSC.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de Syne2, Perp y Slc38a5. MEF fueron infectados siguiendo el esquema de la Figura R.25. **OKSM+G:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc y Gata4; **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+RG:** Reinfección con Gata4 a los 8 días de la infección con OKSM; **MEF:** Fibroblastos embrionarios de ratón; **iPSC:** Células pluripotentes inducidas.

La inducción de Syne2, Perp y Slc38a5 entre los días 3 y 6 de la reprogramación es comparable entre las células procedentes de las infecciones OKSM y OKSM+G (Figura R.28). Sin embargo la expresión de Gata4 en la fase inicial o en la fase de maduración, impide la regulación a la baja de Slc38a5 (Figura R.28C). Esto es, se obtiene el mismo perfil de expresión de Syne2, Perp y Slc38a5 independientemente del momento de expresión de Gata4, lo que sugiere que Gata4 actúa en el inicio de la fase de maduración (Figura R.29).

## RESULTADOS

En conclusión, Gata4 actúa durante la fase de maduración bloqueando un paso esencial para concluir el proceso de reprogramación, la inducción robusta de Nanog (Figura R.29).

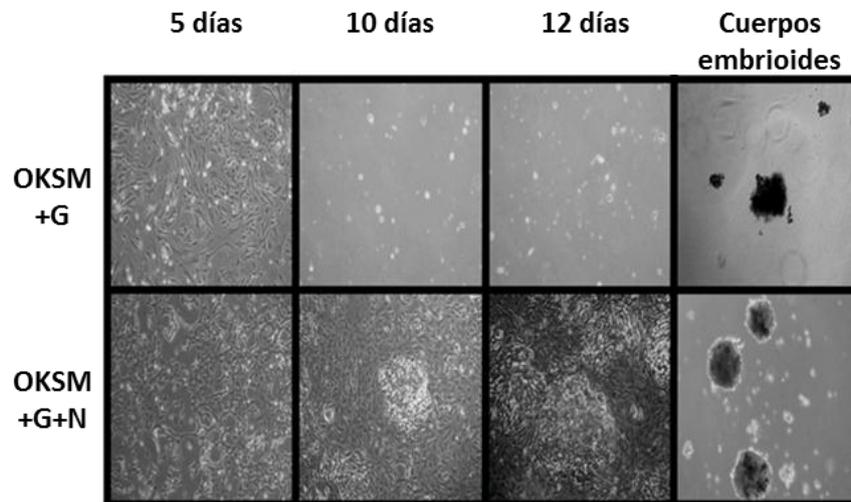


**Figura R.29. Modelo de inhibición de la reprogramación a iPSC mediante Gata4.**

### **R.2.5. La expresión de Nanog rescata el bloqueo inducido por Gata4**

La activación transcripcional de Nanog en la fase de maduración es fundamental para alcanzar un estado de pluripotencia estable y completar la reprogramación a iPSC [88, 89]. Puesto que Gata4 interfiere con la fase de maduración, nos planteamos si Nanog podría ser la diana de Gata4. En otras palabras, si Gata4 ya sea de forma directa o indirecta, estuviera reprimiendo la expresión de Nanog y ello condujera al bloqueo en la reprogramación. Para responder a esta pregunta diseñamos un experimento de rescate mediante la sobreexpresión retroviral de Nanog.

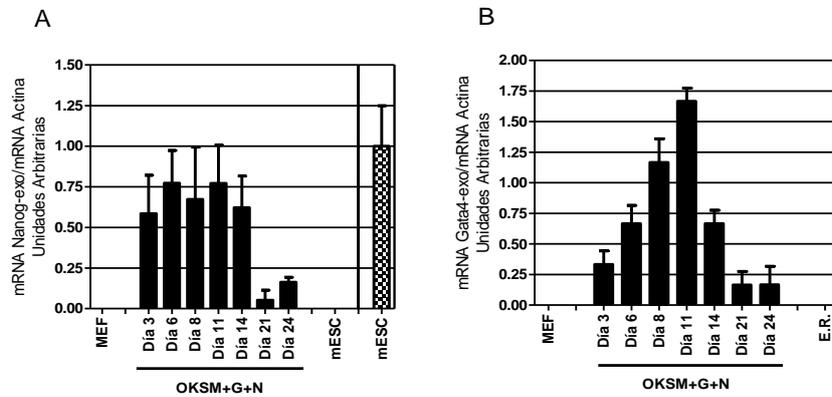
Infectamos MEF con OKSM+G incluyendo un retrovirus que expresa Nanog (OKSM+G+N). Para acelerar el proceso reprogramación transferimos las células infectadas al medio condicionado 2i/LIF durante los últimos 12 días de reprogramación [102]. Las células OKSM+G murieron en el medio 2i/LIF mientras que las células OKSM+G+N, crecieron y formaron colonias que presentaban la morfología típica de colonias de iPSC (Figura R.30). Estas colonias se diferenciaron espontáneamente a cuerpos embrioides cuando se les retiro LIF del medio de cultivo (Figura R.30, columna derecha).



**Figura R.30. La expresión ectópica de Nanog rescata el crecimiento en medio 2i/LIF y la formación de cuerpos embrioides de MEF infectados con OKSM+G.** MEF fueron infectados con OKSM+G y OKSM+G+N. Se muestran imágenes en contraste de fase a los 5,10 y 12 días de cultivo en medio 2i/LIF. En la columna de la derecha se muestra el resultado de cambiar las células a medio sin LIF en placas sin gelatinizar, para facilitar la formación de cuerpos embrioides. **OKSM:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G:** Gata4, **+N:** Nanog.

Cuando analizamos la expresión de Gata4<sub>exo</sub> y Nanog<sub>exo</sub> en las células infectadas con OKSM+G+N, constatamos el silenciamiento propio de verdaderas iPSC a partir del día 14 de reprogramación (Figura R.31). Merece la pena destacar que los niveles mRNA de Nanog<sub>exo</sub> fueron comparables a los niveles endógenos de Nanog en mESC (figura R.31A).

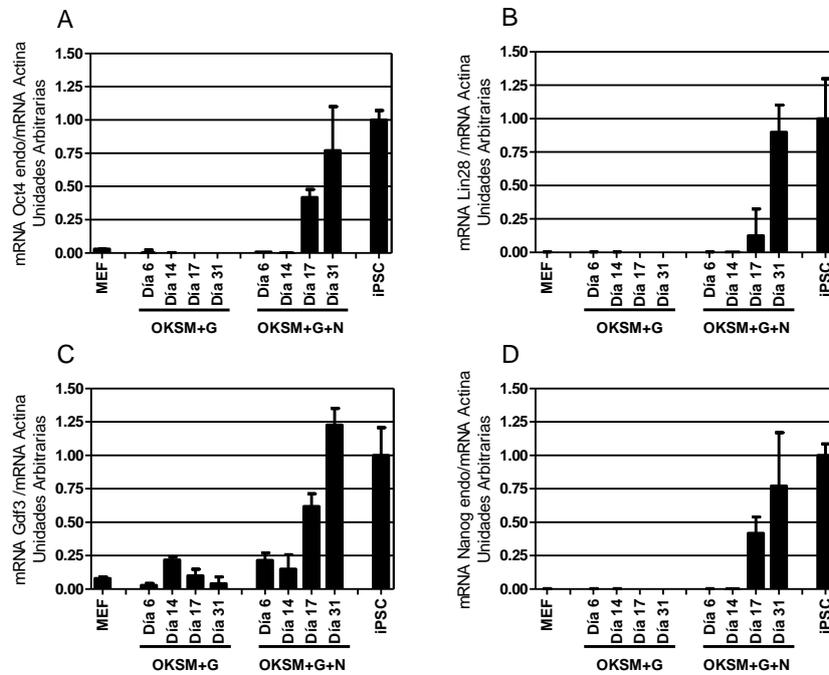
## RESULTADOS



**Figura R.31. Silenciamiento de Nanog y Gata4 exógeno en MEF infectados con OKSM+G+N.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de Nanog<sub>exo</sub> y Gata4<sub>exo</sub>. MEF fueron infectados con OKSM+G+N. Cuarenta y ocho horas después de la infección los MEF infectados fueron pasados a placas de 6 cm y el RNA extraído a los días indicados en la figura. La gráfica muestra la cinética de expresión de Nanog y Gata4 exógenos (A y B). En la figura A (columna a la derecha) se muestran los niveles de Nanog endógeno de mESC. **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G**: Gata4, **+N**: Nanog, **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **mESC**: Células madre embrionarias de ratón, **E.R.**: Embrión de ratón.

En las células rescatadas con Nanog se indujo la transcripción de genes de pluripotencia como el propio *Nanog*<sub>endo</sub>, *Oct4*<sub>endo</sub>, *Lin28* y *Gdf3* a partir de la segunda semana de reprogramación, alcanzando niveles comparables a los de iPSC (Figura R.32). Es interesante destacar que mientras la expresión de *Gdf3* se incrementa gradualmente durante el proceso de reprogramación con OKSM+G+N (Figura R.32C) u OKSM [46, 70, 233, 234], sus niveles se reprimen a partir del día 14 (fase de maduración) en la infección con OKSM+G. De nuevo apuntando a la fase de maduración como el proceso diana de interferencia de Gata4.

## RESULTADOS



**Figura R.32. La sobreexpresión de Nanog rescata la inducción de genes de pluripotencia endógenos.** Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de Oct4<sub>endo</sub>, Lin28, Gdf3 y Nanog<sub>endo</sub>, durante la reprogramación. MEF fueron infectados con OKSM+G y OKSM+G+N. Cuarenta y ocho horas después de la infección, los MEF infectados fueron pasados a placas de 6 cm y el RNA extraído a los días indicados en la figura. **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **+G**: Gata4; **+N**: Nanog; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón; **iPSC**: Células pluripotentes inducidas.

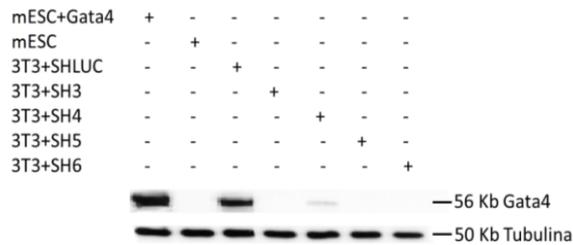
En resumen, Gata4 parece bloquear directa o indirectamente la expresión de Nanog durante la reprogramación de MEF a iPSC. Este bloqueo conduce a células atrapadas en un estadio inmaduro del que son incapaces de progresar hacia formas de iPSC maduras.

## RESULTADOS

### R.2.6. El silenciamiento de Gata4 acelera el proceso de reprogramación

La expresión de Gata4 actúa como inhibidor de la reprogramación a iPSC impidiendo la inducción de Nanog en la fase de maduración. Puesto que en el transcurso de la reprogramación se detecta una expresión transitoria de Gata4 [46], el silenciamiento de Gata4 debería aumentar la eficiencia de la reprogramación al facilitar la inducción

de Nanog. Para bloquear la expresión de Gata4 utilizamos lentivirus que expresan un shRNA contra Gata4 (ver M.3.2.2). La capacidad de silenciar Gata4 de estos lentivirus fue validada en células 3T3 (fibroblastos inmortalizados de ratón), que expresan Gata4 [235] (Figura R.33). Una vez validada la función de los shRNA, infectamos MEF con las combinaciones virales descritas en la Tabla R.1.



**Figura R.33. Silenciamiento de Gata4 mediante los distintos shRNA anti-Gata4.** Células 3T3 fueron infectadas con lentivirus que expresan distintos shRNA anti-Gata4 (SH3-SH6). A las 48 horas de infección se obtuvo un extracto proteico y se analizó por Western blot usando un anticuerpo anti-Gata4. Se utilizaron extractos proteicos de mESC como control negativo y mESC transfectadas con pPYCAG-HA-Gata4 (mESC+Gata4) como control positivo. Se incluye tubulina como control de carga. **3T3:** Línea inmortalizada de fibroblastos de ratón; **SHLUC:** Lentivirus que expresa un shRNA anti-luciferasa; **SH3, SH4, SH5, SH6:** Lentivirus que expresan distintos shRNA anti-Gata4.

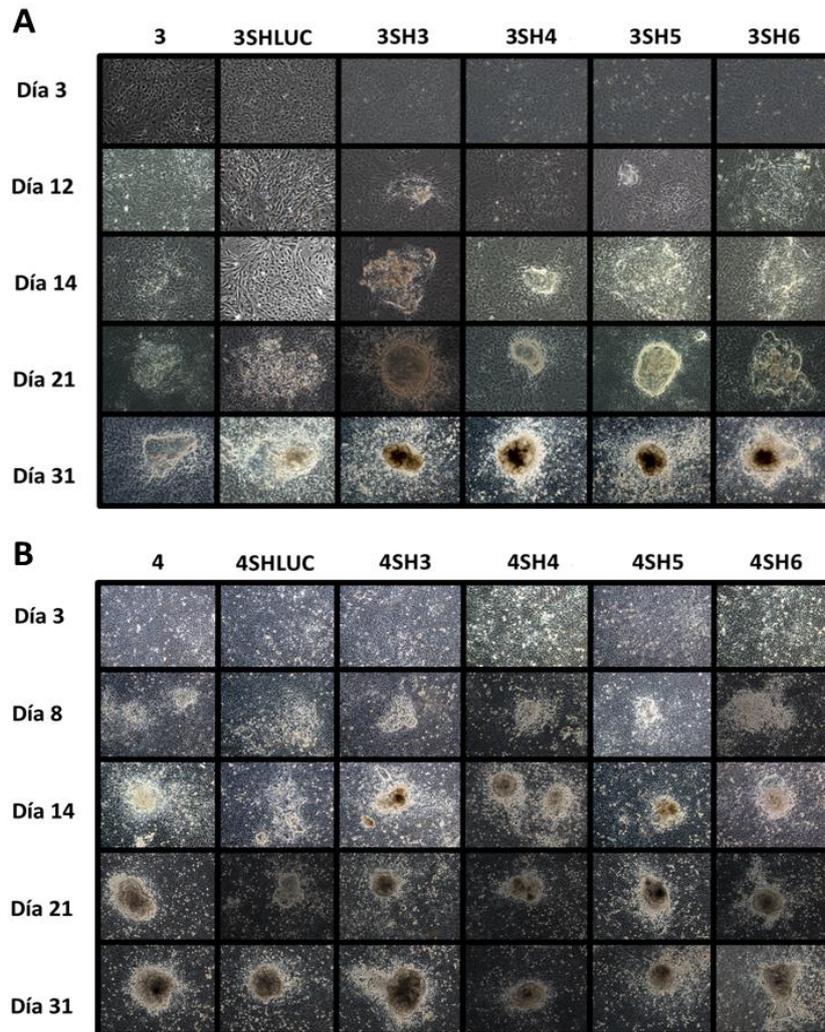
Lentivirus		SHLUC	SH3	SH4	SH5	SH6
Retrovirus	OKS	3SHLUC	3SH3	3SH4	3SH5	3SH6
	OKSM	4SHLUC	4SH3	4SH4	4SH5	4SH6

**Abreviaturas de las combinaciones virales**

**Tabla R.1. Combinaciones virales utilizadas en la infección de MEF.**

## RESULTADOS

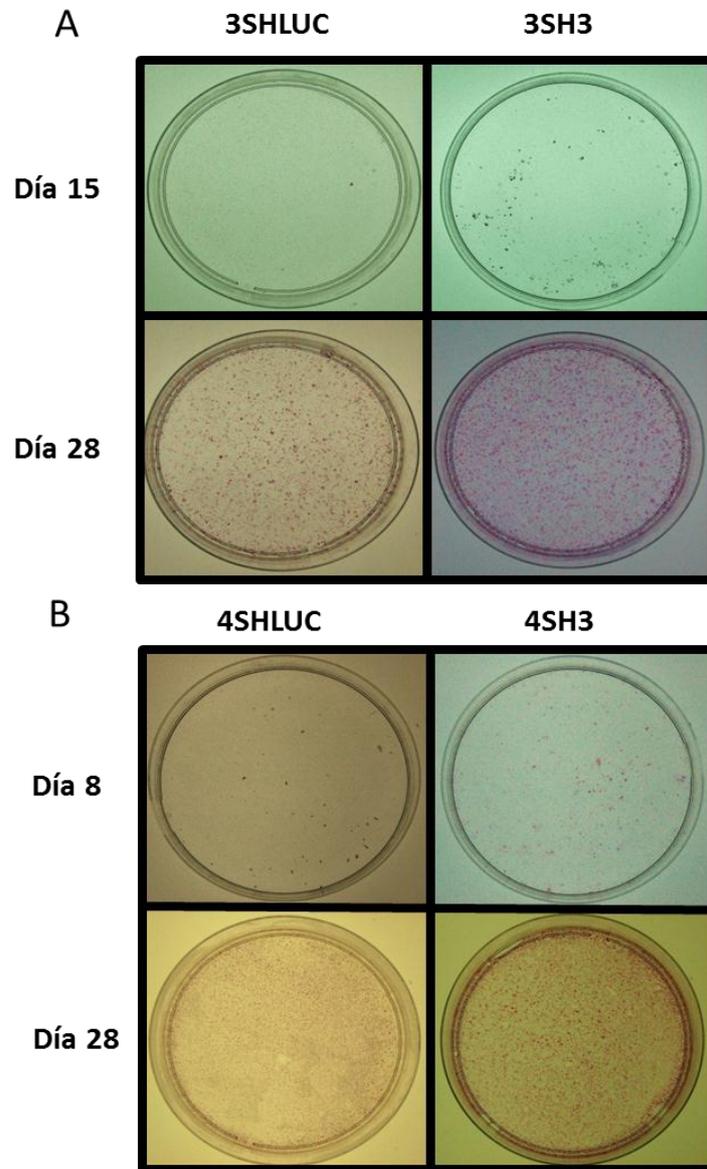
A continuación se muestra imágenes representativas de la cinética de formación de colonias iPSC en el periodo de los 28 días desde la infección (Figura R.34).



**Figura R.34. El silenciamiento de Gata4 acelera la formación de colonias tipo iPSC.** (A) Imágenes representativas de la formación de colonias en MEF reprogramados con OKS (3) y OKSM (4) junto con shRNA anti-Gata4. **4:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **SHLUC:** Lentivirus que expresa un shRNA anti-luciferasa; **SH3, SH4, SH5, SH6:** Lentivirus que expresan distintos shRNA anti-Gata4.

## RESULTADOS

A día 14 post-infección, las combinaciones OKS (3) + shRNA anti-Gata4 (SH3, SH4, SH5, SH6) presentan colonias morfológicamente distinguibles y separadas de los fibroblastos circundantes, mientras que no se observa formación de colonias con las combinaciones OKS (3) y OKS (3) + SHLUC. Similares resultados se obtuvieron a día 8 post-infección con las combinaciones virales OKSM (4) + shRNA anti-Gata4 (SH3, SH4, SH5, SH6). A día 14 se observa claramente que en las combinaciones de OKSM (4) + shRNA (SH3, SH4, SH5, SH6) obtenemos colonias completamente formadas mientras que en este mismo punto, las células infectadas con OKSM (4) y OKSM (4) + SHLUC comienzan el proceso de formación de colonias. En conclusión, el silenciamiento de Gata4 parece acelerar el proceso de formación de colonias con morfología de iPSC. Para confirmar esta observación, se realizó una nueva infección con las combinaciones virales señaladas en la Tabla R1 y monitorizamos la aparición de colonias iPSC mediante la actividad de la fosfatasa alcalina [2, 50, 95] (Figura R.35).

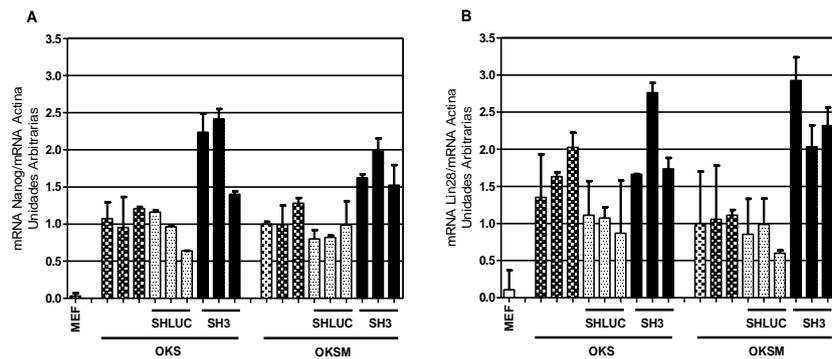


**Figura R.35. Actividad fosfatasa alcalina de las colonias iPSC durante la reprogramación.** Detección de la actividad de la fosfatasa alcalina en MEF en reprogramación. **3:** Oct4, Klf4, Sox2; **4:** Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc; **SHLUC:** Lentivirus que expresa un shRNA anti-luciferasa (control), **SH3:** Lentivirus que expresa shRNA anti-Gata4.

## RESULTADOS

En la Figura R.35 únicamente se observa una colonia fosfatasa alcalina positiva en la infección con 3SHLUC a día 15 de la reprogramación. Por el contrario, cuando incluimos SH3 obtenemos un número de colonias teñidas significativamente mayor. Similares conclusiones se obtienen cuando se incluye c-Myc. Los resultados obtenidos demuestran que el silenciamiento de Gata4 acelera el proceso de formación de colonias en la fase de maduración de la reprogramación de MEF a iPSC.

De acuerdo con nuestra hipótesis de trabajo, la ausencia de Gata4 en los MEF reprogramados debería dar lugar a clones con niveles más altos de Nanog. La expresión de Nanog se determinó por PCR cuantitativa a tiempo real a partir de RNA total de clones aislados a día 28 de la reprogramación (Figura R.36).



**Figura R.36. El silenciamiento de Gata4 da lugar a iPSC con mayores niveles de Nanog y Lin28.**

Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real de los niveles de expresión de los marcadores de pluripotencia Nanog y Lin28. MEF fueron infectados con OKS/M. La expresión de Gata4 fue silenciada mediante shRNA. A los 28 días, se aislaron y expandieron colonias con morfología de iPSC. **OKS**: Oct4, Klf4, Sox2; **OKSM**: Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc; **SHLUC**: Lentivirus que expresa un shRNA anti-luciferasa (control negativo), **SH3**: Lentivirus que expresa un shRNA anti-Gata4; **MEF**: Fibroblastos embrionarios de ratón.

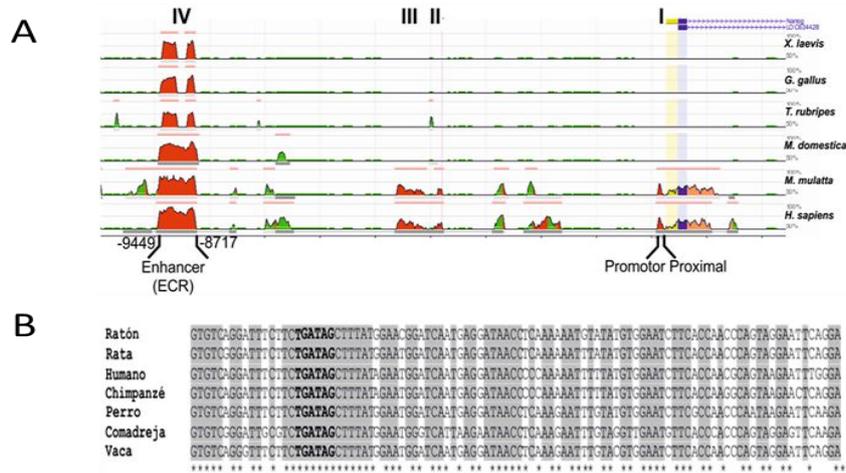
Tal y como se observa en la Figura R.36, los clones aislados de infecciones que incluyen el lentivirus SH3 muestran niveles de Nanog significativamente superiores comparados con SHLUC. Resultados similares se obtuvieron con Lin28, otro importante factor de transcripción implicado en la inducción de pluripotencia [37].

En resumen, el silenciamiento de Gata4 acelera el proceso de formación de colonias fosfatasa alcalina positivas, con morfología de iPSC y que expresan niveles de transcripción más elevados de Nanog y Lin28. En resumen, el silenciamiento de Gata4 acelera el proceso de formación de colonias de iPSC.

### **R.2.7. Gata4 inhibe la transcripción de Nanog mediante la unión a un regulador distal de la transcripción (*enhancer*)**

Con el fin de profundizar sobre el mecanismo de Gata4 para limitar la inducción de Nanog en MEF durante la reprogramación, decidimos buscar sitios consenso para Gata en regiones evolutivamente conservadas (ECR) del gen Nanog. A través de la página web de ECR-Browser ([ecrbrowser.dcode.org](http://ecrbrowser.dcode.org)) identificamos 4 ECR localizadas secuencia arriba (*upstream*) del sitio de iniciación de la transcripción (Figura R.37A). ECR I, II y III están evolutivamente conservados en ratón, humano y chimpancé. ECR I tiene una longitud de 97 pares de bases (pb) y está localizada en las inmediaciones del sitio de inicio de la transcripción. ECR I conserva un elemento de regulación, donde se unen los factores de transcripción Oct-Sox, esencial para la transcripción de Nanog [91]. ECR II (180 pb) y ECR III (635 pb) apenas contienen sitios de unión a factores de transcripción (analizado mediante el programa informático rVista 2.0). Por último, la región ECR IV (732 pb), localizada alrededor de -9000 pares de bases del sitio de inicio de la transcripción del gen Nanog, está conservada en todas las especies incluidas en nuestros análisis.

## RESULTADOS

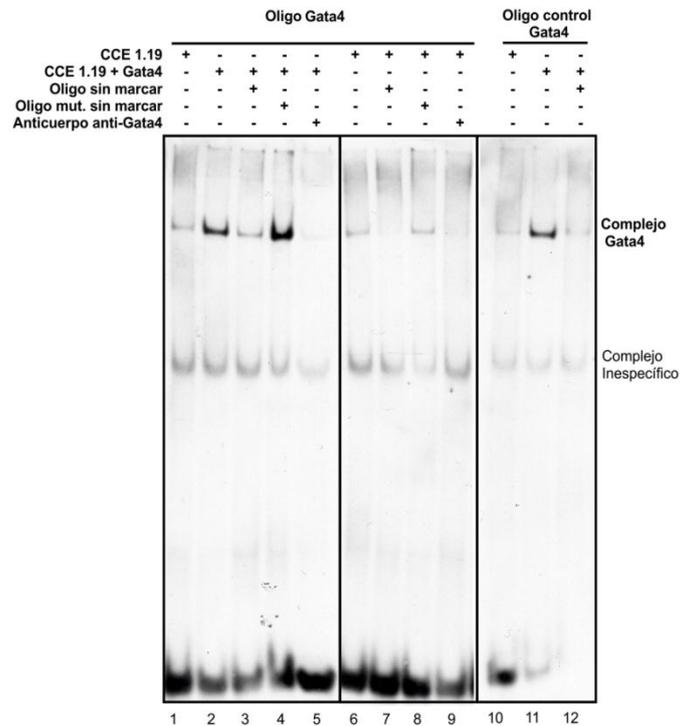


**Figura R.37. Alineamiento del regulador distal de la transcripción de Nanog.** (A) Alineamiento de las secuencias promotoras y potenciadoras de la transcripción de Nanog en diferentes especies. Se muestran las 4 regiones conservadas evolutivamente (ECR). (B) Alineamiento detallado de la secuencia más larga ininterrumpida y homologa de 14 pb, mostrando en negrita la localización del sitio de unión consenso para los factores de transcripción Gata.

Utilizando el software rVista 2.0, identificamos una acumulación significativa de posibles elementos de unión (un total de 66) para factores de transcripción en ECR IV, sugiriendo que esta zona podría tener un papel de regulador distal de la transcripción (*enhancer* en inglés) de Nanog (Figura R.37A). Entre estos elementos de unión, identificamos un sitio de unión consenso para factores Gata. De hecho, el núcleo de la secuencia consenso para factores Gata **[(A/T)GATA(A/G)]** está ubicada dentro de la secuencia conservada más larga ininterrumpida entre todas las especies (Figura R.37B).

Para determinar la unión de Gata4 al *enhancer* de Nanog identificado en este estudio, se diseñó una sonda de 30 pb que contenía el núcleo **[(A/T)GATA(A/G)]** (Tabla TM9) anteriormente citado en ECR IV. Se incubaron extractos nucleares de mESC  $\pm$  Gata4 con esta sonda y se realizó un ensayo de retardo de movilidad electroforética (EMSA) (Figura R.38).

## RESULTADOS



**Figura R.38. Gata4 se une al regulador distal de la transcripción de Nanog *in vitro*.** La unión de Gata4 al sitio de unión Gata (TGATAG) del *enhancer* de Nanog en ECR IV se evaluó mediante un ensayo de cambio movilidad electroforética (EMSA) con una sonda de 33pb. Se incubó esta sonda marcada (**Oligo Gata4**) junto con extractos nucleares de mESC (CCE 1.19) transfectadas con el plásmido episomal, pYCAG-HAGata4, (CCE 1.19 + Gata4) o extractos nucleares de mESC transfectadas con un plásmido control, pYCAG-IP, (CCE 1.19). Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

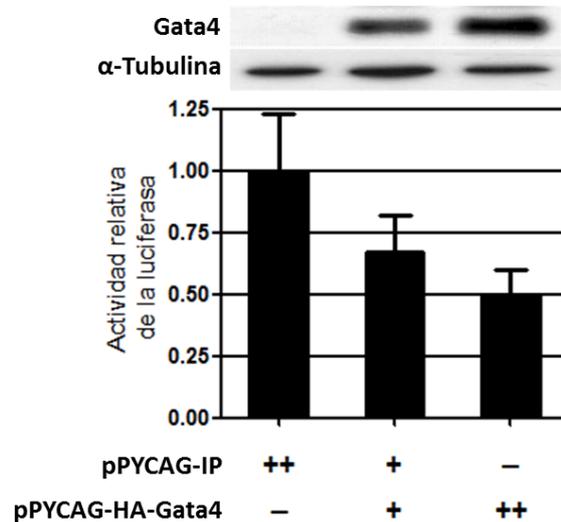
Los ensayos de EMSA revelaron que se forman dos complejos con la sonda (Figura R.38). Un complejo superior, más intenso en las células CCE 1.19+Gata4 y un complejo inferior (menos retardado) presente por igual en CCE 1.19 control y CCE 1.19+Gata4 (carreras 1-2). Cuando añadimos a la incubación la sonda sin marcar (carrera 3), la intensidad del complejo superior en CCE 1.19+Gata4 se redujo a niveles de CCE 1.19 control. Sin embargo, cuando añadimos a la incubación una sonda sin marcar que tenía el sitio de unión de Gata4 mutado (TGATAG fue cambiado por GCGCGC, ver MM.6.5.3.) la intensidad del complejo superior no se redujo (carrera 4). Estos resultados (carreras 1-4)

## RESULTADOS

demuestran que el complejo superior es específico. Para determinar si Gata4 forma parte del complejo DNA-proteína detectado en el ensayo de EMSA, realizamos un ensayo de *supershift* utilizando un anticuerpo contra Gata4 (carrera 5). La desaparición de la banda superior indica que al menos Gata4 se encuentra formando un complejo con la sonda. El complejo inferior (menos retardado) se detectó en todos los extractos nucleares, tanto de CCE 1.19-Gata4 como de CCE 1.19 control, con similar intensidad y no se alteró en presencia de la sonda sin marcar o del anticuerpo anti-Gata4, lo que sugiere que se trata de un complejo inespecífico.

Para profundizar en la naturaleza del complejo superior formado en extractos nucleares procedentes de CCE 1.19 control (carrera 1, Figura R.38), realizamos experimentos de competición similares en extractos nucleares de CCE 1.19 (carreras 6-9). El complejo desapareció cuando incubamos con la sonda sin marcar o con el anticuerpo Gata4, sugiriendo que podría haber factores Gata endógenos expresados en mESC capaces de unirse a la sonda. Por último, utilizamos una sonda diseñada en el promotor proximal del factor natriurético atrial (ANF) como control positivo del EMSA (carreras 10-12, Figura R.38) [236]. Estos resultados en su conjunto confirman que Gata4 se une específicamente al sitio Gata identificado en ECR IV de Nanog.

Una vez confirmada la unión de Gata4 al ECR IV de Nanog, quisimos determinar si Gata4 puede reprimir la transcripción de Nanog. Para ello, realizamos un ensayo reportero en mESC. Se transfectó un plásmido reportero de la luciferasa que contiene la secuencia completa del regulador distal de la transcripción de Nanog (ECR IV, 732 pb), clonado secuencia arriba (*upstream*) del promotor proximal de Nanog (ECR I) que regula la expresión de la luciferasa (Figura R.39).

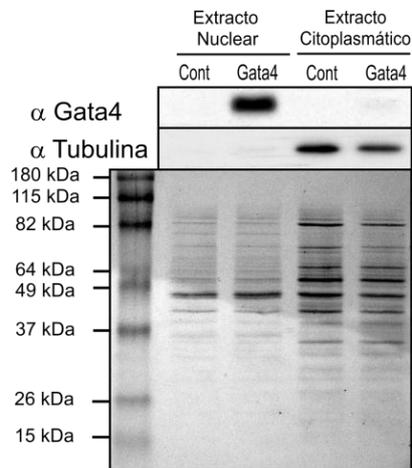


**Figura R.39. Gata4 reduce la actividad luciferasa en mESC transfectadas con el plásmido reportero Nanog-pGL3-*enh/prom*.** Las células CCE1.19 fueron transfectadas con el plásmido reportero Nanog-pGL3-*enh/prom* y un plásmido episomal que expresa Gata4 (pPYCAG-HAGata4). Se muestra la media y desviación típica del *ratio* de las actividades luciferasa/renilla de 3 experimentos normalizado a las células control transfectadas con un plásmido vacío (pPYCAG-IP). En la parte superior de la figura se muestra un *Western blot* mostrando la presencia de las proteínas Gata4 y tubulina, en los correspondientes extractos celulares.

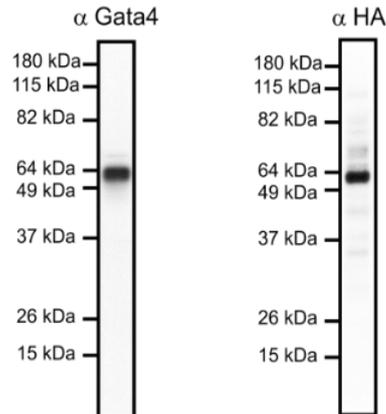
El plásmido quimérico (Nanog-pGL3-*enh/prom*) era activo en mESC (Figura R.39 columna izquierda). La actividad de la luciferasa decreció dosis-dependientemente hasta el 50% cuando co-transfectamos con un vector episomal que expresa Gata4 (pPYCAG-HAGata4). Podemos confirmar que Gata4 se une al sitio Gata en ECR IV y es capaz de reprimir la actividad del promotor de Nanog.

Por último, quisimos determinar si Gata4 es capaz de unirse a ECR IV *in vivo* cuando la cromatina se encuentra en su forma nativa. Para ello se realizó un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina tal y como se describe en [203]. Para la realización de este experimento, utilizamos mESC transfectadas con pPYCAG-IP (CCE 1.19 control) o transfectadas con pPYCAG-HA-Gata4 (CCE 1.19+Gata4) (Figura R.40). La inmunoprecipitación se realizó utilizando los anticuerpos anti-Gata4 y anti-HA-tag, validados mediante Western blot (Figura R.41).

## RESULTADOS



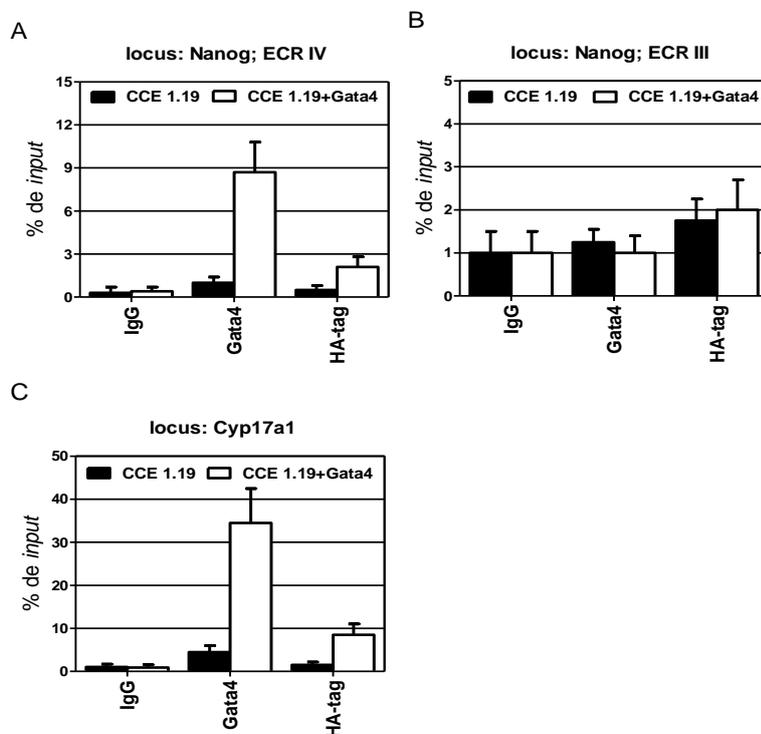
**Figura R.40. Western blot de extractos procedentes de mESC transfectadas con pPYCAG-IP (Cont) o pPYCAG-HAGata4 (Gata4) utilizados en los EMSA.** La tubulina únicamente se detectó en extractos citoplasmáticos. Se muestra en la parte inferior de la figura una tinción de la membrana con azul de Coomassie.



**Figura R.41. Validación de los anticuerpos mediante Western blot.** Validación de los anticuerpos anti-Gata4 y anti-HA-tag mediante Western blot utilizando mESC transfectadas con pPYCAG-HA-Gata4.

Tal y como se muestra en la figura R.42A se observó un enriquecimiento aproximado de 20 veces y 4 veces del regulador de la transcripción de Nanog (ECR IV) en las muestras CCE 1.19-Gata4 inmunoprecipitadas con los anticuerpos anti-Gata4 y anti-HA, respectivamente, en contraposición a los controles de IgG. El ensayo de ChIP fue validado analizando en paralelo una región del promotor Cyp17a1 [237]. En este caso, la inmunoprecipitación con los anticuerpos anti-HA o anti-Gata4 dieron como resultado un enriquecimiento aproximada de 28 veces (Figura R.42C). Cuando se investigó el locus control ECR III, no se encontró un enriquecimiento significativo de este locus (Figura R.42B).

## RESULTADOS



**Figura R.42. Gata4 se une al regulador de la transcripción distal de Nanog *in vivo*.** Análisis de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) de mESC transfectadas con pPYCAG-IP (CCE 1.19) o pPYCAG-HAGata4 (CCE 1.19+Gata4). Las cantidades relativas de cromatina inmunoprecipitada utilizando los anticuerpos anti-Gata4, anti-HA-tag o IgG se analizaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se analizaron 3 diferentes locus genómicos, un dominio de 149 pb localizado en ECR III, como control negativo, un dominio de 143 pb conteniendo el sitio de unión de Gata4 localizado en ECR IV y un dominio de 269 pb localizado en Cyp17a1, como control positivo [237]. Se representan las medias de 3 experimentos independientes.

En conclusión, nuestros resultados indican que Gata4 se une “*in vivo*” al regulador de la transcripción distal de Nanog identificado en ECR IV.

## RESULTADOS

DISCUSIÓN

## ***DISCUSIÓN***

## DISCUSIÓN

**D.1. TRANSDIFERENCIACIÓN DE MEF A IHEP MEDIANTE  
FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN ESPECÍFICOS**

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

Con el fin de desarrollar un protocolo de reprogramación de fibroblastos a hepatocitos, realizamos una primera serie de experimentos con la finalidad de obtener células reprogramadas a endodermo hepático, mediante dos estrategias de reprogramación: directa e indirecta.

La estrategia de reprogramación directa mediante la infección con retrovirus que expresan los factores de transcripción pro-endodérmicos Hhex (H), Foxa2 (F) y Gata4 (G) en DMEMc, resultó en senescencia y muerte celular. Estos resultados ponen de manifiesto que la limitada capacidad proliferativa de los MEF es un paso limitante para la reprogramación directa hacia el linaje hepático, tal y como se ha descrito recientemente [238]. Nuestra estrategia indirecta consistió en reprogramar MEF a endodermo hepático combinando los factores de reprogramación a iPSC (OKSM) junto con los factores de transcripción pro-endodérmicos Foxa2, Gata4 y Hhex en DMEMc (Tabla TM2). Se escogió esta estrategia hipotetizando que inicialmente los factores de reprogramación a iPSC (OKSM) podrían reprogramar estas células a un estado parcialmente pluripotente en ausencia de LIF, potencialmente más susceptible a los factores de transcripción pro-endodérmicos por estar siendo sometidos a un remodelado epigenético.

Las células infectadas con OKS+H presentaban morfología y marcadores de colangiocitos (células epiteliales del conducto biliar). De hecho Hhex es un factor de transcripción esencial en el desarrollo del hígado [146, 149, 150] y su ausencia resulta en una diferenciación deficiente de los hepatoblastos y malformaciones en la formación de las vías biliares [150]. Resulta interesante que esta transformación sólo ocurre cuando c-Myc está ausente. Una de las funciones de c-Myc en células madre es el mantenimiento de la autorenovación (proliferación) y pluripotencia [239], inhibiendo por tanto los procesos de diferenciación. Por ello, parece que sólo en ausencia de c-Myc, Hhex es capaz de inducir la diferenciación que deriva en cambios morfológicos potencialmente pro-hepáticos. Las células infectadas con OKS/OKSM+F+G, no formaban colonias definidas, sino agrupamientos de células con morfología fibroblástica.

## DISCUSIÓN

La expresión de los marcadores endodérmicos analizados *Gsc*, y *Sox7*, en los distintos clones, resultó ser variable (Figura R.3). Esta variabilidad puede ser atribuida al diferente número de retrovirus que infectan a cada una de las células, al lugar donde se insertan en el genoma y otras variables que modulan su expresión en cada célula. Ahora bien, el perfil de expresión de los factores endodérmicos fue en general superior en aquellas combinaciones que no contenían *c-Myc*. Parece que, de nuevo, la presencia de *c-Myc* impide o dificulta la diferenciación inducida por otros factores de transcripción como *Foxa2*, *Gata4* o *Hhex*. Sea como fuere, los niveles de *Nanog* en todas las combinaciones (aproximadamente 650 veces menos que mESC) confirmó que se trataba de células que no habían adquirido la pluripotencia (Figura R.2) [88]. Los análisis de expresión global por *microarrays* y su validación por PCR cuantitativa a tiempo real confirmaron que las OKS/M+F+G no se habían derivado hacia el linaje endodérmico.

Los resultados obtenidos sugerían que la reprogramación de fibroblastos a endodermo hepático de forma indirecta mediante los factores de transcripción OKS/M, *Hhex*, *Foxa2* y *Gata4* no era suficiente. Decidimos introducir dos cambios importantes, la expresión ectópica de *HNF4 $\alpha$* , *HNF1 $\alpha$*  y *HNF6*, así como el uso de medio de cultivo condicionado (MCH). Se ha demostrado que el uso de medios condicionados mejoran y aceleran la reprogramación celular [18, 103, 106, 240]. MEF infectados con retrovirus que codifican para los factores de transcripción *Gata4*, *Foxa2*, *Hhex*, *HNF1 $\alpha$* , *HNF4 $\alpha$*  y *HNF6* indujeron un intenso cambio morfológico y transcripcional hacia el linaje hepático, especialmente cuando se co-infectaron junto con OKSM y se cultivaron en medio condicionado hepático.

Las células se disponen en un empedrado típico de hepatocitos; muchas de estas células son binucleadas y presentan nucléolos prominentes (Figura R.8). La transición de morfología fibroblástica a epiteliales (MET) puede ser inducido por los factores OKS/M como ocurre en la reprogramación a iPSC. En aquellas infecciones que no incluían estos retrovirus, si contenían *HNF4* en la infección, lo cual es suficiente para

## DISCUSIÓN

inducir MET ya que activa genes epiteliales como la E-cadherina [241]. A nivel transcripcional expresan niveles hepáticos de genes esenciales para el desarrollo del hígado como Foxa1 y Foxa2 y activan la expresión de marcadores específicos de la función hepática como Albúmina, Slc10a1 (transportador de ácidos biliares), Cyp7a1 (primer enzima de la ruta sintética de ácidos biliares desde colesterol), Tat (enzima implicado en el metabolismo de la tirosina) y Ugt1a1 (enzima que transforma pequeñas moléculas lipófilas como bilirrubina, esteroides, o distintas drogas en metabolitos solubles en agua para su posterior excreción). Además en estas células no se detecta mRNA de genes mesenquimales propios de fibroblastos como Thy1, Zeb1 o Snai1; ni marcadores de pluripotencia como Nanog o Lin28. La ausencia de marcadores mesenquimales originales de los MEF y de pluripotencia son sugerentes de una verdadera reprogramación hacia iHep. Estos datos concuerdan con una reciente publicación en la que reprograman fibroblastos a cardiomiocitos infectando inicialmente con OKSM y alteran el proceso de adquisición a pluripotencia usando un medio condicionado con factores de crecimiento específicos y sin LIF [240].

Durante la elaboración de esta tesis se publicaron dos trabajos en los que se convertían de forma directa MEF en iHep [238, 242] usando factores de transcripción similares a los empleados en esta tesis. Sin embargo, a diferencia de nuestros resultados y los de Huang et al [238], los MEF infectados no entran en senescencia. Precisamente este motivo llevo a Huang et al a utilizar fibroblastos de ratones p19Arf<sup>-/-</sup> [238] que tienen capacidad de proliferar indefinidamente sin entrar en senescencia.

En resumen, hemos conseguido inducir la conversión de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) a células con morfología y marcadores hepáticos (iHep), mediante la infección con retrovirus que codifican para los factores de transcripción Gata4, Foxa2, Hhex, HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y HNF6. Sin embargo, estos MEF entraron en senescencia y no fue posible congelar las líneas celulares obtenidas, bien porque se trata de hepatocitos altamente diferenciados (estudios en curso) o porque

## DISCUSIÓN

simplemente entran en senescencia por proceder de MEF. La inclusión de Oct4, Klf4, Sox2, c-Myc permite aislar clones que a priori expresan niveles comparables de marcadores hepáticos a las células reprogramadas en su ausencia.

**D.2. PAPEL DE GATA4 EN EL BLOQUEO DE LA  
REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS**

## DISCUSIÓN

## DISCUSIÓN

La expresión exógena de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OKSM) es suficiente para activar la reprogramación celular a través de cambios globales de expresión génica, que culminan con la adquisición de la pluripotencia [2]. Este fenómeno depende en gran medida de una red transcripcional articulada por la inducción del factor de transcripción Nanog [89]. En esta tesis hemos demostrado que Gata4 bloquea la inducción de Nanog y en consecuencia la reprogramación celular.

La expresión de Gata4 causa un intenso deterioro de la reprogramación inducida por la expresión de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc. La presencia de Gata4 da lugar a colonias de naturaleza fibroblástica y bordes poco definidos que no expresan Nanog. Estas colonias no se pueden aislar individualmente y mueren en medio condicionado 2i/LIF, utilizado para culminar la reprogramación de iPSC parcialmente reprogramadas [70]. Cuando Foxa2 se co-expresa con Gata4 (OKS/M+F+G), las colonias pueden ser aisladas y expandidas en clones, pero mantienen su morfología fibroblástica y los niveles de Nanog continúan siendo muy bajos. Estos resultados no son del todo inesperados, ya que se ha descrito que el factor de transcripción maternal Glis1 aumentan la eficiencia de la reprogramación a iPSC a través de la inducción de Foxa2 [42]. De hecho, cuando sobreexpresamos Foxa2 junto con OKSM se alcanzan niveles de mRNA de Nanog superiores que con OKSM (Figura R.17). Inversamente, el silenciamiento de Gata4 en MEF reprogramados con OKS/OKSM mediante shRNA específicos anti-Gata4, incrementó el número de colonias iPSC tempranas (Figura R.35) y los niveles de Nanog en los clones de iPSC aislados (Figura R.36). Por tanto Gata4 bloquea la inducción a células iPSC y su función parece estar relacionada con la ausencia de Nanog.

Con el fin de profundizar en el mecanismo ejercido por Gata4 para bloquear la reprogramación a células iPSC, decidimos evaluar su influencia en los pasos cruciales del proceso. La presencia de Gata4 en la combinación retroviral de reprogramación no induce senescencia más allá de los valores normales del proceso (Figura R.19). Del mismo modo, la sobreexpresión de Gata4 no influye en la activación inicial de

## DISCUSIÓN

marcadores epiteliales como *Cdh1* y *Ocln1* (Figura R.21) o de marcadores tempranos de la reprogramación como *Slc38a5*, *Syne2* y *Perp* (Figura R.28).

La reprogramación celular de MEF a células iPSC es un proceso gradual que puede dividirse en 3 etapas: fase de iniciación (0-8 días), fase de maduración (8-16 días) y fase de estabilización (16-21 días) [46]. Durante la fase de maduración tiene lugar la inducción de Nanog que desencadena toda una serie de respuestas celulares hasta llegar al establecimiento de verdaderas células iPSC. Al mismo tiempo se produce el silenciamiento de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc exógenos, la regulación a la baja de *Slc38a5* (Figura R.28), la estabilización de los niveles de mRNA de *Gdf3* (Figura R.32C) y la inducción progresiva de Nanog. La presencia de Gata4 interfirió en cada uno de estos procesos culminando con la ausencia de Nanog a los 28 días de la infección con OKSM+G. De hecho, el fenotipo de estas las células reproduce el descrito cuando se reprograman células deficientes en Nanog con OKSM [88]. En consonancia con la hipótesis de que Gata4 bloquea la reprogramación en la fase de maduración, la expresión de Gata4 durante el inicio de esta fase (ocho días después de la infección de MEF con OKSM) también bloquea la reprogramación y la inducción de *Nanog* (Figura R.27).

Nuestra hipótesis de trabajo era que Gata4 bloqueaba la reprogramación durante la fase de maduración al limitar la inducción de Nanog en base a las siguientes observaciones: 1) La expresión de Gata4 junto con OKSM reproduce el fenotipo de células deficientes en Nanog reprogramadas con OKSM [88]; 2) Gata4 no altera de ningún modo la fase de iniciación, en la que Nanog no es esencial [46]; 3) la expresión de Gata4 después de la fase de iniciación impidió también la generación de iPSC y la inducción de *Nanog*; 4) el silenciamiento de Gata4 da lugar a clones de células iPSC que expresan niveles de mRNA de *Nanog* significativamente superiores a los clones aislados de la reprogramación con OKSM (Figura R.36). Para confirmar esta hipótesis realizamos un ensayo de rescate genético incluyendo Nanog en la combinación

retroviral OKSM+G (OKSM+G+N). Los clones aislados de la infección con OKSM+G+N presentan el fenotipo propio de células iPSC (Figura R.30).

Una búsqueda *in silico* de regiones evolutivamente conservadas (ECR) en el gen Nanog nos permitió la identificación de un nuevo regulador distal de la transcripción en este gen (ECR IV; Figura R.37). Utilizando ensayos de retardo en la movilidad electroforética (EMSA), ensayos de luciferasa y de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) descubrimos que Gata4 es capaz de unirse a este sitio del regulador distal de Nanog e inhibir la transcripción (Figuras R.38, R.39 y R.42). El significado fisiológico de la unión de Gata4 al regulador ECR IV de Nanog es desconocido, pero dado el papel de Gata4 como un factor de transcripción pionero en la diferenciación de diferentes tipos celulares [131, 243, 244], formulamos la hipótesis de que la unión de Gata4 al regulador ECR IV podría contribuir al silenciamiento de Nanog y la segregación del endodermo primitivo desde las células de la masa celular interna durante el desarrollo embrionario [245].

De forma similar a Gata4, el silenciamiento de LATS2, un supresor tumoral de la vía Hippo, facilita la reprogramación somática [246]. Igualmente células mutantes en Tcf3, un represor de genes diana de  $\beta$ -catenina, también facilita la reprogramación de células neurales [247]. En otros trabajos, es la co-expresión de factores en combinación con OKSM lo que facilita el proceso, como en el caso de HMGA1 [248].

Nuestros descubrimientos indican que, el bloqueo de la reprogramación por Gata4, es debido a su capacidad para abolir la inducción de Nanog en el transcurso de la reprogramación. Gata4 se une directa y específicamente a un regulador de la transcripción (ECR IV) del gen Nanog, que hemos identificado en este estudio, inhibiendo su transcripción en el transcurso de la reprogramación y de esta forma bloqueando la inducción de MEF a células iPSC. Dado el importante papel de Gata4 y Nanog en la diferenciación celular, los resultados presentados en esta tesis tienen también implicaciones en el descifrado

## DISCUSIÓN

de las redes interreguladoras que controlan la reprogramación de células somáticas y la diferenciación de la ICM embrionaria.

CONCLUSIONES

# ***CONCLUSIONES***

## CONCLUSIONES

**Transdiferenciación de fibroblastos embrionarios de ratón a hepatocitos.**

- Hemos conseguido convertir fibroblastos embrionarios de ratón a células con morfología y marcadores hepáticos.
- Esta conversión se ha producido mediante la infección con retrovirus que codifican para los factores de transcripción Gata4, Foxa2, Hhex, HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y HNF6.
- La expresión de estos factores de transcripción junto con Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc, permite obtener células que mejoran la expresión de los marcadores hepáticos examinados y presentan una mayor capacidad de proliferación.
- El uso de medio condicionado hepato-específico optimiza el fenotipo de los hepatocitos inducidos.

**Bloqueo de la reprogramación a pluripotencia por Gata4.**

- El factor de transcripción Gata4 bloquea la reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón a células pluripotentes inducidas.
- Gata4 inhibe la expresión de Nanog mediante su unión específica a un regulador distal de la transcripción de este gen, debido a ello, bloquea la transición a la fase de maduración en la reprogramación a células pluripotentes inducidas.
- El silenciamiento de Gata4 mediante shRNAs aumenta la eficiencia de reprogramación a células pluripotentes inducidas.

## CONCLUSIONES

ARTÍCULO PUBLICADO

***ARTÍCULO PUBLICADO***

ARTÍCULO PUBLICADO

**Serrano F**, Calatayud CF, Blazquez M, Torres J, Castell JV y Bort R.

***Gata4 Blocks Somatic Cell Reprogramming by Directly Repressing Nanog.***

Stem Cells. 2013 Jan;31(1):71-82. doi: 10.1002/stem.1272

Unidad de Hepatología Experimental, CIBERehd, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Valencia 46009, Spain.

ARTÍCULO PUBLICADO

BIBLIOGRAFÍA

# ***BIBLIOGRAFÍA***

## BIBLIOGRAFÍA

## BIBLIOGRAFÍA

1. Stadtfeld, M. and K. Hochedlinger, *Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications*. Genes Dev, 2010. **24**(20): p. 2239-63.
2. Takahashi, K. and S. Yamanaka, *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell, 2006. **126**(4): p. 663-76.
3. Briggs, R. and T.J. King, *Transplantation of Living Nuclei From Blastula Cells into Enucleated Frogs' Eggs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1952. **38**(5): p. 455-63.
4. Gurdon, J.B., T.R. Elsdale, and M. Fischberg, *Sexually mature individuals of Xenopus laevis from the transplantation of single somatic nuclei*. Nature, 1958. **182**(4627): p. 64-5.
5. Gurdon, J.B. and V. Uehlinger, *"Fertile" intestine nuclei*. Nature, 1966. **210**(5042): p. 1240-1.
6. Wilmut, I., et al., *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature, 1997. **385**(6619): p. 810-3.
7. Hochedlinger, K. and K. Plath, *Epigenetic reprogramming and induced pluripotency*. Development, 2009. **136**(4): p. 509-23.
8. Thomson, J.A., et al., *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. Science, 1998. **282**(5391): p. 1145-7.
9. Evans, M.J. and M.H. Kaufman, *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature, 1981. **292**(5819): p. 154-6.
10. Martin, G.R., *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, 1981. **78**(12): p. 7634-8.
11. Nichols, J., et al., *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4*. Cell, 1998. **95**(3): p. 379-91.
12. Tada, M., et al., *Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells*. Curr Biol, 2001. **11**(19): p. 1553-8.
13. Dimos, J.T., et al., *Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons*. Science, 2008. **321**(5893): p. 1218-21.
14. Chambers, S.M., et al., *Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling*. Nat Biotechnol, 2009. **27**(3): p. 275-80.

## BIBLIOGRAFÍA

15. Karumbayaram, S., et al., *Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons*. Stem Cells, 2009. **27**(4): p. 806-11.
16. Graf, T. and T. Enver, *Forcing cells to change lineages*. Nature, 2009. **462**(7273): p. 587-94.
17. Thier, M., et al., *Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells*. Cell Stem Cell, 2012. **10**(4): p. 473-9.
18. Pfisterer, U., et al., *Direct conversion of human fibroblasts to dopaminergic neurons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(25): p. 10343-8.
19. Hadorn, E., *Transdetermination in cells*. Sci Am, 1968. **219**(5): p. 110-4 passim.
20. Ursprung, H. and E. Hadorn, *[Further research on model growth in combination with partly dissociated wing imaginal disks of Drosophila melanogaster]*. Dev Biol, 1962. **4**: p. 40-66.
21. Halder, G., P. Callaerts, and W.J. Gehring, *Induction of ectopic eyes by targeted expression of the eyeless gene in Drosophila*. Science, 1995. **267**(5205): p. 1788-92.
22. Maves, L. and G. Schubiger, *Transdetermination in Drosophila imaginal discs: a model for understanding pluripotency and selector gene maintenance*. Curr Opin Genet Dev, 2003. **13**(5): p. 472-9.
23. Mann, R.S. and G. Morata, *The developmental and molecular biology of genes that subdivide the body of Drosophila*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 243-71.
24. Blau, H.M., C.P. Chiu, and C. Webster, *Cytoplasmic activation of human nuclear genes in stable heterocaryons*. Cell, 1983. **32**(4): p. 1171-80.
25. Blau, H.M., et al., *Plasticity of the differentiated state*. Science, 1985. **230**(4727): p. 758-66.
26. Blau, H.M. and D. Baltimore, *Differentiation requires continuous regulation*. J Cell Biol, 1991. **112**(5): p. 781-3.
27. Taylor, S.M. and P.A. Jones, *Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine*. Cell, 1979. **17**(4): p. 771-9.
28. Jones, P.A. and S.M. Taylor, *Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation*. Cell, 1980. **20**(1): p. 85-93.

## BIBLIOGRAFÍA

29. Lassar, A.B., B.M. Paterson, and H. Weintraub, *Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts*. Cell, 1986. **47**(5): p. 649-56.
30. Davis, R.L., H. Weintraub, and A.B. Lassar, *Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts*. Cell, 1987. **51**(6): p. 987-1000.
31. Weintraub, H., et al., *Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(14): p. 5434-8.
32. Ivanova, N.B., et al., *A stem cell molecular signature*. Science, 2002. **298**(5593): p. 601-4.
33. Ramalho-Santos, M., et al., *"Stemness": transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells*. Science, 2002. **298**(5593): p. 597-600.
34. Fortunel, N.O., et al., *Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature"*. Science, 2003. **302**(5644): p. 393; author reply 393.
35. Vogel, G., *Stem cells. 'Stemness' genes still elusive*. Science, 2003. **302**(5644): p. 371.
36. Hong, H., et al., *Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1132-5.
37. Yu, J., et al., *Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells*. Science, 2007. **318**(5858): p. 1917-20.
38. Kim, J.B., et al., *Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors*. Nature, 2008. **454**(7204): p. 646-50.
39. Zhao, Y., et al., *Two supporting factors greatly improve the efficiency of human iPSC generation*. Cell Stem Cell, 2008. **3**(5): p. 475-9.
40. Tsubooka, N., et al., *Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts*. Genes Cells, 2009. **14**(6): p. 683-94.
41. Hanna, J., et al., *Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency*. Cell, 2008. **133**(2): p. 250-64.

## BIBLIOGRAFÍA

42. Maekawa, M., et al., *Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1*. *Nature*, 2011. **474**(7350): p. 225-9.
43. Lin, S.L., et al., *Regulation of somatic cell reprogramming through inducible mir-302 expression*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(3): p. 1054-65.
44. Liao, B., et al., *MicroRNA cluster 302-367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(19): p. 17359-64.
45. Miyoshi, N., et al., *Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs*. *Cell Stem Cell*, 2011. **8**(6): p. 633-8.
46. Samavarchi-Tehrani, P., et al., *Functional genomics reveals a BMP-driven mesenchymal-to-epithelial transition in the initiation of somatic cell reprogramming*. *Cell Stem Cell*, 2010. **7**(1): p. 64-77.
47. Okada, M. and Y. Yoneda, *The timing of retroviral silencing correlates with the quality of induced pluripotent stem cell lines*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1810**(2): p. 226-35.
48. Stadtfeld, M., et al., *Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(3): p. 230-40.
49. Nishimura, K., et al., *Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(6): p. 4760-71.
50. Fusaki, N., et al., *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*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, 2009. **85**(8): p. 348-62.
51. Ban, H., et al., *Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(34): p. 14234-9.
52. Woltjen, K., et al., *piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2009. **458**(7239): p. 766-70.
53. Okita, K., et al., *Generation of mouse induced pluripotent stem cells without viral vectors*. *Science*, 2008. **322**(5903): p. 949-53.

## BIBLIOGRAFÍA

54. Warren, L., et al., *Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(5): p. 618-30.
55. Treiber, T., N. Treiber, and G. Meister, *Regulation of microRNA biogenesis and function*. Thromb Haemost, 2012. **107**(4).
56. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. EMBO J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
57. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
58. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
59. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
60. Carthew, R.W. and E.J. Sontheimer, *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. Cell, 2009. **136**(4): p. 642-55.
61. Triboulet, R. and R.I. Gregory, *Autoregulatory Mechanisms Controlling the Microprocessor*. Adv Exp Med Biol, 2010. **700**: p. 56-66.
62. Stadtfeld, M., et al., *Induced pluripotent stem cells generated without viral integration*. Science, 2008. **322**(5903): p. 945-9.
63. Yu, J., et al., *Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences*. Science, 2009. **324**(5928): p. 797-801.
64. Zhou, W. and C.R. Freed, *Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells*. Stem Cells, 2009. **27**(11): p. 2667-74.
65. Wernig, M., et al., *A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types*. Nat Biotechnol, 2008. **26**(8): p. 916-24.
66. Ho, R., C. Chronis, and K. Plath, *Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency*. J Cell Physiol, 2011. **226**(4): p. 868-78.
67. Wernig, M., et al., *In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 318-24.
68. Hanna, J., et al., *Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration*. Nature, 2009. **462**(7273): p. 595-601.

## BIBLIOGRAFÍA

69. Brambrink, T., et al., *Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells*. Cell Stem Cell, 2008. **2**(2): p. 151-9.
70. Mikkelsen, T.S., et al., *Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis*. Nature, 2008. **454**(7200): p. 49-55.
71. Li, R., et al., *A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts*. Cell Stem Cell, 2010. **7**(1): p. 51-63.
72. Scheel, C., et al., *Paracrine and autocrine signals induce and maintain mesenchymal and stem cell states in the breast*. Cell, 2011. **145**(6): p. 926-40.
73. Li, Z., et al., *Small RNA-mediated regulation of iPS cell generation*. Embo J, 2011. **30**(5): p. 823-34.
74. Li, H., et al., *The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1136-9.
75. Rodier, F., et al., *Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(8): p. 973-9.
76. Bardeesy, N., et al., *Both p16(Ink4a) and the p19(Arf)-p53 pathway constrain progression of pancreatic adenocarcinoma in the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5947-52.
77. Bardeesy, N., et al., *Obligate roles for p16(Ink4a) and p19(Arf)-p53 in the suppression of murine pancreatic neoplasia*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(2): p. 635-43.
78. Obata, M., et al., *Resistance of primary cultured mouse hepatic tumor cells to cellular senescence despite expression of p16(Ink4a), p19(Arf), p53, and p21(Waf1/Cip1)*. Mol Carcinog, 2001. **32**(1): p. 9-18.
79. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
80. Chambers, I., et al., *Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 643-55.
81. Mitsui, K., et al., *The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells*. Cell, 2003. **113**(5): p. 631-42.

## BIBLIOGRAFÍA

82. Wu, Q., et al., *Sall4 interacts with Nanog and co-occupies Nanog genomic sites in embryonic stem cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24090-4.
83. Zhang, X., et al., *Derivation of human embryonic stem cells from developing and arrested embryos*. Stem Cells, 2006. **24**(12): p. 2669-76.
84. Pan, G., et al., *Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells*. Cell Stem Cell, 2007. **1**(3): p. 299-312.
85. Bernstein, B.E., et al., *A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells*. Cell, 2006. **125**(2): p. 315-26.
86. Okita, K., T. Ichisaka, and S. Yamanaka, *Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells*. Nature, 2007. **448**(7151): p. 313-7.
87. Wolf, D. and S.P. Goff, *Embryonic stem cells use ZFP809 to silence retroviral DNAs*. Nature, 2009. **458**(7242): p. 1201-4.
88. Silva, J., et al., *Nanog is the gateway to the pluripotent ground state*. Cell, 2009. **138**(4): p. 722-37.
89. Theunissen, T.W., et al., *Nanog overcomes reprogramming barriers and induces pluripotency in minimal conditions*. Curr Biol, 2011. **21**(1): p. 65-71.
90. Takahashi, K., et al., *Induction of pluripotent stem cells from fibroblast cultures*. Nat Protoc, 2007. **2**(12): p. 3081-9.
91. Rodda, D.J., et al., *Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2*. J Biol Chem, 2005. **280**(26): p. 24731-7.
92. Johansson, H. and S. Simonsson, *Core transcription factors, Oct4, Sox2 and Nanog, individually form complexes with nucleophosmin (Npm1) to control embryonic stem (ES) cell fate determination*. Aging (Albany NY), 2010. **2**(11): p. 815-22.
93. Cho, H.J., et al., *Induction of pluripotent stem cells from adult somatic cells by protein-based reprogramming without genetic manipulation*. Blood, 2010. **116**(3): p. 386-95.
94. Jia, F., et al., *A nonviral minicircle vector for deriving human iPS cells*. Nat Methods, 2010. **7**(3): p. 197-9.
95. Kim, D., et al., *Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins*. Cell Stem Cell, 2009. **4**(6): p. 472-6.

## BIBLIOGRAFÍA

96. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
97. Kawamura, T., et al., *Linking the p53 tumour suppressor pathway to somatic cell reprogramming*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1140-4.
98. Marion, R.M., et al., *A p53-mediated DNA damage response limits reprogramming to ensure iPS cell genomic integrity*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1149-53.
99. Utikal, J., et al., *Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells*. Nature, 2009. **460**(7259): p. 1145-8.
100. Sridharan, R., et al., *Role of the murine reprogramming factors in the induction of pluripotency*. Cell, 2009. **136**(2): p. 364-77.
101. Liao, J., et al., *Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human somatic cells by a combination of six transcription factors*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 600-3.
102. Ying, Q.L., et al., *The ground state of embryonic stem cell self-renewal*. Nature, 2008. **453**(7194): p. 519-23.
103. Ieda, M., et al., *Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors*. Cell, 2010. **142**(3): p. 375-86.
104. Yoo, A.S., et al., *MicroRNA-mediated conversion of human fibroblasts to neurons*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 228-31.
105. Ambasudhan, R., et al., *Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions*. Cell Stem Cell, 2011. **9**(2): p. 113-8.
106. Vierbuchen, T., et al., *Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors*. Nature, 2010. **463**(7284): p. 1035-41.
107. Szabo, E., et al., *Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 521-6.
108. Papapetrou, E.P., et al., *Genomic safe harbors permit high beta-globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells*. Nat Biotechnol, 2011. **29**(1): p. 73-8.
109. Zhou, Q., et al., *In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells*. Nature, 2008. **455**(7213): p. 627-32.

## BIBLIOGRAFÍA

110. Yusa, K., et al., *Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells*. *Nature*, 2011. **478**(7369): p. 391-4.
111. Thorgeirsson, S.S., *Hepatic stem cells in liver regeneration*. *Faseb J*, 1996. **10**(11): p. 1249-56.
112. Soto-Gutierrez, A., et al., *Differentiation of mouse embryonic stem cells to hepatocyte-like cells by co-culture with human liver nonparenchymal cell lines*. *Nat Protoc*, 2007. **2**(2): p. 347-56.
113. Lagasse, E., et al., *Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo*. *Nat Med*, 2000. **6**(11): p. 1229-34.
114. Austin, T.W. and E. Lagasse, *Hepatic regeneration from hematopoietic stem cells*. *Mech Dev*, 2003. **120**(1): p. 131-5.
115. Lemaigre, F. and K.S. Zaret, *Liver development update: new embryo models, cell lineage control, and morphogenesis*. *Curr Opin Genet Dev*, 2004. **14**(5): p. 582-90.
116. Chagraoui, J., et al., *Fetal liver stroma consists of cells in epithelial-to-mesenchymal transition*. *Blood*, 2003. **101**(8): p. 2973-82.
117. Miyajima, A., et al., *Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development*. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2000. **11**(3): p. 177-83.
118. Dessimoz, J., et al., *FGF signaling is necessary for establishing gut tube domains along the anterior-posterior axis in vivo*. *Mech Dev*, 2006. **123**(1): p. 42-55.
119. McLin, V.A., S.A. Rankin, and A.M. Zorn, *Repression of Wnt/beta-catenin signaling in the anterior endoderm is essential for liver and pancreas development*. *Development*, 2007. **134**(12): p. 2207-17.
120. Wells, J.M. and D.A. Melton, *Early mouse endoderm is patterned by soluble factors from adjacent germ layers*. *Development*, 2000. **127**(8): p. 1563-72.
121. Le Douarin, N.M., et al., *Origin of hemopoietic stem cells in embryonic bursa of Fabricius and bone marrow studied through interspecific chimeras*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(7): p. 2701-5.
122. Gualdi, R., et al., *Hepatic specification of the gut endoderm in vitro: cell signaling and transcriptional control*. *Genes Dev*, 1996. **10**(13): p. 1670-82.

## BIBLIOGRAFÍA

123. Ang, S.L., et al., *The formation and maintenance of the definitive endoderm lineage in the mouse: involvement of HNF3/forkhead proteins*. Development, 1993. **119**(4): p. 1301-15.
124. Monaghan, A.P., et al., *Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm*. Development, 1993. **119**(3): p. 567-78.
125. Ruiz i Altaba, A., et al., *Sequential expression of HNF-3 beta and HNF-3 alpha by embryonic organizing centers: the dorsal lip/node, notochord and floor plate*. Mech Dev, 1993. **44**(2-3): p. 91-108.
126. Arceci, R.J., et al., *Mouse GATA-4: a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart*. Mol Cell Biol, 1993. **13**(4): p. 2235-46.
127. Gao, X., et al., *Distinct functions are implicated for the GATA-4, -5, and -6 transcription factors in the regulation of intestine epithelial cell differentiation*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(5): p. 2901-11.
128. Laverriere, A.C., et al., *GATA-4/5/6, a subfamily of three transcription factors transcribed in developing heart and gut*. J Biol Chem, 1994. **269**(37): p. 23177-84.
129. Cascio, S. and K.S. Zaret, *Hepatocyte differentiation initiates during endodermal-mesenchymal interactions prior to liver formation*. Development, 1991. **113**(1): p. 217-25.
130. Bossard, P. and K.S. Zaret, *GATA transcription factors as potentiators of gut endoderm differentiation*. Development, 1998. **125**(24): p. 4909-17.
131. Cirillo, L.A., et al., *Opening of compacted chromatin by early developmental transcription factors HNF3 (FoxA) and GATA-4*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 279-89.
132. Lee, C.S., et al., *The initiation of liver development is dependent on Foxa transcription factors*. Nature, 2005. **435**(7044): p. 944-7.
133. Holtzinger, A. and T. Evans, *Gata4 regulates the formation of multiple organs*. Development, 2005. **132**(17): p. 4005-14.
134. McKeehan, W.L., F. Wang, and M. Kan, *The heparan sulfate-fibroblast growth factor family: diversity of structure and function*. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol, 1998. **59**: p. 135-76.

## BIBLIOGRAFÍA

135. Szebenyi, G. and J.F. Fallon, *Fibroblast growth factors as multifunctional signaling factors*. *Int Rev Cytol*, 1999. **185**: p. 45-106.
136. Jung, J., et al., *Initiation of mammalian liver development from endoderm by fibroblast growth factors*. *Science*, 1999. **284**(5422): p. 1998-2003.
137. Calmont, A., et al., *An FGF response pathway that mediates hepatic gene induction in embryonic endoderm cells*. *Dev Cell*, 2006. **11**(3): p. 339-48.
138. Dudley, A.T., R.E. Godin, and E.J. Robertson, *Interaction between FGF and BMP signaling pathways regulates development of metanephric mesenchyme*. *Genes Dev*, 1999. **13**(12): p. 1601-13.
139. Solloway, M.J. and E.J. Robertson, *Early embryonic lethality in Bmp5;Bmp7 double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup*. *Development*, 1999. **126**(8): p. 1753-68.
140. Winnier, G., et al., *Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse*. *Genes Dev*, 1995. **9**(17): p. 2105-16.
141. Zhang, C. and T. Evans, *BMP-like signals are required after the midblastula transition for blood cell development*. *Dev Genet*, 1996. **18**(3): p. 267-78.
142. Mishina, Y., et al., *Bmpr encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis*. *Genes Dev*, 1995. **9**(24): p. 3027-37.
143. Roelen, B.A., et al., *Differential expression of BMP receptors in early mouse development*. *Int J Dev Biol*, 1997. **41**(4): p. 541-9.
144. Rossi, J.M., et al., *Distinct mesodermal signals, including BMPs from the septum transversum mesenchyme, are required in combination for hepatogenesis from the endoderm*. *Genes Dev*, 2001. **15**(15): p. 1998-2009.
145. Shin, D., et al., *Bmp and Fgf signaling are essential for liver specification in zebrafish*. *Development*, 2007. **134**(11): p. 2041-50.
146. Bort, R., et al., *Hex homeobox gene controls the transition of the endoderm to a pseudostratified, cell emergent epithelium for liver bud development*. *Dev Biol*, 2006. **290**(1): p. 44-56.
147. Zaret, K.S., *Liver specification and early morphogenesis*. *Mech Dev*, 2000. **92**(1): p. 83-8.

## BIBLIOGRAFÍA

148. Shiojiri, N., *Enzymo- and immunocytochemical analyses of the differentiation of liver cells in the prenatal mouse*. J Embryol Exp Morphol, 1981. **62**: p. 139-52.
149. Bort, R., et al., *Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas*. Development, 2004. **131**(4): p. 797-806.
150. Hunter, M.P., et al., *The homeobox gene Hhex is essential for proper hepatoblast differentiation and bile duct morphogenesis*. Dev Biol, 2007. **308**(2): p. 355-67.
151. Sosa-Pineda, B., J.T. Wigle, and G. Oliver, *Hepatocyte migration during liver development requires Prox1*. Nat Genet, 2000. **25**(3): p. 254-5.
152. Wigle, J.T., et al., *Prox1 function is crucial for mouse lens-fibre elongation*. Nat Genet, 1999. **21**(3): p. 318-22.
153. Margagliotti, S., et al., *The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration*. Dev Biol, 2007. **311**(2): p. 579-89.
154. Papoutsi, M., et al., *Gene regulation by homeobox transcription factor Prox1 in murine hepatoblasts*. Cell Tissue Res, 2007. **330**(2): p. 209-20.
155. Fassler, R. and M. Meyer, *Consequences of lack of beta 1 integrin gene expression in mice*. Genes Dev, 1995. **9**(15): p. 1896-908.
156. Matsumoto, K., et al., *Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function*. Science, 2001. **294**(5542): p. 559-63.
157. Germain, L., M.J. Blouin, and N. Marceau, *Biliary epithelial and hepatocytic cell lineage relationships in embryonic rat liver as determined by the differential expression of cytokeratins, alpha-fetoprotein, albumin, and cell surface-exposed components*. Cancer Res, 1988. **48**(17): p. 4909-18.
158. Shiojiri, N., *The origin of intrahepatic bile duct cells in the mouse*. J Embryol Exp Morphol, 1984. **79**: p. 25-39.
159. Shiojiri, N., *Development and differentiation of bile ducts in the mammalian liver*. Microsc Res Tech, 1997. **39**(4): p. 328-35.
160. Glaser, S., et al., *Heterogeneity of the intrahepatic biliary epithelium*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(22): p. 3523-36.
161. Sell, S., *Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells*. Hepatology, 2001. **33**(3): p. 738-50.

## BIBLIOGRAFÍA

162. Clotman, F., et al., *Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors*. Genes Dev, 2005. **19**(16): p. 1849-54.
163. Antoniou, A., et al., *Intrahepatic bile ducts develop according to a new mode of tubulogenesis regulated by the transcription factor SOX9*. Gastroenterology, 2009. **136**(7): p. 2325-33.
164. Oda, T., et al., *Mutations in the human Jagged1 gene are responsible for Alagille syndrome*. Nat Genet, 1997. **16**(3): p. 235-42.
165. Kodama, Y., et al., *The role of notch signaling in the development of intrahepatic bile ducts*. Gastroenterology, 2004. **127**(6): p. 1775-86.
166. Lorent, K., et al., *Inhibition of Jagged-mediated Notch signaling disrupts zebrafish biliary development and generates multi-organ defects compatible with an Alagille syndrome phenocopy*. Development, 2004. **131**(22): p. 5753-66.
167. Lozier, J., B. McCright, and T. Gridley, *Notch signaling regulates bile duct morphogenesis in mice*. PLoS ONE, 2008. **3**(3): p. e1851.
168. Costa, R.H., D.R. Grayson, and J.E. Darnell, Jr., *Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes*. Mol Cell Biol, 1989. **9**(4): p. 1415-25.
169. Costa, R.H., et al., *Similarities in transthyretin gene expression and differences in transcription factors: liver and yolk sac compared to choroid plexus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(17): p. 6589-93.
170. Hahn-Windgassen, A. and M.R. Van Gilst, *The Caenorhabditis elegans HNF4alpha Homolog, NHR-31, mediates excretory tube growth and function through coordinate regulation of the vacuolar ATPase*. PLoS Genet, 2009. **5**(7): p. e1000553.
171. Palanker, L., et al., *Drosophila HNF4 regulates lipid mobilization and beta-oxidation*. Cell Metab, 2009. **9**(3): p. 228-39.
172. Cheng, W., et al., *HNF factors form a network to regulate liver-enriched genes in zebrafish*. Dev Biol, 2006. **294**(2): p. 482-96.
173. Duncan, S.A., A. Nagy, and W. Chan, *Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos*. Development, 1997. **124**(2): p. 279-87.

## BIBLIOGRAFÍA

174. Li, J., G. Ning, and S.A. Duncan, *Mammalian hepatocyte differentiation requires the transcription factor HNF-4alpha*. *Genes Dev*, 2000. **14**(4): p. 464-74.
175. Odom, D.T., et al., *Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors*. *Science*, 2004. **303**(5662): p. 1378-81.
176. Parviz, F., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis*. *Nat Genet*, 2003. **34**(3): p. 292-6.
177. Kamiya, A., T. Kinoshita, and A. Miyajima, *Oncostatin M and hepatocyte growth factor induce hepatic maturation via distinct signaling pathways*. *FEBS Lett*, 2001. **492**(1-2): p. 90-4.
178. Kamiya, A., et al., *Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer*. *Embo J*, 1999. **18**(8): p. 2127-36.
179. Kamiya, A. and F.J. Gonzalez, *TNF-alpha regulates mouse fetal hepatic maturation induced by oncostatin M and extracellular matrices*. *Hepatology*, 2004. **40**(3): p. 527-36.
180. Dan, Y.Y. and G.C. Yeoh, *Liver stem cells: a scientific and clinical perspective*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2008. **23**(5): p. 687-98.
181. Horslen, S.P. and I.J. Fox, *Hepatocyte transplantation*. *Transplantation*, 2004. **77**(10): p. 1481-6.
182. McKenzie, T.J., J.B. Lillegard, and S.L. Nyberg, *Artificial and bioartificial liver support*. *Semin Liver Dis*, 2008. **28**(2): p. 210-7.
183. Fausto, N., *Liver regeneration and repair: hepatocytes, progenitor cells, and stem cells*. *Hepatology*, 2004. **39**(6): p. 1477-87.
184. Oertel, M. and D.A. Shafritz, *Stem cells, cell transplantation and liver repopulation*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1782**(2): p. 61-74.
185. Fougere-Deschatrette, C., et al., *Plasticity of hepatic cell differentiation: bipotential adult mouse liver clonal cell lines competent to differentiate in vitro and in vivo*. *Stem Cells*, 2006. **24**(9): p. 2098-109.
186. Schmelzer, E., E. Wauthier, and L.M. Reid, *The phenotypes of pluripotent human hepatic progenitors*. *Stem Cells*, 2006. **24**(8): p. 1852-8.

## BIBLIOGRAFÍA

187. Jelnes, P., et al., *Remarkable heterogeneity displayed by oval cells in rat and mouse models of stem cell-mediated liver regeneration*. Hepatology, 2007. **45**(6): p. 1462-70.
188. Apte, U., et al., *Wnt/beta-catenin signaling mediates oval cell response in rodents*. Hepatology, 2008. **47**(1): p. 288-95.
189. Bird, T.G., S. Lorenzini, and S.J. Forbes, *Activation of stem cells in hepatic diseases*. Cell Tissue Res, 2008. **331**(1): p. 283-300.
190. Hu, M., et al., *Wnt/beta-catenin signaling in murine hepatic transit amplifying progenitor cells*. Gastroenterology, 2007. **133**(5): p. 1579-91.
191. Lavon, N. and N. Benvenisty, *Study of hepatocyte differentiation using embryonic stem cells*. J Cell Biochem, 2005. **96**(6): p. 1193-202.
192. D'Amour, K.A., et al., *Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(12): p. 1534-41.
193. Kubo, A., et al., *Development of definitive endoderm from embryonic stem cells in culture*. Development, 2004. **131**(7): p. 1651-62.
194. Gouon-Evans, V., et al., *BMP-4 is required for hepatic specification of mouse embryonic stem cell-derived definitive endoderm*. Nat Biotechnol, 2006. **24**(11): p. 1402-11.
195. Agarwal, S., K.L. Holton, and R. Lanza, *Efficient differentiation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells*. Stem Cells, 2008. **26**(5): p. 1117-27.
196. Cai, J., et al., *Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells*. Hepatology, 2007. **45**(5): p. 1229-39.
197. Heo, J., et al., *Hepatic precursors derived from murine embryonic stem cells contribute to regeneration of injured liver*. Hepatology, 2006. **44**(6): p. 1478-86.
198. Sharma, A.D., et al., *Murine embryonic stem cell-derived hepatic progenitor cells engraft in recipient livers with limited capacity of liver tissue formation*. Cell Transplant, 2008. **17**(3): p. 313-23.
199. Si-Tayeb, K., et al., *Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 297-305.

## BIBLIOGRAFÍA

200. Sullivan, G.J., et al., *Generation of functional human hepatic endoderm from human induced pluripotent stem cells*. Hepatology, 2010. **51**(1): p. 329-35.
201. Mountford, P., et al., *Dicistronic targeting constructs: reporters and modifiers of mammalian gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4303-7.
202. Robertson, E., et al., *Germ-line transmission of genes introduced into cultured pluripotential cells by retroviral vector*. Nature, 1986. **323**(6087): p. 445-8.
203. Xu, C.R., et al., *Chromatin "prepattern" and histone modifiers in a fate choice for liver and pancreas*. Science, 2011. **332**(6032): p. 963-6.
204. Zhao, R., et al., *GATA6 is essential for embryonic development of the liver but dispensable for early heart formation*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(7): p. 2622-31.
205. Watt, A.J., et al., *Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4*. BMC Dev Biol, 2007. **7**: p. 37.
206. Keng, V.W., et al., *Homeobox gene Hex is essential for onset of mouse embryonic liver development and differentiation of the monocyte lineage*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **276**(3): p. 1155-61.
207. Martinez Barbera, J.P., et al., *The homeobox gene Hex is required in definitive endodermal tissues for normal forebrain, liver and thyroid formation*. Development, 2000. **127**(11): p. 2433-45.
208. Wallace, K.N., et al., *Zebrafish hhhex regulates liver development and digestive organ chirality*. Genesis, 2001. **30**(3): p. 141-3.
209. Silva, J., et al., *Nanog promotes transfer of pluripotency after cell fusion*. Nature, 2006. **441**(7096): p. 997-1001.
210. Lin, T., et al., *p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(2): p. 165-71.
211. Hyslop, L., et al., *Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages*. Stem Cells, 2005. **23**(8): p. 1035-43.
212. Hamazaki, T., et al., *Aggregation of embryonic stem cells induces Nanog repression and primitive endoderm differentiation*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 23): p. 5681-6.

## BIBLIOGRAFÍA

213. Gaunt, S.J., M. Blum, and E.M. De Robertis, *Expression of the mouse goosecoid gene during mid-embryogenesis may mark mesenchymal cell lineages in the developing head, limbs and body wall*. *Development*, 1993. **117**(2): p. 769-78.
214. Futaki, S., et al., *Sox7 plays crucial roles in parietal endoderm differentiation in F9 embryonal carcinoma cells through regulating Gata-4 and Gata-6 expression*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(23): p. 10492-503.
215. Shimosato, D., M. Shiki, and H. Niwa, *Extra-embryonic endoderm cells derived from ES cells induced by GATA factors acquire the character of XEN cells*. *BMC Dev Biol*, 2007. **7**: p. 80.
216. Ludwig, J., *New concepts in biliary cirrhosis*. *Semin Liver Dis*, 1987. **7**(4): p. 293-301.
217. Montserrat, N., et al., *Repression of E-cadherin by SNAIL, ZEB1, and TWIST in invasive ductal carcinomas of the breast: a cooperative effort?* *Hum Pathol*, 2011. **42**(1): p. 103-10.
218. Peinado, H., et al., *Snail mediates E-cadherin repression by the recruitment of the Sin3A/histone deacetylase 1 (HDAC1)/HDAC2 complex*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(1): p. 306-19.
219. Sanchez-Tillo, E., et al., *ZEB1 represses E-cadherin and induces an EMT by recruiting the SWI/SNF chromatin-remodeling protein BRG1*. *Oncogene*, 2010. **29**(24): p. 3490-500.
220. Guaita, S., et al., *Snail induction of epithelial to mesenchymal transition in tumor cells is accompanied by MUC1 repression and ZEB1 expression*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(42): p. 39209-16.
221. Barker, T.H., et al., *Thy-1 regulates fibroblast focal adhesions, cytoskeletal organization and migration through modulation of p190 RhoGAP and Rho GTPase activity*. *Exp Cell Res*, 2004. **295**(2): p. 488-96.
222. Richards, M., et al., *The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE*. *Stem Cells*, 2004. **22**(1): p. 51-64.
223. Deza, M. and E. Deza, *Encyclopedia of distances 2009*, Dordrecht New York: Springer Verlag. xiv, 590 p.
224. Silva, J., et al., *Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition*. *PLoS Biol*, 2008. **6**(10): p. e253.
225. Murray, P. and D. Edgar, *The regulation of embryonic stem cell differentiation by leukaemia inhibitory factor (LIF)*. *Differentiation*, 2001. **68**(4-5): p. 227-34.

## BIBLIOGRAFÍA

226. Mathew, R., et al., *Robust activation of the human but not mouse telomerase gene during the induction of pluripotency*. *Faseb J*, 2010. **24**(8): p. 2702-15.
227. Banito, A., et al., *Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells*. *Genes Dev*, 2009. **23**(18): p. 2134-9.
228. Hara, E., et al., *Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence*. *Mol Cell Biol*, 1996. **16**(3): p. 859-67.
229. Nakagawa, M., et al., *Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts*. *Nat Biotechnol*, 2008. **26**(1): p. 101-6.
230. Cherry, S.R., et al., *Retroviral expression in embryonic stem cells and hematopoietic stem cells*. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(20): p. 7419-26.
231. Papapetrou, E.P., et al., *Stoichiometric and temporal requirements of Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc expression for efficient human iPSC induction and differentiation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(31): p. 12759-64.
232. Welstead, G.G., T. Brambrink, and R. Jaenisch, *Generating iPSC cells from MEFS through forced expression of Sox-2, Oct-4, c-Myc, and Klf4*. *J Vis Exp*, 2008(14).
233. Pera, M.F. and P.P. Tam, *Extrinsic regulation of pluripotent stem cells*. *Nature*, 2010. **465**(7299): p. 713-20.
234. Cox, J.L. and A. Rizzino, *Induced pluripotent stem cells: what lies beyond the paradigm shift*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010. **235**(2): p. 148-58.
235. Aries, A., et al., *Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(18): p. 6975-80.
236. Charron, F., et al., *Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(6): p. 4355-65.
237. Shi, Y., M.D. Schonemann, and S.H. Mellon, *Regulation of P450c17 expression in the early embryo depends on GATA factors*. *Endocrinology*, 2009. **150**(2): p. 946-56.
238. Huang, P., et al., *Induction of functional hepatocyte-like cells from mouse fibroblasts by defined factors*. *Nature*, 2011. **475**(7356): p. 386-9.

## BIBLIOGRAFÍA

239. Varlakhanova, N.V., et al., *myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal*. Differentiation, 2010. **80**(1): p. 9-19.
240. Efe, J.A., et al., *Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(3): p. 215-22.
241. Spath, G.F. and M.C. Weiss, *Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells*. J Cell Biol, 1998. **140**(4): p. 935-46.
242. Sekiya, S. and A. Suzuki, *Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors*. Nature, 2011. **475**(7356): p. 390-3.
243. Cirillo, L.A. and K.S. Zaret, *An early developmental transcription factor complex that is more stable on nucleosome core particles than on free DNA*. Mol Cell, 1999. **4**(6): p. 961-9.
244. Miranda-Carboni, G.A., et al., *GATA4 regulates estrogen receptor-alpha-mediated osteoblast transcription*. Mol Endocrinol, 2011. **25**(7): p. 1126-36.
245. Messerschmidt, D.M. and R. Kemler, *Nanog is required for primitive endoderm formation through a non-cell autonomous mechanism*. Dev Biol, 2010. **344**(1): p. 129-37.
246. Qin, H., et al., *Transcriptional analysis of pluripotency reveals the Hippo pathway as a barrier to reprogramming*. Hum Mol Genet, 2012. **21**(9): p. 2054-67.
247. Llus, F., et al., *T-cell factor 3 (Tcf3) deletion increases somatic cell reprogramming by inducing epigenome modifications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(29): p. 11912-7.
248. Shah, S.N., et al., *HMGA1 reprograms somatic cells into pluripotent stem cells by inducing stem cell transcriptional networks*. PLoS ONE, 2012. **7**(11): p. e48533.
249. Serrano, F., et al., *Gata4 blocks somatic cell reprogramming by directly repressing nanog*. Stem Cells, 2013. **31**(1): p. 71-82.

## BIBLIOGRAFÍA