



VNIVERSITAT
E VALÈNCIA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y
Antropología Física, Instituto ERI BioTECMED

Doctorado en Neurociencias

**Papel de la impronta genómica y su regulación
epigenética en células madre neurales: relación
con la formación de tumores**

Anna Lozano Ureña

Directoras de Tesis

Sacri R. Ferrón e Isabel Fariñas

Valencia, enero de 2021

Dña. Sacramento Rodríguez Ferrón, investigadora "Post Ramón y Cajal" y Dña. Isabel Fariñas Gómez Catedrática ambas del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física, y del Instituto de investigación ERI de Biotecnología y Biomedicina (BioTECMED) de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Valencia

INFORMAN QUE:

Dña. Anna Lozano Ureña, graduada en Bioquímica y Ciencias Biomédicas por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado "*Papel de la impronta genómica y su regulación epigenética en células madre neurales: relación con la formación de tumores*", y que hallándose concluida, autorizan su presentación, a fin de que pueda ser juzgado por el Tribunal correspondiente para la obtención del grado de Doctor por la Universitat de València.

Y para que conste, en cumplimiento de la legislación, firman el presente informe en Burjassot, a 15 de enero del 2021.

Dña. Isabel Fariñas Gómez

Dña. Sacramento Rodríguez Ferrón

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido posible gracias a un contrato predoctoral financiado por *Subvenciones a la contratación de investigadores predoctorales en formación* de la Generalitat Valenciana (ACIF2016).

La investigación realizada ha sido financiada por los siguientes proyectos de investigación:

- *“Impronta genómica en la especificación de las células madre neurales: desregulación en síndromes humanos y cáncer cerebral”*. Plan Nacional de I+D+I Ministerio de Ciencia e Innovación, PID2019-110045GB-I00 (2020-2023). IP: [Sacri R. Ferrón](#).

- *“Identificación de las aberraciones de la impronta genómica durante la formación de tumores en el cerebro adulto”*. Subvenciones para grupos de investigación consolidables Generalitat Valenciana AICO/2020/367 (2020-2021). IP: [Sacri R. Ferrón](#).

- *“Regulación del comportamiento de las células madre neurales por el medio sistémico: el nicho extendido”*. Ministerio de Economía y Competitividad, SAF2017-86690-R (2018-2020) IP: [Isabel Fariñas](#)

- *“Papel de la impronta genómica y su regulación epigenética en células madre neurales: relación con la formación de tumores”*. Plan Nacional de I+D+I MINECO, Ministerio de Economía y Competitividad, SAF2016-78845-R (2016-2019). IP: [Sacri R. Ferrón](#).

- *“Efectos directos y remotos de la respuesta inflamatoria sobre las células madre neurales”*. Generalitat Valenciana, Prometeo de Proyectos de Excelencia, PROMETEO/2017/030 (2017-2021). IP: [Isabel Fariñas](#)

*A mis padres,
Carmen y Guillermo*

*A mi hermana y cuñado,
Elena y Paco*

*A mis sobrinos,
Paula y Guillem*

A Lluís

Nadie dijo que fuera fácil. De hecho, dicen todo lo contrario. Encontrar una historia, una buena historia, y plasmarla en un papel no es tarea sencilla. Tampoco lo es expresar lo agradecida que estoy por haber tenido la oportunidad de contar esta historia, pero no puedo cerrar este libro sin dar las gracias a aquellos que han formado parte de él.

Debo comenzar por vosotras, Sacri e Isabel, que me habéis dado la oportunidad de desarrollar no solo un trabajo, sino una pasión. Vuestras enseñanzas, la manera de transmitir y la ilusión con la que lo hacéis, lo increíblemente buenas investigadoras que sois y lo mucho que os preocupáis por vuestra gente, no es fácil de encontrar, y estoy segura que es la razón por la que sigo enamorada de este trabajo. Habéis sido y seguiréis siendo mis referentes. Sacri, a ti quiero decirte que has sido una increíble mentora en todos los sentidos. Me has enseñado cada cosa que sé de ciencia, pero también has contribuido enormemente a mi crecimiento personal. Has creído en mí, y me has apoyado en todo momento. Has convertido cada experimento en un reto emocionante al que enfrentarse. Por todo ello, te estoy enormemente agradecida, pero ninguna palabra podría expresarlo adecuadamente, simplemente, sin ti, no hubiera sido posible. Gracias.

Y como en toda buena historia, el contexto es clave para su desarrollo. Es aquí donde encontramos a los “neuromoles”. Sería imposible nombraros uno a uno, pero podéis estar seguros que cada uno de vosotros ha dejado huella. Siempre estáis ahí para decir la palabra de aliento que se necesita, para dar el consejo que resuelve el problema, para apoyar y escuchar. Porque todos sabemos que no somos únicamente un grupo de trabajo, somos un grupo de amigos, en el que nunca faltará un buen disfraz de pirata o de oveja, pijama, peluca, capa de mago o un micrófono; pero lo que sobre todo nunca faltará, es un abrazo. Tan útiles han sido vuestros consejos científicos como los personales. Isabel y Cristina, no solo sois científicas brillantes, si no que estáis formado gente brillante. Mis primeros pasos se hicieron rodeados de las gentes de Fariñas’ lab, con los que pensé que no había mejor grupo con el que “rodearse”, pero más tarde, tuve la suerte de poder acercarme al grupo de Cris’ lab, otro grupo de gentes increíbles. Con vosotros ha sido como si siempre hubierais formado parte de esta historia. Las risas, las conversaciones, las chorradas, han sido un bálsamo en los peores momentos.

Pero debo mencionar a un personaje especial en la historia. Raquel, aunque ya no estás en el lab, no puedo dejar de sentir que sigues siendo mi compañera de bancada. Tú has sido testigo de todos mis fracasos y logros, y los hemos hecho nuestros. Me has enseñado qué es ser una buena científica y una buena amiga. Tuviste que soportar mis constantes preguntas y jamás menguaste tu sonrisa, jamás desististe en tu trabajo, en tu empeño y en tu ilusión. Siempre has sido un ejemplo para mí. Solo tengo palabras de agradecimiento porque jamás me hubiera imaginado una compañera mejor en esta travesía. Como tú dijiste en tu tesis, “formamos un equipo y este éxito

también es tuyo". Pero este equipo también ha ido creciendo, y este trabajo tampoco hubiera sido posible sin la enorme y constante ayuda de Esteban y Alejandro. Creo que no he conocido a personas más desinteresadas y trabajadoras como vosotros. Os agradezco tanto vuestra infinita ayuda, y siempre con la mejor de las sonrisas. Da gusto trabajar con gente como vosotros. Me alegra saber que seréis vosotros los que continúen el segundo capítulo de esta historia.

¿Y qué es una buena historia sin viajes? Mi estancia en Cambridge fue corta, pero intensa. He tenido la oportunidad de formar parte de un gran grupo que me ha permitido experimentar nuevas experiencias y a valerme por mi misma. Por eso, también tengo que agradecer a Anne Ferguson-Smith que me acogiese, a Mitsu que me llamó fin de semana y noche también para asegurarse que los resultados de pirosecuenciación salían bien, y a tiempo! Pero hay otro viaje que debo mencionar. Este incluso más corto. Tan solo fueron unos días, però et vaig conèixer. Vas aparèixer en el moment més inesperat, i et vas quedar per a revolucionar la meua vida. Són tantes les coses que m'has ensenyat, científica i personalment. I sé, que amb tú, continuaré creixent i podré amb cada nova història que es presente. Eres mi Cajal Girona.

Para cerrar capítulo, gracias a mis compañeros de vida, mis amigos y amigas, Violeta, Clara, Andrea, Vicente, Sara y Willy,... que siempre, siempre, por mucho que el tiempo pase, estáis ahí. Pero, sobre todo, gracias a mi familia. Mi apoyo incondicional, mi mejor modelo. Mis padres, Carmen y Guillermo, me habéis enseñado que los duros momentos siempre se superan, que no importan las adversidades porque siempre nos tendremos los unos a los otros. Vosotros sí sois los héroes de esta historia, luchadores, bondadosos, altruistas, en fin, se me acabarían los adjetivos. Soy quien soy por vosotros. Y por ti, Elena. Siempre has sido mi referente, la persona en la que me quería convertir, mi guía. Paula i Guillem, encara sou molt xicotets, però no ho sembla. És increïble vore créixer a unes personetes tan literal i figuradament. I encara és més increïble com es pot estimar tant als nebots.

A todos los que formáis parte de mi vida, eternamente, gracias.

*“Las preguntas que no podemos contestar son las que más nos enseñan. Nos enseñan a pensar.
Si le das a alguien una respuesta, lo único que obtiene es cierta información.
Pero si le das una pregunta, él buscara sus propias respuestas.”*

*“Todos tenemos dos mentes: una mente despierta y una mente dormida.
Nuestra mente despierta es la que piensa, habla y razona.
Pero la mente dormida es la más poderosa.
Ella ve en lo más profundo de las cosas.
Es la parte de nosotros que sueña.
Lo recuerda todo. Nos proporciona intuición.
Tu mente despierta no entiende la naturaleza de los nombres.
Pero tu mente dormida sí.
Ella sabe muchas cosas que tu mente despierta ignora.”*

El nombre del viento – Patrick Rothfuss

Índice

Índice

Introducción	1
Del cigoto a la célula madre adulta	3
SCs neurales y neurogénesis adulta en mamíferos	4
Regulación epigenética de la neurogénesis adulta	8
Impronta genómica y regulación de la dosis génica	11
Reprogramación celular y adquisición de un estado pluripotente	17
Cáncer cerebral: teoría de la célula madre cancerosa y glioblastoma	24
Impronta genómica y cáncer	33
Objetivos	35
Material y Métodos	39
1. Animales experimentales	41
1.1. Cepas murinas	41
1.2. Genotipado	43
2. Cultivos celulares	44
2.1. Cultivo de MEFs	44
2.2. Cultivo de células NSCs adultas	45
2.3. Cultivo de líneas de GBM murinas	48
2.4. Criopreservación y descongelación de las células	49
3. Reprogramación <i>in vitro</i> mediante el tratamiento con doxiciclina	49
3.1. Reprogramación de MEFs	49
3.2. Reprogramación de NSCs adultas	50
3.3. Obtención del factor inhibidor de leucemia (LIF)	52
4. Caracterización de las iPSCs	53
4.1. Detección de la actividad fosfatasa alcalina (AP)	53
4.2. Formación de cuerpos embrioides (EBs)	54
4.3. Cariotipado de iPSCs	56
4.4. Reactivación del cromosoma X	56
4.5. Diferenciación de las iPSCs a NP	56
5. Reprogramación <i>in vivo</i> mediante el tratamiento con doxiciclina	57
5.1. Reprogramación <i>in vivo</i> de la cepa i4F-B	57
5.2. Reprogramación <i>in vivo</i> de la cepa GFAP-rtTA;i4F	58
5.3. Cultivo de células de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F reprogramados	58
6. Caracterización de las líneas de GBM	59

6.1. Nucleofección de líneas celulares de GBM	59
6.2. Estudio del ciclo celular	60
6.3. Ensayo de tumoresferas	60
6.4. Ensayo de proliferación mediante marcaje con EdU	61
6.5. Ensayo de adhesión	61
6.6. Ensayo de angiogénesis	62
7. Estudio de la capacidad de formación de tumores	63
8. Detección <i>in situ</i> de proteínas	64
8.1. Inmunohisto/citoquímica	64
8.2. Citometría de flujo	66
9. Extracción de RNA y análisis de la expresión génica	67
10. Estudio del estado de impronta genómica	68
10.1. Identificación de polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs)	68
10.2. Determinación de la expresión alelo-específica	69
11. Estudio de la metilación del DNA en regiones de control de impronta genómica	71
11.1. Extracción del DNA genómico	71
11.2. Análisis de la metilación por pirosecuenciación	71
12. Análisis estadístico de los datos	74
Resultados	75
1. La reprogramación de las NSCs a iPSCs <i>in vitro</i> se asocia con cambios en la expresión y el estado epigenético de genes improntados	79
1.1. Las NSCs aisladas de ratones reprogramables i4F-B adquieren un estado pluripotente <i>in vitro</i>	79
1.2. Las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas pueden ser diferenciadas a precursores neurales	88
1.3. La reprogramación de las NSCs adultas de ratones i4F-B a iPSCs produce alteraciones en la expresión de genes improntados	90
1.4. La reprogramación de NSCs a iPSCs se asocia con cambios en el estado epigenético de genes improntados	92
1.4.1. La reprogramación de NSCs adultas a iPSCs causa hipometilación en las ICRs que controlan las regiones de impronta genómica	93
1.4.2. La reprogramación de NSCs adultas a iPSCs conlleva cambios en el estado de impronta del gen <i>Dlk1</i>	97
2. El proceso de impronta genómica sufre alteraciones durante la reprogramación y formación de tumores cerebrales <i>in vivo</i>	103

2.1. La expresión de genes improntados se encuentra alterada en GBM	103
2.2. El proceso de impronta genómica se ve alterado durante la formación de tumores cerebrales	107
2.2.1. La reprogramación in vivo de animales GFAP-rtTA; <i>i4F</i> induce la formación de tumores cerebrales	107
2.2.2. Los tumores cerebrales formados muestran cambios de expresión en genes improntados	126
3. La enzima TET3 previene la formación del GBM a través de la regulación epigenética de genes improntados	131
3.1. <i>TET3</i> disminuye en GBM humano	131
3.2. TET3 controla el comportamiento tumoral de las células de GBM murino in vitro	132
3.3. La sobre-expresión de <i>Tet3</i> previene la formación de tumores in vivo	137
3.4. TET3 regula la expresión de los genes improntados en el GBM	139
Figuras suplementarias	143
Discusión	151
Conclusions	167
Bibliografía	171
Summary	195
Resumen	209
Publicaciones	225

Lista de abreviaturas

5caC	5-carboxylcytosine	EGFR	epidermal grow factor receptor
5fC	5-formylcytosine	EMT	epithelial-mesenchymal transition
5hmC	5-hydroxymethylcytosine	ESC	embryonic stem cell
5mC	5-methylcytosine	FACS	fluorescent activated cell sorting
aNSC	active NSC	FBS	foetal bovine serum
AP	alkaline phophatase	FGF	fibroblast grow factor
AS	Angelman syndrome	GBM	glioblastoma
BLBP	brain lipid-binding protein	gDNA	genomic DNA
bp	base pair	GFAP	glial fibrillary acidic protein
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridine	GFP	green fluorescent protein
BSA	bovine serum albumin	GLAST	astrocyte-specific glutamate aspartate transporters
BWS	Beckwith- Wiedemann syndrome	GSC	glioma stem cell
CAST	Mus musculus castaneus (CAST/Ei)	GSK3	glycogen synthase kinase 3
CB	cerebellum	H	histone
CC	corpus callosum	HM	hormone mix
CDKN1C	cycline dependent kinase inhibitor 1c	Hoxp	Homeodomain-only protein
CDmut	catalytic domain mutated	ICC	inmunocitoquímica
cDNA	complementary DNA	ICM	inner cell mass
CSC	cancer stem cell	ICR	imprinting control region
CSF	cerebrospinal fluid	IGF2	insulin growth factor 2
Cr	chromosome	IHC	immunohistochemistry
DAPI	4',6-diamidine-2'-phenylindole	iPSC	induced pluripotent stem cell
DCX	doublecortin	iPSC-MEF	induced pluripotent stem cell from MEFs
DFFDA	cell trace Oregon Green 488 Carboxyl-DFFSA-SE	iPSC-NSC	induced pluripotent stem cell from NSCs
DG	dentate gyrus	LIF	leukaemia inhibitor factor
DIV	days <i>in vitro</i>	LOI	loss of imprinting
DLK1	delta-like homologue 1	MAPK	mitogen-activated protein kinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	MEF	mouse embryonic fibroblast
DMR	differentially methylated region	MEG3	maternal expression gene 3
DMSO	dimethyl sulfoxide	mRNA	messenger RNA
DNA	deoxyribonucleic acid	Nº cat.	catalogue number
DNMT	DNA methyltransferase	NP	neuroprogenitor
d.p.c	<i>day post-coitum</i>	NSC	neural stem cell
E	embryonic	OB	olfactory bulb
EB	embryoid body	OSKM	Oct4, Sox2, Klf4 and c-Myc factors
EBSS	Earle's Balanced Salt solution	P	postnatal
EDTA	ethylendiaminoetetracetic acid	PBS	phosphate buffer saline
EdU	5-ethynyl-2'-deoxyuridine	PCR	polymerase chain reaction
EGF	epidermal grow factor		

PDGFA	platelet-Derived Growth Factor A	SNP	single nucleotide polymorphisms
PEG	paternal expression gene	SNRPN	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N
PFA	paraformaldehyde	SOX2	SRY-sex determining region Y- box 2
PGC	primordial germ cell	SSEA1	stage-specific embryonic antigen 1
PI3K	phosphoinosite 3-kinase	SVZ	subventricular zone
pNSC	primed NSC	T/E	trypsin/EDTA
PWS	Prader-Willi Syndrome	TDG	thymidine DNA glycosylase
qNSC	quiescent NSC	TET	ten-eleven translocation protein
qPCR	quantitative PCR	U	units
RA	retinoic acid	VL	lateral ventricle
RG	radial glia	WT	wild type
RMS	rostral migratory stream	Xa	active X chromosome
RNA	ribonucleic acid	XCI	X chromosome inactivation
RT	retrotranscription	XCR	X chromosome reactivation
rtTA	transcriptional activator	Xi	inactive X chromosome
SC	stem cell	ZFP57	kruppel-like zinc finger protein
SCNT	somatic cell nuclear transfer		
scRNA-seq	single-cell RNA sequencing		
SGZ	subgranular zone		
SHH	sonic hedgehog		
SNC	central nervous system		

Índice de Figuras y Tablas

Introducción

Figura 1. Potencial de desarrollo de los distintos tipos de SCs.	4
Figura 2. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto de mamíferos.	6
Figura 3. Origen embrionario de las NSCs adultas en la SVZ y la SGZ en roedores.	7
Figura 4. Mecanismos epigenéticos de regulación génica.	10
Figura 5. Los genes improntados son regulados por metilación en las regiones de control de impronta (ICR).	12
Figura 6. Los genes improntados se organizan en <i>clusters</i> .	13
Figura 7. Establecimiento y mantenimiento de la impronta genómica durante el desarrollo.	15
Figura 8. DMRs germinales y somáticas en las regiones de impronta.	16
Figura 9. Cronología de los principales descubrimientos en la reprogramación celular.	18
Figura 10. Eventos moleculares clave durante el proceso de reprogramación celular.	20
Figura 11. Las NSCs adultas de la SVZ se transforman en CSCs que migran y forman el GBM en regiones distales.	28
Figura 12. Modelos murinos de generación de GBM.	32
Figura 13. La LOI en las SCs adultas da lugar a diferentes tipos celulares fisiológicos y tumorales con esta alteración epigenética.	34
Tabla 1. Sistemas de reprogramación celular <i>in vitro</i> .	22
Tabla 2. Clasificación de los gliomas en función de su origen celular.	26
Tabla 3. Marcadores moleculares asociados al GBM.	30

Material y Métodos

Figura 14. Generación de ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F e i4F-B.	43
Figura 15. Obtención de células madre neurales de la SVZ de ratones adultos.	46
Figura 16. Reprogramación <i>in vitro</i> de MEFs y NSCs de ratones reprogramables i4F-B con doxiciclina.	51
Figura 17. Diferenciación de iPSCs en EBs.	55
Figura 18. Vectores para la sobre-expresión de <i>Tet3</i> en el GBM.	59
Figura 19. Esquema del análisis de metilación de DMRs mediante pirosecuenciación.	74
Tabla 4. Cebadores y condiciones de PCR para el genotipado de las cepas murinas.	44
Tabla 5. Preparación del medio MEF.	45
Tabla 6. Preparación del medio NSC control.	47
Tabla 7. Preparación del medio NSC completo.	47
Tabla 8. Preparación de la Mix Hormonal 10x.	48
Tabla 9. Preparación del medio GBM.	49
Tabla 10. Preparación del medio KsR/LIF.	52
Tabla 11. Preparación del medio ES/LIF.	52
Tabla 12. Preparación del medio 2i/LIF.	53
Tabla 13. Preparación de la Mix Hormonal (HM) N2 10x.	53
Tabla 14. Preparación del medio EB.	54
Tabla 15. Preparación del medio NPs.	57
Tabla 16. Preparación del medio SnI.	62

Tabla 17. Preparación del medio de células endoteliales.	63
Tabla 18. Listado de anticuerpos primarios utilizados.	65
Tabla 19. Listado de anticuerpos secundarios utilizados.	66
Tabla 20. Solución de bloqueo para citometría de flujo.	66
Tabla 21. Listado de cebadores utilizados para SYBR Green.	67
Tabla 22. Listado de sondas Taqman murinas utilizadas.	68
Tabla 23. Listado de cebadores utilizados para la detección de SNPs en los genes improntados.	70
Tabla 24. Listado de cebadores utilizados para el estudio de la metilación de los genes improntados.	73

Resultados

Figura 20. MEFs de ratones i4F-B portadores del transgén OSKM se reprograman <i>in vitro</i> mediante el tratamiento con doxiciclina.	82
Figura 21. Las NSCs adultas i4F-B pueden ser reprogramadas a iPSCs <i>in vitro</i> .	84
Figura 22. Las iPSCs generadas a partir de NSCs mantienen la dotación cromosómica y reactivan el cromosoma X silenciado.	86
Figura 23. Las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas de ratones i4F-B generan células pertenecientes a las tres capas embrionarias.	87
Figura 24. Las iPSCs generadas a partir de NSCs i4F-B forman células de las tres capas embrionarias <i>in vivo</i> .	89
Figura 25. Las iPSCs generadas a partir de NSCs pueden diferenciarse a neuroprogenitores.	91
Figura 26. La reprogramación de NSCs a iPSCs conlleva cambios reversibles en la expresión de genes improntados.	93
Figura 27. Los procesos de desdiferenciación y rediferenciación alteran la expresión de los genes improntados.	94
Figura 28. La reprogramación de NSCs a iPSCs conlleva la hipometilación de las regiones de control de impronta.	96
Figura 29. El estado de impronta genómica de <i>Dlk1</i> se ve alterado durante el proceso de reprogramación y diferenciación neural.	101
Figura 30. La reprogramación de NSCs adultas en iPSCs altera la expresión del gen improntado <i>Dlk1</i> y su estado de impronta.	102
Figura 31. Las muestras de pacientes de GBM muestran alteraciones significativas en los niveles de expresión de genes improntados.	104
Figura 32. El perfil de expresión de los genes improntados define las subpoblaciones del GBM y las distingue de poblaciones no tumorales.	105
Figura 33. La expresión de genes improntados se ve alterada en GBM.	107
Figura 34. Los ratones i4F-B portadores del transgén OSKM activan su expresión tras el tratamiento con doxiciclina.	109
Figura 35. Los ratones i4F-B portadores del transgén no se reprograman eficientemente en el cerebro.	110
Figura 36. El cerebro de los ratones GFAP-rtTA;i4F se reprograma tras el tratamiento con doxiciclina.	112
Figura 37. Tumores en ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados con doxiciclina <i>in vivo</i> .	114

Figura 38. Tumores sólidos en animales reprogramables GFAP-rtTA;i4F expresan marcadores tumorales y de reprogramación.	115
Figura 39. Resumen de la expresión génica en tumores de animales reprogramables GFAP-rtTA;i4F.	116
Figura 40. La reprogramación en el cerebro de los animales GFAP-rtTA;i4F da lugar a la formación de tumores de tipo GBM.	118
Figura 41. Los animales control no expresan marcadores tumorales asociados a GBM.	119
Figura 42. Los animales GFAP-rtTA;i4F presentan tumores tipo teratoma.	120
Figura 43. Los tumores formados a partir de la reprogramación de animales GFAP-rtTA;i4F podrían tener origen en las SVZ y migrar para formar el tumor.	121
Figura 44. Los cultivos celulares de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F muestran propiedades de crecimiento distintas a las NSCs.	123
Figura 45. Los cultivos de ratones GFAP-rtTA;i4F comparten alteraciones asociadas a las GSCs.	125
Figura 46. La reprogramación de ratones GFAP-rtTA;i4F conlleva alteraciones en la expresión de genes improntados.	127
Figura 47. Los cultivos celulares obtenidos de cerebros de ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados <i>in vivo</i> presentan alteraciones en la expresión de genes improntados.	128
Figura 48. La expresión de <i>TET3</i> disminuye en GBM humano.	132
Figura 49. La expresión de <i>Tet3</i> está disminuida en el GBM murino.	133
Figura 50. La sobre-expresión de <i>Tet3</i> promueve la transición pro-neural del GBM.	134
Figura 51. <i>Tet3</i> disminuye la capacidad proliferación de en células de GBM.	136
Figura 52. La capacidad de adhesión y angiogénesis del GBM no se ve alterada con la sobre-expresión de <i>Tet3</i> .	138
Figura 53. Efecto de TET3 en la formación del GBM <i>in vivo</i> .	139
Figura 54. <i>Tet3</i> modula la expresión de genes improntados a través de la regulación de la metilación de las ICRs.	141
Figura 55. TET3 regula la metilación de <i>Snrpn</i> DMR y <i>H19</i> DMR disminuyendo la expresión de los genes improntados <i>Snrpn</i> e <i>Igf2</i> .	142
Figura Suplementaria 1. Lista de genes improntados humanos.	143
Figura Suplementaria 2. Lista de genes improntados murinos.	144
Figura Suplementaria 3. La expresión de genes improntados aparece altamente alterada en GBM humano.	145
Figura Suplementaria 4. Ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F forman tumores en cerebro.	146
Figura Suplementaria 5. Tinción de tumores de animales GFAP-rtTA;i4F en cortes sagitales de 10 µm de grosor.	147
Figura Suplementaria 6. Los ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F forman tumores SSEA1 y Nestina positivos.	148
Figura Suplementaria 7. Los ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F forman tumores positivos para el marcador de GSC CD44.	149

Discusión

Figura 56. Estrategia de identificación de la célula de origen del tumor cerebral.	162
Tabla 25. Comparativa de expresión de genes improntados.	166

Introducción



Del cigoto a la célula madre adulta

La formación de una nueva vida conlleva un proceso enormemente complejo de mecanismos celulares, moleculares y epigenéticos que actúan de forma coordinada, permitiendo la generación y especificación de los diferentes tipos celulares que conformarán al nuevo ser (Gilbert, 2000). Tras la fecundación, el cigoto se divide por un proceso conocido como segmentación, dando lugar a nuevas células hijas llamadas blastómeros y formando una estructura conocida como mórula. Todas estas células iniciales son totipotentes, es decir, capaces de formar cualquier tipo celular del embrión y a los tejidos extraembrionarios (**Figura 1**). Tras estas primeras divisiones, los blastómeros se reorganizan dejando un espacio interno, o blastocele, lo que da lugar a una estructura conocida como blástula o blastocisto, en la cual se detecta una capa superficial o trofoblasto y un conjunto de células más interior que constituyen la masa celular interna (ICM), que serán las responsables de la formación del embrión. Las células de la ICM, también conocidas como células madre (SCs) embrionarias (ESCs), tienen un potencial más restringido, ya que no pueden generar tejidos extraembrionarios y se consideran, por tanto, células pluripotentes (Chambers and Smith, 2004; Surani et al., 2007). A partir de este momento del desarrollo embrionario, las células que se van generando inician procesos de especificación perdiendo, de este modo, su capacidad pluripotente para dar lugar a los diferentes tipos celulares específicos de tejido (**Figura 1**). Por lo tanto, las SCs, pueden ser clasificadas en función de su potencial de desarrollo como totipotentes (capaces de formar todos los tipos celulares embrionarios y extraembrionarios), pluripotentes (capaces de formar los tipos celulares de cualquier capa embrionaria), multipotentes (capaces de formar un subconjunto de linajes celulares, normalmente específicos de tejido) y unipotentes (capaces de dar lugar a un único tipo celular diferenciado maduro) (**Figura 1**) (Sobhani et al., 2017).

Las SCs específicas de tejido permanecen indiferenciadas en el organismo adulto, manteniendo la capacidad de auto-renovación y de formación de los diferentes tipos celulares restringidos que conforman el tejido en el que residen (Cheung and Rando, 2013; Wagers and Weissman, 2004). Estas células son clave para la homeostasis tisular y, generalmente, se mantienen en un estado inactivo o quiescente hasta que se activan para contribuir al aporte celular de dicho tejido o para su reparación en caso de daño (Bonfanti, 2013; Schwartz and Rhiner, 2018). Por ello, entender los procesos intrínsecos y las interacciones que establecen las SCs con el microambiente especializado donde residen, también conocido como "*nicho*", son imprescindibles para comprender los procesos de auto-renovación y diferenciación, así como sus implicaciones en situaciones patológicas e incluso para su uso potencial en medicina regenerativa.

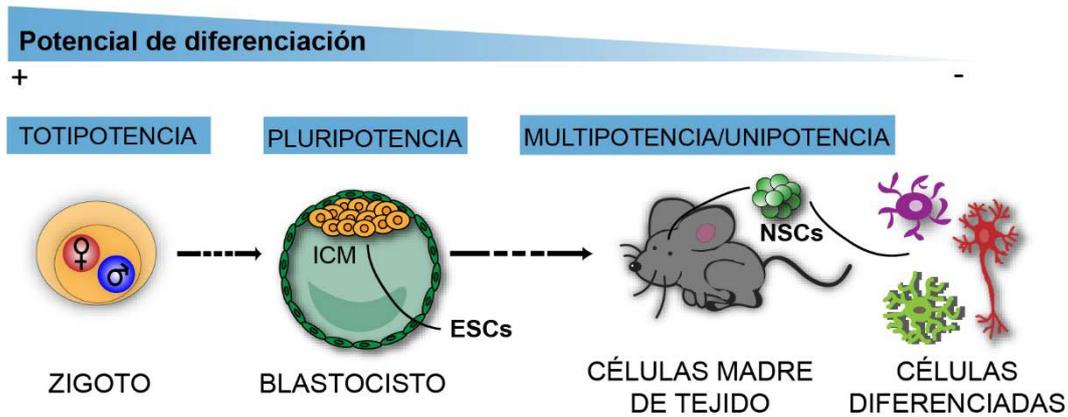


Figura 1. Potencial de desarrollo de los distintos tipos de SCs. Tras la fecundación se forma el cigoto, célula única con capacidad totipotente que dará lugar al desarrollo del embrión y a los tejidos extraembrionarios. El cigoto comienza varias rondas de división que llevan a la formación del blastocisto, el cual contiene las células de la masa celular interna (ICM) responsables de la formación del tejido embrionario y por tanto, con capacidad pluripotente. Estas células, también conocidas como células madre embrionarias (ESCs), forman las tres capas germinales que conforman el embrión. Los tejidos embrionarios y adultos contienen SCs específicas de tejido implicadas en la regeneración y homeostasis de dichos tejidos gracias a su capacidad de auto-renovación y diferenciación. Un ejemplo son las células madre neurales (NSCs) localizadas en el cerebro embrionario y adulto, que son capaces de formar células especializadas como neuronas, astrocitos y oligodendrocitos.

SCs neurales y neurogénesis adulta en mamíferos

La presencia de SCs multipotentes ha sido descrita en la mayoría de tejidos adultos incluyendo la sangre, la piel, el intestino, el tracto respiratorio, los testículos o el músculo (Becker et al., 1963; Jiang et al., 2002; Qu-Petersen et al., 2002; Toma et al., 2001; Umar, 2010). Aunque durante décadas se consideró que en el sistema nervioso central (SNC) no se producía renovación celular, en los años 60, Joseph Altman propuso la existencia de células precursoras no diferenciadas en el cerebro adulto de mamíferos que serían capaces de formar nuevas neuronas (Altman, 1962). La existencia de producción de nuevas neuronas en el cerebro de los mamíferos, primero roedores y luego primates, incluyendo la especie humana, se demostró en las décadas siguientes (Kempermann et al., 2015). La neurogénesis adulta es el proceso de formación de nuevas neuronas a partir de SCs neurales (NSCs) presentes en ubicaciones específicas del cerebro postnatal. Este proceso está restringido a dos regiones en el cerebro de los mamíferos adultos: la **zona subventricular** (SVZ) en la pared de los ventrículos laterales, y la **zona subgranular** en el giro dentado (DG) del hipocampo (SGZ) (**Figura 2**) (Kempermann et al., 2015; Lim and Alvarez-Buylla, 2014).

La **SVZ** es el nicho neurogénico más activo en roedores, está ubicado inmediatamente adyacente a la capa de células endoteliales que limita los ventrículos laterales y contiene NSCs llamadas células tipo B1 que comparten características con los astrocitos debido a su origen glial. Por ello, las NSCs expresan marcadores como la proteína fibrilar ácida glial (GFAP) o el



transportador de aspartato-glutamato específico de astrocitos (GLAST), pero también Nestina, la proteína cerebral de unión a lípidos (BLBP) o Sox2, marcadores presentes también en las células de la glía radial (RG) embrionaria (Giachino et al., 2014; Lagace et al., 2007; Merkle et al., 2004). Además, las NSCs tipo B1 presentan una morfología bipolar similar a las células de la RG, con un proceso apical que se intercala entre las células endimarias, y que acaba en un cilio primario inmerso en el líquido cefalorraquídeo (CSF) de los ventrículos laterales. Así, los finos procesos apicales de una o varias NSCs aparecen rodeados por una roseta de células endimarias que forman una estructura conocida como molinillo o “*pinwheel*” (Mirzadeh et al., 2008). El proceso basal de las NSCs contacta con los vasos sanguíneos que irrigan la zona (Tavazoie et al., 2008) (**Figura 2**). Las células tipo B1 dan lugar a progenitores neurales de alta tasa de proliferación llamados células tipo C. Estos a su vez, generan neuroblastos o células tipo A que expresan el marcador doblecortina (DCX). Estas células migran por el camino migrador rostral o RMS hasta alcanzar el bulbo olfatorio (OB) donde maduran como interneuronas que se integran en los circuitos cerebrales de la zona (**Figura 2**) (Ghosh, 2019; Ming and Song, 2011; Obernier and Alvarez-Buylla, 2019; Varela-Nallar and Inestrosa, 2013; Zhao et al., 2008). Las NSCs de la SVZ también son capaces de generar oligodendroblastos que migran al cuerpo calloso (CC) y al estriado donde se diferencian en oligodendrocitos maduros, aunque este proceso ocurre de forma menos frecuente (Menn et al., 2006; Sohn et al., 2015).

En la **SGZ** del DG del hipocampo, las NSCs son conocidas como células radiales o tipo I y son responsables de la formación de los progenitores neurales también llamados tipo II que, a su vez, generan neuroblastos o células tipo III. Estos neuroblastos migran a la capa granular donde las nuevas neuronas inmaduras se diferencian en células granulares que extienden sus proyecciones dendríticas hacia la capa molecular y su axón a la región CA3 de la estructura hipocámpica (**Figura 2**) (Ghosh, 2019; van Praag et al., 2002; Varela-Nallar and Inestrosa, 2013; Zhao et al., 2006).

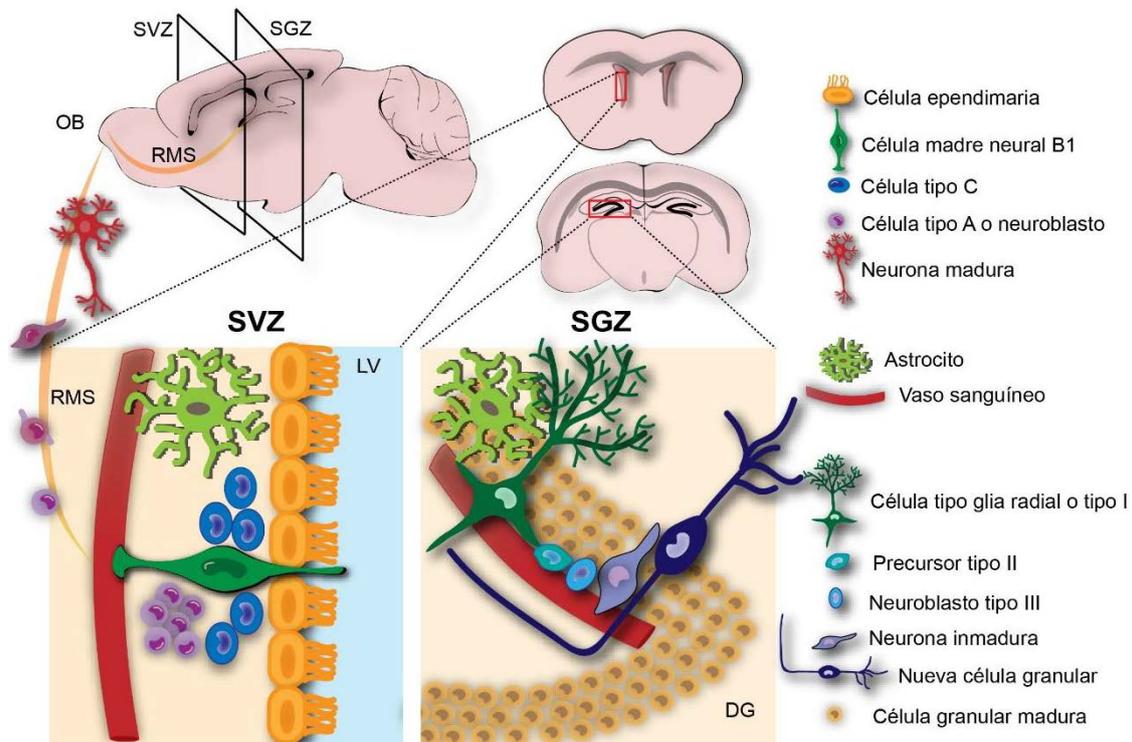


Figura 2. Nichos neurogénicos en el cerebro adulto de mamíferos. Representación de los dos nichos neurogénicos presentes en el cerebro adulto de roedores: zona subventricular (SVZ) y zona subgranular (SGZ) en el giro dentado (DG) del hipocampo, donde se localizan las NSCs y sus progenitores, responsables de la formación de nuevas neuronas. En la SVZ, las NSCs tipo B1 dan lugar a las células tipo C que proliferan y forman neuroblastos o células tipo A que migran por el camino migrador rostral o RMS hasta el bulbo olfatorio (OB) donde se diferencian terminalmente en interneuronas. Las NSCs tipo B1 presentan una morfología bipolar similar a las células RG, con un proceso apical que se intercala entre las células endimarias. El proceso basal de las NSCs contacta con los vasos sanguíneos que irrigan la zona. En la SGZ, las células madre tipo I dan lugar a precursores tipo II, que a su vez forman neuroblastos o células tipo III para dar lugar a neuronas inmaduras que formarán las células granulares. LV: lumen ventricular.

Aunque las NSCs de los dos nichos neurogénicos adultos tienen su origen en la RG embrionaria, el desarrollo de estas sigue distintos cronogramas (Ghosh, 2019). Las NSCs adultas de la SVZ provienen de la RG que se divide durante el período embrionario E13,5 – E15,5 y se mantiene relativamente quiescente hasta edades postnatales (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015), aunque ya hay evidencias de la especificación de las células tipo B1 en E11,5 (Figura 3). En cambio, el origen de las NSCs adultas de la SGZ es más incierto. Las NSCs de esta región se forman al final de la gestación, y las células aquí localizadas se dividen para dar lugar a las NSCs adultas (Li et al., 2013). Sin embargo, se ha observado la presencia de células positivas para marcadores de NSCs y progenitores que se sitúan en una zona germinal en la SGZ que aparecía en los días postnatales P7-14 (Figura 3) (Nicola et al., 2015). Más recientemente se ha descrito la presencia del marcador Hopx en NSCs adultas del DG, pero también precursores del neuroepitelio en E11,5 y en el DG primitivo expresan este marcador, sugiriendo un precursor neural



especificado desde estadios embrionarios tempranos responsable del proceso de neurogénesis en la SGZ (Berg et al., 2019) (Figura 3).

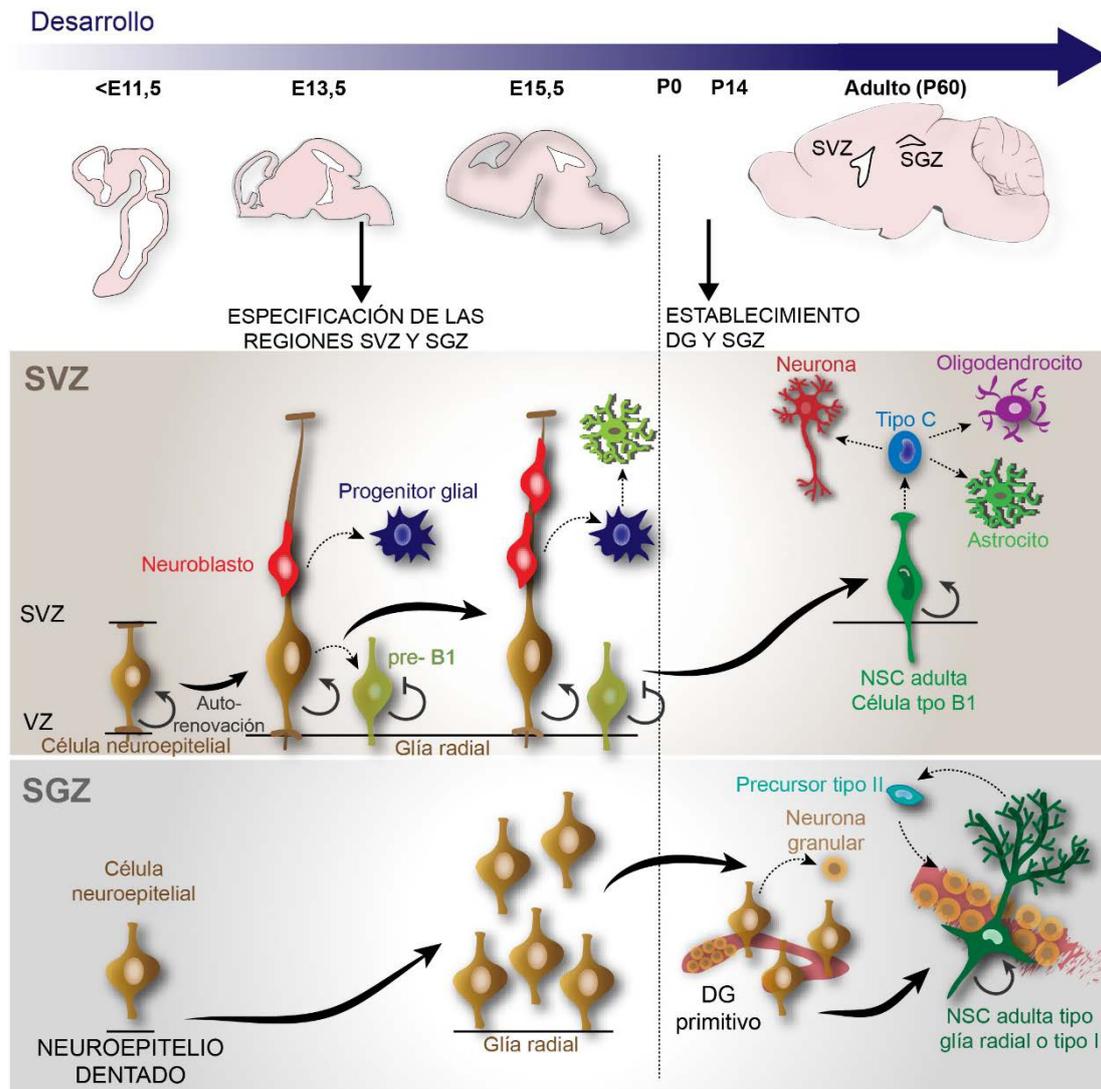


Figura 3. Origen embrionario de las NSCs adultas en la SVZ y la SGZ en roedores. Esquema de la formación de las NSCs adultas desde su origen embrionario. Las NSCs procedentes de la SVZ se originan a partir de las células neuroepiteliales, situadas adyacentes al ventrículo. Estas células forman proyecciones basales por las cuales migran los neuroblastos recién formados. Este primer proceso de neurogénesis tiene lugar a la edad embrionaria comprendida entre E13,5-E15,5. Durante el desarrollo, además de la formación de nuevas neuronas, las células madre, denominadas células de la glia radial (RG), también inician procesos de gliogénesis. Las RGs son las células que darán lugar a las NSCs adultas o células tipo B1 en el adulto (P60), que se dividirán en progenitores de rápida amplificación o células tipo C que, a su vez, formarán neuronas, a partir de los neuroblastos, pero también, células de la glía, como son los astrocitos y los oligodendrocitos. Aunque la especificación de las células B1 comienza ya en E11,5 la mayoría de las NSCs son generadas en E13,5-15,5. En el caso de la formación de las NSCs adultas de la SGZ, el establecimiento final del giro dentado (DG) y de la SGZ se produce al día postnatal 14 (P14), pero su origen procede en el neuroepitelio dentado donde se encuentran las células neuroepiteliales responsables de la generación de NSCs adultas o tipo glía radial (o tipo I) en la SGZ. Las NSCs de la SGZ darán lugar a las neuronas granulares, que se integrarán en el DG, a través de la formación de progenitores intermedios llamados precursores tipo II.

La mayor parte de los conocimientos que tenemos sobre la capacidad de auto-renovación y diferenciación de las NSCs han sido basados en el comportamiento de estas células tras su

aislamiento y cultivo *in vitro*, debido a la falta de marcadores únicos y decisivos que las identifique (Ming and Song, 2011). La posibilidad de cultivar estas células *in vitro* fue mostrada por primera vez a partir de la disección del parénquima estriatal y la SVZ de ratones jóvenes, obteniéndose cultivos celulares en suspensión en medio sin suero y en presencia del factor de crecimiento epidérmico EGF, que crecían en forma de agregados que se denominaron *neuroesferas* (Reynolds BA y Weiss S, 1992). Estos agregados podían ser disociados y subcultivados de nuevo en las mismas condiciones, permitiendo la formación de nuevos agregados, denominados neuroesferas secundarias, y por tanto la propagación del cultivo. En condiciones adherentes y tras la retirada de los mitógenos, estas neuroesferas generaban células diferenciadas de los tres linajes característicos del SNC, astrocitos, neuronas y oligodendrocitos, demostrando así su capacidad multipotente (Reynolds and Weiss, 1992). Los cultivos de neuroesferas han sido ampliamente utilizados (Belenguer et al., 2016; Bull and Bartlett, 2005; Ferron et al., 2007; Wang et al., 2020) y han supuesto una herramienta clave para el estudio de los mecanismos que regulan la actividad de las NSCs, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

Estudios más recientes han permitido el desarrollo de estrategias para la identificación de las NSCs a través de la expresión de combinaciones de marcadores de membrana mediante la implementación de la tecnología de selección de células activadas por fluorescencia o FACS (del inglés "*fluorescent activated cell sorting*"). Esta herramienta no solamente ha permitido la identificación y discriminación de las NSCs y sus progenitores, sino también de sus distintos estados de activación, posibilitando la identificación de una población de NSCs quiescentes (qNSCs) y otra de activadas (aNSCs), que difieren transcripcional y fenotípicamente (Basak et al., 2018; Belenguer et al., 2020; Codega et al., 2014; Dulken et al., 2017; Llorens-Bobadilla et al., 2015; Mich et al., 2014; Morizur et al., 2018; Pastrana et al., 2009). Esto es consistente con que las NSCs quiescentes adultas se originen durante el desarrollo embrionario y permanezcan en este estado de quiescencia hasta su activación en el organismo adulto (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). Además, se ha detectado un estado intermedio, denominado "*primed*" (pNSCs), de células quiescentes pero con una mayor propensión a la activación (Belenguer et al., 2020; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Regulación epigenética de la neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta es un proceso dinámico que se regula por factores intrínsecos y extrínsecos con el fin de mantener un balance adecuado entre la auto-renovación y la capacidad de generar progenie diferenciada (Gage, 2000; Lim and Alvarez-Buylla, 2016; Ming and Song, 2011; Varela-Nallar and Inestrosa, 2013). Por ejemplo, señales extracelulares procedentes del



nicho, como los morfógenos Notch, Wnt o Shh activan cascadas de señalización intracelulares involucradas en el proceso de neurogénesis (Bond et al., 2015; Obernier and Alvarez-Buylla, 2019; Varela-Nallar and Inestrosa, 2013). También reguladores del ciclo celular y factores transcripcionales se han descrito como mecanismos intrínsecos cruciales en la regulación de la neurogénesis adulta (Ming and Song, 2011; Zhao et al., 2008). Por ejemplo, la delección del factor transcripcional Sox2 causa la disminución de la población de NSCs (Ferri et al., 2004), representando un factor clave en la regulación de las NSCs adultas (Shimozaki, 2014).

Los mecanismos epigenéticos, también clave en la regulación del proceso de neurogénesis, consisten en los cambios heredables en la función génica que no implican alteraciones en la secuencia del DNA (Bird, 2007; Jaenisch and Bird, 2003), pero que modulan la expresión génica mediante cambios directos en la estructura de la cromatina o generando lugares de unión para el acceso a la cromatina de factores transcripcionales (Ordog et al., 2012). El DNA se organiza en forma de cromatina que se enrolla alrededor de un núcleo de histonas, conformando estructuras llamadas nucleosomas (**Figura 4A**). Los mecanismos epigenéticos actúan sobre estas estructuras mediante modificaciones químicas en las colas de las histonas, como la acetilación, metilación, fosforilación y ubiquitinación (**Figura 4A**), o del DNA, como la metilación y la hidroximetilación (**Figura 4A, B**) y los RNAs no codificantes (Kaikkonen et al., 2011; Ming and Song, 2011). Estos mecanismos epigenéticos interactúan entre ellos con el fin de generar un sistema robusto de control que permite mantener la identidad celular (Bird, 2007; Montalban-Loro et al., 2015; Yao et al., 2016).

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos más comunes en la regulación de la expresión génica e implica la transferencia de un grupo metilo de forma covalente al carbono (C) 5 del anillo de pirimidina de la citosina, dando lugar a la forma 5-metilcitosina o 5mC (**Figura 4B**) (Fitzsimons et al., 2014; Jin et al., 2011). Aunque esta reacción puede ser producida en cualquier citosina del genoma, en los mamíferos, el 98% de la metilación del DNA ocurre en las llamadas islas CpG (Jin et al., 2011) y generalmente se asocia con la represión de la expresión génica (Fitzsimons et al., 2014). Las enzimas encargadas de mediar la reacción de metilación son las DNA metiltransferasas (DNMTs) (**Figura 4B**). En concreto, la DNMT1 está implicada en el mantenimiento de la metilación del DNA tras el proceso de replicación, en el cual la hebra recién sintetizada debe ser metilada. La enzima DNMT1 reconoce el DNA hemi-metilado y de esta forma, se asegura de mantener las marcas de metilación en el nuevo DNA sintetizado (Fitzsimons et al., 2014; Kohli and Zhang, 2013). Por otro lado, la metilación *de novo* ocurre gracias a las enzimas DNMT3A y DNMT3B, utilizando la DNMT3L como co-factor en el proceso (**Figura 4B**) (Jin et al., 2011; Lozano-Urena et al., 2017). Estas enzimas DNMTs se encuentran altamente expresadas en

las NSCs postnatales y están implicadas en el proceso de neurogénesis y la maduración neuronal (Feng et al., 2010; Fitzsimons et al., 2014; Lozano-Urena et al., 2017; Okano et al., 1999; Wu et al., 2010).

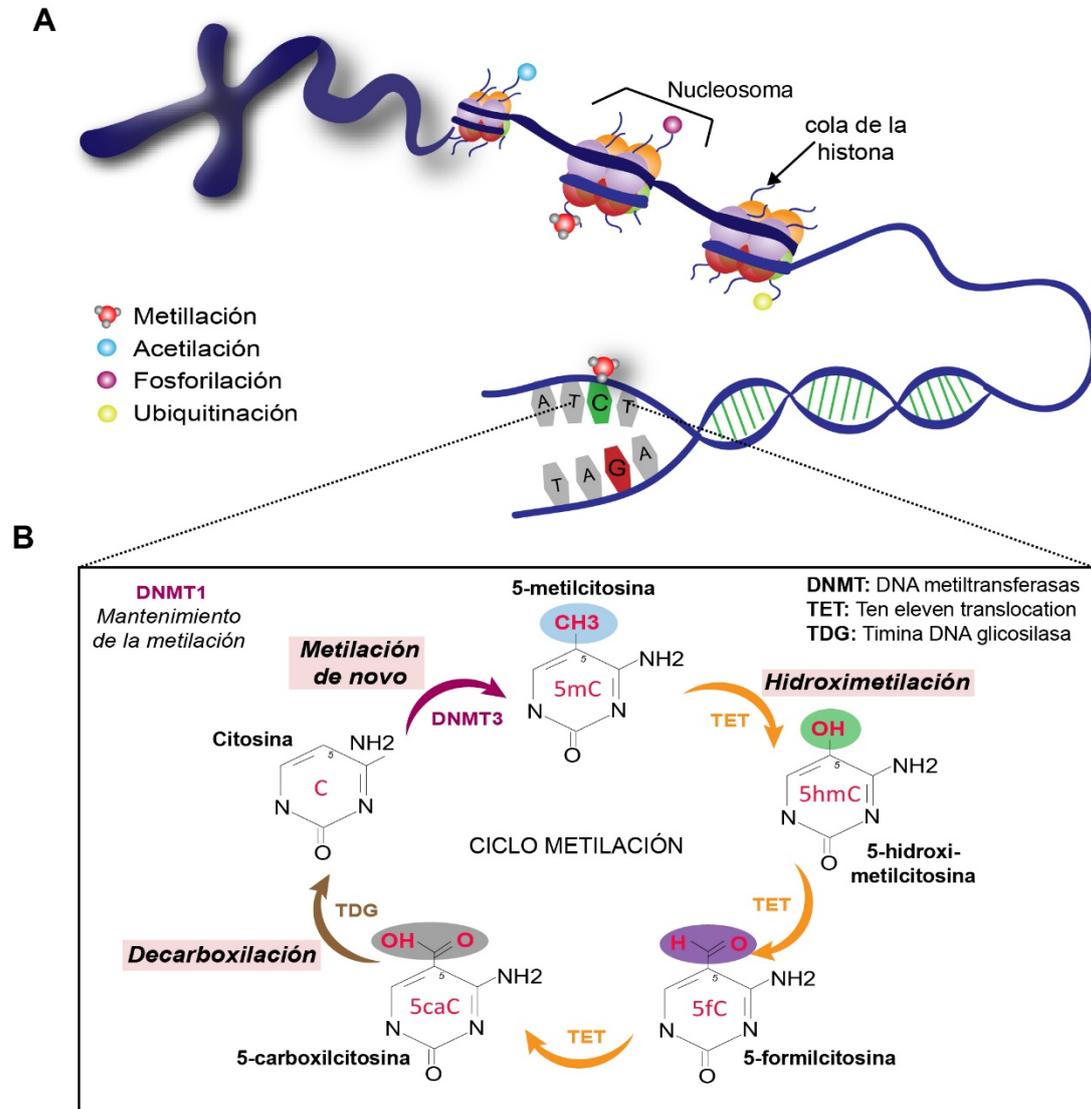
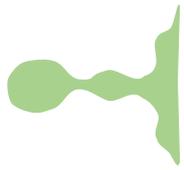


Figura 4. Mecanismos epigenéticos de regulación génica. A) El DNA se encuentra estructurado y compactado en forma de cromatina mediante complejos llamados nucleosomas. Estos nucleosomas están formados por 8 histonas, alrededor de las cuales se enrolla la hélice de DNA. En el extremo N-terminal de las histonas se producen las modificaciones postraduccionales que las regulan como son las metilaciones, las acetilaciones, las fosforilaciones o las ubiquitinaciones. B) Esquema del ciclo de metilación/desmetilación del DNA. El carbono 5 de la citosina puede ser metilado por las enzimas DNMTs, DNMT3A/DNMT3L y DNMT3B (metilación de novo) y DNMT1 (mantenimiento de la metilación) dando lugar al grupo 5-metilcitosina (5mC). La desmetilación activa del DNA implica a las enzimas TET1, TET2 y TET3 que catalizan la oxidación del grupo metilo formando el grupo 5hmC, que a su vez puede ser oxidado a las formas 5-formilcitosina (5fC) o 5-carboxilcitosina (5caC) por estas mismas enzimas. El paso final de eliminación de la modificación de la citosina está catalizado por la enzima TDG.

La desmetilación del DNA también juega un papel clave en la regulación génica durante el desarrollo y puede producirse de forma pasiva o de forma activa (Wu and Zhang, 2017). La desmetilación pasiva hace referencia a la pérdida de las marcas de metilación debido al proceso



de replicación en ausencia de la maquinaria de mantenimiento de la metilación (Kohli and Zhang, 2013). En cambio, la desmetilación activa del DNA implica la eliminación del grupo metilo y es catalizada por enzimas (Wu and Zhang, 2017). Este proceso requiere de un primer paso de oxidación del grupo metilo, transformándolo en el grupo 5-hidroximetilado o 5hmC (**Figura 4B**). Si bien este grupo es considerado un intermediario del proceso de desmetilación activa, por sí mismo el 5hmC actúa también como marca epigenética importante (Fitzsimons et al., 2014; van den Hove et al., 2012). De hecho, los niveles de 5hmC en el cerebro son mayores con respecto a otros tejidos y están implicados en el proceso de neurogénesis (Fitzsimons et al., 2014; Hahn et al., 2013; Montalban-Loro et al., 2019). La oxidación del grupo 5mC está catalizada por las enzimas dioxigenasas TET, que tras la formación de 5hmC, continúan oxidando dando lugar al grupo 5-formilcitosina (5fC) y posteriormente al grupo 5-carboxilcitosina (5caC) (**Figura 4B**) (Ito et al., 2011). En mamíferos existen tres miembros de la familia TET: TET1, TET2 y TET3, todos ellos implicados en la reacción de oxidación del grupo 5mC (Ito et al., 2011; Wu and Zhang, 2017). Finalmente actúa la enzima timidina DNA glicosilasa o TDG, proteína implicada en la reparación del DNA (Cortazar et al., 2007; Kohli and Zhang, 2013), la cual escinde mediante descarboxilación la base modificada 5caC para ser sustituida por una nueva citosina no metilada (Cortellino et al., 2011) (**Figura 4B**).

Se ha relacionado a las enzimas TET con el estado de pluripotencia en el blastocisto y las ESCs mediante la hipometilación de regiones reguladoras clave (Ito et al., 2011; Koh et al., 2011). Además, los niveles de 5hmC del DNA son altos en las ESCs, en etapas tempranas del embrión y en el cerebro adulto, sugiriendo un papel relevante de estas enzimas durante dichos procesos (Ito et al., 2011). De hecho, mientras que los niveles de expresión de *Tet1* y *Tet2* son elevados durante el desarrollo embrionario en ratones, únicamente *Tet3* mantiene sus niveles altos en el adulto, participando en la función de estas células y en el proceso de neurogénesis en el cerebro adulto (Montalban-Loro et al., 2019). Además, cabe destacar que el proceso de desmetilación del DNA es también crucial en el cáncer, ya que la hipometilación global del genoma es uno de los eventos clave en el desarrollo de un proceso maligno (ver apartado 6.5) (Jin et al., 2011).

Impronta genómica y regulación de la dosis génica

En los mamíferos, la mayoría de genes presentan expresión bialélica. Sin embargo, existe un pequeño porcentaje de genes cuya expresión procede únicamente del alelo materno o del alelo paterno, resultando en una expresión monoalélica (**Figura 5A**) (Ferguson-Smith, 2011; Ishida and Moore, 2013). En el genoma de mamíferos, se han descrito aproximadamente 150 de estos genes, llamados *genes improntados* (Tucci et al., 2019), y generalmente se encuentran agrupados

en “clusters”, aunque algunos de ellos están presentes de forma aislada (**Figura 6**) (Barlow and Bartolomei, 2014; Choi et al., 2005; Ferguson-Smith, 2011; Kagitani et al., 1997). Esta agrupación de los genes improntados permite una regulación de forma conjunta de regiones situadas a gran distancia en un mismo cromosoma a partir de un elemento común de DNA conocido como región de control de impronta genómica (ICR) (Abramowitz and Bartolomei, 2012; Dindot et al., 2009). Las ICRs son regiones del DNA diferencialmente metiladas (DMRs) situadas en ambos cromosomas parentales (**Figura 5A**) (Barlow and Bartolomei, 2014) y pueden estar metiladas en el cromosoma heredado maternalmente o en el heredado paternalmente, definiendo el patrón de expresión de los alelos improntados (**Figura 5A**). La delección de estas regiones reguladoras conlleva la pérdida de impronta genómica en los genes situados en el *cluster* bajo el control de la ICR mutada (**Figura 5B**) (Tucci et al., 2019). De esta forma, una mutación de la ICR situada, por ejemplo, en el cromosoma heredado paternalmente resulta en un patrón de expresión propio del alelo materno, mientras que la mutación del ICR materno resulta en un patrón de expresión propio del alelo paterno (**Figura 5B**) (Barlow and Bartolomei, 2014; Ferguson-Smith, 2011; Lozano-Urena et al., 2017).

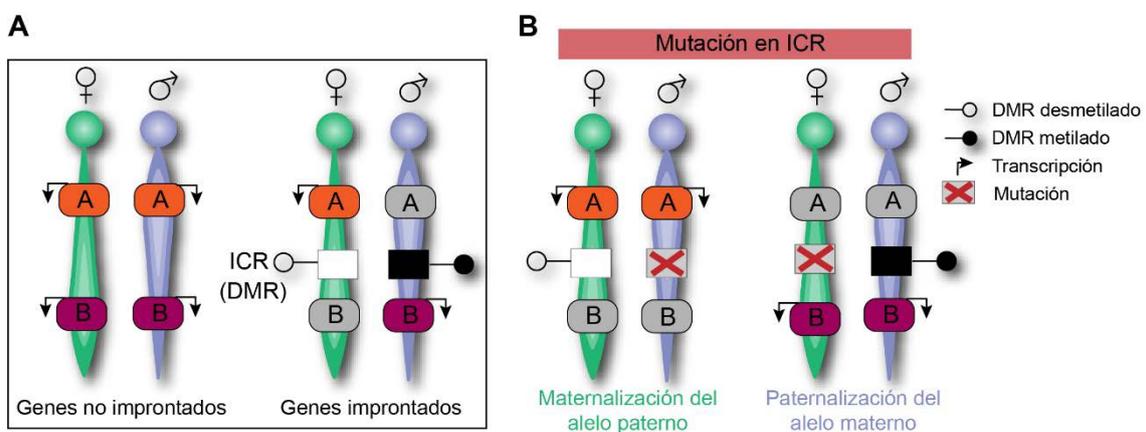


Figura 5. Los genes improntados son regulados por metilación en las regiones de control de impronta (ICR). **A)** Las células somáticas en mamíferos presentan un cromosoma heredado maternalmente (verde) y un cromosoma heredado paternalmente (azul), de tal manera que los genes no improntados se expresan o se reprimen en ambos alelos; sin embargo, los genes improntados presentan una expresión monoalélica a partir del alelo materno (gen A en naranja) o del alelo paterno (gen B en fucsia), manteniéndose silenciado en el otro alelo. Este patrón de expresión de los alelos improntados se regula mediante metilación diferencial del DNA en una zona concreta llamada región de control de impronta genómica (ICR) situado en ambos cromosomas. **B)** Las mutaciones en la región ICR dan lugar a la pérdida de la impronta genómica en los genes improntados situados bajo la regulación de esta región ICR alterada. La mutación en la ICR en el alelo paterno da lugar a un patrón de expresión propio del alelo materno por lo que se produce la “maternalización” del alelo paterno, mientras que la alteración en la región de control en el alelo materno da lugar a la “paternalización” del alelo materno. DMR: región diferencialmente metilada.

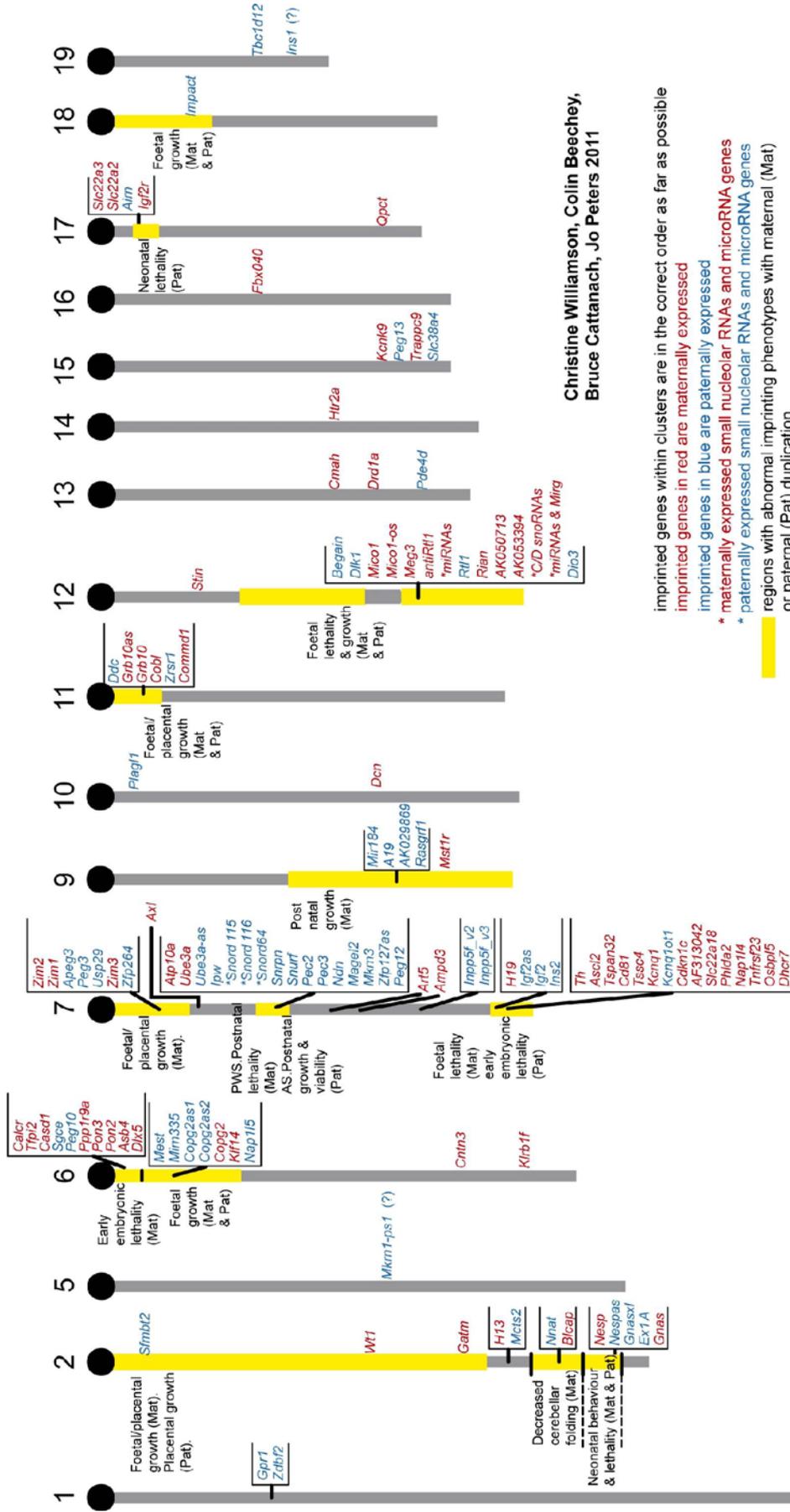


Figura 6. Los genes improntados se organizan en clusters. Mapa genómico de la localización de los genes improntados en el genoma murino en los 19 cromosomas somáticos. Los genes improntados se encuentran generalmente agrupados en *clusters* (indicado en cajas amarillas). Los genes improntados expresados maternalmente se muestran en rojo, mientras que los genes improntados de expresión paterna se muestran en azul. Esta imagen se ha obtenido de <http://www.mousebook.org/all-chromosomes-imprinting-chromosome-map>.

El proceso de impronta genómica sigue un ciclo que conlleva el establecimiento, el mantenimiento y el borrado de las marcas de metilación en las ICRs de los clusters improntados (Li and Sasaki, 2011) (**Figura 7**). La impronta genómica se establece en la línea germinal siendo transmitida al cigoto y mantenida durante el desarrollo y la vida adulta del organismo (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Durante la formación del embrión, las células germinales primordiales (PGCs), responsables de la formación de los gametos, presentan en sus ICRs el patrón de metilación característico de las células somáticas. Sin embargo, estas PGCs sufren un borrado de las marcas epigenéticas que establecen la impronta genómica para permitir el reestablecimiento de las nuevas marcas específicas del alelo parental, gracias a que los genomas materno y paterno se encuentran en compartimentos distintos (Hajkova et al., 2002; Leitch et al., 2013; Lozano-Urena et al., 2017). De esta manera, se pueden llevar a cabo estas modificaciones en función del sexo del que procede el gameto (**Figura 7**). Las marcas de metilación que se establecen en los gametos son mediadas por la DNA metiltransferasa DNMT3A mediante un proceso de metilación *de novo*, junto con el co-factor DNMT3L (Bourc'his et al., 2001; Hata et al., 2002; Kaneda et al., 2004; Lozano-Urena et al., 2017). Tras la fecundación, se produce una reprogramación del genoma que elimina la mayor parte de las marcas epigenéticas heredadas, de manera que las marcas de metilación desaparecen (Smallwood and Kelsey, 2012). Esta desmetilación masiva que ocurre tras la fecundación está mediada por TET3 en el caso del genoma paterno, mientras que en el genoma materno la desmetilación pasiva sería la responsable del proceso de reprogramación epigenético (Gu et al., 2011). No obstante, las marcas de impronta genómica específicas deben ser mantenidas y transmitidas a las células hijas. La enzima clave en el mantenimiento de estas marcas en este momento del desarrollo es la proteína ZFP57 (**Figura 7**) (Takahashi et al., 2015). Posteriormente, es la enzima DNMT1 la molécula implicada en mantener las marcas de impronta genómica tras la división de las células somáticas, preservando las marcas epigenéticas en ambas células hijas. Esto es posible gracias al reconocimiento del nuevo DNA hemi-metilado, de tal manera, que la enzima DNMT1 metila la nueva cadena replicada (**Figura 7**) (Goll and Bestor, 2005).

Por lo tanto, y dado que las marcas de metilación en las DMRs de las regiones de impronta genómica se producen durante la formación de los gametos, estas DMRs son denominadas como DMRs germinales o gDMR (**Figura 8**). Sin embargo, existen DMRs denominadas somáticas o secundarias (sDMR) que también están implicadas en la regulación de la expresión de genes improntados, y estas adquieren las marcas de metilación tras la fecundación (**Figura 8**) (Edwards and Ferguson-Smith, 2007).

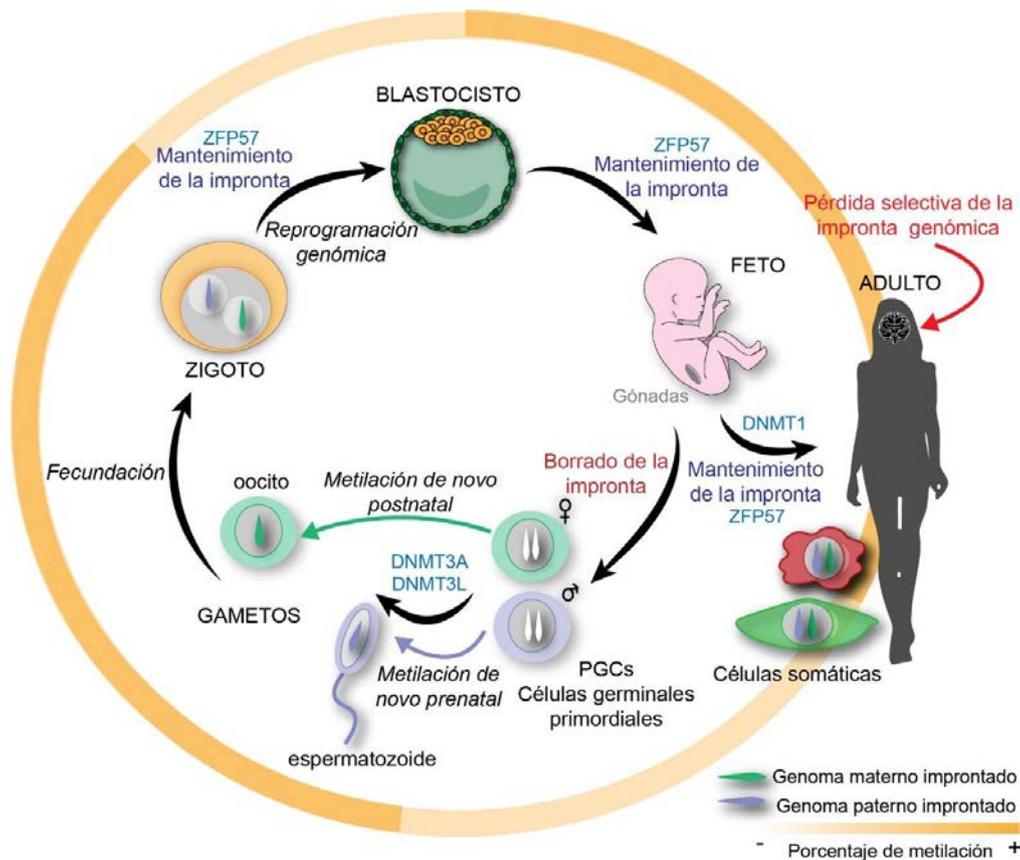
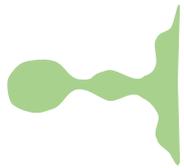


Figura 7. Establecimiento y mantenimiento de la impronta genómica durante el desarrollo. Durante el proceso de formación del organismo, la metilación se presenta como un proceso dinámico en el que el DNA se metila y desmetila para regular la expresión génica. Las células sexuales o gametos contienen el genoma del padre, espermatozoide, o de la madre, oocito, con las marcas de impronta genómica características de cada sexo. Para ello, las células germinales primordiales (PGCs) de las gónadas, que contienen los cromosomas procedentes de la madre y del padre, sufren un borrado de las marcas de impronta genómica. En los gametos se procede a la metilación *de novo* para establecer las nuevas marcas epigenéticas de manera específica según el sexo. Esta metilación es realizada por las DNA metiltransferasas DNMT3A y DNMT3L. Tras la fecundación, el cigoto, que contiene ambos genomas, se divide y sufre una reprogramación genómica que elimina las marcas heredadas; sin embargo, la metilación en las regiones de control de impronta genómica (ICRs) que identifica el origen materno o paterno del cromosoma, es mantenida mediante la acción de la enzima ZFP57. La impronta genómica es un proceso que debe ser mantenido en las células somáticas durante el crecimiento y edad adulta del organismo, y esto es posible mediante la actividad de la enzima DNA metiltransferasa DNMT1. No obstante, a pesar de que la alteración de la impronta genómica está asociada a varias patologías, la pérdida de la impronta genómica ocurre de forma no patológica en genes concretos de forma tejido-específica en el organismo adulto, siendo necesaria para la función celular.

Las sDMRs dependen directamente de la presencia de la gDMR, de manera que estas últimas son necesarias para el establecimiento de la expresión monoalélica de los genes improntados, mientras que las sDMRs están implicadas en el mantenimiento de la impronta genómica (Sutcliffe et al., 1994; Thorvaldsen et al., 1998; Williamson et al., 2006). Las gDMRs maternas suelen encontrarse en las regiones promotoras de los genes, en cambio, las gDMRs paternas son encontradas en regiones intergénicas (Edwards and Ferguson-Smith, 2007). Curiosamente, la mayoría de las gDMRs descritas se encuentran metiladas en el alelo materno, mientras que

únicamente se han referenciado 4 DMRs metiladas en el cromosoma paterno (Li and Sasaki, 2011; Reik and Walter, 2001).

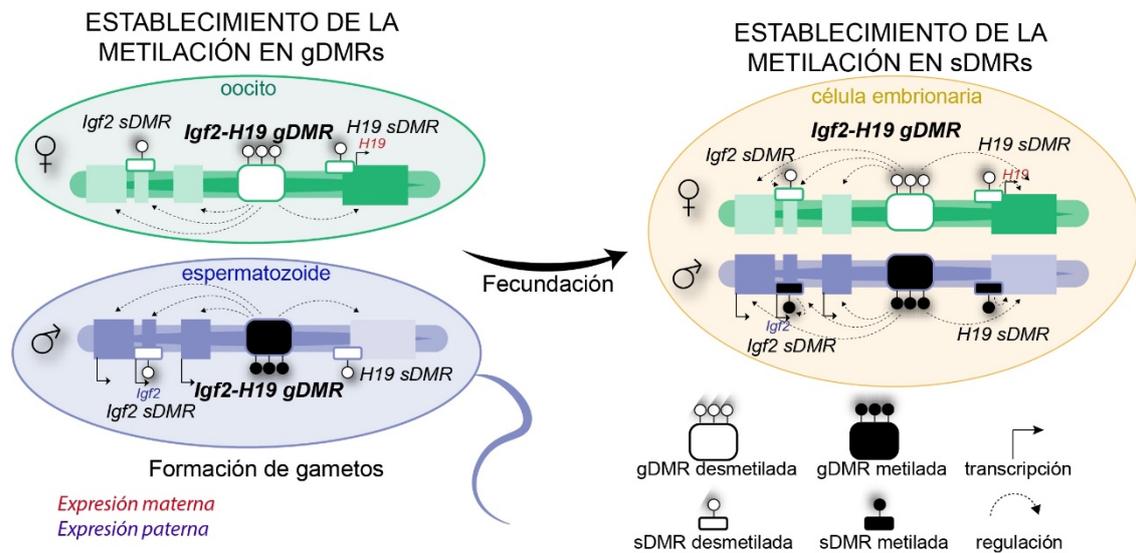


Figura 8. DMRs germinales y somáticas en las regiones de impronta. Las gDMRs establecen las marcas de metilación durante la formación de los gametos, mientras que las sDMRs establecen dichas marcas tras la fecundación. Las sDMRs regulan genes improntados concretos y dependen de las gDMRs, que regulan los genes improntados localizados dentro del *cluster*. En la figura se incluye un ejemplo de *cluster* regulado por H19-Igf2 DMR, paternalmente metilada en el espermatozoide, y que contiene a su vez dos sDMRs paternalmente metiladas que regulan la expresión de los genes *Igf2* y *H19* localizados en el cromosoma 7 del ratón. Los genes de expresión materna se muestran en rojo, mientras que los genes de expresión paterna se muestran en azul.

Los genes improntados se expresan principalmente durante el desarrollo embrionario y disminuyen su expresión tras el nacimiento; sin embargo, también presentan una expresión elevada en el cerebro adulto (Coan et al., 2005; Wilkinson et al., 2007). Debido a la expresión monoalélica de los genes improntados, las mutaciones o la pérdida de impronta genómica están asociadas a diversas patologías como el cáncer y enfermedades del desarrollo (Cleaton et al., 2014; Eggermann et al., 2015; Ishida and Moore, 2013). Precisamente, debido a la elevada expresión de los genes improntados en placenta y cerebro adulto, las alteraciones de la impronta genómica dan lugar a síndromes congénitos que afectan al desarrollo embrionario como el síndrome de Prader-Willi (PWS) o el síndrome de Angelman (AS), y que se caracterizan por problemas neurológicos, de comportamiento y aprendizaje (Hirasawa and Feil, 2010). Sin embargo, aunque las marcas epigenéticas de la impronta genómica son mantenidas durante la edad adulta, también se ha mostrado que este proceso puede ser selectivamente “apagado” en algunos tipos celulares y/o momentos concretos del desarrollo para activar el alelo que se encuentra silenciado (Ferron et al., 2011; Ferron et al., 2015) (Figura 7). Estos cambios en la impronta genómica que ocurren de forma fisiológica son también clave para la correcta función y plasticidad celular.



Los genes improntados han sido implicados en procesos clave del neurodesarrollo y en el cerebro adulto, incluyendo la diferenciación neural, la migración y la supervivencia celular (Perez et al., 2015). Por ejemplo, el gen improntado de expresión paterna *Dlk1*, un ligando atípico de Notch, juega un papel fundamental en la neurogénesis adulta, siendo además crítica la expresión de ambos alelos específicamente en las NSCs de la SVZ para una correcta neurogénesis al OB (Ferron et al., 2011). Curiosamente, la pérdida de impronta genómica en el gen *Dlk1* ocurre postnatalmente (Ferron et al., 2011). El gen de expresión paterna *Igf2* es otro ejemplo de pérdida de impronta genómica de forma fisiológica en el organismo adulto para regular el proceso de neurogénesis (Ferron et al., 2015; Lehtinen et al., 2011). IGF2 es un factor de nicho secretado en la SVZ de forma paracrina por la vasculatura y el plexo coroideo, compartimentos donde pasa a ser expresado de forma bialélica, para regular la función normal de las NSCs (Ferron et al., 2015). En cambio, el gen *Igf2* permanece improntado en la SGZ (Ferron et al., 2015). La delección del gen improntado *Cdkn1c*, de expresión materna, conduce al agotamiento de la población de NSCs y con ello, al descenso de la neurogénesis en el hipocampo durante el envejecimiento (Furutachi et al., 2013). El gen *Cdkn1c*, además, ha sido descrito como regulador negativo de la oligodendrogénesis (Kremer et al., 2009). Precisamente este gen se encuentra regulado por otro gen improntado de expresión paterna, *Plagl1*, que está altamente expresado en las NSCs (Ho-Shing & Dulac, 2019). También se requieren niveles altos de expresión del gen improntado de expresión paterna *Snrpn*, el cual es regulado por la enzima TET3 en las NSCs adultas para controlar la diferenciación astrocitaria (Montalban-Loro et al., 2019). Todos estos estudios demuestran la implicación de los genes improntados y su estado de impronta en la regulación de las funciones en el cerebro adulto de mamíferos, incluyendo un proceso tan específico y crítico como es la neurogénesis.

Reprogramación celular y adquisición de un estado pluripotente

La reprogramación celular es el proceso de revertir células maduras especializadas en células totipotentes o pluripotentes. La posibilidad de conseguirlo mediante la expresión controlada de un número mínimo de factores de transcripción ha sido uno de los hitos más revolucionarios de las últimas dos décadas (Omole and Fakoya, 2018; Takahashi and Yamanaka, 2006). En 1962, Gurdon demostró el primer ejemplo de reprogramación mediante transferencia de núcleos de células somáticas (SCNT) a oocitos enucleados, que conducía a la generación de un embrión genéticamente idéntico a la célula somática donante, demostrando que su núcleo mantenía toda la información genética y que esta podía ser reprogramada al estado totipotente (Gurdon, 1962). El establecimiento de las líneas de ESCs a partir de blastocistos pre-implantacionales murinos

(Evans and Kaufman, 1981; Martin, 1981) y humanos (Thomson et al., 1998) resultó fundamental para entender la regulación de la pluripotencialidad. Se demostró que la fusión de células somáticas con ESCs reprogramaba a las primeras a un estado de pluripotencia (Tada et al., 2001). En 2006, Takahashi K y Yamanaka S demostraron que la mera introducción en células somáticas de un número reducido de ciertos factores transcripcionales era capaz de reprogramar células somáticas a células pluripotentes, denominadas células pluripotentes inducidas (iPSCs) (Takahashi and Yamanaka, 2006, 2016). Un año después de la generación de iPSCs murinas, consiguieron la reprogramación a iPSCs humanas mediante estos mismos factores (Takahashi et al., 2007). Los factores incluidos en lo que pasó a denominarse cóctel de Yamanaka eran *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*. Por ello, el uso del transgén policistrónico OSKM es una de las estrategias más utilizadas para la reprogramación *in vitro* y también ha sido usado *in vivo* (Abad et al., 2013; Ofenbauer and Tursun, 2019; Omole and Fakoya, 2018). En otro estudio se demostró la generación de iPSCs humanas también mediante 4 factores, pero variando dos de ellos: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin 28* (Yu et al., 2007). Y más aún, la reprogramación celular inducida ha sido demostrada con el uso únicamente de dos de los factores en fibroblastos fetales de ratón (MEFs) y en NSCs (Hester et al., 2011; Nemaierova et al., 2012), o incluso con un único factor, *Oct4*, en el caso de los MEFs y células papilares de la dermis y NSCs (Hammachi et al., 2012; Kim et al., 2009; Li et al., 2011; Yuan et al., 2011; Zhu et al., 2010). Los estudios que demostraban la naturaleza reversible de los procesos de restricción del potencial de desarrollo en las células (Figura 9) les valieron el Premio Nobel de Medicina a John Gurdon y Shinya Yamanaka en 2012, y supusieron un avance clave en el campo de la medicina regenerativa, pero también en el estudio de los procesos que ocurren durante el desarrollo y que permiten la especificación celular.

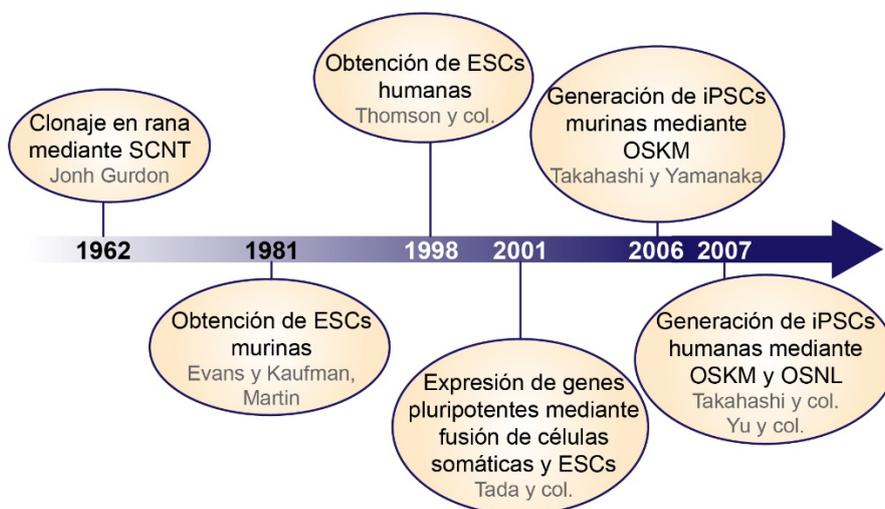


Figura 9. Cronología de los principales descubrimientos en la reprogramación celular. Eventos más significativos que llevaron a la generación de iPSCs. SCNT: transferencia nuclear de células somáticas, ESCs: células madre embrionarias, iPSCs: células madre pluripotentes inducidas, OSKM: *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, OSNL: *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin 28*. Imagen adaptada de Omole and Fakoya, 2018.



Las iPSCs, al igual que las ESCs, pueden ser cultivadas *in vitro* en condiciones específicas para mantener sus propiedades de pluripotencia y auto-renovación. Uno de los factores clave para el cultivo y mantenimiento de estas células es el factor inhibidor de la leucemia o LIF, crítico para el proceso de auto-renovación (Hirai et al., 2011; Smith et al., 1988; Williams et al., 1988). Sin embargo, la presencia de LIF en medio sin suero, aunque esencial, no es suficiente para mantener la pluripotencialidad, por lo que se necesita la adición de suero además de inhibidores de la vía de señalización MAPK/Erk y de la quinasa glicógeno sintasa 3 (GSK3) (medio 2i) que bloquean la diferenciación de las células pluripotentes (Silva et al., 2008; Sim et al., 2017; Ying et al., 2003).

Existen distintos marcadores característicos de las células pluripotentes, como son los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2* o *Nanog*, implicados en el silenciamiento de genes asociados a la diferenciación (Kashyap et al., 2009). *Nanog* es un factor transcripcional que regula el mantenimiento del estado pluripotente de las ESCs murinas al actuar como represor de genes implicados en diferenciación (Chambers et al., 2003; Shi et al., 2006), siendo el principal factor en el mantenimiento de la pluripotencia de la ICM *in vivo* (Allouba et al., 2015). *Nanog* se une al promotor de otro gen de pluripotencia, *Rex1*, y activa su transcripción (Son et al., 2013). *Rex1*, también conocido como *Zfp42*, es un marcador del estado pluripotente y es requerido para el mantenimiento de la auto-renovación y del potencial de diferenciación (Meek et al., 2020; Son et al., 2013). SSEA1 o CD15 es una molécula expresada en las ESCs murinas y en las iPSCs que comienza a expresarse en etapas tempranas durante la adquisición de la pluripotencia (Teshigawara et al., 2017). De hecho, la expresión de marcadores de pluripotencia sigue un patrón de eventos secuenciales que comienza con la aparición de la actividad fosfatasa alcalina (AP), seguido de la expresión de SSEA1. En este momento las células se encuentran en un estadio intermedio entre la célula somática y la iPSC (**Figura 10**). La expresión de los genes *Oct4* y *Nanog* endógenos marca la reprogramación completa de la célula (Brambrink et al., 2008). Acompañando al aumento de expresión de *Oct4* y *Nanog* se produce el silenciamiento progresivo de los genes exógenos utilizados para la inducción de la reprogramación (Brambrink et al., 2008; Teshigawara et al., 2017).

La conversión de las células somáticas a iPSCs implica el aumento en la expresión de genes asociados a pluripotencia y, en consecuencia, la disminución de la expresión de marcadores de célula diferenciada (Brambrink et al., 2008). Por tanto, los eventos que tienen lugar durante el proceso de reprogramación mantienen el siguiente orden: activación de la fosfatasa alcalina, silenciamiento de la expresión específica de genes somáticos, expresión del marcador SSEA1 y el silenciamiento de los genes exógenos junto con la expresión de los genes endógenos *Oct4* y *Nanog* (**Figura 10**) (Teshigawara et al., 2017).

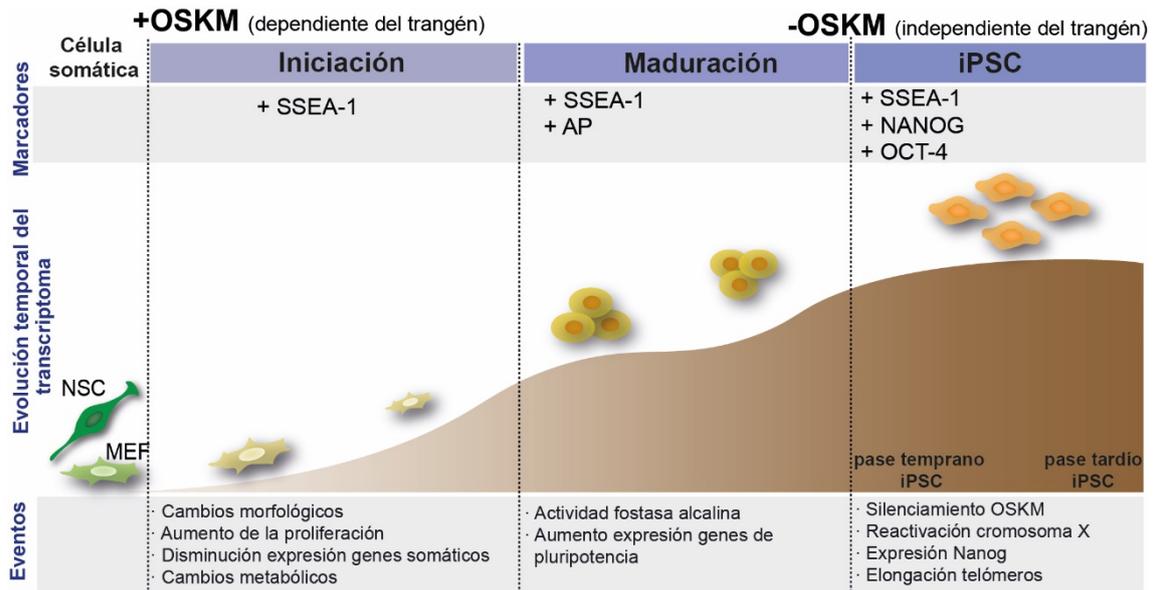
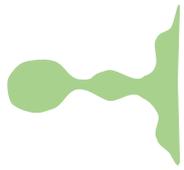


Figura 10. Eventos moleculares clave durante el proceso de reprogramación celular. La reprogramación celular desde la célula somática, como por ejemplo fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) o las NSCs, conlleva una serie de eventos que ocurren de forma secuencial y que dan lugar a estados celulares intermedios que expresan marcadores de pluripotencia (SSEA1 y AP o fosfatasa alcalina) hasta alcanzar el estado de pluripotencia completo, dando lugar a las llamadas células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), en la cuales se produce la reactivación del cromosoma X silenciado y la expresión de los marcadores pluripotentes *Nanog* y *Rex1*. El proceso de reprogramación celular da lugar a cambios metabólicos, como el aumento de la proliferación, y epigenéticos, como son la hipometilación. Figura adaptada de David y Polo, 2014.

Todos estos eventos son posibles gracias a la actuación de los mecanismos epigenéticos que remodelan la cromatina para permitir la expresión o represión génica (Apostolou and Hochedlinger, 2013; Papp and Plath, 2013). Uno de los eventos llamativos en el proceso de adquisición de la pluripotencia es la reactivación del cromosoma X silenciado. Las células somáticas de mamíferos hembras, dotadas con dos cromosomas X, sufren una inactivación de uno de los dos cromosomas (XCI) como estrategia de compensación de la dosis génica del cromosoma sexual entre hembras y machos. Esta inactivación del cromosoma X materno o paterno se produce de forma aleatoria durante el desarrollo embrionario temprano (Bar et al., 2019). El cromosoma inactivado (Xi) expresa el RNA no-codificante *Xist*, molécula responsable de dicha inactivación, mientras que el cromosoma X activo (Xa) expresa el RNA antisentido *Tsix* (Cantone and Fisher, 2017), que reprime la expresión de *Xist* (Lee and Lu, 1999). La expresión de *Xist* está regulada por los factores transcripcionales Oct4, Sox2 y Nanog (Cantone and Fisher, 2017; Navarro et al., 2008; Ohhata and Wutz, 2013), por lo que las células pluripotentes son capaces de regular a *Xist* reprimiendo su expresión y aumentando la expresión de *Tsix*, y así permitiendo la reactivación del cromosoma Xi (Cantone and Fisher, 2017; Janiszewski et al., 2019). Por ello, uno de los sucesos remarcables en el proceso de adquisición de un estado completo de pluripotencia es la reactivación del cromosoma Xi en las células de animales hembra,



de manera que la célula pasa a presentar dos cromosomas X activos (XaXa) (Cantone and Fisher, 2017; Ohhata and Wutz, 2013; Pasque and Plath, 2015).

Una célula pluripotente se define por su capacidad de formar distintos tipos celulares procedentes de las tres capas germinales, mesodermo, endodermo y ectodermo. El crecimiento de las células pluripotentes en cuerpos embrioides (EBs) permite estudiar el potencial de diferenciación de estas células (Sheridan et al., 2012). Para ello, se han desarrollado métodos tanto para la generación de células de tejidos específicos como para la diferenciación de forma estocástica hacia las tres capas germinales (Sheridan et al., 2012) demostrando ser una estrategia muy útil para promover los pasos iniciales de diferenciación (Bibel et al., 2007; Sheridan et al., 2012).

En la generación de iPSCs se han utilizado tanto estrategias integrativas como no integrativas (Omole and Fakoya, 2018). Los retrovirus han sido, por ejemplo, una de las herramientas más utilizadas para introducir los factores de reprogramación y, aunque se trata de una metodología eficiente y relativamente sencilla, la reprogramación completa a iPSCs conlleva el silenciamiento de los genes exógenos virales, y no siempre este silenciamiento es eficiente (Omole and Fakoya, 2018). También se han utilizado lentivirus que, al igual que los retrovirus, son capaces de integrarse en el genoma (Blelloch et al., 2007; Yu et al., 2007). No obstante, uno de los aspectos que más preocupan con el uso de vectores virales es la integración aleatoria del transgén con el consiguiente riesgo de mutaciones (Montini et al., 2009; Omole and Fakoya, 2018). Por ello, se han desarrollado otras estrategias integrativas mediante vectores no virales como el uso de liposomas, la electroporación de DNA (Omole and Fakoya, 2018) o la transfección de transposones *piggybac* co-transfectados con una transposasa. Si bien este sistema evita el riesgo de mutagénesis, existen transposones endógenos sobre los cuales podría actuar la enzima transposasa (Omole and Fakoya, 2018) y, además, los métodos no virales presentan una menor eficiencia (**Tabla 1**).

Los sistemas no integrativos incluyen vectores virales como son los adenovirus (Stadtfield et al., 2008) o el virus Sendai (Fusaki et al., 2009). En el caso de los adenovirus, la eficiencia es muy baja en comparación a los retrovirus o lentivirus, y además, requiere múltiples infecciones (Omole and Fakoya, 2018). El virus Sendai en cambio es un sistema eficiente pero la replicasa de RNA del sistema es muy sensible al contenido de la secuencia transgénica y, al replicarse constitutivamente, la eliminación del vector es complicada (Fusaki et al., 2009; Omole and Fakoya, 2018). También existen sistemas no integrativos no virales como pueden ser los vectores episomales, RNAs o proteínas; no obstante, estos sistemas tienen una eficiencia baja con respecto

a los integrativos y requieren transfecciones repetidas para mantener los factores exógenos activos (Omole and Fakoya, 2018) (Tabla 1).

Tabla 1. Sistemas de reprogramación celular *in vitro*. Se han desarrollado distintos sistemas para la expresión de los factores de reprogramación celular que pueden integrarse o no en el genoma. Las ventajas (verde) e inconvenientes (rojo) de cada sistema han sido indicadas.

SISTEMAS INTEGRATIVOS	Virales	Retrovirus	Eficiente y sencilla Silenciamiento del transgen ineficiente Mutagénesis
		Lentivirus	Eficiente y sencilla Mutagénesis
	No virales	DNA: liposomas o electroporación	No mutagénesis Menor eficiencia
		Transposones	No mutagénesis Menor eficiencia Transposones endógenos
SISTEMAS NO INTEGRATIVOS	Virales	Adenovirus	No mutagénesis Eficiencia baja Múltiples inyecciones
		Virus Sendai	No mutagénesis. Eficiente Díficil eliminación del vector Sensible según el transgen
	No virales	Vectores episomales	No mutagénesis Eficiencia baja Múltiples inyecciones
		RNA	No mutagénesis Eficiencia baja Múltiples inyecciones
		Proteína	No mutagénesis Eficiencia baja Múltiples inyecciones

La creación de vectores policistrónicos virales o no virales ha permitido la expresión de los factores necesarios para la reprogramación bajo el control de un único promotor aumentando de esta forma la eficiencia de la reprogramación y reduciendo el riesgo de mutagénesis (Carey et al., 2009; Omole and Fakoya, 2018). Además, se han desarrollado sistemas inducibles (con tetraciclina o doxiciclina, por ejemplo) que permiten controlar la expresión de los factores *in vivo*, y, por tanto, el momento de la reprogramación, reduciendo de esta forma los efectos del silenciamiento ineficiente y la reactivación del transgén (Omole and Fakoya, 2018). Por ejemplo, dicha reprogramación *in vivo* ya ha sido conseguida en ratones transgénicos mediante un sistema inducible por doxiciclina que permite la expresión del transgén OSKM (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014; Rodríguez-Matellán et al., 2020), y por otro grupo utilizando células de la retina murina que reprograman a células progenitoras mediante fusión celular (Sanges et al., 2013). El proceso de reprogramación *in vivo* conlleva la formación de tumores en el organismo (Ofenbauer and Tursun, 2019; Srivastava and DeWitt, 2016), convirtiéndolo además en una herramienta atractiva para el estudio de la reprogramación celular en el contexto del cáncer.



La reprogramación de células somáticas a un estado pluripotente conlleva modificaciones epigenéticas durante el proceso de reprogramación. Estos cambios epigenéticos incluyen la metilación del DNA, las modificaciones de histonas y la reactivación del cromosoma X silenciado; cambios que regulan la proliferación, supervivencia, pluripotencia y diferenciación celular (Meissner, 2010). Más concretamente, se ha descrito una pérdida variable de la impronta genómica (LOI, del inglés “*loss of imprinting*”) durante la reprogramación a iPSCs (Li et al., 2019; Takikawa et al., 2013). De hecho, los cambios en impronta genómica han sido sugeridos como un posible marcador para la pluripotencia (Do et al., 2009; Kim et al., 2013). Los genes improntados cuyo estado de impronta se pierde más comúnmente en las iPSCs humanas son *H19*, *IGF2*, *MEG3*, *PEG3*, *PEG10* y *MEST* (Bar et al., 2017; Kim et al., 2007; Ma et al., 2014; Perrera and Martello, 2019; Pick et al., 2009; Rugg-Gunn et al., 2005, 2007). Ejemplo del papel de los genes improntados en el proceso de reprogramación son los ratones deficientes en el gen improntado *Peg3* que muestran una mayor expresión de genes de pluripotencia en ESCs y una mejora de la eficiencia en la reprogramación tanto a partir de MEFs como de NSCs (Theka et al., 2017). También el estado de impronta del *cluster Dlk1-Dio3* situado en el cromosoma 12 de ratón, se ha descrito como posible marcador del estado de pluripotencia debido a su frecuente alteración en las iPSCs (Li et al., 2019; Li et al., 2011). Como se ha descrito anteriormente, la expresión monoalélica de estos genes improntados está regulada por los niveles de metilación de sus regiones DMRs. Por ello, la pérdida de impronta genómica durante el proceso de reprogramación se correlaciona con alteraciones en los niveles de metilación de las ICRs (Bar S et al. 2017). Curiosamente, las DMRs metiladas paternalmente parecen estar más afectadas por la pérdida de impronta que las metiladas maternalmente (Bar et al., 2017; Rugg-Gunn et al., 2007).

Sin embargo, algunos estudios defienden que la presencia de procesos de LOI representa una aberración de las células que las convierte en potencialmente peligrosas para su uso como herramienta terapéutica, en lugar de una característica epigenética inherente (Bar et al., 2017). Por lo tanto, la metilación del DNA en las regiones de control de impronta genómica puede suponer una barrera epigenética importante para la reprogramación celular (De Carvalho et al., 2010).

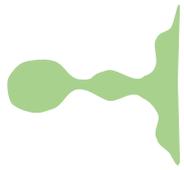
Cáncer cerebral: teoría de la célula madre cancerosa y glioblastoma

A pesar de los progresos realizados en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer, se mantiene como una de las principales causas de muerte en el mundo (Ayob and Ramasamy, 2018). El pensamiento convencional que se tenía acerca del origen del cáncer establecía que la

enfermedad era resultado de la acumulación de cambios genéticos en células somáticas maduras que daban lugar a la proliferación descontrolada de dichas células formando el tumor; sin embargo, la idea que ha ido captando mayor apoyo en los últimos años sugiere que la heterogeneidad presente en los diferentes tipos de cáncer se debe a una jerarquía celular dentro de la masa cancerosa, en la cual las llamadas células madre cancerosas (CSCs) pudieran encontrarse en la cúspide de dicha jerarquía (Ayob and Ramasamy, 2018; Fabian et al., 2013; Reya et al., 2001). Estas CSCs serían las células responsables del origen y la sustentación del tumor gracias a su capacidad de auto-renovación y multipotencia, características que comparten con las SCs de tejido, pero, además, serían responsables de la resistencia a los tratamientos (Bomken et al., 2010; Gangemi et al., 2009). Precisamente, esta última capacidad de resistencia a quimioterapia y radiación sugiere un origen a partir de SCs quiescentes que mantendrían dicho estatus durante su transformación maligna (Ayob and Ramasamy, 2018; Gilbert and Ross, 2009).

Debido a su similitud con las SCs adultas normales, las CSCs generalmente se caracterizan con marcadores de SC tales como las proteínas CD133, CD44 o CD90, y mediante su capacidad de ser aisladas y crecidas *in vitro*; sin embargo, no existen marcadores exclusivos de las CSCs (Ayob and Ramasamy, 2018; Capp, 2019). Estrategias como el aislamiento de células CD34⁺CD38^{bajo} o CD34⁺CD38⁻ en el caso de la leucemia mieloide aguda humana, o células CD133⁺ o CD15⁺ en tumores cerebrales humanos, o CD44⁺CD24^{bajo} o CD44⁺CD24⁻ en tumores de pulmón, han sido utilizadas para la obtención y estudio de las CSCs (Nguyen et al., 2012). Sin embargo, la reproducibilidad de estos ensayos está en controversia debido a la alta heterogeneidad entre los cánceres del mismo tipo (Nguyen et al., 2012). Uno de los eventos más interesantes observados en el estudio del cultivo de las CSCs de tumores cerebrales fue encontrar la similitud entre los medios utilizados para el cultivo de NSCs y para el cultivo de CSCs (Nguyen et al., 2012; Reynolds and Weiss, 1992), apoyando nuevamente la idea de la SC adulta como el origen de la CSC. Además, esta teoría es defendida por estudios que sugieren que la incidencia del cáncer está proporcionalmente relacionada con el tamaño de la población de SCs en el tejido (Alcantara Llaguno et al., 2019; Tomasetti and Vogelstein, 2015). Sin embargo, aunque la presencia de CSCs ha sido demostrada en la mayor parte de tumores (Lapidot et al., 1994; Leick et al., 2012), incluyendo los tumores cerebrales (Singh et al., 2004), existe todavía controversia acerca de la SC adulta como el origen de la CSC (Ayob and Ramasamy, 2018; Capp, 2019; Yoo and Hatfield, 2008).

En el cerebro humano existen diferentes tipos de tumores que difieren en el origen celular, y en la parte del cerebro afectada. Generalmente, los tumores cerebrales se nombran de acuerdo al tipo celular que los inicia y/o dónde se localizan. Los gliomas y los meningiomas son los tipos de tumores cerebrales más comunes (Claus et al., 2005). Los gliomas, originados por células de la



glía, se clasifican en astrocitoma, astrocitoma anaplásico y glioblastoma (GBM), cuando el origen es astrocitario; oligodendroglioma, cuando el origen es oligodendrocitario; o ependimoma, cuando el origen son los ependimocitos (**Tabla 2**) (Maher et al., 2001). Los GBMs son los tumores primarios cerebrales más comunes y agresivos también llamados de grado IV, con una supervivencia media de entre 12 y 15 meses tras el diagnóstico a pesar de los tratamientos mediante cirugía, radiación y quimioterapia (Bien-Moller et al., 2018).

El diagnóstico del GBM se basa principalmente en la histología del tumor, pero cada vez es más patente la necesidad de estudios moleculares para su clasificación (Nefitel et al., 2019). De hecho, una de las alteraciones más comúnmente encontradas en los pacientes de GBM es la amplificación de la molécula EGFR, activador de las vías de señalización Ras/Raf/MAPK y fosfoinositol 3 quinasa (PI3K) que regulan proliferación, supervivencia, migración y tumorigénesis (Ludwig and Kornblum, 2017; Zahonero et al., 2015). Esta alteración se encuentra en el 40% de los casos de GBM (Ludwig and Kornblum, 2017; Sugawa et al., 1990). Alteraciones en el gen supresor de tumores *PTEN* han sido frecuentemente descritas en GBM, afectando también la vía PI3K/Akt (Benitez et al., 2017; Koul et al., 2007). Otra de las vías frecuentemente alteradas en los pacientes de GBM es la que compete a la vía de p53, en la cual el gen *TP53* se encuentra mutado en el 35% de los casos (Zahonero et al., 2015). Finalmente, la tercera vía más frecuentemente afectada en el GBM es la vía de Retinoblastoma (Rb), en la cual los inhibidores de ciclo celular *CDKN2A* (p16^{Ink4a}) y *CDKN2B* (p19^{Arf}) se encuentran inactivados alternativamente en el 50% de los afectados por GBM (Zahonero et al., 2015). Otra mutación recurrente es en el gen isocitrato deshidrogenasa 1 o *IDH1*. Los gliomas con IDH mutado presentan islas CpG hipermetiladas y correlaciona con una mejor prognosis, estando asociada a gliomas de bajo grado y GBM secundarios (Noushmekr et al., 2010).

Una demostración de la heterogeneidad presente en el GBM es la clasificación de subtipos celulares en función de su transcriptoma (Nefitel et al., 2019). Mediante estudios de expresión intra-tumorales, al menos tres subtipos celulares han sido identificados dentro de los GBMs: tipo pro-neural, tipo clásico, y tipo mesenquimal (Nefitel et al., 2019; Verhaak et al., 2010; Wang et al., 2017). Cada subtipo está asociado a distintas alteraciones genéticas; por ejemplo, en el subtipo pro-neural es común observar alteraciones en el gen *PDGFRA*, un activador de la vía Ras/Raf/MAPK, mientras que las alteraciones en *EGFR* son más comunes en el subtipo clásico. En cambio, un aumento del marcador CD44 ha sido descrito en el fenotipo mesenquimal (Nefitel et al., 2019; Zhu et al., 2006). Estos subtipos celulares se pueden encontrar coexistiendo en un mismo tumor e incluso pueden cambiar de un subtipo a otro con el tiempo o los tratamientos (Patel et al., 2014; Sottoriva et al., 2013; Wang et al., 2017). Más recientemente, un estudio por

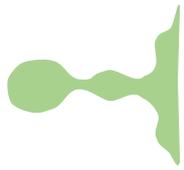
secuenciación de RNA de célula única (scRNAseq) ha mostrado que las células malignas dentro del GBM pueden ser clasificadas en cuatro estados: tipo progenitor neural, tipo oligodendrocitario, tipo astrocitario y tipo mesenquimal (Nefitel et al., 2019), y que estos tipos celulares coexisten dentro del tumor, pero la frecuencia de cada uno de ellos cambia dependiendo de las alteraciones génicas presentes en el tumor (Nefitel et al., 2019).

Tabla 2. Clasificación de los gliomas en función de su origen celular. Los gliomas pueden ser clasificados atendiendo al tipo celular que los origina, siendo el astrocito el tipo celular responsable de la formación de los gliomas más comunes y agresivos, los glioblastomas.

	Célula de origen	Tipo de glioma
GLIOMAS	Astrocito	Astrocitoma
		Astrocitoma anaplásico
		Glioblastoma
	Oligodendrocito	Oligodendroglioma
	Ependimocito	Ependimoma

El GBM es un tumor cerebral muy agresivo e incurable, por lo que identificar la célula de origen responsable de la formación de este cáncer puede ayudar a entender los mecanismos implicados en la aparición y progresión del mismo, y con ello, desarrollar estrategias terapéuticas y de diagnóstico precoz. Muchas investigaciones sobre el origen del GBM se han centrado en la identificación de las CSCs en este tipo de cáncer, conocidas como células madre de glioma o GSCs (Singh et al., 2004), responsables del origen, expansión, recurrencia y resistencia a tratamientos del GBM (Auffinger et al., 2015; Bien-Moller et al., 2018). Inicialmente, se pensaba que la transformación de astrocitos y/o oligodendrocitos sería la responsable de la formación del tumor debido a la capacidad proliferativa de estas células; sin embargo, con el descubrimiento de las NSCs, la teoría de la CSC ha adquirido fuerza, demostrándose la presencia de SCs capaces de formar y sustentar el GBM (Altmann et al., 2019; Ignatova et al., 2002; Lathia et al., 2015; Sanai et al., 2005; Singh et al., 2004).

Esta teoría plantea que la elevada capacidad de proliferación de las NSCs y sus progenitores, las hace más susceptibles a la transformación maligna (Chesler et al., 2012). Precisamente, las GSCs comparten muchas características con las NSCs adultas. De hecho, la disgregación y cultivo *in vitro* del tumor es capaz de generar agregados clonales denominados por algunos autores como “*tumoresferas*”, que pueden ser diferenciados en linajes neurales, propiedad que comparten con las NSCs (Gargini et al., 2020; Joseph et al., 2015; Kawamura et al., 2018; Ledur et al., 2017; Ludwig and Kornblum, 2017). Además, el GBM promueve la formación de vasculatura, para mantener la población de células tumorales, mimetizando así el nicho normal de las NSCs (Calabrese et al., 2007; Chesler et al., 2012). Dentro de estas características compartidas entre las NSCs y las GSCs encontramos diversos factores transcripcionales. Por



ejemplo, SOX2 se encuentra altamente expresado en las NSCs en la SVZ adulta (Ferri et al., 2004), también aparece aumentado en GBM promoviendo la malignidad del tumor (Berezovsky et al., 2014; Bulstrode et al., 2017). La fosfatasa PTEN está implicada en el control de la proliferación de las NSCs y se requiere para la migración celular y la diferenciación neuronal (Chesler et al., 2012), mientras que la proteína supresora de tumores p53 suele aparecer alterada en GBM (Newcomb et al., 1993). De hecho, mutaciones en PTEN y p53, junto con mutaciones en Rb, en las NSCs adultas de la SVZ, son capaces de formar tumores cerebrales; mientras que estos tumores no fueron encontrados a partir de astrocitos maduros deficientes en estas mismas proteínas (Jacques TS et al. 2010), situando nuevamente el origen de este tumor cerebral en las NSCs. También la pérdida de función de los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina p16^{INK4a} y p19^{ARF} aparece de forma frecuente en GBM (Ivanchuk et al., 2001). Aunque estas alteraciones no son suficientes para iniciar el tumor, una activación conjunta de EGFR, permite la formación del GBM a partir de NSCs o astrocitos (Bachoo et al., 2002) y, de hecho, la sobre-expresión del gen *EGFR* aparece en prácticamente la mitad de los casos de GBM humano (Gargini et al., 2020).

Más recientemente se ha demostrado que determinadas mutaciones en NSCs de la SVZ dan lugar a la formación de tumores tipo GBM que migran a diversas regiones del cerebro, como la corteza dorso-lateral caudal, sin afectar la citoarquitectura de la SVZ (Alcantara Llaguno et al., 2019; Lee et al., 2018) (**Figura 11**). Además, esta capacidad de formar tumores disminuye a medida que se reduce el potencial de diferenciación, sugiriendo que las NSCs se transforman más fácilmente que sus progenitores (Alcantara Llaguno et al., 2019). Estos estudios, junto con las características compartidas, así como la expresión de muchos otros marcadores que identifican ambas poblaciones celulares, NSCs y GSCs, como NESTINA, VIMENTINA, CD133 o CD44 (**Tabla 3**), apoyan la teoría de las NSCs como el tipo celular más próximo a las GSCs, y, por tanto, el más probable como origen del GBM.

Conocer los marcadores que definen a la célula responsable del origen del cáncer en cerebro es clave para poder aislarla y estudiarla, por lo que la identificación de las GSCs se ha basado en el uso de anticuerpos que reconocen proteínas presentes en estas células. CD133, proteína de membrana codificada por el gen *PROMININ-1*, fue el primer marcador propuesto para el aislamiento y estudio de las GSCs (Hemmati et al., 2003; Lathia et al., 2015). Esta glicoproteína está implicada en diferenciación celular y en la transición epitelio-mesenquimal (EMT), pero también es un marcador de NSCs (Ludwig and Kornblum, 2017). Si bien se han podido aislar células CD133 positivas a partir de tumores cerebrales humanos, que eran capaces de propagar nuevamente el tumor (Ludwig and Kornblum, 2017; Singh et al., 2004), el uso de este marcador se encuentra en controversia (Brown et al., 2017), debido a que se ha observado en células

diferenciadas, y células CD133 negativas son también capaces de iniciar un tumor (Ludwig and Kornblum, 2017; Wang et al., 2008).

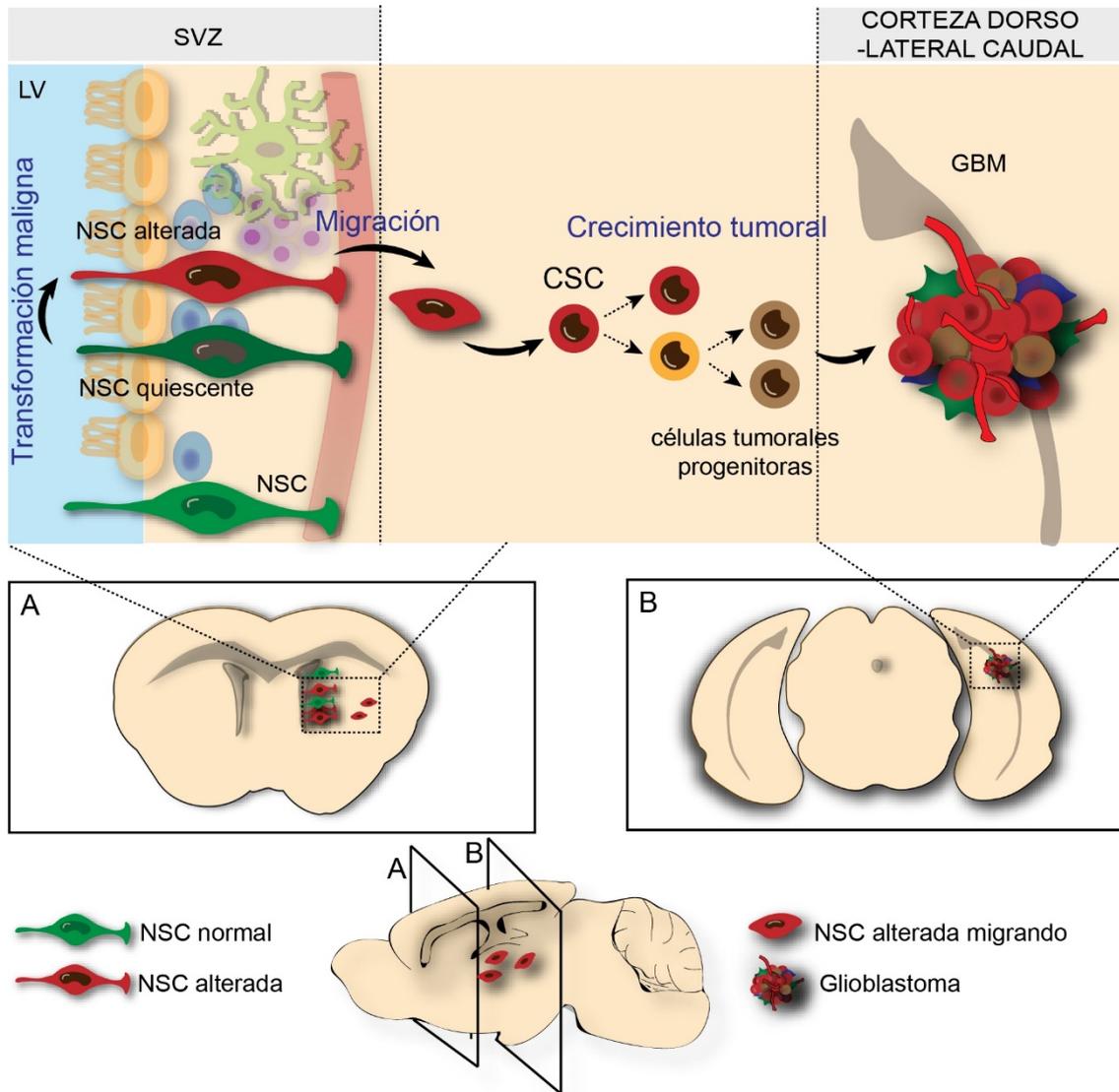
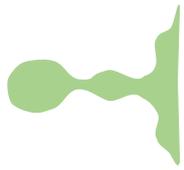


Figura 11. Las NSCs adultas de la SVZ se transforman en CSCs que migran y forman el GBM en regiones distales. Una de las hipótesis más apoyadas sobre el origen del cáncer es la teoría de la célula madre cancerosa (CSC), según la cual el GBM se forma a partir de la transformación maligna de las NSCs adultas. Esta teoría se ve reforzada por la presencia de alteraciones propias del GBM que aparecen en las NSCs adultas de la SVZ. Estas NSCs alteradas pueden migrar a regiones distales incluyendo la corteza dorso-lateral caudal donde forman los tumores. LV: lumen ventricular.

La proteína de membrana CD44, característica de células mesenquimales (Zhu et al., 2006), también ha sido identificada como un marcador de superficie típico presente en las CSCs, individualmente o asociado a otras proteínas de membrana como CD133 (Wang et al., 2018b). CD44 es un ligando del ácido hialurónico, un componente de la matriz extracelular, cuya expresión se encuentra elevada en las CSCs de diferentes tipos de cáncer (Basakran, 2015; Ishimoto et al., 2011; Mooney et al., 2016; Wang et al., 2018b) y que, de hecho, ha sido utilizado para el aislamiento y estudio de CSCs, incluyendo las GSCs (Ghuwalewala et al., 2016; Su et al.,



2017; Wang et al., 2018b). Esta molécula está implicada en diversos procesos como son la proliferación, apoptosis, adhesión/migración y angiogénesis asociadas a la malignidad del cáncer (Mooney et al., 2016; Wang et al., 2018a). Además, CD44 ha sido implicado en el proceso de transición epitelio-mesenquimal que tiene lugar en el cáncer (Ponta et al., 2003; Zhao et al., 2016). Este receptor además regula los estados de quiescencia y diferenciación de las NSCs adultas en la SGZ (Su et al., 2017). Dentro de los subtipos de GBM, CD133 junto con OLIG2 han sido asociados al tipo pro-neural más proliferativo, mientras que la co-expresión de CD133 y CD44 se ha asociado al tipo mesenquimal más invasivo (Brown et al., 2017). De tal manera que aquellos tumores enriquecidos únicamente con CD133 son más proliferativos, en cambio, aquellos que se encuentran enriquecidos por CD44, son más invasivos (Brown et al., 2015).

Otros marcadores de membrana como CD15 o SSEA1 (Son et al., 2009) y la Integrina $\alpha 6$ (Lathia et al., 2015) han sido también utilizados para definir a la población de GSCs (**Tabla 3**). Aunque poco se conoce acerca del papel de SSEA1 en el desarrollo del GBM, sí se han descrito células positivas para SSEA1 capaces de generar el tumor *in vivo* (Ludwig and Kornblum, 2017). El receptor de laminina INTEGRINA $\alpha 6$, altamente expresado en el embrión, en células madre hematopoyéticas y en NSCs (Fortunel et al., 2003) se expresa también en las GSCs, co-localizando con CD133 (**Tabla 3**) y regulando así la vasculatura del tumor (Lathia et al., 2015). Otro marcador asociado clásicamente a las NSCs es la proteína de filamentos intermedios NESTINA (Lendahl et al., 1990; Park et al., 2010); que también se expresa en diversos GBMs correlacionando con una menor ratio de supervivencia en los pacientes afectados (Ludwig and Kornblum, 2017). La proteína VIMENTINA se encuentra expresada de forma ubicua en las células mesenquimales, pero un aumento en la expresión de esta molécula ha sido descrita en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el GBM (Satelli and Li, 2011). En el cerebro murino, el gen *Vimentina* se expresa principalmente en células endoteliales, plexo coroideo y meninges (**Tabla 3**) (Yamada et al., 1992) y regula el estado de quiescencia de las NSCs (Morrow et al., 2020) regulando la polimerización de los filamentos de Nestina (Park et al., 2010). Sin embargo, las muestras de GBM presentan niveles altos de *VIMENTINA* y se asocian con la capacidad de migración e invasión del tumor (Lin et al., 2016; Nowicki et al., 2019) y con una menor ratio de supervivencia en los pacientes (Lin et al., 2016).

Además de los marcadores de membrana o citosólicos, también han sido descritos diversos factores transcripcionales implicados en el desarrollo del GBM (**Tabla 3**). Un estudio del 2014 demostró una firma similar al de las ESCs en GBM con un aumento de las proteínas NANOG, KLF4, c-MYC, OCT4 y SOX2 (Elsir et al., 2014; Hattermann et al., 2016), coincidente con los factores utilizados para la reprogramación a iPSCs. El aumento de expresión de estos factores ha sido

correlacionado con una menor supervivencia en los pacientes afectados por este tipo de cáncer (Bradshaw et al., 2016; Holmberg et al., 2011) y resultan esenciales para el crecimiento y la capacidad de invasión del tumor (Kuciak et al., 2019; Zbinden et al., 2010).

Tabla 3. Marcadores moleculares asociados al GBM. Recopilación de marcadores descritos en GBM y las funciones asociadas. El tipo celular no tumoral en el que se ha descrito también se indica, así como su presencia o no en las NSCs.

Marcador molecular	Tipo celular no tumoral asociado	Expresión en NSCs	Función asociada al GBM
CD44	Células mesequimales y células madre	Sí	Proliferación, migración y angiogénesis
CD133	Células madre	Sí	Proliferación
CD15 o SSEA1	ESCs murinas	MUY BAJA	Auto-renovación
Nestina	NSCs y progenitores	Sí	Migración, regulación ciclo celular, "stemness"
Vimentina	Células mesequimales y ependimales, meninges, plexo coroideo y NSCs	Sí	Migración
Integrina $\alpha 6$	NSCs	Sí	Auto-renovación y formación del tumor
Olig2	NSCs y progenitores de oligodendrocitos y neuronas motoras	Sí	Resistencia y plasticidad, crecimiento
Sox2	Células madre, SNC en desarrollo, NSCs y progenitores	Sí	Proliferación, "stemness" y pluripotencia
Klf4	ESCs, células madre mesequimales y NSCs	Sí	Fusión mitocondrial, regulación ciclo celular y pluripotencia
c-Myc	SNC en desarrollo y NSCs	Sí	Proliferación, radio-resistencia y pluripotencia
Oct4	ESCs	NO	Auto-renovación y pluripotencia
Nanog	ESCs y NSCs	MUY BAJA	Proliferación/crecimiento, auto-renovación y pluripotencia

Los GBMs presentan un fenotipo enormemente complejo debido a los múltiples factores genéticos y epigenéticos implicados en su origen y progresión. Con objeto de elucidar los mecanismos responsables de este tipo de tumor, se han generado modelos animales que recapitulan distintos aspectos de los GBM humanos (Rosenthal and Brown, 2007). Actualmente, los modelos disponibles pueden ser clasificados en espontáneos, inducidos químicamente, diseñados genéticamente, o generados por trasplante (Sampetean and Saya, 2018). El modelo de generación espontánea del tumor es en el que menos alteraciones se producen por la manipulación experimental; sin embargo, la capacidad de formar tumores en ratones queda limitada a un pequeño número de cepas, cuya incidencia es de alrededor del 1% (Sampetean and Saya, 2018). Los modelos inducidos químicamente mediante la administración de carcinógenos permiten una alta incidencia de tumores con mutaciones típicas del GBM humano (Figura 12A), pero el inconveniente de esta estrategia es la variabilidad en la predictibilidad y reproducibilidad de la formación de dichos tumores (Sampetean and Saya, 2018).



La progresión molecular de los gliomas implica la acumulación de cambios genéticos y epigenéticos que resultan en la pérdida de función de genes supresores de tumores o la activación de oncogenes (Parsons et al., 2008). Diversos modelos genéticos que recapitulan estas mutaciones se han desarrollado para el estudio del GBM, siendo necesaria la alteración de al menos dos de los principales genes implicados (Miyai et al., 2017; Sampetreaan and Saya, 2018). Debido a que la ganancia de función del receptor EGFR es la alteración más común en el GBM, diversos modelos genéticos de ratón se han basado en la sobre-expresión de este receptor (Ding et al., 2003; Gargini et al., 2020). Otros genes han sido estudiados en el GBM mediante la generación de ratones que contienen el gen de interés, flanqueado por secuencias loxP, y la recombinasa Cre bajo el control de promotores específicos como el promotor de GFAP, expresado por las NSCs y los astrocitos maduros, o de Nestina, expresando por las NSCs y sus progenitores (Sampetreaan and Saya, 2018). Además, esta estrategia también ha permitido la inducción de la Cre por tamoxifeno o doxiciplina (**Figura 12B**). En los últimos años, el uso de vectores virales para la generación de modelos murinos de GBM se ha extendido para evitar utilizar múltiples cepas murinas y el coste que ello conlleva (Miyai et al., 2017; Sampetreaan and Saya, 2018). Este método se basa en la transferencia génica mediante la inyección de vectores virales (**Figura 12C**). De esta forma, el mismo sistema de recombinación de Cre comentado anteriormente puede ser utilizado en animales transgénicos basados en secuencias loxP, pero en este caso la Cre recombinasa es transducida mediante un vector viral (**Figura 12C**) (Sampetreaan and Saya, 2018).

Finalmente, el trasplante también es utilizado como modelo de formación del GBM. Este sistema se basa en la inyección estereotáxica de células cancerígenas en el cerebro del animal (**Figura 12D**). Se trata de uno de los modelos más reproducibles y utilizados (Sampetreaan and Saya, 2018), e incluye los xenotrasplantes, mediante la inyección de células de GBM humanas en animales inmunocomprometidos, o los alotrasplantes mediante la inyección de células de GBM a partir de un donante de la misma especie (Miyai et al., 2017; Sampetreaan and Saya, 2018). Si bien este modelo resulta realmente útil para testar la tumorigenicidad de las células y sus características, el uso de células ya transformadas impide abordar el estudio de los mecanismos implicados en el inicio de la transformación.

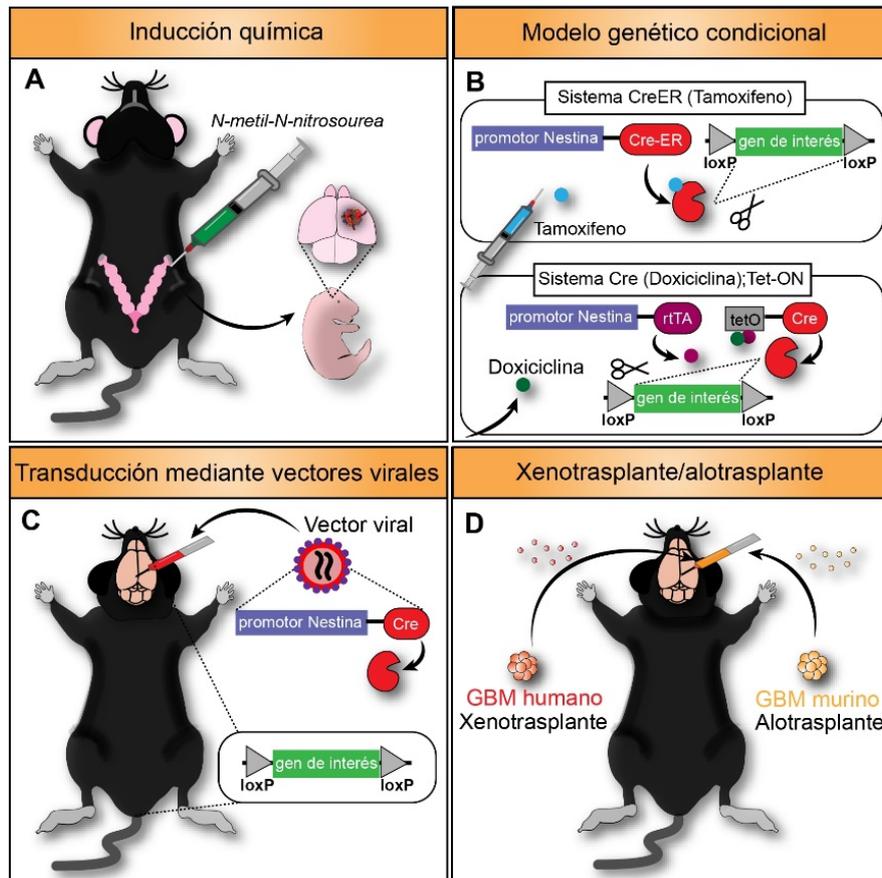
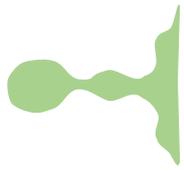


Figura 12. Modelos murinos de generación de GBM. **A)** El modelo de formación de GBM mediante la inducción química se basa en la inyección transplacentar de sustancias cancerígenas, como el N-metil-N-nitrosourea, en hembras preñadas, permitiendo la formación del tumor en el cerebro de los embriones. **B)** El modelo genético permite generar un sistema condicional para controlar la localización, pero también el momento de la transformación maligna. Sistemas como la Cre recombinasa inducible por tamoxifeno o doxiciclina permite la expresión de Cre bajo el promotor que se elija, como por ejemplo Nestina, de manera que únicamente las células Nestina positivas expresarán el gen de interés, flanqueado por secuencias loxP, cuando se administre el antibiótico. **C)** El modelo genético también permite la expresión del gen de interés, flanqueado por secuencias loxP, mediante la inyección intracraneal de vectores virales que codifican para la Cre recombinasa. Este modelo también es compatible con el sistema condicional. **D)** La formación de GBM puede ser inducido mediante la inyección intracraneal de células tumorales humanas (xenotrasplante) o murinas (alotrasplante) en la región cerebral de interés.

Impronta genómica y cáncer

Los genes improntados han sido implicados en el crecimiento embrionario, el crecimiento de la placenta o en el metabolismo del organismo adulto (Kim et al., 2015; Morison et al., 2005). Debido a la expresión monoalélica de estos genes, son extremadamente susceptibles a las mutaciones que se pueden ocasionar durante la formación de los tumores. Una mutación en el alelo expresado puede conducir al silenciamiento completo del gen, mientras que una mutación en el alelo silenciado puede suponer la expresión bialélica del gen. Precisamente, la LOI es uno de los eventos más comunes y tempranos que ocurren en los cánceres humanos (Feinberg, 2007; Holm et al., 2005; Jelinic and Shaw, 2007; Perrera and Martello, 2019). El 100% de las leucemias



mieloides crónicas, tumores de Wilms, meningiomas, así como cánceres de ovario y colorrectales, entre otros, presentan LOI (Jelinic and Shaw, 2007). También se han descrito alteraciones de la impronta genómica en osteosarcomas, hepatoblastomas o incluso gliomas (Jelinic and Shaw, 2007). Como consecuencia de este proceso de pérdida de impronta genómica, la expresión de los genes improntados se encuentra afectada en los diferentes tipos de cáncer (Kim et al., 2015). Este hecho, junto con la mayor propensión de padecer cáncer en pacientes afectados por síndromes de impronta genómica, subraya la importancia de este proceso en el origen y desarrollo del cáncer (Perrera and Martello, 2019; Uribe-Lewis et al., 2011).

La asociación entre LOI y cáncer mejor caracterizada es la descrita en el locus *IGF2-H19* en el tumor de Wilms (Leick et al., 2012; Uribe-Lewis et al., 2011). Este locus contiene el gen de expresión materna *H19* y el gen de expresión paterna *IGF2*, y la pérdida de impronta genómica en este locus ha sido asociada a gran variedad de tumores (Brouwer-Visser and Huang, 2015; Livingstone, 2013; Raveh et al., 2015), incluyendo los gliomas (Uyeno et al., 1996). Cabe destacar también la mayor predisposición de desarrollar diferentes tipos de cáncer en pacientes con el síndrome de impronta Beckwith-Wiedemann (BWS) que muestran expresión bialélica de *IGF2* (Plass and Soloway, 2002). Este evento se encuentra asociado a un aumento de la metilación en la DMR del locus *H19-IGF2* y a una disminución en la expresión materna del gen *H19* (Plass and Soloway, 2002). El silenciamiento de la expresión materna mediante metilación también ha sido descrito en tumores para el gen improntado que codifica el supresor de tumores p73, un homólogo de p53 (Plass and Soloway, 2002); aunque no siempre el silenciamiento de estos genes es dependiente de metilación (Banelli et al., 2000). *PEG3* es un gen improntado de expresión paterna implicado en proliferación y apoptosis mediada por p53 (Otsuka et al., 2009). Este gen también ha sido relacionado con diferentes tipos de cáncer como son el cáncer de colon (Zhou et al., 2019) o los gliomas (Kohda et al., 2001; Otsuka et al., 2009). *MEG3* es otro de los genes improntados asociados a la proliferación y apoptosis mediada por p53 (Gong and Huang, 2017; Li et al., 2016). En este caso, se trata de un gen de expresión materna situado en el locus *DLK1-MEG3*, que se encuentra silenciado en diversos tumores murinos y humanos, incluyendo los gliomas (Buccarelli et al., 2020; He et al., 2017; Perrera and Martello, 2019). Este locus improntado contiene también el gen de expresión paterna *DLK1* (*Delta-like Homolog 1*) cuya expresión es muy alta en neuroblastoma y GBM (Yin et al., 2006).

Por lo tanto, la alta frecuencia de LOI o de alteraciones en la expresión de genes improntados en diferentes tipos de cáncer, sugieren un papel importante de la impronta genómica en la transformación maligna. De hecho, se ha demostrado la relación entre expresión alterada de *ZFP57*, implicada en el establecimiento de las marcas epigenéticas de impronta genómica, y el

GBM (Cirillo et al., 2014). Además, aunque los cambios de expresión de los genes improntados pueden ir acompañados por alteraciones en los niveles de metilación del DNA en las regiones DMR, se ha observado que el número de pacientes con cáncer que presentan alteraciones en la metilación del DNA es menor que aquellos que presentaban alteraciones en la expresión de genes improntados, sugiriendo que los cambios de metilación del DNA son un evento menos frecuente que los cambios a nivel de expresión (Kim et al., 2015). En el caso de la sobre-expresión de *IGF2* en el cáncer de pecho y de colon, la hipometilación de la DMR es más frecuente que la LOI, por lo que el estado de metilación del DMR no es tampoco indicativo de la pérdida del estado de impronta (Ito et al., 2008).

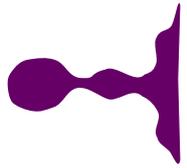
Aunque se han descrito eventos de LOI en gran variedad de cánceres, el origen celular que desencadena un proceso de malignidad todavía se desconoce. Sin embargo, existen diferentes ejemplos que implican a las SCs adultas como las células donde ocurriría esta alteración epigenética (Jelinic and Shaw, 2007; Leick et al., 2012; Sakatani et al., 2005). Uno de los fenómenos encontrados en tumores que apoyan la idea de las SCs adultas como las células de origen del cáncer es la presencia de células no malignas alrededor del tumor en las cuales se detecta LOI, sugiriendo un precursor común en el cual tendría lugar la pérdida de impronta genómica dando lugar a células hijas no tumorales y tumorales, ambos tipos con LOI (**Figura 13**) (Jelinic and Shaw, 2007). De hecho, en el estudio llevado a cabo por Feinberg AP *et al.* se propuso la idea de un aumento en la población de SCs como consecuencia de la LOI (por ejemplo, aumentando *IGF2*), en las cuales podrían acumularse mutaciones (Feinberg et al., 2006), desencadenando el proceso maligno. Esto explicaría además la alta tasa de recurrencia del cáncer en pacientes con LOI.



Figura 13. La LOI en las SCs adultas da lugar a diferentes tipos celulares fisiológicos y tumorales con esta alteración epigenética. La pérdida de impronta genómica o LOI es un evento encontrado de forma frecuente en los tumores humanos. Esta alteración epigenética aparece en las células madre adultas del tejido, pero también en los distintos tipos celulares que conforman el tumor, así como en células no tumorales situadas alrededor del tumor, sugiriendo a la célula madre como la célula originaria del tumor que transmitiría la aberración en la impronta genómica a sus células hijas, tumorales y no tumorales.

Por lo tanto, los estudios realizados sobre impronta genómica y cáncer identifican a este fenómeno epigenético como una potencial y relevante estrategia de diagnóstico precoz y terapéutica en la lucha contra el cáncer, por lo que un mayor entendimiento sobre la impronta genómica y su alteración en el origen y desarrollo del cáncer resulta clave.

Objetivos

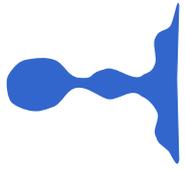


El cáncer es la segunda causa de muerte en el mundo debido a la falta de tratamientos eficaces como consecuencia del desconocimiento sobre el origen y las alteraciones responsables de la transformación maligna. El descubrimiento de células madre cancerosas (CSCs) en los tumores con semejanzas a las células madre de tejido, promovieron la teoría de la célula madre cancerosa, que defiende que la transformación maligna ocurriría en estas células madre de tejido a través de alteraciones genéticas y/o epigenéticas. En el cerebro, entender los mecanismos implicados en la transformación de la célula madre neural (NSC) es clave para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y tratamiento de los tumores cerebrales. Precisamente, la alteración del mecanismo epigenético de impronta genómica es uno de los eventos más comunes y tempranos en el cáncer. Por ello, el principal objetivo de esta tesis es identificar el papel de la impronta genómica y su regulación epigenética en la actividad de las NSCs adultas, y su implicación en el desarrollo de tumores cerebrales.

Los objetivos específicos propuestos en esta Tesis son:

1. Estudio del proceso de **impronta genómica** y su regulación epigenética en **NSCs** procedentes de la SVZ.
2. Estudio del proceso de **impronta genómica** y su regulación epigenética en **glioblastoma**.
3. Estudio del papel de la enzima **TET3** en la regulación de la **impronta genómica** durante la **transformación maligna**.

Material y métodos



1. Animales experimentales

Los ratones usados en esta tesis fueron mantenidos en el Servicio de Producción Animal del Campus de Burjassot de la Universitat de València bajo condiciones de 12 horas de luz/oscuridad, a temperatura constante entre 20 y 22 °C, y con acceso libre a comida y agua (*ad libitum*). Los procedimientos experimentales fueron realizados de acuerdo con las pautas de la ley RD 53/2013 de España y siguiendo los protocolos aprobados por la Comisión de Ética en Investigación Experimental de la Universitat de València. Las camadas fueron destetadas a los 21 días de edad.

En el caso de las técnicas altamente invasivas, como la perfusión, los ratones fueron anestesiados mediante inyección intraperitoneal de una mezcla de Medetomidina (0,5-1 mg por kg de peso del animal; Domtor®) y Ketamina (50-75 mg por kg de peso del animal; Richter Pharma) en solución salina (0,9% de NaCl).

1.1. Cepas murinas

Todos los experimentos fueron realizados en hembras y machos de ratones adultos de entre 2 y 4 meses de edad. Las cepas de ratón utilizadas fueron las siguientes:

- C57BL/6 (*Mus musculus domesticus*): cepa salvaje utilizada como fuente de muestras biológicas para los diferentes experimentos *in vitro* e *in vivo*, así como para la expansión de las distintas cepas murinas utilizadas.
- CAST/EiJ (*Mus musculus castaneus*): ratones obtenidos de *Jackson Laboratory* (Número de Stock: 000735), que pertenecen a la subespecie de *M. musculus* característica del sudeste asiático, utilizados para los estudios de impronta por seguimiento de SNPs. En esta tesis se han generado animales híbridos mediante cruces recíprocos con la cepa i4F-B de *Mus musculus domesticus*.
- i4F reprogramables: ratones cedidos por el Dr. Manuel Serrano del centro CNIO de Madrid. Este modelo de ratón reprogramable contiene un casete poliestrónico inducible por doxiciclina que codifica para los cuatro factores de transcripción murinos, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc* (OSKM), bajo el control de un sistema Tet-On, y el cDNA de una forma optimizada de la proteína reversa transactivadora controlada por tetraciclina rtTA*M2 (rtTA) insertado en el locus *Rosa26* (R26-rtTA) (Abad et al. 2013). El grupo del Dr. Serrano generó dos líneas modificadas OSKM;R26-rtTA **i4F-A** e **i4F-B** (Figura 14A), que se han utilizado en este trabajo.

Se determinó que en la línea i4F-A el casete estaba integrado en uno de los intrones del gen *Neto2*, que codifica una subunidad transmembrana de los receptores kainato liberadores de glutamato, situado en el cromosoma 8, mientras que, en la línea i4F-B, el casete se encontraba en uno de los intrones del gen *Pparg*, que codifica para un receptor nuclear implicado en la transmisión de señales de proliferación, situado en el cromosoma 6, al igual que el locus *Rosa26* (**Figura 14B**) (Abad et al. 2013). El tratamiento de estos animales con doxiciclina permite la expresión de dicho casete. En este trabajo hemos denominado i4F a una línea derivada de la i4F-A que fue cruzada con ratones C57Bl6 a fin de obtener animales con el casete, pero sin el alelo *Rosa26* modificado con el rtTA.

- B6.Cg-Tg(GFAP-rtTA*M2)1Rmra/J (GFAP-rtTA): ratones obtenidos de *Jackson Laboratory* (Número de Stock: 014098). Portadores del transgén *GFAP-rtTA* que contiene el promotor de la proteína humana GFAP dirigiendo la expresión de rtTA*M2. Esta cepa proporciona una herramienta Tet-On que permite la expresión inducible de genes en células que expresan *Gfap*.
- GFAP-rtTA;i4F: ratones generados a partir del cruce entre animales reprogramables i4F-A heterocigotos para el transgén OSKM y ratones GFAP-rtTA. Este modelo animal permite la expresión inducible por doxiciclina de los 4 factores transcripcionales de forma específica en las células positivas para GFAP.
- Nude: ratones obtenidos de Charles River. Ratones homocigotos para una mutación espontánea (*Foxn1nu*, formalmente *Hfh11nu*) que presentan un crecimiento anormal del pelo y defectos en el desarrollo del epitelio del timo. Los ratones *Nude* carecen de un timo funcional y producen un número reducido de células T maduras lo cual les lleva a sufrir una falta de inmunidad celular, por lo que no rechazan tejidos alo- y xenotransplantados.

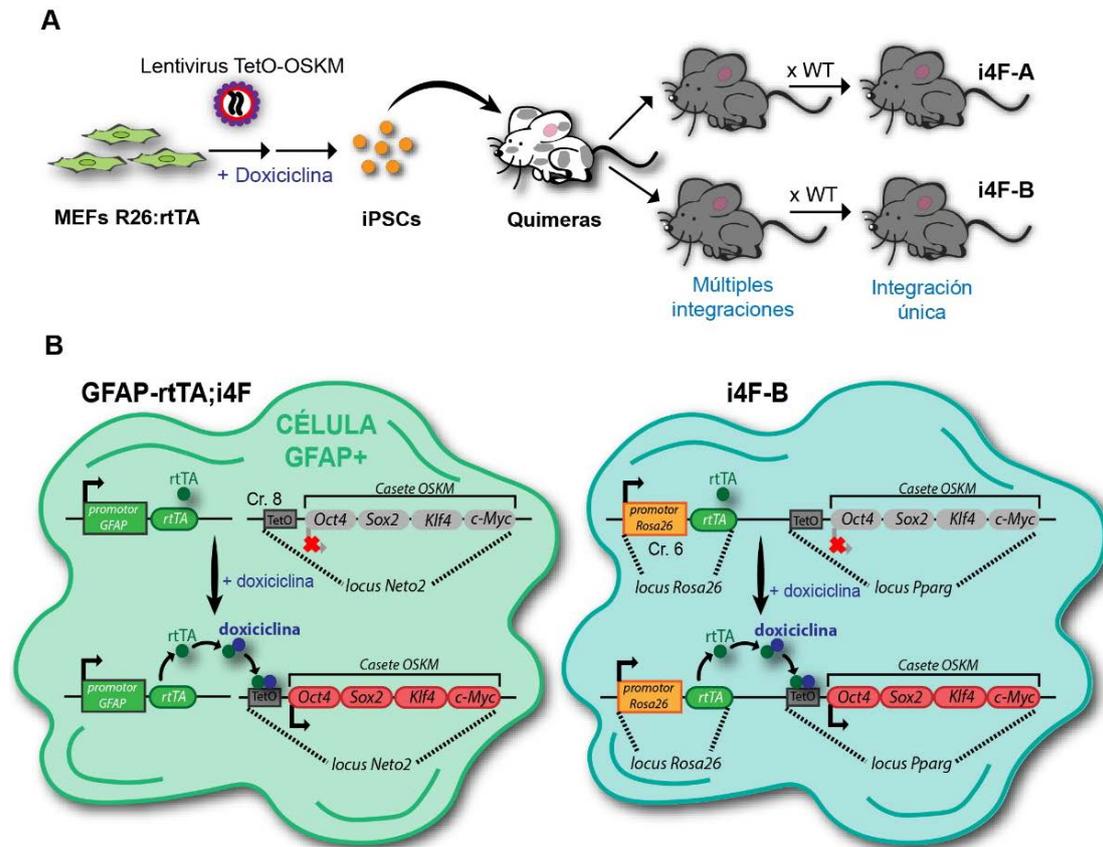
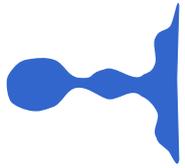


Figura 14. Generación de ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F e i4F-B. **A)** Esquema de la generación de animales reprogramables i4F-A e i4F-B en el laboratorio del Dr. Manuel Serrano. Fibroblastos embrionarios de ratones portadores del activador rtTA en el locus *Rosa26* (MEFs R26:rtTA) fueron infectadas con un lentivirus portador de la construcción TetO-OSKM para generar ratones reprogramables. Mediante el tratamiento con doxyciclina de los MEFs infectados, se obtuvieron iPSCs que fueron inyectadas en ratones albinos C57B/6J-Tyr^{c-2J}/J formando así quimeras. Estos ratones quimera se cruzaron con ratones silvestres (WT; del inglés *wild-type*) de fondo genético C57/BL6 hasta conseguir una única copia del transgen (integración única) en dos regiones distintas del genoma, dando lugar a las cepas murinas i4F-A e i4F-B. Figura modificada de Abad M *et al.* 2013. **B)** Esquema de los modelos reprogramables GFAP-rtTA;i4F e i4F-B (Abad M *et al.* 2013). Las células GFAP positivas (GFAP+) del modelo GFAP-rtTA;i4F expresan los cuatro factores de transcripción del casete OSKM (situado en el locus *Neto2* en el cromosoma 8) en presencia de doxyciclina debido a la presencia del rtTA bajo el promotor de GFAP. Todas células del modelo i4F-B expresan el casete OSKM tras la inducción con doxyciclina debido a la expresión ubicua de *Rosa26*, promotor bajo el cual está el activador transcripcional rtTA (en el cromosoma 6). En este caso, el transgen se encuentra localizado en el mismo cromosoma que el activador transcripcional, por lo que segregan de forma conjunta.

1.2. Genotipado

El genotipo de las distintas cepas usadas en esta tesis fue determinado mediante reacción en cadena de la polimerasa de punto final (PCR; “Polymerase Chain Reaction”) usando DNA genómico extraído de un pequeño fragmento de oreja y procesado de acuerdo con el protocolo establecido en el kit comercial Thermo Scientific™ Phire™ Animal Tissue Direct PCR Kit (Thermo Fisher, nº cat. F140WH). La presencia del alelo mutante o salvaje fue detectada usando 2 µl de DNA genómico a partir de una dilución 1:20, y posterior amplificación mediante PCR usando

cebadores específicos (**Tabla 4**). En el caso de las cepas i4F-A y i4F-B se utilizó ReadyMix™ REDTaq® PCR Reaction Mix with MgCl₂ (Sigma, n° cat. R2648), mientras que la cepa GFAP-rtTA requirió el uso de Kapa 2G HS taq polymerase (Kapa Biosystems, n° cat. KK5510). Las condiciones específicas para cada PCR están detalladas en la **Tabla 4**. Para el genotipado de los animales generados a partir del cruce de la cepa i4F y la cepa GFAP-rtTA, se realizó una PCR para la detección del casete policistrónico y otra PCR para la detección del activador rtTA.

El tamaño de cada producto de PCR fue resuelto mediante electroforesis en gel al 2-3% de agarosa preparado en tampón TAE (40 mM de Tris-HCl pH 7.6, 20 mM de ácido acético y 1 mM de EDTA) con 1x Real Safe (Real®, n° cat. RBMSafe). La detección en el gel del fragmento amplificado se hizo mediante colorante de carga comercial (Thermo fisher, n° cat. F-350). El resultado fue observado y fotografiado mediante luz UV en un transiluminador Kodak.

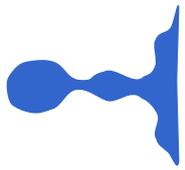
Tabla 4. Cebadores y condiciones de PCR para el genotipado de las cepas murinas. Se muestran las secuencias, temperatura de hibridación (T^a) y ciclos de amplificación de los cebadores usados. 65TD60 indica un protocolo de PCR con disminución de la T^a, que comienza con 65 grados durante 15 segundos y reduce 0,5 grados cada ciclo durante 10 ciclos. Tras esto, se realizaron 28 ciclos a 60 grados.

Gen	Secuencia del cebador (5'-3')	Amplicón	Alelo	T (°C)	Ciclos
<i>i4F-A</i>	125B-F AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	500 bp	WT	60	40
	127B-R GGAGCGGGAGAAATGGATATG				
	ORF2-F GGATGGAGTGGGACAGAGAA	378 bp	OSKM		
	ORF2-R GTGCCGATCCGTTCACTAAT				
<i>i4F-B</i>	125B-F AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT	500 bp	WT	60	40
	127B-R GGAGCGGGAGAAATGGATATG				
	Pparg-F CAGCATCAAATGGCTCGGTA	350 bp	OSKM		
	OSKM-R GCACCATCAAAGGTCAGTG				
<i>GFAP-rtTA</i>	oIMR7338 CTAGGCCACAGAATTGAAAGATCT	324 bp	WT	65TD60	10+28
	oIMR7339 GTAGGTGGAATTCTAGCATCATCC				
	12933 GAAGGCGAGTCATGGCAAG	200 bp	rtTA		
	12934 CAATACGCAGCCCAGTGTAAG				

2. Cultivos celulares

2.1. Cultivo de MEFs

Para testar la capacidad de reprogramación de las células procedentes de ratones i4F-B, se utilizaron MEFs obtenidos a partir de ratones i4F-B portadores del transgén OSKM. Los MEFs se



obtuvieron de embriones de 13,5-14,5 d.p.c. a partir de ratonas preñadas de la cepa i4F-B. Los embriones se extrajeron tras el sacrificio de la madre por dislocación cervical y se colocaron en placas Petri con PBS estéril (Biowest, nº cat. X0515). Los órganos con mucha irrigación sanguínea (corazón, hígado y pulmones) fueron descartados puesto que la sangre puede interferir con el cultivo de los MEFs. Las cabezas de los animales fueron utilizadas para el genotipado de los animales (Tabla 4). El resto del cuerpo fue troceado en pequeños fragmentos utilizando una cuchilla (Fine Science Tools, nº cat. 10316-14) y los fragmentos fueron recogidos en tubos de 15 ml con PBS y centrifugados a 200 *xg* durante 5 minutos. A continuación, se eliminó el PBS y se añadieron 3 ml de PBS con tripsina/EDTA al 0,05% (Life Technologies, nº cat. 25200-056) y 100 unidades/embrión de DNasa I (Labclinics, nº cat. LS002007) previamente filtrada. Las muestras fueron incubadas con dicha solución a 37 °C durante 15 minutos, y agitación cada 5 minutos mediante vórtex. Transcurridos los 15 minutos, la tripsina fue inactivada añadiendo 10 ml de medio de cultivo de MEFs (Tabla 5). Las células se centrifugaron a 200 *xg* durante 5 minutos y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante. Finalmente, se sembraron las células de cada embrión en medio de cultivo MEF en un frasco de 75 cm² (T75) previamente tratado con gelatina (Panreac, nº cat. 142060.1210) al 0,2% en PBS (2 horas a 37°C).

Tabla 5. Preparación del medio MEF. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los stocks, el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. FBS HI (del inglés “*Fetal Bovine Serum High Inactivated*”): suero fetal bovino inactivado mediante calor (55 °C durante 30 minutos).

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM High Glucose	1x	1x (4 °C)	Biowest	L0101
FBS HI	10%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
Antibiótico/Antimicótico	1x	100x (-20 °C)	Gibco	15240-062

Los cultivos primarios generados fueron mantenidos durante 24 horas, tras las cuales las células se pasaron y sembraron tras una dilución 1:3 a frascos de T75 previamente gelatinizados y en medio MEF fresco. Para el pase se utilizaron 3 ml de tripsina/EDTA durante 5 minutos a 37°C.

2.2. Cultivo de NSCs

La obtención y cultivo de NSCs se realizó a partir de ratones de ambos sexos de 2 meses de edad de la cepa i4F-B. El protocolo utilizado para ello ha sido descrito previamente por nuestro laboratorio (Ferron et al. 2007; Belenguer et al. 2016). Los detalles se describen a continuación. Los animales fueron sacrificados mediante la técnica de dislocación cervical. Los cerebros se

extrajeron y colocaron en placas con PBS estéril frío (Biowest, nº cat. X0515), y fueron diseccionados bajo la lupa con un par de bisturíes (harpoint™ Stab Knife, 22.5 Degree, Straight nº cat. 72-2201). Previamente a la disección de la SVZ, los OBs y el cerebelo fueron descartados y ambos hemisferios se separaron para poder diseccionar los nichos neurogénicos (**Figura 15**). La SVZ fue delimitada de manera que el tejido que rodea la zona fue finamente cortado y descartado, separando ambas SVZ del resto del cerebro. Tras la disección de la región de interés, las SVZ de cada ratón fueron troceadas y enzimáticamente digeridas con una solución de papaína (12U/ratón; Worthington Biochemical Corporation, nº cat. LS003120) previamente activada (30 minutos a 37°C) que contenía 0,2 mg/ml de clorhidrato de L-cisteína (Sigma, nº cat. C8277) y 0,2 mg/ml de EDTA (Sigma, nº cat. E6511) en medio EBSS (Earle's Balanced Salt Solution, Gibco™, nº cat. 24010-043). Las muestras se incubaron en esta solución durante 30 minutos a 37°C, y transcurrido dicho tiempo, la papaína fue inactivada con 5 ml de medio NSC control, sin mitógenos (**Tabla 6**). Tras el lavado, las muestras fueron centrifugadas a 300 xg durante 5 minutos y cuidadosamente disgregadas mecánicamente mediante micropipeta (p1000). Una vez se obtuvo una suspensión celular homogénea, las células se sembraron en medio NSC completo, es decir, medio NSC control con los mitógenos factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) (**Tabla 7**), distribuidas en 8 pocillos en placas de 48 pocillos (p48) en un volumen final de 0,5 ml. Las células fueron incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ atmosférico durante 5-7 días *in vitro* (DIV).

En estas condiciones, las células diferenciadas mueren, y las NSCs y sus progenitores proliferan formando agregados clonales llamados neuroesferas primarias (**Figura 2**) hasta alcanzar suficiente tamaño para el subcultivo.

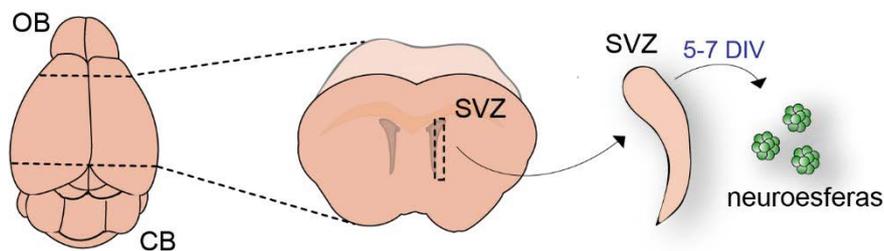
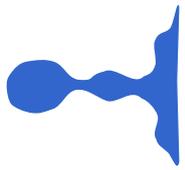


Figura 15. Obtención de células madre neurales de la SVZ de ratones adultos. Las NSCs adultas se obtuvieron a partir de la disección de la SVZ de ambos hemisferios de ratones adultos de dos meses de edad. Para ello, los bulbos olfativos (OB) y el cerebelo (CB) fueron descartados para la visualización de la zona de interés. Una vez obtenidas las SVZs, éstas fueron disgregadas enzimática y mecánicamente hasta conseguir una suspensión celular homogénea que fue sembrada para el cultivo de las NSCs. Éstas crecen en forma de agregados llamados neuroesferas.

Una vez obtenidas las neuroesferas primarias, éstas pueden ser subcultivadas y expandidas mediante disgregación enzimática y siembra de las células individuales en las mismas



condiciones. Sólo algunas de las NSCs son capaces de formar nuevas neuroesferas, y dicha capacidad varía en función de diversos factores como la edad o la cepa de los animales.

Para ello, las neuroesferas primarias obtenidas fueron recogidas en tubos de 15 ml y centrifugadas a 200 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado utilizando una bomba de vacío y las neuroesferas se incubaron con 0,2 ml de Acutasa® (Sigma, nº cat. A6964) durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 0,8 ml de medio NSC control (Tabla 6) y las neuroesferas fueron mecánicamente disgregadas pipeteando con una p1000 unas 10-15 veces. Las células se lavaron en 5 ml de medio NSC control y se centrifugaron a 200 xg durante 5 minutos. Tras el lavado, se resuspendieron en 1 ml de medio NSC completo (Tabla 7) y se procedió a la estimación de células viables mediante el sistema de contaje celular automático ADAM-SSC (NanoEnTek® Digital Bio).

Para la expansión de los cultivos, se sembraron 10.000 células/cm² en medio NSC completo y se cultivaron a 37 °C y 5% de CO₂ atmosférico. Tras 5-7 DIV en estas condiciones, las nuevas neuroesferas formadas, llamadas neuroesferas secundarias, alcanzaron un tamaño suficiente para un nuevo subcultivo.

Tabla 6. Preparación del medio NSC control. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los stocks, el proveedor y el número de catálogo del producto utilizado. DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium / Ham's F12 Nutrient Mixture*). BSA: *Bovine Serum Albumin*.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM/F12 (1:1)	1x	1x (4 °C)	Gibco	11320-074
D(+)-Glucosa	0,6 %	30% (-20 °C)	Panreac	141341
NaHCO ₃	0,1 %	7,5% (4 °C)	Biowest	L0680-500
HEPES	5 mM	1M (4 °C)	Boiwest	L0180-100
L-Glutamina	2 mM	200mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
Antibiótico/Antimicótico	1x	100x (-20 °C)	Gibco	15240-062
Mix hormonal	1x	10x (-20 °C)	Caseo (Tabla 5)	
Sal Heparina sódica	0,7 U/ml	350 U/ml (4 °C)	Sigma	H3149
BSA	4 mg/ml	Polvo (4 °C)	Sigma	B4287

Tabla 7. Preparación del medio NSC completo. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los stocks, el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. EGF: *Epidermal growth factor*; FGF: *Fibroblast Growth Factor*.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
Medio NSC control	Descrito en Tabla 2			
EGF	20 ng/ml	4 µg/ml (-20 °C)	Gibco	530003-018
bFGF	10 ng/ml	25 µg/ml (-20 °C)	Sigma	F0291

Tabla 8. Preparación de la Mix Hormonal 10x. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks*, el proveedor y el número de catálogo del producto utilizado.

Reactivo	HM 10x	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM/F12 (1:1)	1x	1x (4 °C)	Gibco	11320-074
D(+)-Glucosa	0,6 %	30% (-20 °C)	Panreac	141341
NaHCO ₃	0,1 %	7,5% (4 °C)	Biowest	L0680-500
HEPES	0,5 mM	1M (4 °C)	Biowest	L0180-100
Apo-Transferrina	1 mg/ml	Polvo	Sigma	T2252
Insulina Bovina	14,5 µM	145 µM en 0,01N HCl	Sigma	I6634
Putrescina	0,1 mg/ml	1 mg/ml	Sigma	P7505
Progesterona	0,2 µM	2 mM en 95% etOH	Sigma	P6149
Selenito sódico	0,3 µM	3 mM	Sigma	S9133

2.3. Cultivo de líneas de GBM murinas

La línea celular murina de GBM utilizada en este trabajo fue generada y generosamente cedida por el laboratorio de la Dra. Pilar Sánchez Gómez de la Unidad de Neurooncología del Instituto de Salud Carlos III. Los investigadores del grupo establecieron cultivos de neuroesferas de ratones con deleciones en los genes supresores de tumores *Cdkn2a* (p16^{INK4a}) y *Cdkn2b* (p19^{ARF}) (Gargini R *et al.* 2020). Las neuroesferas obtenidas fueron infectadas con retrovirus para la sobre-expresión del gen del receptor para el factor de crecimiento epidérmico *Egfr* e inyectadas en ratones inmunocomprometidos. Los tumores generados fueron disociados y sembrados en medio GBM (Tabla 9) para establecer la línea GBM-EGFR. Estas células expresan GFP y luciferasa como reporteros (Gargini R *et al.* 2020) y son capaces de formar gliomas con una penetrancia del 100% al ser inyectadas (300.000 células) en ratones inmunocomprometidos (Gargini R *et al.* 2020). Las células GBM-EGFR fueron cultivadas y expandidas en nuestro laboratorio en medio GBM (Tabla 9), que contiene bFGF y EGF. Para realizar el subcultivo, las células fueron recogidas y centrifugadas a 200 *xg* durante 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado y se procedió a la disgregación enzimática con 0,2 ml de AccumaxTM (Millipore, nº cat. A7089) durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadió 1 ml de medio GBM sin mitógenos a la solución enzimática, se disgregó suavemente de forma mecánica con la micropipeta p1000 y se añadieron 3 ml más de medio. A continuación, se centrifugaron a 200 *xg* durante 5 minutos y el sobrenadante fue eliminado. Las células fueron entonces sembradas en nuevas placas en medio GBM, con mitógenos, a una dilución 1:3, e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ atmosférico hasta 3-4 días después, cuando se volvió a realizar un subcultivo.

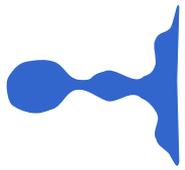


Tabla 9. Preparación del medio GBM. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks*, el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. La ciprofloxacina, el EGF y FGF se añadieron justo antes del uso.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
Neurobasal	0.5x	1x (4 °C)	Gibco	21103049
NaHCO ₃	0,1%	7,5% (4 °C)	Biowest	L0680-500
L-Glutamine	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
Sal Heparina sódica	0,4%	40% (4 °C)	Sigma	H3149
B27	0,5x	50x (-20 °C)	Gibco	17504-044
Ciprofloxacina	2 µg/ml	2 mg/ml (4 °C)	Sigma	17850-5G-F
EGF	4 ng/ml	4 µg/ml (-20 °C)	Gibco	530003-018
FGF	20 ng/ml	25 µg/ml (-20 °C)	Sigma	F0291

2.4. Criopreservación y descongelación de las células

Todos los cultivos generados fueron criopreservados para usos posteriores y así, minimizar el número de ratones utilizados durante esta tesis. Para su criopreservación y tras la disgregación de las células mediante Accutase® o Accumax™, las células individuales fueron centrifugadas y resuspendidas en medio según el tipo celular correspondiente suplementado con 10% de dimetilsulfóxido o DMSO (del inglés “*Dimethyl sulfoxide*”; Sigma, nº cat. D4540). Una vez resuspendidas, las células fueron transferidas a criotubos (Sarstedt; nº cat. 72.379) y guardados a -80°C en un recipiente de congelación (CoolCell™, BioCision) diseñado para permitir que la temperatura descienda 1°C/minuto sin el uso de alcoholes u otros fluidos. Pasadas 24 horas, los criotubos fueron trasladados a un tanque de nitrógeno líquido (-196 °C) para su almacenaje.

En el caso de la descongelación, los criotubos se incubaron en un baño de agua a 37 °C. Las células fueron entonces transferidas a tubos de 15 ml con 5 ml del medio correspondiente a cada tipo celular, y centrifugadas a 200 xg durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y las células fueron resuspendidas y sembradas en el medio de cultivo fresco correspondiente.

3. Reprogramación *in vitro* mediante el tratamiento con doxiciclina

3.1. Reprogramación de MEFs

El protocolo seguido para la reprogramación de los MEFs se basó en el descrito por el grupo del Dr. Manuel Serrano (Abad et al., 2013) (**Figura 16A**). Dos días antes de la inducción de la expresión de los cuatro factores presentes en el casete, 500.000 MEFs fueron sembrados en

pocillos p6 (9,5 cm²) previamente gelatinizados (0,2%) y lavados con PBS. Tras la adhesión de las células, el medio MEF fue sustituido por medio KsR más la citoquina LIF (**Tabla 10**) y, transcurridos dos días, por medio KsR/LIF con 1 µg/ml de doxiciclina (Sigma, nº cat. D9891). A partir de este momento, el medio fue cambiado cada dos días y los cultivos fueron monitorizados para la detección de cambios celulares. Tras 10 días en presencia del antibiótico empezaron a observarse agregados celulares que fueron incubados con el anticuerpo SSEA1 (DyLight 488) (Stemgent®, nº cat. 09-0067, 1:100).

La aparición de células positivas para SSEA1 en el cultivo fue considerada como una indicación de que las células se encontraban en un estadio temprano de la reprogramación a iPSCs, y en este momento fueron denominadas pre-iPSCs. Estas pre-iPSCs proliferaron formando clones de células SSEA1 que fueron aislados individualmente bajo la lupa y disgregados con AccumaxTM. La suspensión celular fue sembrada en placas tratadas con gelatina y en medio KsR/LIF más doxiciclina con el fin de expandir los cultivos de pre-iPSCs. Finalmente, la doxiciclina fue retirada del medio para permitir la reprogramación completa a iPSCs (iPSCs-MEF) (**Figura 16A**).

3.2. Reprogramación de NSCs adultas

Las NSCs fueron obtenidas de la SVZ de ratones i4F-B adultos de dos meses de edad. Con el fin de inducir la expresión del transgén OSKM, las células fueron cultivadas en medio NSC completo (con mitógenos) con 1 µg/ml de doxiciclina desde el cultivo primario, y mantenidas en estas mismas condiciones tras cada pase hasta la detección del marcador SSEA1 con la metodología descrita antes. La aparición de este marcador fue acompañada de la adhesión de las células a la placa, por lo que se procedió a pasarlas y sembrarlas en medio ES/LIF (**Tabla 11**) con 1 µg/ml de doxiciclina sobre placas previamente tratadas con 0,1% de gelatina (20 minutos a 37 °C). La presencia de suero y LIF en el medio ES/LIF promovió la formación de clones de células positivas para SSEA1, estadio celular que denominamos de pre-iPSCs. En este momento, las células fueron pasadas a medio 2i/LIF (**Tabla 12**) en presencia de 1 µg/ml de doxiciclina sobre nuevas placas tratadas con 0,1% de gelatina. Este medio está basado en la inhibición dual (2i) de la señalización de las enzimas MAPK y GSK3, combinado con LIF. Este medio definido permite que las pre-iPSCs alcancen un estado más avanzado de pluripotencia con alta eficiencia (Silva *J et al.* 2008). El medio 2i/LIF fue cambiado cada dos días hasta que aparecieron colonias de iPSCs bien definidas. Para la expansión de estas células, las colonias fueron subcultivadas utilizando AccumaxTM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células iPSCs generadas a partir de las NSCs (iPSCs-NSC) fueron disgregadas y sembradas a una dilución 1:5 en placas tratadas con 0,1% de gelatina y sin doxiciclina (**Figura 16B**).

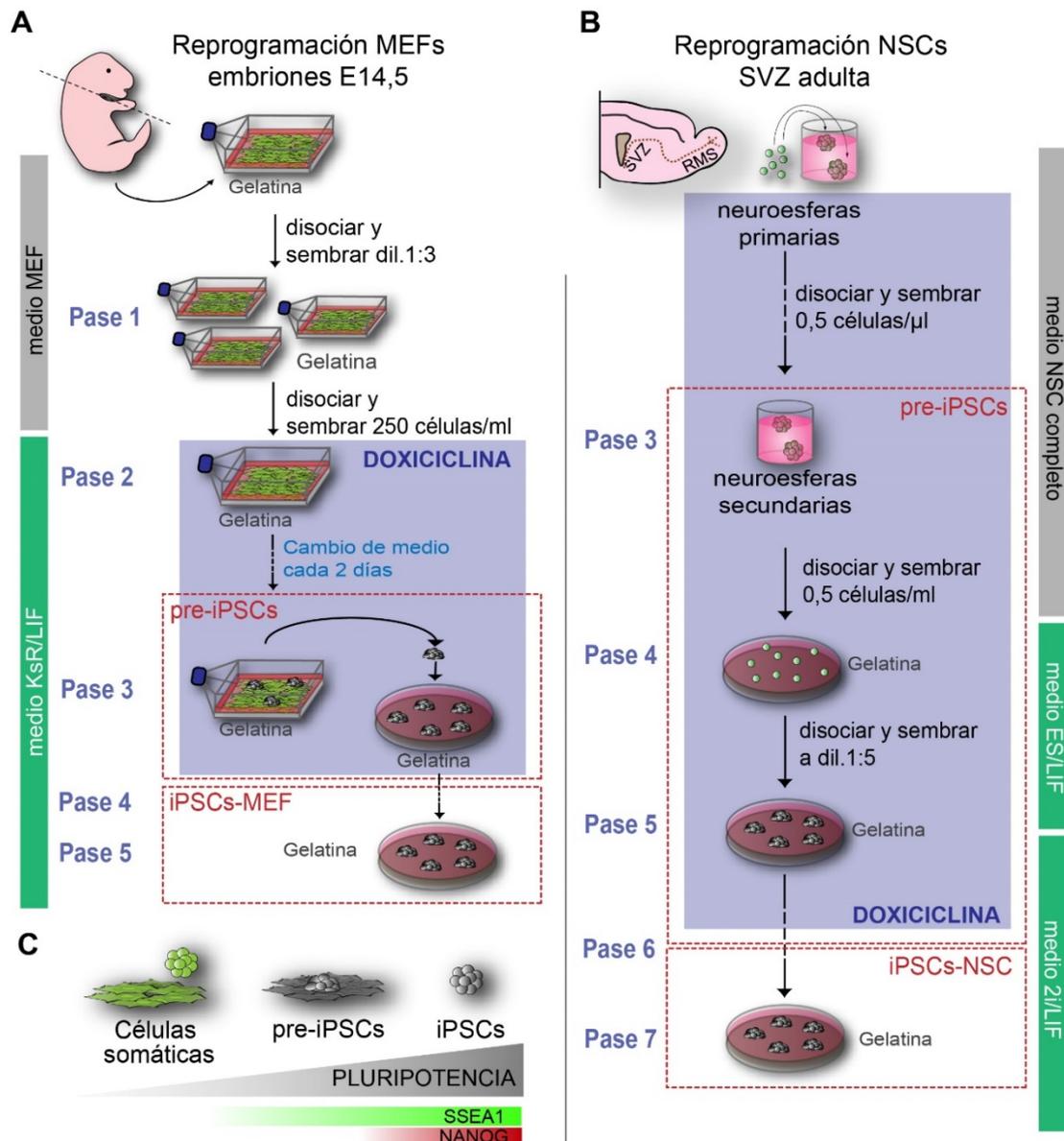
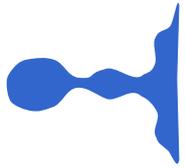


Figura 16. Reprogramación *in vitro* de MEFs y NSCs de ratones reprogramables i4F-B con doxyciclina. A) Protocolo de reprogramación de MEFs en iPSCs. Los MEFs se obtuvieron de la disgregación de embriones i4F-B E14,5 y se cultivaron en medio MEF sobre placas gelatinizadas. Tras 24 horas, las células fueron pasadas mediante disociación y sembradas haciendo una dilución 1:3. En el siguiente subcultivo las células fueron sembradas en medio KsR/LIF. Para la reprogramación se añadió 1 μ g/ml de doxyciclina al medio KsR/LIF y tras varios cambios de medio, las células formaron clones con características de pluripotencia (SSEA1 positivas). Estas células, llamadas pre-iPSCs, fueron expandidas y la doxyciclina fue retirada del medio, permitiendo la reprogramación final de los MEFs en iPSCs (iPSCs-MEF). **B)** Protocolo de reprogramación de NSCs en iPSCs. La SVZ de ratones adultos i4F-B fueron diseccionadas y las NSCs fueron cultivadas en medio NSC (con los mitógenos FGF y EGF) en presencia de 1 μ g/ml de doxyciclina. Tras 2-3 pases, cuando las células comenzaron a expresar el marcador temprano de pluripotencia SSEA1 (pre-iPSCs), fueron disgregadas y sembradas en medio ES/LIF 15% suero (FBS) en presencia de doxyciclina. Las placas fueron previamente tratadas con gelatina al 0,1%. Las células comenzaron a formar clones que fueron pasados y cultivados en presencia de los inhibidores iMEK e iGSK3 β (medio 2i/LIF), condición en la cual las iPSCs empezaron a formar clones positivos también para Nanog. La adquisición final de un estado de pluripotencia completo (iPSCs-NSC) requirió de la eliminación de la doxyciclina del medio. **C)** Representación esquemática de la aparición de los marcadores asociados con pluripotencia SSEA1 (verde) y Nanog (rojo) durante la adquisición de la pluripotencia. Las células de origen MEFs o NSCs son negativas para ambos marcadores. Las pre-iPSCs expresan el marcador SSEA1, pero no Nanog, mientras que las iPSCs expresan ambos marcadores.

3.3. Obtención del factor inhibidor de leucemia (LIF)

Para que la reprogramación de los MEFs y las NSCs a iPSCs tenga lugar, es necesario la presencia de LIF en el medio de cultivo. El LIF es un factor implicado en la inhibición de la diferenciación de las ESCs, manteniendo su estado pluripotente indiferenciado (Nicola and Babon, 2015; Williams et al., 1988). El LIF es requerido también para la generación y mantenimiento de las iPSCs a partir de células somáticas (Graf et al., 2011). Para su obtención, el sobrenadante de células COS7 transfectadas con el plásmido pCAGGs-LIF fue recogido y testado en células ESCs murinas utilizando una dilución 1:50.000 a partir del sobrenadante. El sobrenadante conteniendo el factor LIF fue congelado y mantenido a -20 °C para posteriores usos.

Tabla 10. Preparación del medio KsR/LIF. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo del producto utilizado. NEAA: Aminoácidos no esenciales (del inglés “*Non essential aminoacids*”). El LIF fue añadido fresco al medio.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM High Glucose	1x	1x (4 °C)	Biowest	L0101
Suero KsR	15%	Puro (-20 °C)		
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
NEAA	1x	100x (4 °C)	Gibco	11140050
Piruvato sódico	1 mM	100 mM (4 °C)	Gibco	11360070
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
β -mercaptoetanol	0,1 mM	1 M (4 °C)	Sigma	M6250
LIF	1x	1000x (-20 °C)	Casero*	

Tabla 11. Preparación del medio ES/LIF. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo del producto utilizado. El LIF fue añadido siempre fresco al medio.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM High Glucose	1x	1x (4 °C)	Biowest	L0101
FBS HI	15%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
NEAA	1x	100x (4 °C)	Gibco	11140050
Piruvato Sódico	1 mM	100 mM (4 °C)	Gibco	11360070
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
β -mercaptoetanol	0,1 mM	1 M (4 °C)	Sigma	M6250
LIF	1x	1000x (-20 °C)	Casero*	

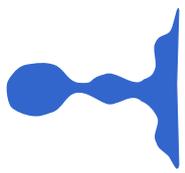


Tabla 12. Preparación del medio 2i/LIF. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. El LIF fue añadido siempre fresco al medio.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
Neurobasal	0,5x	1x (4 °C)	Gibco	21103049
DMEM/F12 (1:1)	0,5x	1x (4 °C)	Gibco	11320-074
NaHCO ₃	0,1%	7,5% (4 °C)	Biowest	L0680-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
NEAA	1x	100x (4 °C)	Gibco	11140050
Piruvato Sódico	1 mM	100 mM (4 °C)	Gibco	11360070
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
B27	0,5x	50x (-20 °C)	Gibco	17504-044
β-mercaptoetanol	0,1 mM	1 M (4 °C)	Sigma	M6250
Mix Hormonal N2	1x	10x (-20 °C)	Casero *	
LIF	1x	1000x (-20 °C)	Casero *	
iMEK	1 μM	10 mM (-20 °C)	Millipore	444968
iGSK3β	3 μM	10 mM (-80 °C)	Millipore	361571

Tabla 13. Preparación de la Mix Hormonal (HM) N2 10x. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación de la Mix Hormonal, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. BSA: Albúmina del suero bovino (del inglés “*Bovine Serum Albumin*”). Se preparó a una concentración 10x y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Reactivo	HM N2 10x	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM/F12 (1:1)	1x	1x (4 °C)	Gibco	11320-074
D(+)-Glucosa	0,6 %	30% (-20 °C)	Panreac	141341
NaHCO ₃	0,1 %	7,5% (4 °C)	Biowest	L0680-500
HEPES	5 mM	1M (4 °C)	Biowest	L0180-100
Apo-Transferrina	1 mg/ml	Polvo (-20 °C)	Sigma	T2252
Insulina Bovina	50 μg/ml	5 mg/ml en 0,01N HCl (-20 °C)	Sigma	I6634
Putrescina	160 μg/ml	160 mg/ml (-20 °C)	Sigma	P7505
Progesterona	60 ng/ml	0,6 mg/ml en 95% etOH (-20 °C)	Sigma	P6149
Selenito sódico	0,3 μM	3 mM (-20 °C)	Sigma	S9133
BSA	0.5 mg/ml	75 mg/ml (4 °C)	Sigma	B4287

4. Caracterización de las iPSCs

4.1. Detección de la actividad fosfatasa alcalina (AP)

Las células reprogramadas fueron fijadas con metanol frío (-20 °C) durante 2 minutos y lavadas 3 veces con el tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. A continuación, las muestras se incubaron con una solución de tinción compuesta por fosfato de Naftol 0,1 mg/ml (Sigma, nº cat. N4875), Dimetilformamida 0,5% (Sigma, nº cat. D4551) y Fast Red Salt 0,6 mg/ml (Sigma, nº cat. F2256)

en el tampón Tris-HCl 0,1 M pH 8,5. Tras la incubación, las células pluripotentes adquirieron una tonalidad roja, momento en el que fueron lavadas de nuevo con el tampón Tris-HCl y posteriormente, con agua destilada. Se obtuvieron imágenes de las células positivas para la AP utilizando el microscopio invertido.

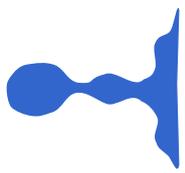
4.2. Formación de cuerpos embrioides (EBs)

La capacidad de las iPSCs de formar tipos celulares pertenecientes a las tres capas embrionarias fue testada mediante el ensayo de formación de EBs por los métodos de la gota colgante y de flotación, tras la disgregación de las iPSCs utilizando Accumax™ y posterior lavado con medio EB (Tabla 14).

En el ensayo de diferenciación en EBs por gota colgante, las células fueron centrifugadas a 300 *xg* durante 5 minutos y resuspendidas en 1 ml de medio EB. Se cuantificó el número de células y se preparó una solución de 30.000 células/ml. Esta suspensión celular fue sembrada en forma de gotas de 20 μ l (600 células por cada gota) en placas Petri, por su menor adhesión celular, usando una pipeta multicanal. Las placas fueron incubadas boca abajo durante 3 días en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂. Pasados 3 días, las placas fueron invertidas y las células se recogieron utilizando un volumen de 10 ml de medio EB y fueron sembradas en nuevas placas tratadas previamente con una solución de 0,4% de poly (2-HEMA) (Sigma, nº cat. P3932) preparada en etanol:acetona (1:1) para evitar la adhesión celular (VWR, nº cat. 83813.360; Panreac, nº cat. 131007.1611). Los EBs en formación, creciendo ahora en flotación, fueron incubados 4 días más en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂. Transcurridos 4 días, los EBs fueron recogidos en tubos de 15 ml y se dejaron decantar al fondo del tubo para la eliminación del medio. En este momento, los EBs se sembraron en placas tratadas con 0,1% de gelatina durante 3 días más en medio EB y a 37 °C y 5% de CO₂ para posterior análisis (Figura 17A).

Tabla 14. Preparación del medio EB. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los stocks, el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
GMEM	1x	1x (4 °C)	Biowest	G5154
FBS HI	15%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
NEAA	1x	100x (4 °C)	Gibco	11140050
Piruvato Sódico	1 mM	100 mM (4 °C)	Gibco	11360070
Penicilina/Estreptomina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
β-mercaptoetanol	0,1 mM	1 M (4 °C)	Sigma	M6250



En el ensayo de diferenciación en EBs por flotación, se generó igualmente una solución de 30.000 células/ml que se sembró en placas Petri tratadas previamente con 0,4% de poly (2-HEMA) preparada en etanol:acetona (1:1) en un volumen de 10 ml de medio EB. Las células permanecieron en estas condiciones durante 4 días en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂, tras lo cuales, los EBs en formación se recogieron en tubos de 15 ml por decantación. El medio fue eliminado y los EBs se sembraron de nuevo en placas tratadas con gelatina al 0,1% durante 3 días más en un incubador humidificado a 37 °C y 5% de CO₂ para su posterior análisis (Figura 17B).

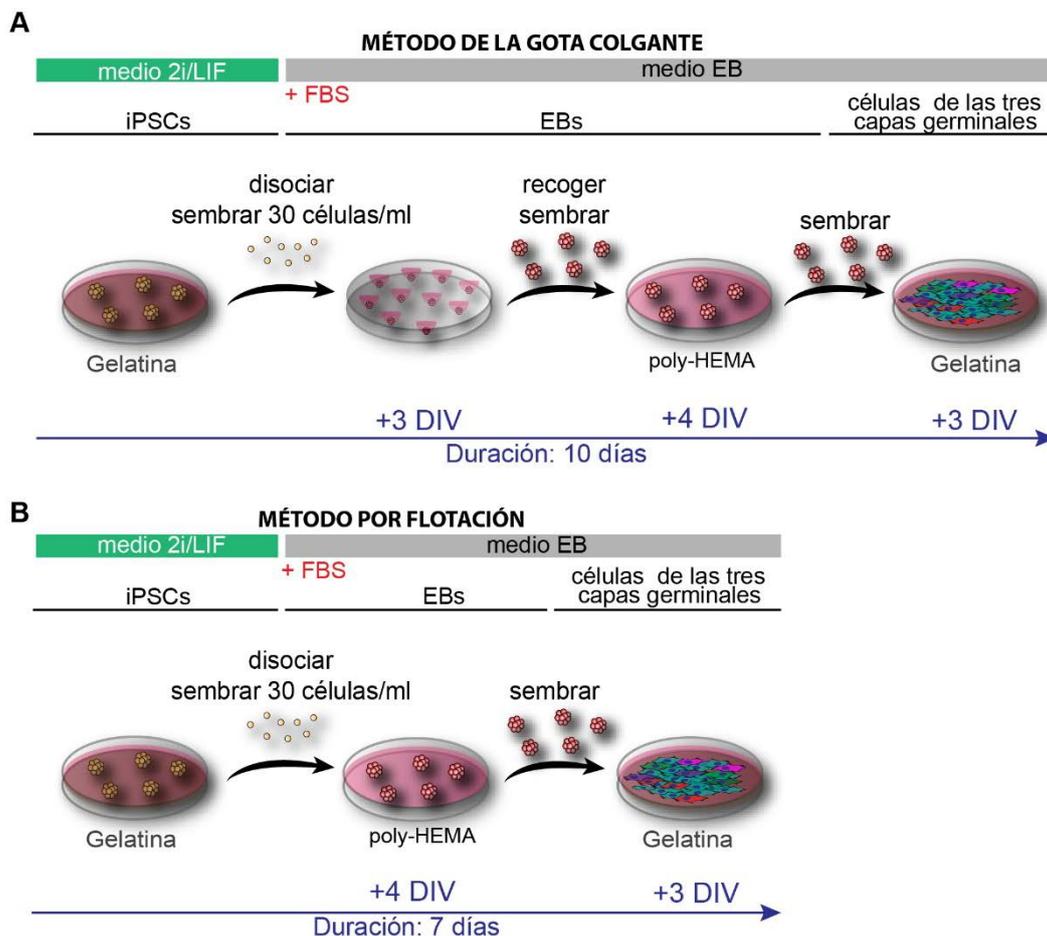


Figura 17. Diferenciación de iPSCs en EBs. A) Esquema del protocolo seguido para la diferenciación a EBs siguiendo el método de la gota colgante. Las iPSCs que crecen sobre gelatina son disociadas y sembradas en medio EB con una concentración de 30 células/ μ l, en forma de gotas con 20 μ l de la suspensión celular cada una. Las placas son invertidas e incubadas durante 3 días (3 DIV) tras los cuales los agregados celulares se recogen y siembran en placas tratadas con poly-HEMA para evitar que se adhieran. Transcurridos 4 días, las esferas se siembran sobre placas tratadas con gelatina durante 3 días más, permitiendo la aparición de células pertenecientes a las tres capas germinales. **B)** Esquema del protocolo de diferenciación de las iPSCs a EBs mediante la estrategia de flotación. Las iPSCs son disgregadas y sembradas con una densidad de 30 células/ μ l en medio EB sobre placas tratadas con poly-HEMA. Pasados 4 días, los EBs son sembrados sobre placas tratadas con gelatina durante 3 días más permitiendo la aparición de células de las tres capas germinales.

4.3. Cariotipado de iPSCs

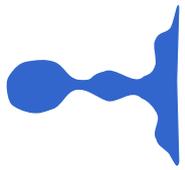
Para detectar posibles aberraciones cromosómicas durante la reprogramación se realizó un estudio del cariotipo de las iPSCs. Para ello, se realizó un subcultivo de iPSCs adheridas a gelatina y, trascurridas 24 horas (semiconfluentes), la división celular fue inhibida mediante 0,6 µg/ml de colcemida KarioMAX® (Gibco, nº cat. 15210-0.40) a 37 °C durante 2 horas. Pasado este tiempo, se añadió citrato sódico al 0,85% (Panreac, nº cat. 131655.1211), previamente atemperado a 37 °C para generar un choque hipotónico. A continuación, las células se levantaron utilizando un telilla de nylon (Scraper celular, Biofil®) y se recogieron en tubos de 15 ml para posteriormente ser incubadas a 37 °C durante 15 minutos, tras lo cual se añadieron 10 gotas del fijador metanol:ácido acético (3:1) (Sigma, nº cat. 32213-2; LabKem, nº cat. ACAC-GOP) frío mediante pipeta Pasteur y se mezcló suavemente usando una pipeta de plástico. Las células fueron centrifugadas a 300 *xg* durante 10 minutos y lavadas tres veces con 5 ml del mismo fijador, esperando 10 minutos entre cada centrifugación con el fijador frío. Finalmente, tras la última centrifugación se eliminó bien el sobrenadante y se añadieron 2-4 gotas de fijador frío. Finalmente, se realizaron las extensiones de cromosomas dejando caer una gota de la muestra sobre portaobjetos inclinados 90° al mismo tiempo que se fijaron por calor. El contraste de los cromosomas se realizó utilizando la tinción Giemsa (Panreac, nº cat. 251338.1611) durante 5 minutos y posterior lavado con agua destilada. El número de cromosomas fue contado utilizando un microscopio vertical (Nikon Eclipse Ni).

4.4. Reactivación del cromosoma X

Para detectar la reactivación del cromosoma X en las iPSCs, se realizó el análisis de expresión del gen asociado al silenciamiento *Xist* (Pasque and Plath, 2015) (**Tabla 21**), así como del gen asociado a su represión *Tsix* (Ohhata and Wutz, 2013; Pasque and Plath, 2015) (**Tabla 21**), mediante PCR cuantitativa (qPCR) (apartado 11 Material y Métodos). También se analizó la expresión del gen *Fosfoglicerato quinasa o Pgc1* (**Tabla 21**), localizado en el cromosoma X. Se utilizaron iPSCs-NSC procedentes de ratones macho para comparar con respecto a las iPSCs-NSC de hembras.

4.5. Diferenciación de las iPSCs a NPs

La diferenciación a neuroprogenitores (NPs) de las iPSCs se realizó siguiendo el protocolo previamente descrito en (Bibel et al., 2007). Brevemente, se sembraron 4×10^6 iPSCs-NSC en placas Petri p100 tratadas previamente con una solución de 0,4% de poly (2-HEMA) en un volumen de 15 ml de medio NPs (**Tabla 15**). El medio fue cambiado a los dos días mediante la transferencia cuidadosa de los agregados formados en suspensión a tubos de 50 ml. Se esperaron



durante 3-5 minutos para que estos agregados sedimentaran al fondo y poder así eliminar el medio. Las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 15 ml de medio NPs y sembradas de nuevo en las mismas condiciones. Dos días después, el medio fue cambiado nuevamente por medio NPs fresco, pero añadiendo 5 μM de ácido retinoico (RA) (Sigma, nº cat. R2625) y se refrescó tras dos días. Dos días después, se recogieron los NPs para la obtención del DNA y RNA.

Tabla 15. Preparación del medio NPs. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. FBS HI: *Fetal Bovine Serum Heat Inactivated*. La inactivación del suero por calor se hizo mediante incubación del suero a 55°C durante 30 minutos.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM/F12 (1:1)	1x	1x (4 °C)	Gibco	11320-074
FBS HI	10%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
NEAA	1x	100x (4 °C)	Gibco	11140050
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100
β -mercaptoetanol	0,1 mM	1 M (4 °C)	Sigma	M6250

5. Reprogramación *in vivo* mediante el tratamiento con doxiciclina

5.1. Reprogramación *in vivo* de la cepa i4F-B

Los animales i4F-B fueron tratados con 0,2 mg/ml de doxiciclina (Sigma, nº cat. D9891) en el agua de beber edulcorada con 7,5% de sacarosa (LabKem, nº cat. SUCR-00A) durante 2,5 semanas. Un estudio previo realizado en nuestro laboratorio por la Dra. Raquel Montalbán Loro, permitió comprobar que la dosis idónea para el estudio era 0,2 mg/ml ya que dosis mayores (0,5 mg/ml y 1 mg/ml) eran letales para estos animales (datos no mostrados). También se realizó un análisis en el que se observó que los efectos del tratamiento con doxiciclina no eran dependientes del sexo del animal. Para este estudio de género se utilizaron animales i4F-B hembras y machos por separado para analizar la inducción de la expresión del transgén OSKM, no observándose diferencias entre ambos sexos ni en la expresión del casete ni en la mortalidad del tratamiento (datos no mostrados). El biberón con el cual se les suministraba el agua fue cubierto con papel de aluminio con el fin de evitar que la luz degradase la doxiciclina y el agua fue cambiada cada dos días. La sacarosa fue utilizada para disimular el sabor de la doxiciclina y, de este modo, favorecer la ingesta del antibiótico. Se midió el volumen de agua ingerida por los animales, así como el peso de éstos, para controlar el consumo de agua y evitar una deshidratación a la vez que controlar la ingesta del antibiótico. Este mismo seguimiento fue realizado en ratones que no eran portadores del casete OSKM y que sirvieron como controles experimentales. Animales

portadores del casete policistrónico y del activador transcripcional, pero sin tratamiento con doxiciclina también se utilizaron como control. Después de 2,5 semanas, el tratamiento fue interrumpido. La expresión del casete OSKM y de marcadores indicadores de que la reprogramación había tenido lugar fueron analizados en diversos tejidos, incluyendo cerebro, tras la aparición de síntomas de posibles neoplasias.

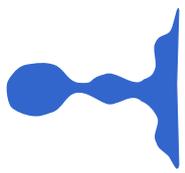
5.2. Reprogramación *in vivo* de la cepa GFAP-rtTA;i4F

Para conseguir la reprogramación de esta cepa, los animales i4F portadores del casete policistrónico OSKM pero sin el rtTA, fueron cruzados con animales GFAP-rtTA con el fin de reprogramar de manera específica las células que expresan el gen *Gfap*. Estos ratones que hemos llamado GFAP-rtTA;i4F, fueron tratados con 1 mg/ml de doxiciclina y 7,5% de sacarosa en el agua de beber. Para este estudio se utilizaron como controles animales i4F, portadores del transgén OSKM pero sin el activador GFAP-rtTA. Como en el caso de estos experimentos no se esperaba la formación de tumores fuera del SNC, el tratamiento con doxiciclina fue de 1 mg/ml y duró 4 semanas. A pesar de no esperar efectos en el peso de los animales, se controló cada dos días el consumo de agua y la variación en el peso de los ratones.

Tras las 4 semanas de tratamiento, la doxiciclina y la sacarosa fueron retiradas del agua y se esperó un mes para el sacrificio y obtención de muestras de los ratones tratados. Por un lado, los cerebros fueron embebidos en agar al 0,4% para ser cortados con vibratomo (Leica VT1200) a 200 μm de grosor para la detección de tumores y el análisis de la expresión génica. También se hizo un análisis a partir de material fijado; para ello, los ratones fueron sacrificados por perfusión intracardiaca con solución salina al 0,9% para eliminar las células sanguíneas durante 5 minutos, seguido de paraformaldehído (PFA) al 4% en 0,1 M de PBS pH 7,4 con un flujo de 5,5 ml/min durante 10 minutos. Tras la perfusión, el cerebro de los animales fue extraído y post-fijado durante 1 hora en PFA al 4% en agitación a 4 °C, tras lo cual, se eliminó el PFA y se lavaron los cerebros con PBS 0,1 M pH 7,4. Los cerebros fijados se cortaron coronalmente con vibratomo a 100 μm de grosor para su posterior procesado.

5.3. Cultivo de células de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F reprogramados

La obtención de células tumorales de animales GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina se realizó mediante la disgregación del cerebro de estos animales y posterior cultivo en medio GBM (Tabla 9). Para ello, los cerebros fueron fragmentados y disgregados utilizando Neural Tissue Dissociation kit (T) (Miltenyi, nº cat. 130-093-231) mediante gentleMACS Octo Dissociator (Miltenyi), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para inhibir la acción de la enzima tripsina se utilizaron 3 ml de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de inhibidor de tripsina (Sigma, nº cat. T6522) diluido en medio



GBM (Tabla 9) y los fragmentos digeridos fueron mecánicamente dissociados. La suspensión celular fue posteriormente filtrada utilizando filtros nylon de 40 μm (Labclinics, nº cat. plc93040) y los filtros fueron lavados con 5 ml más de medio GBM. Las células fueron posteriormente centrifugadas a 200 $\times g$ durante 10 minutos y resuspendidas en medio GBM con mitógenos para ser sembradas a 37 °C al 5% de CO_2 . Se realizó un subcultivo de estas células cada cuatro días.

6. Caracterización de las líneas celulares de GBM

6.1. Nucleofección de líneas celulares de GBM

Para inducir la sobre-expresión del gen *Tet3* en la línea celular de GBM murina GBM-EGFR utilizamos el sistema piggyBAC transposasa que permitió la sobre-expresión constitutiva de dicho gen usando el plásmido pIG-TET3 FL o pIG-TET3 FL con el dominio catalítico mutado (Figura 18). El vector utilizado para la sobre-expresión de *Tet3* con el dominio catalítico mutado se basó en la mutación de 3 bases en la secuencia del exón 9 del gen, dando lugar a la modificación de dos aminoácidos de la enzima TET3 que impiden la actividad de desmetilación de esta proteína (Figura 18). Estos plásmidos permitieron la selección de las células nucleofectadas con el antibiótico blasticidina (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Como control, las células GBM-EGFR fueron nucleofectadas con el vector vacío pIG-EV-GFP (GBM^{control}) (Figura 18), las cuales fueron igualmente seleccionadas con el antibiótico blasticidina. Estos plásmidos fueron generosamente cedidos por el Dr. Wolf Reik (Brabham Institute, Cambridge, UK).

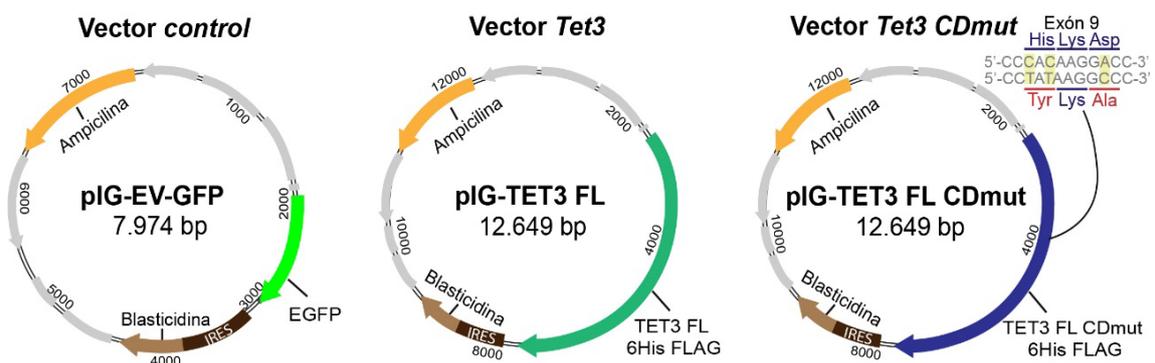


Figura 18. Vectores para la sobre-expresión de *Tet3* en el GBM. Con el fin de sobre-expresarse el gen *Tet3* en la línea de glioblastoma GBM-EGFR, se utilizó el vector pIG-EV-GFP (izquierda) como control generando la línea GBM^{control}, mientras que el vector pIG-TET3 FL (medio) conteniendo el gen *Tet3*, fue utilizado para sobre-expresarse el gen (GBM^{Tet3}). También se utilizó la sobre-expresión de *Tet3* con el dominio catalítico mutado mediante el vector pIG-TET3 FL CDmut (GBM^{Tet3 CDmut}) (derecha). Los tres vectores presentan resistencia a blasticidina y ampicilina; y fueron cedidos por el Dr. Wolf Reik (Brabham Institute, Cambridge, UK).

Para la nucleofección de las líneas de GBM, el medio GBM (Tabla 9) fue sustituido por medio GBM sin penicilina/estreptomicina (P/S). Se disgregaron y centrifugaron 2×10^6 células a las cuales se les añadió directamente 5 μl de mezcla de DNA conteniendo 5,8 μg del plásmido pIG-Tet3 FL

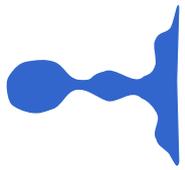
(GBM^{Tet3}), pIG-Tet3 FL CDmut (GBM^{Tet3 CDmut}) o del vector vacío pIG-EV-GFP (GBM^{control}) y 1,2 µg de la transposasa (situada bajo el promotor CAG, generosamente cedida por la Dra. Cristina Gil de la Universidad de Valencia). A continuación, se añadieron 95 µl de la Solución de Nucleofección del kit Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™ (Lonza, nº cat. VPG-1004) y la mezcla fue resuspendida y puesta en una cubeta Nucleofector™ (Amaxa). Las células fueron nucleofectadas utilizando el programa A-31 del Nucleofector™ 2b (Amaxa). Rápidamente las células fueron recogidas y sembradas en frascos de T25 con medio completo previamente atemperado, e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂. La selección de las células nucleofectadas se realizó mediante el tratamiento con 5 µg/ml de blastidina 48 horas tras la nucleofección, que fue retirado 48 horas después.

6.2. Estudio del ciclo celular

Las células de GBM nucleofectadas GMB^{control}, GMB^{Tet3} y GMB^{Tet3 CDmut} fueron sembradas en medio GBM a una densidad de 10.000 células/cm² e incubadas a 37 °C y 5% de CO₂ durante dos días, tras los cuales fueron recogidas y centrifugadas a 300 xg durante 5 minutos. Las células se disgregaron mediante Accumax™ durante 10 minutos a temperatura ambiente para obtener una suspensión de células individuales que fueron teñidas utilizando BD Cycletest™ Plus DNA Kit (BD FACs, nº cat. 340242), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Este kit permitió el análisis de las fases del ciclo celular en estos cultivos mediante la tinción con yoduro de propidio. Como control negativo de la tinción se realizaron todos los pasos del protocolo excepto la incubación con el yoduro de propidio. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular fueron determinados mediante citometría de flujo con FACSVerse (Becton Dickinson) y analizados posteriormente con el software FlowJo® descartando los dobletes de células y fragmentos celulares.

6.3. Ensayo de tumoresferas

Las células de GBM nucleofectadas GMB^{Tet3}, GMB^{Tet3 CDmut} o GMB^{control} fueron disgregadas mediante Accumax™ como en apartados anteriores. Una vez obtenido el precipitado celular tras la centrifugación y eliminación del sobrenadante, éste fue resuspendido en el medio GBM con mitógenos y el número de células viables fue determinado usando el contador automático ADAM-SSC. Las células fueron sembradas a baja densidad, 2.500 células en pocillos p96, en medio GBM con mitógenos y tras 4 días a 37°C a 5% de CO₂, el número de tumoresferas formadas fue contado manualmente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases.



6.4. Ensayo de proliferación mediante marcaje con EdU

La detección de células en fase S del ciclo celular se realizó mediante incorporación del análogo de timidina EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina) y posterior revelado. Para ello, las células fueron sembradas sobre Matrigel® (Corning®, nº cat. 354230) para su adhesión, tras lo cual fueron incubadas durante 1 hora en presencia de EdU 10 μ M (Click-It® EdU Imaging Kits, nº cat. C10338) siguiendo las indicaciones del fabricante. Transcurrida una hora de incubación, el medio fue retirado y se procedió al lavado con PBS 1x y posterior fijación con PFA al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, las células fueron lavadas dos veces con BSA al 3% preparada en PBS 1x, y a continuación se realizó la permeabilización de las membranas mediante 0,5% de Triton® X-100 (Sigma, nº cat. P1379) durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se llevó a cabo el revelado de la EdU, mediante solución de reacción Click-IT®, siguiendo las indicaciones del fabricante. El porcentaje de células EdU positivas fue estimado a partir del número de células totales obtenidas mediante la tinción nuclear con DAPI.

6.5. Ensayo de adhesión

La capacidad de adhesión de las líneas de GBM fue medida mediante un ensayo *in vitro* en presencia de fibroblastos (L929) modificados para la sobre-expresión de la molécula de adhesión N-Cadherina (Porlan et al., 2014), debido a la relación entre la capacidad de invasión/migración de los gliomas y la expresión de la molécula de adhesión N-cadherina (Noh et al., 2017; Peglion and Etienne-Manneville, 2012). Para ello, 24 horas antes del ensayo, fueron sembradas 40.000 células/pocillo (en placa de 96) de los fibroblastos L929 en medio Snl (**Tabla 16**). Después de 24 horas los fibroblastos alcanzaron la confluencia, tras lo cual, las células GBM fueron recogidas en tubos de 15 ml y centrifugadas a 200 xg durante 10 minutos. A continuación, las células GBM fueron resuspendidas y disgregadas mecánicamente en medio GBM con una micropipeta p200 unas 20 veces. Un total de 1×10^6 células, estimado utilizando un contador celular ADAM-SSC, fueron centrifugadas a 200 xg 10 minutos y resuspendidas en 500 μ l de HBSS-Hepes (1:100) sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} (VWR, nº cat. X0509). Para marcar las células de GBM se les añadió 1 μ l del fluoróforo CellTrace™ Oregon Green™ 488 Carboxylic Acid Diacetate, Succinimidyl Ester (Carboxy-DFFDA, SE; Invitrogen™, nº cat. C34555) y se incubaron durante 8 minutos en el baño a 37 °C, protegidas de la luz. Transcurrido dicho tiempo, se lavaron las células con medio GBM y se centrifugaron a 200 xg durante 10 minutos, tras lo cual, se resuspendieron en 1 ml de medio GBM. Nuevamente se procedió a estimar la densidad celular y se sembraron un total de 6.500 células/pocillo en medio GBM con mitógenos. Previamente, los fibroblastos L929 fueron lavados con medio GBM dos veces para eliminar los restos de suero. Los co-cultivos de células fueron entonces incubados

a 37 °C durante 40 minutos para permitir la adhesión de las células de GBM, tras lo cual, se realizaron cuatro lavados para retirar las células no adheridas (Porlan et al., 2014). Finalmente, las células fueron fijadas con PFA al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente, seguido de un lavado con PBS 0,1 M pH 7,4 e incubación con 1 µg/ml de DAPI durante 2 minutos.

El número de células de GBM adheridas a la monocapa de fibroblastos fue estimado a partir de fotografías obtenidas en un IN Cell Analyzer 2000 (General Electric Healthcare) y analizadas mediante la herramienta “Cell Adhesion” (https://github.com/paucabar/cell_adhesion_assay), implementado como una macroinstrucción de ImageJ disponible a través del lugar de actualización de Fiji “NeuroMol Lab”. De este modo se obtiene el número de células de GBM adheridas por mm² a la monocapa de fibroblastos L929.

Tabla 16. Preparación del medio Snl. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los stocks y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. FBS HI: *Fetal Bovine Serum Heat Inactivated*. La inactivación del suero por calor se hizo mediante incubación del suero a 55°C durante 30 minutos.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
DMEM <i>High Glucose</i>	1x	1x (4 °C)	Biowest	L0101
FBS HI	10%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
Penicilina/Estreptomicina	1x	100x (-20 °C)	Biowest	L0018-100

6.6. Ensayo de angiogénesis

El estudio del papel de *Tet3* en la capacidad de angiogénesis del GBM se realizó mediante el análisis de la proliferación de células endoteliales humanas de carácter venoso de cordón umbilical (HUVEC) (Bishop et al., 1999) tras el co-cultivo con células GBM^{control}, GBM^{Tet3} o GBM^{Tet3 CDmut}. Para ello, se cultivaron células HUVEC sobre gelatina 0,1% en medio de células endoteliales (Tabla 17) en pocillos p48, y transcurridas 24 horas, el medio de células endoteliales fue sustituido por medio GBM (Tabla 9) y se sembraron 10.000 células GBM^{control}, GMB^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} sobre *transwells* semipermeables (Sarstedt, nº cat. 833.932.041). Tras 24 horas de condicionamiento del medio, se realizó un pulso de EdU durante 1 hora (apartado 6.4).

Posteriormente, las células de GBM fueron retiradas, y las HUVEC fueron lavadas con PBS 1x y fijadas con PFA 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

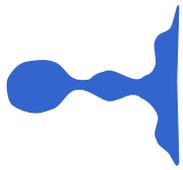


Tabla 17. Preparación del medio de células endoteliales. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación del medio, las concentraciones de trabajo y de los *stocks* y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado. FBS HI: *Fetal Bovine Serum Heat Inactivated*. La inactivación del suero por calor se hizo mediante incubación del suero a 55°C durante 30 minutos.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
Medio EndoGRO basal	1x	1x (4 °C)	Sigma	SCME-BM
FBS HI	2%	Puro (-20 °C)	Labclinics	S181B-500
L-Glutamina	2 mM	200 mM (-20 °C)	Gibco	25030-081
Suplemento Endogro LS	0,2%	100% (-20 °C)	Sigma	SCME-001-S
Ácido ascórbico	50 µg/ml	50 mg/ml	Sigma	SCME-001-S
Heparina	0,75U/ml	750 U/ml	Sigma	SCME-001-S
Hidrocortisona hemisuccinato	1 µg/ml	1 mg/ml	Sigma	SCME-001-S
Antibiótico/Antimicótico	1x	100x (-20 °C)	Gibco	15240-062
rhEGF	5 ng/ml	5 µg/ml	Sigma	SCME-001-S

7. Estudio de la capacidad de formación de tumores

Para estudiar la capacidad de las células de formar tumores, se realizó una inyección de las células en ratones inmunocomprometidos (*Nude*). Tanto para la inyección de las iPSCs, como para las células tumorales, éstas fueron previamente disgregadas con Accumax™ y lavadas con PBS. Dado que la matriz adhesiva Matrigel® mejora la eficiencia de la formación del tumor (Prokhorova et al., 2009), las células fueron resuspendidas en PBS suplementado con 30% de Matrigel®. Se inyectaron subcutáneamente en el área dorso-lateral de la región caudal a cada lado del animal 1,5x10⁶ células/200 µl de iPSCs, y 2x10⁶ células/200 µl de GBM y células GFAP-rtTA;i4F, utilizando jeringuillas de 1 ml. Los tumores alcanzaron un tamaño de entre 1,5-2 cm, momento en el cual fueron extraídos para su análisis.

Para el estudio de los tumores, éstos fueron divididos en dos partes, una de ellas fue utilizada para la extracción de RNA y análisis de expresión génica por qPCR. La otra parte del tumor se fijó con mezcla fijadora metanol:ácido acético (3:1) por inmersión durante toda la noche en agitación a 4 °C para su posterior análisis histológico. La muestra fijada fue posteriormente deshidratada con lavados de 2 horas en alcoholes de gradación creciente (etanol al 70%, 96% y 100%) cada uno, y posterior aclarado con tolueno (Panreac, nº cat. 141746.1611) durante 3 horas. Posteriormente se realizó una inclusión con 1:1 parafina:tolueno durante toda la noche a 60°C, seguida de una inclusión en parafina (Panreac, nº cat. 256993) durante 3 horas a 60°C. Finalmente se confeccionó el bloque y se realizaron cortes de 10 µm de grosor utilizando el micrótopo de parafina (Leica, nº cat. RM2125). Los cortes fueron tratados con tolueno durante 15 minutos y

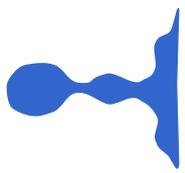
rehidratados con lavados de alcoholes de concentración decreciente (etanol al 100%, 96% y 70%) durante 5 minutos cada uno y tras un lavado final de 5 minutos con agua destilada, los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Para ello, se realizó una tinción de 10 minutos con hematoxilina férrica (1 gr hematoxilina en 100 ml de etanol 96° + 1,16 gr de Cl_3Fe y 1 ml de ClH en 98 ml de agua destilada; relación 1:1). Tras la tinción, los cortes fueron lavados con agua destilada y teñidos con eosina durante 7 minutos y nuevamente lavados con agua destilada. Finalmente, las muestras fueron sometidas a montaje permanente para su observación al microscopio óptico. Para la detección de tumores cerebrales en animales GFAP-rtTA;i4F reprogramados se utilizó la tinción de hematoxilina de Gill (Sigma; nº cat. 1.05175.0500) durante 9 minutos en cortes coronales de 40 μm de grosor, tras lo cual, se lavaron con agua corriente. Posteriormente, se tiñeron con eosina durante 9 minutos y se lavaron con agua destilada, tras lo cual se montaron y observaron por microscopía óptica. También se utilizó la técnica inmunohistoquímica para la detección de marcadores de interés.

En el caso de las células GBM, las tres líneas $GMB^{control}$, GMB^{Tet3} y $GMB^{Tet3 CDmut}$ fueron utilizadas para este estudio, inyectándose las células $GMB^{control}$ en el lado izquierdo del animal inmunocomprometido, y las células GMB^{Tet3} o las $GMB^{Tet3 CDmut}$ en el lado derecho para minimizar la variabilidad que pueda ser debida a la resistencia del animal para formar el cáncer. Esta práctica también se llevó a cabo en las inyecciones de NSCs control y GFAP-rtTA/i4F.

8. Detección *in situ* de proteínas

8.1. Inmunohisto/citoquímica

Para la detección de proteínas en las células cultivadas, estas fueron sembradas en pocillos de p48 sobre cristales tratados con ácido nítrico (Panreac, nº cat. 141037.1611). Debido a que las NSCs y los NPs, así como las líneas celulares de GBM, crecen en flotación, los pocillos fueron tratados con Matrigel® durante 2 horas a 37 °C previamente a la siembra de estas células. En el caso de las iPSCs, las células se sembraron en pocillo tratados con 0,1% de gelatina durante 20 minutos a 37 °C. Las células fueron fijadas con PFA al 2% durante 15 minutos a 37 °C, tras los cuales, fueron lavadas con PBS 0,1M. A partir de este paso, tanto las células como los cortes de tejido, fueron procesados de la misma forma. Se procedió a la incubación con una solución de bloqueo compuesta por 0,2% de Triton-100, 1% de glicina (Fisher, nº cat. 10754724), y 10% suero (Labclinics; nº cat. S181B) en PBS 0,1M durante una hora en agitación a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios (**Tabla 18**) durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Al día siguiente, el anticuerpo primario fue eliminado y se lavó



tres veces con PBS 0,1M durante 5-10 minutos cada lavado. Finalmente, las muestras fueron incubadas con anticuerpos secundarios (**Tabla 19**) durante 1 hora en agitación a temperatura ambiente. Después de varios lavados, se añadió DAPI a una concentración de 1 µg/ml durante 2 minutos para contrateñir los núcleos. Los cristales y los cortes se montaron sobre portaobjetos utilizando el medio de montaje FluorSave™.

Tabla 18. Listado de anticuerpos primarios utilizados. En la tabla se muestra el huésped donde se generó el anticuerpo y su dilución de uso. También se indica la compañía donde se han adquirido los anticuerpos y la referencia. Las aplicaciones corresponden a ICC: inmunocitoquímica, IHC: inmunohistoquímica, FACS: citometría de flujo.

Anticuerpo primario	Huésped	Dilución	Compañía	Nº Cat.	Aplicación
5 hmC	Conejo	1:1000	Active Motif	36769	ICC
5 mC	Ratón	1:1000	Diagenode	C15200006	ICC
βIII-TUBULINA	Ratón	1:300	Covance	PRB-435P	ICC/IHC
β-CATENINA	Conejo	1:300	Cell Signaling	9587	ICC
BrdU	Rata	1:300	Abcam	Ab6326	ICC
CD31	Rata	1:100	BD Biosciences	550274	IHC
CD44	Ratón	1:1000	Cell Signaling	5640S	ICC/IHC
CD44 – PeCP-Cy5	Rata	1:100	BD Biosciences	560570	FACS
CD133	Ratón	1:400	eBioscience	13A4	ICC/IHC
EGFR	Conejo	1:200	Cell Signaling	4267	ICC
GATA4	Cabra	1:100	Santa Cruz	sc-1237	ICC/IHC
GFAP	Pollo	1:600	Millipore	AB5541	ICC/IHC
INTEGRINA α6	Rata	1:300	Millipore	MAB1378	IHC
Ki67	Conejo	1:100	Abcam	ab15580	ICC/IHC
MAP2	Ratón	1:200	Sigma	MAB3418	ICC
NANOG	Conejo	1:100	Reprocell	RCAB002PF	ICC/IHC
NESTINA	Ratón	1:4	Hybridoma Bank	Rat-401	ICC/IHC
OCT4	Ratón	1:200	Santa Cruz	sc-5279	ICC
OLIG2	Conejo	1:200	Millipore	AB9610	ICC/IHC
α-SMA	Ratón	1:100	Abcam	ab18147	ICC/IHC
SOX2	Cabra	1:200	R&D Systems	AF2018	ICC/IHC
SSEA1	Ratón	1:50	Santa Cruz	SC-21702	ICC/IHC
SSEA1 – AF647	Ratón	1:100	BD Biosciences	562277	FACS
TET3	Conejo	1:100	Millipore	ABE290	ICC
VIMENTINA	Cobaya	1:200	Fitzgerald	20R-VP004	IHC

Tabla 19. Listado de anticuerpos secundarios utilizados. En la tabla se muestra la dilución de uso, la compañía donde se han adquirido los anticuerpos y la referencia. Las aplicaciones corresponden a ICC: inmunocitoquímica, IHC: inmunohistoquímica.

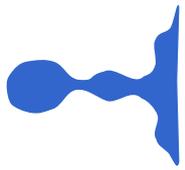
Anticuerpo secundario	Compañía	Dilución	Nº Cat.	Aplicación
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	1:600	711-545-152	ICC/IHC
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-pollo	Jackson ImmunoResearch	1:600	703-545-155	IHC
Alexa Fluor® 488 Donkey Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	1:600	715-545-150	ICC/IHC
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-cabra	Jackson ImmunoResearch	1:600	705-605-003	IHC
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	1:600	711-605-152	ICC
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-pollo	Jackson ImmunoResearch	1:600	703-605-155	IHC
Alexa Fluor® 647 Donkey Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	1:600	715-605-151	ICC/IHC
Cy3-Donkey Anti-conejo	Jackson ImmunoResearch	1:800	711-165-152	ICC/IHC
Cy3-Donkey Anti-rata	Jackson ImmunoResearch	1:800	712-165-153	IHC
Cy3-Donkey Anti-ratón	Jackson ImmunoResearch	1:800	715-165-151	ICC/IHC

8.2. Citometría de flujo

Para la detección de los marcadores de membrana SSEA1 y CD44 por citometría de flujo, las células fueron centrifugadas y disgregadas, y se lavaron con medio GBM sin mitógenos y fueron centrifugadas nuevamente a 300 xg durante 10 minutos. El medio fue eliminado y las células resuspendidas en 100 µl del tampón de bloqueo de citometría de flujo (Tabla 20) que contenía los anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos de interés (Tabla 18). La incubación con dichos anticuerpos se realizó a 4 °C durante 30 minutos, tras lo cual, las células se lavaron con tampón de bloqueo de citometría de flujo, se centrifugaron y resuspendieron en 500 µl del tampón, al cual se le añadió 0,1 µg/ml de DAPI para la exclusión de las células muertas en el análisis. Dicho análisis se realizó utilizando un citómetro LSR-Fortessa (Becton Dickinson).

Tabla 20. Solución de bloqueo para citometría de flujo. En la tabla se muestran los reactivos utilizados para la preparación de la solución de bloqueo, las concentraciones de trabajo y de los stocks y el proveedor y el número de catálogo (Nº Cat.) del producto utilizado.

Reactivo	Concentración trabajo	Concentración stock	Proveedor	Nº Cat.
HBSS	1x	10x	Gibco	14185052
Glucosa	0,1%	30% (-20 °C)	Panreac	141341
HEPES	1M	10 mM (4 °C)	Biowest	L0180-100
BSA	0,5%	Puro (4 °C)	Sigma	B4287
EDTA	2mM	20mM (4 °C)	Sigma	E6511



9. Extracción de RNA y análisis de la expresión génica

La extracción de RNA en tejidos y en cultivos celulares fue realizado mediante el Kit RNeasy Mini (Qiagen, nº cat. 74104) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante, incluyendo una digestión de DNA mediante RNase-free DNase set (Qiagen, nº cat. 79254). En los tejidos, un volumen de 600 µl del componente RLT[®], mezclado con β-mercaptoetanol en una proporción 1:100, se añadió a la muestra para posteriormente ser disgregada con una matriz de lisado (MP BiomedicalsTM BioPulverizer System I, nº cat. 6750-200) en un BioRotor FastPrep-24TM Classic bead beating grinder and lysis system (MPTM, nº cat. 116004500). El RNA fue cuantificado mediante un espectrofotómetro NanoDropTM 2000 (Thermo Scientific) y guardado a -80°C hasta su uso. Se realizó la retrotranscripción de 1 µg de RNA en cDNA usando RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher, nº cat. K1632) según el protocolo indicado por el fabricante.

El análisis de expresión génica fue llevado a cabo mediante qPCR en un aparato Step One Plus real-time PCR (Applied Biosystem), usando 4 ng del cDNA y cebadores SYBR-green (**Tabla 21**) o sondas TaqManTM específicas para cada gen (Applied Biosystems) (**Tabla 22**).

Tabla 21. Listado de cebadores utilizados para SYBR Green. En la tabla se indica el gen de interés y las secuencias de los cebadores utilizados. Fw: cebador directo y Rv: cebador reverso.

Gen/región	Secuencia 5'-3'
<i>Casete OSKM</i>	Fw – ACTGCCCTGTCGCACAT
	Rv - CATGTCAGACTCGCCAGGTG
<i>Gapdh</i>	Fw - GAACATCATCCCTGCATCCA
	Rv - CCAGTGAGCTTCCCGTTCA
<i>Gnas</i>	Fw – AGAAGGACAAGCAGGTCTACCG
	Rv – GTTAAACCCATTAACATGCAGGA
<i>Pgk1</i>	Fw – GTAAAGGCCATTCCACCACCAA
	Rv – AGCTGAGCCGCCAAAATTGAT
<i>Tsix</i>	Fw – TGTCAGGTTTCGGGGACACT
	Rv – CTCTCCAGCCCAGGAACTGA
<i>Xist</i>	Fw – CTCATAGTAGTGCCGACTA
	Rv - TAAGCCCGTTAAGTAGTCCTT

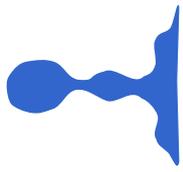
Tabla 22. Listado de sondas Taqman murinas utilizadas. En la tabla se indica el gen de interés y las secuencias de los cebadores utilizados. También se indica el código de cada una de las sondas Taqman según la empresa Applied Biosystems.

GEN	Código sonda Taqman	GEN	Código sonda Taqman
<i>18S</i>	Hs99999901_s1	<i>Ndn</i>	Mm02524479_s1
<i>Afp</i>	Mm00431715_m1	<i>Nestina, Nes</i>	Mm00450205_m1
<i>Cd44</i>	Mm01277161_m1	<i>Oct4</i>	Mm00658129_gH
<i>Cd133</i>	Mm01211402_m1	<i>Olig2</i>	Mm01210556_m1
<i>Cdkn1c</i>	Mm01272135_g1	<i>p53, Tfp53</i>	Mm01731287_m1
<i>Cer1</i>	Mm00515474_m1	<i>Peg3</i>	Mm00443081_m1
<i>Cntn3</i>	Mm00500947_m1	<i>Peg10</i>	Mm01337379_m1
<i>Cobl</i>	Mm01187905_m1	<i>Peg12</i>	Mm01167724_m1
<i>Dio3</i>	Mm00548953_s1	<i>Phlda2</i>	Mm00844053_s1
<i>Dlk1</i>	Mm00494477_m1	<i>Plagl1</i>	Mm00493899_g1
<i>Egfr</i>	Mm01187857_m1	<i>Pten</i>	Mm00477208_m1
<i>Foxa2</i>	Mm01976556_s1	<i>Rasgrf1</i>	Mm00441097_m1
<i>Gapdh</i>	Mm99999915_g1	<i>Rian</i>	Mm01325842_g1
<i>Gfap</i>	Mm01253033_m1	<i>Slc38a4</i>	Mm00459056_m1
<i>Grb10</i>	Mm01180443_m1	<i>Snrpn</i>	Mm04204818_m1
<i>H19</i>	Mm01156721_g1	<i>Sox2</i>	Mm03053810_s1
<i>Igf2</i>	Mm00439564_m1	<i>Tet1</i>	Mm01169087_m1
<i>Igf2r</i>	Mm00439576_m1	<i>Tet2</i>	Mm00524395_m1
<i>Ins2</i>	Mm00731595_gh	<i>Tet3</i>	Mm00805756_m1
<i>Kdr1</i>	Mm01222421-m1	<i>Th</i>	Mm00447557_m1
<i>Magel2</i>	Mm00844026_s1	<i>Tubb3</i>	Mm00727586_s1
<i>Mcts2</i>	Mm00481540_s1	<i>Vim</i>	Mm01333430_m1
<i>Meg3</i>	Mm03456293_m1	<i>Zdbf2</i>	Mm01254509_m1
<i>Meox1</i>	Mm00440285_m1	<i>Zfp42</i>	Mm01194089_g1
<i>Nanog</i>	Mm02384862_g1	<i>Zic1</i>	Mm00656094_m1

En el caso de las sondas TaqMan™, se utilizó TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, n° cat. 4444557) en un volumen final de 10 µl. Los niveles de expresión de cada gen fueron obtenidos mediante cuantificación relativa (ΔCt) usando la expresión de los genes *Gapdh* y *18S* como controles endógenos. En el caso de los cebadores SYBR-green, se utilizó SYBR® Premix Ex Taq™ (Takara, n° cat. RR420) con temperaturas de alineamiento específicos de cada par de sondas. Una curva estándar fue realizada con diluciones seriadas a partir de una mezcla de cDNA generada con 1 µl de cada muestra analizada. En este caso, la expresión de cada gen fue calculada relativa al gen *Gapdh* como control endógeno.

10. Estudio del estado de impronta genómica

Para análisis de la expresión alelo-específica de los genes improntados mediante la identificación de polimorfismos de nucleótido único (SNPs, del inglés "single nucleotide



polymorphism”) se utilizaron animales híbridos de primera generación (F1) de dos meses de edad obtenidos a partir de cruces recíprocos entre las cepas *Mus musculus domesticus* i4F-B, de fondo genético C57/BL6 (B6), y la cepa *Mus musculus castaneus*, de fondo genético CAST/Eij (CAST).

10.1. Identificación de SNPs

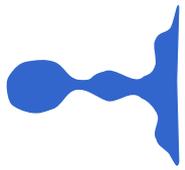
Las secuencias de DNA genómico (gDNA) y DNA complementario (cDNA) de los genes improntados de interés fueron obtenidas de la base de datos NCBI Web Site. Para la identificación de los SNPs entre las subespecies se diseñaron cebadores para la amplificación de la región de cDNA de interés en ratones C57/BL6 y ratones CAST/Eij de dos meses de edad. Los productos de las PCRs realizadas en muestras de las dos subespecies fueron secuenciados y dichas secuencias obtenidas fueron alineadas entre ellas para la confirmación de la presencia de SNPs entre las dos subespecies. En la **Tabla 23** se listan los SNPs identificados y analizados junto con los cebadores utilizados para la amplificación de la secuencia que contiene el SNPs. La amplificación por PCR del segmento de interés se testó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

10.2. Determinación de la expresión alelo-específica

Para determinar la expresión alelo-específica de los genes improntados candidatos en las NSCs, iPSCs y NPs, se amplificaron las regiones que contenían el SNP para el gen estudiado mediante PCR utilizando cebadores específicos (**Tabla 23**) para cada gen a partir de cDNA. Posteriormente se procedió a la secuenciación de los productos de PCR para lo cual se llevó a cabo a la purificación directa de este producto utilizando el kit de purificación MiniElute® PCR (Qiagen, nº cat. 28004) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En el caso de genes con diferentes isoformas, la purificación se hizo a partir del corte y extracción del DNA a partir del gel de agarosa tras la electroforesis utilizando QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, nº cat. 28704) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En ambos tipos de purificación, el DNA resultante fue eluido en 11 µl de agua destilada y se procedió a su cuantificación con NanoDrop™. Un total de entre 20 y 80 ng/µl de muestra fue enviada a la compañía GATC Biotech para su secuenciación junto con 5pmol/µl del cebador correspondiente (**Tabla 23**) en un volumen final de 10 µl.

Tabla 23. Listado de cebadores utilizados para la detección de SNPs en los genes improntados. En la tabla se indican los nombres y secuencia nucleotídica de los cebadores usados, así como el producto de la PCR. También se muestran los nucleótidos que corresponden a la cepa B6 o CAST en los distintos SNPs y sus posiciones en los distintos genes.

Gen	Cebador	Secuencia del cebador (5'-3')	Producto (bp)	SNP (B6/CAST)	Secuencia gen	PCR	Exón	Posición cebadores	Posición SNP	Secuencia SNP
<i>Cobl</i>	<i>Cobl</i> -Fw (SEQ) <i>Cobl</i> -Rv	CCGTGACTCTGGGAGGATAC ATCTTTGGGAGTGGCCTTT	232	G/A	NM_0012829 93.1	62	12	3477 3690	3598	AAAA G CCCAG
<i>Dlk1</i>	<i>Dlk1</i> -Fw <i>Dlk1</i> -Rv <i>DLKDBA2 125F</i> (SEQ)	ACCCCTGCGCCAACAATGG GGGGTGAAGGGCCTGGGAGT AGAAGAAGAACCCTCTGTTGCA	914	T/C	NM_010052	60	5	488 1245 1401	1270	ACCA CTT TCA
<i>Gnas</i>	<i>Gnas</i> -Fw (SEQ) <i>Gnas</i> -Rv	CGGGAGGACAACCAAGACTAA TGGGTGACCAACTGCTTGTA	496	G/C	NM_010309.4	60	3	80 556	292	GAGC CG GGGA
<i>Meg3</i>	<i>Meg3</i> -Fw (SEQ) <i>Meg3</i> -Rv	TTGCAACCCTCCTGGATTAG GAGTCTGGGTCCAGCATGT	165	G/A	Y13832	62	9	1461 1606	1570	CCCT C TACA
<i>Peg3</i>	<i>Peg3</i> -Fw <i>Peg3</i> -Rv (SEQ)	AAGGCTCTGGTTGACAGTCGTG TTCTCCTTGGTCTCACGGGC	238	A/G	NM_008817	60	9	3708 3926	3800	ACTA T ATGA
<i>Phlda2</i>	<i>Phlda2</i> -Fw (SEQ) <i>Phlda2</i> -Rv	AGAGCGAGCGCATTGGGTG GGCTGGTTTCCCGGAGA	197	A/C	NM_009434	66	1	4 200	136	CCAGG T ATGG
<i>Snrpn</i>	<i>Snrpn</i> -Fw <i>Snrpn</i> -Rv <i>Snrpn</i> (SEQ)	CATTATGGCTCCTCCACCTG AGAGGGGTCAAAAAGCTTGC GCCCCACCAAGACCCTAAGATAC	246	C/T	NM_013670	62	9 y 10	1070 1297 1216	1270	CCTA CA ATGC



11. Estudio de metilación del DNA en las ICRs

11.1. Extracción del DNA genómico

La obtención de DNA para el posterior estudio de los niveles de metilación fue realizada mediante la recogida y centrifugación de las células a 300 *xg* durante 5 minutos y posterior homogeneización con 0,5 ml de la solución de extracción (NaCl a 35 mM, EDTA a 20 mM, SDS al 0.5%, de Proteinasa K a 0,1 mg/ml en de Tris-HCl a 5 mM y pH 8) a 55 °C durante toda la noche. A continuación, se añadió 1 ml de fenol a pH 8 (Sigma, nº cat. P9346). Las muestras fueron agitadas durante 15-30 minutos y posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos. La fase acuosa fue entonces transferida a nuevos tubos de 2 ml a los que se les añadió 1 ml de solución fenol:cloroformo (1:1) equilibrado. Las muestras se agitaron de nuevo durante 15-30 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante 30 minutos. La fase acuosa se transfirió a nuevos tubos y se añadió 1 ml de cloroformo (Sigma, nº cat. C2432). Finalmente, las muestras se agitaron durante 15-30 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm otros 30 minutos. A continuación, la fase acuosa fue transferida a tubos de 15 ml a los que se añadió 200 µl de NH₄CH₃CO₂ a 10 M. Las muestras fueron agitadas suavemente y se les añadió 2 ml de etanol absoluto, tras lo cual, se dejaron en agitación durante toda la noche a 4 °C para favorecer la precipitación del DNA.

Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 3.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante fue eliminado. Los *pellets* de DNA se incubaron con etanol al 70%, invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante fue eliminado y se añadieron 200 µl de agua inmediatamente después y se incubó a 55 °C durante 1 hora para facilitar la resuspensión del DNA. Los DNAs fueron cuantificados usando el fluorómetro Qubit™ 3.0 (Thermo Fisher) y posteriormente guardados a -20 °C.

11.2. Análisis de metilación por pirosecuenciación

El análisis de los niveles de metilación en las DMRs de ICRs en las células se hizo mediante pirosecuenciación en el laboratorio de la Dra. Anne Ferguson-Smith del Departamento de Genética de la Universidad de Cambridge durante mi estancia pre-doctoral en dicho laboratorio. Para ello, se llevó a cabo la conversión bisulfítica del DNA utilizando EZ DNA Methylation-Direct™ Kit (Zymo, nº cat. D5020) y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante (**Figura 19**). Esta técnica se basa en la conversión de las citosinas del DNA que no se encuentran metiladas en uracilos, mientras que aquellas citosinas que presentan un grupo metilo no cambian durante el tratamiento. Para ello, 1 µg de DNA de cada muestra fue incubado con 130 µl de la solución CT

Conversion Reagent® durante 8 minutos a 98°C, seguida de una incubación de 64°C durante 3,5 horas. Posteriormente, las columnas Zymo-Spin™ fueron tratadas con 600 µl de M-Binding Buffer®, a las cuales se les añadió las muestras convertidas. Las columnas fueron centrifugadas a >10.000 g durante 30 segundos, y el sobrenadante fue descartado. Se añadieron 100 µl de M-Wash Buffer® y se volvió a centrifugar a máxima velocidad durante 30 segundos. A continuación, se añadieron 200 µl de M-Desulphonation Buffer® y se dejaron incubando entre 15-20 minutos. Transcurrido ese tiempo, las columnas fueron centrifugadas a máxima velocidad durante 30 segundos. Finalmente, se añadió el tampón de lavado a las columnas y se volvió a realizar la centrifugación como anteriormente. Este último paso fue repetido dos veces antes de eluir el DNA con 10 µl de M-Elution Buffer® (**Figura 19**).

Una vez convertido el DNA, se realizó la amplificación por PCR de las DMRs de interés con sondas específicas biotiniladas (**Tabla 24**) seguido de su pirosecuenciación. La verificación de una correcta amplificación en la PCR fue realizada por electroforesis en gel de agarosa al 1,5% para cada producto de PCR. Para la pirosecuenciación, los productos de PCR fueron purificados utilizando bolas magnéticas conjugadas con estreptavidina, Streptavidin Sepharose® High Performance Beads (GE Healthcare, nº cat. 17-5113-01) y tampón de unión (Tris-HCl pH 7,6 a 10mM, NaCl a 2M, EDTA a 0,1mM y Tween®-20 al 0,1%). Los productos de PCR fueron incubados con esta solución durante 5 minutos en agitación. Al mismo tiempo, una solución de la sonda específica para la secuenciación de las regiones de interés (**Tabla 24**) y tampón de anillamiento (C₄H₁₁NO₃ · C₂H₄O₂ a 20 mM y pH 7,6 y Mg(C₂H₃O₂)₂ a 2 mM) fue añadida a las placas de pirosecuenciación de 96 pocillos. La desnaturalización y purificación de las muestras se realizó utilizando PyroMark® Q96 Vacuum Workstation (Qiagen) haciendo un lavado con etanol al 70%, seguido de un lavado con NaOH a 0,2 N y otro con Tris-acetato a 10 mM y pH 7,6. A continuación, las muestras fueron añadidas a la placa preparada con la sonda específica y la pirosecuenciación fue realizada utilizando el sistema PyroMark® MD (Qiagen) mediante PyroMark® Gold Q96 Reagents (Qiagen, nº cat. 972804) (**Figura 19**). La determinación del porcentaje de metilación en locus específicos fue calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$, donde $\Delta\Delta Ct = (CT_{Target} - CT_{Reference})_{muestra} - (CT_{Target} - CT_{Reference})_{DNA\ completamente\ metilado}$.

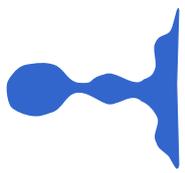


Tabla 24. Listado de cebadores utilizados para el estudio de metilación de los genes improntados. Fw: cebador situado a 5' de la secuencia amplificada, Rv: cebador situado a 3' de la secuencia amplificada, Seq: cebador utilizado para secuenciar.

DMR	Alelo metilado	Cebadores	Tm	Tamaño
Zdbf2	paterno	Fw - GGAGTTGTGATTAGGGAATGAT	60 °C	187 bp
		Rv - ACTAAACCCCTCTAATTCCTATATTCT		
		Seq - AGGTAGGTATGTTGG		
Mcts2	materno	Fw - TGAAGAAGAATTAGTGGGGTAA	50 °C	279 bp
		Rv - ACAATTAACACACTTTCCTTCTC		
		Seq - GGTGTTATTTTTTTGTAGA		
Peg10	materno	Fw - AATTTTGTAAAGTTTTAGTGGTTAGAT	55 °C	226 bp
		Rv - CACTTAAAAATACAAAACCAATCACTT		
		Seq - CACAATCCATCAATAACT		
Peg3	materno	Fw - TTGGATTGGTTAGAGAGGAAGT	60 °C	191 bp
		Rv - ACAATCTAATACCCCACTAA		
		Seq - GGAGAGATGTTTATTTG		
Snrpn	materno	Fw - TTGGTAGTTGTTTTTGGTAGGAT	54 °C	240 bp
		Rv - TCCACAAACCAACTAACCTTC		
		Seq - GTGTAGTTATTGTTGGGA		
KvDMR	materno	Fw - AGAAGGGTGTGAAGAAAAATT	55 °C	217 bp
		Rv - ATCCTAAACCTAAACCTCCATAA		
		Seq - GTTGAGAAGTTAAGTGGA		
Plagl1	materno	Fw - TGTTAGGAGAGTGAGGTTGGAGAA	60 °C	139 bp
		Rv - CATAACAACCATCCCCTTAAC		
		Seq - GTTTTAGTTTAATTGAGTGATAAAT		
Grb10	materno	Fw - GGGGTAAGAGAAGATATGTTGAAG	55 °C	86 bp
		Rv - TACCCACCACTTAAACCATTACAAATT		
		Seq - AGAGAAGATATGTTGAAGTTA		
Igf2r DMR2	materno	Fw - GGGGTAAGATTTTTGGGTTATAAG	54 °C	187 bp
		Rv - CCCCCCAATACAACAA		
		Seq - TTTATTGTTTATTAGTGTTTGAAT		
H19	paterno	Fw - GGGGGGTAGGATATATGATTTTT	54 °C	226 bp
		Rv - ACCTCATAAAACCCATAACTATAAAATCAT		
		Seq - GTGTGTAAGATTAGGG		
Rasgrf1	paterno	Fw - GGGGAAGATTATTAGTTGGGGAGGTG	54 °C	117 bp
		Rv - CAACAAAAACCAAAATATCAATCCTAAC		
		Seq - ATTAGAGTTAAATATAAAGAATGG		
IG-DMR	paterno	Fw - GTGGTTTGTATGGGTAAGTTT	54 °C	318 bp
		Rv - CCCTCCCTCACTCCAAAAATTAA		
		Seq - TGGTTTATTGTATATAATGT		
DMRs somáticos				
Cdkn1c	materno	Fw - AGGATTTAGTTGGTAGTAGG	54 °C	132 bp
		Rv - AACCATAAAACTAAACACAACCCC		
		Seq - GGTGTAGTTTTAGGGTTAG		
H19prom	paterno	Fw - AGGTTTTGTTAAGGGATTTTAAAGT	54 °C	173 bp
		Rv - CCCTACTCTATCAACCAATCAATACA		
		Seq - TGTGGTGAGGTTGTT		
Igf2	paterno	Fw - TGTTTTGTGGAATTTTTAGGTAGGT	60 °C	238 bp
		Rv - CCCCAAATCAAAAAATAAATAATCTC		
		Seq - CCTTCAACCCACC		

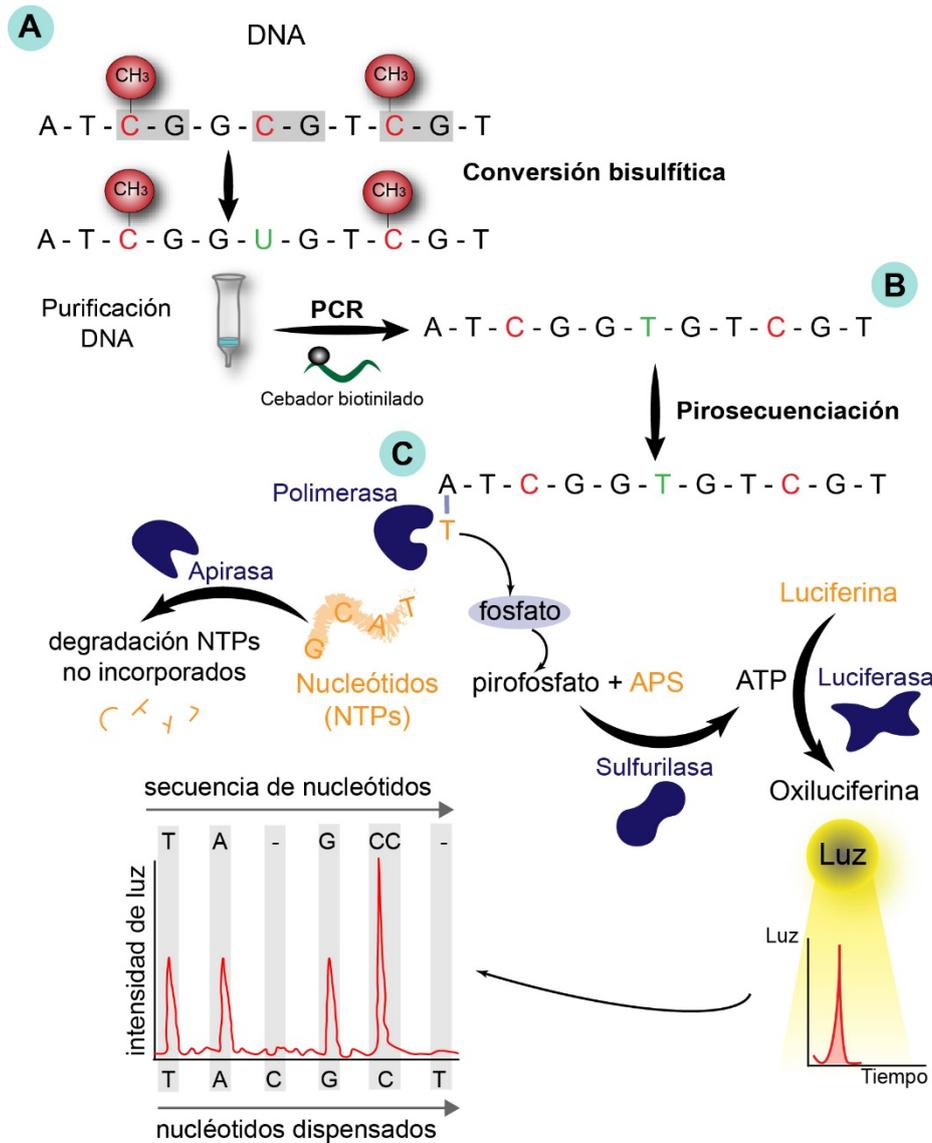
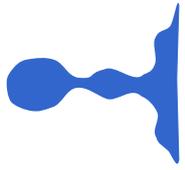


Figura 19. Esquema del análisis de metilación de DMRs mediante pirosecuenciación. **A)** Paso inicial de conversión bisulfítica del gDNA que transforma las citosinas (C, rojo) situadas en las islas CpG no metiladas en uracilos (U, verde), mientras las citosinas metiladas (CH₃) no pueden ser convertidas. **B)** El DNA resultante es purificado y amplificado por PCR utilizando cebadores específicos de la región de interés marcados con biotina. El producto de PCR contendrá timidina (T, verde) en aquellas posiciones que habían sido convertidas en U en el paso anterior. **C)** Finalmente, se determinan los niveles de metilación mediante pirosecuenciación. La polimerasa cataliza la unión de nucleótidos a la cadena molde, que son dispensados en un orden concreto, y dicha unión libera fosfato que es utilizado por la enzima sulfurilasa para generar ATP en presencia del sustrato APS (adenosina 5'-fosfosulfato). Este ATP a su vez, permite la oxidación de la luciferina a oxiluciferina mediante la enzima luciferasa, reacción que genera luz y es detectada por el pirosecuenciador, cuando el nucleótido dispensado se corresponde con el nucleótido de la cadena complementaria a la cadena molde. En caso de que el nucleótido dispensado no se corresponda con el nucleótido a incorporar, no se producirá luz. Los nucleótidos que no se unen, son degradados por la enzima apirasa. Las enzimas (azul) y los sustratos (naranja) necesarios para estas reacciones son suministrados en el pirosecuenciador en el momento del análisis. La presencia de timidina en una posición que correspondía a una citosina es indicativo de una isla CpG no metilada.



12. Análisis estadístico de los datos

Todos los tests estadísticos han sido llevados a cabo mediante el software GraphPad Prism (versión 5.00). La significatividad entre diferencias de medias de grupos experimentales fue realizada usando Student t-test de dos colas pareado o no pareado o one-way ANOVA (ANalysis Of VAriance) seguido por el test Tukey post-hoc. Los valores relativos (valores normalizados y porcentajes) fueron transformados usando arcsen previamente al análisis estadístico. Los p-valores por debajo de 0,05 fueron considerados significativos. Los datos han sido representados como la media \pm error estándar de la media (s.e.m.), y el número de cultivos o animales independientes utilizados en cada experimento se ha indicado en las figuras.

Resultados

OBJETIVO 1. Estudio del proceso de impronta genómica y su regulación epigenética en células madre neurales adultas (NSCs).



1. La reprogramación de NSCs a iPSCs *in vitro* se asocia con cambios en la expresión y el estado epigenético de genes improntados

1.1. Las NSCs aisladas de ratones reprogramables i4F-B adquieren un estado pluripotente *in vitro*

Los modelos de reprogramación utilizados en este trabajo ha sido cepas de ratones reprogramables i4F, generadas en el laboratorio del Dr. Manuel Serrano (Abad et al., 2013), que contienen un transgén policistrónico *Oct4-Sox2-Klf4-cMyc* (OSKM), cuya expresión permite la adquisición de un estado pluripotente *in vivo* (Abad et al., 2013). El transgén está controlado por un sistema Tet-On que permite la expresión de los factores de pluripotencia de forma inducible por doxiciclina en células que expresen el activador transcripcional (rtTA). En este primer apartado de la tesis se utilizaron ratones de la línea i4F-B portadores del activador rtTA en el locus *Rosa26* y del casete OSKM en el mismo cromosoma (Abad et al., 2013). Con objeto de determinar la eficiencia de reprogramación de los ratones i4F-B en nuestras manos, se aplicó el mismo protocolo de tratamiento llevado a cabo previamente en MEFs (Abad et al., 2013) consistente en exponer MEFs de embriones de 14,5 días de gestación (E14,5) a 1 µg/ml de doxiciclina y LIF (**Figura 20A, B**). En todos los experimentos se usaron ratones no modificados genéticamente de la cepa C57Bl6, tratados de la misma manera, como controles negativos (WT, de inglés *wild-type*). Transcurrida una semana desde el inicio del tratamiento, los MEFs comenzaron a formar agregados celulares que resultaron ser positivos para el marcador temprano de pluripotencia SSEA1 (**Figura 20B-D**), indicando que las células estaban adquiriendo características de pre-iPSCs. La doxiciclina fue retirada del medio 10-20 días después de la aparición de los clones de pre-iPSCs para favorecer la adquisición de un estado de pluripotencia total de las células en iPSCs (iPSCs-MEF), estado que fue confirmado mediante la detección de la actividad enzimática fosfatasa alcalina (AP) y la proteína NANOG (**Figura 20D**).

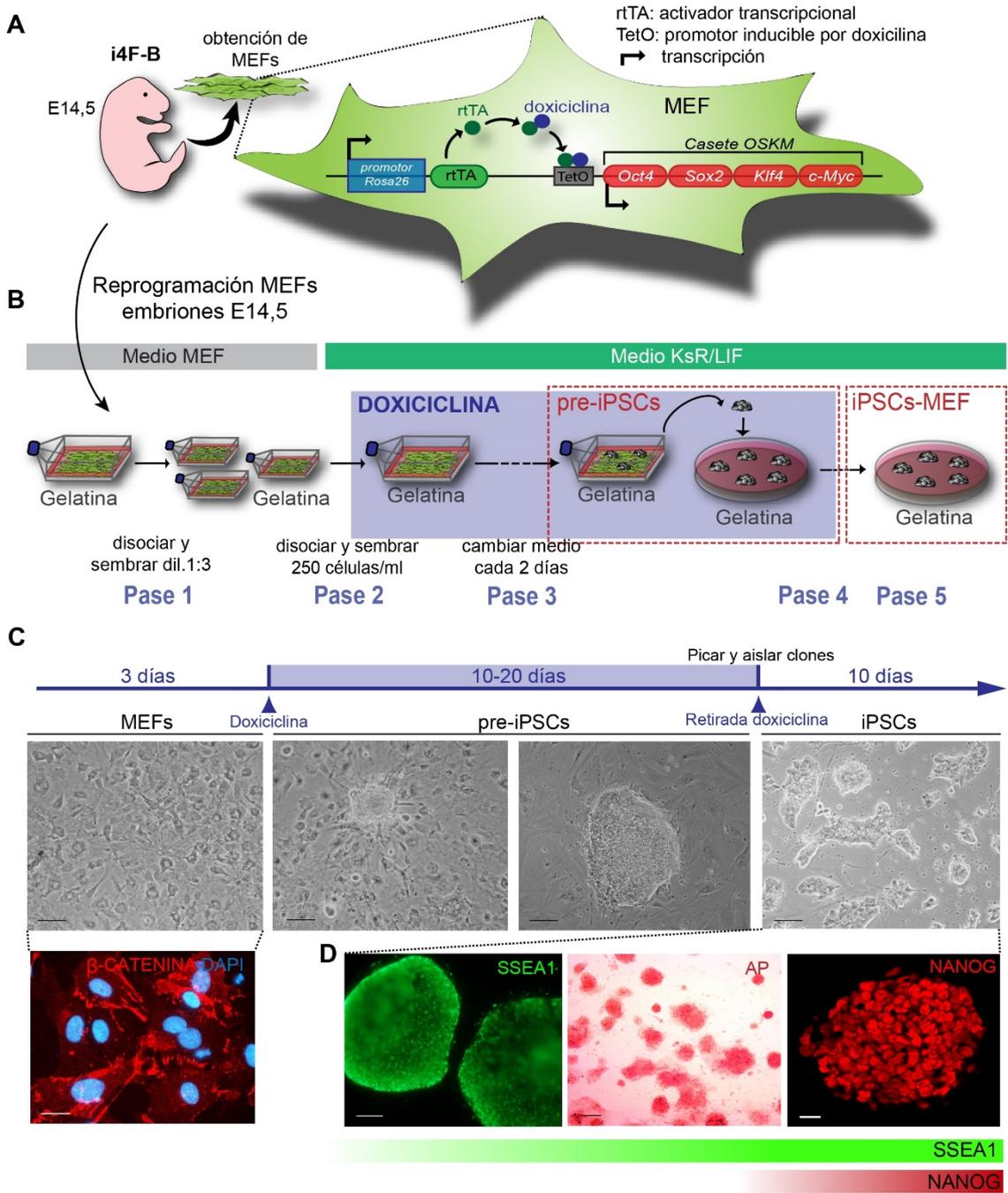


Figura 20. MEFs de ratones i4F-B portadores del transgén OSKM se reprograman *in vitro* mediante el tratamiento con doxiciclina. **A)** Esquema del modelo murino de reprogramación i4F-B inducible por doxiciclina en MEFs. **B)** Esquema del protocolo seguido para la reprogramación mediante doxiciclina de MEFs de ratones i4F-B a iPSCs-MEF. **C)** Imágenes de contraste de fases de los MEFs obtenidos de animales reprogramables i4F-B previamente al tratamiento con 1 µg/ml de doxiciclina, tras adquirir el estado de pre-iPSCs, y tras el aislamiento de clones de iPSCs. La doxiciclina fue retirada tras la aparición de las pre-iPSCs. La duración de cada estado celular, así como los medios de cultivo utilizados han sido indicados (paneles superiores). Inmunocitoquímica para β-CATENINA (rojo) en cultivos de MEFs de ratones i4F-B. La tinción con DAPI ha sido utilizada para contrateñir el núcleo (panel inferior). **D)** El tratamiento con 1 µg/ml de doxiciclina en el medio de KsR/LIF condujo a la aparición de agregados clonales de iPSCs positivas para el marcador temprano de pluripotencia SSEA1 (verde), y también para la actividad AP (rojo). Los clones aislados mostraron ser positivos para el marcador de pluripotencia NANOG (rojo). Escalas en C y D: 100 µm; en D (NANOG): 20 µm.



A continuación, NSCs aisladas de ratones adultos i4F-B y WT fueron sembradas en medio NSC completo con 1 µg/ml de doxiciclina y sin LIF, y el medio fue cambiado cada dos días con el fin de mantener la concentración del antibiótico de manera constante durante la reprogramación (**Figura 21A**). A partir del pase 3, las células i4F-B se agregaron de forma irregular, a diferencia de la morfología esférica regular de las neuroesferas WT, y comenzaron a adherirse a la placa (**Figura 21A, B**). A pesar de la ausencia de LIF en el medio de cultivo, las células con morfología y adherencia alteradas expresaban el marcador de pluripotencia SSEA1 (**Figura 21B**).

Tras la adquisición de la expresión del marcador de SSEA1, el medio de cultivo fue cambiado a medio ES con LIF manteniendo la misma concentración de doxiciclina. En estas condiciones, y transcurrida una semana, las células comenzaron a formar agregados positivos para SSEA1 y morfológicamente similares a los observados durante la reprogramación de los MEFs (**Figura 21B**). El análisis de los agregados celulares mediante qPCR mostró niveles bajos de *Nanog* y *Rex1*, a pesar de la expresión de *Oct4* (**Figura 21C**), por lo que las células fueron consideradas pre-iPSCs (**Figura 21A, B**). Para promover un estado completo de pluripotencia, se utilizó un medio con LIF y con el inhibidor de la ruta MAPK y el inhibidor de la ruta GSK3 (medio 2i), tal y como se había descrito en la bibliografía (Silva et al., 2008) y tras dos pases se retiró el antibiótico (**Figura 21A, B**). El medio 2i/LIF se ha visto que induce una regulación al alza estable de los genes *Oct4* y *Nanog* (Silva et al., 2008), junto con la reactivación del cromosoma X (Cantone and Fisher, 2017; Ohhata and Wutz, 2013), y el silenciamiento de la expresión del transgén OSKM (Silva et al., 2008).

A continuación, se realizó el análisis de expresión génica de los cultivos en las distintas fases de reprogramación (**Figura 21C-E**). El estudio mostró un aumento significativo de la expresión de *Nanog* y *Rex1* durante el proceso de reprogramación, siendo las iPSCs las que alcanzaron los mayores niveles tanto de mRNA como de proteína (**Figura 21C**). En concordancia con la adquisición de un estado de pluripotencia, los genes neurales *Nestina* y *Olig2* disminuyeron su expresión durante dicho proceso (**Figura 21D**). También se midió la expresión del casete policistrónico, observándose un nivel máximo de expresión en pre-iPSCs, y un silenciamiento del transgén tras el cultivo de las células pre-iPSCs en medio 2i/LIF en ausencia de doxiciclina (**Figura 21E**), coincidente con la adquisición de un estado pluripotente en las iPSCs generadas. Estos resultados de expresión génica fueron confirmados a nivel de proteína mediante la inmunocitoquímica para OCT4, NANOG, NESTINA y OLIG2 (**Figura 21C, D**).

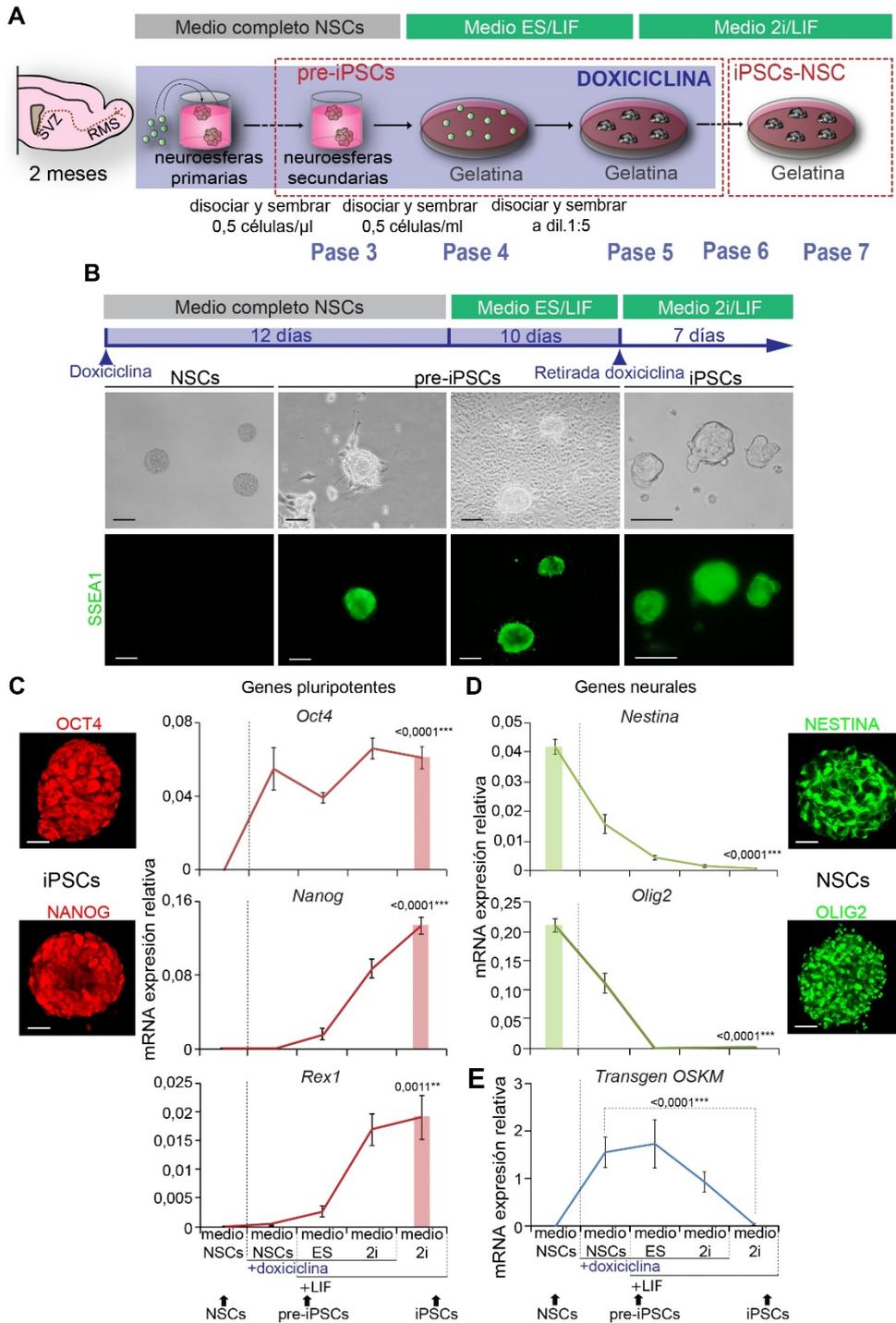
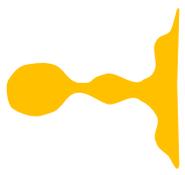


Figura 21. Las NSCs adultas i4F-B pueden ser reprogramadas a iPSCs *in vitro*. A) Esquema del protocolo utilizado para la reprogramación de NSCs adultas de ratones i4F-B en iPSCs-NSC mediante doxiciclina. B) Esquema del protocolo de reprogramación donde se indican los medios utilizados y la duración aproximada cada medio (panel superior). Imágenes de contraste de fases de NSCs, pre-iPSCs e iPSCs durante del proceso de reprogramación. La adquisición del marcador SSEA1 (verde) durante el proceso de reprogramación se muestra en el panel inferior. C) Análisis por qPCR de los niveles de expresión de *Oct4*, *Nanog* y *Rex1* durante el proceso de reprogramación. Imágenes de la ICC para OCT4 y NANOG en iPSCs también se muestran en rojo. D) Análisis por qPCR de los niveles de expresión de los genes neurales *Nestina* y *Olig2* durante el proceso de reprogramación. Se muestran en verde imágenes de la ICC para NESTINA y OLIG2 en NSCs. E) Análisis por qPCR de los niveles de expresión del casete *OSKM* durante el proceso de reprogramación. El gen *Gapdh* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. El p-valor ha sido indicado. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos cuatro animales por condición. Escala en B: NSCs, 100 μm; pre-iPSCs e iPSCs: 50 μm. En C y D: 20 μm.



Además de los cambios de expresión génica, la reprogramación celular a un estado pluripotente puede dar lugar a alteraciones en la dotación cromosómica de las iPSCs generadas, tales como aneuploidías o poliploidías (Liang and Zhang, 2013). Sin embargo, las distintas líneas de iPSCs generadas mostraron un cariotipo normal, con una media de 40 cromosomas por célula en metafase (**Figura 22A**), indicando que la estabilidad genómica durante el proceso de reprogramación de las NSCs adultas a iPSCs se había mantenido. Otra de las características de la adquisición de la pluripotencia es la reactivación del cromosoma X inactivo, silenciado en las células adultas (Bar et al., 2019; Heard and Disteché, 2006), de manera que las células pasan a presentar los dos cromosomas X activos (Cantone and Fisher, 2017; Ohhata and Wutz, 2013). Uno de los genes responsables de la inactivación del cromosoma X es el RNA no-codificante *Xist* (Navarro et al., 2008; Ohhata and Wutz, 2013). Este gen se encuentra regulado a su vez por el RNA no-codificante antisentido *Tsix*, que actúa como represor de la expresión de *Xist* (Lee and Lu, 1999) (Esquema en **Figura 22B**). Cuando el cromosoma X se encuentra inactivo, expresa el RNA *Xist*, que interacciona con el propio cromosoma reclutando la maquinaria de represión de la expresión génica (Cantone and Fisher, 2017; Ohhata and Wutz, 2013). Por tanto, la reactivación del cromosoma X que ocurre durante la reprogramación de NSCs a iPSCs puede ser determinada por la cuantificación de la expresión de ambos genes *Xist* y *Tsix* (Kim et al., 2015). El análisis de la expresión del RNA antisentido *Tsix* en las iPSCs generadas, reveló un aumento en su expresión durante el proceso de reprogramación en las células hembras (**Figura 22B**). En cuanto al gen *Xist*, de acuerdo con el aumento de su represor *Tsix*, el análisis de expresión mostró una disminución en las iPSCs respecto a las NSCs (**Figura 22B**). Como controles se utilizaron iPSCs de ratones macho, que mostraron niveles de expresión de *Tsix* significativamente menores y niveles similares de *Xist* a los encontrados en iPSCs de animales hembra (**Figura 22B**). También se estudió la expresión de un gen situado en el cromosoma X, *Pgk1* que ha sido ampliamente utilizada para demostrar la reactivación del cromosoma X y la consiguiente re-expresión de los genes localizados en él (Maherali et al., 2007; Sripathy et al., 2017). El análisis por qPCR mostró una mayor expresión del gen *Pgk1* en las iPSCs de ratones hembra con respecto a las de ratones macho (**Figura 22C**), concordante con los cambios a nivel de expresión que ocurren durante la reactivación del cromosoma X en las iPSCs generadas.

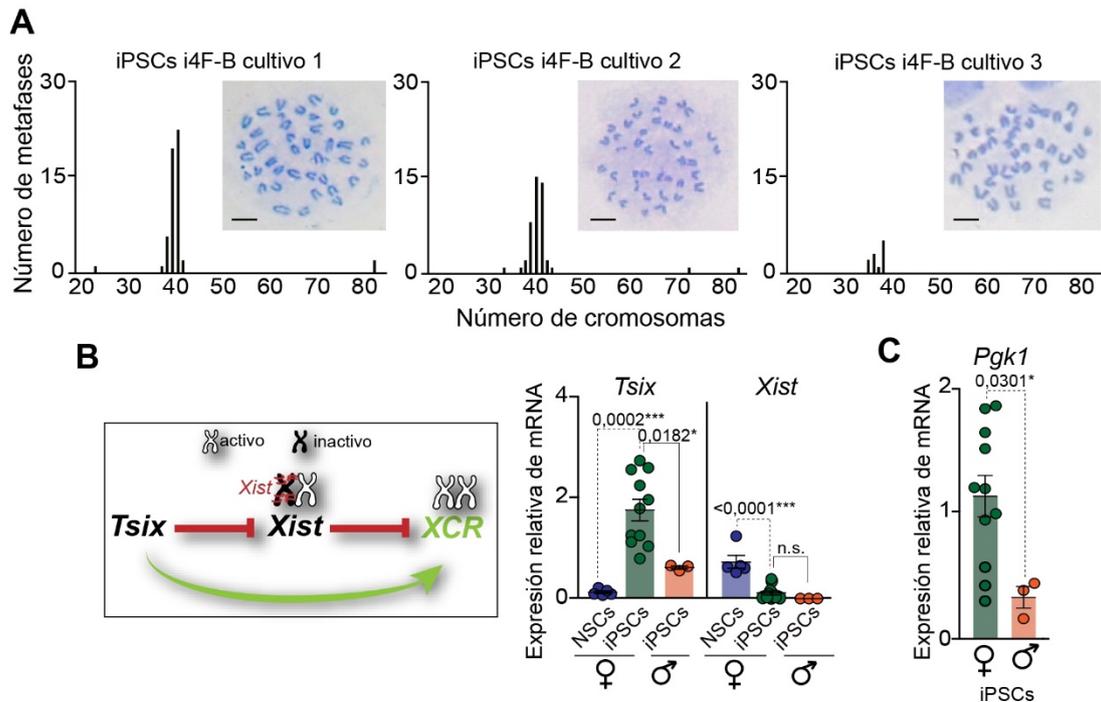


Figura 22. Las iPSCs generadas a partir de NSCs mantienen la dotación cromosómica y reactivan el cromosoma X silenciado. **A)** Cuantificación del número de cromosomas por metafase en distintas líneas de iPSCs i4F-B, mostrando una dotación cromosómica media normal de 40 cromosomas. Se muestran también imágenes por microscopía óptica de metafases obtenidas tras la tinción con Giemsa. **B)** Esquema del efecto de *Xist* y *Tsix* en la reactivación del cromosoma X (*XCR*). *Tsix* reprime la expresión de *Xist*, que está inactivando uno de los cromosomas X, permitiendo de esta forma su reactivación (*XCR*). qPCR para la expresión de los genes *Tsix* y *Xist* en NSCs, pre-iPSCs e iPSCs procedentes de animales hembras, y pre-iPSCs e iPSCs de machos. **C)** qPCR para el gen *Pgk1* en iPSCs de animales i4F-B hembras y machos. El gen *Gapdh* ha sido utilizado para normalizar los datos de expresión. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos 3 animales por condición. Los p-valores aparecen indicados en la figura; n.s.: no significativo estadísticamente. Barras de escala en A: 10 μ m.

Dado que la pluripotencia implica la capacidad de generar células pertenecientes a las tres capas germinales, las iPSCs generadas fueron sometidas a un ensayo de diferenciación *in vitro* usando dos métodos de obtención de EBs: el método de la gota colgante (protocolo A) y el método de flotación (protocolo B). En ambos casos, se generaron EBs en los que se observó una disminución significativa en la expresión del gen *Nanog* y de su proteína con respecto al estado iPSC (Figura 23A).

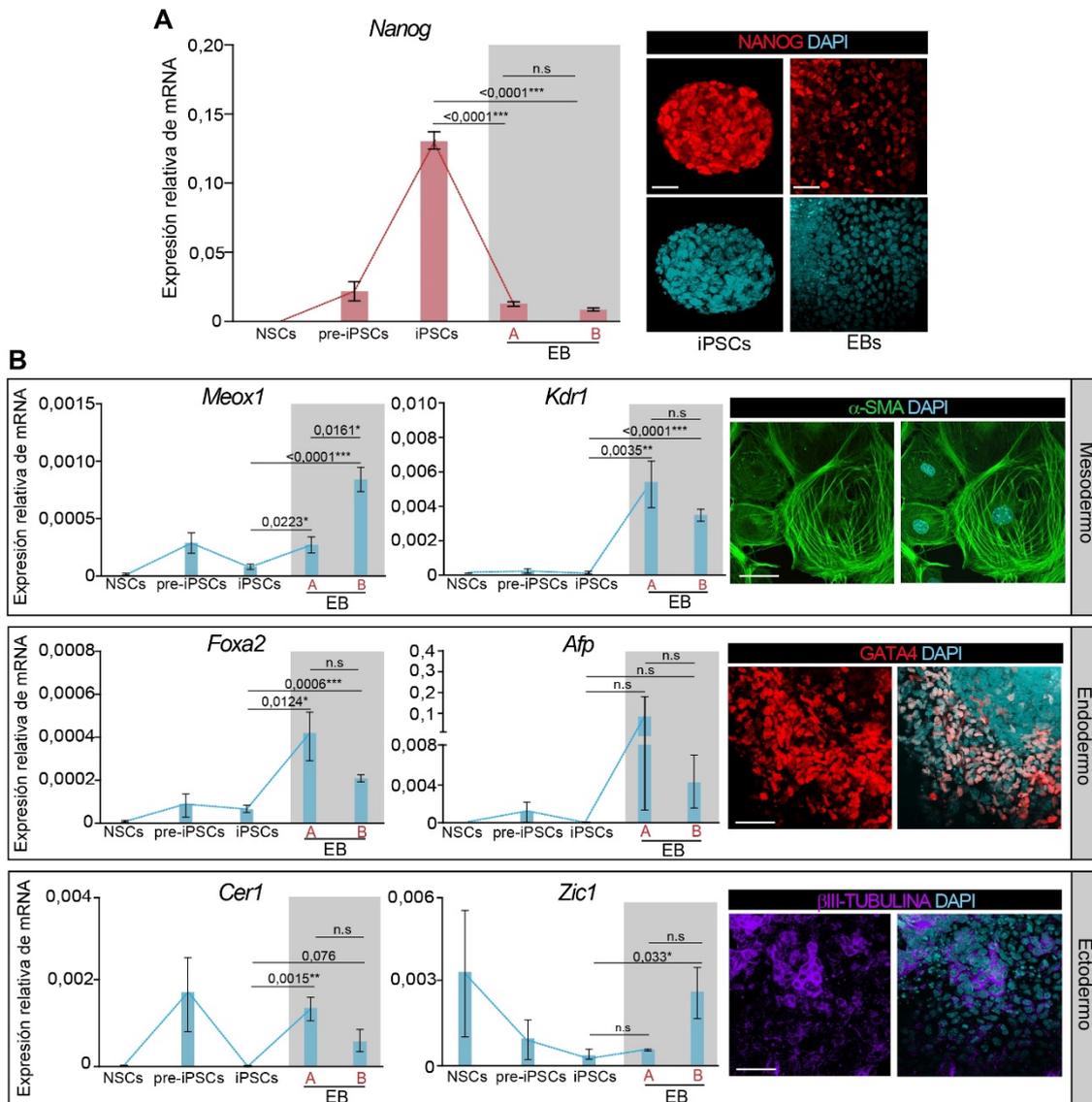


Figura 23. Las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas de ratones i4F-B generan células pertenecientes a las tres capas embrionarias. **A)** qPCR para *Nanog* durante el proceso de reprogramación de las NSCs reprogramables y en EBs generados mediante el ensayo de gota colgante (A) o por flotación (B). La ICC para NANOG en iPSCs y en EBs también se muestra a la derecha de la imagen. **B)** qPCR para genes asociados a mesodermo (*Meox1* y *Kdr1*), endodermo (*Foxa2* y *Afp*) y ectodermo (*Cer1* y *Zic1*) durante el proceso de reprogramación y en EBs por el método de la gota colgante (A) o por el método de flotación (B). A la derecha de la imagen se muestran imágenes de fluorescencia de las ICC para el marcador de mesodermo α -SMA (verde), de endodermo GATA4 (rojo) y de ectodermo β III-TUBULINA (morado), en EBs generados a partir de la diferenciación de las iPSCs. DAPI ha sido utilizado para contrateñir. El gen *Gapdh* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. Los p-valores están indicados en las imágenes; n.s.: no significativo estadísticamente. Las barras de error muestran los s.e.m. de al menos 4 cultivos por condición. Barras de escala en A y B: 20 μ m.

La presencia de células pertenecientes a las diferentes capas germinales se determinó mediante estudios de expresión génica de marcadores de tejidos diferenciados y mediante ICC para estos mismos marcadores. Tras este análisis, se observó un aumento en la expresión de genes asociados a mesodermo, como *Meox1* (*Mesenchyme Homeobox 1*) y *Kdr1* (*Kinase insert Domain Receptor 1*) y a endodermo, como *Foxa2* (*Hepatocyte nuclear factor 36*) y *Afp* (α -

Fetoprotein) (**Figura 23B**). Los niveles de expresión de genes asociados a ectodermo, tales como *Zic1* y *Cer1* también aumentaron en los EBs con respecto a las iPSCs, aunque la expresión de *Zic1* ya era relativamente alta en las NSCs de partida debido a su origen ectodérmico (**Figura 23B**). Los estudios por ICC en EBs también mostraron la presencia de marcadores de las tres capas germinales, tales como α -SMA (del inglés *Alpha-smooth muscle actin*) para el mesodermo, GATA4 para el endodermo y β III-TUBULINA para el ectodermo (**Figura 23B**). Estos cambios de expresión fueron similares en los EBs generados tanto con la técnica de gota colgante como con la técnica de flotación (**Figura 23B**), demostrándose así la capacidad de las iPSCs generadas de formar células de las tres capas germinales.

La capacidad pluripotente de las iPSCs fue testada también mediante un ensayo de formación de teratomas *in vivo* en ratones inmunocomprometidos (**Figura 24**). La inyección de $1,5 \times 10^6$ iPSCs en la zona dorso-lateral de la parte trasera de animales *Nude*, dio lugar a la formación de teratomas en estas regiones (**Figura 24A, B**). Una semana después de la inyección de las iPSCs, se pudo observar algún crecimiento tumoral, pero, no fue hasta pasados 18 días, cuando los teratomas alcanzaron un tamaño de entre 1,4-1,8 cm (**Figura 24B**). Una tinción de hematoxilina-eosina en cortes de parafina de los tumores extraídos reveló la presencia de tejido mesodérmico con células musculares esqueléticas, de tejido endodérmico con células epiteliales columnares y de tejido ectodérmico con la presencia de melanocitos (**Figura 24C**). Los estudios con microscopía confocal de cortes inmunoteñidos mostraron células positivas para α -SMA, GATA4 y β III-TUBULINA (**Figura 24D**) confirmando la capacidad pluripotente de las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas.

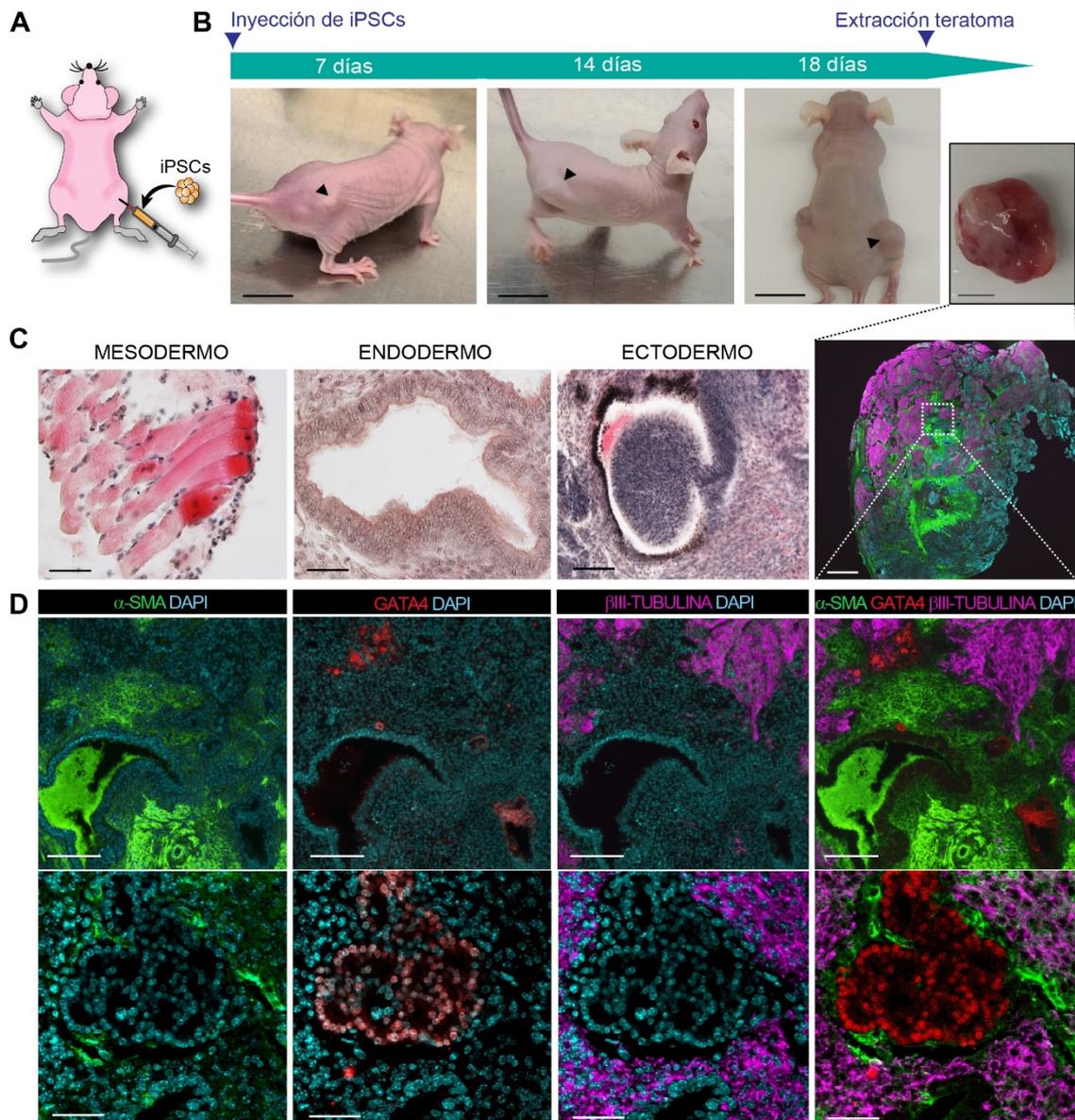


Figura 24. Las iPSCs generadas a partir de NSCs i4F-B forman células de las tres capas embrionarias *in vivo*. **A)** Esquema del protocolo de formación de teratomas *in vivo* a partir de la inyección de iPSCs en los flancos dorso-laterales de ratones inmunocomprometidos *Nude*. **B)** Seguimiento del crecimiento de los teratomas (cabeza de flecha) tras 7, 14 y 18 días de la inyección de las iPSCs en ratones *Nude*. La última imagen corresponde a uno de los teratomas 18 días tras la inyección. **C)** Análisis histológico de los teratomas mediante tinción con hematoxilina-eosina. Se muestran imágenes de células pertenecientes a las tres capas embrionarias, mesodermo (fibras musculares estriadas), endodermo (células del epitelio columnar) y ectodermo (melanocitos). **D)** Imágenes de fluorescencia para marcadores específicos de mesodermo (α -SMA), endodermo (GATA4) y ectodermo (β III-TUBULINA) también se obtuvieron por ICC. DAPI fue utilizado para contrateñir los núcleos. Las barras de escala son, en B: 500 mm (ampliación: 100 mm); en C: 50 μ m; en D: 50 μ m (teratoma completo), 10 μ m (paneles superiores), 20 μ m (paneles inferiores).

1.2. Las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas pueden ser diferenciadas a precursores neurales

Con el fin de determinar si los cambios producidos durante la generación de las iPSCs a partir de NSCs eran reversibles, se indujo la re-diferenciación de las iPSCs generadas a un fenotipo neural, utilizando un protocolo basado en la diferenciación mediante FBS y ácido retinoico (RA) (Bibel et al., 2007), de tal manera que tras varios días en cultivo se obtuvieron los progenitores neurales (NPs) (**Figura 25A**). La adquisición del fenotipo neural, así como la pérdida de marcadores de pluripotencia en estos NPs, fue comprobada mediante qPCR. El análisis mostró una disminución de casi 15 veces en la expresión de *Nanog* durante la diferenciación en medio de NPs con FBS (**Figura 25B**). La adición posterior de RA al medio indujo un descenso aún mayor en la expresión del gen conforme se diferenciaban los NPs (**Figura 25B**). Simultáneamente, la expresión del gen neural *Nestina* aumentó significativamente en los NPs, aunque no llegaron a alcanzar los niveles de las NSCs adultas (**Figura 25B**). En este caso, fue la presencia del RA en el medio la que indujo un aumento de alrededor de 20 veces en los NPs con respecto a las iPSCs. También se observó el cambio de expresión del gen neural *Pax6* en presencia de RA el cual aumentó 100 veces su expresión en los NPs con respecto a las iPSCs, alcanzando niveles comparables a las NSCs de origen (**Figura 25B**). La expresión de genes asociados a los tres linajes neurales: oligodendrocitos (*Olig2*), astrocitos (*Gfap*), y neuronas (*β III-tubulina*), también fue analizada (**Figura 25C**). Tanto la expresión de *Olig2*, como de *Gfap*, se mantuvo durante la diferenciación a NPs, sin embargo, la expresión de *β III-tubulina* mostró un aumento significativo sugiriendo una diferenciación más dirigida hacia el linaje neuronal (**Figura 25C**).

El estudio inmunocitoquímico durante la diferenciación de iPSCs a NPs confirmó la disminución de NANOG y OCT4 y la reaparición de NESTINA en los NPs (**Figura 6D**). También se observó la aparición de células positivas para el marcador OLIG2, aunque la frecuencia de células positivas para este marcador en NPs fue mucho menor que el observado en las NSCs adultas de origen. En cambio, el marcador GFAP no mostró cambios significativos en la expresión de proteína entre NSCs, iPSCs y NPs (**Figura 25D**). Para confirmar si los NPs generados presentaban tendencia hacia un linaje neuronal, se llevó a cabo una ICC para MAP2 (del inglés *Microtubule-associated protein 2*), marcador específico de neurona madura (Dehmelt and Halpain, 2005). Este estudio reveló la presencia de células positivas para dicho marcador en NPs, ausente en iPSCs e, incluso, en NSCs (**Figura 25D**). Todos estos resultados indican que las iPSCs generadas a partir de la reprogramación de las NSCs adultas portadoras del transgén OSKM pueden ser eficientemente diferenciadas de nuevo a un fenotipo neural.

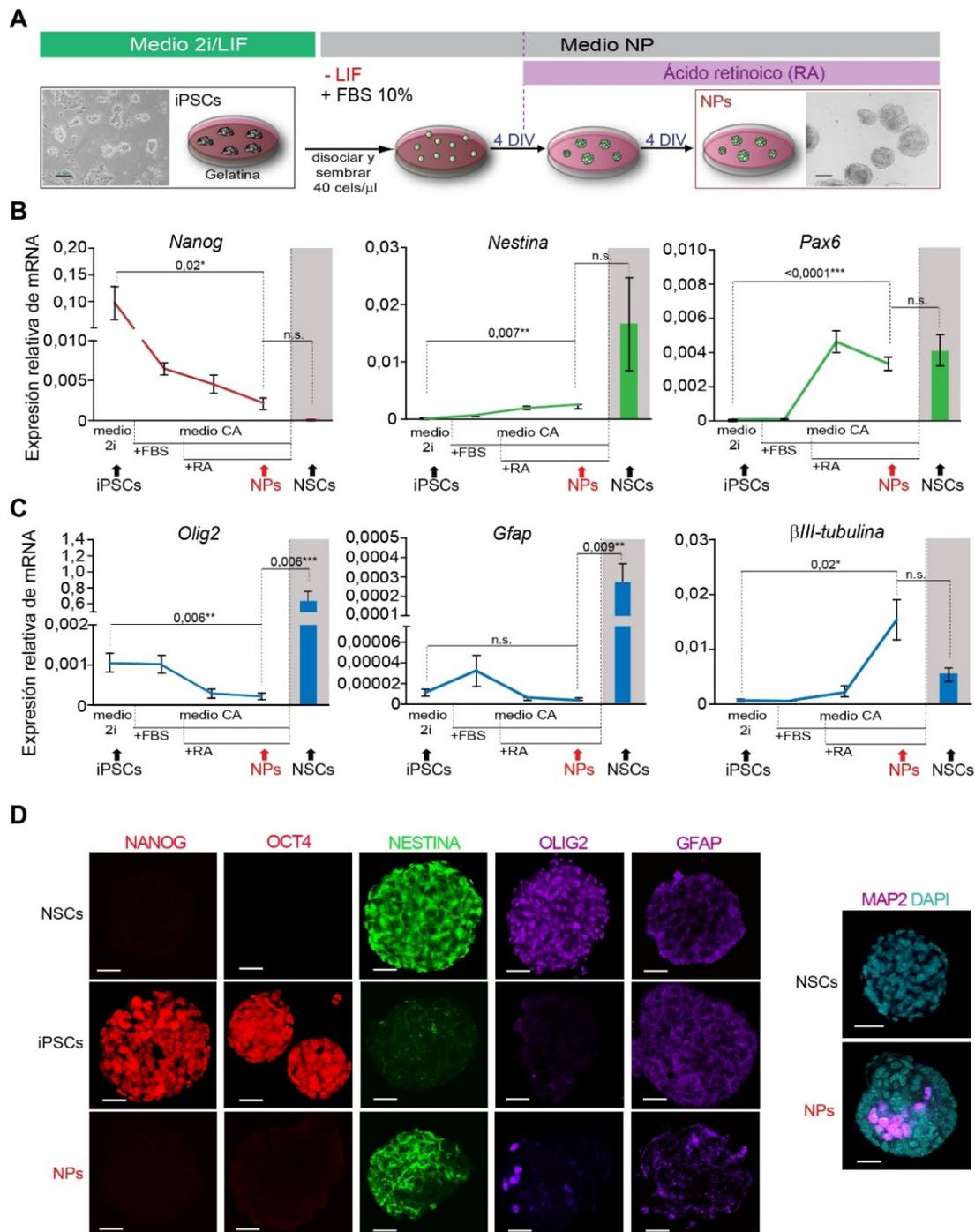


Figura 25. Las iPSCs generadas a partir de NSCs pueden diferenciarse a neuroprogenitores (NPs). **A)** Esquema del protocolo de diferenciación de las iPSCs a NPs. Este protocolo se basa en los resultados publicados en Bibbel M *et al.* 2007 en los cuales se utiliza medio NP con suero al 10% (FBS) y 5 μ M de ácido retinoico (RA) para promover la diferenciación neural de las iPSCs. Se muestran imágenes de contraste de fases de las iPSCs y tras su diferenciación a NPs. **B)** qPCR para *Nanog* y los marcadores neurales *Nestina* y *Pax6* en NSCs, iPSCs y NPs. **C)** qPCR para marcadores de los distintos linajes neurales *Olig2*, *Gfap* y *βIII-tubulina*, durante el proceso de diferenciación de las iPSCs a NPs. Los niveles de expresión de estos genes en las NSCs i4F-B también se han indicado, así como los p-valores. El gen *Gapdh* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. **D)** Imágenes de ICC para los marcadores de pluripotencia NANOG y OCT4 (rojo), para el marcador neural NESTINA (verde), y para los marcadores OLIG2 y GFAP (morado) en NSCs, iPSCs y NPs. Se muestran imágenes de fluorescencia también de la ICC para el marcador neuronal MAP2 (morado) en NSCs y NPs. DAPI ha sido utilizado para contrateñir los núcleos. Los p-valores están indicados en las imágenes; n.s.: no significativo estadísticamente. Las barras de error muestran el s.e.m. de entre 3 y 6 cultivos por condición. Las barras de escala son, en A: 100 μ m; en D: 25 μ m.

1.3. La reprogramación de las NSCs adultas de ratones i4F-B a iPSCs produce alteraciones en la expresión de genes improntados

Con el fin de estudiar la posible implicación del proceso epigenético de impronta genómica en la transformación de las NSCs adultas a un estado pluripotente, la expresión de diversos genes improntados fue analizada mediante qPCR en NSCs, iPSCs y NPs utilizando sondas específicas (**Tablas Suplementarias 1 y 2 MM**). Este análisis mostró que, de un total de 26 genes analizados, localizados en distintos *clusters* de impronta, un elevado porcentaje (84,62%) veían alterados sus niveles de expresión durante el proceso de reprogramación de NSCs a iPSCs (**Figura 26A, B**). En el conjunto de los 22 genes alterados, el 54,55% aumentó su nivel de expresión en las iPSCs, mientras que el resto lo disminuyó (**Figura 26A**). Curiosamente, los genes cuya expresión se vio disminuida pertenecían a *clusters* de impronta que se localizaban principalmente entre los cromosomas 2 y 7, mientras que los genes improntados cuya expresión aumentó en las iPSCs pertenecían a *clusters* que se localizaban en los cromosomas del 7 al 15 (**Figura 26B**).

Del total de genes improntados cuya expresión cambiaba durante la reprogramación de las NSCs, alrededor del 40% revirtieron sus niveles de expresión al re-diferenciar las iPSCs en NPs (**Figura 26A**). En concreto, un total de 9 genes (*Gnas*, *Peg10*, *Peg3*, *Peg12*, *Ins2*, *Plagl1*, *Cobl*, *Dio3* y *Dlk1*) de los 22 que se encontraban alterados en iPSCs, acercaron sus niveles de expresión a los de las NSCs de origen (**Figura 26C y 27A**). Estos resultados indican que la regulación de la expresión de genes improntados es modulable durante los procesos de desdiferenciación de las NSCs y re-diferenciación de las iPSCs a una nueva identidad neural.

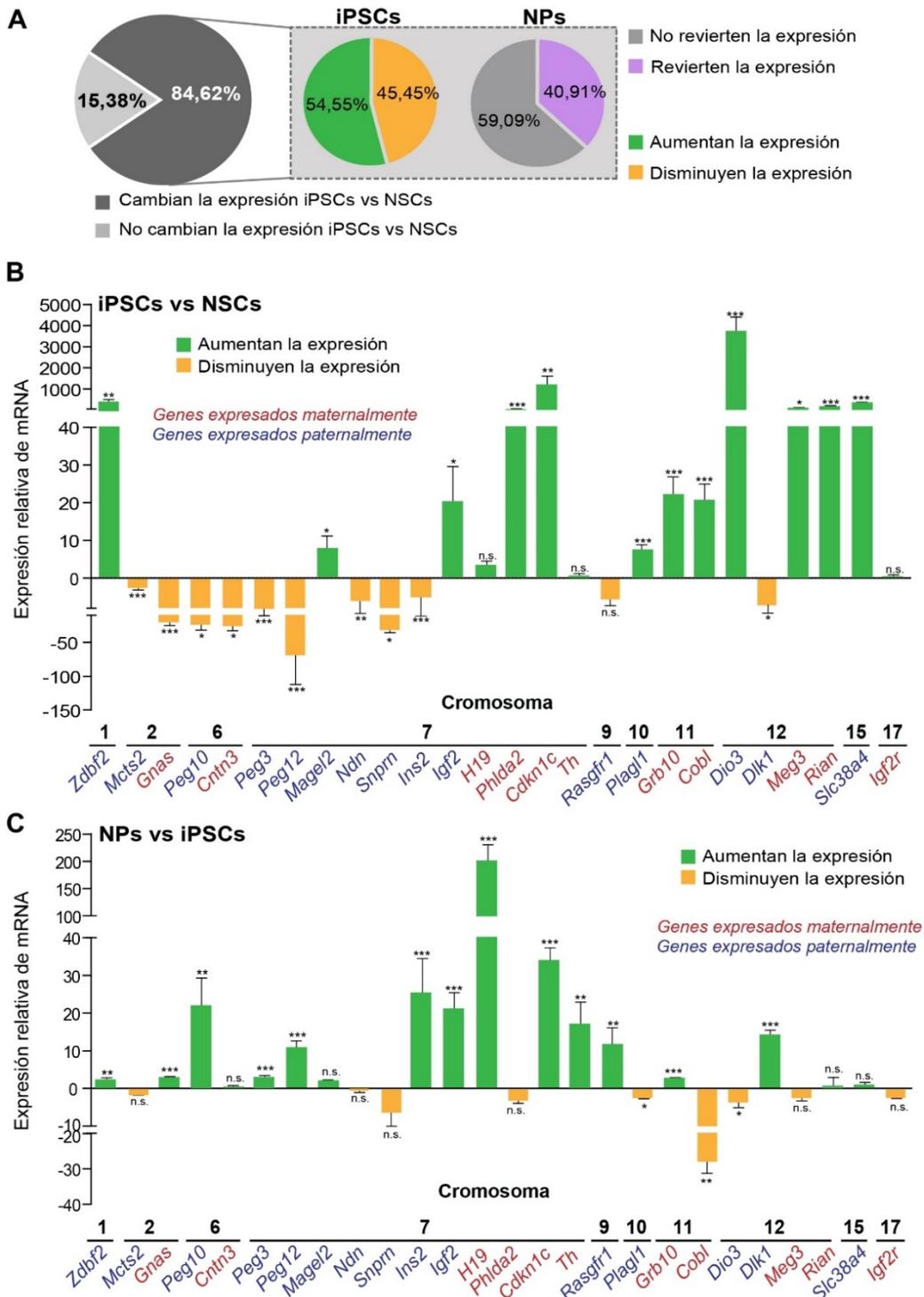


Figura 26. La reprogramación de NSCs a iPSCs conlleva cambios reversibles en la expresión de genes improntados. **A)** Porcentaje de genes cuya expresión cambia en las iPSCs con respecto a las NSCs de origen (panel de la izquierda). Porcentaje de genes que aumentan (verde) y disminuyen (naranja) su expresión en las iPSCs respecto a las NSCs, y de aquellos que reversionen la expresión al ser diferenciados nuevamente al fenotipo de neuroprogenitores (NPs; morado). **B)** Cambios de expresión de los genes improntados en las iPSCs con respecto a las NSCs. Los genes cuya expresión se vio aumentada en las iPSCs han sido indicados en verde, mientras que aquellos que disminuyeron, se muestran en naranja. **C)** Cambios de expresión de los genes improntados en NPs con respecto a las iPSCs de origen. Los genes han sido organizados por su localización en los cromosomas, indicando el cromosoma concreto en el que se encuentra el gen. Los genes de expresión materna se indican en rojo mientras que aquellos cuya expresión proviene del alelo paterno, en azul. El gen *Gapdh* ha sido utilizado para normalizar los datos de expresión. Los p-valores ***<0,001, **<0,01, *<0,05; n.s.: no significativo estadísticamente.

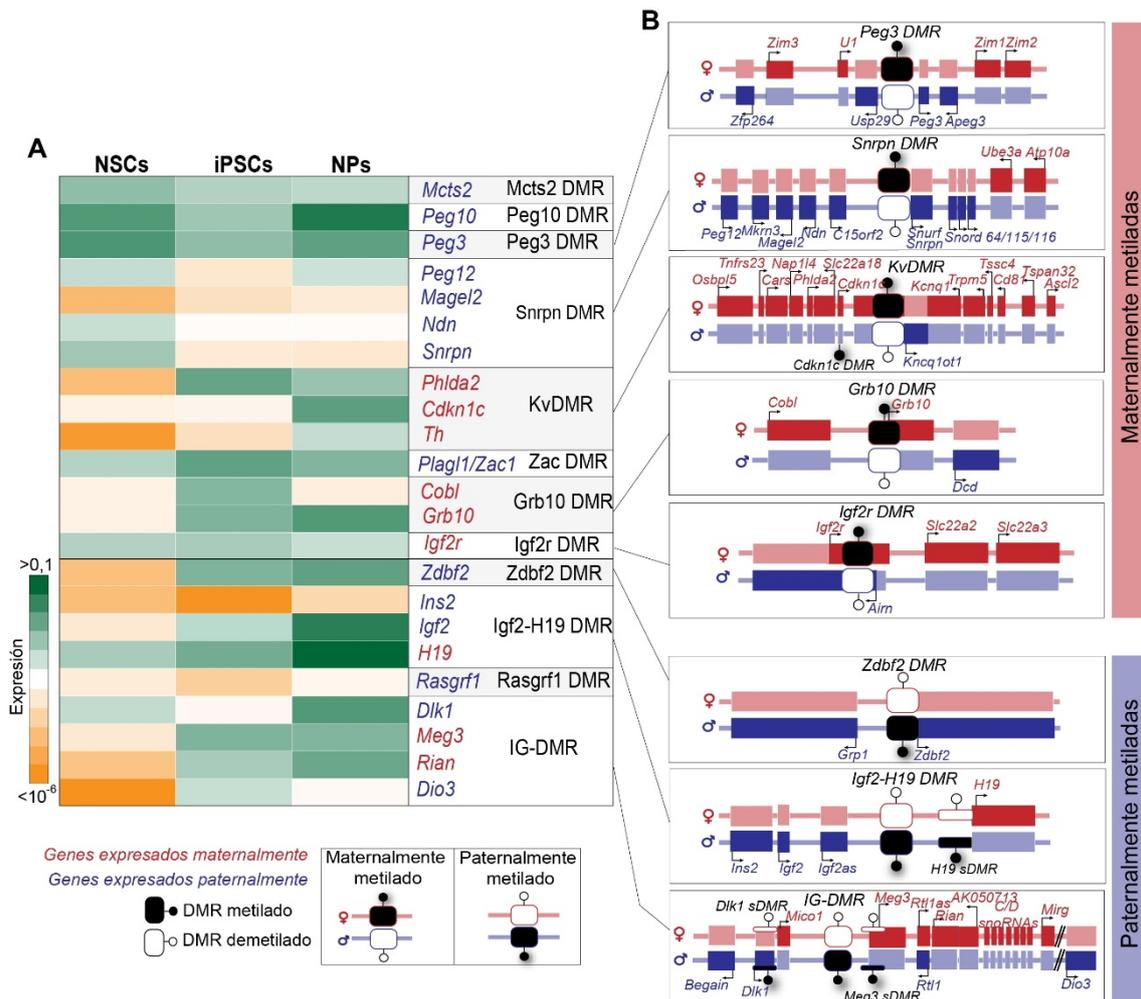


Figura 27. Los procesos de desdiferenciación y rediferenciación alteran la expresión de los genes improntados. **A)** HeatMap que muestra la expresión de los genes improntados en NSCs, iPSCs y NPs. Los genes han sido organizados por clusters indicando la región DMR reguladora de cada uno de ellos. Niveles altos de expresión se indican en verde y aquellos que presentan menores niveles de expresión se muestran en naranja. Los genes de expresión materna se indican en rojo mientras que aquellos de expresión paterna se muestran en azul. **B)** Representación de la distribución de los genes improntados en distintos clusters de impronta genómica. Se representan el alelo materno (rojo) y paterno (azul), y la metilación de la DMR que regula cada cluster.

1.4. La reprogramación de NSCs a iPSCs se asocia con cambios en el estado epigenético de genes improntados

La adquisición de un estado pluripotente se caracteriza por una hipometilación del genoma de las células de origen (Leitch et al., 2013; Liu et al., 2017; Pastor et al., 2016; Perrera and Martello, 2019; Wang et al., 2018c), lo que implica que la metilación supone una barrera para la reprogramación completa a iPSCs (De Carvalho et al., 2010). Esto incluye la pérdida de metilación en las ICRs (Liu et al., 2017), lo que puede causar, en algunos casos, la reactivación o represión de los genes improntados regulados por una misma DMR (Bar et al., 2017; Giulitti et al., 2019; Pastor et al., 2016).



1.4.1 La reprogramación de NSCs adultas a iPSCs conlleva la hipometilación de las ICRs

Clásicamente la metilación del DNA ha sido asociada a la represión génica (Razin and Cedar, 1991), y aunque este no es siempre el caso de los *clusters* improntados, la hipometilación de las ICRs promueve generalmente la expresión de los genes localizados en dichos *clusters* (Zou et al., 2020). Las ICRs identificadas hasta la fecha se clasifican en gDMR, que adquieren su estado de metilación en la línea germinal y sDMR que se metilan diferencialmente tras la fertilización y son específicas de tejido (Ferguson-Smith, 2011). La delección o alteraciones de la metilación de estas DMRs pueden causar una pérdida de impronta genómica en múltiples genes dentro del *cluster* (**Figura 27B, C**) (SanMiguel and Bartolomei, 2018). Por ello, y con el fin de determinar si los cambios observados en la expresión de los genes improntados durante el proceso de reprogramación estaban asociados a cambios en los niveles de metilación en las DMRs reguladoras de estos genes, se llevó a cabo el análisis por conversión bisulfítica y posterior pirosecuenciación del porcentaje de metilación asociado a las islas CpG de las DMRs que regulan los *clusters* improntados (**Figura 27B, C**). El porcentaje de metilación en una ICR es de básicamente el 100% en el alelo metilado y de 0% en el alelo no metilado, resultando en una medida conjunta del 50% por la técnica de pirosecuenciación. Un aumento o descenso de ese porcentaje puede representar un cambio en el estado de la impronta de dicho *cluster* (Ferguson-Smith, 2011).

Para determinar los cambios en los niveles de metilación durante la reprogramación celular, un total de 15 ICR/DMRs fueron analizadas en iPSCs, NPs y en las NSCs de origen (**Figura 28**). De ellas, 6 paternalmente metiladas (**Figura 28A**) y 9 maternalmente metiladas (**Figura 28B**). Cabe destacar que la localización de estos dos tipos de DMRs difieren, situándose en regiones intergénicas en el caso de las DMRs paternalmente metiladas, mientras que las DMRs maternalmente metiladas se localizan en regiones promotoras (Bar et al., 2017; Edwards and Ferguson-Smith, 2007). De todas las DMRs analizadas, 13 (86,67%) mostraron una disminución de la metilación significativa en las iPSCs en comparación con las NSCs y ninguna de ellas mostró un aumento de la metilación, independientemente de si eran gDMRs o sDMRs (**Figura 28A B**). Además, 5 de las 6 (83%) DMRs paternalmente metiladas (H19 DMR, H19 promotor DMR, IG-DMR, Zdbf2 DMR, Rasgfr1 DMR), revirtieron los niveles de metilación tras la diferenciación de las iPSCs a NPs (**Figura 28A**). Es interesante destacar que únicamente la Igf2r DMR (germinal) y la Cdkn1c sDMR (somática) maternalmente metiladas mostraron una reversión en los niveles de metilación tras la re-diferenciación de las iPSCs a un fenotipo neural (**Figura 28B**). Estos datos sugieren que, tras la reprogramación celular, las DMRs paternalmente metiladas parecen estar

más afectadas por la pérdida de impronta genómica que las maternalmente metiladas, lo cual coincide con estudios anteriores en otros sistemas (Bar et al., 2017; Rugg-Gunn et al., 2007).

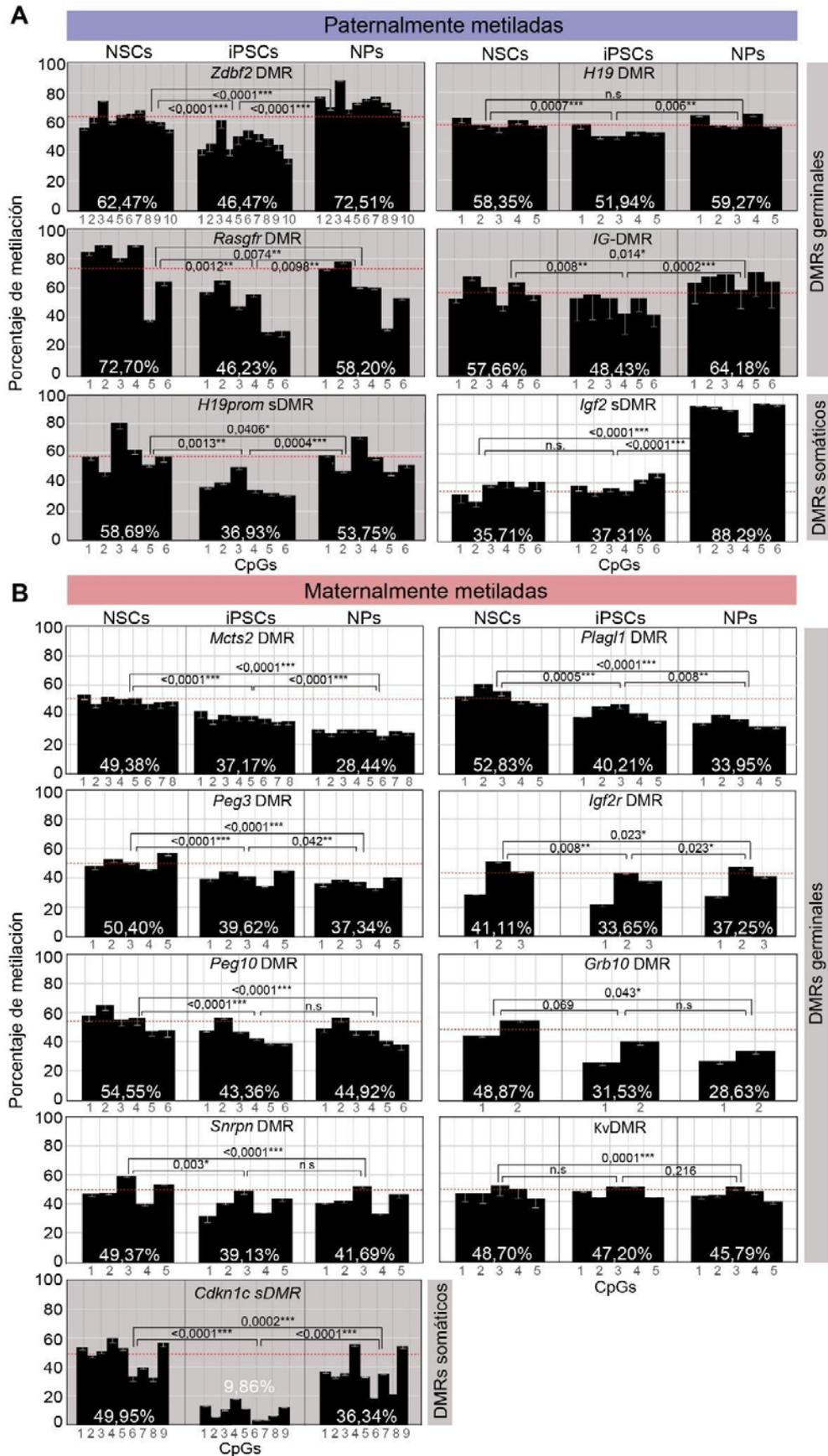




Figura 28. La reprogramación de NSCs a iPSCs conlleva la hipometilación de las regiones de control de impronta. A) Porcentaje de metilación en las islas CpG de las DMRs, germinales y somáticos, paternalmente metilados en NSCs, iPSCs y NPs en las regiones de control de impronta. **B)** Porcentaje de metilación en las islas CpG de las DMRs, germinales y somáticas, maternalmente metiladas. El número de CpGs analizadas se indica. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos 3 cultivos por tipo celular. Los p-valores han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente.

Los efectos de la hipometilación en la expresión de los genes improntados a los que controlan las DMRs afectadas dependerán de qué alelo, el materno o el paterno, se encuentre metilado originalmente (**Figura 27B, C**). De esta manera, si la hipometilación ocurre en las DMRs maternalmente metiladas, se producirá la “paternalización” del alelo materno, es decir, la expresión de los genes maternos disminuirá mientras que la de los paternos aumentará. Sin embargo, el estudio cruzado de los datos de expresión por qPCR y de metilación de las DMRs en *clusters* improntados, reveló que únicamente en algunos casos estas premisas se cumplían. Por ejemplo, el gen *Plagl1*, de expresión paterna y localizado en el cromosoma 10, aumentó su expresión en las iPSCs con respecto a las NSCs acorde con la hipometilación del DMR materno (**Figura 26B, 27A y 28B**). Lo mismo ocurría con el gen *Magel2*, también de expresión paterna, situado en la *Snrpn* DMR, el cual mostró un aumento de su expresión en iPSCs como consecuencia de la hipometilación de dicha DMR (**Figura 26B, 27A y 28B**). Sin embargo, el resto de genes improntados en esta región, también de expresión paterna, disminuyeron sus niveles en iPSCs respecto a NSCs (**Figura 26B y 27A**). Otros ejemplos en los que la hipometilación de la DMR no explica los cambios de expresión génica, son los genes de expresión materna *Cobl*, *Grb10*, *Phdla2* y *Th* también localizados en *clusters* con ICR/DMRs maternalmente metiladas y cuyos niveles de expresión aumentaron tras la reprogramación (**Figura 26B y 27A**). Estos datos sugirieron que los cambios en la expresión génica de los genes improntados durante la adquisición de un estado pluripotente en NSCs no son totalmente dependientes de la hipometilación observada en sus DMRs.

En el caso de las DMRs paternalmente metiladas, la pérdida de metilación producirá la “maternalización” del alelo paterno (Ferguson-Smith, 2011). Por ejemplo, en las 4 gDMRs paternalmente metiladas, la hipometilación debería conllevar al aumento de expresión de los genes maternos y la disminución de los paternos. En concordancia, el gen *Ins2* de expresión paterna localizado en el *cluster* de la H19 DMR, disminuyó en iPSCs y el gen *H19* de expresión materna localizado en el mismo *cluster* aumentó en iPSCs respecto a las NSCs coincidente con una hipometilación del H19 DMR (**Figura 26B, 27A y 28A**). Sin embargo, el gen *Igf2*, de expresión paterna y localizado en el mismo *cluster*, aumentó sus niveles de expresión en las iPSCs, contrariamente a lo esperado (**Figura 26B y 27A**), si bien el gen *Igf2* se encuentra regulado a su vez por una sDMR, cuyos niveles de metilación no se ven afectados en las iPSCs y que podría estar

regulando coordinadamente la expresión de este gen (**Figura 26B, 27A y 28A**). En el caso del gen *H19*, su expresión también es regulada por una DMR somática o secundaria (*H19prom* sDMR), cuyos niveles de metilación disminuyeron en las iPSCs y se revirtieron en los NPs, como ocurría con su DMR germinal; sin embargo, el aumento de expresión de *H19* no fue significativo en las iPSCs, mientras que hubo un aumento de expresión en los NPs, contrariamente a lo esperado tras el aumento de metilación (**Figura 26B y 27A**). Cabe destacar, que la expresión del gen *Ins2* sí coincidió con los cambios de metilación observados en la DMR tras la reprogramación de las NSCs, y estos revertían, tanto en los niveles de expresión como de metilación, en los NPs (**Figura 27 y 28**).

Finalmente, cuatro genes localizados en el cromosoma 12 bajo la regulación de la ICR denominada IG-DMR paternalmente metilada fueron también analizados. Dos de ellos, *Meg3* y *Rian*, de expresión materna aumentaron su expresión en las iPSCs con respecto a las NSCs tras la hipometilación de la IG-DMR. A su vez, el gen *Dlk1*, de expresión paterna y localizado en el mismo *cluster*, disminuyó sus niveles de expresión en iPSCs, concordante con la disminución de la metilación de la DMR (**Figura 26B y 27A**). Además, la reversión en la metilación de la IG-DMR observada tras la diferenciación de las iPSCs a NPs correlacionó con la readquisición de niveles altos del gen *Dlk1*, sugiriendo una posible relación de los niveles de metilación de la IG-DMR y los niveles de expresión del gen durante la reprogramación celular y posterior re-diferenciación a un fenotipo neural (**Figura 27 y 28**). Esta condición no se cumplió para los otros genes del *cluster* *Meg3* y *Rian*, que aumentaron aún más sus niveles de expresión tras la diferenciación a NPs (**Figura 27 y 28**).

Por tanto, los cambios en el porcentaje de metilación en el proceso de adquisición del estado pluripotente y de diferenciación neural no siempre coincidieron con los cambios de expresión génica observados durante ambos procesos, indicando que esos casos pudieran no estar causados por los cambios de metilación en sus regiones reguladoras DMRs. Este fenómeno ya ha sido observado en otros estudios de reprogramación celular (Kim et al., 2013). Sin embargo, estos resultados sí señalaron a la IG-DMR y al gen *Dlk1* regulado por ella como potenciales reguladores del estado de NSC durante la adquisición de un estado pluripotente, sugiriendo que la impronta genómica es un proceso parcialmente modulable durante el desarrollo y tras la adquisición de la identidad celular.



1.4.2 La reprogramación de NSCs adultas a iPSCs conlleva cambios en el estado de impronta del gen *Dlk1*

La pérdida de impronta genómica o LOI ha sido sugerida como uno de los procesos que favorecen la adquisición de un estado pluripotente (Bar et al., 2017; Perrera and Martello, 2019; Takikawa et al., 2013), causando la expresión bialélica de algunos genes improntados tales como *H19*, *Igf2*, *Meg3*, *Peg3*, *Peg10* o *Mest* (Leick et al., 2012; Perrera and Martello, 2019). Clásicamente se ha utilizado el estudio de los niveles de metilación de las regiones ICRs para detectar la LOI (Jelinic and Shaw, 2007). Sin embargo, para determinar si los cambios observados en los niveles de metilación (**Figura 28**) eran los responsables de los cambios de expresión de los genes improntados durante la reprogramación celular, se llevó a cabo un análisis de polimorfismos o SNPs en los genes de interés. Las variaciones de un único nucleótido en la secuencia de DNA en la generación F1 del cruce híbrido entre las cepas murinas *Mus musculus castaneus* (CAST) y *Mus musculus domesticus* (B6) permitió detectar si la expresión de los genes improntados procedía del alelo materno, del paterno, o de ambos alelos tras la pérdida de impronta genómica. Las NSCs adultas de ratones híbridos procedentes de cruces de hembras i4F-B con machos CAST (cruce B6xCAST) y de cruces recíprocos de hembras CAST con machos i4F-B (cruce CASTxB6) fueron extraídas y reprogramadas a iPSCs y posteriormente diferenciadas a NPs. Con el fin de determinar la expresión alelo-específica de los genes improntados, se secuenció el cDNA de las regiones de estos genes que contenían el SNP. Se realizó este análisis para 7 genes improntados con perfiles de expresión diferentes durante el proceso de reprogramación y diferenciación: *Gnas* (cromosoma 2), *Peg3* (cromosoma 7), *Snrpn* (cromosoma 7), *Phlda2* (cromosoma 7), *Cobl* (cromosoma 11), *Dlk1* (cromosoma 12) y *Meg3* (cromosoma 12) (**Figura 29**). La detección y análisis de los SNPs para los genes *Snrpn*, *Dlk1* y *Meg3* se basaron en estudios previos (Ferron et al., 2011), mientras que el resto de SNPs fueron diagnosticados en esta Tesis.

Los estudios de metilación de las DMRs en regiones de impronta genómica identificaron al gen *Dlk1*, perteneciente al *cluster* improntado *Dlk1-Dio3* y regulado por la IG-DMR, como crucial durante la reprogramación de las NSCs, por lo que se procedió a estudiar el estado de impronta genómica de dicho gen en NSCs, iPSCs y NPs procedentes de animales híbridos B6xCAST y CASTxB6. *Dlk1* es un gen improntado de expresión paterna en el organismo, pero que pierde dicho estado de impronta en las NSCs adultas de forma fisiológica (Ferron et al., 2011). Durante la reprogramación de las NSCs al estado pluripotente se observó una disminución de la expresión de dicho gen en las iPSCs generadas, niveles que se vieron revertidos en los NPs tras la diferenciación neural de las iPSCs (**Figura 26B y 27A**). Dichos cambios de expresión del gen pudieran ser causados por alteraciones del estado de impronta genómica de *Dlk1*. El estudio por

secuenciación de un SNP en el exón 5 del mRNA de *Dlk1* mostró que, tras la reprogramación de las NSCs, se producía el silenciamiento de uno de los alelos, dando lugar a una expresión monoalélica del gen, consistente con la hipometilación observada en la IG-DMR en las iPSCs (**Figura 29A**). En contra de lo esperado, el alelo silenciado fue el paterno, mientras que el materno permaneció transcripcionalmente activo (**Figura 29A**). Notablemente, el estado de impronta genómica en el gen *Dlk1*, se perdió nuevamente durante el proceso de diferenciación a NPs de las iPSCs, coincidente con el aumento del porcentaje de metilación de la IG-DMR en los NPs (**Figuras 28A y 29A**).

La metilación paterna de la IG-DMR también es requerida para mediar la represión del gen *Meg3* en el cromosoma paterno, siendo por lo tanto un gen de expresión materna dentro del mismo *cluster* (**Figura 27C**). Por lo tanto, para determinar si los cambios en el porcentaje de metilación observados en la IG-DMR pudieran también alterar la expresión de *Meg3* durante la reprogramación de las NSCs, se determinó su estado de impronta mediante la secuenciación de un SNP en el exón 9 del gen *Meg3* (**Figura 29A**). Los resultados mostraron que este gen, vecino a *Dlk1*, mantuvo únicamente la expresión materna en iPSCs y tras la diferenciación a NPs (**Figura 29A**). Genes localizados en otros *clusters* clásicamente improntados tales como *Cobl* y *Gnas*, pero de expresión bialélica en cerebro, o *Peg3*, de expresión paterna, no vieron alterado su estado de impronta tras la reprogramación celular (**Figura 29B**).

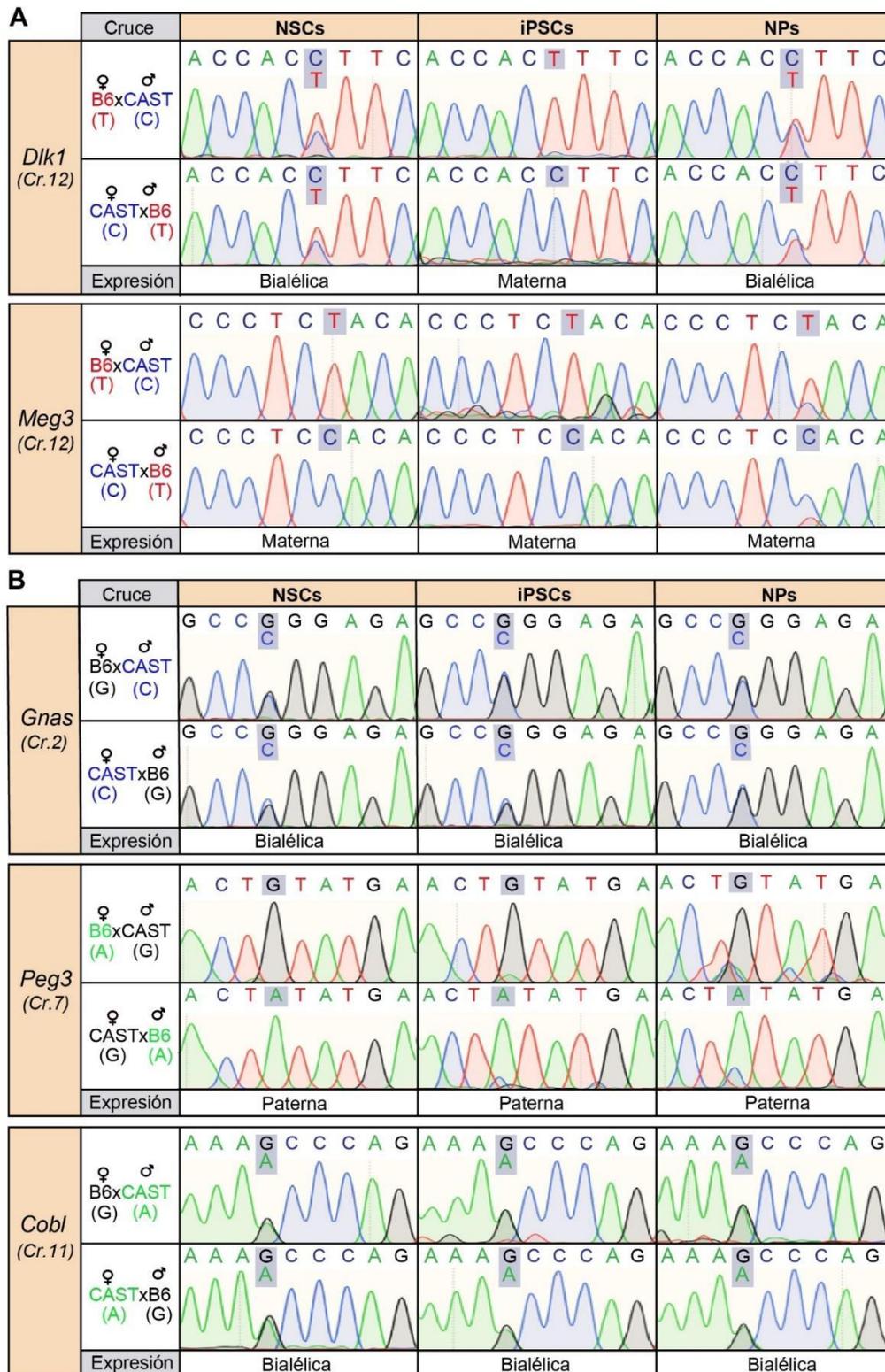


Figura 29. El estado de impronta genómica de *Dlk1* se ve alterado durante el proceso de reprogramación y diferenciación neural. **A)** Perfiles de secuenciación del producto de PCR del mRNA de los genes improntados *Dlk1* y *Meg3* en NSCs, iPSCs y NPs procedentes de animales híbridos generados por cruces entre hembras i4F-B (B6) con machos *Mus musculus castaneus* (CAST) (animales B6xCAST), o cruces entre hembras *Mus musculus castaneus* con machos i4F-B (animales CASTxB6). La región analizada contiene un SNP entre las dos cepas que permite determinar la expresión alelo-específica de dichos genes. **B)** Perfiles de secuenciación del producto de PCR de los genes improntados *Gnas*, *Peg3* y *Cobl* conteniendo un SNP para determinar la expresión alelo-específica de los genes improntados a partir de NSCs, iPSCs y NPs.

Los datos muestran, por lo tanto, que la hipermetilación de la región IG-DMR en las NSCs adultas, da lugar a la expresión bialélica del gen *Dlk1*, como ya se había mostrado previamente (Ferrón et al., 2011). Sin embargo, la reprogramación de estas células en iPSCs coincide con una disminución de la metilación de la IG-DMR y, como consecuencia, la expresión monoalélica del gen (Figura 30). Finalmente, la re-diferenciación de las iPSCs en NPs, vuelve a conllevar la hipermetilación de la IG-DMR, lo cual se asocia con la readquisición de la expresión bialélica de *Dlk1* en los NPs generados. Estos resultados muestran que el estado de impronta del gen *Dlk1* durante la reprogramación celular correlaciona con el estado de metilación de la IG-DMR, y por lo tanto con sus niveles de expresión.

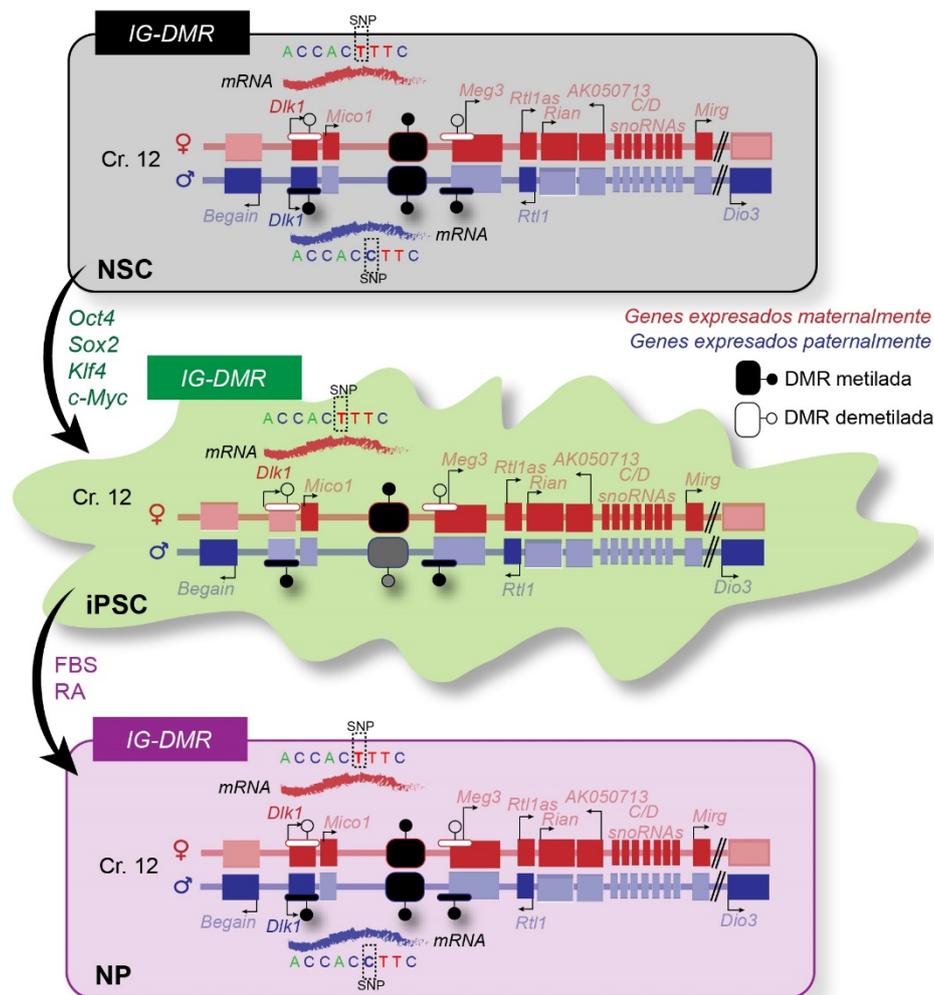


Figura 30. La reprogramación de NSCs adultas en iPSCs altera la expresión del gen improntado *Dlk1* y su estado de impronta. Esquema del efecto del proceso de reprogramación de NSCs adultas en iPSCs y diferenciación de estas últimas en NPs en la metilación de la región IG-DMR y la expresión alelo-específica del gen improntado *Dlk1* situado bajo el control de IG-DMR. Las NSCs adultas pierden de forma específica el estado de impronta de *Dlk1* de tal manera que presentan expresión bialélica en concordancia a la hipermetilación encontrada en la región IG-DMR; sin embargo, la reprogramación conduce a la hipometilación de la IG-DMR y a la represión de la expresión del alelo paterno del gen, manteniéndose la expresión del alelo materno, lo cual conduce a una disminución de la expresión de *Dlk1* en iPSCs con respecto a las NSCs de origen. La diferenciación de las iPSCs a NPs revierte los niveles de metilación en la IG-DMR, y en consecuencia, la expresión de *Dlk1* pasa a ser bialélica, aumentando la expresión del gen.

OBJETIVO 2. Estudio del proceso de impronta genómica y su regulación epigenética en el glioblastoma



2. El proceso de impronta genómica sufre alteraciones durante la reprogramación y formación de tumores cerebrales *in vivo*

La regulación del proceso de impronta genómica a través de las marcas de metilación en el DNA juega además un papel clave en el desarrollo del cáncer (Kulis and Esteller, 2010; Luczak and Jagodzinski, 2006; Plass and Soloway, 2002). De hecho, la desmetilación global del DNA observada en distintos cánceres va también acompañada de la disminución de la metilación en las DMRs en las ICRs (Caren et al., 2013; Uribe-Lewis et al., 2011), aunque también se han descrito procesos de hipermetilación en estas DMRs (De Smet and Loriot, 2010; Uribe-Lewis et al., 2011). Además, alteraciones del estado de impronta genómica, como la LOI son uno de los procesos más comunes y que más tempranamente ocurren en la formación de tumores (Holm et al., 2005; Jelinic and Shaw, 2007; Kim et al., 2015; Peters, 2014). Por ello, el estudio del papel de la impronta genómica en el origen y desarrollo del principal y más agresivo tumor cerebral, el GBM (Cirillo et al., 2014; Miyai et al., 2017), es clave para el desarrollo de nuevas estrategias para su diagnóstico y tratamiento.

2.1. La expresión de genes improntados se encuentra alterada en GBM humano y murino

Gracias a los estudios realizados en diferentes laboratorios de neurooncología, actualmente se cuenta con mucha información sobre los distintos tipos de tumores a nivel de expresión por secuenciación del RNA (RNAseq) o microarrays, de metilación del DNA, de proteína y de distintos parámetros clínicos (Bowman et al., 2017). La aplicación Gliovis (<http://gliovis.bioinfo.cnio.es/>), que sirve para la visualización de bases de datos de expresión en tumores cerebrales humanos, contiene aproximadamente 6.500 muestras de tumores cerebrales y 50 bases de datos de expresión generadas por distintos laboratorios (Bowman et al., 2017). Con el fin de determinar la potencial relevancia de distintos genes improntados en la formación y/o desarrollo del GBM en humanos, se obtuvo de la base de datos *Geneimprint* (www.geneimprint.com) la lista de genes improntados descritos en humanos hasta la fecha (**Figura Suplementaria 1**). A continuación, se analizó la expresión de todos estos genes improntados en muestras de tumores humanos, utilizando la base de datos de Gill de Gliovis que engloba datos de RNAseq de 17 muestras no tumorales y 75 tumorales (con tres réplicas por muestra) de GBM. Un total de 81 genes improntados se expresaban en las muestras analizadas, de los cuales, 57 mostraron cambios de expresión (70,37%) entre las muestras tumorales y las no tumorales (**Figura 31A, B**). Dentro del grupo de genes improntados cuya expresión se encontraba alterada, 23 presentaron una expresión mayor en las muestras tumorales con respecto a las muestras no tumorales (40,35%), y 34 presentaron una expresión menor (59,65%) (**Figura 31A**).

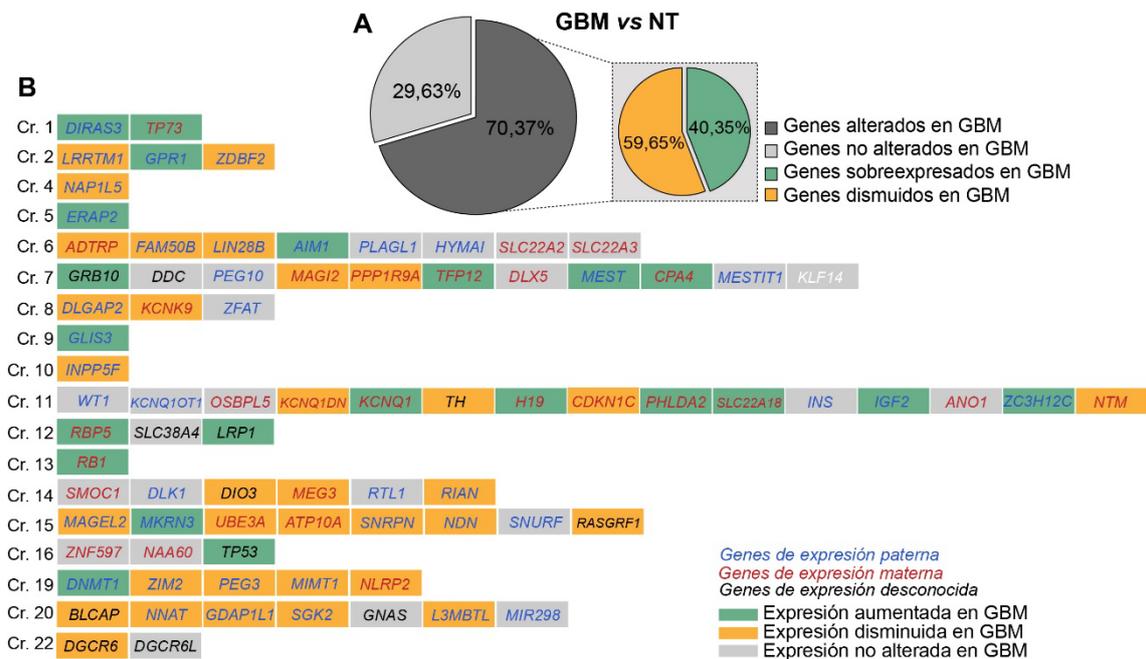


Figura 31. Las muestras de pacientes de GBM muestran alteraciones significativas en los niveles de expresión de genes improntados. A) Gráficos en círculo donde se muestran los porcentajes de genes improntados alterados en muestras de GBM respecto a muestras no tumorales (NT). Se utilizaron para el análisis los datos de RNAseq de la base de datos de Gill en la plataforma de GLIOVIS que incluye 75 pacientes de GBM. Un gran porcentaje de genes improntados están alterados en las muestras de GBM respecto a las no tumorales (70%). Los gráficos muestran, además, que casi el 60% de los genes presentan una expresión disminuida (naranja) en las muestras tumorales con respecto a tejido no tumoral, mientras que alrededor de un 40% de los genes presentan una expresión aumentada (verde) en GBM. **B)** Distribución de los genes improntados expresados en muestras de GBM a lo largo del genoma humano. Se representan los cromosomas con los genes de expresión materna (rojo) y paterna (azul). En verde aparecen los genes cuya expresión está aumentada en los pacientes de GBM, mientras que en naranja aparecen aquellos genes con una expresión disminuida. Los genes improntados que no alteran la expresión con respecto a tejido no tumoral aparecen en gris.

Dadas las alteraciones observadas en la expresión de genes improntados en GBM, se analizó a continuación si el perfil de expresión de estos genes permitía distinguir entre poblaciones tumorales y no tumorales. Con este fin, se examinaron los datos de RNAseq de célula única obtenidos por un estudio previo en el que se analizaba el transcriptoma de poblaciones celulares no tumorales (linfocitos T, macrófagos y oligodendrocitos) y de células de GBM en 28 tumores humanos (Neftel et al., 2019). Estos datos revelaron la enorme heterogeneidad dentro del GBM, describiendo la presencia de hasta cuatro estados celulares dentro del propio tumor: tipo progenitor oligodendrocitario (OPC), tipo astrocitario (AC), tipo mesenquimal (MES) y tipo progenitor neural (NPC) (Neftel et al., 2019). En nuestro estudio también se incluyeron en la comparativa datos de expresión de genes improntados en NSCs adultas humanas descritos previamente (Donega et al., 2019).

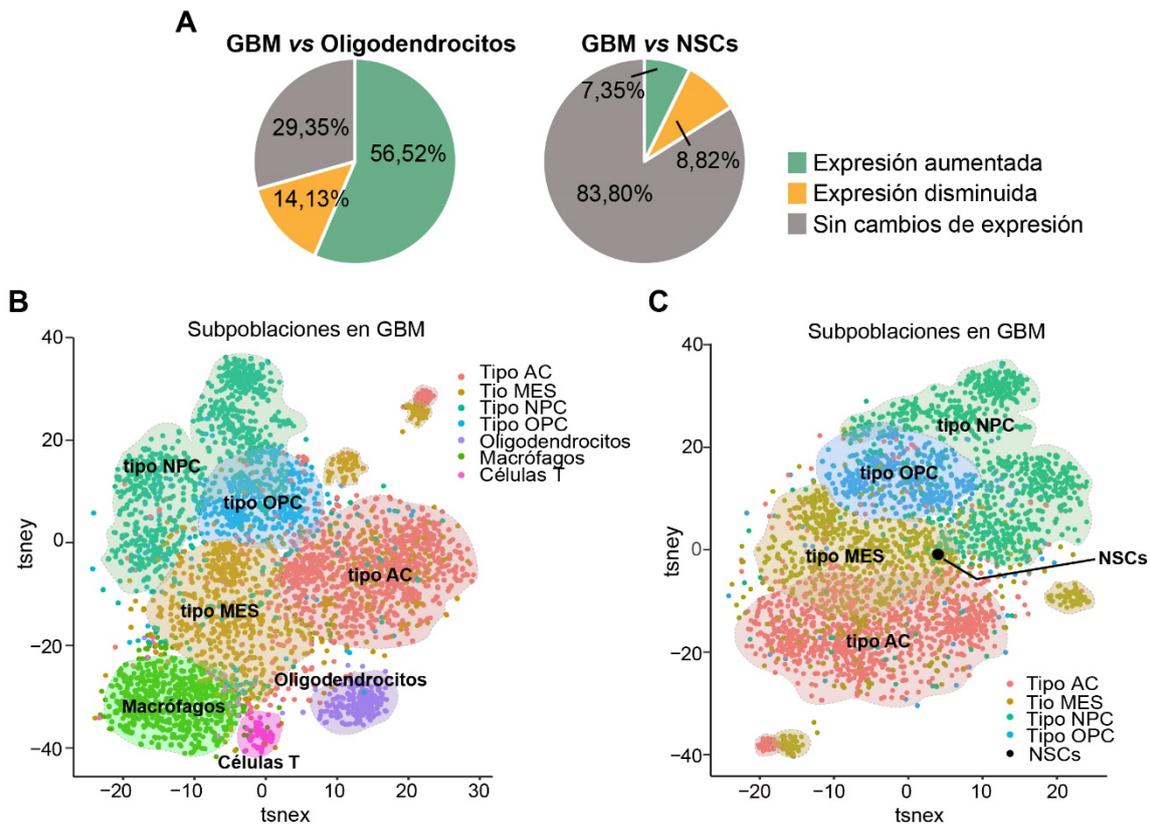


Figura 32. El perfil de expresión de los genes improntados define las subpoblaciones del GBM y las distingue de poblaciones no tumorales. **A)** Porcentaje de genes improntados alterados en GBM con respecto a oligodendrocitos (panel izquierdo) o respecto a NSCs adultas humanas (panel derecho). El porcentaje de genes que aumentan su expresión se ha indicado en verde, y el porcentaje de genes que la disminuyen, en naranja. En gris se muestra el porcentaje de genes que no se ven alterados entre los tipos celulares. Los datos de expresión se han obtenido de los análisis de RNAseq de Neftel C *et al.* 2019 y Donega *et al.* 2019. **B)** Análisis de los datos de RNAseq de célula única (Neftel et al., 2019) donde se muestran los subtipos celulares dentro de los GBM: AC (tipo astrocitario), MES (tipo mesenquimal), NPC (tipo pro-neural) y OPC (tipo oligodendrocitario), y células no tumorales: oligodendrocitos, macrófagos y linfocitos T en función de la expresión de genes improntados a partir de un análisis de reducción dimensional tSNE. **C)** Análisis de reducción dimensional tSNE de los datos de RNAseq de muestras de GBM (Neftel et al., 2019) que incluyen las NSCs adultas humanas (Donega et al., 2019), donde se muestran los subtipos celulares del GBM y las NSCs en función de la expresión de los genes improntados. Un total de 222 genes improntados han sido analizados. Imagen obtenida de Lozano-Ureña y col., 2021. En prensa.

Del total de genes improntados analizados, 92 mostraron una expresión significativa en oligodendrocitos, mientras que 68 de ellos se expresaban en las NSCs. La mayoría de estos genes (70,65%) se encontraban alterados en GBM al ser comparados con oligodendrocitos; sin embargo, únicamente el 16% de genes difería en su expresión con respecto a las NSCs humanas (**Figura 32A**), sugiriendo que las NSCs comparten perfiles de expresión de genes improntados con las células malignas. Basándonos en estos mismos datos (Neftel et al., 2019), se llevó a cabo un análisis de reducción dimensional tSNE teniendo en cuenta únicamente la expresión de los genes improntados presentes en la matriz de expresión, para así determinar si la expresión diferencial de estos genes era capaz de distinguir entre poblaciones celulares tumorales y no tumorales (**Figura 32B**).

Curiosamente, las células no malignas analizadas, linfocitos T, macrófagos y oligodendrocitos, formaron tres *clusters* separados claramente de las células de GBM, que expresaban de forma significativa marcadores, previamente descritos en el estudio, específicos de cada tipo celular (**Figura 32B**) (Nefitel et al., 2019). Este análisis no solo mostró que la expresión combinada de genes improntados era capaz de diferenciar tipos celulares no tumorales frente a tumorales, sino que, además, identificó varias subpoblaciones dentro del propio GBM (**Figura 32B**). De hecho, se obtuvieron *clusters* separados de células que coincidían con cada estado celular, es decir tipo NPC, OPC, MES o AC (**Figura 32B**). Cuando se repitió este análisis de reducción dimensional incluyendo los datos de RNAseq de NSCs adultas humanas (Donega et al., 2019), las células GBM fueron nuevamente separadas en *clusters* de acuerdo con los cuatro estados celulares previamente descritos. En este caso, las NSCs quedaron incluidas dentro de las células malignas (**Figura 32C**). Por tanto, este estudio junto con la alta frecuencia de alteraciones en la impronta genómica y el aumento en la propensión a desarrollar cáncer en los pacientes con síndromes de impronta, enfatiza la importancia de este mecanismo epigenético en el origen y desarrollo del cáncer.

Para determinar si estas alteraciones en la expresión de genes improntados era relevante también en GBM murino, se utilizó un modelo celular generado en el laboratorio de la Dra. Pilar Sánchez Gómez a partir de la inducción de la expresión del gen *Egfr* en NSCs adultas de la SVZ de ratones p16/p19 deficientes (Gargini et al., 2020), denominadas en este trabajo como GBM-EGFR. En primer lugar, se obtuvo la lista de genes improntados descritos en ratón de la base de datos *Geneimprint* (**Figura Suplementaria 2**). A continuación, se estudió la expresión de algunos de estos genes improntados en las líneas GBM-EGFR, utilizando NSCs de ratones WT como control (**Figura 33**). De un total de 26 genes improntados analizados, 13 (50%) presentaron una expresión alterada con respecto a NSCs adultas (**Figura 33**). De todos ellos, el 38,46% mostró una disminución de sus niveles de expresión en la línea GBM-EGFR, mientras que únicamente el 11,54% de los genes improntados analizados aumentaron su expresión con respecto a las NSCs (**Figura 33**). Estos resultados confirman que la adquisición de un fenotipo tumoral puede conllevar cambios significativos en la expresión de los genes improntados también en NSCs murinas.

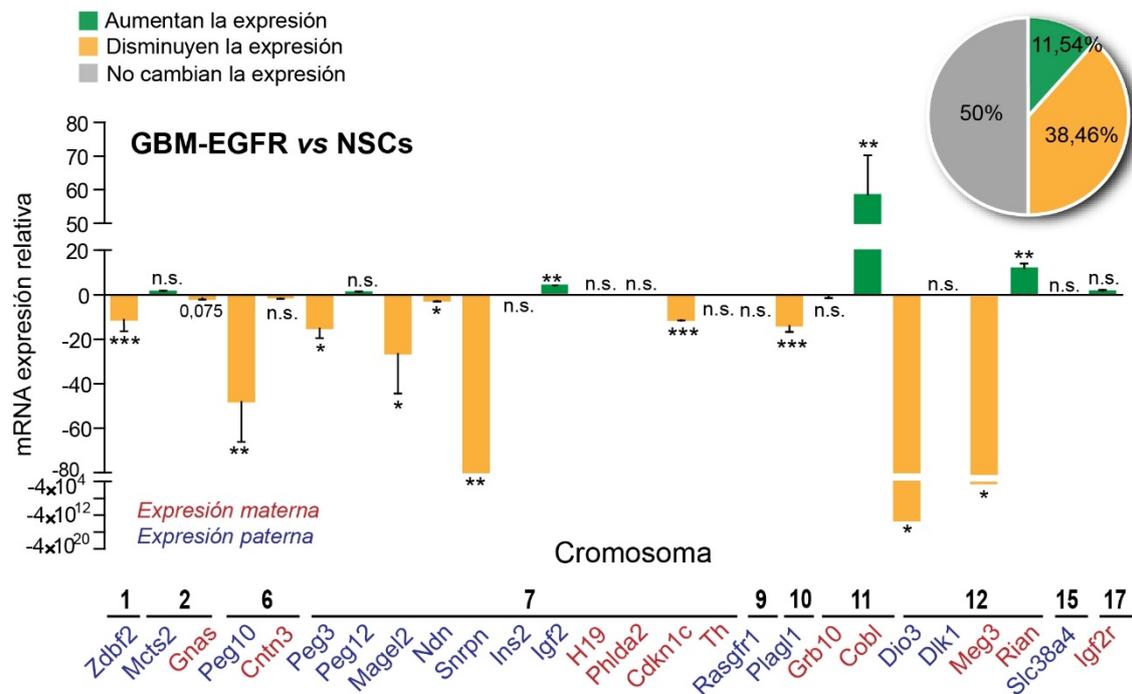


Figura 33. La expresión de genes improntados se ve alterada en GBM. Comparativa de la expresión de genes improntados en GBM-EGFR con respecto a las NSCs control. En verde se han marcado los genes improntados que aumentan su expresión en la línea tumoral, mientras que en naranja aparecen aquellos que disminuyen su expresión respecto a las NSCs. Los genes improntados analizados aparecen en orden según su localización cromosómica, que también ha sido indicada. El porcentaje de genes improntados cuya expresión cambia en la línea GBM-EGFR con respecto a las NSCs control también ha sido indicado. Las barras de error muestran el s.e.m. de tres cultivos. Los p-valores corresponden a: ***<0,001, **<0,01, *<0,05, n.s.: no significativo estadísticamente.

2.2. El proceso de impronta genómica se ve alterado durante la formación de tumores cerebrales

Muchos son los estudios llevados a cabo para desvelar las claves que conducen a la formación del cáncer más agresivo del cerebro, el GBM. Para ello, se han desarrollado múltiples modelos murinos que recapitulan los efectos que produce esta patología en humanos y se basan en la mutación de diversos genes que se encuentran alterados comúnmente en este tipo de cáncer (Sampetean and Saya, 2018). Aun así, la formación de tumores cerebrales resulta infrecuente en ratón (Miyai et al., 2017; Neftel et al., 2019; Sampetean and Saya, 2018). Debido a ello, una estrategia alternativa usualmente utilizada es el trasplante de células de GBM, ya sean humanas o murinas, en el cerebro de animales inmunocomprometidos (Miyai et al., 2017; Sampetean and Saya, 2018). Aunque eficiente, esta estrategia impide estudiar los eventos tempranos que conducen a la transformación maligna *in vivo*.

2.2.1 La reprogramación *in vivo* de animales GFAP-rtTA;i4F induce la formación de tumores cerebrales

En este estudio hemos utilizado dos modelos murinos de formación de tumores *in vivo* basados en la reprogramación inducida en el cerebro. El primer modelo utilizado fue el ratón reprogramable i4F-B que, como se ha comentado, expresa de forma inducible por doxiciclina el transgén OSKM en todas las células del organismo debido a la localización del cDNA de rtTA en el locus de expresión ubicua *Rosa26* (Figura 34A; Figura 1 MM). Para la inducción de la formación de tumores se llevó a cabo la activación del casete OSKM mediante el tratamiento con 0,2 mg/ml de doxiciclina en el agua de beber durante 2,5 semanas, tal como había sido descrito (Abad et al., 2013) (Figura 34A). Para controlar la cantidad de antibiótico consumido, se comprobó la ingesta de agua y el peso de los animales, tratados cada dos días durante la duración del tratamiento (Figura 34B). Este seguimiento mostró un menor consumo de agua en los animales i4F-B tratados (Figura 34B) lo cual dio lugar a la consiguiente pérdida continua de peso en los animales reprogramables respecto a ratones control con o sin tratamiento, o respecto a animales i4F-B sin tratar (Figura 34B).

Con el fin de comprobar el efecto de la reprogramación inducida tras el tratamiento, se estudió el aspecto de órganos como el estómago, el bazo, el ciego del intestino y el cerebro de los animales tratados (Figura 34C). Mientras que el cerebro no mostró cambios en el tamaño ni aspecto entre los ratones i4F-B y WT, tanto el estómago como el bazo y el ciego presentaron una displasia hipertrófica en los ratones i4F-B con respecto a los controles a los 11-14 días después de la retirada de la doxiciclina (Figura 34C), como ya se había descrito previamente (Abad et al., 2013). Un análisis de la expresión del transgén *OSKM* en diferentes tejidos, incluyendo la SVZ, justo después de la retirada de tratamiento, mostró la expresión del transgén en los diferentes tejidos estudiados en los ratones i4F-B, sin expresión significativa en los ratones control (Figura 34D), indicando que la doxiciclina era capaz de alcanzar los distintos órganos, incluido el cerebro, como ya ha sido descrito anteriormente (Das et al., 2016; Mansuy et al., 1998), e inducir la expresión de los factores de reprogramación. No obstante, cabe destacar que los niveles de expresión en la SVZ fueron inferiores con respecto al resto de tejidos analizados (Figura 34D). Consistentemente, la expresión del gen *Oct4* se vio aumentada en distintos órganos de los animales i4F-B, si bien este aumento también fue menor en la SVZ (Figura 34E). Aunque los resultados indican que la doxiciclina es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, como ya se había reportado previamente en otros estudios (Abad et al., 2013; Das et al., 2016; Mansuy et al., 1998; Rodríguez-Matellán et al., 2020), los menores niveles de expresión del transgén en el



cerebro, y especialmente en la SVZ, sugería que este modelo de inducción pudiera ser menos eficiente en el cerebro que en otros órganos.

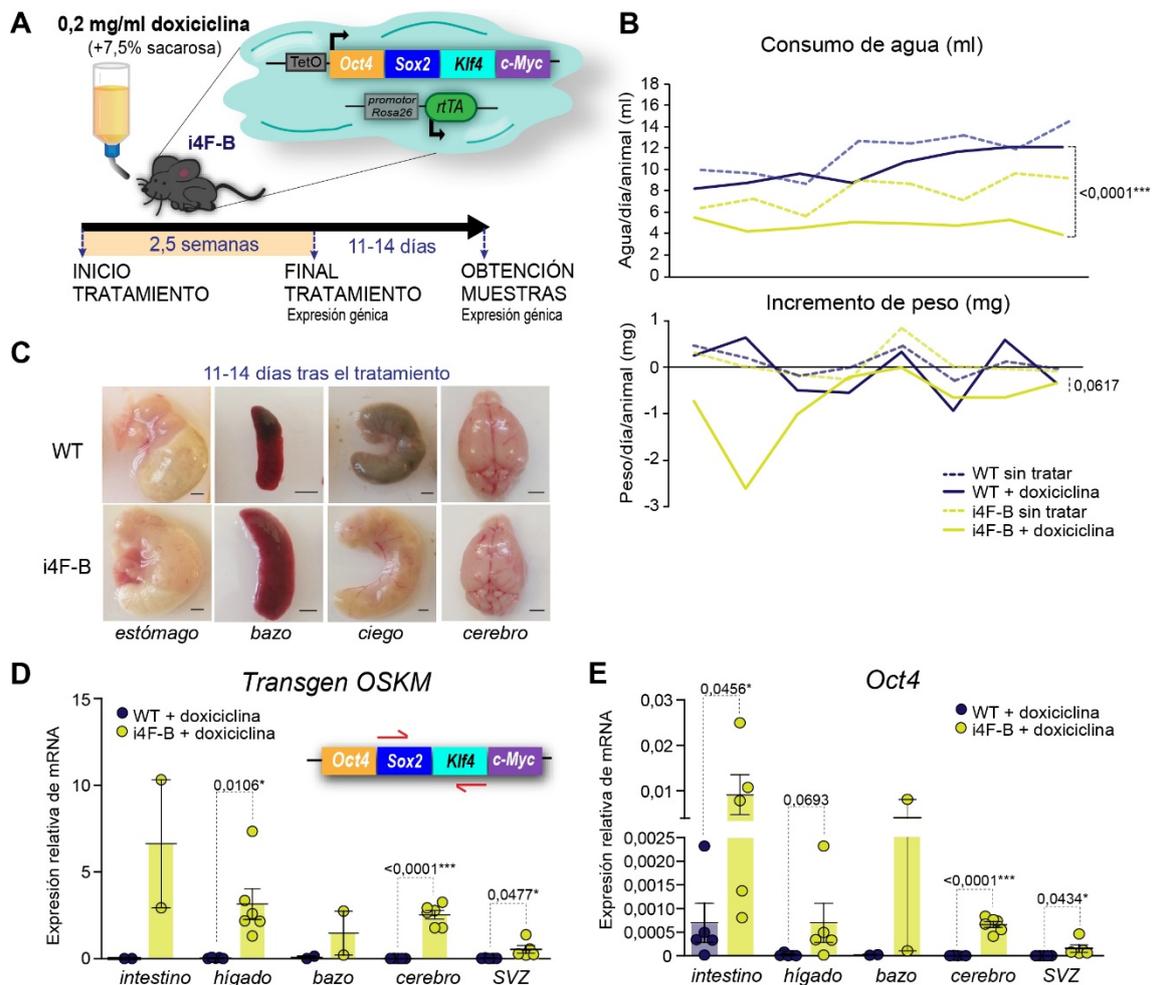
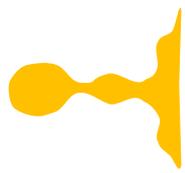


Figura 34. Los ratones i4F-B portadores del transgén OSKM activan su expresión tras el tratamiento con doxiciclina. **A)** Esquema del protocolo seguido para la reprogramación *in vivo* de ratones i4F-B mediante el tratamiento con 0,2 mg/ml de doxiciclina en el agua durante 2,5 semanas. **B)** Registro del volumen de agua (en ml) bebido por los animales control o WT (azul) tratados y sin tratar con doxiciclina, y de los animales i4F-B (amarillo) tratados y sin tratar con la doxiciclina, medido por día y ratón (gráfica superior). Registro del incremento de peso (en mg) de los animales control e i4F-B tratados y sin tratar, medido por día y ratón (gráfica inferior). **C)** Imágenes del estómago, bazo, ciego y cerebro de animales reprogramables i4F-B y animales control tras 11-14 días después de la finalización del tratamiento con doxiciclina. **D)** Expresión del transgén OSKM mediante qPCR en diferentes tejidos de animales control (azul) e i4F-B (amarillo) tras las 2,5 semanas de tratamiento. La región amplificada en la PCR se encuentra indicada, así como la localización de la unión de las sondas utilizadas para dicha amplificación (flechas rojas). **E)** Expresión de Oct4 mediante qPCR en diferentes tejidos de animales control (azul) e i4F-B (amarillo) tras 2,5 semanas de tratamiento. El gen *Gapdh* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. El número de muestras y los p-valores aparecen indicados en la figura. Las barras de error muestran el s.e.m. Barras de escala en C: 2 mm.

Para comprobar si la reprogramación había tenido lugar, se analizó la expresión de genes asociados a pluripotencia como *Nanog* y *Rex1* unos días después de la retirada del tratamiento en dos ratones i4F-B y sus controles (**Figura 35A**). Se observó la expresión de ambos genes en el bazo e intestino donde se encontraron, además, varios tumores (**Figura 35A**), tal y como ya



El activador rtTA que permite la expresión del transgén en el modelo i4F-B está situado en el locus *Rosa26*, de expresión ubicua (Abad et al., 2013), aunque está en debate si el promotor endógeno del locus *Rosa26* puede dirigir la activación transgénica condicional en todos los tejidos de ratones adultos de forma eficiente (Wortge et al., 2010). Por ello, se llevó a cabo el análisis de expresión endógena del gen *Rosa26* en diferentes regiones del cerebro utilizando el hígado como órgano control (**Figura 35C**). Tanto el cerebro como las distintas regiones cerebrales ensayadas, incluyendo la SVZ, mostraron niveles de expresión similares a los del hígado (**Figura 35C**). Estos resultados indican que el rtTA puede estar expresándose a los mismos niveles que en otros tejidos pero que dicha expresión no parece ser suficiente para inducir la expresión de genes de pluripotencia y por tanto promover la reprogramación de células cerebrales como lo hace en otros órganos. Por ello, el modelo i4F-B no resultó ser eficiente para el estudio de la formación de tumores en cerebro.

Aunque la aparente resistencia del tejido cerebral a la reprogramación en los ratones i4F-B sugería que igual serían necesarios tiempos más largos tras la inducción, el descenso en supervivencia de los animales inducidos no nos permitía alargar dichos tiempos y, por ello, decidimos utilizar un modelo genético que se basase en la expresión del activador rtTA solo en astrocitos y NSCs, utilizando una cepa en la que dicha expresión está controlada por el promotor del gen humano *GFAP* (Ransohoff R, 2010). A fin de obtener el modelo reprogramable específico, se cruzaron los ratones Tg(*GFAP-rtTA*) con otra línea de ratones reprogramables, los i4F-A, que portan el casete tetracistrónico insertado en el gen *Neto2*, en un cromosoma diferente al del gen *Rosa26*. Mediante los cruces correspondientes generamos ratones *GFAP-rtTA;i4F* y ratones control, sin el transactivador (i4F), para su inducción con doxiciclina y análisis.

Debido a la especificidad de la reprogramación en el cerebro, el tratamiento con doxiciclina en el agua de beber pudo realizarse en el modelo *GFAP-rtTA;i4F* con una concentración y duración mayor a la utilizada en el modelo i4F-B. En este caso, los animales fueron tratados con 1 mg/ml de doxiciclina durante 4 semanas. Transcurrido dicho tiempo, la doxiciclina fue retirada y se esperó un mes para la observación y análisis de los cerebros (**Figura 36A**). En este caso, ni el consumo de agua ni el incremento de peso se vieron afectados en los animales *GFAP-rtTA;i4F* con respecto a los animales control i4F (**Figura 36B**). Cuando se extrajeron los cerebros para su análisis, se detectaron múltiples zonas con hemorragias visibles en fresco (**Figura 36C**). Además, la eficiencia de la reprogramación y formación de tumores mediante el tratamiento con doxiciclina en animales *GFAP-rtTA;i4F* fue del 100%, es decir que los cerebros de todos los animales tratados mostraron la presencia de masas tumorales. La detección por qPCR del casete

mostró expresión específica en el cerebro de los animales GFAP-rtTA;i4F, no obteniéndose expresión en el hígado de estos animales ni en los animales control (Figura 36D). Además, se observó un aumento en la expresión de los genes de pluripotencia *Oct4* y *Nanog* (Figura 36E), confirmando la presencia de procesos de reprogramación en el cerebro de estos animales.

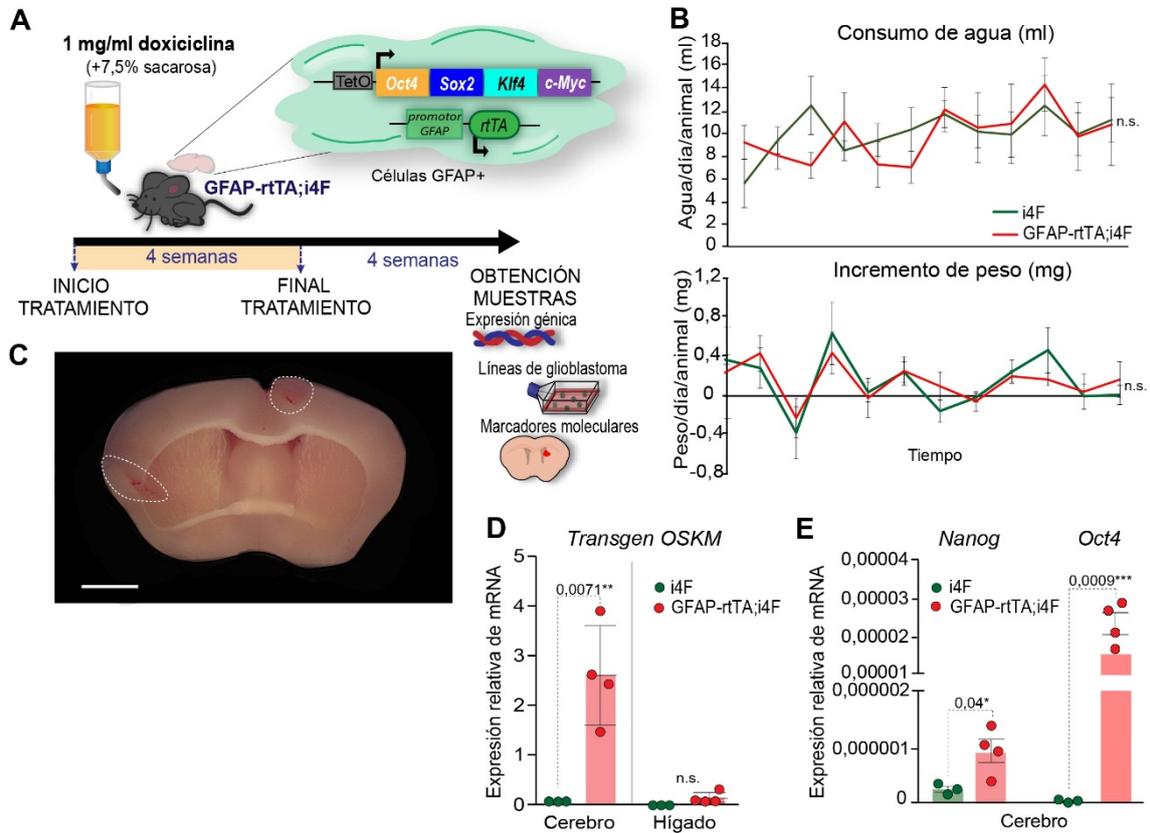


Figura 36. El cerebro de ratones GFAP-rtTA;i4F se reprograma tras el tratamiento con doxiciclina. A) Esquema del protocolo seguido para la reprogramación específica en el cerebro de los animales GFAP-rtTA;i4F que contienen el transgén OSKM en el locus *Neto2* y el activador transcripcional rtTA bajo el promotor del gen *GFAP*. El tratamiento con 1 mg/ml de doxiciclina en el agua de beber duró 4 semanas y se esperaron 4 semanas más para el análisis de los cerebros en los animales tratados. **B)** Registro del volumen de agua (en ml) bebido por los animales control i4F (verde) y de los animales GFAP-rtTA;i4F (rojo), tratados con doxiciclina y medido por día y ratón (panel superior). Registro del incremento de peso (mg) de ratones control i4F (verde) y ratones GFAP-rtTA;i4F (rojo) tratados, medido por día y ratón (panel inferior). **C)** Imagen coronal del cerebro de un animal GFAP-rtTA;i4F en el que se observan regiones con hemorragia. **D)** qPCR para el transgén *OSKM*, tras las 4 semanas de tratamiento con doxiciclina y 4 semanas más de espera para la obtención de las muestras, en cerebro e hígado de ratones control i4F-A (verde) y ratones GFAP-rtTA;i4F (rojo). El gen *Gapdh* se utilizó para normalizar los datos de expresión. **E)** qPCR para *Oct4* y *Nanog* en cerebro de ratones control i4F (verde) y ratones GFAP-rtTA;i4F (rojo) tratados con doxiciclina. El gen *18S* se utilizó para normalizar los datos de expresión. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos 3 animales por genotipo. El número de muestras y los p-valores aparecen indicados en la figura. Barra de escala en C: 1 mm. n.s: no significativo estadísticamente.

Con el fin de determinar si la reprogramación observada en los animales GFAP-rtTA;i4F daba lugar a la formación de tumores en el cerebro y analizar las características de éstos, los animales fueron perfundidos y los cerebros cortados coronalmente para su estudio. Durante la obtención de estos cortes se detectaron masas celulares anormales con una mayor densidad



celular bajo la lupa, que mostraron características tumorales tras tinción con hematoxilina-eosina (**Figura 37A, B**) (Martino et al., 2020). Estas masas tumorales presentaron una tinción más densa para el colorante y fueron encontradas a lo largo del eje antero-posterior de los cerebros de los animales GFAP-rtTA;i4F, desde el OB hasta el cerebelo, pero nunca en los ratones i4F que no portaban el transactivador (**Figura 37A-C, Figura Suplementaria 3 y 4**).

Con el objetivo de caracterizar molecularmente los tumores sólidos extraídos de ratones GFAP-rtTA;i4F, se estudió el perfil de expresión génica de distintos marcadores por qPCR utilizando como control un fragmento de tejido de la misma región diseccionada de animales i4F (**Figura 38**). La expresión de *Oct4* en 22 muestras tumorales obtenidas de cerebros de animales reprogramados mostró un aumento de 2.500 veces con respecto a los animales control (**Figura 38A-C**). Curiosamente, las muestras correspondientes a las regiones más rostrales (OB, RMS y corteza rostral) presentaron un mayor aumento de la expresión de *Oct4* (**Figura 38C**). Con el fin de determinar el estado completo de reprogramación celular, la expresión de *Nanog* también fue analizada en estas muestras, pero en este caso los resultados mostraron mucha variabilidad entre muestras (**Figura 38C y 39**). También, se analizó la expresión de genes asociados a la diferenciación en las tres capas embrionarias, tales como el gen *Nestina* asociado a ectodermo, el gen *Kdr* asociado a mesodermo y el gen *Afp* asociado a endodermo. La expresión de *Nestina*, que además ha sido asociado a GBM (Jin et al., 2013; Ludwig and Kornblum, 2017), mostró 15 de las 22 muestras analizadas con una mayor expresión de *Nestina* con respecto a la expresión en las mismas regiones control (**Figura 38C y 39**). La expresión del gen *Kdr* presentó un aumento en 7 de los tumores (muestras 1, 9, 10, 11, 14, 17 y 22) en comparación a sus regiones control (**Figura 38C y 39**). Por otro lado, la expresión de *Afp* apareció aumentada en las muestras 4, 5, 11, 13, 17 y 20 (**Figura 38C y 39**).

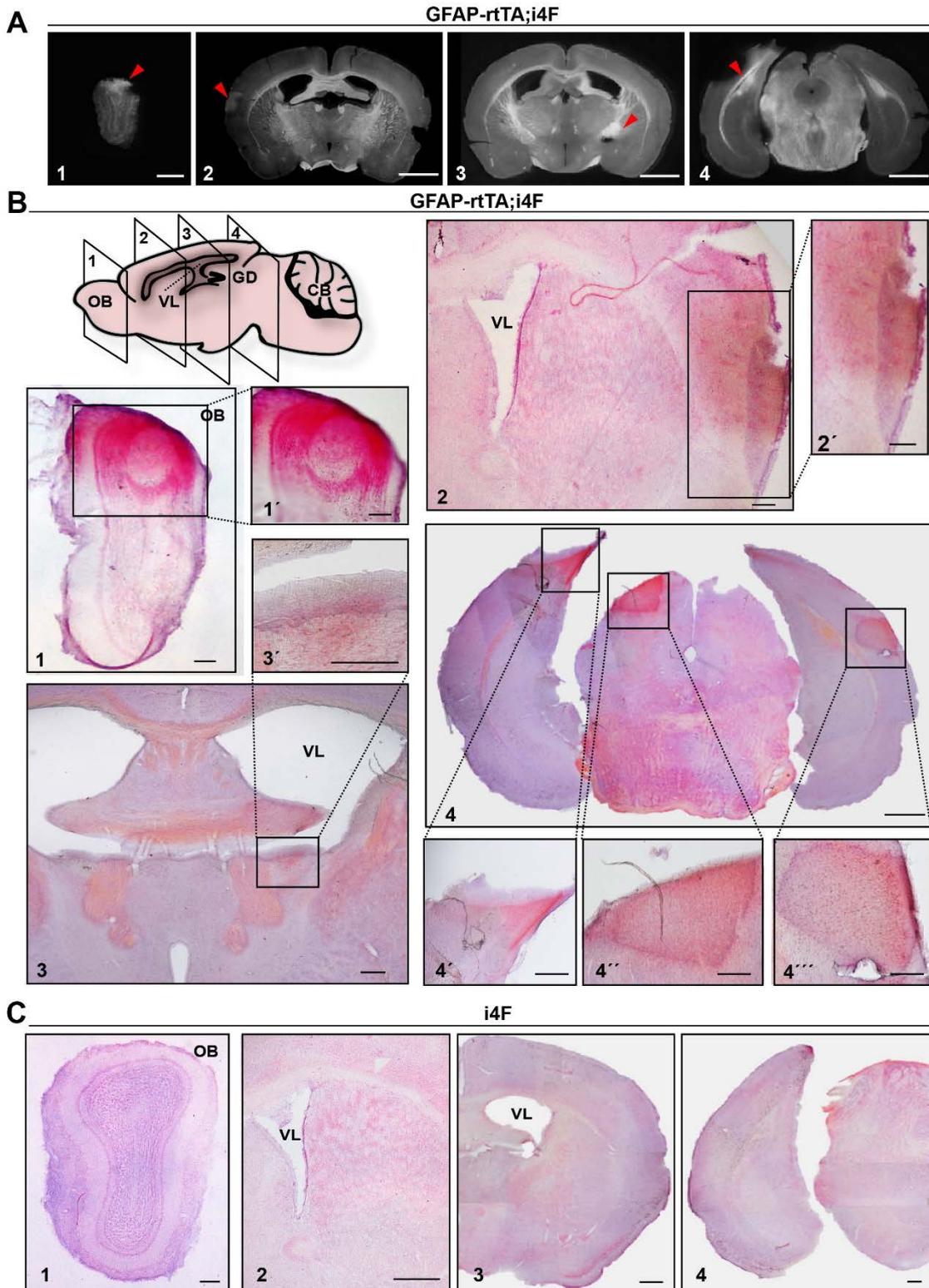


Figura 37. Tumores en ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados con doxiciclina *in vivo*. **A)** Imágenes de cortes histológicos en lupa a lo largo del eje antero-posterior de animales GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina. Las masas tumorales aparecen indicadas con cabezas de flecha rojas. **B)** Imágenes de cortes coronales teñidos con hematoxilina-eosina de ratones GFAP-rtTA;i4F tratados. La ubicación de los cortes a lo largo del eje antero-posterior del cerebro aparece representada. Las regiones tumorales teñidas aparecen amplificadas (1', 2', 3', 4', 4'', 4'''). **C)** Imágenes de cortes coronales a lo largo del eje antero-posterior del cerebro de ratones control teñidos con hematoxilina-eosina. VL: ventrículo lateral. Barras de escala en A: 1 mm; en B: 200 μ m en 1 y 4'-4''', 100 μ m en 2 y 3, 500 μ m en 4; en C: 200 μ m.

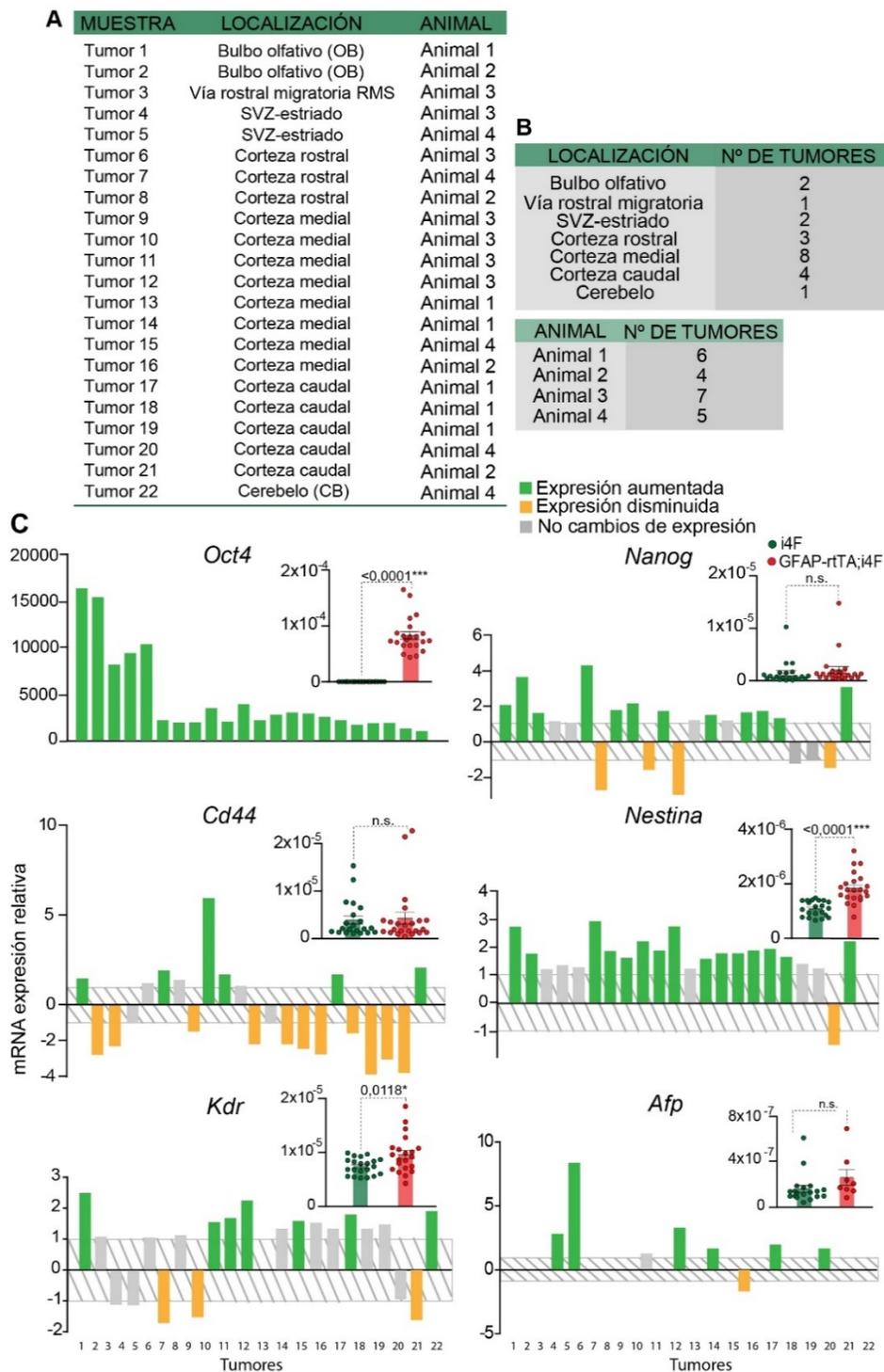


Figura 38. Tumores sólidos en animales reprogramables GFAP-rtTA;i4F expresan marcadores tumorales y de reprogramación. A) Localización y animal donde se han encontrado tumores sólidos. **B)** Número de tumores encontrados por animal y por región cerebral. **C)** Expresión relativa mediante qPCR de los genes de pluripotencia *Oct4* y *Nanog*, de los genes de GBM *Cd44* y *Nestina* en las 22 muestras tumorales extraídas de animales GFAP-rtTA;i4F. Los marcadores de mesodermo *Kdr* y de endodermo *Afp* también se incluyen. El estudio se realizó respecto a las mismas regiones cerebrales de animales control i4F. El aumento de expresión se muestra en verde, mientras que la disminución aparece en naranja. Aquellas muestras cuyos niveles de expresión fueron similares a las muestras control se han indicado en gris. Las gráficas con la expresión media relativa de mRNA de las muestras control i4F (verde) y GFAP-rtTA;i4F (rojo) también se incluyen. El gen *18S* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. Las barras de error muestran el número de muestras analizadas y el s.e.m. Los p-valores han sido indicados; n.s: no significativo estadísticamente.

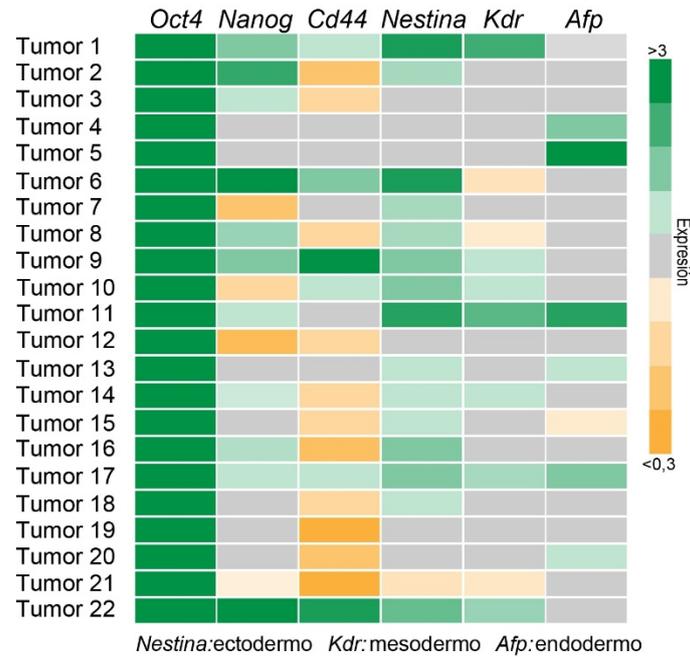
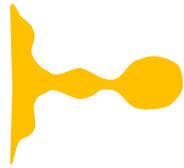
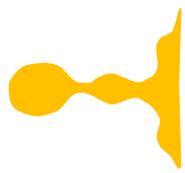


Figura 39. Resumen de la expresión génica en tumores de animales reprogramables GFAP-rtTA;i4F. Tabla resumen con el análisis de expresión de las 22 muestras tumorales obtenidas de ratones GFAP-rtTA;i4F-A reprogramados con doxiciclina para los genes *Oct4*, *Nanog*, *Cd44*, *Nestina*, *Kdr* y *Afp* en relación a animales control i4F. El aumento de expresión ha sido indicado en verde, mientras que la disminución aparece en naranja. La expresión de los genes que no se encuentra alterada en las muestras aparece en gris. El orden se basa en la localización de la muestra en el eje antero-posterior del cerebro.

A continuación, se estudió la expresión de los genes *Cd44*, asociado a tumores tipo GBM (Figura 38C). Niveles altos de CD44 se han correlacionado con un mayor potencial de desarrollar tumores *in vivo* (Anido et al., 2010) y ha sido asociado al subtipo de GBM más agresivo, al subtipo denominado mesenquimal (Brown et al., 2017; Mooney et al., 2016; Wang et al., 2018a). Varios de los tumores encontrados mostraron una expresión mayor del gen *Cd44* que en las muestras control, concretamente los tumores 1, 6, 9, 10, 17 y 22 (Figura 38C y 39).

Con el fin de analizar en más detalle la naturaleza de los tumores formados tras la reprogramación de los animales GFAP-rtTA;i4F, se realizaron estudios mediante IHC de una variedad de los marcadores tumorales descritos anteriormente. Este análisis permitió distinguir al menos dos tipos de tumores formados en los ratones GFAP-rtTA;i4F: tumores con un fenotipo de *glioblastoma* (Figura 40) y los de fenotipo *teratoma* (Figuras 42) en función de la presencia o no de marcadores de GBM. En primer lugar, la adquisición de un estado de pluripotencia en células de los cerebros reprogramables fue observada mediante el marcador SSEA1, que también ha sido descrito como marcador de GSCs (Son et al., 2009). La IHC para este marcador mostró la presencia de células SSEA1+ en las masas tumorales de los animales GFAP-rtTA;i4F, pero no en los animales control i4F, tratados con doxiciclina (Figuras 40, 41 y 42, Figura Suplementaria 5), confirmando así, la efectividad del protocolo de reprogramación *in vivo*. A continuación, se realizó



el estudio de expresión de Integrina $\alpha 6$, molécula implicada en la capacidad de auto-renovación y formación de tumores de las GSCs (Corsini and Martin-Villalba, 2010; Delamarre et al., 2009; Lathia et al., 2010). La detección de este marcador reveló que se restringía a zonas altamente vascularizadas, donde se encontraban las células SSEA1 positivas (**Figura 40A, Figura Suplementaria 5**).

También se analizó la presencia del marcador tumoral CD44. Los estudios de expresión de esta proteína revelaron su presencia en los cerebros de animales reprogramables (**Figura 40A, Figura Suplementaria 6**) sugiriendo la formación de tumores de tipo GBM de fenotipo mesenquimal. Algunas de estas células CD44 positivas mostraron ser también positivas para el marcador de proliferación Ki67 (**Figura 40A**), pudiendo ser responsables, por tanto, del crecimiento del tumor. Debido a que el modelo se basa en la reprogramación de células GFAP, y que precisamente este marcador también se ha asociado a algunos GBM (Goyal et al., 2015; Ludwig and Kornblum, 2017) se llevó a cabo la detección de la proteína GFAP en el tejido (**Figura 39**). Curiosamente, las células positivas para el marcador tumoral CD44 no co-localizaron con células GFAP positivas (**Figura 40A**).

La presencia de la proteína VIMENTINA también fue estudiada. Esta molécula está asociada a filamentos intermedios, se expresa de forma ubicua en células mesenquimales y ha sido descrita en la migración de diferentes tipos de cáncer incluyendo el GBM (Nowicki et al., 2019; Satelli and Li, 2011; Zhao et al., 2016). En el estudio, se encontraron células doblemente marcadas para CD44 y VIMENTINA (**Figura 40A**).

Para finalmente confirmar la presencia de tumores de tipo GBM en los cerebros reprogramables, se estudió la expresión de NESTINA (**Figura 40A**), marcador de NSC que también ha sido descrito en GBM y asociado a mal pronóstico en los pacientes (Ludwig and Kornblum, 2017; Wang et al., 2018a). Curiosamente, en los animales GFAP-rtTA;i4F se observaron células positivas para NESTINA agrupadas en regiones muy concretas del cerebro, como la SVZ, el parénquima estriatal o la corteza (**Figura 40A, Figura Suplementaria 5**). La morfología de las células positivas para el marcador NESTINA y VIMENTINA en tumores de la SVZ fue completamente distinta a las NSCs y progenitores que se encuentran normalmente en la SVZ de ratones control (**Figura 40A y 41A**). Mientras que en la SVZ se encuentran prolongaciones marcadas para NESTINA y VIMENTINA alrededor de los ventrículos (**Figura 41A**), en los tumores de los animales reprogramables, estos marcadores aparecieron en células aisladas y con una morfología fusiforme o redonda sin prolongaciones (**Figura 40A, Figura Suplementaria 5**). Además,



control (**Figura 41A**). Estos marcadores de GBM también fueron encontrados en otras regiones además de la SVZ-estriado (**Figura 40A**), como corteza u OB, mientras que no se observaron células positivas para SSEA1, Integrina 6 α , CD44, NESTINA o VIMENTINA en cerebros de ratones i4F tratados con doxiciclina (**Figura 41A**). En estos tumores tampoco se observaron células NANOG positivas (**Figura 40A y 42C**). Finalmente se llevó a cabo la IHC para OLIG2 (**Figura 41B**), asociado a un fenotipo más pro-neural del GBM, y también a oligodendrogliomas (Okada et al., 2011; Yokoo et al., 2004). Esta detección no mostró cambios en la expresión de Olig2 en el tejido de animales reprogramables respecto a sus controles (**Figura 41B**).

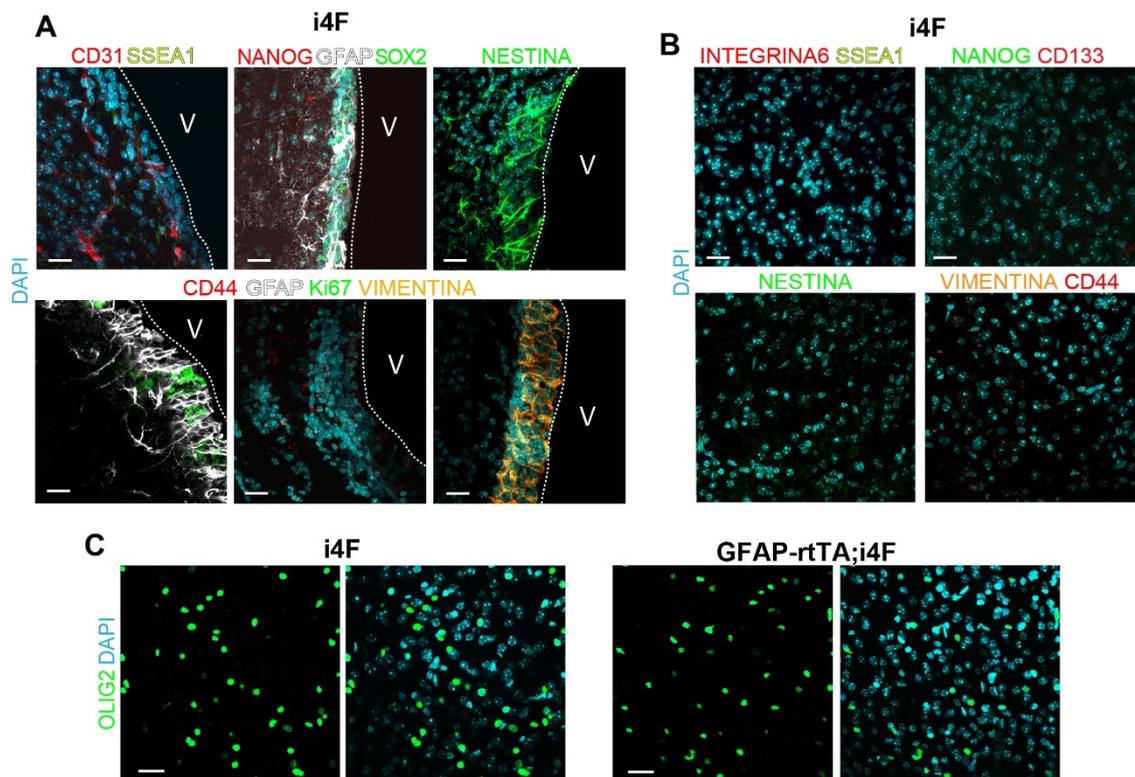


Figura 41. Los animales control no expresan marcadores tumorales asociados a GBM. A) IHC para marcadores de pluripotencia y de GSCs glioblastoma en SVZ (panel izquierdo) y corteza (panel derecho) en cortes coronales de animales i4F. **B)** IHC para OLIG2 en cortes coronales en el estriado de animales i4F y GFAP-rtTA;i4F. El DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Las barras de escala: 25 μ m. V: ventrículo lateral.

Junto con los tumores que expresaban marcadores asociados al GBM, también se detectaron masas tumorales que no presentaron ninguno de los marcadores estudiados excepto SSEA1 (**Figura 42A-D**). Estos tumores se encontraron en distintas regiones del cerebro (**Figura 37A**), presentaban un tamaño mayor y una alta densidad de vasos sanguíneos CD31 positivos (**Figura 42C**), y tampoco expresaban el marcador astrocitario GFAP (**Figura 42C, D**). Aunque tampoco se detectaron células positivas para NANOG en estas masas tumorales (**Figura 42C**), estos tumores los clasificamos como de fenotipo tipo teratoma.

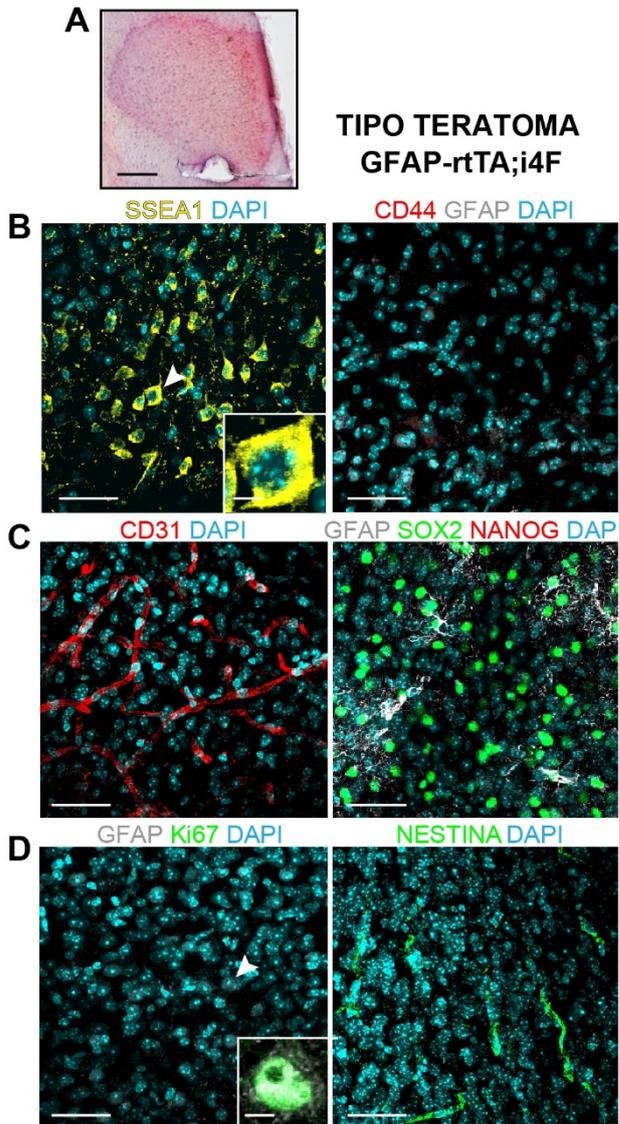


Figura 42. Los animales GFAP-rtTA;i4F presentan tumores tipo teratoma. **A)** Teratoma detectado mediante tinción con hematoxilina y eosina en un corte coronal de un cerebro GFAP-rtTA;i4F tras la reprogramación con doxiciclina durante 4 semanas. **B)** IHC para el marcador de pluripotencia temprano SSEA1 (panel izquierdo), y CD44 (rojo) y GFAP (gris) (panel derecho) en masas tumorales de animales GFAP-rtTA;i4F. Los tumores de tipo teratoma presentan el marcador SSEA1, pero no CD44 ni GFAP. **C)** IHC para el marcador de vasos sanguíneos CD31 (panel izquierdo); y GFAP (gris), SOX2 (verde) y NANOG (rojo) en ratones GFAP-rtTA;i4F. **D)** IHC para GFAP y Ki67 (panel izquierdo), y NESTINA (panel derecho) en estos mismos ratones. El DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Las cabezas de flecha indican las células a mayor magnificación. Barras de error en A: 200 μm ; en B-D: 50 μm (ampliaciones: 5 μm).

Como se ha mostrado anteriormente, los tumores fueron encontrados en distintas regiones del cerebro, incluyendo la SVZ. Precisamente, uno de estos tumores mostró células tumorales positivas para CD44 localizadas a lo largo de toda la SVZ y que descendían hasta el estriado donde se observaba la masa celular tumoral (**Figura 43**). Este tumor situado cerca de la SVZ mostró células positivas también para Nestina y SSEA1 que se desplazaban ventralmente al estriado (**Figura 43**), sugiriendo una posible migración de las células tumorales procedentes del nicho neurogénico hacia esas zonas, como ya fue observado previamente (Lee et al., 2019).

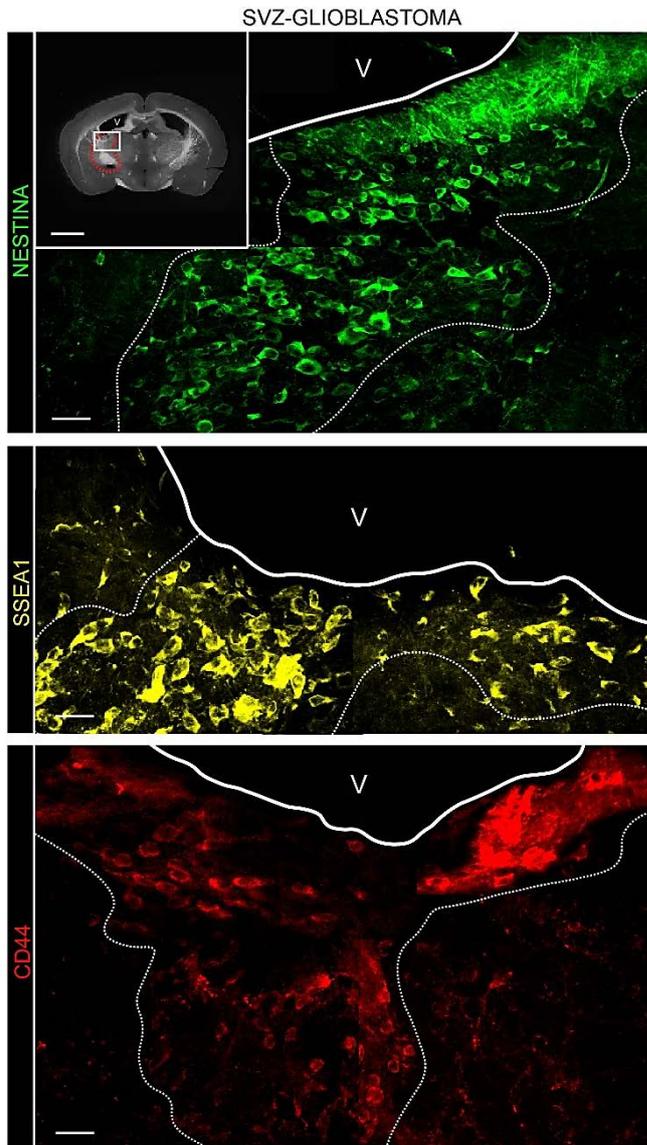


Figura 43. Los tumores formados a partir de la reprogramación de animales GFAP-rtTA;i4F podrían tener origen en las SVZ y migrar para formar el tumor. El tumor detectado en el estriado (rodeado en rojo) de uno de los animales reprogramados con doxiciclina mostró células NESTINA (verde), SSEA1 (amarillo) y CD44 (rojo) positivas que parecían migrar desde la SVZ hasta la masa tumoral detectada en la región cerebral del estriado, sugiriendo una posible migración desde la zona neurogénica. Barras de escala: 20 μ m (corte coronal completo: 1mm).

Para investigar en más detalle la naturaleza de los tumores formados y el papel de los genes improntados en la reprogramación de los animales GFAP-rtTA;i4F, se llevó a cabo el aislamiento y cultivo de células a partir de los cerebros inducidos de animales reprogramables. Para ello, se disgregaron los cerebros completos de dichos animales y se sembraron las células en medio GBM para permitir el crecimiento de las células malignas (Figura 44A). NSCs aisladas de la SVZ fueron usadas como control. Los cultivos de disociados de cerebros GFAP-rtTA;i4F crecieron en forma de esferas aunque mostraron diferencias morfológicas y de comportamiento con respecto a las NSCs control, tales como la adhesión a la placa (Figura 44B). Además, las células GFAP-rtTA;i4F mostraron una mayor tendencia de formación de esferas (Figura 44B) y de proliferación, reflejada en la proporción de células positivas para Ki67 y para la incorporación de EdU, aunque éstas no resultaron estadísticamente significativas (Figura 44C).

Para comprobar la presencia de células tumorales en los cultivos GFAP-rtTA;i4F, se analizaron los marcadores SSEA1 y CD44 por citometría de flujo, estrategia utilizada previamente para el aislamiento y caracterización de las GSCs (Ghuwalewala et al., 2016; Pollard et al., 2009; Wang et al., 2018b). Como control positivo de células malignas se utilizaron las células GBM-EGFR descritas en el apartado anterior. Como control negativo se utilizaron NSCs de animales WT. En primer lugar, las células GBM-EGFR pudieron ser diferenciadas por citometría de las NSCs y de los cultivos tumorales por la presencia de la proteína GFP contenida en las células de GBM (**Figura 44D**). Además, los parámetros de complejidad y tamaño también permitieron diferenciar los distintos tipos celulares (**Figura 44E**). El análisis mostró que tanto las NSCs control como las células de ratones GFAP-rtTA;i4F, expresaban el marcador de membrana CD44 casi en la totalidad de las células y con una intensidad similar (**Figura 44E, F**). A pesar de que el porcentaje de células positivas para este marcador en las células GBM-EGFR no fue significativamente diferente a las NSCs control y cultivos de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F (**Figura 44E**), la intensidad del marcaje de CD44 mostró ser mayor en las GBM-EGFR (**Figura 44F**). Tampoco el marcador SSEA1 mostró diferencias en el porcentaje de células positivas entre las NSCs control y los cultivos GFAP-rtTA;i4F, siendo en ambos casos menor que el porcentaje en las GBM-EGFR (**Figura 44E**). Además, la intensidad del marcaje de SSEA1 fue mayor en las GBM-EGFR con respecto a las NSCs control y las células GFAP-rtTA;i4F (**Figura 44F**). Estos resultados muestran que las líneas generadas a partir de animales reprogramados, aunque muestran características de crecimiento distintas a las NSCs control, no difieren en la expresión de los marcadores tumorales CD44 y SSEA1.

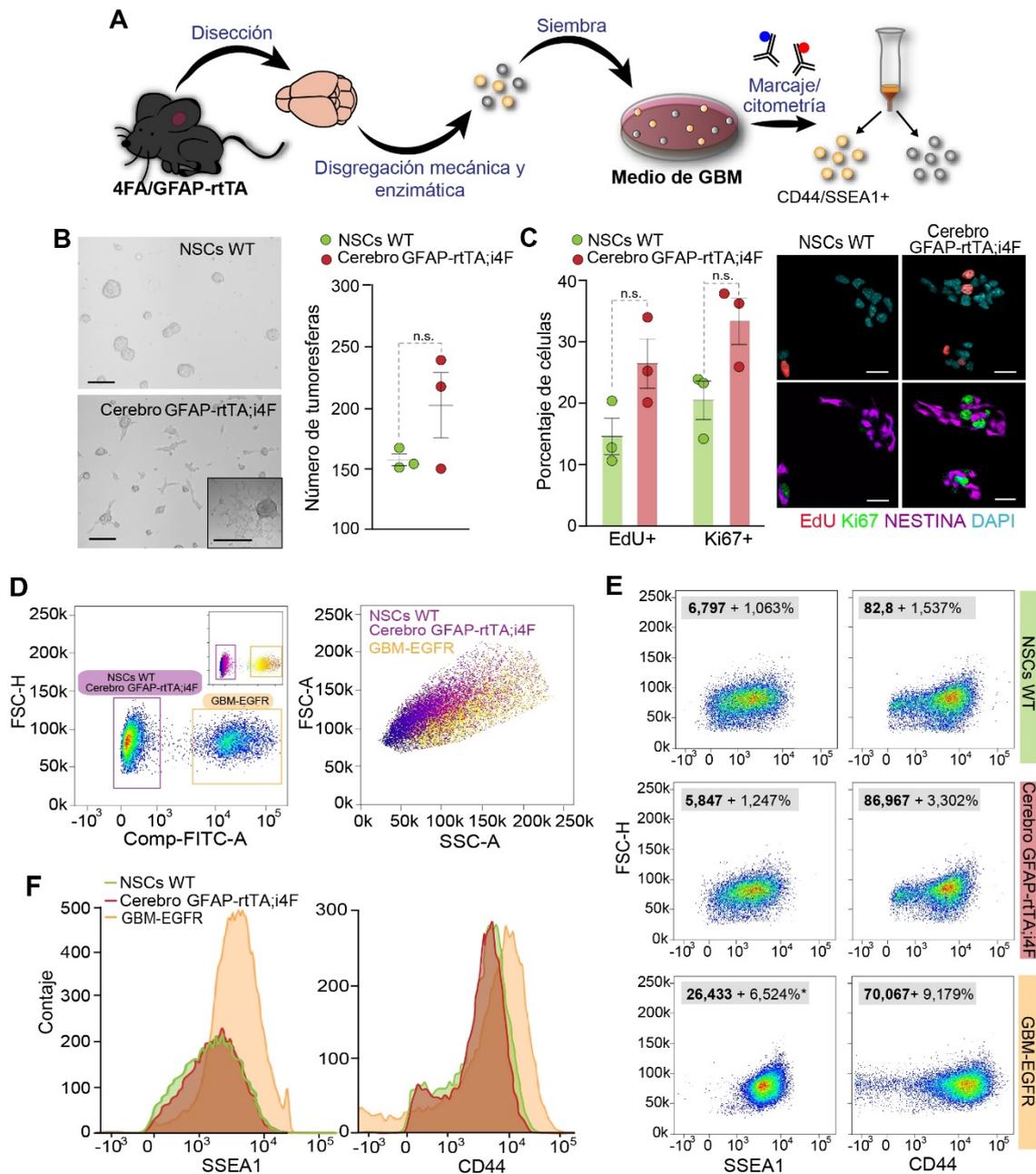


Figura 44. Los cultivos celulares de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F muestran propiedades de crecimiento distintas a las NSCs. **A)** Esquema del proceso de aislamiento, cultivo y caracterización de las células GFAP-rtTA;i4F para la obtención de GSCs tras el tratamiento con doxiciclina. Los cerebros de los animales fueron disgregados enzimática y manualmente hasta obtener una suspensión celular, que fue cultivada en medio de GBM. Los cultivos crecieron en forma de esferas que fueron disgregadas mecánicamente y marcadas con anticuerpos frente a CD44 y SSEA1, para posteriormente ser analizados por citometría de flujo. **B)** Imágenes en contraste de fases de NSCs adultas de la SVZ y de cultivos GFAP-rtTA;i4F. El número de esferas formadas tras la siembra de 50 células/ μ l fue determinado tanto en NSCs control como en cultivos de cerebro GFAP-rtTA;i4F. **C)** Recuento del porcentaje de células EdU y Ki67 positivas en los cultivos de ambos genotipos. A la derecha de la imagen se muestra la ICC para los marcadores EdU (rojo), Ki67 (verde) y NESTINA (morado) en los cultivos de NSCs y de cerebros GFAP-rtTA;i4F. El DAPI se ha utilizado para contrateñir y realizar el recuento de células totales. **D)** Caracterización por citometría de flujo de NSCs, células de cerebro completo GFAP-rtTA;i4F y células GBM-EGFR utilizando la detección del fluoróforo FITC para distinguir las GBM-EGFR. Las células fueron seleccionadas basándose en el tamaño (FSC-A) y la complejidad (SSC-A) celular, para eliminar restos celulares y agregados. Las células únicas fueron a su vez aisladas para distinguir la población de células vivas y muertas por DAPI. **E)**

Caracterización por citometría de flujo de las células mediante la detección de SSEA1 y CD44. Se muestra también el porcentaje de células positivas para SSEA1 y CD44 en estos tres tipos celulares. **F)** Histograma de la cuantificación del número de células que poseen el marcador SSEA1 en NSCs (verde), GFAP-rtTA;i4F (rojo) y GBM-EGFR (naranja). El análisis de células CD44 positivas se basó en la detección de PerCP-Cy5.5, mientras que para la detección de SSEA1 se utilizó APC-Cy7. El número de muestras, así como los p-valores han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente. El s.e.m. muestra la desviación típica de tres cultivos. Barra de escala en B: 50 μ m y C: 15 μ m.

Debido a la ausencia de diferencias claras a nivel de marcadores por citometría entre los cultivos obtenidos, se realizó una caracterización a nivel de mRNA de diferentes marcadores en cultivos de NSCs de animales control sin tratar, en cultivos de NSCs de animales i4F tratados *in vivo* con doxiciclina y en cultivos de NSCs y cerebro de animales GFAP-rtTA;i4F también tratados (**Figura 45A**). El aumento de expresión del transgén *OSKM* fue comprobada en los cultivos tanto de NSCs como de cerebro completo en animales GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina; sin embargo, las NSCs procedentes de la SVZ de animales i4F también mostraron cierta expresión basal del transgén en dos de los tres cultivos analizados (**Figura 45B**), indicando que estas NSCs no eran el control más adecuado para analizar la expresión génica en los cultivos GFAP-rtTA;i4F puesto que podrían haber adquirido ciertas alteraciones, a pesar de no haber generado tumores *in vivo*.

A continuación, se estudió la expresión del gen *Oct4*, observándose que las células de los ratones GFAP-rtTA;i4F sembradas y cultivadas en medio GBM también presentaron un aumento en la expresión de *Oct4* de casi 1.000 veces con respecto a NSCs control (**Figura 45C**). Las NSCs i4F no mostraron aumento de *Oct4*, indicando que la expresión basal del transgén *OSKM* no era suficiente para inducir el aumento de expresión de este gen (dato no mostrado). Los cerebros GFAP-rtTA;i4F mostraron un aumento de *Oct4*, incluso mayor que los cultivos de NSCs, sugiriendo que esos cultivos no se componían únicamente de NSCs. De acuerdo con estos resultados, la proteína OCT4 fue detectada en las células de cultivos de cerebros GFAP-rtTA;i4F pero no en las NSCs control (**Figura 45D**). Sin embargo, la detección de la proteína Nanog fue negativa tanto para las NSCs control como en los cultivos GFAP-rtTA;i4F (**Figura 45D**).

Para corroborar la adquisición de características malignas en los cultivos tratados, se analizó la expresión de los marcadores CD44 y CD133. Ni la expresión del mRNA ni de la proteína CD44 mostraron diferencias con respecto a NSCs control (**Figura 45C, D**), tal y como se había observado en el análisis por citometría de flujo (**Figura 44G**). Respecto a CD133, los estudios por qPCR mostraron un perfil variable de expresión del gen con un incremento en las NSCs GFAP-rtTA;i4F pero un descenso significativo en los cultivos de cerebro completo GFAP-rtTA;i4F con respecto a NSCs control (**Figura 45C**), mientras que la ICC realizada frente a esta molécula no mostró cambios en los cultivos GFAP-rtTA;i4F (**Figura 45D**).

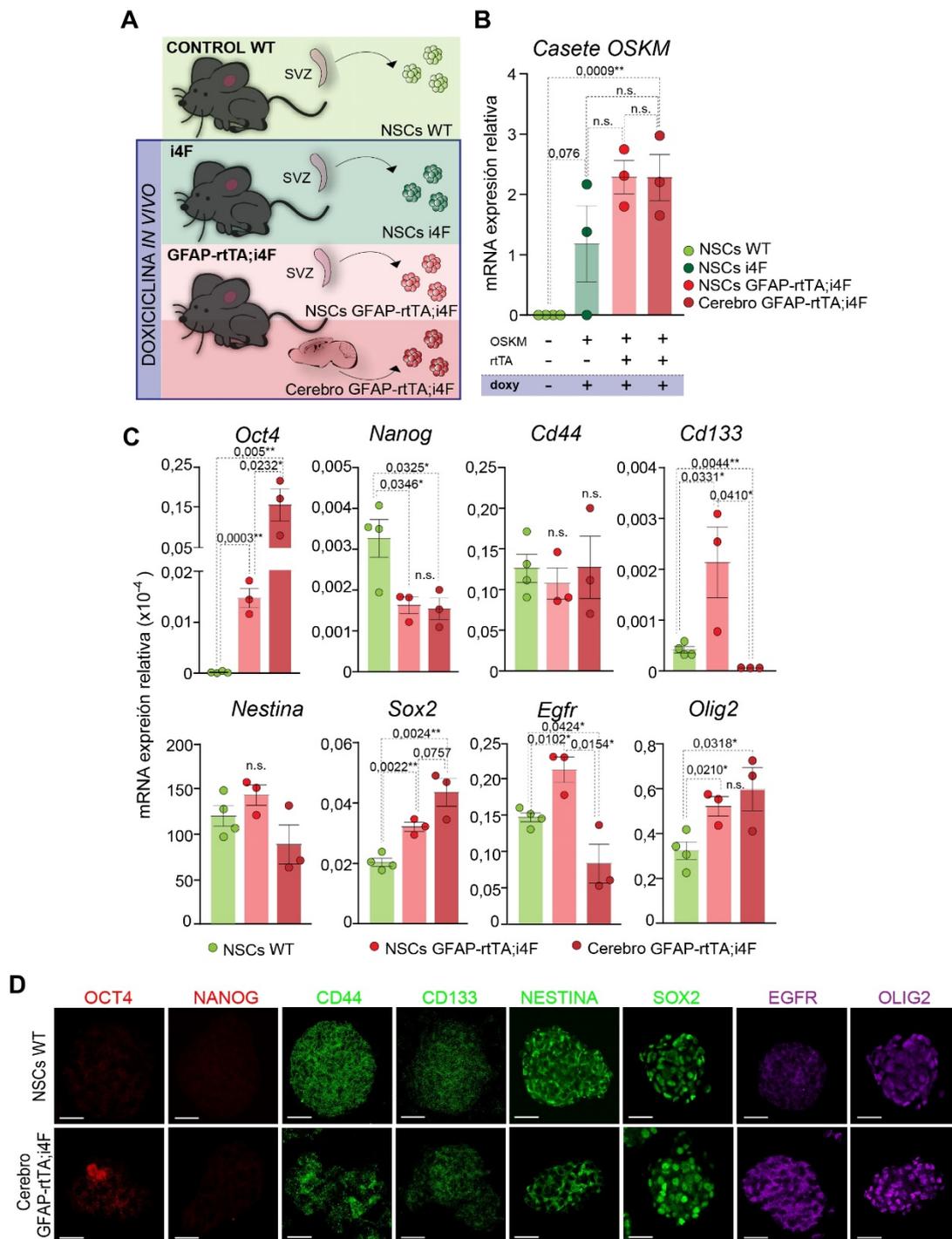


Figura 45. Los cultivos de ratones GFAP-rtTA;i4F comparten alteraciones asociadas a las GSCs. **A)** Esquema de los modelos utilizados: NSCs aisladas de la SVZ de animales control, i4F, y GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina (doxy). También se han usado células aisladas del cerebro completo de animales GFAP-rtTA;i4F tratados. **B)** Expresión del transgén *OSKM* en NSCs de animales control B6, i4F y GFAP-rtTA;i4F y en las células obtenidas de la disgregación del cerebro completo de animales GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina (doxy). **C)** Expresión de los genes de pluripotencia *Oct4* y *Nanog*, los genes *Cd44* y *Cd133*, los genes neurales *Nestina* y *Sox2*, y los genes *Egfr* (asociado al subtipo clásico del GBM) y *Olig2* (asociado al subtipo pro-neural del GBM) en NSCs control, y NSCs y células GFAP-rtTA;i4F obtenidas del cerebro de ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos tres animales por genotipo. Los p-valores han sido indicados. El gen *18S* se ha utilizado para normalizar los datos de expresión. **D)** ICC para OCT4 (rojo), NANOG (rojo), CD44 (verde), CD133 (verde), NESTINA (verde), SOX2 (verde), EGFR (morado) y OLIG2 (morado) en NSCs control y cultivos GFAP-rtTA;i4F. Barras de escala en D: 25 μ m. n.s: no significativo estadísticamente.

Otro de los marcadores analizados fue Nestina. En este caso, las células de los cultivos GFAP-rtTA;i4F no mostraron cambios con respecto a los cultivos control ni en la expresión relativa de mRNA ni en los niveles de proteína (**Figura 45C, D**). Finalmente, la expresión del gen *Egfr* aumentó significativamente tanto en las NSCs GFAP-rtTA;i4F (**Figura 45C**) como en los cultivos de cerebro completo (**Figura 45D**). Además, el análisis de expresión del factor de transcripción *Sox2* en las células GFAP-rtTA;i4F también mostró un aumento tanto en las NSCs como en los cultivos de cerebros completos, especialmente en estas últimas, tanto en los niveles de mRNA como de proteína respecto a las células control (**Figura 45C, D**). Otro factor de transcripción cuyo aumento en su expresión ha sido asociado al GBM es *Olig2* (Kosty et al., 2017; Trepant et al., 2015). La expresión de este factor también aumentó tanto a nivel de mRNA como de proteína en los cultivos GFAP-rtTA;i4F con respecto a NSCs control (**Figura 45C, D**). Por lo tanto, el incremento de *Oct4*, *Sox2* y *Olig2* respecto a las NSCs en los cultivos GFAP-rtTA;i4F, así como la detección elevada de los marcadores SSEA1 y EGFR, sugieren la adquisición de ciertas propiedades tumorales en los cultivos, apoyando la idea de que la reprogramación inducida en células GFAP positivas sería capaz de generar tumores con propiedades de GBM. Además, el aumento en la expresión de *Oct4*, *Cd133*, *Sox2*, *Egfr* y *Olig2* en las NSCs GFAP-rtTA;i4F tratadas con doxiciplina *in vivo*, sugieren que estas células podrían encontrarse en un estado de predisposición a la transformación maligna.

2.2.2 Los tumores cerebrales formados muestran cambios de expresión en genes improntados

Una vez obtenido un modelo de formación de tumores cerebrales eficiente, se procedió al estudio del papel de la impronta genómica en la formación y desarrollo de estos tumores. Para ello, se procedió a analizar la expresión de diversos genes improntados (**Figura 46**). Un total de 12 genes improntados localizados a lo largo del genoma, y cuya expresión alterada se identificó previamente en muestras de tumores humanos y murinos, fueron analizados: *Zdbf2*, *Cntn3*, *Peg12*, *Magel2*, *Ndn*, *Snrpn*, *Cdkn1c*, *Grb10*, *Dio3*, *Dlk1*, *Meg3* y *Rian* (**Figura 31**). Para ello se escogieron 13 de las 22 muestras tumorales encontradas (**Figura 38**). Entre 4 y 10 genes improntados mostraron una expresión alterada en los tumores respecto a la misma región cerebral en animales control (**Figura 46A, B**). La mayoría de los genes estudiados aumentaron su expresión; aunque, algunos tumores, como por ejemplo el 2, 5 y 16, mostraron una disminución de la expresión de la mayoría de los genes. Por lo tanto, este análisis de expresión permitió observar nuevamente dos perfiles de expresión diferentes entre los tumores analizados, lo cual podría coincidir con la existencia de tumores tipo teratoma y GBM previamente detectados por IHC (**Figura 40 y 42**).



Cabe destacar que la mayoría de los tumores mostraron alteraciones en al menos 3 de los 4 genes improntados situados en el *cluster* improntado regulado por el IG-DMR: *Dio3*, *Meg3* y *Dlk1* (Figura 46A, B). Nuevamente, este locus podría tener implicaciones en la alteración de las NSCs hacia el fenotipo maligno, como también se había observado en la transformación de las NSCs en iPSCs durante el proceso de reprogramación inducida *in vitro*. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la región IG-DMR podría ser clave en la regulación del estado de las NSCs y que su alteración promovería su desdiferenciación completa hasta las iPSCs o hacia la transformación en CSCs.

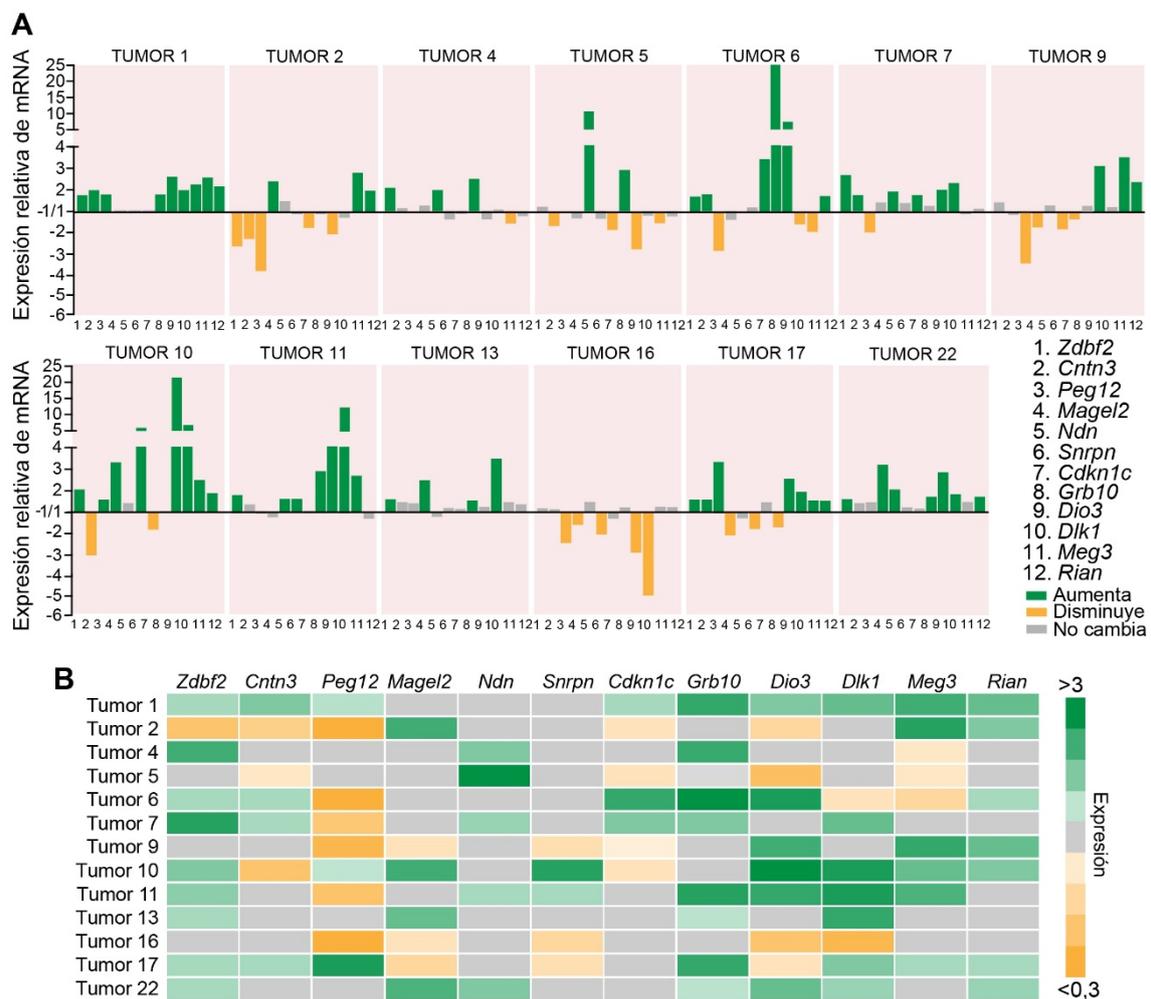


Figura 46. La reprogramación de ratones GFAP-rtTA;i4F conlleva alteraciones en la expresión de genes improntados. **A)** qPCR para 12 genes improntados en 13 muestras tumorales de ratones reprogramados GFAP-rtTA;i4F respecto a la expresión en tejido control i4F en las regiones cerebrales en las que se ha detectado el tumor. La expresión del gen *18S* ha sido utilizada para normalizar los datos de expresión. **B)** HeatMap de los genes improntados en las muestras tumorales de ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados. El aumento de expresión se muestra en verde mientras que la disminución en la expresión se ha indicado en naranja. Aquellos genes cuya expresión no se ve alterada se muestran en gris.

En conclusión, los resultados del análisis de expresión de los genes improntados en muestras tumorales mostraron dos perfiles de expresión claramente diferenciados, lo cual

coincide con los análisis previos de marcadores moleculares a nivel de proteína, pero también van en concordancia con los datos del RNAseq del apartado 2.1 en el cual se observó que la expresión de los genes improntados es suficiente para distinguir el tejido tumoral del no tumoral en pacientes de GBM, e incluso los subtipos celulares dentro del GBM.

Las células aisladas de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F reprogramados *in vivo*, y crecidas en medio GBM, fueron también analizadas para determinar las alteraciones en la expresión de genes improntados con respecto a NSCs control (Figura 47). De un total de 25 genes improntados analizados, se observó la alteración en un 20% de ellos (Figura 47A), de los cuales, a su vez, el 20% disminuyó la expresión en los cultivos GFAP-rtTA;i4F tratados con respecto a las NSCs control, mientras que el 80% lo aumentó (Figura 47A). Únicamente 5 de estos genes mostraron cambios significativos: *Mcts2*, *Peg12*, *H19*, *Meg3* e *Igf2r* (Figura 47B) aunque otros 10 mostraron tendencias claras a aumentar en los cultivos tumorales: *Zdbf2*, *Peg10*, *Cntn3*, *Magel2*, *Ndn*, *Igf2*, *Ins2*, *Dlk1* y *Rian* (Figura 47B). Muchos de estos genes muestran alteraciones en muestras humanas de GBM en la base de datos de Gliovis (Figura 31) y en los tumores sólidos del modelo GFAP-rtTA;i4F (Figura 46), apoyando nuevamente la idea de que los cultivos aislados de tumores inducidos en ratones reprogramables pudieran corresponderse a células de GBM.

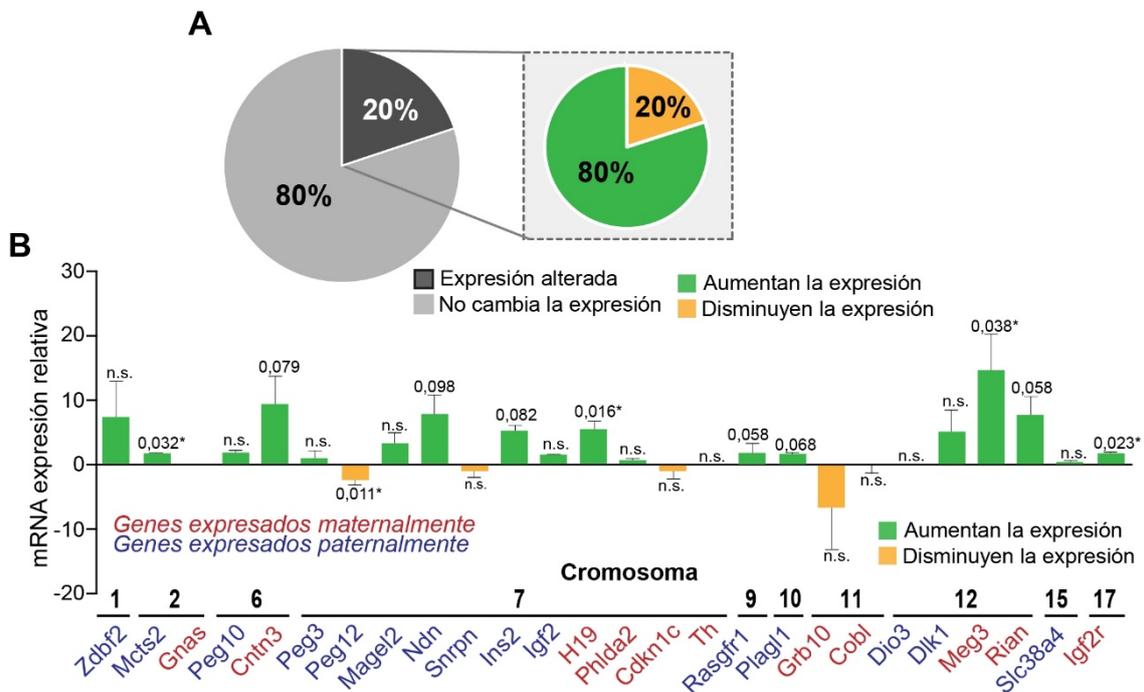


Figura 47. Los cultivos celulares obtenidos de cerebros de ratones GFAP-rtTA;i4F reprogramados *in vivo* presentan alteraciones en la expresión de genes improntados. **A)** Porcentaje de genes improntados cuya expresión se encuentra alterada en los animales GFAP-rtTA;i4F con respecto a NSCs control. El porcentaje de genes que aumentan la expresión (verde) o la disminuyen (naranja) también ha sido indicado. **B)** Expresión relativa de 26 genes improntados en cultivos GFAP-rtTA;i4F en comparación con NSCs control aisladas de la SVZ adulta sana. Los genes cuya expresión aumenta han sido indicados en verde, mientras que aquellos que disminuyen se muestran en naranja. Las barras de error muestran el s.e.m. de tres cultivos. Los p-valores han sido indicados; n.s: no significativo estadísticamente.

OBJETIVO 3. Estudio del papel de la enzima TET3 en la regulación de la impronta genómica durante la transformación maligna.



3. La enzima TET3 previene la formación del GBM a través de la regulación epigenética de genes improntados

La enzima TET3 está implicada en la oxidación de la metilación del DNA dando lugar a la forma 5-hidroximetilcitosina (5hmC) a partir de la 5-metilcitosina (5mC), por lo que participa en la desmetilación activa del DNA (Wu and Zhang, 2017). El cerebro presenta niveles altos de hidroximetilación (Montalban-Loro et al., 2019), siendo la expresión de *Tet3* la que permanece más elevada en el cerebro y en las NSCs adultas (Montalban-Loro et al., 2019; Szwagierczak et al., 2010). Si bien un efecto anti-tumoral de TET3 ha sido demostrado previamente (Misawa et al., 2018; Rasmussen and Helin, 2016), la acción de esta enzima también ha sido descrita como oncogénica a través de la desmetilación del DNA (Herrmann et al., 2020). Dadas estas discrepancias entre estudios previos, entender el papel que juega TET3 en el desarrollo del GBM y su posible implicación en la alteración de los genes improntados en este cáncer resulta clave.

3.1. TET3 disminuye en GBM humano

Con el fin de elucidar el papel que juega TET3 en el desarrollo del GBM se llevó a cabo un análisis de la expresión de *TET3* en muestras de GBM humano recurriendo a la base de datos de Rembrant en la aplicación GlioVis. Los datos aportados por Rembrant muestran una menor expresión del gen *TET3* en muestras de GBM con respecto a tejido no tumoral, observándose la menor expresión en el subtipo más agresivo, el GBM de tipo mesenquimal (**Figura 48A**). Consistentemente, los pacientes con una mayor expresión del gen *TET3* correlacionan con una mayor tasa de supervivencia (**Figura 48B**), mostrando a TET3 como un factor importante en la regulación de la malignidad en GBM. Contrariamente, la expresión de este gen mostró ser mayor en los subtipos clásico y mesenquimal según la base de datos CGGA, en la misma aplicación de GlioVis (**Figura 48C**). Además, cuando se analizó la correlación entre la supervivencia y la expresión de *TET3* con la base de datos CGGA, esta mostró una menor supervivencia en los pacientes con expresión alta de *TET3* (**Figura 48C**).

Esta variabilidad en el efecto de TET3 sobre el crecimiento de tumores *in vivo* coincide con los resultados contradictorios en la literatura reciente, en la que Carella A et al. observaron que la sobre-expresión de *TET3* en el GBM inhibía el crecimiento exponencial de los tumores (Carella et al., 2020), mientras que el estudio de Herrmann et al. mostró un efecto oncogénico de la enzima, aumentando la proliferación de GSCs y el número de tumoresferas *in vitro*, mientras que el silenciamiento de *TET3* disminuye el crecimiento exponencial de los tumores *in vivo* y aumenta la supervivencia (Herrmann et al. 2020).

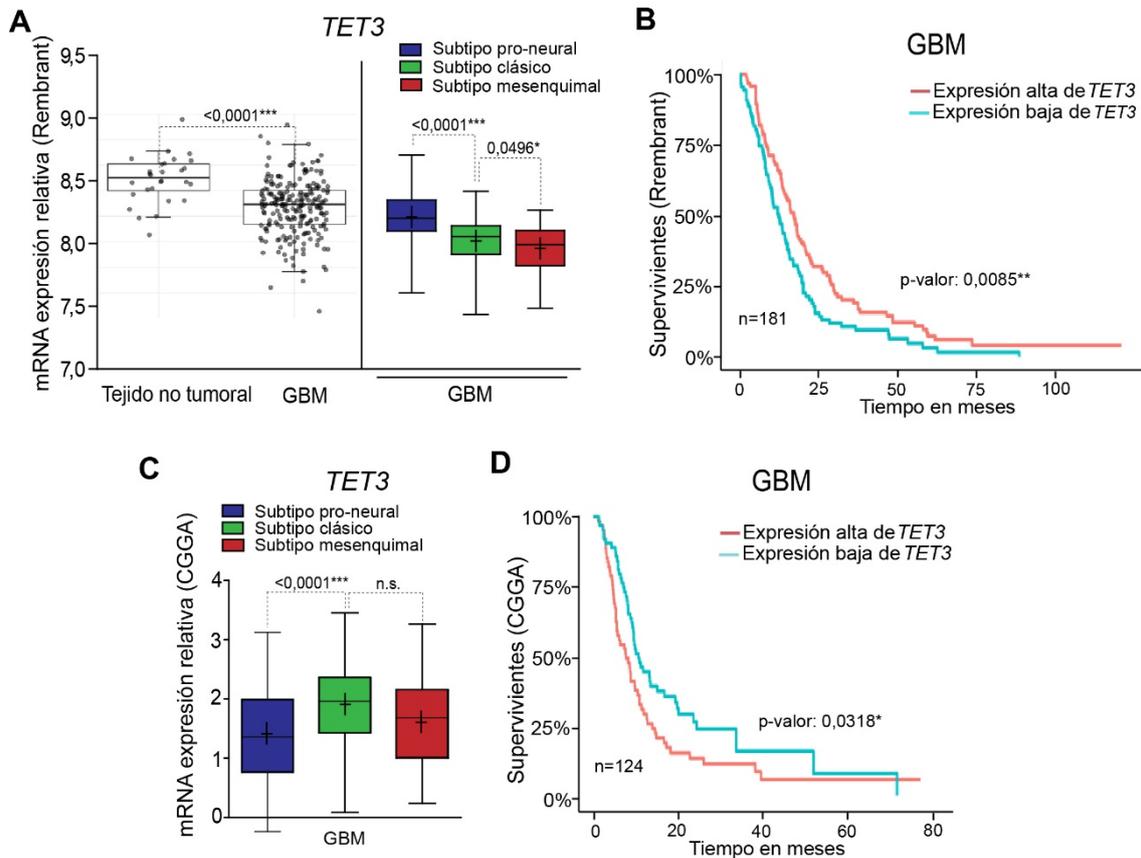


Figura 48. La expresión de *TET3* disminuye en GBM humano. **A)** Expresión de *TET3* en muestras de GBM humano y muestras no tumorales a partir de la base de datos de Rembrant (obtenida de la aplicación GlioVis; panel izquierdo). La expresión de *TET3* en los tres subtipos: pro-neural (azul), clásico (verde) y mesenquimal (rojo) de GBM también se muestra (panel derecho). **B)** Porcentaje de supervivencia en meses en pacientes de GBM según la expresión alta (rojo) o baja (azul) del gen *TET3*. Datos obtenidos de la base de datos de Rembrant. Los p-valores han sido indicados. **C)** Expresión de *TET3* en muestras de GBM humano según el subtipo pro-neural, clásico o mesenquimal a partir de la base de datos CGGA (obtenida de la aplicación GlioVis). **D)** Porcentaje de supervivencia en meses en pacientes de GBM según la expresión alta (rojo) o baja (azul) del gen *TET3*. Datos obtenidos de la base de datos de CGGA. Se indica el número de pacientes analizados. Los p-valores han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente.

3.2. *TET3* controla el comportamiento tumoral de células de GBM murino *in vitro*

Para dilucidar la posible relación de la expresión de *TET3* y la prognosis del GBM, así como el papel que puede jugar esta enzima en la formación de este tipo de cáncer, en primer lugar, se analizaron los niveles de expresión del gen *Tet3* en la línea murina GBM-EGFR usada previamente (Figura 49A). Como control se utilizaron NSCs salvajes de la SVZ adulta. En la línea celular tumoral se observó una menor expresión de *Tet3* con respecto a las NSCs (Figura 49A), mientras que ninguno de los otros dos genes de la misma familia, *Tet1* y *Tet2*, mostró cambios en la expresión en GBM (Figura 49A). La menor expresión de la enzima también fue detectada a nivel de proteína mediante ICC en las NSCs y las células GBM-EGFR (Figura 49B). Estos resultados sugieren que la disminución en la expresión de *Tet3* podría ser importante en la transformación maligna de las NSCs, como se ha sugerido en otros estudios (Carella et al., 2020; Cui et al., 2016).

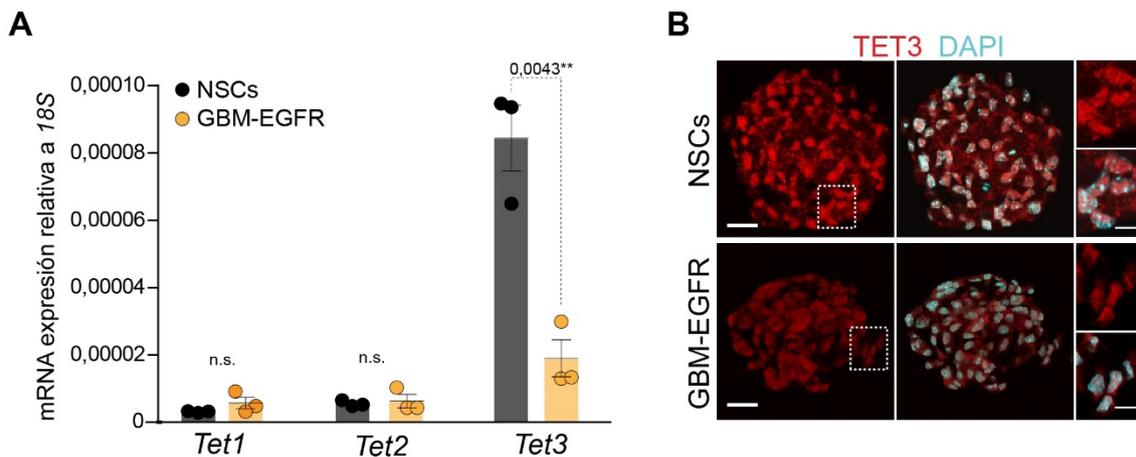


Figura 49. La expresión de *Tet3* está disminuida en el GBM murino. A) qPCR para los genes *Tet1*, *Tet2* y *Tet3* en NSCs adultas (negro) de la SVZ y en la línea GBM-EGFR. El gen *18S* ha sido utilizado para normalizar los datos. El p-valor ha sido indicado en la figura. Las barras de error muestran el s.e.m. de tres cultivos. **B)** ICC para TET3 (rojo) en NSCs adultas y células GBM-EGFR. Se ha utilizado DAPI para contrateñir los núcleos. Las barras de escala en B: 20 μ m (ampliaciones: 7 μ m); n.s.: no significativo estadísticamente.

Para comprender si la menor expresión de *Tet3* estaba implicada en el desarrollo del cáncer, se sobre-expresó el gen *Tet3* en la línea GBM-EGFR. Si bien TET3 ha sido descrita como una enzima implicada en el proceso de desmetilación activa del DNA (Wu and Zhang, 2017), también es capaz de regular la expresión génica a nivel de la transcripción (Krueger et al., 2017; Montalban-Loro et al., 2019). Por ello, también se sobre-expresó esta enzima con el dominio catalítico mutado, de tal manera que esta variante de TET3 no puede transformar el grupo 5-metilcitosina en 5-hidroximetilcitosina a través de su función dioxigenasa. El aumento de expresión de *Tet3* tras la nucleofección fue confirmado mediante qPCR y a nivel de proteína mediante ICC en células GBM-EGFR nucleofectadas con un vector vacío (GBM^{control}) y en las células de GBM nucleofectadas con el vector de *Tet3* (GBM^{Tet3}) o de *Tet3* con el dominio catalítico mutado (GBM^{Tet3 CDmut}) (**Figura 50A, B**). En concordancia con el aumento de TET3, un aumento en la señal 5hmC fue detectada en las células que sobre-expresaban *Tet3* (GBM^{Tet3}) en comparación con las células control (GBM^{control}) y las células GBM^{Tet3 CDmut} (**Figura 50B**).

Con el fin de estudiar la implicación de *Tet3* en el comportamiento de las células de GBM, se llevaron a cabo ensayos para testar algunas de las características asociadas al tumor. En primer lugar, se analizó la expresión de moléculas asociadas a la malignidad mediante qPCR (**Figura 50C**). La expresión de *Cd44* y *Egfr* no mostró cambios en las células nucleofectadas para la sobre-expresión de *Tet3* en comparación con las células GBM^{control}, mientras que la expresión de *Olig2* aumentó (**Figura 50C**); sin embargo, este aumento no fue significativo en las células nucleofectadas con *Tet3* con el dominio catalítico mutado (GBM^{Tet3 CDmut}), indicando que el efecto de *Tet3* sobre *Olig2* pudiera ser dependiente de su acción dioxigenasa. Estos marcadores

tumorales también fueron testados a nivel de proteína, no observándose cambios entre las células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} (Figura 50D).

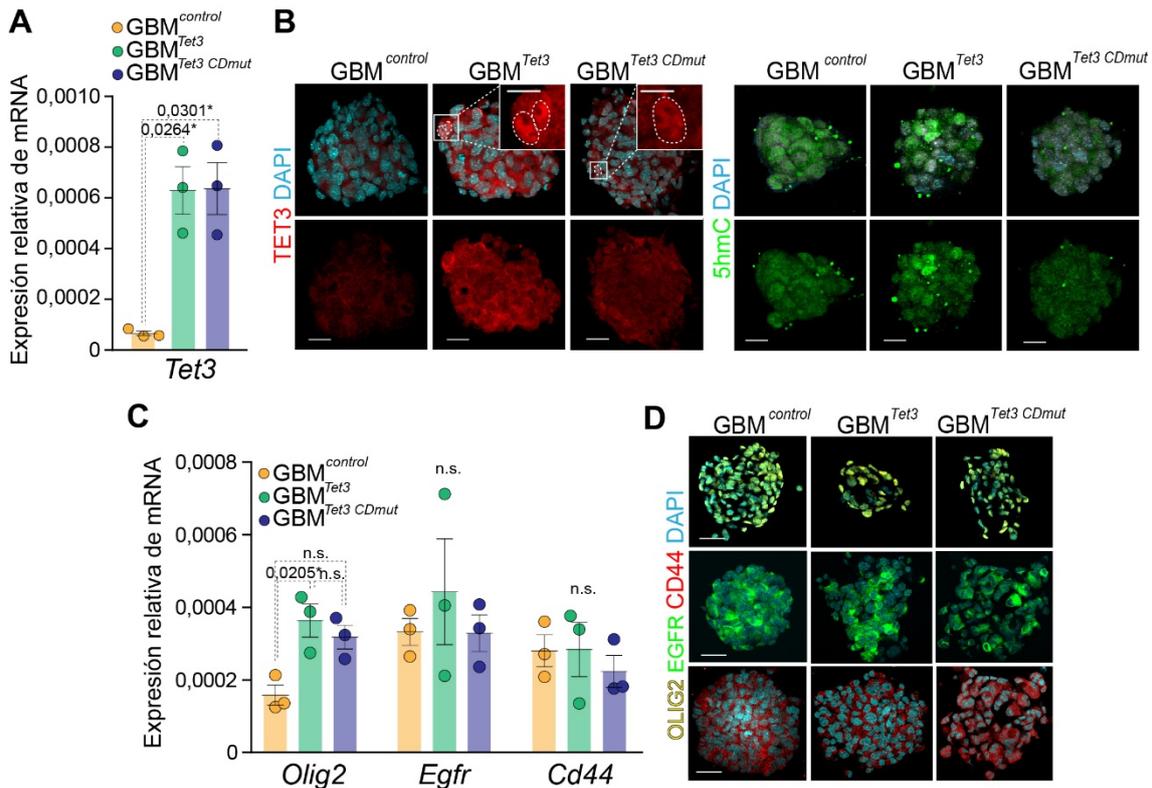


Figura 50. La sobre-expresión de *Tet3* promueve la transición pro-neural del GBM. **A)** qPCR para *Tet3* en células GBM-EGFR nucleofectadas con un vector vacío (GBM^{control}) o con el vector para la sobre-expresión de *Tet3* (GBM^{Tet3}) y *Tet3* con el dominio catalítico mutado (GBM^{Tet3 CDmut}). **B)** ICC para TET3 (rojo) y 5hmC (rojo) en células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. **C)** qPCR para *Olig2*, *Egfr* y *Cd44* en los cultivos control y nucleofectados con *Tet3* o *Tet3 CDmut*. **D)** ICC para OLIG2 (amarillo), EGFR (verde) y CD44 (rojo) en células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. El gen *18S* ha sido utilizado para normalizar los datos de expresión. DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Las barras de error muestran el s.e.m. El número de muestras y los p-valores han sido indicados en las gráficas; n.s.: no significativo estadísticamente. Escala en B y D: 20 μm (ampliaciones en B): 7 μm.

A continuación, para analizar si la TET3 afectaba a la capacidad de proliferación del GBM, se llevó a cabo un ensayo de tumoresferas en el cual se sembraron las células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} disgregadas a baja densidad y se estimó el número de esferas formadas en cada condición. Los cultivos de células GBM^{Tet3} presentaron una menor tendencia a formar tumoresferas con respecto a las células control, sin embargo, esta disminución en el número de tumoresferas no fue significativo. En cambio, las células GBM^{Tet3 CDmut} mostraron un mayor número de tumoresferas con respecto a las células GBM^{Tet3}, pero no respecto al GBM^{control} (Figura 51A y B). Por otro lado, el diámetro de las tumoresferas formadas en la línea GBM^{Tet3} fue mayor en comparación con las tumoresferas GBM^{control} (Figura 51C), pudiendo indicar efectos en la proliferación o en la capacidad de adhesión de estas células que causa su agregación en los cultivos.



Para realizar un estudio más exhaustivo de la implicación de TET3 en la proliferación, se analizó las fases del ciclo celular en las líneas GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. Este ensayo mostró cambios significativos en la fase G₀/G₁ del ciclo entre los cultivos GBM^{control} y los GBM^{Tet3} con un aumento en el porcentaje de células en esta fase en los cultivos con *Tet3* sobre-expresado (**Figura 51B**). También se detectó en las células GBM^{Tet3} una ligera disminución en la fase S y G₂/M; aunque esta disminución no llegó a ser significativa (**Figura 51B**). Para confirmar si los cambios observados en la fase G₀/G₁ del ciclo celular se correspondían a una posible parada de las células en esa fase, se llevó a cabo un marcaje de células en proliferación mediante la detección de Ki67 y de forma específica en fase S mediante un pulso de 1 hora con el análogo de timidina EdU. Este análisis mostró un menor porcentaje de células en replicación tras la sobre-expresión de *Tet3*, pero no cuando la sobre-expresión se realizó con la forma mutada de la enzima (**Figura 51C**), implicando a TET3 en la proliferación de las células de GBM a través de la desmetilación del DNA. El porcentaje de células Ki67 no cambió de forma significativa, aunque sí presentó una tendencia siguiendo el mismo patrón que el marcaje con EdU (**Figura 51C**). A continuación, se realizó una tinción para la Histona 3 fosforilada (pH3) que permite detectar y distinguir las fases G₂ y M del ciclo celular (Filby et al., 2011). Esta ICC no mostró alteraciones en la fase M en las células GBM^{Tet3} ni GBM^{Tet3 CDmut}, cuantificado como porcentaje de células con marcaje pH3 positivo tiñendo de forma homogénea todo el núcleo, pero sí se observó una disminución en el porcentaje de células en fase G₂, cuantificado como el porcentaje de células pH3 positivas con marcaje de cromosomas condensados observados como un marcaje punteado (**Figura 51D**).

Por tanto, los ensayos realizados para el análisis de la capacidad proliferativa del GBM tras la sobre-expresión de *Tet3*, no mostraron un efecto claro. El ciclo celular presentó ligeros cambios tras sobre-expresar a *Tet3*, aumentando el porcentaje de células en fase G₀/G₁, y disminuyendo el porcentaje de células en fase S y G₂; sin embargo, el número de tumoresferas formadas no se vio disminuido.

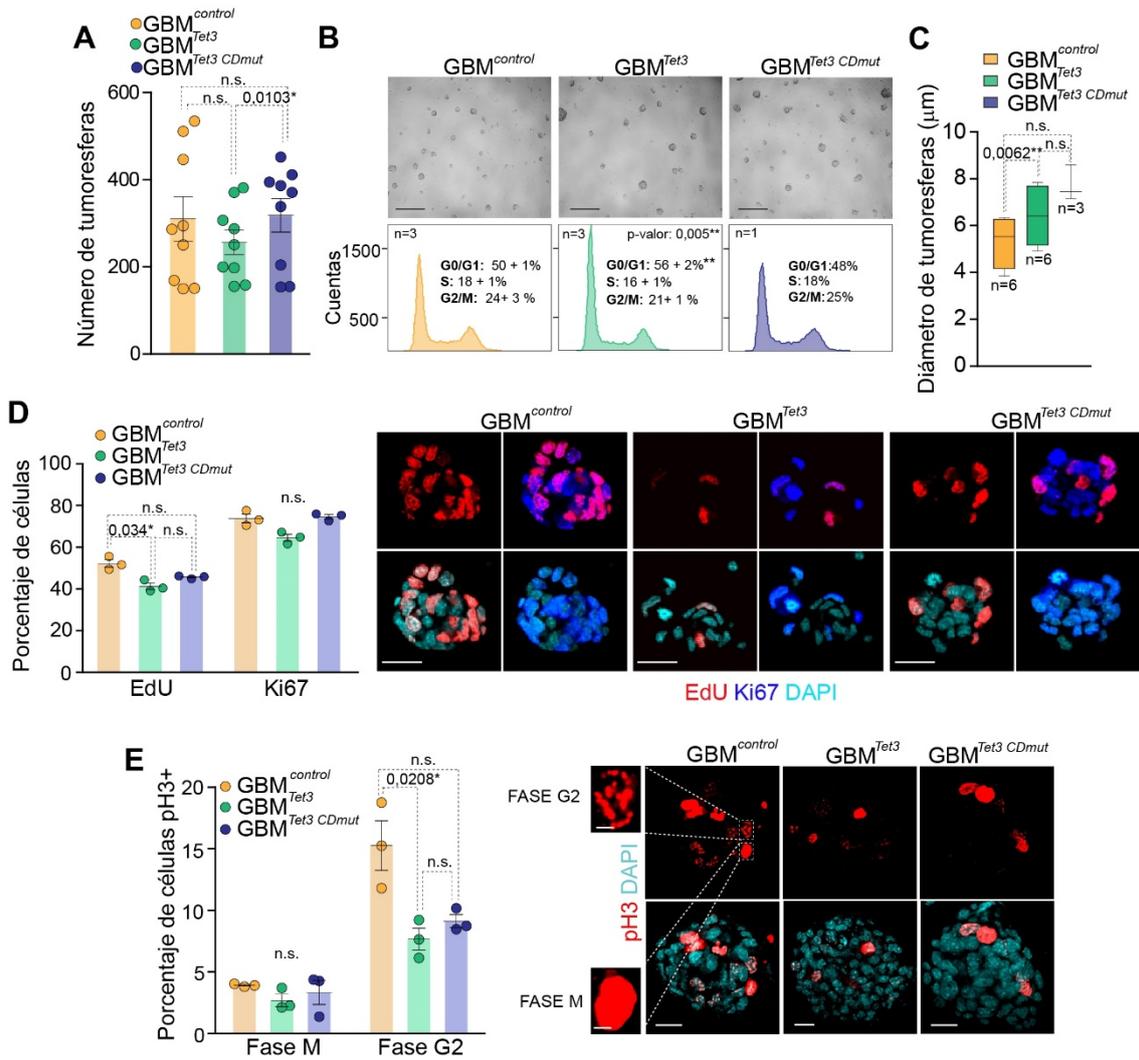


Figura 51. *Tet3* disminuye la capacidad proliferación de en células de GBM. **A)** Número de tumoresferas formadas a partir de 2500 células en las que se ha sobre-expresado *Tet3* (GBM^{Tet3}) o *Tet3* con el dominio catalítico mutado (GBM^{Tet3 CDmut}) y en células control (GBM^{control}). **B)** Imágenes de contraste de fases de tumoresferas formadas en cultivos GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} (panel superior). Porcentajes de células en cada fase del ciclo celular en GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. Los perfiles del ciclo también se muestran (panel inferior). **C)** Diámetro medio de las esferas formadas por los cultivos de los distintos genotipos. **D)** Porcentaje de células EdU+ y Ki67+ en células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. Los porcentajes se estimaron respecto a DAPI (panel izquierdo). Imágenes de ICC para la detección de EdU (rojo) y Ki67 (azul) (panel derecho). **E)** Porcentaje de células positivas para pH3 en cultivos GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} (panel izquierdo). Imágenes de ICC para pH3 (rojo) en las mismas células mostrando el marcaje característico de la fase G2 (punteado) y la fase M (denso) (panel derecho). El DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Las barras de error muestran el s.e.m. de al menos 3 cultivos por condición. Los p-valores han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente. Barra de escala en B: 200 µm; D y E: 20 µm (ampliaciones en E: 5 µm).

Otra de las características clave en el comportamiento del cáncer además de la proliferación es la adhesión/migración e invasividad de las células malignas (Paw et al., 2015). El mayor diámetro de las tumoresferas en la línea GBM^{Tet3} durante el ensayo de formación de tumoresferas, sugieren un posible efecto de *Tet3* sobre la capacidad de adhesión o agregación de estas células. Dicha capacidad fue testada tras la sobre-expresión de *Tet3* mediante un análisis de expresión del gen *N-cadherina*, el cual está presente en los gliomas de alto grado y ha sido



implicado en la invasividad del tumor (Noh et al., 2017; Peglion and Etienne-Manneville, 2012). El resultado de la qPCR para *N-cadherina*, sin embargo, no mostró cambios cuando *Tet3* fue sobre-expresado (**Figura 52A**). Para estudiar más detenidamente el posible papel de TET3 en la adhesión del GBM a través de la molécula N-Cadherina, se cultivaron las células de GBM sobre fibroblastos modificados L292 que sobre-expresaban esta molécula de adhesión. Las células de GBM fueron previamente marcadas con el marcador fluorescente DFFDA y sembradas sobre los fibroblastos durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se procedió a lavar y fijar las células y analizar el porcentaje de células de GBM adheridas por mm² de fibroblastos. Este análisis tampoco mostró diferencias en adhesión entre las células GBM^{control} y las células GBM^{Tet3} (**Figura 52B**). Tomados todos estos datos en conjunto, TET3 podría estar afectando la proliferación del tumor sin afectar a su capacidad de migración e invasividad mediada por N-Cadherina. Sin embargo, un mayor número de muestras es requerido para poder concluir el efecto de TET3 sobre el GBM.

La formación del tumor requiere también de la generación de nuevos vasos sanguíneos para asegurar el aporte de factores tróficos necesarios para la supervivencia celular (Das S y Marsden PA, 2013; Guarnaccia L et al. 2018). El posible papel de *Tet3* en la angiogénesis también fue analizada *in vitro* mediante la cuantificación de la expresión del gen asociado a este proceso *Vegfa*; sin embargo, la expresión de esta molécula en los cultivos tumorales que sobre-expresaban *Tet3* no se vio alterada con respecto a los cultivos control (**Figura 52C**). El ensayo realizado para detectar la capacidad de TET3 en promover la proliferación de células endoteliales mediante co-cultivo de las células de GBM con células endoteliales humanas HUVEC (Bishop et al., 1999), mostró un menor porcentaje de células HUVEC Ki67 y EdU/Ki67 positivas cuando éstas fueron co-cultivadas con las células GBM^{Tet3} con respecto a las que fueron co-cultivadas con la línea GBM^{control}; sin embargo, esta disminución no fue significativa (**Figura 52D, E**).

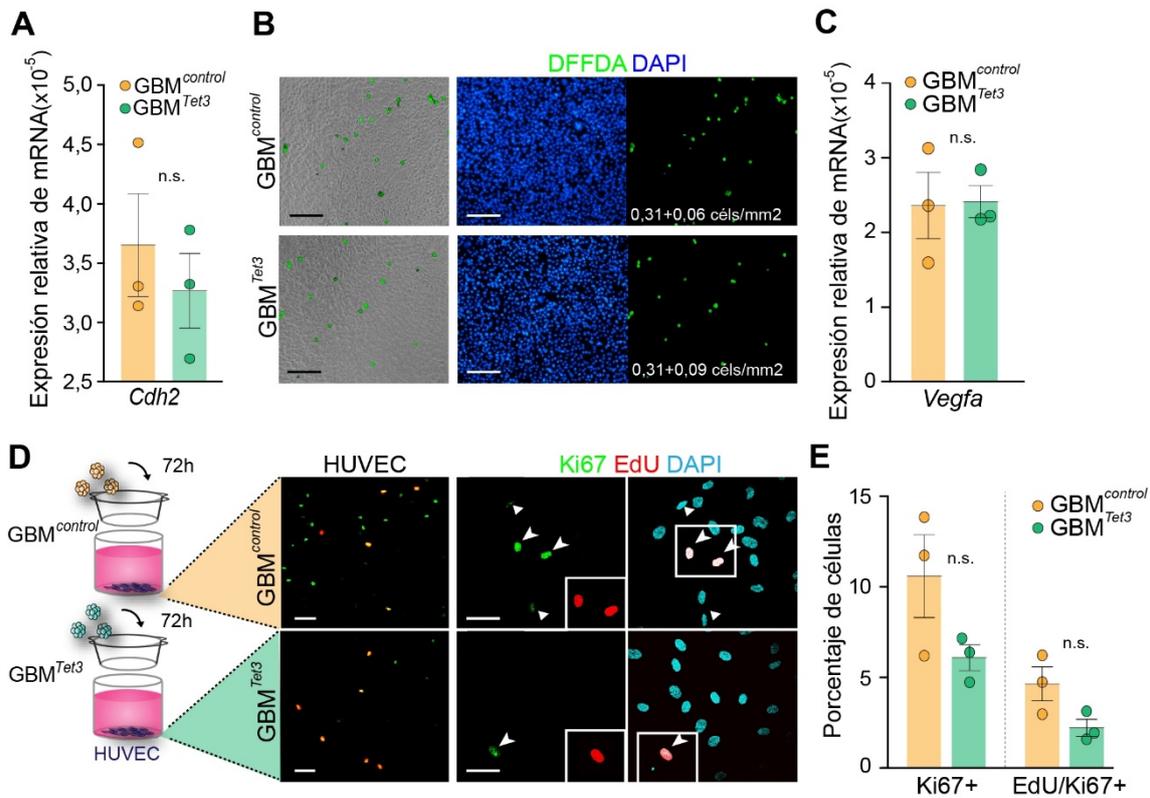


Figura 52. La capacidad de adhesión y angiogénesis del GBM no se ve alterada con la sobre-expresión de *Tet3*. **A)** qPCR para *Cdh2* en células GBM^{control} y GBM^{Tet3}. **B)** Ensayo de adhesión basado en el número de células de GBM, control y que sobre-expresan *Tet3*, marcadas con DFFDA (verde) adheridas a células de fibroblastos que sobre-expresan *N-Cadherina* (L929) tras 30 minutos en co-cultivo. El número de células DFFDA positivas (verde) por mm² se muestra. **C)** qPCR para *Vegfa* en las células GBM^{control} y GBM^{Tet3}. **D)** ICC para EdU (rojo) y Ki67 (verde) en células HUVEC tras ser co-cultivadas con células GBM^{control} o GBM^{Tet3}. **E)** Porcentaje de células HUVEC Ki67 y EdU/Ki67 positivas. El DAPI ha sido utilizado para contrateñir el DNA. El gen *18S* ha sido utilizado para normalizar. Las barras de error muestran el s.e.m. de tres muestras por condición. Los p-valores han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente. Barras de escala en B: 100 μ m y en D: 20 μ m.

3.3. La sobre-expresión de *Tet3* promueve la formación de tumores *in vivo*

Con el fin de confirmar la implicación de la enzima TET3 en la proliferación del GBM en un contexto adecuado de tumor sólido, se procedió a la inyección de las células tumorales en ratones inmunocomprometidos. En primer lugar, un total de 2×10^6 de células, de tres cultivos GBM^{control}, GBM^{Tet3} o GBM^{Tet3 CDmut} diferentes, fueron inyectadas en el flanco dorsal de estos animales (**Figura 53A**). Los tumores formados se clasificaron en función de su tamaño y peso, en grandes, medianos y pequeños, observándose un elevado porcentaje de tumores pequeños generados a partir de los cultivos GBM^{control} (**Figura 53C**), aunque también se encontraron algunos tumores medianos y grandes en las células control (**Figura 53C**). Respecto al tamaño de los tumores formados a partir de las GBM que sobre-expresan *Tet3* se observó que de tres tumores generados, dos eran grandes y uno pequeño (**Figura 53C**). Curiosamente, todos los tumores generados por las células GBM^{Tet3 CDmut} mostraron un tamaño pequeño (**Figura 53C**).

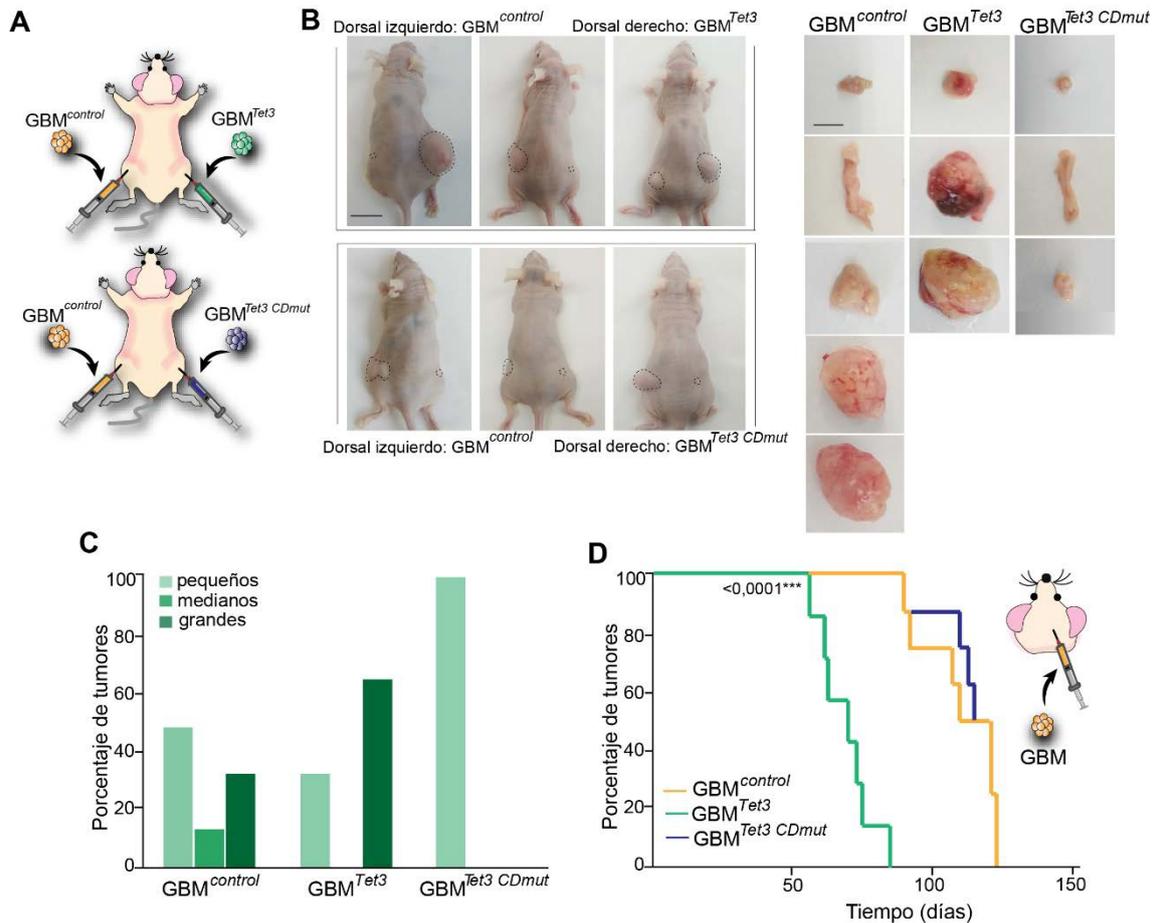


Figura 53. Efecto de TET3 en la formación del GBM *in vivo*. **A)** Esquema del protocolo de formación de GBM *in vivo* a partir de la inyección de células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} en los flancos dorso-laterales de ratones inmunocomprometidos *Nude*. **B)** Imagen de ratones inmunocomprometidos tras dos meses desde la inyección de células GBM^{control} (lado derecho) y GBM^{Tet3} (lado izquierdo). Las imágenes de estos tumores también se muestran (panel derecho). **C)** Porcentaje de tumores formados según el tamaño (pequeño, mediano o grande) tras la inyección de células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. **D)** Porcentaje de supervivencia en días en ratones inmunocomprometidos inyectados intracranalmente con células de GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. Barra de escala en B: 500 mm; en C: 100 mm.

Para dilucidar el posible papel de la enzima TET3 en la formación y desarrollo del GBM en el cerebro, 300.000 células GBM^{control}, células GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} se inyectaron esterotáxicamente en el estriado de ratones inmunocomprometidos *Nude* (Figura 53D) (Gargini et al., 2020). Este procedimiento fue realizado por el grupo de Neurooncología del Instituto Carlos III dirigido por la Dra. Pilar Sánchez Gómez. El resultado de este estudio mostró una menor supervivencia en los ratones inyectados con células GBM^{Tet3}, no alcanzando los 100 días de vida en ninguno de los 8 animales inyectados (Figura 35D). En cambio, los ratones inyectados con células GBM^{control} y GBM^{Tet3 CDmut} sobrevivieron más tiempo (Figura 35D).

3.4. TET3 regula la expresión de los genes improntados en el GBM

La impronta genómica es un proceso regulado principalmente por las marcas de metilación situadas en las regiones de control de impronta o ICRs que controlan la expresión de los genes

improntados (Plass and Soloway, 2002). Para determinar la posible acción de la enzima TET3 en la metilación de estas regiones y por tanto en la regulación de los genes improntados en GBM, se realizó un análisis de expresión de los genes improntados y de su estado de metilación tras la sobre-expresión de *Tet3*.

Con el fin de comprobar el efecto de *Tet3* en la expresión de genes improntados en el GBM, se analizó un total de 15 genes en células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. De estos 15 genes improntados, *Zdbf2*, *Peg10*, *Peg3*, *Cntn3*, *Snrpn*, *Igf2*, *Meg3* y *Rian* cambiaron su expresión en las células GBM^{Tet3} con respecto a las células GBM^{control} (**Figura 54A**); de los cuales, tres genes, *Zdbf2*, *Igf2* y *Meg3*, no vieron alterada su expresión en GBM^{Tet3 CDmut}, sugiriendo que los cambios tras la sobre-expresión de *Tet3* eran dependientes de la desmetilación del DNA. Sin embargo, algunos genes más como *Cdkn1c*, *Plagl1* y *Dlk1* mostraron una tendencia (**Figura 54A**).

Estos resultados sugieren que TET3 regula la expresión de múltiples genes improntados en GBM, siendo en algunos casos de forma dependiente de los procesos de metilación y desmetilación. De hecho, IGF2 es un factor crítico en el desarrollo de diferentes tumores, incluyendo los GBM (Livingstone, 2013) debido a su implicación en el proceso de proliferación y supervivencia celular (Oliva et al., 2018). Por tanto, el efecto de TET3 sobre la expresión de *Igf2* podría ser clave en su papel en la proliferación del GBM.

Para analizar el mecanismo por el cual TET3 regula la expresión de estos genes improntados, y teniendo en cuenta la actividad catalítica característica de las enzimas TET, se analizó el porcentaje de metilación de DMRs que controlan la expresión de diferentes genes improntados (**Figura 54**). El análisis de metilación mediante pirosecuenciación mostró alteraciones en el porcentaje de metilación de las 5 DMR/ICRs analizadas incluyendo la *H19* DMR, que controla la expresión de diferentes genes improntados, incluyendo *Igf2* (**Figura 54A**). Estas alteraciones implicaron una disminución de la metilación o hipometilación en las islas CpG de las dos DMRs paternalmente metiladas de genes improntados (*H19*-DMR e *IG*-DMR) (**Figura 54A**), pero una hipermetilación en las tres DMRs maternalmente metiladas analizadas (*Peg3* DMR, *Snrpn* DMR y *KvDMR*) (**Figura 54B**), sugiriendo una regulación diferencial en función del alelo metilado.

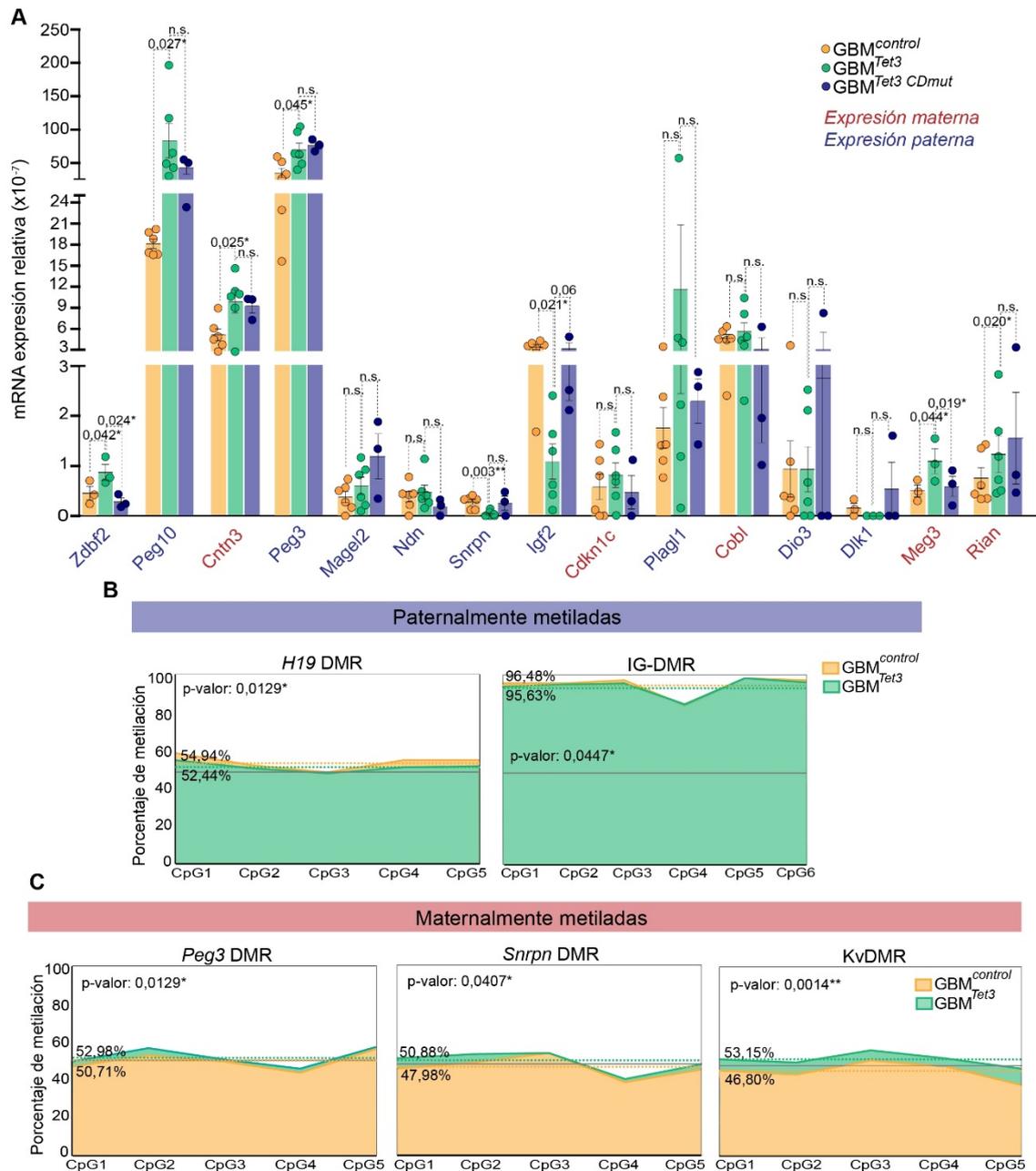


Figura 54. *Tet3* modula la expresión de genes improntados a través de la regulación de la metilación de las ICRs. A) qPCR de los genes improntados cuya expresión está alterada en la línea GBM-EGFR con respecto a las NSCs adultas. Los niveles de expresión se han analizado en NSCs adultas, en la línea GBM^{control} y en las células tumorales en las que se ha sobre-expresado *Tet3*, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut}. El gen *18S* se ha utilizado para relativizar los datos. B) La sobre-expresión de *Tet3* en el GBM murino muestra una hipometilación de las islas CpG de las DMRs paternalmente metiladas *H19* y IG-DMR. C) La sobre-expresión de *Tet3* en el GBM murino dio lugar a la hipermetilación de las islas CpG de las DMRs maternalmente metiladas *Peg3*, *Snrpn* y *KvDMR*. El porcentaje de metilación medio de tres cultivos en la región DMR ha sido indicado. Los p-valoros han sido indicados; n.s.: no significativo estadísticamente. Las barras de error muestran el s.e.m. de tres muestras por condición.

Debido al papel de TET3 en la desmetilación del DNA, la hipometilación podría ser asociada al efecto directo de la enzima dioxigenasa, mientras que los efectos de hipermetilación podrían explicarse por un efecto indirecto de TET3 sobre estas DMRs. Además, si bien se observaron cambios en el porcentaje de metilación en las 5 DMRs de los genes improntados analizadas, estos

fueron muy pequeños y no todos los genes improntados situados bajo la regulación de estas DMRs se vieron afectados tras la sobre-expresión de *Tet3* (Figura 54). Aunque los cambios en metilación no explican todos los cambios en la expresión de los genes improntados observados, en el caso del gen *Snrpn*, su expresión disminuyó en las células nucleofectadas con TET3 coincidiendo con la hipermetilación observada en su región reguladora (Figura 55A). La disminución de la expresión de *Igf2* en las células GBM^{Tet3} sería explicable por la hipometilación de *H19* DMR ya que aunque *Igf2* es un gen de expresión paterna, la metilación se encuentra en el alelo paterno, y TET3 produce la “maternalización” parcial del alelo paterno, y con ello, la disminución de la expresión de *Igf2* (Figura 55B). Los cambios observados en la expresión y metilación de *Igf2* a través de TET3 resultan muy prometedores en el entendimiento de los mecanismos implicados en la formación y desarrollo del GBM debido a la implicación de este factor en cáncer. Por ello, resulta clave el estudio de la *Igf2* sDMR y su posible implicación en la regulación de *Igf2* a través de TET3.

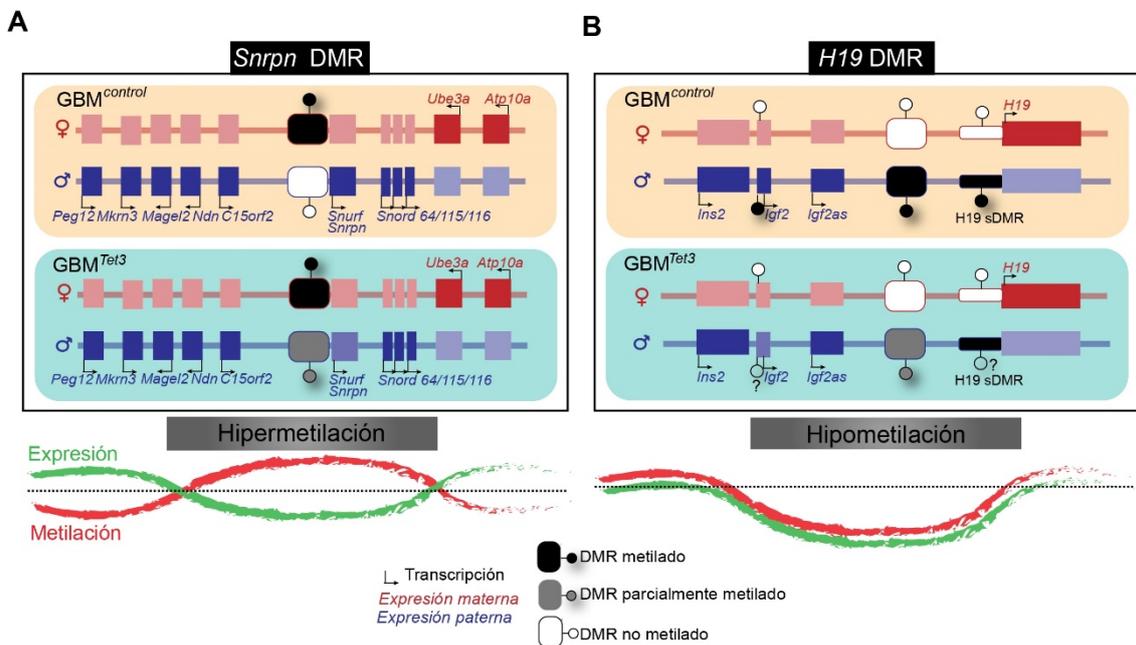


Figura 55. TET3 regula la metilación de *Snrpn* DMR y *H19* DMR disminuyendo la expresión de los genes improntados *Snrpne Igf2*. **A)** Esquema de la localización de los genes improntados regulados por *Snrpn* DMR en el alelo materno (rojo) y paterno (azul). La sobre-expresión de *Tet3* en la línea de GBM dio lugar a una hipermetilación de la región *Snrpn* DMR, con la consiguiente disminución de la expresión del gen improntado *Snrpn*. La expresión del resto de genes improntados del locus no aparece alterada al sobre-expresarse *Tet3*. **B)** Esquema de la localización de los genes improntados regulados por *H19* DMR en el alelo materno (rojo) y paterno (azul). La sobre-expresión de *Tet3* en el GBM (GBM^{Tet3}) dio lugar a una hipometilación de la región *H19* DMR, con la consiguiente disminución de la expresión del gen improntado de expresión paterna *Igf2*. El locus *H19* DMR contiene dos regiones más diferencialmente metiladas, somáticas, una de las cuales precisamente regula a *Igf2*.



Figuras suplementarias

Gen	Localización	Alelo expresado	Gen	Localización	Alelo expresado	Gen	Localización	Alelo expresado	Gen	Localización	Alelo expresado
<i>NDUFA4P1</i>	1p13.3	Paternal	<i>HOXA2</i>	7p15-p14AS	Maternal	<i>IFTM1</i>	11p15.5	Maternal	<i>ZNF597</i>	16p13.3AS	Maternal
<i>GFH</i>	1p22AS	Paternal	<i>EVX1</i>	7p15-p14	Paternal	<i>RAB1B</i>	11q12	Maternal	<i>NAA60</i>	16p13.3	Maternal
<i>DIRAS3</i>	1p31AS	Paternal	<i>HOXA5</i>	7p15-p14AS	Maternal	<i>ANO1</i>	11q13.3	Maternal	<i>SALL1</i>	16q12.1AS	Maternal
<i>FUCA1</i>	1p34AS	Paternal	<i>TMEM60</i>	7q11.23AS	Paternal	<i>ZC3H12C</i>	11q22.3	Paternal	<i>C16orf57</i>	16q21	Maternal
<i>RNU5D-1</i>	1p34.1AS	Paternal	<i>PEG10</i>	7q21	Paternal	<i>KBTBD3</i>	11q22.3AS	Paternal	<i>ACD</i>	16q22.1AS	Maternal
<i>BMP8B</i>	1p35-p32AS	Paternal	<i>MAGI2</i>	7q21AS	Maternal	<i>NTM</i>	11q25	Maternal	<i>FOXF1</i>	16q24	Maternal
<i>DVL1</i>	1p36AS	Maternal	<i>SGCE</i>	7q21-q22AS	Paternal	<i>ABCC9</i>	12p12.1AS	Maternal	<i>TP53</i>	17p13.1AS	Desconocido
<i>TP73</i>	1p36.3	Maternal	<i>PPP1R9A</i>	7q21.3	Maternal	<i>RBP5</i>	12p13.31AS	Maternal	<i>TMEM88</i>	17p13.1	Maternal
<i>WDR8</i>	1p36.3AS	Maternal	<i>TFPI2</i>	7q22AS	Maternal	<i>SLC38A4</i>	12q13AS	Desconocido	<i>PYY2</i>	17q11	Paternal
<i>RPL22</i>	1p36.3-p36.2AS	Paternal	<i>DLX5</i>	7q22AS	Maternal	<i>SLC26A10</i>	12q13	Maternal	<i>HOXB2</i>	17q21-q22AS	Maternal
<i>PRDM16</i>	1p36.23-p33	Paternal	<i>MEST</i>	7q32	Paternal	<i>LRP1</i>	12q13.3	Unknown	<i>HOXB3</i>	17q21.3AS	Maternal
<i>PEX10</i>	1p36.32AS	Maternal	<i>CPA4</i>	7q32	Maternal	<i>HOXC9</i>	12q13.3	Maternal	<i>LOC100131170</i>	17q25.3AS	Paternal
<i>TMEM52</i>	1p36.33AS	Paternal	<i>COPG2IT1</i>	7q32	Paternal	<i>HOXC4</i>	12q13.3	Maternal	<i>BRUNOL4</i>	18q12AS	Maternal
<i>HSPA6</i>	1q23	Maternal	<i>MESTIT1</i>	7q32.2AS	Paternal	<i>CDK4</i>	12q14AS	Maternal	<i>FAM59A</i>	18q12.1AS	Paternal
<i>PTRN14</i>	1q32.2AS	Maternal	<i>KLF14</i>	7q32.3AS	Maternal	<i>E2F7</i>	12q21.2AS	Maternal	<i>TCEB3C</i>	18q21.1AS	Maternal
<i>HIST3H2BB</i>	1q42.13	Maternal	<i>FASTK</i>	7q35AS	Maternal	<i>DCN</i>	12q21.33 AS	Desconocido	<i>PPAP2C</i>	19p13AS	Maternal
<i>OBSCN</i>	1q42.13	Paternal	<i>SLC4A2</i>	7q35-q36	Maternal	<i>KIAA1545</i>	12q24.33	Maternal	<i>DNMT1</i>	19p13.2AS	Paternal
<i>OR11L1</i>	1q44AS	Paternal	<i>PURG</i>	8p11AS	Paternal	<i>FBRS1L</i>	12q24.33	Maternal	<i>CHMP2A</i>	19q4S	Maternal
<i>LRR11M1</i>	2p12AS	Paternal	<i>DLGAP2</i>	8p23	Paternal	<i>ATP5F1E2</i>	13q12.2	Maternal	<i>TSZH3</i>	19q12AS	Paternal
<i>VAX2</i>	2p13	Maternal	<i>NKAIN3</i>	8q12.3	Paternal	<i>HTR2A</i>	13q14-q21AS	Maternal	<i>CHST8</i>	19q13.1	Maternal
<i>OTX1</i>	2p13	Maternal	<i>LY6D</i>	8q24-qterAS	Paternal	<i>RB1</i>	13q14.2	Maternal	<i>ZNF225</i>	19q13.2	Paternal
<i>CCDC85A</i>	2p16.1	Paternal	<i>GPT</i>	8q24.3	Maternal	<i>FLJ40296</i>	13q21.1	Maternal	<i>LILRB4</i>	19q13.4	Maternal
<i>ABCG8</i>	2p21	Maternal	<i>KCNK9</i>	8q24.3AS	Maternal	<i>FAM70B</i>	13q34	Maternal	<i>ZIM2</i>	19q13.4AS	Paternal
<i>CYP1B1</i>	2p21AS	Paternal	<i>ZFAT-AS1</i>	8q24.22	Paternal	<i>FOXP1</i>	14q13	Paternal	<i>ZNF264</i>	19q13.4	Desconocido
<i>ZFP36L2</i>	2p22.3-p21AS	Maternal	<i>PEG13</i>	8q24.22	Paternal	<i>FERMT2</i>	14q22.1AS	Paternal	<i>MZF1</i>	19q13.4AS	Maternal
<i>GPR1</i>	2q33.3AS	Paternal	<i>ZFAT</i>	8q24.22AS	Paternal	<i>SMOC1</i>	14q24.2	Maternal	<i>PEG3</i>	19q13.4AS	Paternal
<i>ZDBF2</i>	2q33.3	Paternal	<i>GLIS3</i>	9p24.2AS	Paternal	<i>DLK1</i>	14q32	Paternal	<i>MINT1</i>	19q13.4	Paternal
<i>TIGD1</i>	2q37.1AS	Paternal	<i>APBA1</i>	9q13-q21.1AS	Paternal	<i>DIO3</i>	14q32	Desconocido	<i>ZNF229</i>	19q13.31AS	Maternal
<i>MYEOV2</i>	2q37.3AS	Paternal	<i>C9orf85</i>	9q21.13	Paternal	<i>MEG3</i>	14q32	Maternal	<i>NLRP2</i>	19q13.42	Maternal
<i>ALDH1L1</i>	3q21.3AS	Maternal	<i>FLJ46321</i>	9q21.32	Maternal	<i>RTL1</i>	14q32.31AS	Paternal	<i>MIR371A</i>	19q13.42	Paternal
<i>ZIC1</i>	3q24	Maternal	<i>LMX1B</i>	9q34	Maternal	<i>SNORD114-1</i>	14q32.31	Maternal	<i>C20orf82</i>	20p12.1	Paternal
<i>HES1</i>	3q28-q29	Paternal	<i>PHPT1</i>	9q34.3	Maternal	<i>MEG8</i>	14q32.31	Maternal	<i>ISM1</i>	20p12.1	Paternal
<i>FGFR1L1</i>	4p16	Maternal	<i>EGFL7</i>	9q34.3	Paternal	<i>SNORD113-1</i>	14q32.31	Maternal	<i>PSIMCT-1</i>	20q11.2	Paternal
<i>KIAA1530</i>	4p16.3	Maternal	<i>C9orf116</i>	9q34.3AS	Paternal	<i>MAGEL2</i>	15q11-q12AS	Paternal	<i>BLCAP</i>	20q11.2-q12AS	Depen. isof.
<i>SPON2</i>	4p16.3AS	Paternal	<i>GATA3</i>	10p15	Paternal	<i>MKRN3</i>	15q11-q13	Paternal	<i>NNAT</i>	20q11.2-q12	Paternal
<i>NAP1L5</i>	4q22.1AS	Paternal	<i>LDB1</i>	10q24-q25AS	Maternal	<i>UBE3A</i>	15q11-q13AS	Maternal	<i>MCTS2</i>	20q11.21	Paternal
<i>ADAMTS16</i>	5p15	Maternal	<i>NKX6-2</i>	10q26AS	Maternal	<i>NPAP1</i>	15q11-q13	Desconocido	<i>GDAP1L1</i>	20q12	Paternal
<i>CDH18</i>	5p15.2-p15.1AS	Paternal	<i>C10orf93</i>	10q26.3AS	Maternal	<i>ZNF127AS</i>	15q11-q13	Desconocido	<i>SGK2</i>	20q13.2	Paternal
<i>ERAP2</i>	5q15	Paternal	<i>VENTX</i>	10q26.3	Maternal	<i>SNORD109A</i>	15q11.2	Paternal	<i>COL9A3</i>	20q13.3	Maternal
<i>VTRNA2-1</i>	5q31.1AS	Paternal	<i>PAOX</i>	10q26.3	Maternal	<i>SNORD108</i>	15q11.2	Paternal	<i>GNAS</i>	20q13.3	Depen. isof.
<i>CSF2</i>	5q31.1	Maternal	<i>C10orf91</i>	10q26.3	Maternal	<i>SNORD107</i>	15q11.2	Paternal	<i>L3MBTL</i>	20q13.12	Paternal
<i>BTNL2</i>	6p21.3AS	Maternal	<i>INPP5F V2</i>	10q26.11	Paternal	<i>SNORD109B</i>	15q11.2	Paternal	<i>SANG</i>	20q13.32	Paternal
<i>ADTRP</i>	6p24.1AS	Maternal	<i>WT1-AS</i>	11p13	Paternal	<i>ATP10A</i>	15q11.2AS	Maternal	<i>GNASAS</i>	20q13.32AS	Paternal
<i>FAM50B</i>	6p25.2	Paternal	<i>WT1</i>	11p13AS	Paternal	<i>SNRPN</i>	15q11.2	Paternal	<i>MIR298</i>	20q13.32AS	Paternal
<i>MRAP2</i>	6q14.2	Paternal	<i>PKP3</i>	11p15	Maternal	<i>SNORD116@</i>	15q11.2	Paternal	<i>MIR296</i>	20q13.32AS	Paternal
<i>C6orf117</i>	6q14.3	Paternal	<i>KCNQ10T1</i>	11p15	Paternal	<i>SNORD115-48</i>	15q11.2	Paternal	<i>C20orf20</i>	20q13.33	Maternal
<i>LIN28B</i>	6q21	Paternal	<i>OSBPL5</i>	11p15.4AS	Maternal	<i>SNORD115@</i>	15q11.2	Paternal	<i>SIM2</i>	21q22.2	Paternal
<i>AIM1</i>	6q21	Paternal	<i>KCNQ1DN</i>	11p15.4	Maternal	<i>PWCR1</i>	15q11.2	Paternal	<i>DGCR6</i>	22q11.21	Random
<i>PLAGL1</i>	6q24-q25AS	Paternal	<i>KCNQ1</i>	11p15.5	Maternal	<i>GABRA5</i>	15q11.2-q12	Paternal	<i>DGCR6L</i>	22q11.21AS	Random
<i>HYMAI</i>	6q24.2AS	Paternal	<i>B4GALNT4</i>	11p15.5	Maternal	<i>GABRB3</i>	15q11.2-q12AS	Paternal	<i>FLJ20464</i>	22q12.2	Paternal
<i>SLC22A2*</i>	6q26AS	Maternal	<i>TH</i>	11p15.5AS	Desconocido	<i>NDN</i>	15q11.2-q12AS	Paternal			
<i>SLC22A3*</i>	6q26-q27	Maternal	<i>H19</i>	11p15.5AS	Maternal	<i>GABRG3</i>	15q12	Paternal			
<i>BRP44L</i>	6q27AS	Paternal	<i>NAP1L4</i>	11p15.5AS	Desconocido	<i>SNURF</i>	15q12	Paternal			
<i>GRB10</i>	7p12-p11.2AS	Depen. isof.	<i>CDKN1C</i>	11p15.5AS	Maternal	<i>SNORD64</i>	15q12	Paternal			
<i>DDC</i>	7p12.2AS	Depen. isof.	<i>PHLDA2</i>	11p15.5AS	Maternal	<i>GATM</i>	15q21.1AS	Desconocido			
<i>GLI3</i>	7p13AS	Maternal	<i>IGF2AS</i>	11p15.5	Paternal	<i>RASGRF1</i>	15q24.2AS	Desconocido			
<i>HOXA3</i>	7p15-p14AS	Maternal	<i>SLC22A18</i>	11p15.5	Maternal	<i>MIR184</i>	15q25.1	Desconocido			
<i>HOXA11</i>	7p15-p14AS	Maternal	<i>INS</i>	11p15.5AS	Paternal	<i>IRAIN</i>	15q26.3AS	Paternal			
<i>HOXA4</i>	7p15-p14AS	Maternal	<i>IGF2</i>	11p15.5AS	Paternal	<i>SOX8</i>	16p13.3	Paternal			

Figura Suplementaria 1. Lista de genes improntados descritos en humanos y obtenidos de la base de datos GenImprint (www.genemprint.com). Se indica el nombre del gen, la localización en los distintos cromosomas y el alelo expresado. En azul se muestran los genes de expresión paterna y en rojo, los de expresión materna. En negro se muestran genes cuya expresión alélica no está clara o es dependiente de isoforma.

Gen	Localización	Alelo expresado	Gen	Localización	Alelo expresado	Gen	Localización	Alelo expresado
<i>Gpr1</i>	1:63172690-63224208	Paternal	<i>Ube3a</i>	7:59086618-59184595	Maternal	<i>Mir154</i>	12:109728432-109748497	Maternal
<i>Zdbf2</i>	1:63263268-63324574	Paternal	<i>Pwcr1</i>	7:59533858-59553947	Paternal	<i>Mir127</i>	12:109582845-109602914	Maternal
<i>Mcts2</i>	2:152677147-152697945	Paternal	<i>Zfp127as</i>	7 29.0 cM	Maternal	<i>B830012L14Rik</i>	12:110923795-110950797	Maternal
<i>Mir298</i>	2:174257503-174277584	Paternal	<i>Mkrn3</i>	7:62286542-62309088	Paternal	<i>Dio3os</i>	12:110231817-110254501	Maternal
<i>Mir296</i>	2:174257046-174277124	Paternal	<i>Snrpn</i>	7:59852063-59894053	Paternal	<i>AF357355</i>	12:109644626-109664696	Maternal
<i>Sfmbt2</i>	2:10360450-10605252	Paternal	<i>Ampd3</i>	7:110762603-110822394	Maternal	<i>Mir370</i>	12:109608257-109628335	Maternal
<i>Wt1</i>	2:104917367-104984450	Maternal	<i>H19</i>	7:142565531-142588145	Maternal	<i>Mir136</i>	12:109585326-109605387	Maternal
<i>Gatm</i>	2:122275912-122312702	Maternal	<i>Igf2as</i>	7 69.09 cM	Paternal	<i>Mir410</i>	12:109733714-109753794	Maternal
<i>H13</i>	2:152659460-152718667	Maternal	<i>Ins2</i>	7:142478050-142499097	Paternal	<i>Mir411</i>	12:109700174-109720255	Maternal
<i>Nnat</i>	2:157375845-157398257	Paternal	<i>Th</i>	7:142882775-142909965	Maternal	<i>Mir380</i>	12:109701802-109721862	Maternal
<i>Bicap</i>	2:157372097-157402096	Depen. isof.	<i>Ascl2</i>	7:142766215-142788616	Maternal	<i>Mir380</i>	12:109701802-109721862	Maternal
<i>Nespas</i>	2:174271236-174305435	Paternal	<i>Kcnq1</i>	7:142906643-143246431	Maternal	<i>Mir431</i>	12:109580446-109600536	Maternal
<i>Gnas</i>	2:173917259-173999682	Depen. isof.	<i>Tssc4</i>	7:142868757-142890476	Maternal	<i>Mir376b</i>	12:109713457-109733538	Maternal
<i>Ngfb</i>	3:102263850-102334927	Paternal	<i>Cd81</i>	7:142852184-142887313	Maternal	<i>Dlk1</i>	12:109891029-109918497	Paternal
<i>Gnai3</i>	3:108225354-108284169	Maternal	<i>Kcnq1ot1</i>	7:474882-579156	Paternal	<i>Gtl2</i>	12:109983424-110019518	Maternal
<i>Lin28a</i>	4:133993329-134028815	Desconocido	<i>AF313042</i>	7 69.5 cM	Maternal	<i>AF357428</i>	12 54.5 cM	Maternal
<i>Trp73</i>	4:152892643-152994007	Desconocido	<i>Phlda2</i>	7:143300937-143321913	Maternal	<i>AF357426</i>	12:109632837-109652903	Maternal
<i>Magi2</i>	5:19217045-20714791	Paternal	<i>Slc22a18</i>	7:143273178-143318711	Maternal	<i>AF357425</i>	12:109626011-109646079	Maternal
<i>Il6</i>	5:30003160-30029967	Desconocido	<i>Cdkn1c</i>	7:143257729-143280385	Maternal	<i>AF357341</i>	12 54.5 cM	Maternal
<i>Fkbp6</i>	5:135310557-135390661	AS	<i>Nap14</i>	7:143312968-143368479	Maternal	<i>Rian</i>	12:109593944-109671715	Maternal
<i>Mkrn1-ps1</i>	5:89902715-89923906	Paternal	<i>Tnfrsf23</i>	7:143465196-143505261	AS	<i>Dio3</i>	12:110717039-110738901	Paternal
<i>Mir335</i>	6:30731298-30751395	Desconocido	<i>Tnfrsf22</i>	7:143626724-143659637	Maternal	<i>Begain</i>	12:110260391-110316426	Depen. isof.
<i>Pon3</i>	6:5160851-5216232	Maternal	<i>AK155734</i>	7 69.57 cM	Maternal	<i>Mirg</i>	12 F1	Maternal
<i>Peg10</i>	6:4687379-4720475	Paternal	<i>Tnfrsf26</i>	7:143597684-143637844	Maternal	<i>Rtl1</i>	12:110027975-110053209	Paternal
<i>Ppp1r9a</i>	6:4843319-5125660	Maternal	<i>Osbp15</i>	7:143488151-143561352	AS	<i>Htr2a</i>	14:73364994-73451013	Maternal
<i>Tfpi2</i>	6:3902594-3928353	Maternal	<i>Nctc1</i>	7:142534608-142568597	Paternal	<i>Slc38a4</i>	15:96882700-96963836	Paternal
<i>Sgce</i>	6:4614349-4707098	Paternal	<i>Igf2</i>	7:142194504-142230565	Paternal	<i>Peg13</i>	15:72667450-72692172	Paternal
<i>Asb4</i>	6:5373385-5443021	Maternal	<i>Zim2</i>	7:6245833-6276491	Maternal	<i>Galnt6</i>	15:100577795-100637256	Paternal
<i>Calcr</i>	6:3625733-3728615	Maternal	<i>Snurf</i>	7:59857551-59894073	Paternal	<i>Kcnk9</i>	15:72332548-72386708	Maternal
<i>Mest</i>	6:30678072-30708466	Paternal	<i>Atp10a</i>	7:58516200-58706659	Maternal	<i>Dact2</i>	17:11049226-12292256	Maternal
<i>Aqp1</i>	6:55303283-55335539	Maternal	<i>Inpp5f V2</i>	7:135744878-135849949	Paternal	<i>Qpct</i>	17:79349334-79407806	Maternal
<i>Pon2</i>	6:5204623-5258372	Maternal	<i>Gab1</i>	8:80754433-80890478	Paternal	<i>Prkn</i>	17:14405491-14434594	Maternal
<i>Cpa4</i>	6:30508385-30551756	Maternal	<i>Ntm</i>	9:28985963-29973128	Desconocido	<i>Slc22a3</i>	17:12253329-12361061	Maternal
<i>Klf14</i>	6:30897682-30918981	Maternal	<i>Mir184</i>	9:88366746-88449851	Paternal	<i>Slc22a2</i>	17:12417546-12481845	Maternal
<i>Copg2</i>	6:30729597-30836920	Maternal	<i>Musd2</i>	9	Desconocido	<i>Igf2r</i>	17:12515770-12623021	Maternal
<i>Nap115</i>	6:58824811-58846642	Paternal	<i>Rasgrf1</i>	9:89781564-89919031	Paternal	<i>Air</i>	17:12581652-12605350	Paternal
<i>Ano1</i>	7:144578548-144748591	Maternal	<i>Sdhd</i>	9:50338575-50366046	Desconocido	<i>Thbs2</i>	17:14875761-14924523	Maternal
<i>LOC101055709</i>	7:6977608-6999822	Desconocido	<i>Hymai</i>	10	Paternal	<i>Smoc2</i>	17:14489767-14635051	Maternal
<i>Dhcr7</i>	7:143813166-143858409	Maternal	<i>Plagl1</i>	10:12771106-12830085	Paternal	<i>Impact</i>	18:13105420-13146116	Paternal
<i>Nlrp2</i>	7:5291545-5364033	Paternal	<i>Dcn</i>	10:97305361-97364024	Maternal	<i>Ins1</i>	19:52307761-52328342	Paternal
<i>Peg3os</i>	7:6696759-6717623	Maternal	<i>Ctnna3</i>	10:62815454-64408298	Desconocido	<i>Gm35612</i>	X:49616265-49661474	Maternal
<i>Peg3</i>	7:6300045-6344504	Paternal	<i>Ccdc40</i>	11:119218571-119275211	Desconocido	<i>Rhox5</i>	X:37794841-37818877	Depen. isof.
<i>Usp29</i>	7:6324668-6581301	Paternal	<i>Platr20</i>	11:51070659-51121244	Paternal	<i>Tsix</i>	X:99624235-99697675	Maternal
<i>Zim1</i>	7:6269528-6310517	Maternal	<i>Ddc</i>	11:11704105-11800403	Paternal	<i>Jpx</i>	X:103483575-103516424	Paternal
<i>Zim3</i>	7 7.0 cM	Maternal	<i>Grb10</i>	11:11820510-11947357	Depen. isof.	<i>Ftx</i>	X:103550909-103633753	Paternal
<i>Zfp264</i>	7 7.0 cM	Paternal	<i>Commd1</i>	11:22789727-22892283	Maternal	<i>Zcchc13</i>	X:103620585-103641663	Maternal
<i>Ndn</i>	7:62217297-62238877	Paternal	<i>Zrsr1</i>	11:22962004-22986495	Paternal	<i>Xist</i>	X:99653091-99695951	Paternal
<i>Magel2</i>	7:62245928-62270589	Paternal	<i>U2af1-rs1</i>	11:22862036-22884907	Paternal			
<i>Peg12</i>	7:62330820-62353459	Paternal	<i>Smoc1</i>	12:81063581-81243187	Paternal			
<i>Gabrg3</i>	7:56582260-57264816	Desconocido	<i>AF357359</i>	12:109640708-109660737	Maternal			
<i>Gabra5</i>	7:57265687-57387872	Desconocido	<i>Mir337</i>	12:109575788-109595884	Maternal			
<i>Gabrb3</i>	7:57448397-57706665	Maternal	<i>Mir134</i>	12:109724138-109744208	Maternal			

Figura Suplementaria 2. Lista de genes improntados descritos en ratón y obtenidos de la base de datos GenImprint (www.genemprint.com). Se indica el nombre del gen, la localización en los distintos cromosomas y el alelo expresado. En azul se muestran los genes de expresión paterna y en rojo, los de expresión materna. En negro se muestran genes cuya expresión alélica no está clara o es dependiente de la isoforma.

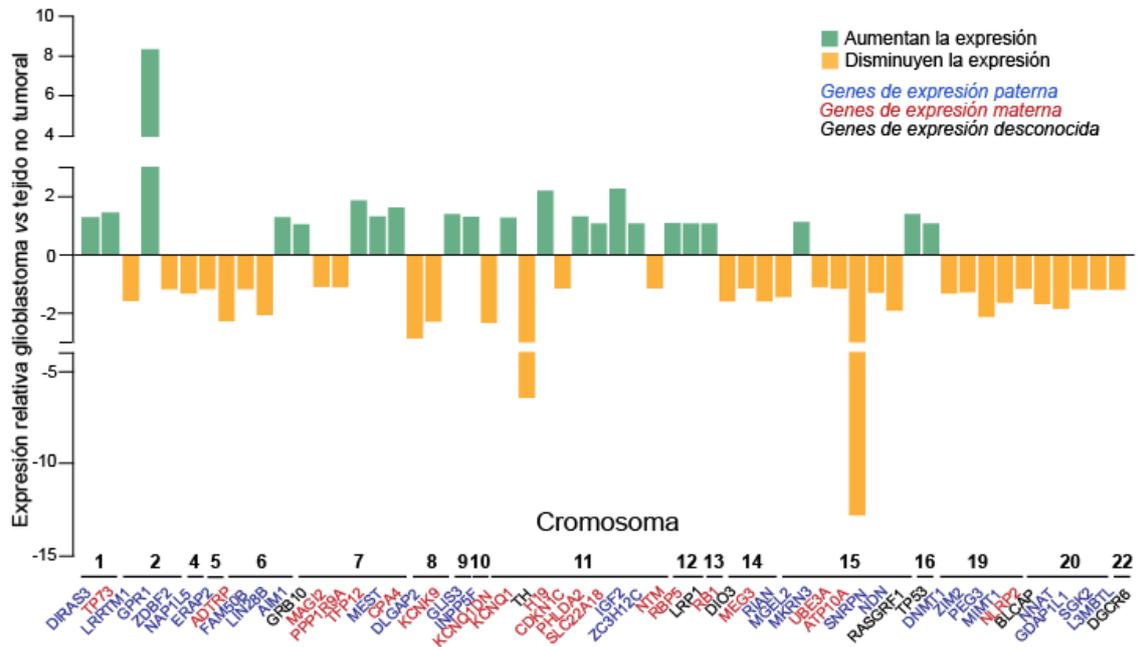


Figura Suplementaria 3. La expresión de genes improntados aparece altamente alterada en GBM humano. Expresión de genes improntados (obtenidos de GenelMprint) en muestras de pacientes de GBM frente a tejido no tumoral a partir de la base de datos de Gill de la plataforma GlioVis. En verde se muestran los genes que aumentan su expresión en el GBM, mientras que la disminución se ha indicado en naranja. Los genes maternalmente expresados han sido indicados en rojo y los genes paternalmente expresados aparecen en azul. Aquellos genes cuya expresión alélica no está clara se muestran en negro. Los genes han sido ordenados por cromosoma.

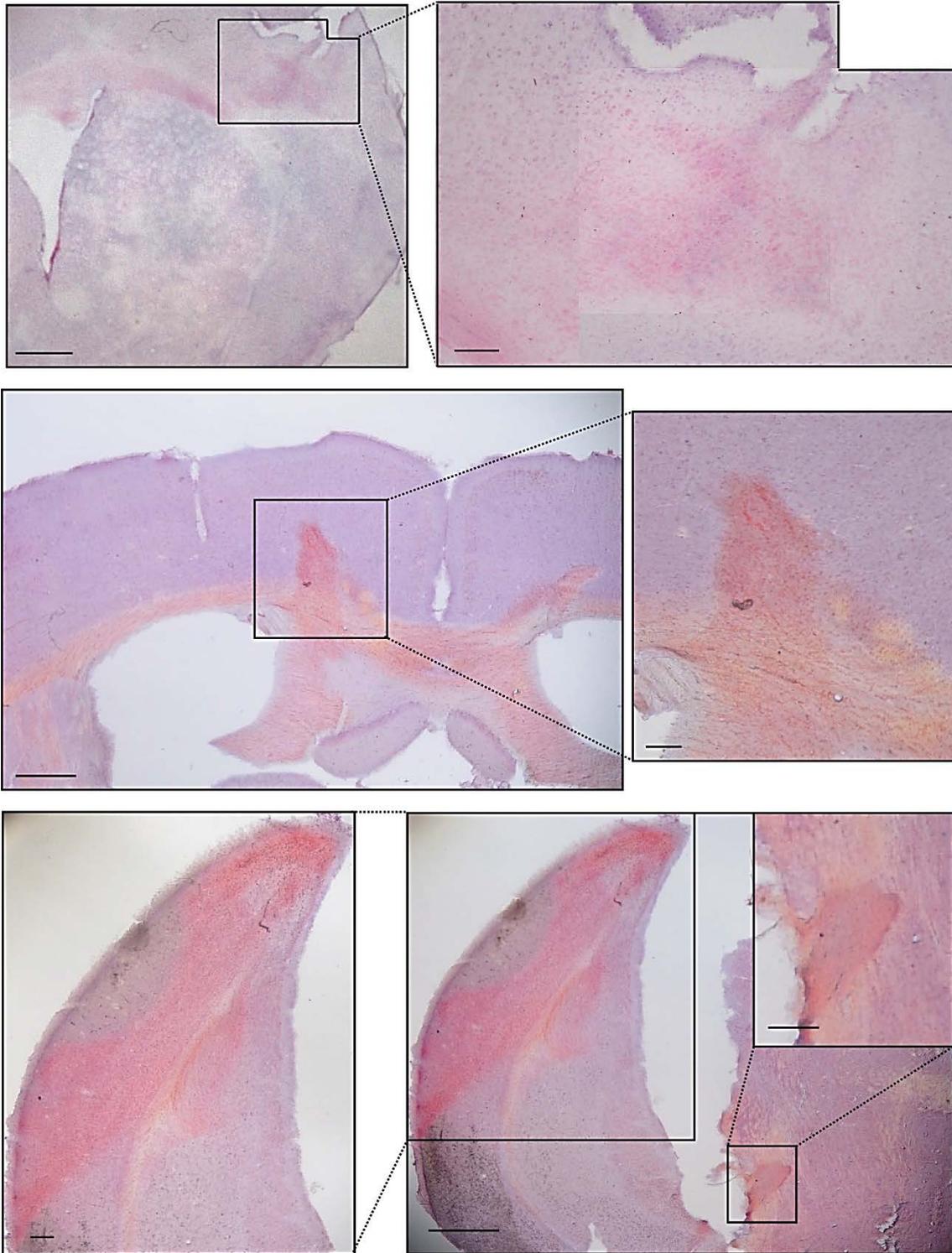


Figura Suplementaria 4. Los ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F forman tumores en cerebro. Tinción con hematoxilina y eosina en cortes coronales de 40 μm de grosor de cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F tras 4 semanas desde su tratamiento con 1 mg/ml de doxiciclina durante 4 semanas. Las regiones en las que se encontraron masas tumorales aparecen amplificadas. Barras de escala: 200 μm (ampliaciones: 50 μm).

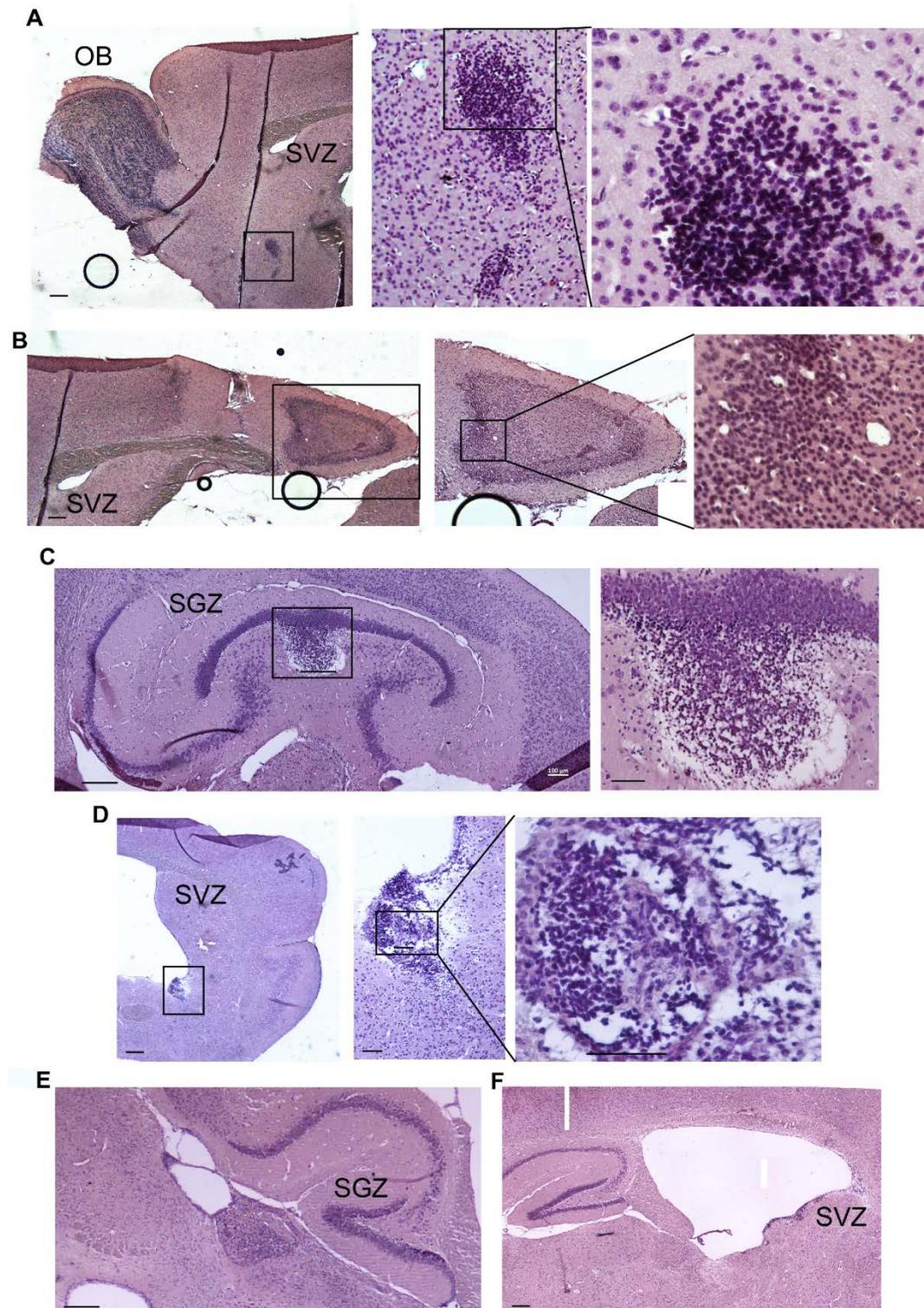


Figura Suplementaria 5. Tinción de tumores GFAP-rtTA;i4F en cortes sagitales de 10 μm de grosor. A) Tinción de un corte sagital de la parte rostral de una animal reprogramable con tumores. Las regiones en las que se encontraron masas tumorales aparecen amplificadas. **B)** Tinción de un corte sagital de la parte dorsal de una animal reprogramable con tumores. Las regiones en las que se encontraron masas tumorales aparecen amplificadas. **C)** Tinción de un corte sagital de un animal reprogramable donde aparece un tumor en la SGZ. **D)** Tinción de un corte sagital de un animal reprogramable donde aparece un tumor en la SVZ. **E)** Tinción de un corte sagital de un animal reprogramable donde aparece un tumor adyacente al ventrículo. **F)** Tinción de un corte sagital de un animal reprogramable donde aparece un tumor en la SVZ. Las regiones en las que se encontraron masas tumorales aparecen amplificadas. Barras de escala: 200 μm (amplificaciones: 50 μm).

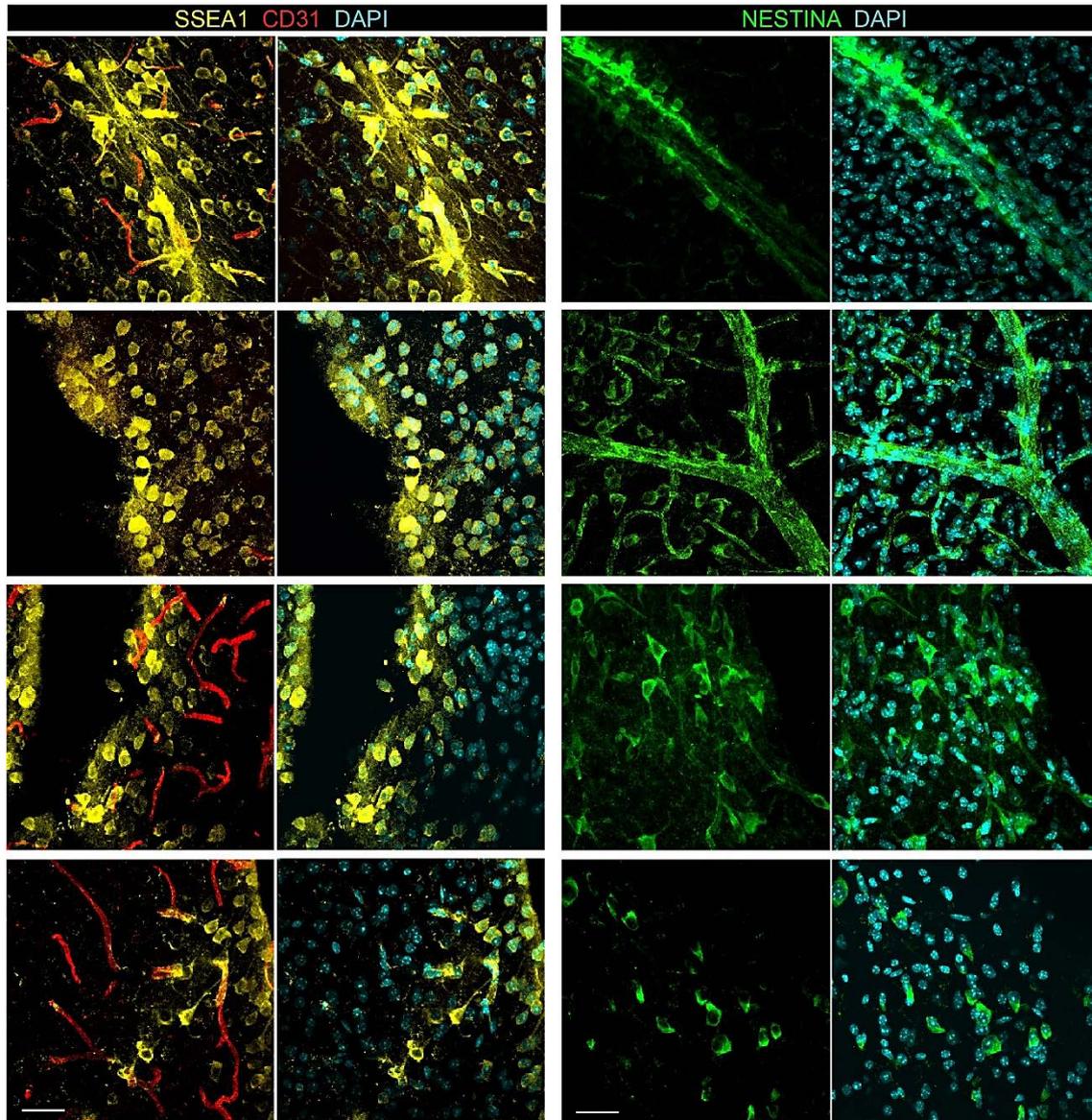


Figura Suplementaria 6. Los ratones reprogramables GFAP-rtTA;i4F forman tumores SSEA1 y Nestina positivos. IHC para SSEA1 (amarillo) y CD31 (rojo) en cerebros de animales GFAP-rtTA;i4F reprogramables tras el tratamiento con doxiciclina *in vivo* (panel izquierdo). Las células positivas para el marcador de pluripotencia temprano y de GSCs SSEA1 frecuentemente son observadas cerca de vasos sanguíneos y en regiones dañadas durante el corte del cerebro con vibratomo debido a la diferencia de consistencia de los tumores respecto al cerebro normal. IHC para NESTINA (verde) en cerebros de estos mismos animales (panel derecho). DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Barras de escala: 20 μ m.

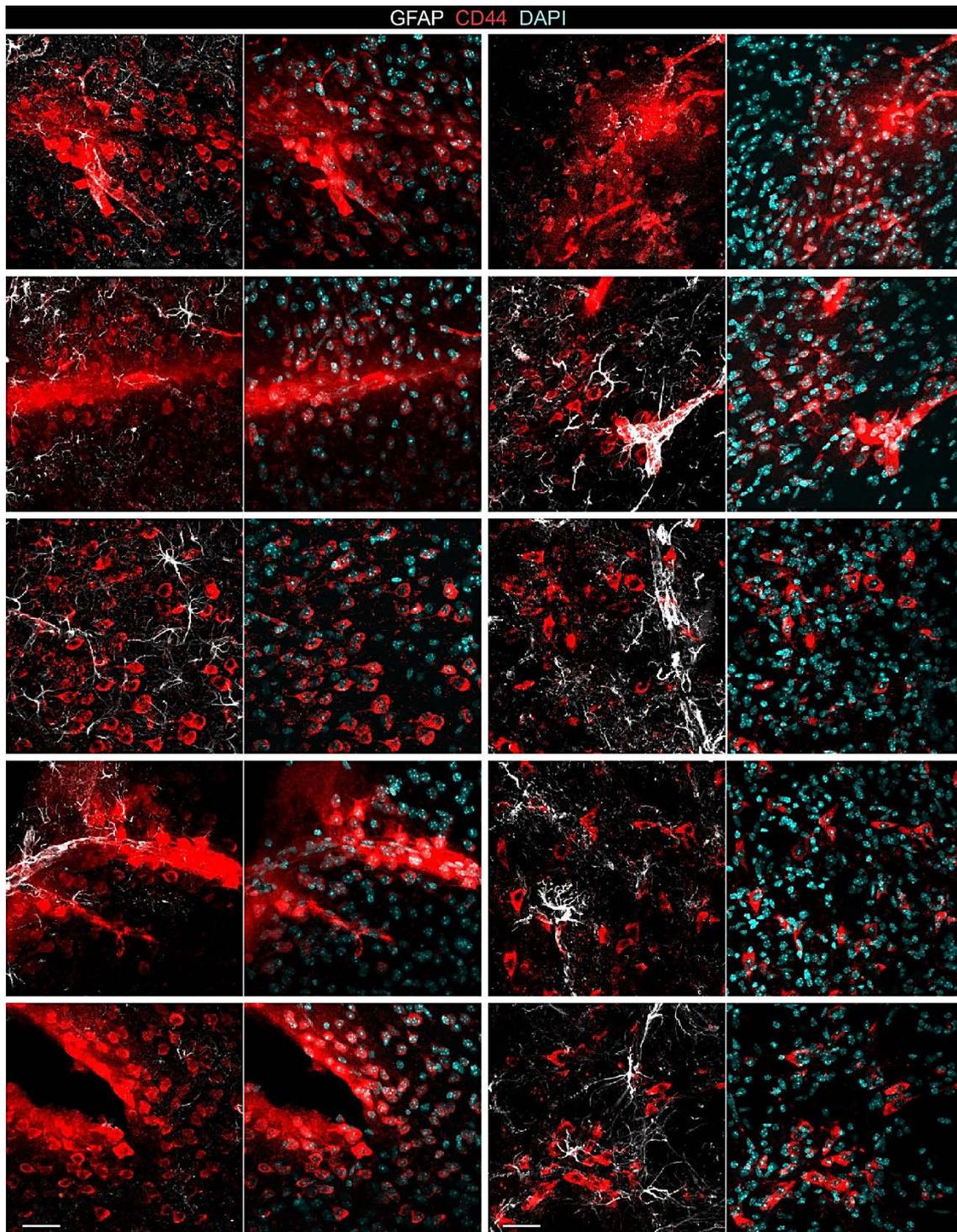
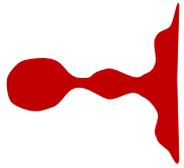


Figura Suplementaria 7. Los ratones reprogramables GFAP-rtTA;*i4F* forman tumores positivos para el marcador de GSC CD44. IHC para CD44 (rojo) y GFAP (blanco) en cerebros de animales GFAP-rtTA;*i4F* reprogramables tras el tratamiento con doxiciclina *in vivo*. Las células positivas para el marcador asociado al GBM mesenquimal frecuentemente son observadas cerca de vasos sanguíneos y en regiones dañadas durante el corte del cerebro con vibratomo debido a la diferencia de consistencia de los tumores respecto al cerebro normal. DAPI ha sido utilizado para contrateñir el núcleo. Barras de escala: 20 μm .

Discusión



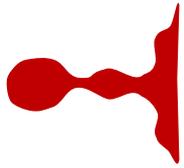
La impronta genómica ha sido implicada en múltiples procesos fisiológicos entre los que encontramos principalmente el desarrollo embrionario y extraembrionario, pero también el funcionamiento normal del SNC (Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011; Hoffmann et al., 2014). Además, alteraciones en la impronta genómica han sido implicadas en diversas patologías, que van desde ciertos trastornos neurológicos al cáncer (Bartolomei and Ferguson-Smith, 2011; Lozano-Urena et al., 2017). Sin embargo, se sabe poco acerca del posible papel de los genes improntados en el establecimiento y mantenimiento de las NSCs adultas. Curiosamente, la impronta de algunos de estos genes se relaja, o “apaga”, de manera específica en el nicho de la SVZ como mecanismo normal de modulación de la expresión génica para la regulación del comportamiento de las NSCs (Ferron et al., 2011; Ferron et al., 2015). Por tanto, las NSCs de la SVZ adulta disponen de mecanismos para regular el proceso de impronta genómica en genes específicos durante la neurogénesis postnatal (Ferron et al., 2011; Ferron et al., 2015). Por otro lado, las alteraciones en la impronta genómica y en la expresión de los genes improntados es uno de los mecanismos más comunes y tempranos en la formación del cáncer (Feinberg, 2007; Jelinic and Shaw, 2007; Kim et al., 2015; Uribe-Lewis et al., 2011) y muchas evidencias parecen indicar que las NSCs de la SVZ podrían ser las células de origen del GBM (Alcantara Llaguno et al., 2009; Alcantara Llaguno et al., 2019; Chesler et al., 2012; Jacques et al., 2010; Lee et al., 2018). Por todo ello, nos parece especialmente relevante estudiar el patrón de impronta genómica en las NSCs durante procesos de reprogramación celular y formación de tumores. Nuestros resultados muestran que la alteración de la identidad de las NSCs, tanto en la des-diferenciación como en su transformación maligna, conlleva múltiples cambios en la expresión de los genes improntados y en su estado epigenético. Los principales resultados derivados de esta tesis son: 1) La reprogramación de las NSCs a un estado pluripotente induce cambios en la expresión de genes improntados y en los niveles de metilación en las regiones de control de impronta o ICRs; 2) La reprogramación *in vivo* de células GFAP positivas produce tumores con diferentes perfiles celulares y cambios de expresión en genes improntados; 3) La enzima TET3 regula la proliferación y la expresión de genes improntados en células de GBM modulando su capacidad de formación de tumores *in vivo*.

El complejo proceso de formación de un nuevo ser vivo requiere un orden temporal muy preciso en la expresión de los genes durante el desarrollo, para así garantizar la correcta especificación de los distintos linajes celulares y la determinación del destino celular. Los mecanismos epigenéticos, entre los que se encuentra la impronta genómica, son fundamentales para regular dicha expresión génica. Nuestra aproximación global al estudio del posible papel de la impronta genómica en el destino y potencialidad de las NSCs, y la identificación de genes

improntados con un papel relevante en dichos mecanismos, ha sido la de determinar los cambios en el proceso de impronta genómica durante el proceso de reprogramación de las NSCs adultas. Para ello, se han reprogramado NSCs aisladas del nicho neurogénico de la SVZ a un estado de pluripotencia, caracterizándose las fases del proceso y la posterior readquisición de la identidad neural. El modelo utilizado para la reprogramación celular (Abad et al., 2013) ha permitido estudiar también la reprogramación *in vivo*. Una observación no esperada ha sido que la expresión del poli-transgén OSKM en células del cerebro del linaje astrocitario conduce a la aparición de tumores de tipo teratoma, como los que pueden generarse en otros tejidos, pero también a la aparición de tumores de tipo GBM. En todas las condiciones, tanto *in vitro* como *in vivo*, se detectan alteraciones en la expresión de un elevado porcentaje de genes improntados, sugiriendo un papel importante de este mecanismo epigenético en el proceso de reprogramación inducida y carcinogénesis en el cerebro.

La reprogramación celular inducida de NSCs adultas in vitro revela alteraciones del estado epigenético del proceso de impronta genómica

La utilización del modelo murino reprogramable i4F en este trabajo de tesis ha demostrado la adquisición de un estado de pluripotencia de células neurales del linaje astrocitario, que incluye a las NSCs. Los fibroblastos y otros tipos celulares han sido previamente reprogramados exitosamente a iPSCs con este modelo (Abad et al., 2013). Sin embargo, la generación de clones pluripotentes a partir de fibroblastos en nuestras manos ha requerido tiempos más largos para emerger las primeras características de pluripotencia que cuando las iPSCs han sido generadas a partir de las NSCs adultas. Además, en las primeras fases de la reprogramación celular las NSCs son tratadas con doxiciclina en ausencia de LIF, y en esas condiciones los cultivos muestran rápidamente características de estar parcialmente reprogramadas como indica la presencia del marcador de pluripotencia temprano SSEA1. Estas pre-iPSCs muestran una morfología similar a las ESCs y reducen la expresión de marcadores somáticos neurales como *Nestina* u *Olig2*, pero también se caracterizan por la expresión incompleta de genes de pluripotencia y por el mantenimiento de la expresión del transgén. Sin embargo, en respuesta al medio de cultivo definido 2i (Huang et al., 2018; Silva et al., 2008) y la adición de LIF, las pre-iPSCs sufren un reseteo transcripcional y epigenético que, en tan solo dos semanas, culmina con la adquisición de un estado de pluripotencia completo indistinguible fenotípica y funcionalmente del de las ESCs. Nuestro estudio no excluye la posibilidad de que células reprogramadas a partir de las NSCs pudieran generarse también sin necesidad del medio definido 2i/LIF, pero tales células no estarían siendo seleccionadas con nuestro protocolo, ya que éstas se generarían tras tiempos más largos de inducción y con menor frecuencia. Esta elevada



eficiencia en la respuesta de las NSCs a la inducción de la reprogramación pudiera ser favorecida por la expresión endógena en estas células de tres de los factores necesarios para la reprogramación como son *Sox2*, que mantiene su estado de SC y su multipotencia, *c-myc* que incrementa la actividad telomerasa en NSCs favoreciendo su proliferación (Miura et al., 2001) y *Klf4* que juega un papel importante en la estimulación de su división (Rowland et al., 2005). De hecho, la reprogramación inducida de NSCs adultas únicamente con la expresión de los genes *Oct4* y *Klf4* (Kim et al., 2008) o incluso con sólo el factor *Oct4* (Kim et al., 2009), ha sido demostrada tanto en NSCs humanas como murinas (Sterneckert et al., 2012).

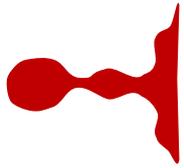
Por lo tanto, la adquisición del estado de pluripotencia en las iPSCs inducidas a partir de NSCs del modelo i4F-B, se ha conseguido eficientemente tras el aumento de la expresión endógena de *Oct4*, *Rex1* y *Nanog*, la disminución de la expresión simultánea de genes neurales y el silenciamiento de los genes exógenos, así como la reactivación el cromosoma X silenciado, procesos todos característicos en las iPSCs. Además, la inyección de las iPSCs generadas en animales inmunocomprometidos ha dado lugar a la formación de teratomas que contienen derivados de las tres capas germinales quedando así confirmada su capacidad de diferenciación. Destacar que nunca se han podido generar este tipo de teratomas a partir de NSCs adultas. Estas iPSCs-NSCs además, han mostrado poder ser rediferenciadas en neuroprogenitores, al recuperar la expresión de genes neurales como *Nestina*, *Olig2* y β *III-tubulina* y perder la expresión de los genes de pluripotencia. Este modelo *in vitro* supone una herramienta valiosa para el estudio de los procesos genéticos y epigenéticos que regulan la desdiferenciación de células somáticas.

El proceso epigenético de impronta genómica es considerado un mecanismo de control de la dosis génica que se establece previamente al nacimiento y que es mantenido de forma inmutable a lo largo de la vida del organismo (Hoffmann et al., 2014), por eso las funciones de los genes improntados se han centrado históricamente en su influencia en el desarrollo embrionario y la placenta (Lozano-Urena et al., 2017; Millership et al., 2019). Sin embargo, recientemente se han descrito procesos de “apagado” selectivo de la impronta genómica en tipos celulares específicos y en momentos del desarrollo concretos para así activar el alelo que está habitualmente reprimido por el proceso de impronta genómica (Lozano-Urena et al., 2017). Por ejemplo, el gen *Igf2* canónicamente expresado por el alelo paterno, se expresa bialélicamente por el plexo coroideo siendo secretado al líquido cefalorraquídeo para regular paracrinamente la función de las NSCs (Ferron et al., 2015; Lehtinen et al., 2011). Otro ejemplo de pérdida de impronta genómica es el que ocurre con gen *Dlk1* improntado en cerebro pero que se expresa bialélicamente en las NSCs y astrocitos de la SVZ tras el día postnatal 7, regulación necesaria para el mantenimiento de las NSCs y la neurogénesis adulta (Ferron et al., 2011).

Consistentemente, los resultados de esta tesis apuntan a que el proceso de impronta genómica es modulable dependiendo del estado de diferenciación de las células (Hoffmann et al., 2014). De hecho, más del 80% de los genes improntados analizados han mostrado cambios de expresión durante el proceso de reprogramación celular. Por ejemplo, la expresión de los genes *Peg3*, *Peg10* y *Peg12* disminuye claramente en las iPSCs-NSCs tras la reprogramación de las NSCs adultas. Estos genes son factores de transcripción de unión al DNA que controlan la proliferación, diferenciación y apoptosis en distintos tipos celulares (Lux et al., 2010; Relaix et al., 2000), por lo que pudieran tener un papel importante en el estado de diferenciación de las NSCs. Esto coincide con resultados previos donde se muestra una elevada expresión de, por ejemplo, *Peg3* en NSCs (Hoffmann et al., 2014) consistente con que su deficiencia promueva la reprogramación celular (Jang et al., 2016; Theka et al., 2017).

Curiosamente, el cromosoma 7 ha mostrado alteraciones en gran parte de los genes improntados allí localizados, como *Igf2*, que aumenta en las iPSCs, o *Ins2*, que disminuye, ambos situados en el mismo *cluster* de impronta y que juegan un papel clave en la regulación de la función cerebral (Lehtinen et al., 2011; Ziegler et al., 2019). Otros genes localizados en el cromosoma 7 como *Magel2*, *Ndn*, *Snrpn*, *Phlda* o *Th* y que están implicados en desórdenes genéticos también mostraron cambios de expresión en iPSCs respecto de las NSCs de origen. Estos datos son consistentes con estudios previos que muestran pérdida de impronta genómica de *Snrpn* y *Ndn* durante la reprogramación de células somáticas (Kim et al., 2013). Curiosamente la mayoría de genes improntados en este cromosoma son de expresión paterna, lo que podría sugerir efectos dominantes de la aportación genética paterna en el proceso de reprogramación. El estudio identifica además a algunos de los genes improntados de otro *cluster* improntado, el *Dlk1-Dio3*, localizado en el cromosoma 12, con cambios significativos de su expresión en iPSCs. Concretamente se ha observado un aumento de los genes *Dio3* y *Meg3*, y una disminución del gen *Dlk1* previamente implicado en la función de las NSCs (Ferron et al., 2011). Esto es consistente con trabajos previos que describen las frecuentes alteraciones en genes de este *cluster* en las iPSCs como posible marcador del estado de pluripotencia (Li et al., 2019; Li and Sasaki, 2011).

Además, un 40% del total de genes improntados con cambios de expresión durante el proceso de reprogramación, revirtieron su expresión tras las rediferenciación de las iPSCs-NSCs a NPs, lo cual apoya la idea de que el proceso de impronta genómica es más modulable de lo que se pensaba originariamente. Entre los genes rescatados destacan otra vez *Peg3*, *Peg10* y *Peg12* cuya expresión disminuida en iPSCs vuelve a incrementarse tras la diferenciación neural, sugiriendo nuevamente un papel crucial de estos genes en la función neural. Otros genes que



revertieron sus niveles de expresión en NPs son *Plagl1*, *Cobl*, *Ins2*, *Rasgrf1* y *Dlk1*, este último reconocido también por su papel en el comportamiento de las NSCs (Ferron et al., 2011).

El elevado número de alteraciones en la expresión de genes improntados, también detectadas en otros estudios (Kim et al., 2013; Li et al., 2019; Takikawa et al., 2013), sugieren que la regulación epigenética por metilación en las regiones de control de impronta pueda estar alterada durante la desdiferenciación de NSCs siendo la causante de los cambios de expresión observados. La adquisición de la metilación en las ICRs ocurre en la línea germinal durante la formación de los gametos. Estos DMRs germinales pueden estar metilados tanto en el cromosoma materno como en el paterno (Ferguson-Smith, 2011). Es interesante destacar que en las ICRs maternas, que representan la mayoría de las ICRs, la DMR se localiza cerca de promotores, mientras que las ICRs paternas se suelen encontrar en regiones intergénicas alejadas de los promotores (Adalsteinsson and Ferguson-Smith, 2014; Messerschmidt et al., 2014; Tucci et al., 2019). En los clusters de impronta genómica también se encuentran DMRs somáticas que adquieren la metilación tras la fertilización y que son dependientes de las DMRs germinales para su establecimiento (Adalsteinsson and Ferguson-Smith, 2014). Estas sDMRs también pueden estar metiladas paternal o maternalmente, pero en este caso se encuentran únicamente junto a promotores. La metilación diferencial tanto en las gDMRs como en las sDMRs es la responsable de la expresión de los genes improntados dentro del cluster que regulan (Tucci et al., 2019).

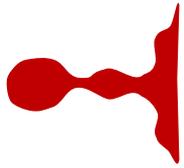
Nuestros estudios de metilación por pirosecuenciación han mostrado una hipometilación global en las ICRs, tanto germinales como somáticas, en las iPSCs generadas a partir de NSCs adultas, alteración previamente descrita en el proceso de reprogramación celular (Perrera and Martello, 2019). Es relevante destacar que los cambios a nivel de metilación observados fueron revertidos en algunos de los DMRs estudiados tras la rediferenciación de las iPSCs en NPs. Concretamente, las cuatro gDMRs metiladas paternalmente volvieron a los niveles de metilación de las NSCs tras la re-diferenciación, mientras que dicha reversión no se observó en las gDMRs metiladas maternalmente, lo cual es consistente con trabajos anteriores que ya sugieren una posible regulación diferente entre ambos tipos de DMRs durante el proceso de reprogramación (Bar et al., 2017; Perrera and Martello, 2019). De hecho, el fenómeno de pérdida de impronta genómica ocurre más frecuentemente en los genes situados bajo la regulación de DMRs paternalmente metiladas (Bar et al., 2017; Perrera and Martello, 2019; Rugg-Gunn et al., 2007).

Cambios de los niveles de metilación en las ICRs pueden conllevar a la pérdida del estado de impronta genómica en algunos o la totalidad de los genes que se regulan por esa ICR dentro del *cluster*. Es decir, que genes que se expresan de forma monoalélica, pueden activar el alelo silenciado tras los cambios en metilación de la DMR. Sin embargo, el análisis cruzado de los datos

de metilación y de expresión génica durante el proceso de reprogramación y re-diferenciación neural, ha mostrado una correlación significativa únicamente del gen *Dlk1*, situado en el cluster *Dlk1-Dio3* que se regula por el IG-DMR. *Dlk1*, como se ha mencionado anteriormente, es un caso excepcional, dado que, a pesar de expresarse únicamente por el alelo paterno en el cerebro, muestra una pérdida de impronta genómica específicamente en la población de NSCs localizadas en la SVZ, expresándose de forma bialélica (alelos materno y paterno) a partir del día postnatal 7 (Ferron et al., 2011). Esta pérdida de impronta genómica en NSCs va asociada a la hipermetilación de la IG-DMR en el alelo materno sin metilar (Ferron et al., 2011). Durante la reprogramación de las NSCs, *Dlk1* disminuye sus niveles de expresión significativamente, lo cual podría deberse a una readquisición del estado de impronta en las iPSCs generadas. Esto implicaría el silenciamiento de nuevo de uno de los alelos y debería estar mediado por la pérdida de metilación en el IG-DMR. En concordancia, la bajada de expresión de *Dlk1* observada en iPSCs coincide con la pérdida de metilación en la IG-DMR, aunque nuestros estudios de pirosecuenciación no nos permiten identificar el alelo que ha perdido la metilación. Sin embargo, el estudio de impronta genómica del gen mediante la secuenciación de SNPs en NSCs, iPSCs y NPS híbridos, confirma en primer lugar la readquisición del estado monoalélico del gen en iPSCs, estado que vuelve a perderse tras la re-diferenciación a NPs. Curiosamente, en el caso de las iPSCs el alelo expresado es el materno y el silenciamiento se produce en el paterno, situación no observada previamente en el cerebro. Es muy interesante destacar que el gen vecino *Meg3*, no altera su estado de impronta, a pesar de haber cambios de metilación en el IG-DMR que regula a todo el cluster, situación ya observada previamente en NSCs adultas (Ferron et al., 2011). Tampoco, se encuentra este tipo de regulación en otros dos genes improntados en placenta pero de expresión bialélica en las NSCs como *Gnas* o *Cobl*. Por lo que los resultados de este primer objetivo sugieren que el estado epigenético que regula la impronta genómica en los distintos clústeres no es un proceso tan dinámico como postulábamos en un principio, y que pudiera haber una regulación gen a gen que revela una especificidad celular y génica de los efectos de la impronta genómica. Además, nuestros resultados identifican al gen *Dlk1* como un jugador crucial en los procesos de mantenimiento y desdiferenciación de la NSC adulta.

La reprogramación inducida in vivo como un modelo eficiente de formación de tumores cerebrales

La generación experimental de tumores cerebrales *in vivo* en ratones, mediante modificaciones genéticas puntuales, resulta difícil y requiere de la combinación de diversas mutaciones o del trasplante de células tumorales ya establecidas (Miyai et al., 2017; Sampetean and Saya, 2018). Sin embargo, se han desarrollado modelos de reprogramación epigenética *in vivo* que resultan en la formación de tumores en los distintos órganos del ratón (Abad et al., 2013;



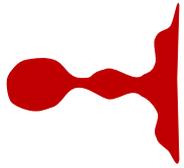
Ohnishi et al., 2014). De la misma manera, el modelo utilizado en este trabajo ha permitido detectar la formación de tumores cerebrales con una eficiencia del 100% mediante la inducción transitoria del transgén OSKM en células específicas. El modelo i4F-B, con el activador R26-rtTA y el transgén OSKM situados en el mismo cromosoma (Abad et al., 2013), ha demostrado recientemente que la reprogramación ocurre también en el hipocampo adulto (Rodríguez-Matellán et al., 2020). Los autores de este estudio observaron que el tratamiento con 2 mg/ml de doxiciclina durante 12 días, daba lugar a un aumento de expresión del gen pluripotente *Nanog* y cambios en ciertas marcas epigenéticas en el hipocampo, mientras que no se observó en la corteza cerebral de estos animales; sin embargo, no se reportó la presencia de tumores (Rodríguez-Matellán et al., 2020). Aunque la SVZ no fue analizada en este estudio, este resultado podría sugerir que las NSCs son más susceptibles a la reprogramación. No obstante, el tratamiento con 0,2 mg/ml de doxiciclina durante 2,5 semanas, basado en el protocolo de Abad et al., no nos ha permitido detectar procesos de reprogramación en el cerebro o la SVZ o la aparición de tumores en los cerebros de estos animales. El uso de una mayor concentración de antibiótico no ha sido posible debido a la alta mortalidad producida por el tratamiento. Sin embargo, sí se desarrollaron displasias hipertróficas en otros órganos, como ya había sido reportado previamente (Abad et al., 2013). Por tanto, este modelo de reprogramación no resultó ser eficiente para la formación de tumores en cerebro. Por ello, se generó un modelo específico de formación de tumores en cerebro, GFAP-rtTA;i4F, basado en el cruce del modelo de reprogramación i4F-A sin el activador transcripcional (Abad et al., 2013) con animales portadores del rtTA bajo el promotor de *Gfap*. El modelo GFAP-rtTA;i4F ha permitido generar tumores cerebrales en todos los animales tratados utilizando una mayor dosis de doxiciclina (1 mg/ml) que en el modelo anterior, debido a la ausencia de reprogramación en otros órganos. Además, la duración del tratamiento en este modelo también se extendió a 4 semanas, ya que en el trabajo de Abad et al. demostraron que un tratamiento con una menor dosis pero más prolongado era más eficiente en la formación de tumores que dosis altas durante un tiempo menor (Abad et al., 2013), y los animales se analizaron 4 semanas después del tratamiento.

Además, la reprogramación *in vivo* de los animales GFAP-rtTA;i4F ha mostrado ser capaz de formar tumores cerebrales con dos tipos de perfiles, los de fenotipo tipo teratomas que expresan el marcador SSEA1, de gran masa celular y muy vascularizados, y los del tipo GBM que contienen células que también expresan la proteína SSEA1 pero que además son Nestina y CD44 positivas. Sin embargo, no se han encontrado células *Nanog* positivas en ninguno de estos tumores ni en el parénquima cerebral. Desconocemos si la generación de tumores de tipo neural en el cerebro de los animales GFAP-rtTA;i4F es debida al contexto celular en el que se expresa el

transgén, al nivel de expresión o a las especificidades del diseño experimental para el tratamiento. La activación de un casete tetracistrónico similar en células que expresan Lgr5 conduce, inmediatamente tras la aplicación de doxiciclina en estos ratones, a la aparición de células desdiferenciadas y displásicas en distintos órganos con importantes cambios epigenéticos. Pero, si se analizan los riñones de estos animales tiempo después de la retirada del antibiótico se observa la formación de tumores de tipo Wilms, un cáncer renal pediátrico (Ohnishi et al., 2014). Además, las células reprogramadas, obtenidas tiempo después del tratamiento y trasplantadas en ratones inmunocomprometidos, se diferencian a células renales normales (Ohnishi et al., 2014). De la misma manera, el ensayo de formación de tumores a partir de la inyección de células reprogramadas en ratones GFAP-rtTA; i4F en el flanco de ratones inmunocomprometidos no ha mostrado capacidad tumorigénica por ahora, en contraposición a las GBM-EGFR inyectadas en paralelo como control positivo. Esto podría proporcionar una herramienta valiosa para realizar análisis y manipulaciones para el estudio de las propiedades tumorales, como el papel de la impronta genómica en el cáncer y otros cambios epigenéticos, en ausencia y/o presencia de mutaciones iniciadoras.

El GBM es un glioma incurable y devastador por lo que múltiples estudios tienen como objetivo la identificación de la célula de origen que sufre las mutaciones o alteraciones moleculares que conducen a la formación de este tipo de tumor. Varios estudios han sugerido que las NSCs en la SVZ adulta, tanto en ratón como en humano, pueden ser las células a partir de las cuales se originan estos tumores (Alcantara Llaguno et al., 2009; Alcantara Llaguno et al., 2019; Lee et al., 2018). Cabe destacar, además, que tal y como demostraron Alcantara Llaguno et al., 2019, el potencial de formación de un GBM disminuye a medida que disminuye el potencial de diferenciación, siendo las NSCs las más susceptibles a la transformación maligna (Alcantara Llaguno et al., 2019). Precisamente, el análisis de células aisladas a partir de animales reprogramados *in vivo* en cultivo podría indicar que sus NSCs se encontrasen en un estado intermedio de la transformación maligna al presentar niveles elevados de *Oct4*, *Cd133*, *Sox2*, *Egfr* y *Olig2*, apoyando la idea de la NSC como la célula de origen del GBM (Alcantara Llaguno et al., 2019; Chesler et al., 2012; Jacques et al., 2010). Más concretamente, algunos autores han sugerido a la NSC en su estado quiescente como la célula responsable del origen y el mantenimiento del GBM (Tejero et al., 2019). De hecho, se ha descrito la presencia de una población de división rápida y una población relativamente quiescente también dentro del GBM, siendo esta última la responsable de la recurrencia del tumor tras el tratamiento con radioterapia y quimioterapia (Chen et al., 2012; Deleyrolle et al., 2011; Tejero et al., 2019).

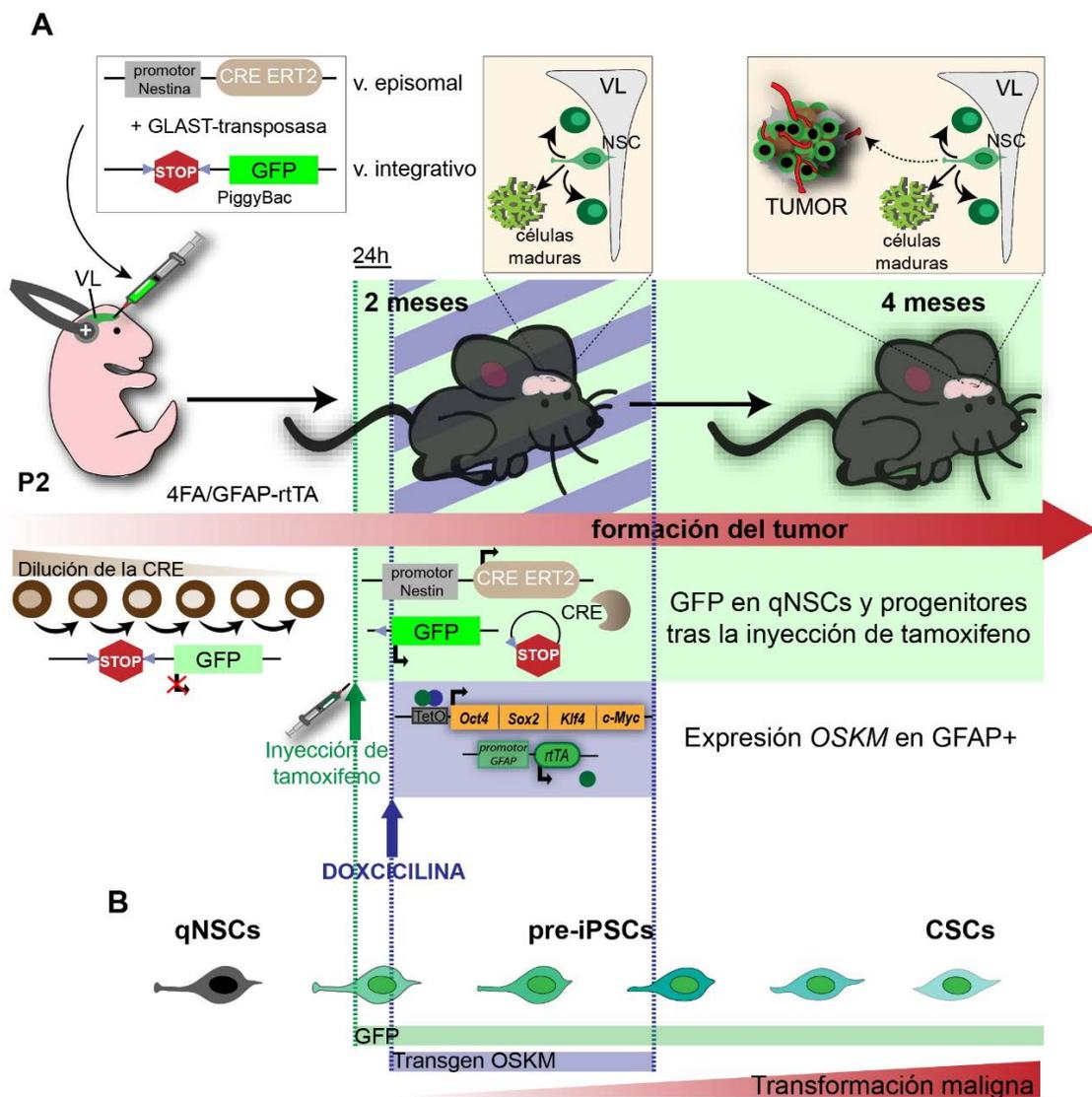
La estrategia genética elegida para la reprogramación cerebral podría potencialmente



iniciar dicho proceso en astrocitos maduros y en NSCs. A pesar de que todos los animales inducidos generaron tumores, el número de estos no superó en ningún caso los siete tumores por animal, lo cual podría indicar que la población celular capaz de formar estos tumores está representada en una menor proporción en el cerebro, como es el caso de las NSCs adultas. Sin embargo, hay que tener en cuenta también que el uso del promotor GFAP humano utilizado para generar la cepa transactivadora se expresa a mayor nivel en NSCs adultas que en astrocitos (Wang et al., 2004). En cualquier caso, algunos de los tumores tipo GBM encontrados en los cerebros de los ratones GFAP-rtTA;i4F mostraron células cercanas a la SVZ que se desplazaban agrupadas hacia el parénquima estriatal, donde se encontraba la masa tumoral principal. Esto sugiere una posible migración de las células desde el nicho neurogénico, como observaron en el estudio de Lee et al. 2018. Por ello, nos hemos planteado, como continuación de este trabajo, realizar estudios de trazado de destino celular para determinar el origen de los tumores y su relación con la diversidad encontrada, como se explica a continuación.

Recientemente se han caracterizado las poblaciones de NSCs quiescentes, en sus estados durmientes y *primed* (quiescentes pero preparadas para la activación), y activadas en la SVZ mediante secuenciación de RNA a nivel de célula única y por aislamiento prospectivo mediante citometría de flujo (Belenguer et al., 2020; Llorens-Bobadilla et al., 2015). Las células quiescentes son especificadas durante la etapa fetal, momento en el cual entran en un estado de quiescencia que puede ser muy prolongado (Fuentealba et al., 2015; Furutachi et al., 2015). La ausencia de divisiones en estas células puede ser utilizada experimentalmente para estudios de linaje con plásmidos episomales introducidos mediante electroporación en útero que serán diluidos por la mayoría de células, pero no por las NSCs quiescentes (Ortiz-Alvarez et al., 2019); resultados no publicados). Por ello, y con el fin de investigar la posible implicación de las NSCs quiescentes en la formación de tumores cerebrales, estamos llevando a cabo una estrategia de trazado de linaje mediante la electroporación, en animales postnatales 2 (P2) de la cepa GFAP-rtTA;i4F, de un vector PiggyBac con la proteína reportera GFP junto con la transposasa bajo el promotor de Glast, que también se activa en NSCs. Este vector contiene una secuencia STOP flanqueada por secuencias loxP, de tal manera que en presencia de una recombinasa CRE, la célula pasa a expresar GFP de manera permanente. Por ello, junto con el vector PiggyBac y la transposasa, se electropora un vector episomal que contiene la recombinasa bajo el promotor de NSCs Nestina, pero inducible por tamoxifeno (**Figura 56**). Al tratarse de un vector episomal, la recombinasa únicamente estará presente en las NSCs quiescentes, mientras que las células activas que se van produciendo diluirán el vector en cada proceso de división. A los dos meses de edad, estos animales serán inyectados con tamoxifeno para inducir la expresión de la CRE, y 24 horas después

se iniciará el tratamiento con 1 mg/ml de doxiciclina durante 4 semanas tras las cuales se retirará la doxiciclina. Si los tumores que se forman en estos animales proceden de NSCs quiescentes que han iniciado el proceso de dediferenciación hacia pre-iPSCs y transformación maligna en CSCs hasta conformar el tumor, las masas celulares neoplásicas presentarán células positivas para GFP (Figura 56). Estos experimentos se han iniciado ya en colaboración con la Dra. Cristina Gil, del Departamento de Biología Celular, Biología Funcional y Antropología Física de la Universidad de Valencia, experta en electroporación en útero y postnatal. Se ha iniciado ya el tratamiento con doxiciclina y estamos a la espera de la formación de tumores cerebrales para su análisis junto con inmunohistoquímica para la detección de la posible co-localización de células positivas para GFP junto con los marcadores de GBM descritos.



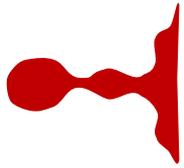


Figura 56. Estrategia de identificación de la célula de origen del tumor cerebral. A) Los animales GFAP-rtTA;*i4F* son electroporados a P2 en los ventrículos laterales con un vector episomal para la expresión inducible por tamoxifeno de la recombinasa CRE bajo el control del promotor *Nestina* y con un vector integrativo conteniendo la proteína GFP a expresar como resultado de la recombinación. Junto con estos dos vectores se electropora una transposasa bajo el control del promotor *Glast*. Los animales son inyectados con tamoxifeno al cumplir 2 meses de edad. Un día después a la inyección de tamoxifeno se inicia el tratamiento con 1 mg/ml de doxiciclina para la inducción de la reprogramación durante 4 semanas. Si las células responsables de la formación del tumor eran las NSCs quiescentes (qNSCs), el tumor formado estará compuesto de células verdes. **B)** Mediante esta estrategia, únicamente las qNSCs retienen el vector episomal y por tanto serán GFP+, así como las células que se formen a partir de las qNSCs tras la inyección del tamoxifeno. Si la qNSC es la célula de origen del tumor, durante el proceso de reprogramación, la qNSC comenzará el proceso de dediferenciación hasta formar la CSC, que será verde, así como las células que conformen el tumor producidas por estas CSCs.

Papel de la impronta genómica en la transformación maligna de las NSCs adultas

Las alteraciones en la impronta genómica y de la expresión de los genes improntados es uno de los mecanismos más comunes y tempranos en la formación del cáncer (Feinberg, 2007; Jelinic and Shaw, 2007; Kim et al., 2015; Uribe-Lewis et al., 2011). Además alteraciones de los niveles de *Dlk1*, *Snrpn* o *Igf2* y de las ICRs que controlan su expresión han sido previamente descritas en cáncer (Benetatos et al., 2010; Buccarelli et al., 2020; Xu et al., 2012). De hecho, los pacientes afectados por síndromes de impronta genómica presentan una mayor propensión a padecer tumores (Perrera and Martello, 2019; Uribe-Lewis et al., 2011), sugiriendo la implicación de este mecanismo en el desarrollo de la patología. Por lo tanto, el estudio del papel de la impronta genómica en la transformación maligna también en el SNC es una pieza clave en el diagnóstico y tratamiento de los tumores cerebrales.

El estudio de los datos de expresión de genes improntados obtenidos de distintas bases de datos en GBM humano, ha mostrado alteraciones de hasta el 70% de los genes improntados descritos hasta la fecha. Esto es consistente, con los estudios por qPCR que se han realizado en esta tesis en muestras de GBM murino, en las que el 50% de los genes analizados mostraron alteraciones de sus niveles de expresión. Este mismo estudio llevado a cabo en los tumores sólidos de animales GFAP-rtTA;*i4F* también ha permitido detectar alteraciones en la expresión de entre el 40 y 80% de los genes improntados dependiendo del tumor. Es interesante destacar que este estudio también identifica dos grupos diferentes de tumores en función de su perfil de expresión. Un grupo de tumores que muestran un aumento generalizado de la expresión de los genes improntados analizados, y el otro grupo que sufren una disminución masiva de dichos genes. Esto coincide con la presencia de los dos fenotipos de tumores GBM y teratoma. Estos resultados sugieren una vez más un papel importante del proceso epigenético de impronta genómica en la formación y el comportamiento del cáncer cerebral. Además, se sabe que la metilación del DNA es un mecanismo de regulación clave en el proceso del cáncer en el cerebro (Capper et al., 2018), por lo que alteraciones en los patrones de metilación de las regiones de

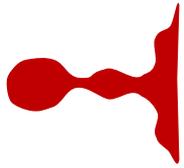
control de impronta son también esperables. De hecho, la hipermetilación de las ICRs ha sido observada en células cancerosas (Sharma et al., 2010). Por lo tanto queda pendiente, la realización de un estudio exhaustivo del perfil de metilación en los dos tipos de tumores generados en el modelo reprogramable GFAP-rtTA;4F.

La enzima TET3 participa en la regulación de la expresión de genes improntados de manera dependiente de la metilación.

Los estudios de las bases de datos de tumores humanos de Rembrant en GLIOVIS, muestran una menor expresión de *TET3* en los gliomas en general, y en el GBM en particular, siendo los niveles altos de *TET3* coincidentes con una mayor supervivencia de los pacientes (Rembrant, 2006). Además, diversos estudios han mostrado una disminución de *TET3* en otros tipos de cáncer como los hematológicos o los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello (Misawa et al., 2018; Rasmussen and Helin, 2016), por lo que la represión de *TET3* podría ser un mecanismo general del cáncer. Estudios por qPCR han confirmado la disminución de la expresión de *Tet3* también en GBM murino. Esta dioxigenasa es la enzima implicada en el proceso de desmetilación activa del DNA y resulta esencial en el mantenimiento del estado indiferenciado de la NSCs adultas (Carella et al., 2020; Montalban-Loro et al., 2019), lo cual ha sugerido un posible mecanismo implicado en la transformación maligna también en el SNC.

La sobre-expresión de *Tet3* en la línea murina GBM-EGFR causa un efecto negativo en el crecimiento de las células tumorales, disminuyendo tanto la capacidad de formar clones como su tasa de proliferación, coincidente con estudios recientes que proponen a TET3 como una proteína inhibidora de la proliferación del GBM (Carella et al., 2020; Cui et al., 2016). Estos efectos parecen ser dependientes de hidroximetilación ya que la sobre-expresión de células GBM-EGFR con la variante de TET3 que tiene el dominio catalítico mutado, no muestra estos efectos celulares en los cultivos. En contraposición, otro estudio actual describe la hidroximetilación mediada por TET3 como crítica para el mantenimiento de las GSCs (Herrmann et al., 2020), y no como una molécula anti-tumoral como indican nuestros datos. Además, los ensayos de trasplantes de células que sobre-expresan TET3 en ratones inmunodeprimidos, confirman los efectos de represión del tumor que tiene TET3 también *in vivo*.

El estudio de expresión de genes improntados en células GBM-EGFR ha mostrado que aproximadamente el 50% de los genes improntados cambian su expresión respecto a las NSCs de origen. Además, la sobre-expresión de *Tet3* en estas células revierte parcialmente estos cambios de expresión en GBM, lo cual sugiere un papel de TET3 en la transformación maligna de las NSCs. Por ejemplo, la expresión de *Igf2* está aumentada en el GBM respecto a las NSCs, lo cual es coincidente con el papel de IGF2 en la proliferación del tumor y la supervivencia de los pacientes



con glioma (Gallagher and LeRoith, 2010; Livingstone, 2013; Plass and Soloway, 2002). Un aumento en los niveles de *Tet3* en células GBM-EGFR causa una disminución de los niveles de expresión de *Igf2*, efecto que ha mostrado ser dependiente de la actividad catalítica de la enzima TET3, como en el caso de *Zdbf2* y *Meg3*. También la enzima parece regular de manera dependiente de la metilación del DNA, la expresión de genes como *Dlk1* y *Snrpn*. Otros genes como *Peg3* y *Peg10* ven aumentados sus niveles tras la sobre-expresión de *Tet3*, pero en estos casos la acción de la enzima no depende de su actividad catalítica.

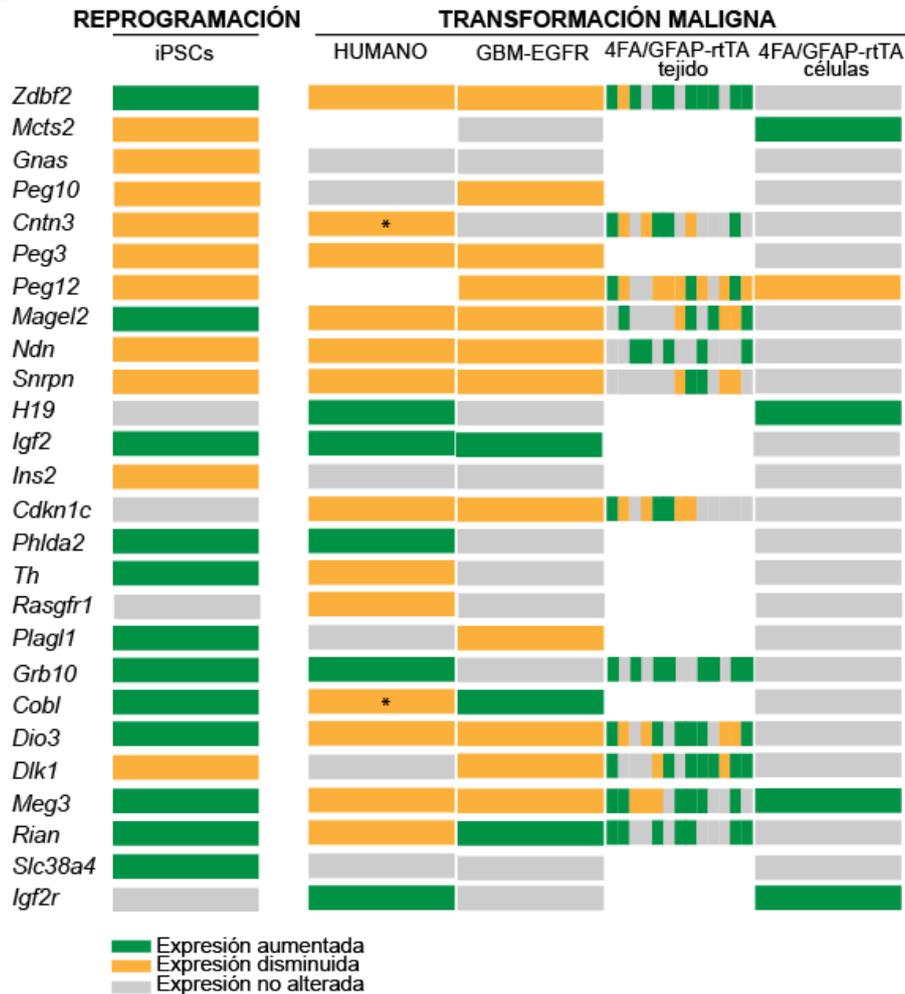
Además de la acción catalítica bien descrita de TET3, la unión preferencial de las proteínas TET a promotores libres de metilación y moléculas reclutadoras de la maquinaria de transcripción como es el complejo represivo PRC2, sugieren una función potencial adicional e independiente de su acción catalítica. Esta posibilidad se ve apoyada por la demostración de que formas no catalíticas de TET son capaces de rescatar el fenotipo proliferativo en células deficientes para Tet2 (Montagner et al., 2017). Además la sobre-expresión de un mutante de Tet1 inactivo catalíticamente en el hipocampo de ratón resulta en el aumento de la expresión de genes asociados a memoria y aprendizaje (Kaas et al., 2013). Es importante mencionar también que ya se han descrito acciones transcripcionales de TET3 sobre genes improntados en NSCs (Montalban-Loro et al., 2019). Por lo tanto, estos resultados, plantean una interesante acción dual de TET3 sobre la expresión de genes improntados, mediante la cual se podría combinar la regulación dependiente del estado metilado de las regiones de control de impronta, con un control independiente de esa metilación y que pudiera ser transcripcional.

Observaciones finales

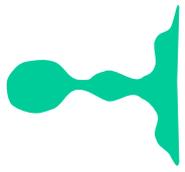
Dado que la impronta genómica parece ser clave tanto en el proceso de reprogramación inducida como en la formación de tumores cerebrales, este proceso epigenético podría ser la pieza inicial que permitiese la transformación de las NSCs a un estado más indiferenciado que las llevara a formar iPSCs o GSCs. De hecho, algunos de los genes improntados analizados, tales como *Peg3*, *Peg10*, *Peg12*, *Igf2*, *Snrpn* o *Dlk1*, han mostrado la misma tendencia tanto en el proceso de reprogramación inducida como en el cáncer, por lo que estos podrían participar en el inicio de la desdiferenciación de las NSCs (**Tabla 25**), y por tanto ser útiles, como posibles herramientas en el diagnóstico precoz de los tumores cerebrales. Curiosamente, los niveles de metilación fueron contrarios entre el proceso de reprogramación inducida y el cáncer. Las iPSCs presentaron una hipometilación generalizada en las regiones reguladoras de impronta, mientras que en las células de GBM, mostraron una hipermetilación global, por lo que los cambios en las marcas de metilación podrían determinar el tipo de tumor que se forma. Por tanto, la metilación en DMRs de las regiones de control de impronta, y la alteración en la expresión de genes improntados que

se comportan de forma contraria en iPSCs y GBM, podrían ser los implicados en determinar el tipo de tumor a generarse.

Tabla 25. Comparativa de expresión de genes improntados. Comparativa entre iPSCs, GBM humano, la línea murina GBM-EGFR, 13 tumores de ratones reprogramados GFAP-rtTA;i4F, y las líneas celulares obtenidas de los cerebros de estos animales, en relación a la expresión de genes improntados. El aumento de expresión se ha indicado en verde, mientras que la disminución se muestra en naranja. Aquellos genes cuya expresión no varía se han indicado en gris. Las iPSCs, las células GMB-EGFR y GFAP-rtTA;i4F se han comparado con respecto a NSCs adultas de la SVZ. Los datos de GBM humano y de tumores GFAP-rtTA;i4F se han comparado con respecto a tejido no tumoral. Los datos de GBM humano se han obtenido de la base de datos de Gill de la plataforma Gliovis. La marca * hace referencia a resultados de la base de datos de Rembrant.

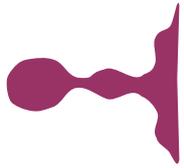


Conclusions



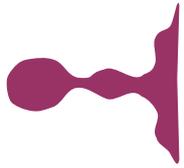
1. The expression of imprinted genes is significantly altered during the acquisition of pluripotency in adult NSCs, suggesting a relevant role of genomic imprinting in cellular reprogramming.
2. Reprogramming of adult NSCs into iPSCs involves global hypomethylation at the imprinting control regions, which is reverted during the differentiation of iPSCs into NPs only at paternally methylated gDMRs. This shows a divergent mechanism of regulation in maternally and paternally methylated DMRs during reprogramming.
3. The imprinting state of *Dlk1*, lost in adult NSCs, is restored in iPSCs and lost again after their differentiation into NPs, suggesting a plastic regulation of genomic imprinting in neural cells.
4. *In vivo* cellular reprogramming by OSKM induced expression in brain cells of the astrocytic lineage, leads to the generation of brain tumors, with molecular features of either teratomas or GBM.
5. Brain tumor formation involves changes in the expression of several imprinted genes, showing two molecular profiles that might be coincident with teratoma or GBM.
6. Human and murine GBM show altered expression of imprinted genes, suggesting a relevant role of this epigenetic mechanism in brain tumor. Importantly, the expression profile of imprinted genes is sufficient to distinguish non-tumor cell populations from GBM cells.
7. *TET3* is controversially expressed in human, with high and low levels of this gene associated with survival of the patients, suggesting a role of TET3 enzyme in the pathology.
8. Overexpression of *Tet3* in murine GBM promotes tumor formation *in vivo* in a demethylation-dependent manner.
9. TET3 regulates the expression of imprinted genes in brain tumors. This regulation is exerted through the dioxygenase activity in the imprinted genes *Zdbf2*, *Igf2* and *Meg3*.

Bibliografía



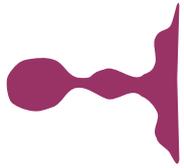
- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Canamero, M., Rayon, T., Ors, I., Grana, O., Megias, D., Dominguez, O., Martinez, D., *et al.* (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature* *502*, 340-345.
- Abramowitz, L.K., and Bartolomei, M.S. (2012). Genomic imprinting: recognition and marking of imprinted loci. *Curr Opin Genet Dev* *22*, 72-78.
- Adalsteinsson, B.T., and Ferguson-Smith, A.C. (2014). Epigenetic control of the genome-lessons from genomic imprinting. *Genes (Basel)* *5*, 635-655.
- Ahmed, S.I., Javed, G., Laghari, A.A., Bareeqa, S.B., Farrukh, S., Zahid, S., Samar, S.S., and Aziz, K. (2018). CD133 Expression in Glioblastoma Multiforme: A Literature Review. *Cureus* *10*, e3439.
- Alcantara Llaguno, S., Chen, J., Kwon, C.H., Jackson, E.L., Li, Y., Burns, D.K., Alvarez-Buylla, A., and Parada, L.F. (2009). Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model. *Cancer Cell* *15*, 45-56.
- Alcantara Llaguno, S., Sun, D., Pedraza, A.M., Vera, E., Wang, Z., Burns, D.K., and Parada, L.F. (2019). Cell-of-origin susceptibility to glioblastoma formation declines with neural lineage restriction. *Nat Neurosci* *22*, 545-555.
- Allouba, M.H., ElGuindy, A.M., Krishnamoorthy, N., Yacoub, M.H., and Aguib, Y.E. (2015). Nanog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Glob Cardiol Sci Pract* *2015*, 36.
- Altman, J. (1962). Are new neurons formed in the brains of adult mammals? *Science* *135*, 1127-1128.
- Altmann, C., Keller, S., and Schmidt, M.H.H. (2019). The Role of SVZ Stem Cells in Glioblastoma. *Cancers (Basel)* *11*.
- Anido, J., Saez-Borderias, A., Gonzalez-Junca, A., Rodon, L., Folch, G., Carmona, M.A., Prieto-Sanchez, R.M., Barba, I., Martinez-Saez, E., Prudkin, L., *et al.* (2010). TGF-beta Receptor Inhibitors Target the CD44(high)/Id1(high) Glioma-Initiating Cell Population in Human Glioblastoma. *Cancer Cell* *18*, 655-668.
- Apostolou, E., and Hochedlinger, K. (2013). Chromatin dynamics during cellular reprogramming. *Nature* *502*, 462-471.
- Auffinger, B., Spencer, D., Pytel, P., Ahmed, A.U., and Lesniak, M.S. (2015). The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother* *15*, 741-752.
- Ayob, A.Z., and Ramasamy, T.S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J Biomed Sci* *25*, 20.
- Bachoo, R.M., Maher, E.A., Ligon, K.L., Sharpless, N.E., Chan, S.S., You, M.J., Tang, Y., DeFrances, J., Stover, E., Weissleder, R., *et al.* (2002). Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* *1*, 269-277.
- Banelli, B., Casciano, I., and Romani, M. (2000). Methylation-independent silencing of the p73 gene in neuroblastoma. *Oncogene* *19*, 4553-4556.
- Bar, S., Schachter, M., Eldar-Geva, T., and Benvenisty, N. (2017). Large-Scale Analysis of Loss of Imprinting in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* *19*, 957-968.
- Bar, S., Seaton, L.R., Weissbein, U., Eldar-Geva, T., and Benvenisty, N. (2019). Global Characterization of X Chromosome Inactivation in Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep* *27*, 20-29 e23.

- Barlow, D.P., and Bartolomei, M.S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6.
- Bartolomei, M.S., and Ferguson-Smith, A.C. (2011). Mammalian genomic imprinting. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3.
- Basak, O., Krieger, T.G., Muraro, M.J., Wiebrands, K., Stange, D.E., Frias-Aldeguer, J., Rivron, N.C., van de Wetering, M., van Es, J.H., van Oudenaarden, A., *et al.* (2018). Troy+ brain stem cells cycle through quiescence and regulate their number by sensing niche occupancy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115, E610-E619.
- Basakran, N.S. (2015). CD44 as a potential diagnostic tumor marker. *Saudi Med J* 36, 273-279.
- Becker, A.J., Mc, C.E., and Till, J.E. (1963). Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 197, 452-454.
- Belenguer, G., Domingo-Muelas, A., Ferron, S.R., Morante-Redolat, J.M., and Farinas, I. (2016). Isolation, culture and analysis of adult subependymal neural stem cells. *Differentiation* 91, 28-41.
- Belenguer, G., Duart-Abadia, P., Jordan-Pla, A., Domingo-Muelas, A., Blasco-Chamarro, L., Ferron, S.R., Morante-Redolat, J.M., and Farinas, I. (2020). Adult Neural Stem Cells Are Alerted by Systemic Inflammation through TNF-alpha Receptor Signaling. *Cell Stem Cell*.
- Benetatos, L., Hatzimichael, E., Dasoula, A., Dranitsaris, G., Tsiara, S., Syrrou, M., Georgiou, I., and Bourantas, K.L. (2010). CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 34, 148-153.
- Berezovsky, A.D., Poisson, L.M., Cherba, D., Webb, C.P., Transou, A.D., Lemke, N.W., Hong, X., Hasselbach, L.A., Irtenkauf, S.M., Mikkelsen, T., *et al.* (2014). Sox2 promotes malignancy in glioblastoma by regulating plasticity and astrocytic differentiation. *Neoplasia* 16, 193-206, 206 e119-125.
- Berg, D.A., Su, Y., Jimenez-Cyrus, D., Patel, A., Huang, N., Morizet, D., Lee, S., Shah, R., Ringeling, F.R., Jain, R., *et al.* (2019). A Common Embryonic Origin of Stem Cells Drives Developmental and Adult Neurogenesis. *Cell* 177, 654-668 e615.
- Bibel, M., Richter, J., Lacroix, E., and Barde, Y.A. (2007). Generation of a defined and uniform population of CNS progenitors and neurons from mouse embryonic stem cells. *Nat Protoc* 2, 1034-1043.
- Bien-Moller, S., Balz, E., Herzog, S., Plantera, L., Vogelgesang, S., Weitmann, K., Seifert, C., Fink, M.A., Marx, S., Bialke, A., *et al.* (2018). Association of Glioblastoma Multiforme Stem Cell Characteristics, Differentiation, and Microglia Marker Genes with Patient Survival. *Stem Cells Int* 2018, 9628289.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447, 396-398.
- Bishop, E.T., Bell, G.T., Bloor, S., Broom, I.J., Hendry, N.F., and Wheatley, D.N. (1999). An in vitro model of angiogenesis: basic features. *Angiogenesis* 3, 335-344.
- Blelloch, R., Venere, M., Yen, J., and Ramalho-Santos, M. (2007). Generation of induced pluripotent stem cells in the absence of drug selection. *Cell Stem Cell* 1, 245-247.
- Bomken, S., Fiser, K., Heidenreich, O., and Vormoor, J. (2010). Understanding the cancer stem cell. *Br J Cancer* 103, 439-445.
- Bond, A.M., Ming, G.L., and Song, H. (2015). Adult Mammalian Neural Stem Cells and Neurogenesis: Five Decades Later. *Cell Stem Cell* 17, 385-395.
- Bonfanti, L. (2013). The (real) neurogenic/gliogenic potential of the postnatal and adult brain parenchyma. *ISRN neuroscience* 2013, 354136.



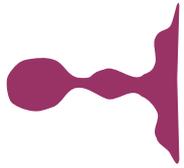
- Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B., and Bestor, T.H. (2001). Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science* 294, 2536-2539.
- Bowman, R.L., Wang, Q., Carro, A., Verhaak, R.G., and Squatrito, M. (2017). GlioVis data portal for visualization and analysis of brain tumor expression datasets. *Neuro Oncol* 19, 139-141.
- Bradshaw, A., Wickremsekera, A., Tan, S.T., Peng, L., Davis, P.F., and Itinteang, T. (2016). Cancer Stem Cell Hierarchy in Glioblastoma Multiforme. *Front Surg* 3, 21.
- Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G.G., Lengner, C.J., Wernig, M., Suh, H., and Jaenisch, R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2, 151-159.
- Brouwer-Visser, J., and Huang, G.S. (2015). IGF2 signaling and regulation in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 371-377.
- Brown, D.V., Daniel, P.M., D'Abaco, G.M., Gogos, A., Ng, W., Morokoff, A.P., and Mantamadiotis, T. (2015). Coexpression analysis of CD133 and CD44 identifies proneural and mesenchymal subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncotarget* 6, 6267-6280.
- Brown, D.V., Filiz, G., Daniel, P.M., Hollande, F., Dworkin, S., Amiridis, S., Kountouri, N., Ng, W., Morokoff, A.P., and Mantamadiotis, T. (2017). Expression of CD133 and CD44 in glioblastoma stem cells correlates with cell proliferation, phenotype stability and intra-tumor heterogeneity. *PLoS one* 12, e0172791.
- Buccarelli, M., Lulli, V., Giuliani, A., Signore, M., Martini, M., D'Alessandris, Q.G., Giannetti, S., Novelli, A., Ilari, R., Giurato, G., *et al.* (2020). Deregulated expression of the imprinted DLK1-DIO3 region in glioblastoma stemlike cells: tumor suppressor role of lncRNA MEG3. *Neuro Oncol* 22, 1771-1784.
- Bull, N.D., and Bartlett, P.F. (2005). The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. *J Neurosci* 25, 10815-10821.
- Bulstrode, H., Johnstone, E., Marques-Torrejon, M.A., Ferguson, K.M., Bressan, R.B., Blin, C., Grant, V., Gogolok, S., Gangoso, E., Gargica, S., *et al.* (2017). Elevated FOXG1 and SOX2 in glioblastoma enforces neural stem cell identity through transcriptional control of cell cycle and epigenetic regulators. *Genes Dev* 31, 757-773.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11, 69-82.
- Cantone, I., and Fisher, A.G. (2017). Human X chromosome inactivation and reactivation: implications for cell reprogramming and disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 372.
- Capp, J.P. (2019). Cancer Stem Cells: From Historical Roots to a New Perspective. *J Oncol* 2019, 5189232.
- Capper, D., Jones, D.T.W., Sill, M., Hovestadt, V., Schrimpf, D., Sturm, D., Koelsche, C., Sahm, F., Chavez, L., Reuss, D.E., *et al.* (2018). DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. *Nature* 555, 469-474.
- Carella, A., Tejedor, J.R., Garcia, M.G., Urdinguio, R.G., Bayon, G.F., Sierra, M., Lopez, V., Garcia-Torano, E., Santamarina-Ojeda, P., Perez, R.F., *et al.* (2020). Epigenetic downregulation of TET3 reduces genome-wide 5hmC levels and promotes glioblastoma tumorigenesis. *Int J Cancer* 146, 373-387.
- Caren, H., Pollard, S.M., and Beck, S. (2013). The good, the bad and the ugly: epigenetic mechanisms in glioblastoma. *Mol Aspects Med* 34, 849-862.

- Carey, B.W., Markoulaki, S., Hanna, J., Saha, K., Gao, Q., Mitalipova, M., and Jaenisch, R. (2009). Reprogramming of murine and human somatic cells using a single polycistronic vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *106*, 157-162.
- Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* *113*, 643-655.
- Chambers, I., and Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene* *23*, 7150-7160.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* *488*, 522-526.
- Chesler, D.A., Berger, M.S., and Quinones-Hinojosa, A. (2012). The potential origin of glioblastoma initiating cells. *Front Biosci (Schol Ed)* *4*, 190-205.
- Cheung, T.H., and Rando, T.A. (2013). Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nature reviews Molecular cell biology* *14*, 329-340.
- Choi, J.D., Underkoffler, L.A., Wood, A.J., Collins, J.N., Williams, P.T., Golden, J.A., Schuster, E.F., Jr., Loomes, K.M., and Oakey, R.J. (2005). A novel variant of Inpp5f is imprinted in brain, and its expression is correlated with differential methylation of an internal CpG island. *Mol Cell Biol* *25*, 5514-5522.
- Cirillo, A., Di Salle, A., Petillo, O., Melone, M.A., Grimaldi, G., Bellotti, A., Torelli, G., De' Santi, M.S., Cantatore, G., Marinelli, A., *et al.* (2014). High grade glioblastoma is associated with aberrant expression of ZFP57, a protein involved in gene imprinting, and of CPT1A and CPT1C that regulate fatty acid metabolism. *Cancer Biol Ther* *15*, 735-741.
- Claus, E.B., Horlacher, A., Hsu, L., Schwartz, R.B., Dello-Iacono, D., Talos, F., Jolesz, F.A., and Black, P.M. (2005). Survival rates in patients with low-grade glioma after intraoperative magnetic resonance image guidance. *Cancer* *103*, 1227-1233.
- Cleaton, M.A., Edwards, C.A., and Ferguson-Smith, A.C. (2014). Phenotypic outcomes of imprinted gene models in mice: elucidation of pre- and postnatal functions of imprinted genes. *Annu Rev Genomics Hum Genet* *15*, 93-126.
- Coan, P.M., Burton, G.J., and Ferguson-Smith, A.C. (2005). Imprinted genes in the placenta--a review. *Placenta* *26 Suppl A*, S10-20.
- Codega, P., Silva-Vargas, V., Paul, A., Maldonado-Soto, A.R., Deleo, A.M., Pastrana, E., and Doetsch, F. (2014). Prospective identification and purification of quiescent adult neural stem cells from their in vivo niche. *Neuron* *82*, 545-559.
- Corsini, N.S., and Martin-Villalba, A. (2010). Integrin alpha 6: anchors away for glioma stem cells. *Cell Stem Cell* *6*, 403-404.
- Cortazar, D., Kunz, C., Saito, Y., Steinacher, R., and Schar, P. (2007). The enigmatic thymine DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* *6*, 489-504.
- Cortellino, S., Xu, J., Sannai, M., Moore, R., Caretti, E., Cigliano, A., Le Coz, M., Devarajan, K., Wessels, A., Soprano, D., *et al.* (2011). Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* *146*, 67-79.
- Cui, Q., Yang, S., Ye, P., Tian, E., Sun, G., Zhou, J., Sun, G., Liu, X., Chen, C., Murai, K., *et al.* (2016). Downregulation of TLX induces TET3 expression and inhibits glioblastoma stem cell self-renewal and tumorigenesis. *Nat Commun* *7*, 10637.



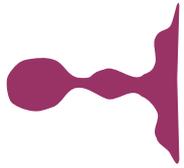
- Das, A.T., Tenenbaum, L., and Berkhout, B. (2016). Tet-On Systems For Doxycycline-inducible Gene Expression. *Curr Gene Ther* 16, 156-167.
- De Carvalho, D.D., You, J.S., and Jones, P.A. (2010). DNA methylation and cellular reprogramming. *Trends Cell Biol* 20, 609-617.
- De Smet, C., and Loriot, A. (2010). DNA hypomethylation in cancer: epigenetic scars of a neoplastic journey. *Epigenetics* 5, 206-213.
- Dehmelt, L., and Halpain, S. (2005). The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol* 6, 204.
- Delamarre, E., Taboubi, S., Mathieu, S., Berenguer, C., Rigot, V., Lissitzky, J.C., Figarella-Branger, D., Ouafik, L., and Luis, J. (2009). Expression of integrin alpha6beta1 enhances tumorigenesis in glioma cells. *Am J Pathol* 175, 844-855.
- Deleyrolle, L.P., Ericksson, G., Morrison, B.J., Lopez, J.A., Burrage, K., Burrage, P., Vescovi, A., Rietze, R.L., and Reynolds, B.A. (2011). Determination of somatic and cancer stem cell self-renewing symmetric division rate using sphere assays. *PloS one* 6, e15844.
- Dindot, S.V., Person, R., Strivens, M., Garcia, R., and Beaudet, A.L. (2009). Epigenetic profiling at mouse imprinted gene clusters reveals novel epigenetic and genetic features at differentially methylated regions. *Genome Res* 19, 1374-1383.
- Ding, H., Shannon, P., Lau, N., Wu, X., Roncari, L., Baldwin, R.L., Takebayashi, H., Nagy, A., Gutmann, D.H., and Guha, A. (2003). Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model. *Cancer Res* 63, 1106-1113.
- Do, J.T., Joo, J.Y., Han, D.W., Arauzo-Bravo, M.J., Kim, M.J., Greber, B., Zaehres, H., Sobek-Klocke, I., Chung, H.M., and Scholer, H.R. (2009). Generation of parthenogenetic induced pluripotent stem cells from parthenogenetic neural stem cells. *Stem cells* 27, 2962-2968.
- Donega, V., Burm, S.M., van Strien, M.E., van Bodegraven, E.J., Paliukhovich, I., Geut, H., van de Berg, W.D.J., Li, K.W., Smit, A.B., Basak, O., *et al.* (2019). Transcriptome and proteome profiling of neural stem cells from the human subventricular zone in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun* 7, 84.
- Dulken, B.W., Leeman, D.S., Boutet, S.C., Hebestreit, K., and Brunet, A. (2017). Single-Cell Transcriptomic Analysis Defines Heterogeneity and Transcriptional Dynamics in the Adult Neural Stem Cell Lineage. *Cell Rep* 18, 777-790.
- Edwards, C.A., and Ferguson-Smith, A.C. (2007). Mechanisms regulating imprinted genes in clusters. *Curr Opin Cell Biol* 19, 281-289.
- Eggermann, T., Perez de Nanclares, G., Maher, E.R., Temple, I.K., Tumer, Z., Monk, D., Mackay, D.J., Gronskov, K., Riccio, A., Linglart, A., *et al.* (2015). Imprinting disorders: a group of congenital disorders with overlapping patterns of molecular changes affecting imprinted loci. *Clin Epigenetics* 7, 123.
- Elsir, T., Edqvist, P.H., Carlson, J., Ribom, D., Bergqvist, M., Ekman, S., Popova, S.N., Alafuzoff, I., Ponten, F., Nister, M., *et al.* (2014). A study of embryonic stem cell-related proteins in human astrocytomas: identification of Nanog as a predictor of survival. *Int J Cancer* 134, 1123-1131.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Fabian, A., Vereb, G., and Szollosi, J. (2013). The hitchhikers guide to cancer stem cell theory: markers, pathways and therapy. *Cytometry A* 83, 62-71.

- Feinberg, A.P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* 447, 433-440.
- Feinberg, A.P., Ohlsson, R., and Henikoff, S. (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7, 21-33.
- Feng, J., Zhou, Y., Campbell, S.L., Le, T., Li, E., Sweatt, J.D., Silva, A.J., and Fan, G. (2010). Dnmt1 and Dnmt3a maintain DNA methylation and regulate synaptic function in adult forebrain neurons. *Nat Neurosci* 13, 423-430.
- Ferguson-Smith, A.C. (2011). Genomic imprinting: the emergence of an epigenetic paradigm. *Nat Rev Genet* 12, 565-575.
- Ferri, A.L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P.P., Sala, M., DeBiasi, S., *et al.* (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* 131, 3805-3819.
- Ferron, S.R., Andreu-Agullo, C., Mira, H., Sanchez, P., Marques-Torrejon, M.A., and Farinas, I. (2007). A combined ex/in vivo assay to detect effects of exogenously added factors in neural stem cells. *Nat Protoc* 2, 849-859.
- Ferron, S.R., Charalambous, M., Radford, E., McEwen, K., Wildner, H., Hind, E., Morante-Redolat, J.M., Laborda, J., Guillemot, F., Bauer, S.R., *et al.* (2011). Postnatal loss of Dlk1 imprinting in stem cells and niche astrocytes regulates neurogenesis. *Nature* 475, 381-385.
- Ferron, S.R., Radford, E.J., Domingo-Muelas, A., Kleine, I., Ramme, A., Gray, D., Sandovici, I., Constancia, M., Ward, A., Menheniott, T.R., *et al.* (2015). Differential genomic imprinting regulates paracrine and autocrine roles of IGF2 in mouse adult neurogenesis. *Nat Commun* 6, 8265.
- Filby, A., Perucha, E., Summers, H., Rees, P., Chana, P., Heck, S., Lord, G.M., and Davies, D. (2011). An imaging flow cytometric method for measuring cell division history and molecular symmetry during mitosis. *Cytometry A* 79, 496-506.
- Fitzsimons, C.P., van Bodegraven, E., Schouten, M., Lardenoije, R., Kompotis, K., Kenis, G., van den Hurk, M., Boks, M.P., Biojone, C., Joca, S., *et al.* (2014). Epigenetic regulation of adult neural stem cells: implications for Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 9, 25.
- Fortunel, N.O., Otu, H.H., Ng, H.H., Chen, J., Mu, X., Chevassut, T., Li, X., Joseph, M., Bailey, C., Hatzfeld, J.A., *et al.* (2003). Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science* 302, 393; author reply 393.
- Fuentealba, L.C., Rompani, S.B., Parraguez, J.I., Obernier, K., Romero, R., Cepko, C.L., and Alvarez-Buylla, A. (2015). Embryonic Origin of Postnatal Neural Stem Cells. *Cell* 161, 1644-1655.
- Furutachi, S., Matsumoto, A., Nakayama, K.I., and Gotoh, Y. (2013). p57 controls adult neural stem cell quiescence and modulates the pace of lifelong neurogenesis. *EMBO J* 32, 970-981.
- Furutachi, S., Miya, H., Watanabe, T., Kawai, H., Yamasaki, N., Harada, Y., Imayoshi, I., Nelson, M., Nakayama, K.I., Hirabayashi, Y., *et al.* (2015). Slowly dividing neural progenitors are an embryonic origin of adult neural stem cells. *Nat Neurosci* 18, 657-665.
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., and Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 348-362.
- Gage, F.H. (2000). Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438.
- Gallagher, E.J., and LeRoith, D. (2010). The proliferating role of insulin and insulin-like growth factors in cancer. *Trends Endocrinol Metab* 21, 610-618.



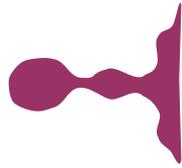
- Gangemi, R., Paleari, L., Orengo, A.M., Cesario, A., Chessa, L., Ferrini, S., and Russo, P. (2009). Cancer stem cells: a new paradigm for understanding tumor growth and progression and drug resistance. *Curr Med Chem* *16*, 1688-1703.
- Gargini, R., Segura-Collar, B., Herranz, B., Garcia-Escudero, V., Romero-Bravo, A., Nunez, F.J., Garcia-Perez, D., Gutierrez-Guaman, J., Ayuso-Sacido, A., Seoane, J., *et al.* (2020). The IDH-TAU-EGFR triad defines the neovascular landscape of diffuse gliomas. *Sci Transl Med* *12*.
- Ghosh, H.S. (2019). Adult Neurogenesis and the Promise of Adult Neural Stem Cells. *J Exp Neurosci* *13*, 1179069519856876.
- Ghuwalewala, S., Ghatak, D., Das, P., Dey, S., Sarkar, S., Alam, N., Panda, C.K., and Roychoudhury, S. (2016). CD44(high)CD24(low) molecular signature determines the Cancer Stem Cell and EMT phenotype in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Stem Cell Res* *16*, 405-417.
- Giachino, C., Basak, O., Lugert, S., Knuckles, P., Obernier, K., Fiorelli, R., Frank, S., Raineteau, O., Alvarez-Buylla, A., and Taylor, V. (2014). Molecular diversity subdivides the adult forebrain neural stem cell population. *Stem cells* *32*, 70-84.
- Gilbert, C.A., and Ross, A.H. (2009). Cancer stem cells: cell culture, markers, and targets for new therapies. *J Cell Biochem* *108*, 1031-1038.
- Giulitti, S., Pellegrini, M., Zorzan, I., Martini, P., Gagliano, O., Mutarelli, M., Ziller, M.J., Cacchiarelli, D., Romualdi, C., Elvassore, N., *et al.* (2019). Direct generation of human naive induced pluripotent stem cells from somatic cells in microfluidics. *Nature cell biology* *21*, 275-286.
- Goll, M.G., and Bestor, T.H. (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* *74*, 481-514.
- Gong, X., and Huang, M. (2017). Long non-coding RNA MEG3 promotes the proliferation of glioma cells through targeting Wnt/beta-catenin signal pathway. *Cancer Gene Ther* *24*, 381-385.
- Goyal, R., Mathur, S.K., Gupta, S., Goyal, R., Kumar, S., Batra, A., Hasija, S., and Sen, R. (2015). Immunohistochemical expression of glial fibrillary acidic protein and CAM5.2 in glial tumors and their role in differentiating glial tumors from metastatic tumors of central nervous system. *J Neurosci Rural Pract* *6*, 499-503.
- Graf, U., Casanova, E.A., and Cinelli, P. (2011). The Role of the Leukemia Inhibitory Factor (LIF) - Pathway in Derivation and Maintenance of Murine Pluripotent Stem Cells. *Genes (Basel)* *2*, 280-297.
- Gu, T.P., Guo, F., Yang, H., Wu, H.P., Xu, G.F., Liu, W., Xie, Z.G., Shi, L., He, X., Jin, S.G., *et al.* (2011). The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. *Nature* *477*, 606-610.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* *10*, 622-640.
- Hahn, M.A., Qiu, R., Wu, X., Li, A.X., Zhang, H., Wang, J., Jui, J., Jin, S.G., Jiang, Y., Pfeifer, G.P., *et al.* (2013). Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. *Cell Rep* *3*, 291-300.
- Hajkova, P., Erhardt, S., Lane, N., Haaf, T., El-Maarri, O., Reik, W., Walter, J., and Surani, M.A. (2002). Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev* *117*, 15-23.
- Hammachi, F., Morrison, G.M., Sharov, A.A., Livigni, A., Narayan, S., Papapetrou, E.P., O'Malley, J., Kaji, K., Ko, M.S., Ptashne, M., *et al.* (2012). Transcriptional activation by Oct4 is sufficient for the maintenance and induction of pluripotency. *Cell Rep* *1*, 99-109.

- Hata, K., Okano, M., Lei, H., and Li, E. (2002). Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development* 129, 1983-1993.
- Hattermann, K., Fluh, C., Engel, D., Mehdorn, H.M., Synowitz, M., Mentlein, R., and Held-Feindt, J. (2016). Stem cell markers in glioma progression and recurrence. *Int J Oncol* 49, 1899-1910.
- He, Y., Luo, Y., Liang, B., Ye, L., Lu, G., and He, W. (2017). Potential applications of MEG3 in cancer diagnosis and prognosis. *Oncotarget* 8, 73282-73295.
- Heard, E., and Distèche, C.M. (2006). Dosage compensation in mammals: fine-tuning the expression of the X chromosome. *Genes Dev* 20, 1848-1867.
- Hemmati, H.D., Nakano, I., Lazareff, J.A., Masterman-Smith, M., Geschwind, D.H., Bronner-Fraser, M., and Kornblum, H.I. (2003). Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 15178-15183.
- Herrmann, A., Lahtz, C., Song, J., Aftabizadeh, M., Cherryholmes, G.A., Xin, H., Adamus, T., Lee, H., Grunert, D., Armstrong, B., *et al.* (2020). Integrin alpha6 signaling induces STAT3-TET3-mediated hydroxymethylation of genes critical for maintenance of glioma stem cells. *Oncogene* 39, 2156-2169.
- Hester, M.E., Murtha, M.J., Song, S., Rao, M., Miranda, C.J., Meyer, K., Tian, J., Boulting, G., Schaffer, D.V., Zhu, M.X., *et al.* (2011). Rapid and efficient generation of functional motor neurons from human pluripotent stem cells using gene delivered transcription factor codes. *Mol Ther* 19, 1905-1912.
- Hirai, H., Karian, P., and Kikyo, N. (2011). Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor. *Biochem J* 438, 11-23.
- Hirasawa, R., and Feil, R. (2010). Genomic imprinting and human disease. *Essays Biochem* 48, 187-200.
- Hoffmann, A., Daniel, G., Schmidt-Edelkraut, U., and Spengler, D. (2014). Roles of imprinted genes in neural stem cells. *Epigenomics* 6, 515-532.
- Holm, T.M., Jackson-Grusby, L., Brambrink, T., Yamada, Y., Rideout, W.M., 3rd, and Jaenisch, R. (2005). Global loss of imprinting leads to widespread tumorigenesis in adult mice. *Cancer Cell* 8, 275-285.
- Holmberg, J., He, X., Peredo, I., Orrego, A., Hesselager, G., Ericsson, C., Hovatta, O., Oba-Shinjo, S.M., Marie, S.K., Nister, M., *et al.* (2011). Activation of neural and pluripotent stem cell signatures correlates with increased malignancy in human glioma. *PloS one* 6, e18454.
- Huang, D., Wang, L., Duan, J., Huang, C., Tian, X.C., Zhang, M., and Tang, Y. (2018). LIF-activated Jak signaling determines Esrrb expression during late-stage reprogramming. *Biol Open* 7.
- Ignatova, T.N., Kukekov, V.G., Laywell, E.D., Suslov, O.N., Vrionis, F.D., and Steindler, D.A. (2002). Human cortical glial tumors contain neural stem-like cells expressing astroglial and neuronal markers in vitro. *Glia* 39, 193-206.
- Ishida, M., and Moore, G.E. (2013). The role of imprinted genes in humans. *Mol Aspects Med* 34, 826-840.
- Ishimoto, T., Nagano, O., Yae, T., Tamada, M., Motohara, T., Oshima, H., Oshima, M., Ikeda, T., Asaba, R., Yagi, H., *et al.* (2011). CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell* 19, 387-400.



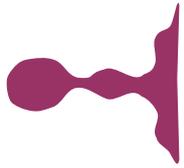
- Ito, S., Shen, L., Dai, Q., Wu, S.C., Collins, L.B., Swenberg, J.A., He, C., and Zhang, Y. (2011). Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine. *Science* 333, 1300-1303.
- Ito, Y., Koessler, T., Ibrahim, A.E., Rai, S., Vowler, S.L., Abu-Amero, S., Silva, A.L., Maia, A.T., Huddleston, J.E., Uribe-Lewis, S., *et al.* (2008). Somatically acquired hypomethylation of IGF2 in breast and colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 17, 2633-2643.
- Ivanchuk, S.M., Mondal, S., Dirks, P.B., and Rutka, J.T. (2001). The INK4A/ARF locus: role in cell cycle control and apoptosis and implications for glioma growth. *J Neurooncol* 51, 219-229.
- Jacques, T.S., Swales, A., Brzozowski, M.J., Henriquez, N.V., Linehan, J.M., Mirzadeh, Z., C, O.M., Naumann, H., Alvarez-Buylla, A., and Brandner, S. (2010). Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes. *EMBO J* 29, 222-235.
- Jaenisch, R., and Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet* 33 *Suppl*, 245-254.
- Jang, H.S., Hong, Y.J., Choi, H.W., Song, H., Byun, S.J., Uhm, S.J., Seo, H.G., and Do, J.T. (2016). Changes in Parthenogenetic Imprinting Patterns during Reprogramming by Cell Fusion. *PloS one* 11, e0156491.
- Janiszewski, A., Talon, I., Chappell, J., Collombet, S., Song, J., De Geest, N., To, S.K., Bervoets, G., Marin-Bejar, O., Provenzano, C., *et al.* (2019). Dynamic reversal of random X-Chromosome inactivation during iPSC reprogramming. *Genome Res* 29, 1659-1672.
- Jelinic, P., and Shaw, P. (2007). Loss of imprinting and cancer. *J Pathol* 211, 261-268.
- Jiang, Y., Jahagirdar, B.N., Reinhardt, R.L., Schwartz, R.E., Keene, C.D., Ortiz-Gonzalez, X.R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., *et al.* (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49.
- Jin, B., Li, Y., and Robertson, K.D. (2011). DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes Cancer* 2, 607-617.
- Joseph, J.V., van Roosmalen, I.A., Busschers, E., Tomar, T., Conroy, S., Eggens-Meijer, E., Penaranda Fajardo, N., Pore, M.M., Balasubramanyian, V., Wagemakers, M., *et al.* (2015). Serum-Induced Differentiation of Glioblastoma Neurospheres Leads to Enhanced Migration/Invasion Capacity That Is Associated with Increased MMP9. *PloS one* 10, e0145393.
- Kaas, G.A., Zhong, C., Eason, D.E., Ross, D.L., Vachhani, R.V., Ming, G.L., King, J.R., Song, H., and Sweatt, J.D. (2013). TET1 controls CNS 5-methylcytosine hydroxylation, active DNA demethylation, gene transcription, and memory formation. *Neuron* 79, 1086-1093.
- Kagitani, F., Kuroiwa, Y., Wakana, S., Shiroishi, T., Miyoshi, N., Kobayashi, S., Nishida, M., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., and Ishino, F. (1997). Peg5/Neuronatin is an imprinted gene located on sub-distal chromosome 2 in the mouse. *Nucleic Acids Res* 25, 3428-3432.
- Kaikkonen, M.U., Lam, M.T., and Glass, C.K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* 90, 430-440.
- Kaneda, M., Okano, M., Hata, K., Sado, T., Tsujimoto, N., Li, E., and Sasaki, H. (2004). Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* 429, 900-903.
- Kashyap, V., Rezende, N.C., Scotland, K.B., Shaffer, S.M., Persson, J.L., Gudas, L.J., and Mongan, N.P. (2009). Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev* 18, 1093-1108.

- Kawamura, Y., Takouda, J., Yoshimoto, K., and Nakashima, K. (2018). New aspects of glioblastoma multiforme revealed by similarities between neural and glioblastoma stem cells. *Cell Biol Toxicol* 34, 425-440.
- Kempermann, G., Song, H., and Gage, F.H. (2015). Neurogenesis in the Adult Hippocampus. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a018812.
- Kim, J., Bergmann, A., Choo, J.H., and Stubbs, L. (2007). Genomic organization and imprinting of the Peg3 domain in bovine. *Genomics* 90, 85-92.
- Kim, J., Bretz, C.L., and Lee, S. (2015). Epigenetic instability of imprinted genes in human cancers. *Nucleic Acids Res* 43, 10689-10699.
- Kim, J.B., Greber, B., Arauzo-Bravo, M.J., Meyer, J., Park, K.I., Zaehres, H., and Scholer, H.R. (2009). Direct reprogramming of human neural stem cells by OCT4. *Nature* 461, 649-643.
- Kim, J.B., Zaehres, H., Wu, G., Gentile, L., Ko, K., Sebastiano, V., Arauzo-Bravo, M.J., Ruau, D., Han, D.W., Zenke, M., *et al.* (2008). Pluripotent stem cells induced from adult neural stem cells by reprogramming with two factors. *Nature* 454, 646-650.
- Kim, M.J., Choi, H.W., Jang, H.J., Chung, H.M., Arauzo-Bravo, M.J., Scholer, H.R., and Do, J.T. (2013). Conversion of genomic imprinting by reprogramming and redifferentiation. *J Cell Sci* 126, 2516-2524.
- Koh, K.P., Yabuuchi, A., Rao, S., Huang, Y., Cunniff, K., Nardone, J., Laiho, A., Tahiliani, M., Sommer, C.A., Mostoslavsky, G., *et al.* (2011). Tet1 and Tet2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 8, 200-213.
- Kohda, T., Asai, A., Kuroiwa, Y., Kobayashi, S., Aisaka, K., Nagashima, G., Yoshida, M.C., Kondo, Y., Kagiya, N., Kirino, T., *et al.* (2001). Tumour suppressor activity of human imprinted gene PEG3 in a glioma cell line. *Genes Cells* 6, 237-247.
- Kohli, R.M., and Zhang, Y. (2013). TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* 502, 472-479.
- Kosty, J., Lu, F., Kupp, R., Mehta, S., and Lu, Q.R. (2017). Harnessing OLIG2 function in tumorigenicity and plasticity to target malignant gliomas. *Cell Cycle* 16, 1654-1660.
- Kremer, D., Heinen, A., Jadasz, J., Gottle, P., Zimmermann, K., Zickler, P., Jander, S., Hartung, H.P., and Kury, P. (2009). p57kip2 is dynamically regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis and interferes with oligodendroglial maturation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 9087-9092.
- Kuciak, M., Mas, C., Borges, I., Sanchez-Gomez, P., and Ruiz, I.A.A. (2019). Chimeric NANOG repressors inhibit glioblastoma growth in vivo in a context-dependent manner. *Sci Rep* 9, 3891.
- Kulis, M., and Esteller, M. (2010). DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70, 27-56.
- Lagace, D.C., Whitman, M.C., Noonan, M.A., Ables, J.L., DeCarolis, N.A., Arguello, A.A., Donovan, M.H., Fischer, S.J., Farnbauch, L.A., Beech, R.D., *et al.* (2007). Dynamic contribution of nestin-expressing stem cells to adult neurogenesis. *J Neurosci* 27, 12623-12629.
- Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367, 645-648.
- Lathia, J.D., Gallagher, J., Heddleston, J.M., Wang, J., Eyler, C.E., Macsworlds, J., Wu, Q., Vasanji, A., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., *et al.* (2010). Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells. *Cell Stem Cell* 6, 421-432.



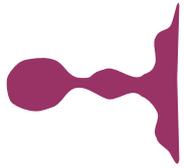
- Lathia, J.D., Mack, S.C., Mulkearns-Hubert, E.E., Valentim, C.L., and Rich, J.N. (2015). Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes Dev* 29, 1203-1217.
- Ledur, P.F., Onzi, G.R., Zong, H., and Lenz, G. (2017). Culture conditions defining glioblastoma cells behavior: what is the impact for novel discoveries? *Oncotarget* 8, 69185-69197.
- Lee, J.H., Lee, J.E., Kahng, J.Y., Kim, S.H., Park, J.S., Yoon, S.J., Um, J.Y., Kim, W.K., Lee, J.K., Park, J., *et al.* (2018). Human glioblastoma arises from subventricular zone cells with low-level driver mutations. *Nature* 560, 243-247.
- Lee, J.T., and Lu, N. (1999). Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell* 99, 47-57.
- Lehtinen, M.K., Zappaterra, M.W., Chen, X., Yang, Y.J., Hill, A.D., Lun, M., Maynard, T., Gonzalez, D., Kim, S., Ye, P., *et al.* (2011). The cerebrospinal fluid provides a proliferative niche for neural progenitor cells. *Neuron* 69, 893-905.
- Leick, M.B., Shoff, C.J., Wang, E.C., Congress, J.L., and Gallicano, G.I. (2012). Loss of imprinting of IGF2 and the epigenetic progenitor model of cancer. *Am J Stem Cells* 1, 59-74.
- Leitch, H.G., McEwen, K.R., Turp, A., Encheva, V., Carroll, T., Grabole, N., Mansfield, W., Nashun, B., Knezovich, J.G., Smith, A., *et al.* (2013). Naive pluripotency is associated with global DNA hypomethylation. *Nat Struct Mol Biol* 20, 311-316.
- Lendahl, U., Zimmerman, L.B., and McKay, R.D. (1990). CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell* 60, 585-595.
- Li, G., Fang, L., Fernandez, G., and Pleasure, S.J. (2013). The ventral hippocampus is the embryonic origin for adult neural stem cells in the dentate gyrus. *Neuron* 78, 658-672.
- Li, J., Bian, E.B., He, X.J., Ma, C.C., Zong, G., Wang, H.L., and Zhao, B. (2016). Epigenetic repression of long non-coding RNA MEG3 mediated by DNMT1 represses the p53 pathway in gliomas. *Int J Oncol* 48, 723-733.
- Li, X., Li, M.J., Yang, Y., and Bai, Y. (2019). Effects of reprogramming on genomic imprinting and the application of pluripotent stem cells. *Stem Cell Res* 41, 101655.
- Li, Y., and Sasaki, H. (2011). Genomic imprinting in mammals: its life cycle, molecular mechanisms and reprogramming. *Cell Res* 21, 466-473.
- Li, Y., Zhang, Q., Yin, X., Yang, W., Du, Y., Hou, P., Ge, J., Liu, C., Zhang, W., Zhang, X., *et al.* (2011). Generation of iPSCs from mouse fibroblasts with a single gene, Oct4, and small molecules. *Cell Res* 21, 196-204.
- Liang, G., and Zhang, Y. (2013). Genetic and epigenetic variations in iPSCs: potential causes and implications for application. *Cell Stem Cell* 13, 149-159.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2014). Adult neural stem cells stake their ground. *Trends Neurosci* 37, 563-571.
- Lim, D.A., and Alvarez-Buylla, A. (2016). The Adult Ventricular-Subventricular Zone (V-SVZ) and Olfactory Bulb (OB) Neurogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8.
- Lin, L., Wang, G., Ming, J., Meng, X., Han, B., Sun, B., Cai, J., and Jiang, C. (2016). Analysis of expression and prognostic significance of vimentin and the response to temozolomide in glioma patients. *Tumour Biol* 37, 15333-15339.
- Liu, X., Nefzger, C.M., Rossello, F.J., Chen, J., Knaupp, A.S., Firas, J., Ford, E., Pflueger, J., Paynter, J.M., Chy, H.S., *et al.* (2017). Comprehensive characterization of distinct states of human naive pluripotency generated by reprogramming. *Nat Methods* 14, 1055-1062.
- Livingstone, C. (2013). IGF2 and cancer. *Endocr Relat Cancer* 20, R321-339.

- Llorens-Bobadilla, E., Zhao, S., Baser, A., Saiz-Castro, G., Zwadlo, K., and Martin-Villalba, A. (2015). Single-Cell Transcriptomics Reveals a Population of Dormant Neural Stem Cells that Become Activated upon Brain Injury. *Cell Stem Cell* *17*, 329-340.
- Lozano-Urena, A., Montalban-Loro, R., Ferguson-Smith, A.C., and Ferron, S.R. (2017). Genomic Imprinting and the Regulation of Postnatal Neurogenesis. *Brain Plast* *3*, 89-98.
- Luczak, M.W., and Jagodzinski, P.P. (2006). The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* *44*, 143-154.
- Ludwig, K., and Kornblum, H.I. (2017). Molecular markers in glioma. *J Neurooncol* *134*, 505-512.
- Lux, H., Flammann, H., Hafner, M., and Lux, A. (2010). Genetic and molecular analyses of PEG10 reveal new aspects of genomic organization, transcription and translation. *PloS one* *5*, e8686.
- Ma, H., Morey, R., O'Neil, R.C., He, Y., Daughtry, B., Schultz, M.D., Hariharan, M., Nery, J.R., Castanon, R., Sabatini, K., *et al.* (2014). Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* *511*, 177-183.
- Maher, E.A., Furnari, F.B., Bachoo, R.M., Rowitch, D.H., Louis, D.N., Cavenee, W.K., and DePinho, R.A. (2001). Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* *15*, 1311-1333.
- Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachechko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R., *et al.* (2007). Directly reprogrammed fibroblasts show global epigenetic remodeling and widespread tissue contribution. *Cell Stem Cell* *1*, 55-70.
- Mansuy, I.M., Winder, D.G., Moallem, T.M., Osman, M., Mayford, M., Hawkins, R.D., and Kandel, E.R. (1998). Inducible and reversible gene expression with the rtTA system for the study of memory. *Neuron* *21*, 257-265.
- Martin, G.R. (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *78*, 7634-7638.
- Meek, S., Wei, J., Oh, T., Watson, T., Olavarrieta, J., Sutherland, L., Carlson, D.F., Salzano, A., Chandra, T., Joshi, A., *et al.* (2020). A Stem Cell Reporter for Investigating Pluripotency and Self-Renewal in the Rat. *Stem Cell Reports* *14*, 154-166.
- Meissner, A. (2010). Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* *28*, 1079-1088.
- Menn, B., Garcia-Verdugo, J.M., Yaschine, C., Gonzalez-Perez, O., Rowitch, D., and Alvarez-Buylla, A. (2006). Origin of oligodendrocytes in the subventricular zone of the adult brain. *J Neurosci* *26*, 7907-7918.
- Merkle, F.T., Tramontin, A.D., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2004). Radial glia give rise to adult neural stem cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 17528-17532.
- Messerschmidt, D.M., Knowles, B.B., and Solter, D. (2014). DNA methylation dynamics during epigenetic reprogramming in the germline and preimplantation embryos. *Genes Dev* *28*, 812-828.
- Mich, J.K., Signer, R.A., Nakada, D., Pineda, A., Burgess, R.J., Vue, T.Y., Johnson, J.E., and Morrison, S.J. (2014). Prospective identification of functionally distinct stem cells and neurosphere-initiating cells in adult mouse forebrain. *Elife* *3*, e02669.
- Millership, S.J., Van de Pette, M., and Withers, D.J. (2019). Genomic imprinting and its effects on postnatal growth and adult metabolism. *Cell Mol Life Sci* *76*, 4009-4021.



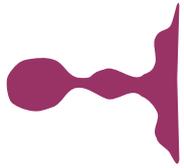
- Ming, G.L., and Song, H. (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70, 687-702.
- Mirzadeh, Z., Merkle, F.T., Soriano-Navarro, M., Garcia-Verdugo, J.M., and Alvarez-Buylla, A. (2008). Neural stem cells confer unique pinwheel architecture to the ventricular surface in neurogenic regions of the adult brain. *Cell Stem Cell* 3, 265-278.
- Misawa, K., Imai, A., Mochizuki, D., Mima, M., Endo, S., Misawa, Y., Kanazawa, T., and Mineta, H. (2018). Association of TET3 epigenetic inactivation with head and neck cancer. *Oncotarget* 9, 24480-24493.
- Miura, T., Katakura, Y., Yamamoto, K., Uehara, N., Tsuchiya, T., Kim, E.H., and Shirahata, S. (2001). Neural stem cells lose telomerase activity upon differentiating into astrocytes. *Cytotechnology* 36, 137-144.
- Miyai, M., Tomita, H., Soeda, A., Yano, H., Iwama, T., and Hara, A. (2017). Current trends in mouse models of glioblastoma. *J Neurooncol* 135, 423-432.
- Montagner, S., Leoni, C., Emming, S., Della Chiara, G., Balestrieri, C., Barozzi, I., Piccolo, V., Togher, S., Ko, M., Rao, A., *et al.* (2017). TET2 Regulates Mast Cell Differentiation and Proliferation through Catalytic and Non-catalytic Activities. *Cell Rep* 20, 1744.
- Montalban-Loro, R., Domingo-Muelas, A., Bizy, A., and Ferron, S.R. (2015). Epigenetic regulation of stemness maintenance in the neurogenic niches. *World J Stem Cells* 7, 700-710.
- Montalban-Loro, R., Lozano-Urena, A., Ito, M., Krueger, C., Reik, W., Ferguson-Smith, A.C., and Ferron, S.R. (2019). TET3 prevents terminal differentiation of adult NSCs by a non-catalytic action at Snrpn. *Nat Commun* 10, 1726.
- Montini, E., Cesana, D., Schmidt, M., Sanvito, F., Bartholomae, C.C., Ranzani, M., Benedicenti, F., Sergi, L.S., Ambrosi, A., Ponzoni, M., *et al.* (2009). The genotoxic potential of retroviral vectors is strongly modulated by vector design and integration site selection in a mouse model of HSC gene therapy. *The Journal of clinical investigation* 119, 964-975.
- Mooney, K.L., Choy, W., Sidhu, S., Pelargos, P., Bui, T.T., Voth, B., Barnette, N., and Yang, I. (2016). The role of CD44 in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 34, 1-5.
- Morison, I.M., Ramsay, J.P., and Spencer, H.G. (2005). A census of mammalian imprinting. *Trends Genet* 21, 457-465.
- Morizur, L., Chicheportiche, A., Gauthier, L.R., Daynac, M., Boussin, F.D., and Mouthon, M.A. (2018). Distinct Molecular Signatures of Quiescent and Activated Adult Neural Stem Cells Reveal Specific Interactions with Their Microenvironment. *Stem Cell Reports* 11, 565-577.
- Morrow, C.S., Porter, T.J., Xu, N., Arndt, Z.P., Ako-Asare, K., Heo, H.J., Thompson, E.A.N., and Moore, D.L. (2020). Vimentin Coordinates Protein Turnover at the Aggresome during Neural Stem Cell Quiescence Exit. *Cell Stem Cell* 26, 558-568 e559.
- Navarro, P., Chambers, I., Karwacki-Neisius, V., Chureau, C., Morey, C., Rougeulle, C., and Avner, P. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 321, 1693-1695.
- Neftel, C., Laffy, J., Filbin, M.G., Hara, T., Shore, M.E., Rahme, G.J., Richman, A.R., Silverbush, D., Shaw, M.L., Hebert, C.M., *et al.* (2019). An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma. *Cell* 178, 835-849 e821.
- Nemajerova, A., Kim, S.Y., Petrenko, O., and Moll, U.M. (2012). Two-factor reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells reveals partial functional redundancy of Sox2 and Klf4. *Cell Death Differ* 19, 1268-1276.

- Newcomb, E.W., Madonia, W.J., Pisharody, S., Lang, F.F., Koslow, M., and Miller, D.C. (1993). A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 3, 229-235.
- Nguyen, L.V., Vanner, R., Dirks, P., and Eaves, C.J. (2012). Cancer stem cells: an evolving concept. *Nat Rev Cancer* 12, 133-143.
- Nicola, N.A., and Babon, J.J. (2015). Leukemia inhibitory factor (LIF). *Cytokine Growth Factor Rev* 26, 533-544.
- Nicola, Z., Fabel, K., and Kempermann, G. (2015). Development of the adult neurogenic niche in the hippocampus of mice. *Front Neuroanat* 9, 53.
- Noh, M.G., Oh, S.J., Ahn, E.J., Kim, Y.J., Jung, T.Y., Jung, S., Kim, K.K., Lee, J.H., Lee, K.H., and Moon, K.S. (2017). Prognostic significance of E-cadherin and N-cadherin expression in Gliomas. *BMC Cancer* 17, 583.
- Nowicki, M.O., Hayes, J.L., Chiocca, E.A., and Lawler, S.E. (2019). Proteomic Analysis Implicates Vimentin in Glioblastoma Cell Migration. *Cancers (Basel)* 11.
- Obernier, K., and Alvarez-Buylla, A. (2019). Neural stem cells: origin, heterogeneity and regulation in the adult mammalian brain. *Development* 146.
- Ofenbauer, A., and Tursun, B. (2019). Strategies for in vivo reprogramming. *Curr Opin Cell Biol* 61, 9-15.
- Ohhata, T., and Wutz, A. (2013). Reactivation of the inactive X chromosome in development and reprogramming. *Cell Mol Life Sci* 70, 2443-2461.
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., *et al.* (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell* 156, 663-677.
- Okada, M., Yano, H., Hirose, Y., Nakayama, N., Ohe, N., Shinoda, J., and Iwama, T. (2011). Olig2 is useful in the differential diagnosis of oligodendrogliomas and extraventricular neurocytomas. *Brain Tumor Pathol* 28, 157-161.
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
- Oliva, C.R., Halloran, B., Hjelmeland, A.B., Vazquez, A., Bailey, S.M., Sarkaria, J.N., and Griguer, C.E. (2018). IGFBP6 controls the expansion of chemoresistant glioblastoma through paracrine IGF2/IGF-1R signaling. *Cell Commun Signal* 16, 61.
- Omole, A.E., and Fakoya, A.O.J. (2018). Ten years of progress and promise of induced pluripotent stem cells: historical origins, characteristics, mechanisms, limitations, and potential applications. *PeerJ* 6, e4370.
- Ordog, T., Syed, S.A., Hayashi, Y., and Asuzu, D.T. (2012). Epigenetics and chromatin dynamics: a review and a paradigm for functional disorders. *Neurogastroenterol Motil* 24, 1054-1068.
- Ortiz-Alvarez, G., Daclin, M., Shihavuddin, A., Lansade, P., Fortoul, A., Faucourt, M., Clavreul, S., Lalioti, M.E., Taraviras, S., Hippenmeyer, S., *et al.* (2019). Adult Neural Stem Cells and Multiciliated Ependymal Cells Share a Common Lineage Regulated by the Geminin Family Members. *Neuron* 102, 159-172 e157.
- Otsuka, S., Maegawa, S., Takamura, A., Kamitani, H., Watanabe, T., Oshimura, M., and Nanba, E. (2009). Aberrant promoter methylation and expression of the imprinted PEG3 gene in glioma. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 85, 157-165.



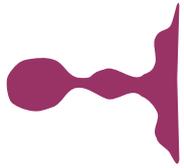
- Papp, B., and Plath, K. (2013). Epigenetics of reprogramming to induced pluripotency. *Cell* 152, 1324-1343.
- Park, D., Xiang, A.P., Mao, F.F., Zhang, L., Di, C.G., Liu, X.M., Shao, Y., Ma, B.F., Lee, J.H., Ha, K.S., *et al.* (2010). Nestin is required for the proper self-renewal of neural stem cells. *Stem cells* 28, 2162-2171.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.M., Gallia, G.L., *et al.* (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321, 1807-1812.
- Pasque, V., and Plath, K. (2015). X chromosome reactivation in reprogramming and in development. *Curr Opin Cell Biol* 37, 75-83.
- Pastor, W.A., Chen, D., Liu, W., Kim, R., Sahakyan, A., Lukianchikov, A., Plath, K., Jacobsen, S.E., and Clark, A.T. (2016). Naive Human Pluripotent Cells Feature a Methylation Landscape Devoid of Blastocyst or Germline Memory. *Cell Stem Cell* 18, 323-329.
- Pastrana, E., Cheng, L.C., and Doetsch, F. (2009). Simultaneous prospective purification of adult subventricular zone neural stem cells and their progeny. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 6387-6392.
- Patel, A.P., Tirosh, I., Trombetta, J.J., Shalek, A.K., Gillespie, S.M., Wakimoto, H., Cahill, D.P., Nahed, B.V., Curry, W.T., Martuza, R.L., *et al.* (2014). Single-cell RNA-seq highlights intratumoral heterogeneity in primary glioblastoma. *Science* 344, 1396-1401.
- Paw, I., Carpenter, R.C., Watabe, K., Debinski, W., and Lo, H.W. (2015). Mechanisms regulating glioma invasion. *Cancer Lett* 362, 1-7.
- Peglion, F., and Etienne-Manneville, S. (2012). N-cadherin expression level as a critical indicator of invasion in non-epithelial tumors. *Cell Adh Migr* 6, 327-332.
- Perez, J.D., Rubinstein, N.D., Fernandez, D.E., Santoro, S.W., Needleman, L.A., Ho-Shing, O., Choi, J.J., Zirlinger, M., Chen, S.K., Liu, J.S., *et al.* (2015). Quantitative and functional interrogation of parent-of-origin allelic expression biases in the brain. *Elife* 4, e07860.
- Perrera, V., and Martello, G. (2019). How Does Reprogramming to Pluripotency Affect Genomic Imprinting? *Front Cell Dev Biol* 7, 76.
- Peters, J. (2014). The role of genomic imprinting in biology and disease: an expanding view. *Nat Rev Genet* 15, 517-530.
- Pick, M., Stelzer, Y., Bar-Nur, O., Mayshar, Y., Eden, A., and Benvenisty, N. (2009). Clone- and gene-specific aberrations of parental imprinting in human induced pluripotent stem cells. *Stem cells* 27, 2686-2690.
- Plass, C., and Soloway, P.D. (2002). DNA methylation, imprinting and cancer. *Eur J Hum Genet* 10, 6-16.
- Pollard, S.M., Yoshikawa, K., Clarke, I.D., Danovi, D., Stricker, S., Russell, R., Bayani, J., Head, R., Lee, M., Bernstein, M., *et al.* (2009). Glioma stem cell lines expanded in adherent culture have tumor-specific phenotypes and are suitable for chemical and genetic screens. *Cell Stem Cell* 4, 568-580.
- Ponta, H., Sherman, L., and Herrlich, P.A. (2003). CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews Molecular cell biology* 4, 33-45.
- Prokhorova, T.A., Harkness, L.M., Frandsen, U., Ditzel, N., Schroder, H.D., Burns, J.S., and Kassem, M. (2009). Teratoma formation by human embryonic stem cells is site dependent and enhanced by the presence of Matrigel. *Stem Cells Dev* 18, 47-54.

- Qu-Petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, C., Wernig, A., *et al.* (2002). Identification of a novel population of muscle stem cells in mice: potential for muscle regeneration. *The Journal of cell biology* 157, 851-864.
- Rasmussen, K.D., and Helin, K. (2016). Role of TET enzymes in DNA methylation, development, and cancer. *Genes Dev* 30, 733-750.
- Raveh, E., Matouk, I.J., Gilon, M., and Hochberg, A. (2015). The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. *Mol Cancer* 14, 184.
- Razin, A., and Cedar, H. (1991). DNA methylation and gene expression. *Microbiol Rev* 55, 451-458.
- Reik, W., and Walter, J. (2001). Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2, 21-32.
- Relaix, F., Wei, X., Li, W., Pan, J., Lin, Y., Bowtell, D.D., Sassoon, D.A., and Wu, X. (2000). Pw1/Peg3 is a potential cell death mediator and cooperates with Siah1a in p53-mediated apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 2105-2110.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414, 105-111.
- Reynolds, B.A., and Weiss, S. (1992). Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 255, 1707-1710.
- Rodriguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernandez, F., Serrano, M., and Avila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports* 15, 1056-1066.
- Rosenthal, N., and Brown, S. (2007). The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology* 9, 993-999.
- Rowland, B.D., Bernards, R., and Peeper, D.S. (2005). The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nature cell biology* 7, 1074-1082.
- Rugg-Gunn, P.J., Ferguson-Smith, A.C., and Pedersen, R.A. (2005). Epigenetic status of human embryonic stem cells. *Nat Genet* 37, 585-587.
- Rugg-Gunn, P.J., Ferguson-Smith, A.C., and Pedersen, R.A. (2007). Status of genomic imprinting in human embryonic stem cells as revealed by a large cohort of independently derived and maintained lines. *Hum Mol Genet* 16 *Spec No. 2*, R243-251.
- Sakatani, T., Kaneda, A., Iacobuzio-Donahue, C.A., Carter, M.G., de Boom Witzel, S., Okano, H., Ko, M.S., Ohlsson, R., Longo, D.L., and Feinberg, A.P. (2005). Loss of imprinting of Igf2 alters intestinal maturation and tumorigenesis in mice. *Science* 307, 1976-1978.
- Sampetean, O., and Saya, H. (2018). Modeling phenotypes of malignant gliomas. *Cancer Sci* 109, 6-14.
- Sanai, N., Alvarez-Buylla, A., and Berger, M.S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *N Engl J Med* 353, 811-822.
- Sanges, D., Romo, N., Simonte, G., Di Vicino, U., Tahoces, A.D., Fernandez, E., and Cosma, M.P. (2013). Wnt/beta-catenin signaling triggers neuron reprogramming and regeneration in the mouse retina. *Cell Rep* 4, 271-286.
- SanMiguel, J.M., and Bartolomei, M.S. (2018). DNA methylation dynamics of genomic imprinting in mouse development. *Biol Reprod* 99, 252-262.



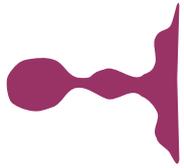
- Satelli, A., and Li, S. (2011). Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* 68, 3033-3046.
- Schwartz, S., and Rhiner, C. (2018). Reservoirs for repair? Damage-responsive stem cells and adult tissue regeneration in *Drosophila*. *The International journal of developmental biology* 62, 465-471.
- Sharma, S., Kelly, T.K., and Jones, P.A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27-36.
- Sheridan, S.D., Surampudi, V., and Rao, R.R. (2012). Analysis of embryoid bodies derived from human induced pluripotent stem cells as a means to assess pluripotency. *Stem Cells Int* 2012, 738910.
- Shi, W., Wang, H., Pan, G., Geng, Y., Guo, Y., and Pei, D. (2006). Regulation of the pluripotency marker Rex-1 by Nanog and Sox2. *J Biol Chem* 281, 23319-23325.
- Shimozaki, K. (2014). Sox2 transcription network acts as a molecular switch to regulate properties of neural stem cells. *World J Stem Cells* 6, 485-490.
- Silva, J., Barrandon, O., Nichols, J., Kawaguchi, J., Theunissen, T.W., and Smith, A. (2008). Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS biology* 6, e253.
- Sim, Y.J., Kim, M.S., Nayfeh, A., Yun, Y.J., Kim, S.J., Park, K.T., Kim, C.H., and Kim, K.S. (2017). 2i Maintains a Naive Ground State in ESCs through Two Distinct Epigenetic Mechanisms. *Stem Cell Reports* 8, 1312-1328.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396-401.
- Smallwood, S.A., and Kelsey, G. (2012). De novo DNA methylation: a germ cell perspective. *Trends Genet* 28, 33-42.
- Smith, A.G., Heath, J.K., Donaldson, D.D., Wong, G.G., Moreau, J., Stahl, M., and Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336, 688-690.
- Sobhani, A., Khanlarkhani, N., Baazm, M., Mohammadzadeh, F., Najafi, A., Mehdinejadani, S., and Sargolzaei Aval, F. (2017). Multipotent Stem Cell and Current Application. *Acta medica Iranica* 55, 6-23.
- Sohn, J., Orosco, L., Guo, F., Chung, S.H., Bannerman, P., Mills Ko, E., Zarbalis, K., Deng, W., and Pleasure, D. (2015). The subventricular zone continues to generate corpus callosum and rostral migratory stream astroglia in normal adult mice. *J Neurosci* 35, 3756-3763.
- Son, M.J., Woolard, K., Nam, D.H., Lee, J., and Fine, H.A. (2009). SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* 4, 440-452.
- Son, M.Y., Choi, H., Han, Y.M., and Cho, Y.S. (2013). Unveiling the critical role of REX1 in the regulation of human stem cell pluripotency. *Stem cells* 31, 2374-2387.
- Sottoriva, A., Spiteri, I., Piccirillo, S.G., Touloumis, A., Collins, V.P., Marioni, J.C., Curtis, C., Watts, C., and Tavare, S. (2013). Intratumor heterogeneity in human glioblastoma reflects cancer evolutionary dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110, 4009-4014.
- Sripathy, S., Leko, V., Adrianse, R.L., Loe, T., Foss, E.J., Dalrymple, E., Lao, U., Gatbonton-Schwager, T., Carter, K.T., Payer, B., *et al.* (2017). Screen for reactivation of MeCP2 on the inactive X

- chromosome identifies the BMP/TGF-beta superfamily as a regulator of XIST expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114, 1619-1624.
- Srivastava, D., and DeWitt, N. (2016). In Vivo Cellular Reprogramming: The Next Generation. *Cell* 166, 1386-1396.
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., and Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322, 945-949.
- Sternecker, J., Hoing, S., and Scholer, H.R. (2012). Concise review: Oct4 and more: the reprogramming expressway. *Stem cells* 30, 15-21.
- Su, W., Foster, S.C., Xing, R., Feistel, K., Olsen, R.H., Acevedo, S.F., Raber, J., and Sherman, L.S. (2017). CD44 Transmembrane Receptor and Hyaluronan Regulate Adult Hippocampal Neural Stem Cell Quiescence and Differentiation. *J Biol Chem* 292, 4434-4445.
- Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D., and Collins, V.P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 8602-8606.
- Surani, M.A., Hayashi, K., and Hajkova, P. (2007). Genetic and epigenetic regulators of pluripotency. *Cell* 128, 747-762.
- Sutcliffe, J.S., Nakao, M., Christian, S., Orstavik, K.H., Tommerup, N., Ledbetter, D.H., and Beaudet, A.L. (1994). Deletions of a differentially methylated CpG island at the SNRPN gene define a putative imprinting control region. *Nat Genet* 8, 52-58.
- Szwagierczak, A., Bultmann, S., Schmidt, C.S., Spada, F., and Leonhardt, H. (2010). Sensitive enzymatic quantification of 5-hydroxymethylcytosine in genomic DNA. *Nucleic Acids Res* 38, e181.
- Tada, M., Takahama, Y., Abe, K., Nakatsuji, N., and Tada, T. (2001). Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol* 11, 1553-1558.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature reviews Molecular cell biology* 17, 183-193.
- Takahashi, N., Tarumi, W., Itoh, M.T., and Ishizuka, B. (2015). The Stage- and Cell Type-Specific Localization of Fragile X Mental Retardation Protein in Rat Ovaries. *Reprod Sci* 22, 1524-1529.
- Takikawa, S., Ray, C., Wang, X., Shamis, Y., Wu, T.Y., and Li, X. (2013). Genomic imprinting is variably lost during reprogramming of mouse iPS cells. *Stem Cell Res* 11, 861-873.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., Garcia-Verdugo, J.M., and Doetsch, F. (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell Stem Cell* 3, 279-288.
- Tejero, R., Huang, Y., Katsyv, I., Kluge, M., Lin, J.Y., Tome-Garcia, J., Daviaud, N., Wang, Y., Zhang, B., Tsankova, N.M., *et al.* (2019). Gene signatures of quiescent glioblastoma cells reveal mesenchymal shift and interactions with niche microenvironment. *EBioMedicine* 42, 252-269.
- Teshigawara, R., Cho, J., Kameda, M., and Tada, T. (2017). Mechanism of human somatic reprogramming to iPS cell. *Lab Invest* 97, 1152-1157.



- Theka, I., Sottile, F., Aulicino, F., Garcia, A.C., and Cosma, M.P. (2017). Reduced expression of Paternally Expressed Gene-3 enhances somatic cell reprogramming through mitochondrial activity perturbation. *Sci Rep* 7, 9705.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
- Thorvaldsen, J.L., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1998). Deletion of the H19 differentially methylated domain results in loss of imprinted expression of H19 and Igf2. *Genes Dev* 12, 3693-3702.
- Toma, J.G., Akhavan, M., Fernandes, K.J., Barnabe-Heider, F., Sadikot, A., Kaplan, D.R., and Miller, F.D. (2001). Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology* 3, 778-784.
- Tomasetti, C., and Vogelstein, B. (2015). Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* 347, 78-81.
- Trepant, A.L., Bouchart, C., Rorive, S., Sauvage, S., Decaestecker, C., Demetter, P., and Salmon, I. (2015). Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour Biol* 36, 1943-1953.
- Tucci, V., Isles, A.R., Kelsey, G., Ferguson-Smith, A.C., and Erice Imprinting, G. (2019). Genomic Imprinting and Physiological Processes in Mammals. *Cell* 176, 952-965.
- Umar, S. (2010). Intestinal stem cells. *Curr Gastroenterol Rep* 12, 340-348.
- Uribe-Lewis, S., Woodfine, K., Stojic, L., and Murrell, A. (2011). Molecular mechanisms of genomic imprinting and clinical implications for cancer. *Expert Rev Mol Med* 13, e2.
- Uyeno, S., Aoki, Y., Nata, M., Sagisaka, K., Kayama, T., Yoshimoto, T., and Ono, T. (1996). IGF2 but not H19 shows loss of imprinting in human glioma. *Cancer Res* 56, 5356-5359.
- van den Hove, D.L., Chouliaras, L., and Rutten, B.P. (2012). The role of 5-hydroxymethylcytosine in aging and Alzheimer's disease: current status and prospects for future studies. *Curr Alzheimer Res* 9, 545-549.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D., and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415, 1030-1034.
- Varela-Nallar, L., and Inestrosa, N.C. (2013). Wnt signaling in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Front Cell Neurosci* 7, 100.
- Verhaak, R.G., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., *et al.* (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 17, 98-110.
- Wagers, A.J., and Weissman, I.L. (2004). Plasticity of adult stem cells. *Cell* 116, 639-648.
- Wang, F., Zheng, Z., Guan, J., Qi, D., Zhou, S., Shen, X., Wang, F., Wenkert, D., Kirmani, B., Solouki, T., *et al.* (2018a). Identification of a panel of genes as a prognostic biomarker for glioblastoma. *EBioMedicine* 37, 68-77.
- Wang, J., Sakariassen, P.O., Tsinkalovsky, O., Immervoll, H., Boe, S.O., Svendsen, A., Prestegarden, L., Rosland, G., Thorsen, F., Stuhr, L., *et al.* (2008). CD133 negative glioma cells form tumors in nude rats and give rise to CD133 positive cells. *Int J Cancer* 122, 761-768.

- Wang, K., Bekar, L.K., Furber, K., and Walz, W. (2004). Vimentin-expressing proximal reactive astrocytes correlate with migration rather than proliferation following focal brain injury. *Brain Res* 1024, 193-202.
- Wang, L., Zuo, X., Xie, K., and Wei, D. (2018b). The Role of CD44 and Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol* 1692, 31-42.
- Wang, Q., Hu, B., Hu, X., Kim, H., Squatrito, M., Scarpace, L., deCarvalho, A.C., Lyu, S., Li, P., Li, Y., *et al.* (2017). Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment. *Cancer Cell* 32, 42-56 e46.
- Wang, S., Zhang, Q., Tiwari, S.K., Lichinchi, G., Yau, E.H., Hui, H., Li, W., Furnari, F., and Rana, T.M. (2020). Integrin α v β 5 Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. *Cell Rep* 30, 969-983 e964.
- Wang, Y., Zhao, C., Hou, Z., Yang, Y., Bi, Y., Wang, H., Zhang, Y., and Gao, S. (2018c). Unique molecular events during reprogramming of human somatic cells to induced pluripotent stem cells (iPSCs) at naive state. *Elife* 7.
- Wilkinson, L.S., Davies, W., and Isles, A.R. (2007). Genomic imprinting effects on brain development and function. *Nat Rev Neurosci* 8, 832-843.
- Williams, R.L., Hilton, D.J., Pease, S., Willson, T.A., Stewart, C.L., Gearing, D.P., Wagner, E.F., Metcalf, D., Nicola, N.A., and Gough, N.M. (1988). Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336, 684-687.
- Williamson, C.M., Turner, M.D., Ball, S.T., Nottingham, W.T., Glenister, P., Fray, M., Tymowska-Lalanne, Z., Plagge, A., Powles-Glover, N., Kelsey, G., *et al.* (2006). Identification of an imprinting control region affecting the expression of all transcripts in the Gnas cluster. *Nat Genet* 38, 350-355.
- Wortge, S., Eshkind, L., Cabezas-Wallscheid, N., Lakaye, B., Kim, J., Heck, R., Abassi, Y., Diken, M., Sprengel, R., and Bockamp, E. (2010). Tetracycline-controlled transgene activation using the ROSA26-iM2-GFP knock-in mouse strain permits GFP monitoring of DOX-regulated transgene-expression. *BMC Dev Biol* 10, 95.
- Wu, H., Coskun, V., Tao, J., Xie, W., Ge, W., Yoshikawa, K., Li, E., Zhang, Y., and Sun, Y.E. (2010). Dnmt3a-dependent nonpromoter DNA methylation facilitates transcription of neurogenic genes. *Science* 329, 444-448.
- Wu, X., and Zhang, Y. (2017). TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet* 18, 517-534.
- Xu, X., Hou, Y., Yin, X., Bao, L., Tang, A., Song, L., Li, F., Tsang, S., Wu, K., Wu, H., *et al.* (2012). Single-cell exome sequencing reveals single-nucleotide mutation characteristics of a kidney tumor. *Cell* 148, 886-895.
- Yamada, T., Kawamata, T., Walker, D.G., and McGeer, P.L. (1992). Vimentin immunoreactivity in normal and pathological human brain tissue. *Acta Neuropathol* 84, 157-162.
- Yao, B., Christian, K.M., He, C., Jin, P., Ming, G.L., and Song, H. (2016). Epigenetic mechanisms in neurogenesis. *Nat Rev Neurosci* 17, 537-549.
- Yin, D., Xie, D., Sakajiri, S., Miller, C.W., Zhu, H., Popoviciu, M.L., Said, J.W., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2006). DLK1: increased expression in gliomas and associated with oncogenic activities. *Oncogene* 25, 1852-1861.
- Ying, Q.L., Stavridis, M., Griffiths, D., Li, M., and Smith, A. (2003). Conversion of embryonic stem cells into neuroectodermal precursors in adherent monoculture. *Nat Biotechnol* 21, 183-186.



- Yokoo, H., Nobusawa, S., Takebayashi, H., Ikenaka, K., Isoda, K., Kamiya, M., Sasaki, A., Hirato, J., and Nakazato, Y. (2004). Anti-human Olig2 antibody as a useful immunohistochemical marker of normal oligodendrocytes and gliomas. *Am J Pathol* 164, 1717-1725.
- Yoo, M.H., and Hatfield, D.L. (2008). The cancer stem cell theory: is it correct? *Mol Cells* 26, 514-516.
- Yu, J., Vodyanik, M.A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J.L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G.A., Ruotti, V., Stewart, R., *et al.* (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920.
- Yuan, X., Wan, H., Zhao, X., Zhu, S., Zhou, Q., and Ding, S. (2011). Brief report: combined chemical treatment enables Oct4-induced reprogramming from mouse embryonic fibroblasts. *Stem cells* 29, 549-553.
- Zahonero, C., Sepulveda, J.M., and Sanchez-Gomez, P. (2015). [Epidermic growth factor receptor (EGFR) in glioblastomas: the mechanism of tumorigenesis and its role as a therapeutic target]. *Rev Neurol* 61, 85-93.
- Zbinden, M., Duquet, A., Lorente-Trigos, A., Ngwabyt, S.N., Borges, I., and Ruiz i Altaba, A. (2010). NANOG regulates glioma stem cells and is essential in vivo acting in a cross-functional network with GLI1 and p53. *EMBO J* 29, 2659-2674.
- Zhao, C., Deng, W., and Gage, F.H. (2008). Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis. *Cell* 132, 645-660.
- Zhao, C., Teng, E.M., Summers, R.G., Jr., Ming, G.L., and Gage, F.H. (2006). Distinct morphological stages of dentate granule neuron maturation in the adult mouse hippocampus. *J Neurosci* 26, 3-11.
- Zhao, S., Chen, C., Chang, K., Karnad, A., Jagirdar, J., Kumar, A.P., and Freeman, J.W. (2016). CD44 Expression Level and Isoform Contributes to Pancreatic Cancer Cell Plasticity, Invasiveness, and Response to Therapy. *Clin Cancer Res* 22, 5592-5604.
- Zhou, T., Lin, W., Zhu, Q., Renaud, H., Liu, X., Li, R., Tang, C., Ma, C., Rao, T., Tan, Z., *et al.* (2019). The role of PEG3 in the occurrence and prognosis of colon cancer. *Onco Targets Ther* 12, 6001-6012.
- Zhu, H., Mitsuhashi, N., Klein, A., Barsky, L.W., Weinberg, K., Barr, M.L., Demetriou, A., and Wu, G.D. (2006). The role of the hyaluronan receptor CD44 in mesenchymal stem cell migration in the extracellular matrix. *Stem cells* 24, 928-935.
- Zhu, S., Li, W., Zhou, H., Wei, W., Ambasadhan, R., Lin, T., Kim, J., Zhang, K., and Ding, S. (2010). Reprogramming of human primary somatic cells by OCT4 and chemical compounds. *Cell Stem Cell* 7, 651-655.
- Ziegler, A.N., Feng, Q., Chidambaram, S., Testai, J.M., Kumari, E., Rothbard, D.E., Constancia, M., Sandovici, I., Cominski, T., Pang, K., *et al.* (2019). Insulin-like Growth Factor II: An Essential Adult Stem Cell Niche Constituent in Brain and Intestine. *Stem Cell Reports* 12, 816-830.
- Zou, L., Liu, W., Zhang, Z., Edwards, E.J., Gathunga, E.K., Fan, P., Duan, W., Li, S., and Liang, Z. (2020). Gene body demethylation increases expression and is associated with self-pruning during grape genome duplication. *Hortic Res* 7, 84.

Summary

INTRODUCTION

From zygote to adult stem cell

The formation of a new organism begins with the zygote, a totipotent cell capable of generating the rest of embryonic and extra-embryonic structures. This differentiation potential is lost during development (Sobhani et al., 2017). In the blastocyst stage, cells of the inner mass (ICM) are able to form cells of the three germ layers, but not of the extra-embryonic ones, becoming pluripotent cells. In the adult organism, this pluripotency capacity disappears. However, there are discrete populations of multipotent cells located in different tissues with the capacity for self-renewal and differentiation towards a certain restricted lineages, called adult stem cells (Sobhani et al., 2017). These cells are essential to maintain tissue homeostasis through cell supply or repair in case of injury (Cheung and Rando, 2013; Wagers and Weissman, 2004).

Neural stem cells and adult neurogenesis

Neural stem cells (NSCs) are the adult stem cells located in the brain and represent a reservoir of multipotent cells. Adult NSCs are responsible for the generation of new neurons throughout the life of the organism, process known as neurogenesis (Kempermann et al., 2015). This complex and tightly regulated process is restricted to two brain regions in adult mammals, the subventricular zone (SVZ) in the lateral wall of the ventricles, and the subgranular zone (SGZ) in the dentate gyrus of the hippocampus (Kempermann et al., 2015; Lim and Alvarez-Buylla, 2014). The SVZ corresponds to the most active neurogenic niche in rodents, and contains stem cells called B1 cells, which when activated, generate rapidly amplifying progenitor cells or type C cells, which in turn, produce type A cells or neuroblasts. These neuroblasts migrate through the rostral migratory stream (RMS) until they reach the olfactory bulb (OB) where they integrate and differentiate into interneurons (Giachino et al., 2014; Lagace et al., 2007). In the SGZ, stem cells known as radial or type I cells form type II progenitors, which in turn generate neuroblasts or type III cells. These neuroblasts migrate to the granular layer of the dentate gyrus and differentiate into granule cells, which are integrated into neuronal circuits (Ghosh, 2019; van Praag et al., 2002).

Due to the lack of defining markers of NSCs, the main knowledge of these cells has been possible thanks to their *in vitro* culture (Ming and Song, 2011). However, more recently, detection and isolation strategies have been developed using a combination of several markers present in the different cell subpopulations by flow cytometry (Belenguer et al., 2020; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

Epigenetic regulation of adult neurogenesis

Adult neurogenesis is a dynamic process involving intrinsic and extrinsic factors (Gage, 2000; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). The epigenetic mechanisms regulating NSCs activity include modifications that affect gene expression without altering the nucleotide sequence (Bird, 2007; Jaenisch and Bird, 2003). DNA methylation is one of the most common epigenetic mechanisms for regulating gene expression and involves the activity of enzymes that incorporate the methyl group, DNA methyltransferases (DNMTs), and enzymes responsible for the active demethylation of DNA, deoxygenases TET (Ito et al., 2011). Precisely, TET3 enzyme is the only member of the family that maintains high levels of expression in the adult brain, and its function has been shown to be essential in the regulation of adult NSCs (Montalban-Loro et al., 2019). DNA methylation plays an important role in many physiological and pathological processes.

Genomic imprinting and the regulation of gene dose

Genomic imprinting is an epigenetic mechanism responsible for the mono-allelic expression of a discrete number of genes, called *imprinted genes* (Ferguson-Smith, 2011; Ishida and Moore, 2013). This process is regulated by methylation in specific regions of DNA called the *imprinting control region* (ICR) containing the differentially methylated regions (DMRs) of the maternal and paternal allele. Imprinted genes are usually found in clusters which are regulated by a common DMR (Abramowitz and Bartolomei, 2012; Dindot et al., 2009). ICRs can be methylated on the maternally inherited chromosome or methylated on the paternal chromosome, defining the expression pattern of imprinted alleles. Deletion of ICRs leads to the loss of imprinting (LOI) in the genes located within the cluster and is associated with imprinting syndromes such as Prader-Willi or Angelman syndrome, but also in cancer; most of them involving neurological disorders due to the role of these genes in the brain (Cleaton et al., 2014; Eggermann et al., 2015; Ishida and Moore, 2013).

Genomic imprinting is established in the gametes and must be maintained during the development of the organism to ensure the epigenetic marks that determine the parental origin of each allele (Li and Sasaki, 2011). However, this process can be selectively *switched off* in a non-pathological way in certain cell types or specific moments of development to allow the expression of the silenced allele (Ferron et al., 2011; Ferron et al., 2015). Precisely, this fine and striking gene dose regulation mechanism has been observed in adult NSCs. The imprinted gene *Dlk1* presents biallelic expression in postnatal NSCs, being necessary for the correct function of the adult neurogenesis (Ferron et al., 2011). The niche factor IGF2 is also expressed in a biallelic-manner in the choroid plexuses, vasculature and meninges, being crucial for the homeostasis of the adult

NSCs of the SVZ. However, the NSCs from SGZ maintain the paternal expression of *Igf2* (Ferron et al., 2015). These examples show the importance of the regulation of genomic imprinting in the adult NSCs.

Cellular reprogramming and acquisition of a pluripotent state

The specialized adult cells can be reprogrammed to a previous undifferentiated state equivalent to the cells of ICM, becoming into induced pluripotent stem cells (iPSCs), acquiring the capacities of self-renewal and differentiation potential, characteristics of stem cells (Takahashi and Yamanaka, 2006, 2016). Reprogramming involves changes in gene expression, increasing pluripotent genes and decreasing the specific genes of the somatic cell lineage. Other epigenetic alterations during reprogramming include the reactivation of the inactive X chromosome in female cells, hypomethylation of DNA or silencing of exogenous genes (Teshigawara et al., 2017). Moreover, variable events of loss of imprinting (LOI) have been described during iPSCs generation, being considered by some authors as a marker of pluripotency (Li et al., 2019; Takikawa et al., 2013). Specifically, the paternally methylated locus *Dlk1-Dio3*, regulated by levels of methylation in IG-DMR, is frequently altered in iPSCs (Li et al., 2019; Li et al., 2011). Interestingly, paternally methylated DMRs appear to be more affected by LOI than maternally methylated ones (Bar et al., 2017; Rugg-Gunn et al., 2007).

The induction of cell reprogramming has been carried out by both viral and non-viral mechanisms, capable of integrating exogenous genes into the genome or by temporarily expression of these genes. The transgenic organisms that carry the OSKM cassette coding the four transcriptional factors *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* and *c-Myc*, is one of the most used strategies for the study of the reprogramming process *in vitro* and *in vivo* (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014; Rodriguez-Matellan et al., 2020).

Brain cancer: cancer stem cell theory

Understanding the origin of cancer continues to be a priority aspect of the research in this pathology. Cancer stem cells (CSCs), responsible for the formation and maintenance of cancer, as well as resistance to treatments, have been described in many types of cancer (Ayob and Ramasamy, 2018; Fabian et al., 2013; Reya et al., 2001). Due to the multitude of characteristics shared between adult stem cells and cancer cells, several studies have supported the cancer stem cell theory. According to this theory, adult stem cells might be responsible for the malignant transformation.

In the human brain there are different types of tumors. Glioblastoma (GBM) is the most common and aggressive primary brain tumor, and it has been associated with several genetic and epigenetic alterations (Claus et al., 2005). One of the most common alterations found in human GBM is the overexpression of the EGFR molecule, an activator of various signalling pathways including proliferation, survival, migration, and tumorigenesis. For this reason, this alteration has been associated with classic GBM. However, this tumor shows a high heterogeneity. Indeed, different subtypes within the GBM are present. While the classic subtype is characterized by an increase in EGFR, an increase in the OLIG2 is associated with a pro-neural and less aggressive phenotype. The most aggressive subtype is the mesenchymal type, which is characterized by high levels of CD44. However, these molecules, along with other GBM-associated markers, are not unique to these pathological cells but are also present in NSCs, supporting the cancer stem cell theory. In fact, the ability of adult NSCs from SVZ to form GBM in different regions of the brain has been demonstrated in various studies (Alcantara Llaguno et al., 2019; Lee et al., 2018). Furthermore, this capacity decreases with differentiation, suggesting that NSCs transform more easily than their committed progenitors (Alcantara Llaguno et al., 2019).

Multiple genes have been related to GBM. Moreover, alterations in promoter methylation levels is the main epigenetic mark that occurs during malignant transformation. Human GBM shows a decrease in the epigenetic mark 5hmC, correlating with a decrease in the presence of TET3 enzyme, which is involved in the conversion of the 5mC group into 5hmC (Herrmann et al., 2020). Increasing the levels of expression of this enzyme has shown to inhibit the proliferation of GBM cells (Cui et al., 2019).

Imprinted genes are susceptible to mutations that can lead to tumor formation due to their mono-allelic expression and their involvement in the regulation of growth and metabolism. Patients affected by genomic imprinting syndromes are more susceptible to developing tumors, revealing a possible role of this epigenetic mechanism in cancer formation. Precisely, the LOI is one of the most common and early events in this pathology. For example, LOI at the IGF2-H19 locus in Wilms tumor have been the best characterized association between imprinting and cancer, although alterations in various imprinted genes have been described (Leick et al., 2012; Uribe-Lewis et al., 2011).

Different strategies have been used to understand this cancer. However, it is difficult to generate models that form these tumors efficiently, therefore, various mutations are usually required (Sampetean and Saya, 2018). One of the most used model are the xenotransplants or

allografts. Nevertheless, this methodology does not allow to address one of the most interesting aspects of GBM, the origin.

OBJETIVES

The discovery of CSCs in tumors with similarities to adult stem cells promoted the cancer stem cell theory, which argues that malignant transformation occurs in these tissue stem cells through genetic and epigenetic alterations. In the brain, understanding the mechanisms involved in the maintenance of NSCs and the relationship with malignant transformation is essential to develop useful tools for the diagnosis and treatment of brain tumors. Precisely, the alteration of the epigenetic mechanism of genomic imprinting is one of the most common and earliest events in cancer. Therefore, the main objective of this thesis is to identify the role of genomic imprinting and its epigenetic regulation in the activity of adult NSCs, and its implication in the development of brain tumors.

The specific goals proposed in this thesis are:

1. Study of genomic imprinting and its epigenetic regulation in adult NSCs from the SVZ.
2. Study of genomic imprinting and its epigenetic regulation in glioblastoma.
3. Study of the role of TET3 enzyme in the regulation of genomic imprinting during malignant transformation.

MATERIAL AND METHODS

1. Experimental animals

The animals used in this thesis as well as the experimental procedures have been approved by the ethics committee of the Universitat of València. In this work, different murine strains have been used: i4F (OSKM transgene), GFAP-rtTA (transcriptional activator under the *Gfap* promoter), C57BL6 (wild strain), CAST/EiJ (wild strain used for the generation of hybrid animals) and the Nude strain (immunosuppressed). The experiments were carried out in animals between 2-4 months of age, with the exception of MEFs, obtained from E14.5 embryos, and the electroporation in postnatal animals (P2).

2. Cell cultures

The reprogramming studies have been performed in i4F-B animals, carrying the rtTA and the inducible by doxycycline transgene OSKM (Abad et al., 2013). The i4F-B MEFs, obtained from the disintegration with trypsin/EDTA of E14.5 embryos, and adult NSCs have been used to reprogram. Adult NSCs were obtained from dissection and culture by isolating the SVZ and subsequent

disintegration with papain. The cells were seeded to allow growth in the form of neurospheres and disaggregated again with Acutase® to expand them in well established conditions.

The GBM line, GBM-EGFR, were obtained from Dra. Pilar Sánchez Gómez. This line was generated by overexpression of *Egfr* in p16 and p19 deficient adult NSCs and subsequent injection into immunocompromised mice. For the expansion, the cells were disaggregated with Accumax™ and cultured again in their corresponding medium.

3. Reprogramming with doxycycline treatment *in vitro*

Reprogramming of i4F-B MEFs was based on the treatment with 1 µg/ml of doxycycline in the KsR medium with LIF (Abad et al., 2013). The appearance of cells with pluripotent characteristics, detected by the presence of the SSEA1 marker, was indicative of the reprogramming process. The SSEA1+ cells were isolated and cultured in the absence of doxycycline for complete reprogramming in iPSCs. Regarding the reprogramming of adult NSCs, the primary cultures of adult NSCs from reprogrammable adult mice were treated with 1 µg / ml of doxycycline in the medium of NSCs. After the appearance of SSEA1 + clonal aggregates, the cells were cultured in ES medium with LIF, in the presence of doxycycline. Finally, cells were cultured in 2i selective medium with LIF, initially in the presence of doxycycline which was finally removed to allow complete reprogramming to iPSCs.

4. Characterization of iPSCs

The characterization of the iPSCs was performed by detecting markers associated with pluripotency as well as testing the capacity of generate multiple embryonic linages. The alkaline phosphatase activity was performed after fixing the cells with cold methanol and subsequent staining with Naphthol phosphate, Dimethylformamide and Fast Red Salt in the Tris-HCl buffer. The ability to form embryonic bodies was made by the hanging drop and floating method. Both strategies were based on culturing the iPSCs at low density in the presence of serum. The reactivation of the X chromosome was carried out by analyzing the expression of *Xist* and *Tsix* genes, involved in this process. The expression of *Pgk1*, located on the X chromosome, was also analysed. In order to verify whether the reprogramming had led to chromosomal aberrations, a karyotype study of the iPSCs was carried out by means of inhibition of cell division, subsequent hypotonic shock and fixation with cold Carnoy. The chromosomes were contrasted with Giemsa staining and the number of chromosomes per metaphase was quantified. The differentiation of iPSCs to neuroprogenitors (NPs) was based on the formation of embryo bodies and subsequent treatment with retinoic acid (RA) for 4 days.

5. Reprogramming with doxycycline treatment *in vivo*

In vivo reprogramming was performed using two models based on the expression of the OSKM transgene; a first model, i4F-B, of systemic reprogramming due to the presence of the transcriptional activator rtTA at the *Rosa26* locus. The second model, GFAP-rtTA;i4F, is based in brain-specific reprogramming due to the presence of rtTA under the *Gfap* promoter. For the induction of OSKM expression, both models were treated with doxycycline in water sweetened with 7.5% sucrose. However, the treatment in the i4F-B model was 2.5 weeks with 0.2 mg/ml doxycycline, while the GFAP-rtTA;i4F animals were treated for 4 weeks with 1 mg/ml.

Obtaining tumor cells from GFAP-rtTA;i4F animals treated with doxycycline to induce reprogramming *in vivo* was carried out by disintegrating the brain of these animals with trypsin and subsequent culturing in GBM medium.

6. Characterization of GBM line

GBM-EGFR line was nucleofected with the piggyBAC transposase system of the control vector, the Tet3 FL vector and the Tet3 FL CDmut vector with the Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™ kit, following the manufacturer's instructions. Subsequent selection of nucleofected cells was performed with blasticidin treatment after 48h of nucleofection. For cell cycle analysis, the nucleofected GBM cells GMB^{control}, GMB^{Tet3} and GMB^{Tet3 CDmut} were disaggregated to obtain a suspension of single cells that were stained using BD Cycletest™ Plus DNA Kit, allowing the analysis of the cell cycle phases by propidium iodide staining. The percentages of cells in each phase of the cell cycle were determined by flow cytometry with FACSVerse. For the tumorespheres assay, the GBM cells were disrupted and seeded at low density, 2500 cells in p96 wells with GBM medium.

The number of tumorspheres formed was counted manually using an inverted phase contrast microscope. The detection of cells in S phase of the cell cycle was made by incorporation of the thymidine analog EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) and subsequent revealed. For that, adhered cells were incubated for 1 hour in the presence of 10 μM EdU and subsequently fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 minutes at room temperature. After fixation, permeabilization was performed with 0.5% Triton® X-100 for 20 minutes at room temperature. Finally, the EdU was revealed. The percentage of EdU+ cells was estimated from the number of total cells.

The adhesion capacity of GBM lines was measured by an *in vitro* assay in the presence of fibroblasts that overexpress the adhesion molecule N-Cadherin (NC-929). A total of 1x10⁶ GBM cells, manually disaggregated, were labelled with CellTrace™ Oregon Green™ 488 Carboxylic

Acid Diacetate, Succinimidyl Ester fluorophore for 8 minutes at 37°C, and protected from light. Later, a total of 6500 cells were seeded on NC-929 fibroblasts. The cell co-cultures were incubated for 40 minutes to allow adhesion of the GBM cells. Finally, the cells were fixed with 2% PFA for 15 minutes at room temperature and staining with DAPI. The number of GBM cells adhered to the fibroblast monolayer was estimated using the script "Cell Adhesion" (https://github.com/paucabar/cell_adhesion_assay), implemented as an ImageJ macro available through the Fiji update site "NeuroMol Lab", obtaining the number of GBM cells adhered per mm² to the NC-929 fibroblast monolayer.

The study of the role of Tet3 in the angiogenesis capacity was performed by analysing the proliferation of human endothelial cells HUVEC after being co-cultured with GBM cells. For this, 10,000 GBM^{control}, GMB^{Tet3} and GBM^{Tet3 CDmut} cells were seeded on semipermeable transwells. After 48 hours of medium conditioning, an EdU pulse was performed for 1 hour on the HUVEC cells. Subsequently, the GBM cells were removed and the HUVECs were fixed with 2% PFA for 15 minutes at room temperature. The Ki67 molecule was also detected.

7. Study of the ability to form tumors

To study the tumor capacity of the cells, 1.5x10⁶ cells/200 µl of iPSCs or 2x10⁶ cells/200 µl of GBM and GFAP-rtTA;i4F cells were injected in Nude mice. The cells were resuspended in PBS supplemented with 30% Matrigel and injected subcutaneously in the dorso-lateral area of the caudal region on each side of the animal. When the tumors reached 1.5-2 cm in diameter, the animals were sacrificed and the tumors were removed for analysis. The staining and detection of molecular markers in 10 µm thick sections of tumors was done by inclusion in paraffin and paraffin microtome after having been fixed with Carnoy. For staining, samples were incubated with Haematoxylin for 9-10 minutes and eosin for another 9-10 minutes.

8. Immunodetection and flow cytometry

Protein detection by immunohistochemistry (IHC) and immunocytochemistry (ICC) was based on incubation with a blocking solution composed of 0.2% Triton-100, 1% glycine, and 10% serum in PBS of fixed samples during 1 hour at room temperature. The samples were then incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C and shaking. The next day, the samples were washed and incubated with the secondary antibody for 1 hour with shaking and at room temperature. Finally, DAPI was added to stain the nuclei.

For the detection of membrane markers by flow cytometry, cells were resuspended in 100 µl of the flow cytometry blocking buffer containing the fluorophore-conjugated primary antibodies.

The incubation with these antibodies was carried out at 4 °C for 30 minutes. Cells were washed and DAPI was added to exclude dead cells in the analysis. The analysis was performed using an LSR-Fortessa cytometer.

9. RNA extraction and gene expression analysis

RNA extraction from tissues and cell cultures was performed by using the RNeasy Mini Kit including a DNA digestion using the enzyme DNase. RNA was quantified using a spectrophotometer and 1 µg of RNA was retrotranscribed into complementary DNA (cDNA) using RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Gene expression analysis was carried out by real-time PCR, using 4 ng of cDNA and specific TaqMan™ probes for each gene or SYBR-green primers. The expression levels of each gene were obtained by relative quantification (Δ Ct) using the expression of the *Gapdh* and *18S* genes as endogenous controls. In the case of SYBR-green probes, a standard curve was made with serial dilutions from a mixture of cDNA generated from each sample.

10. Study of genomic imprinting state

The DNA sequences of the imprinted genes of interest were obtained from the NCBI Web Site database. For the identification of SNPs between the subspecies, primers were designed for the amplification of the region of cDNA of interest in the brain of C57/BL6 mice and CAST/EiJ mice of two months of age. To determine the allele-specific expression of the imprinted genes, the regions containing the SNP for the gene studied were amplified by PCR using specific primers from cDNA of hybrid animals. Subsequently, the purified PCR products were sequenced.

11. Study of DNA methylation in imprinting control regions

DNA was obtained by extraction solution at 55 °C overnight. Next, 1 ml of phenol was added at pH 8 and the samples were shaken for 15-30 minutes and subsequently centrifuged at 13,000 rpm for 30 minutes. Then, 1 ml of phenol:chloroform (1:1) equilibrated was added to the aqueous phase. Samples were shaken and centrifuged again, and the aqueous phase was transferred to new tubes and 1 ml of chloroform was added. Finally, 200 µl of 10M NH₄CH₃CO₂ was added. The samples were gently shaken and 2 ml of absolute ethanol was added. They were left shaking overnight at 4°C. The DNA pellets were incubated with 70% ethanol, inverting the tube several times, and centrifuged. Finally, 200 µl of water was added immediately thereafter and incubated at 55°C for 1 hour.

The analysis of the methylation levels at the DMRs of the ICRs was done by pyrosequencing. To do this, bisulfite conversion of DNA was previously made, after which the region of interest

was amplified by PCR. The determination of the percentage of methylation at specific loci was calculated as $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$, where $\Delta\Delta Ct = (C_{T_{Target}} - C_{T_{Reference}})_{sample} - (C_{T_{Target}} - C_{T_{Reference}})_{reference}$ shows completely methylated DNA.

RESULTS

1. Reprogramming of NSCs to iPSCs *in vitro* is associated with changes in the expression and epigenetic state of imprinted genes

Reprogramming of adult NSCs carrying the doxycycline-inducible OSKM transgene began in the absence of LIF, appearing SSEA1+ cells, called pre-iPSCs, which finished their reprogramming efficiently in the 2i/LIF selective medium and in the absence of doxycycline after 20-30 days. The acquisition of the pluripotent state was confirmed with the increase in the expression of *Oct4*, *Nanog* and *Rex1* genes, the decrease in neural genes, and the silencing of the transgene. The reprogrammed cells also showed the capacity of forming cell from the three germ layers *in vitro* and *in vivo*. In addition, iPSCs, which did not suffer chromosomal aberrations, did reactivate the silenced X chromosome in cells from female animals. These iPSCs were also capable of differentiating again into the neural phenotype in the presence of serum and retinoic acid.

Cellular reprogramming to an undifferentiated pluripotent state also showed alterations of genomic imprinting. The expression analysis of the imprinted genes in the iPSCs showed a high percentage (84.62%) of genes altered compared to the NSCs of origin. Around 40% of these genes reverted their expression levels when they were differentiated again into neural progenitors (NPs). The analysis of the methylation levels at the DMRs/ICRs showed a generalized hypomethylation in the iPSCs that was only reverted in paternally methylated gDMRs when iPSCs were differentiated into NPs. However, most of the alterations of the expression of imprinted genes were not related to changes of the methylation levels at the DMRs within the ICRs. Only *Dlk1* showed coincident expression and methylation changes in both iPSCs and NPs. *Dlk1* is an imprinted gene that loses this imprinting state in postnatal NSCs, physiologically. Reprogramming of NSCs led to the acquisition of the imprinting state that was lost again when iPSCs were differentiated again into NPs.

2. Genomic imprinting is altered during reprogramming and tumor formation *in vivo*

The expression of imprinted genes was analysed in human GBMs and non-tumor samples. This analysis showed more than 70% of genes were affected, most of them, with a decrease in their expression. Furthermore, the expression profile of the imprinted genes showed to be sufficient to identify GBM cells from non-tumor cell types such as oligodendrocytes. Moreover, this study also allowed to distinguish between cell subtypes within GBM. However, it was not able

to segregate the adult NSCs y GBM cells, indicating a common gene expression profile between both populations.

To study the role of genomic imprinting during the acquisition of the cancer phenotype in the brain, a model of tumor formation based on cell reprogramming was used. The reprogramming was performed firstly in the previously described i4F-B model; however, reprogramming was not efficient enough for the formation of tumors in the brain. Therefore, the next murine model used in this study was based on the reprogramming of GFAP+ cells (NSCs and astrocytes). This strategy allowed the generation of brain tumors in the 100% of the animals reprogrammed, expressing GBM markers such as CD44, SSEA1 or NESTIN, among others. These tumors showed alterations in several imprinted genes.

In order to compare the alterations in the expression of imprinted genes in the tumors of reprogrammed animals with those that occur in GBM, the murine cell model GBM-EGFR was used. This cell line also presented alterations in the expression of the 50% of the imprinted genes, of which only *Peg3* and *Snrpn* coincided with the changes in methylation in their regulatory DMRs.

3. Study of the role of TET3 in the regulation of genomic imprinting during malignant transformation

TET family enzymes are involved in the active demethylation of DNA through the oxidation of the 5-methylcytosine (5mC) group in 5-hydroxymethylcytosine (5hmC). The expression data for *TET3* in the database are controversial, showing both decreased and increased levels in GBM patients. Therefore, the role of this enzyme in the regulation of methylation levels in ICRs and the expression of imprinted genes in GBM was analysed. Although, overexpression of this enzyme reduced the proliferation of GBM-EGFR cells, high levels of TET3 inhibited their ability to form tumors *in vivo*, in a dioxygenase-dependent manner. Furthermore, this increased expression of *Tet3* led to the alteration of more than 50% of the imprinted genes. This effect of TET3 showed to be dependent on methylation processes in *Zdbf2*, *Igf2* and *Meg3* genes. However, only *Igf2* expression changes correlated with DMR methylation changes.

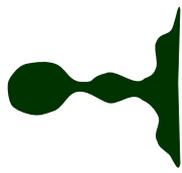
CONCLUSIONS

1. The expression of imprinted genes is significantly altered during the acquisition of pluripotency in adult NSCs, suggesting a relevant role of genomic imprinting in cellular reprogramming.
2. Reprogramming of adult NSCs into iPSCs involves global hypomethylation at the imprinting control regions, which is reverted during the differentiation of iPSCs into NPps

only at paternally methylated gDMRs. This shows a divergent mechanism of regulation in maternally and paternally methylated DMRs during reprogramming.

3. The imprinting state of *Dlk1*, lost in adult NSCs, is restored in iPSCs and lost again after their differentiation into NPs, suggesting a plastic regulation of genomic imprinting in neural cells.
4. *In vivo* cellular reprogramming by OSKM induced expression in brain cells of the astrocytic lineage, leads to the generation of brain tumors, with molecular features of either teratomas or GBM.
5. Brain tumor formation involves changes in the expression of several imprinted genes, showing two molecular profiles that might be coincident with teratoma or GBM.
6. Human and murine GBM show altered expression of imprinted genes, suggesting a relevant role of this epigenetic mechanism in brain tumor. Importantly, the expression profile of imprinted genes is sufficient to distinguish non-tumor cell populations from GBM cells.
7. *TET3* is controversially expressed in human, with high and low levels of this gene associated with survival of the patients, suggesting a role of TET3 enzyme in the pathology.
8. Overexpression of *Tet3* in murine GBM promotes tumor formation *in vivo* in a demethylation-dependent manner.
9. TET3 regulates the expression of imprinted genes in brain tumors. This regulation is exerted through the dioxygenase activity in the imprinted genes *Zdbf2*, *Igf2* and *Meg3*.

Resumen



INTRODUCCIÓN

Del cigoto a la célula madre adulta

La formación de un organismo se inicia con la aparición del cigoto, una célula totipotente capaz de formar el resto de estructuras embrionarias y extraembrionarias (Sobhani et al., 2017). Este potencial de diferenciación se va perdiendo durante el desarrollo, de manera que en el estadio de blastocisto, las células de la masa interna (ICM) son capaces de formar células de las tres capas germinales, pero no de las extraembrionarias, pasando a ser células pluripotentes. En el organismo adulto, esta capacidad pluripotente desaparece; sin embargo, existen poblaciones discretas de células situadas en los diferentes tejidos con capacidad de auto-renovación y diferenciación hacia un determinado linaje o multipotentes, llamadas células madre adultas. Estas células son esenciales para mantener la homeostasis del tejido mediante el aporte celular o la reparación en caso de daño (Cheung and Rando, 2013; Wagers and Weissman, 2004).

Células madre neurales y neurogénesis adulta

Las células madre adultas situadas en el cerebro son conocidas como células madre neurales (NSCs) y suponen un reservorio de células multipotentes responsables de la formación de nuevas neuronas a lo largo de la vida del organismo, proceso conocido como neurogénesis (Kempermann et al., 2015). Este complejo y estrechamente regulado proceso queda restringido a dos regiones cerebrales en los mamíferos adultos, la zona subventricular (SVZ) en la pared lateral de los ventrículos, y la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del hipocampo (Kempermann et al., 2015; Lim and Alvarez-Buylla, 2014). La SVZ, el nicho neurogénico más activo en los roedores, y contiene célula madre llamadas células B1, que al activarse, generan células progenitoras de amplificación rápida o células tipo C, que a su vez, producen células tipo A o neuroblastos, que migran a través de la vía rostral migratoria (RMS) hasta alcanzar los bulbos olfativos (OBs) donde se integran y diferencian en interneuronas (Giachino et al., 2014; Lagace et al., 2007). En la SGZ, las células madre conocidas como células radiales o tipo I, forman progenitores de tipo II, que a su vez, generan neuroblastos o células tipo III. Estos neuroblastos migran a la capa granular del giro dentado y se diferencian en células granulares, que se integran en los circuitos neuronales (Ghosh, 2019; van Praag et al., 2002). Debido a la falta de marcadores definitorios de las células madre neurales, los principales conocimientos sobre estas células han sido posibles gracias a su cultivo *in vitro* (Ming and Song, 2011). Sin embargo, en los últimos años, se han desarrollado estrategias de detección y aislamiento de estas células gracias a la identificación de combinaciones de marcadores presentes en las diferentes subpoblaciones celulares mediante citometría de flujo (Belenguer et al., 2020; Llorens-Bobadilla et al., 2015).

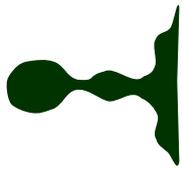
Regulación epigenética de la neurogénesis adulta

La neurogénesis adulta en ambos nichos es un proceso dinámico que se encuentra altamente regulado por factores intrínsecos y extrínsecos (Gage, 2000; Lim and Alvarez-Buylla, 2016). Los mecanismos epigenéticos que regulan la actividad de las NSCs implican modificaciones que afectan a la expresión génica sin alterar la secuencia de nucleótidos (Bird, 2007; Jaenisch and Bird, 2003). La metilación del DNA se trata de uno de los mecanismos más comunes de regulación de la expresión génica e implica la actividad de enzimas que incorporan el grupo metilo, las DNA metiltransferasas (DNMTs), y enzimas encargadas de la desmetilación activa del DNA, las deoxigenasas TET (Ito et al., 2011). Precisamente la enzima TET3 es el único miembro de la familia que mantiene sus niveles de expresión en el organismo adulto, y su función ha demostrado ser clave en la regulación de las NSCs adultas (Montalban-Loro et al., 2019). La metilación del DNA participa de forma esencial en multitud de procesos tanto fisiológicos como patológicos.

Impronta genómica y regulación de la dosis génica

La impronta genómica es el mecanismo epigenético responsable de la expresión monoalélica de algunos genes, los *genes improntados* (Ferguson-Smith, 2011; Ishida and Moore, 2013). Este proceso es regulado por metilación en regiones concretas del DNA llamadas región de control de impronta (ICR) donde se sitúan las regiones diferencialmente metiladas (DMRs) del alelo materno y paterno, y que permite regular de forma conjunta diversos genes improntados debido a que éstos se encuentran generalmente agrupados en “*clusters*” (Abramowitz and Bartolomei, 2012; Dindot et al., 2009). Las ICRs pueden estar metiladas en el cromosoma heredado maternalmente o metiladas en el cromosoma paterno, definiendo el patrón de expresión de los alelos improntados. La delección de estas regiones reguladoras conlleva la pérdida de impronta genómica (LOI) en los genes situados en el “*cluster*”, y está asociada a diversos síndromes de impronta como el síndrome de Prader-Willis o de Angelman, o también al cáncer; la mayor parte de ellos afectando al desarrollo y al sistema nervioso central debido a la implicación de estos genes en el desarrollo del embrión y en el cerebro adulto (Cleaton et al., 2014; Eggermann et al., 2015; Ishida and Moore, 2013).

La impronta genómica es establecida en los gametos y debe ser mantenida durante el desarrollo del organismo para asegurar las marcas epigenéticas que determinan el origen parental de cada alelo (Li and Sasaki, 2011). Sin embargo, este proceso puede ser selectivamente “apagado” de forma no patológica en ciertos tipos celulares y/o momentos concretos del desarrollo para permitir la expresión del alelo silenciado (Ferron et al., 2011; Ferron et al., 2015). Este fino y llamativo mecanismo de regulación de la dosis génica ha sido observado precisamente



en las NSCs adultas, en las que la expresión del gen improntado de expresión paterna *Dlk1*, presenta expresión bialélica en las NSCs postnatales de la SVZ, siendo clave para el correcto funcionamiento del proceso de neurogénesis (Ferron et al., 2011). También el factor de nicho IGF2 se expresa de forma bialélica en los plexos coroideos, vasculatura y meninges, siendo necesario para la homeostasis de las NSCs de la SVZ; mientras que las NSCs procedentes de la SGZ mantienen de forma improntada el gen de expresión paterna *Igf2* (Ferron et al., 2015). Estos ejemplos, muestran como la expresión de los genes improntados es específica y clave en el mantenimiento de las NSCs adultas.

Reprogramación celular y adquisición de un estado pluripotente

Las células adultas especializadas pueden ser reprogramadas a un estado previo indiferenciado equivalente a las células de la masa interna del blastocito, las célula madre pluripotentes inducidas (iPSCs), adquiriendo las capacidades de auto-renovación y potencial de diferenciación, características de las células madre (Takahashi and Yamanaka, 2006, 2016). La adquisición del estado pluripotente implica cambios de expresión génica, aumentando aquellos genes relacionados con el proceso de indiferenciación, y disminuyendo los genes específicos del linaje de la célula somática; así como alteraciones epigenéticas incluyendo la reactivación del cromosoma X inactivo en las células procedentes de hembras, hipometilación del DNA o silenciamiento de los genes exógenos (Teshigawara et al., 2017). Además, el proceso de reprogramación inducida a iPSCs se caracteriza por eventos variables de pérdida de impronta (LOI), considerándose por algunos autores como un marcador de pluripotencia (Li et al., 2019; Takikawa et al., 2013). En concreto, el locus paternalmente metilado *Dlk1-Dio3*, regulado por los niveles de metilación en IG-DMR, se encuentra frecuentemente alterado en las iPSCs (Li et al., 2019; Li et al., 2011). Curiosamente, las DMRs metiladas paternalmente parecen estar más afectadas por la pérdida de impronta que las metiladas maternalmente (Bar et al., 2017; Rugg-Gunn et al., 2007).

La inducción de la reprogramación celular se ha llevado a cabo mediante diferentes mecanismos, tanto virales como no virales capaces de integrarse en el genoma o mantenidos de forma transitoria. Los organismos transgénicos portadores del casete OSKM que codifica para los cuatro factores transcripcionales *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, es una de la estrategias más utilizadas y que ha permitido el estudio del proceso de reprogramación en el animal vivo (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014; Rodriguez-Matellan et al., 2020).

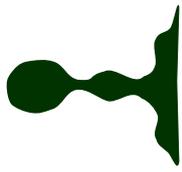
Cáncer cerebral: teoría de la célula madre cancerosa

El estudio sobre el origen del cáncer continúa siendo un aspecto prioritario en la investigación de esta patología. Se han descrito en numerosos tipos de cáncer la presencia de células con características de célula madre llamadas células madre cancerosas (CSCs), responsables de la formación y el mantenimiento del cáncer, así como la resistencia a tratamientos (Ayob and Ramasamy, 2018; Fabian et al., 2013; Reya et al., 2001). Debido a la multitud de características compartidas entre las células madre de tejido y estas células patológicas, diversos estudios han situado el origen de las CSCs en la transformación maligna de las células madre de tejido.

Cáncer en cerebro

En el cerebro humano existen diferentes tipos de tumores que difieren en el origen celular y la parte del cerebro afectada, siendo el glioblastoma (GBM) el tumor primario cerebral más común y agresivo (Claus et al., 2005). Se han descrito numerosas alteraciones genéticas y epigenéticas implicadas en el GBM. Una de las alteraciones más comúnmente encontradas en los pacientes de GBM es la amplificación de la molécula EGFR, un activador de diversas vías de señalización que incluyen proliferación, supervivencia, migración y tumorigénesis. Por ello, esta alteración ha sido asociada al GBM de tipo clásico. Los glioblastomas presentan una alta heterogeneidad, ejemplo de ello es la presencia de diferentes subtipos dentro del GBM. Mientras que el subtipo clásico se caracteriza por el aumento de EGFR, un aumento de la molécula OLIG2 se asocia a un fenotipo pro-neural y menos agresivo. El subtipo más agresivo es el de tipo mesenquimal, el cual contiene elevados niveles de CD44. Sin embargo, estas moléculas, junto con otros marcadores asociados al GBM, no son exclusivas de estas células patológicas sino que también están presentes en las NSCs. Hecho que refuerza la idea de la NSC como célula de origen del GBM. Si bien, diversos genes han sido relacionados con esta patología, las alteraciones en los niveles de metilación de los promotores es la principal marca epigenética que sucede durante la transformación maligna. Precisamente, las muestras de pacientes de GBM muestran una disminución en los niveles de la marca epigenética 5hmC, coincidente con una disminución de la enzima TET3, implicada en la conversión del grupo 5mC en 5hmC. El aumento de esta enzima ha demostrado inhibir la proliferación de las células de GBM (Cui et al., 2019).

Los genes improntados son susceptibles a las mutaciones que pueden ocasionar la formación de tumores debido a su expresión monoalélica y a su implicación en la regulación del crecimiento y el metabolismo. Los pacientes afectados por síndromes de impronta genómica presentan una mayor susceptibilidad a desarrollar tumores, revelando la implicación de este mecanismo epigenético en el cáncer. Precisamente, la pérdida de impronta genómica es uno de los eventos



más comunes y tempranos en esta patología, siendo la LOI en el locus *IGF2-H19* en el tumor de Wilms la asociación entre impronta y cáncer mejor caracterizada; si bien, alteraciones en diversos genes improntados han sido descritas (Leick et al., 2012; Uribe-Lewis et al., 2011).

Con el fin de estudiar los distintos factores implicados en el origen y mantenimiento del GBM, se han desarrollado diferentes estrategias (Sampetean and Saya, 2018). Sin embargo, resulta complicado generar modelo que formen estos tumores de forma eficiente, por ello, diversas mutaciones suelen ser requeridas. Una de las estrategias más utilizadas es el uso de xenotrasplantes o alotrasplantes. Sin embargo, esta metodología no permite abordar uno de los aspectos más interesantes del glioblastoma, su origen.

OBJETIVOS

El descubrimiento de células madre cancerosas (CSCs) en los tumores con semejanzas a las células madre de tejido promovieron la teoría de la célula madre cancerosa, que defiende que la transformación maligna ocurriría en estas célula madre de tejido a través de alteraciones genéticas y/o epigenéticas. En el cerebro, entender los mecanismos implicados en el mantenimiento de las NSCs y la relación con la transformación maligna es clave para el desarrollo de herramientas de diagnóstico y tratamiento de los tumores cerebrales. Precisamente, la alteración del mecanismo epigenético de impronta genómica es uno de los eventos más comunes y tempranos en el cáncer. Por ello, el principal objetivo de esta tesis es identificar el papel de la impronta genómica y su regulación epigenética en la actividad de las NSCs adultas, y su implicación en el desarrollo de tumores cerebrales.

Los objetivos específicos propuestos en esta Tesis son:

4. Estudio del proceso de impronta genómica y su regulación epigenética en NSCs adultas de la SVZ.
5. Estudio del proceso de impronta genómica y su regulación epigenética en el glioblastoma.
6. Estudio del papel de la enzima TET3 en la regulación de la impronta genómica durante la transformación maligna.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Animales experimentales

Los animales utilizados en esta tesis así como los procedimientos experimentales han sido aprobados por el comité de ética de la Universitat de València. En este trabajo se han utilizado diferentes cepas murinas: i4F (portador del transgen OSKM), GFAP-rtTA (portador del activador

transcripcional bajo el promotor de *Gfap*), C57BL6 (cepa salvaje), CAST/EiJ (cepa salvaje utilizada para la generación de animales híbridos) y la cepa *Nude* (cepa inmunodeprimida). Los experimentos se llevaron a cabo en animales de entre 2-4 meses de edad generalmente, a excepción de los MEFs obtenidos de embriones E14,5 y la electroporación en animales postnatales (P2).

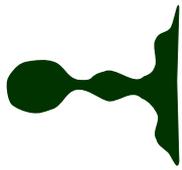
2. Cultivos celulares

Los estudios de reprogramación llevados a cabo en este trabajo se han realizado con animales portadores el activador transcripcional rtTA y del transgén OSKM inducible por doxiciclina (Abad et al., 2013). De estos animales se han utilizado MEFs, obtenidos a partir de la disgregación con tripsina/EDTA de embriones de E14,5. En el caso de la obtención de NSCs adultas reprogramables procedentes de la SVZ, la disección y el cultivo se hicieron mediante aislamiento de la SVZ y posterior disgregación con papaína. Las células fueron sembradas para permitir el crecimiento en forma de neuroesferas y disgregadas nuevamente con Acutasa® para expandirlas.

Las líneas de glioblastoma (GBM) murino, GBM-EGFR, fueron obtenidas del laboratorio de la Dra. Pilar Sánchez Gómez. Estas líneas fueron generadas a partir de la sobre-expresión de *Egfr* en NSCs adultas deficientes en p16 y p19 y posterior inyección en ratones inmunocomprometidos. Para su expansión, las células fueron disgregadas con Accumax™ y cultivadas de nuevo en su medio correspondiente.

3. Reprogramación *in vitro* mediante el tratamiento con doxiciclina

La reprogramación de los MEFs de ratones portadores del transgen OSKM se basó en el tratamiento con 1 µg/ml de doxiciclina en el medio KsR con LIF (Abad et al., 2013). La aparición de células con características pluripotentes, detectadas por la presencia del marcador SSEA1, fue indicativo del proceso de reprogramación. Estas células SSEA1+ fueron aisladas y cultivadas en ausencia de doxiciclina para la reprogramación completa en iPSCs. En cuanto a la reprogramación de las NSCs adultas, los cultivos primarios de NSCs de la SVZ procedente de ratones adultos reprogramables fueron tratados con 1 µg/ml de doxiciclina en el medio de NSCs. Tras la aparición de agregados clonales SSEA1+, las células fueron cultivadas en medio ES con LIF, en presencia de doxiciclina. Finalmente, las células fueron cultivadas en medio selectivo 2i con LIF, inicialmente en presencia de doxiciclina que finalmente fue retirada para permitir la reprogramación completa a iPSCs.



4. Caracterización de las iPSCs

La caracterización de las iPSCs se realizó mediante la detección de marcadores asociados a pluripotencia así como el testado de dicha capacidad. La actividad fosfatasa alcalina se realizó tras la fijación de las células con metanol frío y posterior tinción con fosfato de Naftol, Dimetilformamida y Fast Red Salt en el tampón Tris-HCl. La capacidad de formar cuerpos embrioides se hizo por el método de la gota colgante y de flotación. Ambas estrategias se basaron en el cultivo de las iPSCs a baja densidad en presencia de suero. La reactivación del cromosoma X se realizó mediante el análisis de expresión de los genes *Xist* y *Tsix*, implicados en este proceso. También se analizó la expresión de *Pgk1*, situado en el cromosoma X. Con el fin de comprobar si la reprogramación había dado lugar a aberraciones cromosómicas se realizó un estudio del cariotipo de las iPSCs mediante inhibición de la división celular, posterior choque hipotónico y fijación con Carnoy frío. Los cromosomas se contrastaron con la tinción Giemsa y el número de cromosomas por metafase fue cuantificado.

La diferenciación de las iPSCs a neuroprogenitores (NPs) se basó en la formación de cuerpos embrioides y posterior tratamiento con ácido retinoico (AR) durante 4 días, tras los cuales se analizaron las características neurales de las células.

5. Reprogramación *in vivo* mediante el tratamiento con doxiciclina

La reprogramación *in vivo* se llevó a cabo utilizando dos modelos basados en la expresión del transgén OSKM; un primer modelo, i4F-B, de reprogramación sistémica debido a la presencia del activador transcripcional rtTA en locus *Rosa26*, y un segundo modelo, GFAP-rtTA;i4F, de reprogramación específico de cerebro debido a la presencia del rtTA bajo el promotor de *Gfap*. Para la inducción de la expresión de OSKM, ambos modelos fueron tratados con doxiciclina en agua edulcorada con 7,5% de sacarosa. Sin embargo, el tratamiento en el modelo i4F-B se basó en 2,5 semanas con 0,2 mg/ml de doxiciclina, mientras que los animales GFAP-rtTA;i4F fueron tratados durante 4 semanas con 1 mg/ml.

La obtención de células tumorales de animales GFAP-rtTA;i4F tratados con doxiciclina para inducir la reprogramación *in vivo*, se realizó mediante la disgregación con tripsina del cerebro de estos animales y posterior cultivo en medio de GBM.

6. Caracterización de las líneas de GBM

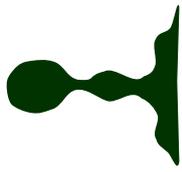
La sobre-expresión de *Tet3* en la línea GBM-EGFR se realizó mediante nucleofección con el sistema piggyBAC transposasa del vector control, el vector *Tet3* y el vector *Tet3* CDmut con el kit Mouse Neural Stem Cell Nucleofector™. La posterior selección de las células nucleofectadas se

realizó con el tratamiento con blasticidina. Para el análisis de ciclo celular, estas células fueron disgregadas para obtener una suspensión de células individuales que fueron teñidas utilizando BD Cycletest™ Plus DNA Kit, permitiendo el análisis de las fases del ciclo celular mediante tinción con yoduro de propidio. Los porcentajes de células en cada fase del ciclo celular fueron determinados mediante citometría de flujo con FACSVerse. La detección de células en fase S del ciclo celular también se realizó mediante incorporación del análogo de timidina EdU (5-etinil-2'-deoxiuridina) y posterior revelado. Para ello, las células adheridas fueron incubadas durante 1 hora en presencia de EdU 10 μ M y posteriormente fijadas con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la fijación, se realizó la permeabilización con 0,5% de Triton® X-100 durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se llevó a cabo el revelado de la EdU. El porcentaje de células EdU positivas fue estimado a partir del número de células totales.

En el ensayo de formación de tumoresferas, las células fueron disgregadas y sembradas a baja densidad, 2500 células en pocillos p96. El número de tumoresferas formadas fue contado manualmente utilizando un microscopio invertido de contraste de fases.

La capacidad de adhesión de las líneas GBM que sobre-expresan el gen *Tet3* fue medida mediante un ensayo *in vitro* en presencia de fibroblastos modificados para la sobre-expresión de la molécula de adhesión N-Cadherina (L-929). Un total de 1×10^6 células de células de GBM, disgregadas manualmente, fueron marcadas con el fluoróforo CellTrace™ Oregon Green™ 488 Carboxylic Acid Diacetate, Succinimidyl Ester durante 8 minutos en el baño a 37 °C y protegidas de la luz. Tras lo cual, se sembraron un total de 6500 células sobre fibroblastos NC-929. Los co-cultivos de células fueron incubados durante 40 minutos para permitir la adhesión de las células de GBM. Finalmente, se realizó la fijación de las células con PFA al 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente y tinción con DAPI. El número de células de GBM adheridas a la monocapa de fibroblastos fue estimado mediante el *script* “Cell Adhesion” (https://github.com/paucabar/cell_adhesion_assay), implementado como una macroinstrucción de ImageJ disponible a través del lugar de actualización de Fiji “NeuroMol Lab”, obteniéndose el número de células de GBM adheridas por mm^2 a la monocapa de fibroblastos NC-929.

El estudio del papel de *Tet3* en la capacidad de angiogénesis se realizó mediante el análisis de la proliferación de células endoteliales humanas HUVEC tras el co-cultivo con células de GBM. Para ello, se sembraron 10.000 células GBM^{control}, GBM^{Tet3} y GBM^{Tet3 CDmut} sobre *transwells* semipermeables. Tras 48 horas de condicionamiento del medio, se realizó un pulso de EdU durante 1 hora sobre las HUVEC. Posteriormente, las células de GBM fueron retiradas y las HUVEC



fueron fijadas con PFA 2% durante 15 minutos a temperatura ambiente. También se detectó la molécula Ki67.

7. Estudio de la capacidad de formación de tumores

El estudio de la capacidad tumoral de las células, se realizó una inyección de $1,5 \times 10^6$ células/200 μ l de iPSCs o 2×10^6 células/200 μ l de GBM y células GFAP-rtTA;*i4F* en ratones *Nude*. Las células fueron resuspendidas en PBS suplementado con 30% de Matrigel y se inyectaron subcutáneamente en el área dorso-lateral de la región caudal a cada lado del animal. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de entre 1,5-2 cm, los animales fueron sacrificados y los tumores fueron extraídos para su análisis. La tinción y detección de marcadores moleculares en cortes de 10 μ m de grosor de tumores se hizo mediante la inclusión en parafina y micrótopo de parafina tras haber sido fijados con Carnoy. Para la tinción, se realizó la coloración con Hematoxilina férrica o de Gill durante 9-10 minutos y eosina durante otros 9-10 minutos.

8. Detección *in situ* de proteínas

La detección de proteínas mediante inmunohistoquímica (IHC) e inmunocitoquímica (ICC) se basó en la incubación con una solución de bloqueo compuesta por 0,2% de Triton-100, 1% de glicina, y 10% suero en PBS de muestras fijadas durante una hora en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, las muestras fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante toda la noche a 4 °C y en agitación. Al día siguiente, las muestras fueron lavadas e incubadas con el anticuerpo secundario durante 1 hora en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió DAPI para contrateñir los núcleos.

Para la detección de marcadores de membrana por citometría de flujo, las células fueron resuspendidas en 100 μ l del tampón de bloqueo de citometría de flujo que contenía los anticuerpos primarios conjugados con fluoróforos. La incubación con dichos anticuerpos se realizó a 4 °C durante 30 minutos, tras lo cual, las células se lavaron y se le añadió DAPI para la exclusión de las células muertas en el análisis. Dicho análisis se realizó utilizando un citómetro LSR-Fortessa.

9. Extracción de RNA y análisis de expresión génica

La extracción de RNA en tejidos y en cultivos celulares fue realizada mediante el Kit RNeasy Mini incluyendo una digestión de DNA mediante la enzima DNAsa. El RNA fue cuantificado mediante un espectrofotómetro y se realizó la retrotranscripción de 1 μ g de RNA en DNA complementario (cDNA) usando RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. El análisis de expresión génica fue llevado a cabo mediante PCR a tiempo real, usando 4 ng del cDNA y sondas

TaqMan™ específicas para cada gen o sondas SYBR-green. Los niveles de expresión de cada gen fueron obtenidos mediante cuantificación relativa (ΔCt) usando la expresión de los genes *Gapdh* y *18S* como controles endógenos. En el caso de las sondas SYBR-green se realizó curva estándar con diluciones seriadas a partir de una mezcla de cDNA generada a partir de cada muestra.

10. Estudio del estado de impronta genómico

Las secuencias de DNA de los genes improntados de interés fueron obtenidas de la base de datos NCBI Web Site. Para la identificación de los SNPs entre las subespecies se diseñaron cebadores para la amplificación de la región de cDNA de interés en cerebro de ratones C57/BL6 y ratones CAST/EiJ de dos meses de edad. Para determinar la expresión alelo-específica de los genes improntados se amplificaron las regiones que contenían el SNP para el gen estudiado mediante PCR utilizando sondas específicas a partir de cDNA de animales híbridos. Posteriormente se procedió a la secuenciación de los productos de PCR purificados.

11. Estudio de la metilación del DNA en regiones de control de impronta

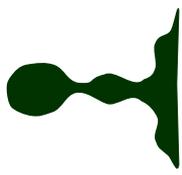
La obtención de DNA fue realizada mediante solución de extracción a 55°C durante toda la noche. A continuación, se añadió 1 ml de fenol a pH 8 y las muestras fueron agitadas durante 15-30 minutos y posteriormente centrifugadas a 13.000 rpm durante 30 minutos. Se añadió 1 ml de fenol:cloroformo (1:1) equilibrado a la fase acuosa. Se agitaron y centrifugaron de nuevo, y la fase acuosa se transfirió a nuevos tubos y se añadió 1 ml de cloroformo. Finalmente, se añadió 200 μ l de $NH_4CH_3CO_2$ a 10M. Las muestras fueron agitadas suavemente y se les añadió 2 ml de etanol absoluto. Se dejaron en agitación durante toda la noche a 4 °C. Los pellets de DNA se incubaron con etanol al 70%, invirtiendo el tubo varias veces y se centrifugaron. Se añadieron 200 μ l de agua inmediatamente después y se incubó a 55°C durante 1 hora.

El análisis de los niveles de metilación en las DMR de las ICRs se hizo mediante pirosecuenciación. Para ello, previamente se llevó a cabo la conversión bisulfítica del DNA, tras lo cual, se amplificó por PCR la región de interés. La determinación del porcentaje de metilación en locus específicos fue calculado como $2^{-\Delta\Delta Ct} \times 100\%$, donde $\Delta\Delta Ct = (CT_{Target} - CT_{Reference})_{muestra} - (CT_{Target} - CT_{Reference})_{DNA \text{ completamente metilado}}$.

RESULTADOS

1. La reprogramación de NSCs a iPSCs *in vitro* se asocia con cambios en la expresión y el estado epigenético de genes improntados

La reprogramación de NSCs adultas portadoras del transgén OSKM inducible por doxiciclina se inició en ausencia de LIF, apareciendo células SSEA1 positivas, pre-iPSCs, que terminaron de



reprogramarse eficientemente en el medio selectivo 2i/LIF en ausencia de doxiciclina tras 20-30 días desde el inicio del tratamiento. La adquisición del estado pluripotente fue comprobada con el aumento de la expresión de los genes *Oct4*, *Nanog* y *Rex1*, una disminución de genes neurales, y el silenciamiento del transgén. También mediante la capacidad de formación de células de las tres capas germinales *in vitro* e *in vivo*. Además, las iPSCs, que no sufrieron aberraciones cromosómicas, sí reactivaron el cromosoma X silenciado en las células procedentes de animales hembra. Estas iPSCs además, eran capaces de diferenciarse nuevamente al fenotipo neural al ser cultivadas en medio con suero y ácido retinoico.

La reprogramación celular a un estado indiferenciado pluripotente también mostró cambios en la impronta genómica. El análisis de expresión de los genes improntados en las iPSCs mostró un elevado porcentaje (84,62%) de genes alterados con respecto a las NSCs de origen, de los cuales alrededor del 40% revirtieron al ser diferenciadas nuevamente a neuroprogenitores (NPs). Al analizar la relación de los niveles de metilación en las DMRs en ICRs, se observó una hipometilación generalizada en las iPSCs que únicamente revertía en los NPs de las gDMRs paternalmente metiladas. Sin embargo, la mayor parte de alteraciones en la expresión de los genes improntados no era explicable con los cambios en los niveles de metilación. Únicamente los genes *Ins2* y *Dlk1*, mostraron cambios en la expresión y metilación coincidentes tanto en iPSCs como en NPs. *Dlk1* es un gen improntado de expresión paterna que pierde dicho estado de impronta en las NSCs postnatales de forma fisiológica. Precisamente, la reprogramación de las NSCs dio lugar a la adquisición del estado de impronta que volvió a perderse al diferenciar las iPSCs en NPs.

2. El proceso de impronta genómica sufre alteraciones durante la reprogramación y formación de tumores *in vivo*

El análisis de la expresión de muestras de GBM de pacientes con respecto a tejido no tumoral, mostró más del 70% de genes improntados afectados, la mayor parte de ellos, con una disminución en su expresión. Además, el perfil de expresión de los genes improntados mostró ser suficiente para identificar las células de GBM con respecto a tipos celulares no tumorales como los oligodendrocitos e incluso, entre subtipos celulares dentro del propio GBM. Sin embargo, no era capaz de agrupar de forma diferente estas poblaciones tumorales con respecto a las NSCs adultas, indicando un perfil génico común entre ambas poblaciones.

Para estudiar el papel de la impronta genómica durante la adquisición del fenotipo canceroso en cerebro, se utilizó un modelo de formación de tumores basado en la reprogramación de las células. En primer lugar, se llevó a cabo dicha reprogramación con el modelo anteriormente

utilizado i4F-B; sin embargo, no resultó ser eficiente para la formación de tumores en cerebro. Por ello, el modelo utilizado en este estudio se basó en la reprogramación de las células GFAP positivas (NSCs y astrocitos). Esto permitió generar tumores cerebrales en el 100% de los animales con marcadores asociados al GBM como CD44, SSEA1 o Nestina, entre otros. Estos tumores mostraron alteraciones en gran parte de los genes improntados analizados.

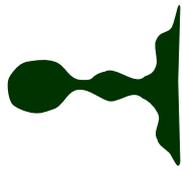
Con el fin de comparar las alteraciones en la expresión de genes improntados detectadas en los tumores de animales reprogramados con aquellas que ocurren en el GBM, se utilizó un modelo celular murino de GBM basado en la sobre-expresión de *Egfr* en NSCs adultas de la SVZ deficientes en p16 y p19 (GBM-EGFR). Esta línea celular también presentó alteraciones en la expresión del 50% de los genes improntados, de los cuales, únicamente *Peg3* y *Snrpn*, coincidieron con los cambios en metilación en sus DMRs reguladoras.

3. Estudio del papel de la enzima TET3 en la regulación de la impronta genómica durante la transformación maligna

Las enzimas de la familia TET están implicadas en la desmetilación activa del DNA a través de la oxidación del grupo 5-metilcitosina (5mC) en 5-hidroximetilcitosina (5hmC), por lo que podrían estar implicadas en las alteraciones en la impronta genómica observadas en el GBM. Precisamente, la expresión de *TET3* disminuye tanto en pacientes de GBM como en la línea murina GMB-EGFR. Por ello, el papel de esta enzima en la regulación de los niveles de metilación en ICRs y la expresión de los genes improntados en GBM fue analizada. La sobre-expresión de esta enzima redujo la proliferación de las células GBM-EGFR, inhibiendo su capacidad de formar tumores *in vivo* de manera dependiente de la actividad dioxigenasa. Además, este aumento de expresión de *Tet3* conllevó a la alteración de más del 50% de los genes improntados, de los cuales *Zdbf2*, *Igf2* y *Meg3* mostraron ser dependientes de procesos de metilación. Sin embargo, únicamente los cambios de expresión de *Igf2* coincidieron con los cambios en metilación de la DMR reguladora.

CONCLUSIONES

1. La expresión de los genes improntados se encuentra significativamente alterada en el proceso de adquisición del estado pluripotente a partir de NSCs adultas, sugiriendo un papel relevante de la impronta genómica en la reprogramación celular.
2. La reprogramación de adultas NSCs a iPSCs produce la hipometilación global en las regiones de control de impronta, que se revierte durante la diferenciación de las iPSCs en NPs únicamente en las gDMRs paternalmente metiladas. Esto muestra



mecanismos divergentes entre la regulación de las DMRs metiladas maternalmente y paternalmente durante la reprogramación.

3. El estado de impronta de *Dlk1*, que se encuentra perdido en las NSCs adultas, se recupera en las iPSCs y vuelve a perderse tras la diferenciación a NPs, mostrando ser un mecanismo plástico en la regulación de las NSCs adultas.
4. La reprogramación celular *in vivo* mediante inducción del transgén OSKM en células cerebro del linaje astrocitario es capaz de generar tumores cerebrales, con marcadores asociados a teratoma o GBM.
5. La formación de tumores cerebrales implica cambios en la expresión de diversos genes improntados, mostrando dos perfiles moleculares que podrían coincidir con teratomas o GBM.
6. El GBM humano y murino presenta alteraciones en la expresión de genes improntados, sugiriendo un papel importante de este mecanismo epigenético en el fenotipo canceroso. De hecho, el perfil de expresión de genes improntados es suficiente para distinguir poblaciones celulares no tumorales de las células de GBM.
7. La expresión de *TET3* en humano es controvertida, con niveles altos y bajos asociados con la supervivencia de los pacientes, sugiriendo un papel de la enzima TET3 en la patología.
8. La sobre-expresión de *Tet3* en el GBM murino promueve la formación de tumores *in vivo* de forma dependiente a la desmetilación.
9. TET3 regula la expresión de genes improntados en tumores cerebrales. Esta regulación la ejerce a través de su actividad dioxigenasa en el caso de *Zdbf2*, *Igf2* y *Meg3*.

Publicaciones

Publicaciones derivadas de este trabajo de tesis

Lozano-Ureña A, Montalbán-Loro R, Ferguson-Smith AC y Ferrón SR (2017). Genomic imprinting and the regulation of postnatal neurogenesis. *Brain Plasticity (Molecular mechanism and neurogenesis)* 3: 89-98.

López del Castillo I, **Lozano-Ureña A** y Ferrón SR. Genomic imprinting and neurodevelopment. *Elsevier (Diagnosis, Management and Modelling of Neurodevelopmental Disorders: The Neuroscience Of Development)*. En prensa.

Lozano-Ureña A*, Jiménez-Villalba E*, Pinedo-Serrano A, Jordán-Pla A, Kirstein M y Ferrón SR. Aberrations of genomic imprinting in glioblastoma formation (2021). *Frontiers in Oncology (Neural stem cells of the subventricular zone: from neurogenesis to glioblastoma origin)* 11:630482. *Co-autores.

Lozano-Ureña A, Montalbán-Loro R, Pinedo-Serrano A, Galbis N, Fernández-Ballester M y Ferrón SR. Genomic imprinting of *Dlk1* is modulated during *in vitro* reprogramming of NSCs. *En preparación*.

Otras publicaciones

Lozano-Ureña A y Ferrón SR (2019). Beyond protein-coding genes. *eLife* 8:e45123

Montalbán-Loro R*, **Lozano-Ureña A***, Ito M, Krueger C, Reik W, Ferguson-Smith AC y Ferrón SR (2019). TET3 prevents terminal differentiation of adult NSCs by a non-catalytic action at *Snrpn*. *Nature communications* 10(1): 1726. *Co-autoras.

Montalbán-Loro R, Lassi G, **Lozano-Ureña A**, Perez-Villalba A, Jiménez-Villalba E, Charalambous M, Vallortigara G, Horner A, Saksida L, Bussey T, Trejo JL, Tucci V, Ferguson-Smith AC y Ferrón SR (2021). *Dlk1* dosage regulates hippocampal neurogenesis and cognition. *PNAS* 118(11):e2015505118.

Montalbán-Loro R, **Lozano-Ureña A**, Pinedo-Serrano A, Radford E, Ito M, Ferguson-Smith AC y Ferrón SR. Genomic imprinting aberrations during the acquisition of a pluripotent state in adult neural stem cells. *En preparación*.

Lozano-Ureña A, Montalbán-Loro R, Martínez-Gurrea I, Lázaro L, Jiménez-Villalba E, Nakayama K, Kirstein M y Ferrón SR. IGF2 increases P57^{KIP2} expression to promote terminal differentiation of neural stem cells. *En preparación*.