



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

**TESIS DOCTORAL**

**NUEVA ESTRATEGIA PARA LA DERIVACIÓN DE HEPATOCITOS  
FUNCIONALES DE MUJERES AFECTAS DE DEFICIENCIA DE  
ORNITINA TRANSCARBAMILASA**

Ramón Santamaría Peiteado

Directores: Dr. Roque Bort Martí. Dra. Laia Tolosa Pardo

Tutor: Dr. Ramiro Jover Atienza

PROGRAMA DE DOCTORADO: BIOMEDICINA Y BIOTECNOLOGÍA.  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.  
UNIVERSIDAD DE VALENCIA.

15 de enero de 2021

**Identificador de la solicitud: UV-DOC\_TES16-1547633**

<b>Fecha y hora: 15/01/2021 21:44:44</b>	<b>Código de verificación:</b> <b>7FT5MSCRBNAH8A60</b>
	<b>Núm. registro: 5914</b>

La investigación que se expone a continuación ha sido llevada a cabo en el grupo de Hepatología experimental y trasplante hepático situado en el Instituto de investigación sanitaria La Fé (IIS La Fe) en Valencia, España, asociado a la Universidad de Valencia; y en el Genome Institute of Singapore, en el parque científico y tecnológico Biopolis en Singapur.



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe



Genome Institute  
of Singapore



Instituto de  
Investigación  
Sanitaria La Fe

**Roque Bort Martí**, Doctor en Farmacia, Investigador principal en el grupo de Hepatología experimental y trasplante hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe).

**Laia Tolosa Pardo**, Doctora en Biología, investigadora emergente en el grupo de Hepatología experimental y trasplante hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe).

**INFORMAN:**

El siguiente trabajo de investigación con el título “**NUEVA ESTRATEGIA PARA LA DERIVACIÓN DE HEPATOCITOS FUNCIONALES DE MUJERES AFECTAS DE DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA**”, ha sido realizada por el Licenciado en Ciencias Biológicas **Ramón Santamaría Peiteado**, bajo nuestra dirección, en el laboratorio de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. Roque Bort Martí

Fdo.Dra. Laia Tolosa Pardo



VNIVERSITAT  
DE VALÈNCIA

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

#### INFORMA

Que el siguiente trabajo de investigación titulado “**NUEVA ESTRATEGIA PARA LA DERIVACIÓN DE HEPATOCITOS FUNCIONALES DE MUJERES AFECTAS DE DEFICIENCIA DE ORNITINA TRANSCARBAMILASA**”, ha sido realizada por el Licenciado en Ciencias Biológicas **Ramón Santamaría Peiteado**, bajo mi tutela académica, en el laboratorio de Hepatología Experimental y Trasplante Hepático del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe (IIS La Fe), y autorizo su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Fdo. Dr. Ramiro Jover Atienza

A mi familia, la causante de que todo haya ocurrido...

“...Jamás se descubriría nada si nos considerásemos  
satisfechos con las cosas descubiertas...”.

Lucio Anneo Séneca.





## **AGRADECIMIENTOS:**

Desde muy pequeño siempre me ha interesado la naturaleza, la ciencia, conocer el origen de las cosas o las razones por las que ocurren. Supongo que esa curiosidad en parte es consecuencia de haber vivido rodeado de bosques y animales, y no tener videoconsolas con las que quedarme pegado a la televisión durante mi infancia.

Durante mi etapa de bachillerato, mi interés continuaba siendo el mismo, además de comprender que las matemáticas y la física eran parte de la ciencia que no se me daban muy bien. Por ello finalmente terminé estudiando la Licenciatura en Biología en la Universidad de Granada. El principio costó mucho, hay que reconocerlo, pero al final se consiguió. Durante los dos últimos años de carrera fui dándome cuenta de que lo que más me interesaba era la rama de la biología molecular y celular. Por ello, tras licenciarme decidí estudiar un master en Biomedicina regenerativa en la misma universidad. Con el master tuve la oportunidad de hacer prácticas durante 4 meses en el centro GenyO de genómica e investigación oncológica, en el laboratorio de Pedro Medina.

Los meses de prácticas me parecieron tan interesantes que al terminar quería continuar en investigación. Durante el master nos informaron de las diferentes becas que se ofertaban para investigación. En la convocatoria de becas FPI, solicite el proyecto propuesto por el Doctor Roque Bort, al que le estoy totalmente agradecido no solo por haberme dado la oportunidad de emprender una etapa de investigación llevando a cabo un proyecto de investigación, sino porque es quien me ha enseñado todo lo que se en ciencia.

¿Qué no habrá sucedido durante estos últimos 5 años? He tenido hasta el privilegio de viajar a Asia y trabajar en el A-Star Genome Institute of Singapore, en el laboratorio del Dr. Torsten Wuestefeld. Y después de un duro y largo trabajo, aquí estoy, escribiendo finalmente la tesis doctoral. Durante estos años he conocido a mucha gente y he compartido muchos buenos momentos con los compañeros del departamento.

A decir verdad, el apoyo, el cariño, y la ayuda que he recibido por parte de mis amigos y compañeros ha sido para quitarse el sombrero, y es que sin ellos, esta tesis doctoral quizá nunca se hubiera escrito. Es por ello que quiero dedicar unas palabras de agradecimiento.

### **A mi familia:**

Gracias a mis padres, Ramón y Rosa María. Dar las gracias se queda muy corto. Soy lo que soy por ellos, por los sacrificios hechos, la privación de vacaciones, lujos o caprichos para que sus hijos estudiaran lo que quisieran. Todo por y para sus hijos. Gracias mama por ser mi templo de paz y saber tranquilizarme con palabras y recuerdos en cualquier momento o en cualquier lugar. Gracias papa por tu apoyo incondicional, y por empujarme día a día hasta el día de hoy. Sin tus llamadas de teléfono insistiendo siempre en lo mismo probablemente me hubiera quedado en el camino. Mama, papa, al final lo hemos conseguido. Os quiero.

Gracias a mi hermano Santiago, quien siempre me ha animado y apoyado en cualquier cosa que quisiera hacer. Aunque estos años hemos estado distanciados, no lo ha parecido en absoluto. Papa, mama y tú siempre vais conmigo allá donde esté.

## **A mi Familia Valenciana**

Gracias a Laura, mi pareja. Que puedo decir. Te conocí pocos meses después de mi llegada a Valencia, y desde entonces hemos compartido juntos todos los días. Gracias por tu paciencia infinita y tu apoyo diario. Eres quien ha visto y vivido directamente los buenos y malos momentos que he tenido durante todos estos años. Siempre has estado ahí. Eres la mejor, insustituible. No hay palabras para describir lo afortunado que me siento de que te hayas cruzado en mi vida y me hayas elegido. Contigo todo siempre es mejor y más sencillo. Te quiero.

A mi suegra Eugenia y mi cuñado Víctor, quienes me han acogido y me han hecho sentir uno más de la familia desde el primer día. ¡Cuántas paellas, cervecitas, risas y aire puro! Como decía, sois mi familia valenciana.

## **A mi grupo de investigación en Valencia.**

A mis directores de tesis Roque y Laia. Siempre agradeceré a Roque el que me haya dado la oportunidad de llevar a cabo el proyecto de investigación, y su confianza en mí hasta el final. Mi valía como investigador te la debo a ti.

Gracias Laia por ser tan amable conmigo siempre. Siempre buenas palabras, y buenos consejos. Gracias por apoyarme cuando he tenido bajones de ánimo. Gracias por enseñarme a operar a los ratones, una de las partes más bonitas de la tesis. Prácticamente todos mis conocimientos en iPSC y trasplantes celulares te los debo a ti.

A mi tutor de Tesis Ramiro. Siempre con una sonrisa en la cara animándome. Me pareces una persona genial, y espero que no cambies nunca. Ahora no nos veremos por los laboratorios, ¡pero

lo haremos en el chiringuito! Nunca olvidaré mi vuelta de Singapur en el Tochar.

Gracias a Marina, mi vasca favorita. Fuiste como mi profesora de laboratorio en los inicios. Siempre me has ayudado cuando lo he necesitado. Ver ese nervio y esa forma de ser fue estupendo. Gracias por todo.

A María Ballester. Llegaste junto con Laura para hacer unas prácticas al laboratorio, ¡y aquí sigues todavía! Eres la persona que más tiempo ha estado junto a mí en el laboratorio, casi desde el inicio, y quien más me ha ayudado. Te agradezco mucho toda la ayuda en cultivos celulares, con las qPCR, las inmunos, eres una curranta! Un beso enorme cariñet!

A Carla y Mireia. Muchas gracias por el apoyo constante y los ratos de risas durante todos estos años. Mireia, hemos visto cómo te hacías doctora, ¡ahora me toca a mí! Y lo próximo un bailecito de ¡salsa!

Nuria, Guillem y Petar sois probablemente las personas que más locuras me habéis oído decir. Gracias por estar ahí. Por los ratos durante la comida con Guillem en la torre H o los viajes de locura a por motos a Barcelona. Los gin-tonic después de las comidas de fallas y navidad con Nuria dándolo todo. Las mil horas con petar en cultivos contándonos cosas. No lo cambio por nada. Os voy a echar de menos.

A Tere, María Pelecha, Rebeca y Polina. Gracias por hacer el día a día fácil y llevadero, en un ambiente donde ha habido siempre sonrisas y compañerismo. Sois geniales.

A Juan Sandoval, Agus, Aitana y Tony. Gracias por los consejos y los momentos de deporte, cervecero y desconexión. Gracias Aitana por los consejos antes de irme de estancia a Singapur, fueron de gran ayuda. Y gracias a Agus por escucharme y darme muy buenos consejos en algún momento delicado.

### **A mi grupo de Investigación en Singapur.**

Gracias a Torsten por acogerme en su laboratorio en Singapur. También agradecer a Roque su contribución para que haya sido posible. Haber tenido la oportunidad de trabajar en otro laboratorio, en otro continente, conocer otras culturas y relacionarme con investigadores de todas las partes del mundo no tiene precio. Gracias a Torsten por la ayuda en las intervenciones y por sus consejos durante mi estancia.

Gracias a Agnes y John por la ayuda en el animalario y por hacerme la vida más fácil durante mi estancia. Gracias por hacer que me integrase tan rápidamente en el laboratorio, y por enseñarme vuestra cultura y gastronomía en alguna que otra escapada. He conocido de verdad Singapur. Me alegro mucho de conocerlos.

Thanks to Torsten for hosting me in his lab in Singapore. Also thank Roque for his contribution to make it possible. To have the chance to work in another laboratory, on another continent, learn about other cultures and interact with researchers from all over the world is priceless. Thanks to Torsten for the help in the interventions and for his advice during my stay.

Thanks to Agnes and John for their help in the animal facility and for making my life easier during my stay. Thank you for making me integrate so quickly in the laboratory, and for teaching me your culture and gastronomy on the odd getaway. I have really known Singapore. I am very glad to meet you.

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

Gracias a los colegas moteros de Valencia. Rolex, Jose, Hugo, Josevi, Hector, Pablo, Carlos y muchos más. Recuerdo esas mañanas frías en Dos aguas hablando de a qué había venido a

Valencia. Como os parecía chino lo que os contaba, pero terminabais diciéndome que era una pasada y que era muy bonito dedicarse a intentar mejorar la vida de los demás. Esos comentarios me hacían sentirme orgulloso y me empujaban a seguir adelante. De nuevo gracias por los ratos de desconexión con las motos en los circuitos, y esas inyecciones de energía que me dabais sin saberlo.

## **A Roque**

Se me ocurren dos palabras sin pensar mucho. Admiración y agradecimiento. Eres una de las personas más inteligentes y dedicada a su trabajo que conozco. Aunque todos han aportado positivamente durante mi formación estos años, eres tu quien más me ha espabilado. Has hecho que sea más crítico científicamente, más organizado aunque no lo parezca, que fuera aprendiendo a resolver problemas, y cuando no he podido, has estado ahí para dar con la solución y sacar el proyecto adelante.

No cabe duda de que sin tu constante ayuda yo no sería doctor. Las capacidades y conocimientos que he adquirido en ciencia, y que son la base de mi futuro laboral, son todos gracias a ti. Te lo agradeceré siempre. Gracias por tu ayuda, tu paciencia infinita, tu tolerancia y también por los ratos de risas y juerga que hemos tenido juntos. Eurocopas, partidos de fútbol, cervecero... Eres más que un simple director de tesis, alguien a quien nunca olvidaré. Eso sí, lo que no vamos a hacer nunca más es jugar a Pádel, ¡te lo aseguro!



## Índice

ABREVIATURAS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	24
I 1 EL CICLO DE LA UREA.....	26
I 1.2 REGULACIÓN DEL CICLO.....	28
I 2 EL ENZIMA ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC).....	29
I 3 DEFICIENCIA EN OTC. ASPECTOS GENERALES.....	30
I 3.1 ETIOLOGÍA:.....	30
I 3.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	31
I 3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	31
I 3.4 DIAGNÓSTICO DE LA DOTC.....	33
I 3.5 TRATAMIENTO DE LA DOTC.....	36
I 3.5.1 Tratamientos dietéticos.....	37
I 3.5.2 Uso de fármacos “scavengers”.....	37
I 3.5.3 Diálisis.....	39
I 3.5.4 Nuevas terapias paliativas.....	40
I 3.5.5 Trasplante hepático: Problemas derivados.....	41
I 4 INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	42
I 4.1 MECANISMO Y REGULACIÓN.....	44
I 4.2 MOMENTO DE LA INACTIVACIÓN Y MOSAICISMO CELULAR.....	47
I 4.3 SESGO EN LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X.....	48
I 5 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS: TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA.....	49
I 5.1 REPROGRAMACIÓN A PLURIPOTENCIA (IPSC).....	54



I 5.2 REPROGRAMACIÓN DIRECTA CON FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, TRANSDIFERENCIACIÓN.....	56
I 5.2.1 Terapia celular alternativa en enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X.....	59
MATERIALES Y MÉTODOS.....	63
M1 CULTIVOS CELULARES.....	65
M 1.1 TECNICAS GENERALES.....	66
M 1.1.1 Descongelación.....	66
M 1.1.2 Mantenimiento de cultivos.....	67
M 1.1.3 Congelación.....	67
M 1.1.4 Microscopía.....	68
M 1.2 TIPOS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO.....	68
M1.2.1 293T.....	68
M 1.2.2 Fibroblastos humanos.....	69
M 1.2.3 Hepatocitos humanos inducidos.....	69
M 1.2.4 HepG2.....	70
M 1.3 GENERACIÓN DE LENTIVIRUS E INFECCIONES.....	70
M 1.3.1 Plásmidos.....	70
M 1.3.2 Protocolo.....	72
M 1.3.3 Infecciones.....	74
M 1.4 OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE PIEL PARA LA GENERACIÓN DE CULTIVOS CELULARES.....	74
M 1.5 AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE BIOPSIAS DE PIEL (HDF-FPH4).....	74
M 1.6 OBTENCIÓN DE POBLACIONES CLONALES DE FIBROBLASTOS..	75
M 1.7 INMORTALIZACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HDF <sup>LT</sup> ).....	76

M 1.8 REPROGRAMACIÓN CELULAR A iHEP.....	77
M 2 PREPARADO DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CULTIVOS CELULARES .....	79
M 2.1 RNA.....	80
M 2.1.1 Extracción .....	80
M 2.1.2 Cuantificación y conservación.....	80
M 2.2 DNA GENÓMICO .....	81
M 2.2.1 Extracción .....	81
M 2.2.2 Cuantificación y conservación.....	81
M 3 TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	82
M 3.1 TEST HUMARA.....	83
M 3.2 RT-qPCR .....	83
M 3.2.1 Obtención de DNA copia (cDNA).....	83
M 3.2.2 PCR cuantitativa .....	83
M 3.3 SECUENCIACIÓN SANGER DE OTC.....	84
M 3.4 CITOMETRÍA.....	85
M 3.5 TINCIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS).....	85
M 3.6 ALMACENAMIENTO DE VERDE INDOCIANINA (ICG).....	86
M 3.7 SÍNTESIS UREA.....	86
M 3.8 INMUNOCITOQUÍMICA .....	87
M 3.9 ELISA.....	87
M 3.10 PROTEÍNAS.....	88
M 3.10.1 Aislamiento y cuantificación .....	88
M 3.11 ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA .....	89
M 4 EXPERIMENTACIÓN IN VIVO .....	90

M 4.1 MODELOS ANIMALES:.....	90
M 4.1.1 B6EiC3Sn a/A-Otc <sup>spf-ash</sup> /J (OTC <sup>spf-ash</sup> ).....	90
M 4.1.2 CB17/Icr-Prkdc scid/Crl (NOD/SCID).....	91
M 4.1.3 FRG® (Fah-/-, Rag2-/- and Il2rg-/-).....	91
M 4.1.4 Genotipado de ratones OTC <sup>spf-ash</sup> .....	91
M 4.2 ACONDICIONAMIENTO ANIMAL PREVIO A LAS INTERVENCIONES CON IHEP.....	93
M 4.2.1 Ayuno.....	93
M 4.2.2 Inmunosupresión.....	93
M 4.2.3 Inducción de daño hepático con paracetamol (APAP).....	93
M 4.3 INTERVENCIONES.....	94
M 4.3.1 Modelos OTC <sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID.....	94
M 4.3.2 Modelo FRG®.....	94
M 4.4 SACRIFICIO, OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS.....	95
M 4.4.1 Sacrificio.....	95
M 4.4.2 Obtención y procesado de muestras.....	95
M 4.5 TECNICAS ANALÍTICAS.....	98
M 4.5.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina.....	98
M 4.5.2 Inmunohistoquímica.....	98
M 4.5.3 ELISA.....	99
M 4.5.4 Cuantificación de ácido orótico en orina.....	99
M5 TABLAS.....	102
RESULTADOS.....	105

R 1 OBTENCIÓN DE POBLACIONES HOMOGÉNEAS DE FIBROBLASTOS DE LA PACIENTE CON DEFICIENCIA EN OTC CON EL MISMO CROMOSOMA X (Xp O Xm) INACTIVO.....	106
R 2 REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS A iHEP .....	108
R 3 REPROGRAMACIÓN A iHEP DE CLONES DE HDF DE LA PACIENTE CON DOTC .....	116
R 3.1 LA SENESCENCIA AFECTA NEGATIVAMENTE A LA REPROGRAMACIÓN A iHEP.....	117
R 4 INMORTALIZACIÓN DE CLONES DE HDF DE LA PACIENTE CON DOTC.....	122
R 5 REPROGRAMACION A iHEP DE CLONES HDF <sup>LT</sup> DE LA PACIENTE CON DOTC .....	124
R 5.1 LA DENSIDAD CELULAR ES UN FACTOR DETERMINANTE PARA EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO HEPÁTICO.....	128
R 5.2 LOS IHEP <sup>LT</sup> DE LOS CLONES E2 Y D6 EXPRESAN GENES HEPÁTICOS Y REALIZAN FUNCIONES PROPIAS DE HEPATOCITOS HUMANOS.....	132
R 5.3 LA INMORTALIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DIRECTA NO MODIFICAN EL ESTADO DE INACTIVACIÓN DE LOS CROMOSOMAS X.136	
R 6 EXPRESIÓN DE LOS ALELOS SILVESTRE Y MUTANTE DEL GEN OTC EN LOS CLONES DE IHEP <sup>LT</sup> REPROGRAMADOS.....	137
R 7 VALIDACIÓN EN MODELOS ANIMALES MURINOS .....	141
CONCLUSIONES .....	153
ARTÍCULOS PULICADOS DURANTE EL TRANCURSO DE LA TESIS DOCTORAL.....	156
ARTÍCULO ENVIADO PENDIENTE DE PUBLICACIÓN.....	157
BIBLIOGRAFÍA.....	159

## ABREVIATURAS

<b>ALB:</b> Albúmina	inmortalizados con el antígeno T del virus SV40
<b>BSA:</b> Albúmina sérica Bovina	<b>HDVVC:</b> Hemodiálisis venovenosa continua
<b><math>\beta</math>-GAL:</b> Beta-galactosidasa	<b>HNF1A:</b> Factor de transcripción nuclear hepático 1 homeobox A
<b>CDKN1A:</b> Ciclina dependiente de Kinasa 1 A	<b>HNF4A:</b> Factor de transcripción nuclear hepático 4 alfa
<b>CDKN2A:</b> Ciclina dependiente de Kinasa 2 A	<b>HVVC:</b> hemofiltración venovenosa continua
<b>CMA:</b> Células madre adultas	<b>ICG:</b> verde de indocianina
<b>CME:</b> Células madre embrionarias	<b>iHEP:</b> Hepatocitos inducidos o <i>hepatocyte-like cells</i>
<b>CMH:</b> Células madre hematopoyéticas	<b>iHEP<sup>LT</sup>:</b> Hepatocitos inducidos o <i>hepatocyte-like cells</i> inmortalizados con el antígeno T del virus SV40
<b>CMM:</b> Células madre mesenquimales	<b>ITS:</b> Insulina transferrina selenio.
<b>DMSO:</b> Dimetilsulfóxido	<b>iPSC:</b> Células pluripotentes inducidas
<b>DNA:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>KDa:</b> Kilo Dalton
<b>DOTC:</b> Deficiencia en OTC	<b>MCI:</b> Masa celular interna
<b>EGF:</b> Factor de crecimiento epidérmico humano	<b>mi-RNA:</b> micro RNA
<b>eGFP:</b> Proteína fluorescente verde	<b>NAG:</b> N-acetil glutamato
<b>FA:</b> Fenil-alanina-d5	<b>NAGS:</b> N-acetil glutamato sintasa
<b>FBS:</b> Suero bovino fetal	
<b>FT:</b> Factores de transcripción	
<b>FOXA3:</b> Forkhead box A3	
<b>HDF:</b> Fibroblastos humanos de la dermis	
<b>HDF<sup>LT</sup>:</b> Fibroblastos humanos de la dermis	

**OTC:** Ornitina transcarbamilasa  
**PRC1:** Complejo proteico represivo poly comb 1  
**PRC2:** Complejo proteico represivo poly comb 2  
**RNA:** Ácido ribonucleico  
**TCU:** Trastornos del ciclo de la urea  
**TGF $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante alfa humano  
**TSIX:** Tránsito antisentido de inactivación del cromosoma X

**UPLC-MSMS:** Cromatografía líquida masas masas  
**UTR:** Región no traducida de RNA  
**WT:** *Wild-type*, silvestre  
**X<sub>m</sub>:** Cromosoma X materno  
**X<sub>p</sub>:** Cromosoma X paterno  
**X-GAL:** 5-bromo-4-cloro-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido  
**XIC:** Centro de inactivación del cromosoma X  
**XIST:** Tránsito específico de inactivación del cromosoma X



# **INTRODUCCIÓN**



## **Historia de la DOTC**

La primera vez que se informó en referencia a la deficiencia de ornitina transcarbamilasa (DOTC) fue en 1962, en un artículo publicado en la revista Lancet. En esta publicación, A. Russell et al. estudiaron un caso de hiperamonemia crónica en dos niñas.

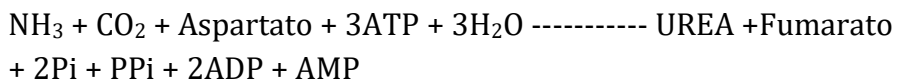
La similitud sintomatológica hizo pensar a los investigadores en un posible origen genético del trastorno, siendo la acumulación de amonio una consecuencia de algún defecto en el ciclo de la urea. Para comprobarlo recogieron una biopsia de una de las niñas y utilizaron hígado humano sano como control para la realización de los experimentos. Los resultados que obtuvieron fueron que la concentración de carbamoil fosfato sintasa 1 (CPS1) estaba dentro de los valores normales. Sin embargo, la concentración de OTC había descendido cerca de un 90%<sup>1</sup>.

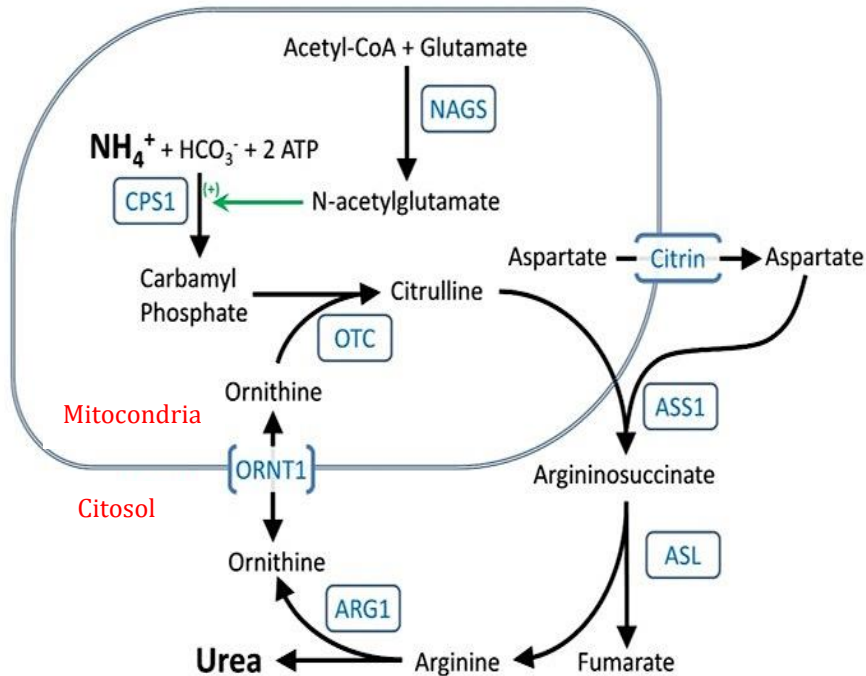
Durante los años siguientes, se identificó este trastorno también en hombres asociado a una mayor letalidad durante el periodo neonatal. Se estableció entonces que era una enfermedad ligada al sexo. En mujeres el trastorno se presentaba en heterocigosis y no resultaba ser tan letal ni de aparición tan temprana<sup>2</sup>. La razón de esta diferencia entre hombres y mujeres se determinó y validó posteriormente mediante un estudio ligado al cromosoma X<sup>3</sup>. A continuación se describen los aspectos más relevantes referentes a la DOTC.

## I 1 EL CICLO DE LA UREA

La formación de urea a partir de amonio, es el mecanismo que poseen los organismos ureotéticos, entre ellos el ser humano, para desprenderse del exceso de amonio generado durante el metabolismo de los nutrientes nitrogenados (fundamentalmente aminoácidos). El ciclo fue descrito por primera vez en 1932, por Hans Adolf Krebs y Kurt Henseleit <sup>4</sup>. El amonio que se produce como consecuencia del metabolismo celular, es tóxico en concentraciones muy bajas, por lo que su adecuada regulación y eliminación es de notable relevancia <sup>5</sup>.

Los hepatocitos, y en particular los periportales, son en exclusiva las células que realizan el ciclo de la urea, teniendo por tanto la capacidad de producir urea a partir de amonio. El ciclo de la urea tiene lugar entre la matriz mitocondrial y el citosol. En el ciclo de la urea intervienen 4 enzimas de manera cíclica, además de dos enzimas adicionales responsables de producir el sustrato de la reacción inicial del ciclo. El balance global se puede resumir en la siguiente ecuación:





**Figura I1. El ciclo de la urea.** Se realiza exclusivamente en los hepatocitos. En cada ciclo, se forma una molécula de urea, portadora de dos amonios, que será eliminada por la orina. **NAGS:** N-acetil glutamato sintasa. **CPS1:** Carbamoil fosfato sintasa 1. **OTC:** Ornitina transcarbamilasa. **ASS1:** Argininosuccinato sintasa 1. **ASL:** Argininosuccinato liasa. **ARG:** Arginasa. **ORNT1:** proteína translocadora de ornitina y citrulina. **CITRIN:** transportador/intercambiador de glutamato por aspartato.

De forma simplificada, cada ciclo convierte dos moléculas de amonio en una molécula de urea. El primer amonio procede directamente del metabolismo de nutrientes nitrogenados, mientras que el segundo amonio lo proporciona el aspartato<sup>6</sup>.

Dentro de la mitocondria el enzima carbamoil fosfato sintasa I (CPS1), en presencia de N-acetil glutamato como co-activador alostérico, amonio, bicarbonato y ATP, sintetizan carbamoil

fosfato. Esta molécula, portadora de un amonio, junto con la ornitina son utilizados como sustratos para la formación de citrulina por acción del enzima OTC (**Figura I1**). La citrulina es transportada de nuevo al citosol donde el enzima argininosuccinato sintasa (ASS) junto al aspartato sintetizarán arginino-succinato. Posteriormente, el arginino succinato será hidrolizado por el enzima arginino-succinato liasa (ASL), dando una molécula de fumarato y otra de arginina. El fumarato seguirá otras rutas metabólicas como la gluconeogénesis, mientras que la arginina será utilizada como sustrato por la arginasa (ARG), dando como productos una molécula de ornitina y una molécula de urea<sup>6-8</sup>. La ornitina, es transportada al interior de la matriz mitocondrial por la proteína translocadora ORNT1 completándose el ciclo.

## **I 1.2 REGULACIÓN DEL CICLO**

La síntesis de urea está regulada principalmente por dos factores: la ingesta de alimentos y las concentraciones de las enzimas del ciclo de la urea. Schimke observó que el contenido de todas las enzimas del ciclo de la urea en el hígado era directamente proporcional al consumo diario de proteínas. Por tanto, se puso de manifiesto la importancia de la actividad enzimática y la ingesta de alimentos en la regulación del ciclo<sup>9</sup>.

El otro factor regulador del ciclo son las concentraciones de N-acetilglutamato (NAG) y ornitina. Para el inicio del ciclo debe haber una activación de CPS1 seguida de la síntesis de carbamoil fosfato. La concentración de NAG tiene una importancia primordial en su activación, actuando como activador alostérico. CPS1 se activa cuando la concentración intracelular de NAG es alta, provocando un aumento del metabolismo del amonio, mientras que cuando la concentración de NAG es baja CPS1 está

menos activa, disminuyendo así la síntesis de urea. El papel regulador de NAG se evidenció en el estudio de un paciente con hiperamonemia causada por ausencia de actividad de la N-acetil-L-glutamato sintasa (NAGS)<sup>10,11</sup>. En el hígado de ratas sometidas a transiciones dietéticas con alimento de alto a bajo porcentaje en proteínas, las concentraciones de ornitina y NAG cambiaron significativamente, además de hacerlo antes que la actividad de las enzimas del ciclo de la urea. Se cree que la arginina derivada de las proteínas de la dieta es la principal fuente de ornitina y también la causa de los cambios en el NAG<sup>12</sup>. Sin embargo, otros factores deben estar involucrados en la regulación de la concentración de ornitina, ya que las concentraciones de ornitina y NAG aumentan después de una inyección intraperitoneal de cloruro de amonio, sin alterar el aporte de arginina o proteínas<sup>13</sup>.

## **I 2 EL ENZIMA ORNITINA TRANSCARBAMILASA (OTC)**

La ornitina transcarbamilasa (OTC; EC 2.1.3.3), es una de las 5 enzimas que intervienen en el ciclo de la urea. El enzima hace uso de carbamoil fosfato y ornitina para formar citrulina. El gen que la codifica se localiza en el brazo corto del cromosoma X (Xp21.1)<sup>14</sup>. Se compone de un total de 10 exones y 9 intrones, teniendo una longitud total de 73 kilobases y un marco lectura abierto de 1.062 nucleótidos. Codifica una proteína de 354 aminoácidos de longitud, con un peso molecular de 39.9 Kilo Dalton (KDa)<sup>15,16</sup>. Se trata de un enzima homotrimérico que en mamíferos se localiza en la matriz mitocondrial, y su expresión se produce en el hígado, aunque también podemos localizarla en las células glandulares del tracto gastro-intestinal (duodeno, intestino delgado y colon) ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)). En el hígado, está implicada en la conversión de amonio en urea, mientras que en la mucosa intestinal interviene en la síntesis de arginina<sup>17</sup>.

### **I 3 DEFICIENCIA EN OTC. ASPECTOS GENERALES.**

La deficiencia en OTC (DOTC) es una enfermedad ligada al sexo que se incluye dentro de un grupo de enfermedades denominadas trastornos del ciclo de la urea (TCU). Es el trastorno metabólico que se produce con mayor frecuencia<sup>18</sup>, cuyo resultado es la acumulación de amonio en la sangre debido a que no puede ser excretado en forma de urea<sup>17</sup>. Concentraciones superiores a 100  $\mu\text{mol/L}$  producen daños importantes en el sistema nervioso, pudiendo llegar a causar la muerte del individuo <sup>19</sup>. El trastorno puede manifestarse de dos maneras, de forma temprana en el periodo neonatal, o bien de forma tardía.

#### **I 3.1 ETIOLOGÍA:**

La causa que subyace a la DOTC es la aparición de mutaciones en el gen que codifica el enzima OTC localizado en el cromosoma X. Como resultado no se produce la síntesis de citrulina a partir de carbamoil fosfato y ornitina. Estas mutaciones pueden ser heredadas o bien pueden producirse de novo<sup>20</sup>. La pérdida total de actividad está asociada con la manifestación temprana y de forma grave del trastorno, en el periodo neonatal. Por el contrario, la aparición tardía del trastorno se asocia a una mutación que causa una reducción más o menos leve de la actividad enzimática. Sus fenotipos son diversos, pudiendo ser desde asintomáticos hasta muy severos<sup>21</sup>. Hasta la actualidad se han descrito más de 400 mutaciones en el gen de la OTC. La mayoría consisten en la sustitución de una sola base, que como consecuencia causan mutaciones sin sentido. En menor proporción se producen pequeñas deleciones o inserciones, deleciones de mayor tamaño o reordenamientos de mayor complejidad<sup>17,22</sup>.

### I 3.2 EPIDEMIOLOGÍA

Debido a su baja frecuencia, la DOTC es una enfermedad catalogada como “rara”. Del total de TCU diagnosticados, más del 60% son causados por mutaciones en el gen de la OTC, siendo éste el más común<sup>23</sup>. La prevalencia mundial del trastorno se estima que es de 1:63.000 habitantes<sup>24</sup>. Debido a las complicaciones para hacer un diagnóstico temprano en este tipo de trastornos, como la sintomatología inespecífica derivada de los episodios de hiperamonemia, no todos los casos de DOTC se detectan en el periodo neonatal, y muchos no llegan a diagnosticarse. Por esta razón, es plausible que la prevalencia sea mayor, estimándose de 1-9/100.000 habitantes<sup>25</sup>.

### I 3.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La consecuencia directa de no poder producir urea es la acumulación del amonio circulante en el organismo, que finalmente acaba produciendo episodios de **hiperammonemia** con diferentes grados de severidad. En cualquier caso se ve afectado el sistema nervioso central causando encefalopatías, llegando incluso a la muerte en los casos más severos<sup>26,27</sup>. Cabe destacar que los pacientes con DOTC no sufren ninguna enfermedad hepática. Los hepatocitos que conforman sus hígados cumplen con el resto de sus funciones y su morfología es la de un hepatocito sano. Además la estructura hepática no se ve deteriorada por la pérdida de actividad OTC. Sin embargo los efectos causados por la hiperamonemia en ocasiones son similares a los observados en pacientes con insuficiencia hepática<sup>27</sup>.

La manifestación temprana, en el periodo neonatal, se asocia con la forma severa de la enfermedad. Además, el hecho de presentarse en individuos recién nacidos, los cuales no tienen un

hígado completamente maduro, puede acentuar el daño producido<sup>28</sup>. Campbell et al. fueron los primeros en informar sobre episodios de hiperamonemia letal neonatal debida a la pérdida total de actividad OTC. Sugirieron que la mutación en el gen que codifica la enzima puede conducir a una deficiencia parcial en hembras heterocigotas y a una deficiencia completa en machos hemicingotos<sup>29,30</sup>.

Los **síntomas y signos clínicos** que presentan los pacientes que sufren este trastorno son muy variables e inespecíficos. Este hecho dificulta un diagnóstico temprano o precoz. Tal y como está descrito en OMIM.org (#311250) y en numerosas publicaciones, los síntomas más comunes están asociados a la toxicidad del amonio a nivel neurológico. Los pacientes con DOTC en el periodo neonatal pueden sufrir episodios de letargo y ataxia. Las convulsiones, retraso en el desarrollo o el retraso mental son los signos más frecuentes. En los casos más severos o durante episodios agudos de hiperamonemia puede producirse edema cerebral e incluso llegar al coma, llegándose a producir la muerte si no se aplica un tratamiento rápido y eficaz. Los signos digestivos más habituales son vómitos, dolores intestinales y diarreas<sup>18,24,31,32</sup>.

Cuando la manifestación del trastorno es tardía, el cuadro sintomatológico es similar aunque con grados de severidad muy variables entre pacientes. Se han registrado casos de pacientes adultos ingresados de urgencia con convulsiones, ataxia y vómitos<sup>33</sup>, desorientación y alteraciones en el estado mental<sup>31,34</sup>, y en los peores casos edemas cerebrales e incluso pacientes en coma que pueden derivar en la muerte<sup>35</sup>. También es común un retraso en el aprendizaje y dificultad en el lenguaje y las habilidades motoras<sup>36</sup>. También se han registrado casos de cambios en el comportamiento de los individuos y síntomas menos frecuentes como la pérdida de la regulación corporal ,



fiebre o falta de apetito<sup>24</sup>. Por último, mencionar que individuos distintos con una manifestación tardía del trastorno, pueden presentar cuadros sintomatológicos diferentes teniendo el mismo genotipo mutante, tal y como se demostró en una familia con diferentes miembros afectados por DOTC<sup>37,38</sup>.

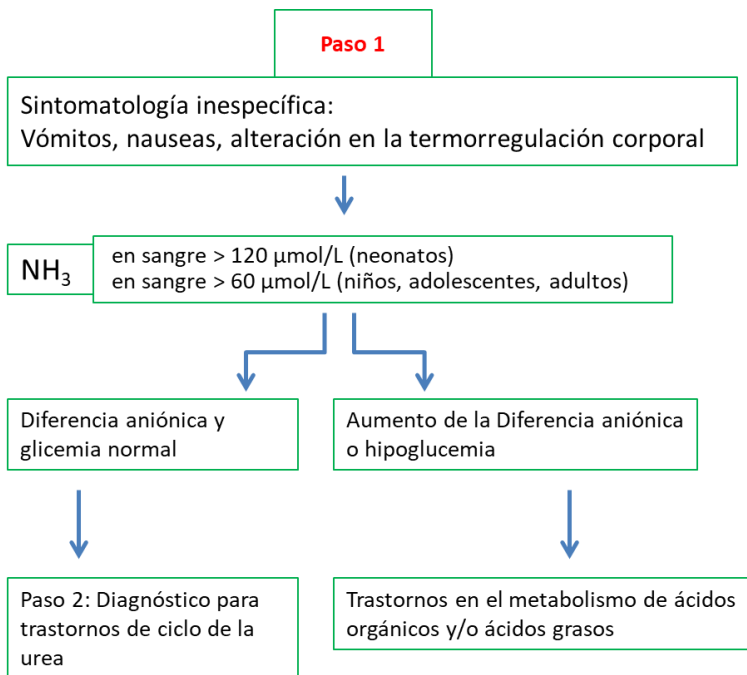
### I 3.4 DIAGNÓSTICO DE LA DOTC

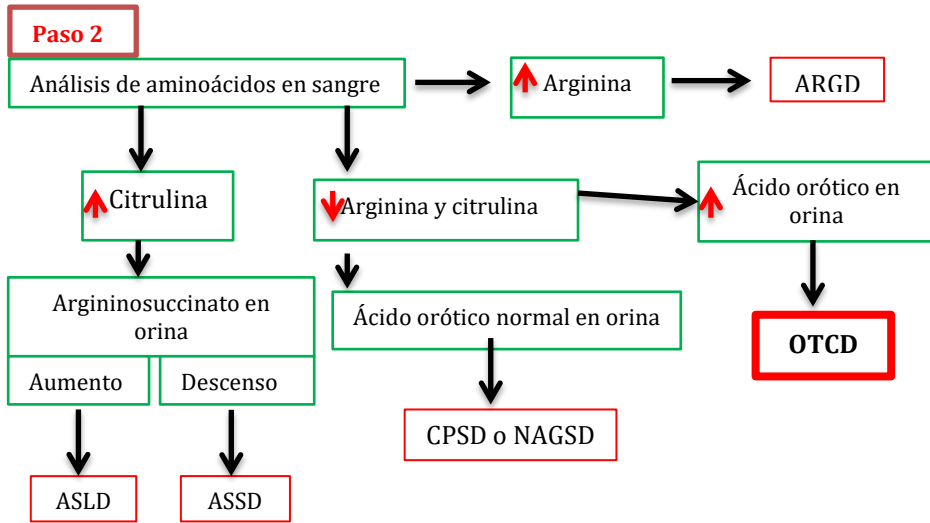
En la actualidad hay disponibles una serie de guías cuyo objetivo es el facilitar el diagnóstico precoz y la toma de decisiones, proporcionando una base para discutir las opciones de diagnóstico y terapia<sup>39</sup>. El enfoque de un paciente que se considera que tiene algún tipo de TCU debe incluir una evaluación neurológica completa, información de los antecedentes familiares y las características clínicas clave, como cambios de comportamiento y síntomas gastrointestinales<sup>40</sup>. Las pruebas y los análisis que se pueden llevar a cabo para encontrar el origen de la encefalopatía son muy numerosos. En cualquier caso y ante todo se deben evaluar los niveles de amonio presentes en la sangre. Los niveles normales de amonio, establecidos por la asociación de bioquímica clínica británica según la edad, son los que se muestran en la siguiente tabla.

<b>Edades</b>	<b>Amonio en sangre</b>
Neonatos prematuros	<150 µmol/L
Neonatos recién nacidos	<100 µmol/L
Niños periodo infantil	<40 µmol/L
Adolescentes y adultos	11-32 µmol/L

**Tabla I1:** Niveles de amonio circulante en sangre establecidos por la asociación de bioquímica clínica británica.

Por otro lado, se debe sospechar inmediatamente de un TCU cuando se produce una encefalopatía particularmente en el periodo neonatal. Una vez evaluado el cuadro de síntomas y signos, y analizado los niveles de amonio, si éstos están aumentados en sangre se procede a realizar un diagnóstico diferencial descrito en las figuras que se presentan a continuación<sup>19,39-41</sup> (**Figura I2**).





**Figura I2: Algoritmo propuesto para el diagnóstico diferencial de hiperamonemia neonatal.** Pasos a seguir para el diagnóstico de los diferentes TCU.

Una vez realizado el diagnóstico diferencial comprobando los niveles de ciertos metabolitos clave, se realiza un estudio genético y un estudio familiar final en busca de posibles mutaciones. El DNA es el material genético utilizado habitualmente, aunque para la DOTC se recomienda el análisis del RNA procedente de una biopsia hepática, ya que en la sangre podemos obtener falsos negativos<sup>42,43</sup>.

Actualmente también se realizan análisis prenatales cuando alguno de los progenitores tiene diagnosticada DOTC<sup>44</sup>. Estas pruebas son de un gran interés debido a la severidad y letalidad del trastorno en el periodo neonatal, por lo que el correcto tratamiento desde el nacimiento es muy recomendable para evitar los problemas neurológicos derivados de la hiperamonemia<sup>45</sup>. Para el caso de la DOTC, las muestras aisladas preferiblemente y

analizadas antes del parto son muestras de vellosidades coriónicas y células del líquido amniótico<sup>44,46</sup>.

### **I 3.5 TRATAMIENTO DE LA DOTC**

El diagnóstico y el tratamiento son primordiales para reducir el riesgo de daño cerebral, que en muchas ocasiones se vuelve irreversible si las concentraciones de amonio no descienden en un periodo de tiempo corto. De hecho, el periodo de tiempo que el paciente permanece con edema cerebral<sup>47</sup> o en estado de coma con altas concentraciones de amoníaco en sangre, son los factores principales que determinan las secuelas neurológicas futuras. Los pacientes sospechosos de padecer DOTC deben ser trasladados rápidamente a centros con UCI pediátrica. Los medicamentos y protocolos de actuación establecidos deben estar siempre disponibles y ser de fácil acceso por el personal sanitario.

Son varios los tratamientos que se pueden utilizar con el fin de paliar/evitar los episodios de hiperamonemia causados por la DOTC. Su elección varía en función del paciente y la severidad del trastorno. No obstante, todos ellos están diseñados para producir un descenso de la concentración de amonio circulante y proteger al cerebro de su toxicidad. No hay un umbral determinado para hacer un pronóstico y evaluar cuál es el tratamiento más adecuado, por lo que lo más plausible es una corrección contundente de los niveles de amonio en sangre, sea cual sea el tratamiento a utilizar.

### **I 3.5.1 Tratamientos dietéticos**

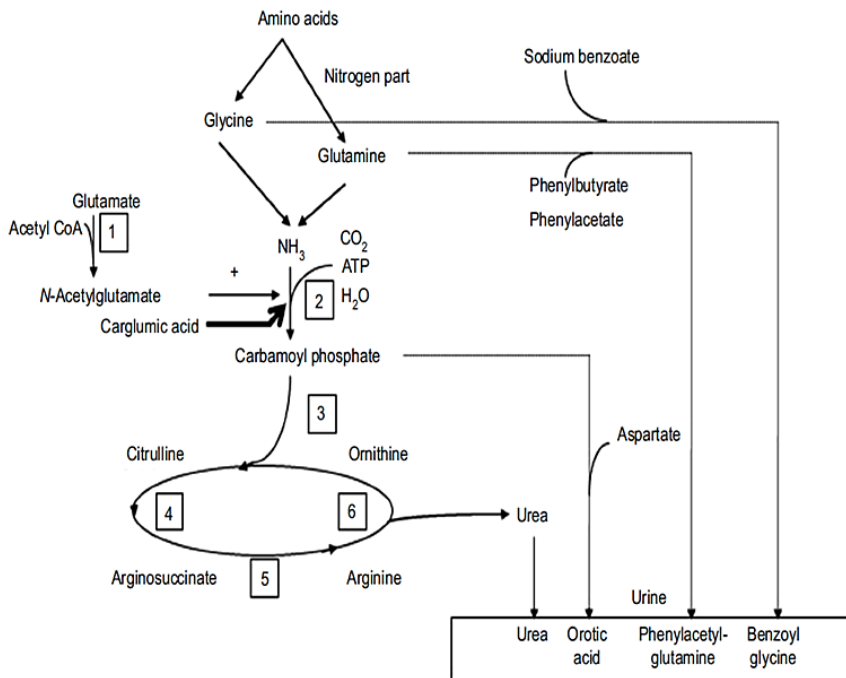
El primer paliativo utilizado frente la hiperamonemia es un cambio y control adecuado en la dieta del paciente<sup>48</sup>. En primer lugar, se elimina la ingesta de proteínas durante las 48 horas siguientes a su ingreso<sup>49,50</sup>. También se administra glucosa intravenosa para promover el anabolismo<sup>51</sup>, manteniendo un control de la glucemia. Si el tratamiento resulta efectivo, se puede retomar la ingesta de proteínas de una forma controlada, monitorizando de nuevo los niveles de amonio circulante y siempre y cuando se mantengan dentro de los valores normales<sup>19</sup>. Por otro lado, también se administra arginina<sup>52</sup> y/o citrulina vía intravenosa, promoviendo la secreción y excreción de amonio a través del ciclo de la urea<sup>39,49,53</sup>. Para el caso de DOTC, es más adecuado el uso de citrulina<sup>41</sup> por ser el metabolito intermedio y precursor de la arginina, que no se puede generar en el ciclo de la urea como consecuencia de la inactividad del enzima OTC.<sup>54</sup>

Cabe destacar que los pacientes con síntomas como náuseas o vómitos necesitan una alimentación por vía parenteral, siendo recomendable cambiar a la vía enteral con la mayor brevedad posible.

### **I 3.5.2 Uso de fármacos “scavengers”**

Cuando los tratamientos dietéticos no son eficaces o bien el cuadro hiperamonémico es muy severo, se procede a hacer uso de una serie de fármacos. Los diferentes compuestos administrados al paciente están encargados de eliminar el amonio por vías alternativas al ciclo de la urea (**Figura I3**). Estas moléculas son el benzoato sódico, fenilacetato sódico, fenilbutirato sódico<sup>41,55</sup>. Cuando se administran vía intravenosa, reaccionan con el amonio circulante metabolizándolo por una ruta alternativa. El

fenilacetato sódico<sup>56</sup> y/o fenilbutirato sódico<sup>57</sup> reaccionan con la glutamina, y dan como producto moléculas de fenil-acetil glutamina. Además de los dos fármacos anteriormente citados, el benzoato sódico también puede ser administrado vía intravenosa, solo o de forma simultánea a los anteriores. Este compuesto reacciona con la glicina para producir benzoil glicina<sup>58</sup>. En definitiva todos estos compuestos reaccionan con el amonio circulante, secuestrándolo y generando metabolitos que si pueden ser eliminados por la orina.



**Figura I3: Esquema de los diferentes fármacos utilizados y su funcionamiento como secuestradores de amonio.** Imagen extraída de<sup>19</sup>. Secuestradores de amonio: **Sodium Benzoate** (Benzoato sódico) genera benzoil glicina; **phenylbutyrate** (fenilbutirato) y **phenylacetate** (fenilacetato) generan fenilacetil-glutamina; **Aspartate** (aspartato) genera ácido orótico. Todos los compuestos generados pueden ser eliminados por la orina.

Hay que mencionar que los tratamientos citados hasta el momento están diseñados para tratamientos puntuales y relativamente cortos de los posibles efectos causados por la hiperamonemia. No obstante, los tratamientos a largo plazo tanto en la edad adulta como en el periodo neonatal no presentan muchas diferencias respecto a los de corto plazo, utilizándose los mismos fármacos anteriormente mencionados<sup>46</sup>. En relación al tratamiento dietético, hay consenso en una reducción de la ingesta de proteínas de manera general, volviéndose obligatoria para individuos con vida sedentaria. En la dieta también se incluyen vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales.<sup>59</sup>.

### **I 3.5.3 Diálisis**

Es el tratamiento más rápido y eficaz para disminuir drásticamente las concentraciones de amonio circulante. Es importante sobre todo cuando aún no hay un diagnóstico claro y los niveles de amonio son lo suficientemente elevados como para causar una encefalopatía aguda grave. Se ha establecido el uso inmediato de diálisis cuando los niveles de amonio superan los 500  $\mu\text{mol/L}$ , así como cuando no hay respuesta al uso de fármacos o los niveles de amonio permanecen elevados pasadas pocas horas con tratamientos farmacológicos<sup>60,61</sup>.

Se han publicado estudios en los cuales, pacientes adultos tratados con hemodiálisis convencional tenía una tasa de reducción de amonio en 4 horas significativamente más rápida que la tasa obtenida mediante hemofiltración veno-venosa continua (HVVC)<sup>62,63</sup>. Por lo tanto, la hemodiálisis es el método más eficaz para disminuir rápidamente el nivel de amonio, siendo el método elegido en caso de tener un paciente con un alto nivel de amonio en adultos.

En los recién nacidos, las frecuentes complicaciones relacionadas con la hemodiálisis pueden dificultar la eliminación del amonio<sup>64</sup>. La hemodiálisis veno-venosa continua (HDVVC) o la HVVC son mejor toleradas por los pacientes pediátricos, proporcionando una extracción continua con una excelente depuración de amonio. Es por ello que se puede considerar como la terapia de primera línea en los lactantes pequeños con cuadros agudos de hiperamonemia<sup>65,66</sup>. Independientemente del método de diálisis elegido, siempre deben ir acompañados del apoyo nutricional adecuado<sup>67</sup>.

### **I 3.5.4 Nuevas terapias paliativas**

Carbón activado:

Hay estudios que demuestran que las micropartículas de carbón activado influyen en el tracto digestivo y en la absorción de los nutrientes de animales y humanos. Las micropartículas disminuyen la absorción intestinal de amoníaco procedente de los alimentos, consiguiendo de esta manera no aumentar la concentración de amoníaco en sangre como consecuencia de la ingesta de alimentos<sup>55</sup>.

Hipotermia:

Varios investigadores han estudiado el efecto de la hipotermia en la regulación de los niveles de amonio<sup>68</sup>. Jalan et al. estudiaron la influencia de la hipotermia leve en pacientes adultos con hiperamonemia. Sus resultados revelan que los pacientes sometidos durante 4 horas a un descenso de 17°C de su temperatura corporal, habían reducido su concentración de amonio en sangre un 30%, mientras que la reducción en el



cerebro fue de un 66% al compararlos con individuos que no fueron sometidos a periodos de hipotermia<sup>69,70</sup>.

Por otro lado, en una pequeña cohorte de 14 niños con TCU, Lichter-Konecki et al. informaron de una reducción de los niveles de amonio en sangre más rápida en pacientes tratados con HDVVC y mantenidos en hipotermia que en pacientes tratados únicamente con HDVVC<sup>71</sup>.

### **I 3.5.5 Trasplante hepático: Problemas derivados.**

Cuando los tratamientos anteriores no son efectivos, así como cuando se producen episodios crónicos y severos de hiperamonemia, la alternativa es el trasplante hepático. El trasplante proporciona la expresión de *OTC*, pudiendo eliminar amonio en pacientes trasplantados con deficiencia en este enzima. Además, permite volver a la dieta normal sin la necesidad de continuar con la toma de fármacos de captación de amonio<sup>72</sup>. Por tanto, un trasplante ofrece a los pacientes con TCU con afección grave una alternativa al tratamiento médico crónico para la DOTC, manteniendo o mejorando su calidad de vida<sup>73-76</sup>, aunque no va a revertir el daño neurológico generado con anterioridad.<sup>77,78</sup>

Gracias al seguimiento de los pacientes con TCU trasplantados se ha comprobado que la tasa de supervivencia es directamente proporcional a la edad en el momento del trasplante, siendo del 99% en niños a partir de 2 años<sup>79</sup>. El desafío actual es extender el tiempo de supervivencia del aloinjerto y al mismo tiempo reducir los efectos negativos derivados del trasplante.

Aunque a priori resulte un tratamiento curativo, un trasplante siempre conlleva complicaciones. Los pacientes deben someterse a terapia inmunosupresora de por vida, con los consiguientes efectos adversos que conlleva<sup>80,81</sup>. Los efectos más habituales

ligados al tratamiento inmunosupresor son la adquisición de otras patologías, habiéndose registrado enfermedades renales y cardiovasculares, diabetes, infecciones virales derivadas de la intervención, trastornos autoinmunes, retrasos en el crecimiento o neoplasias como las más frecuentes<sup>81-83</sup>.

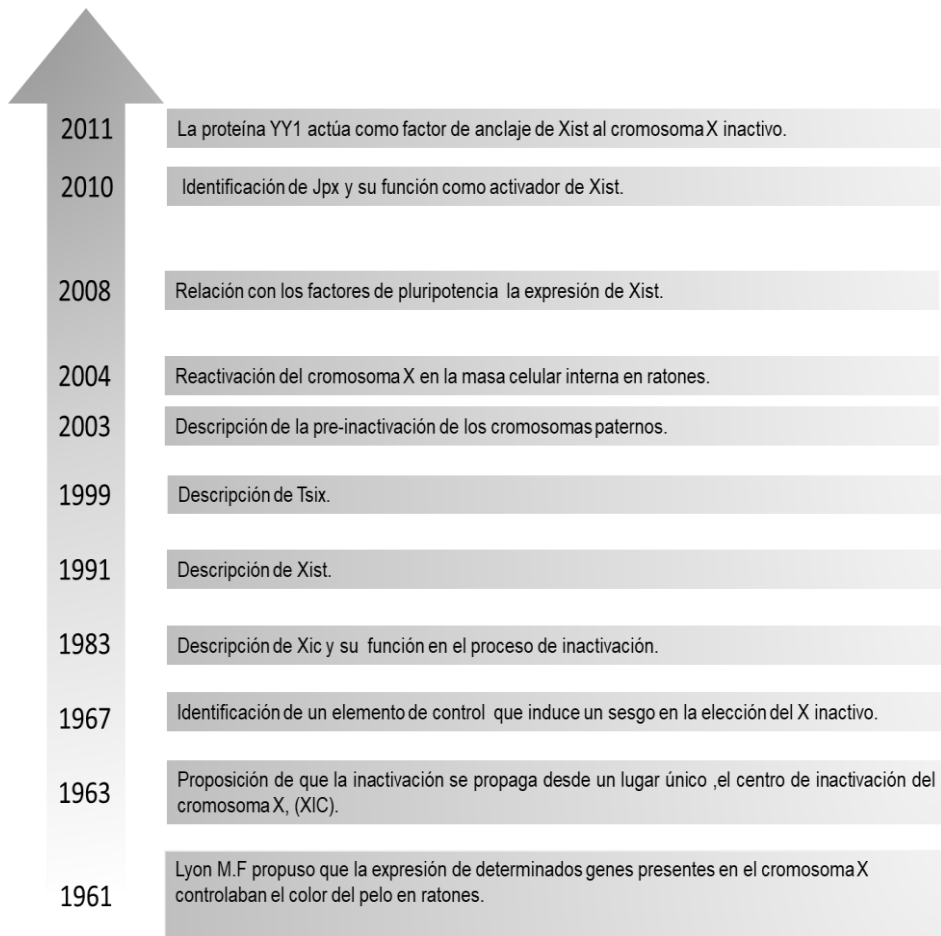
Como mencionábamos con anterioridad, la edad del paciente es un factor importante para la realización del trasplante, siendo desaconsejable en niños menores de 3 meses o con un peso inferior a 5 kg<sup>84</sup>. Esto es debido a la alta probabilidad de aparición de complicaciones durante la intervención, así como a la baja tasa de supervivencia post trasplante que presenta esta población. Los pacientes que ingresan con hiperamonemia aguda suelen ser neonatos que no alcanzan el peso o la edad mínima, haciendo que el trasplante no sea la solución más adecuada por el momento<sup>85</sup>.

## **I 4 INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X**

La inactivación del cromosoma X es un proceso fundamental que tiene lugar en las hembras de mamíferos terios (placentarios y marsupiales). Su objetivo es compensar el desequilibrio que hay en la dosis de genes del cromosoma X en los distintos sexos, i.e. las hembras duplicarían la expresión de los genes del cromosoma X en comparación con los machos. Para solucionarlo las hembras inactivan uno de los cromosomas X, igualando así la expresión de genes en ambos sexos<sup>86,87</sup>. Este sistema de compensación de dosis es conocido como inactivación del cromosoma X y lo propuso por primera vez en 1961 Mary F. Lyon<sup>88</sup>. En la **figura I4** se muestran los principales descubrimientos referentes al proceso de inactivación del cromosoma X.

El proceso de inactivación implica varios pasos: Un recuento inicial del número de cromosomas X por cada conjunto de

autosomas en cada célula hembra. La selección del cromosoma X que se va a silenciar, el paterno o materno ( $X_p$  o  $X_m$ ). El inicio de la inactivación, al que le siguen una serie de modificaciones epigenéticas necesarias para llevar a cabo la inactivación. Y finalmente debe haber un mantenimiento de la inactivación, de manera que las células mantengan el mismo estado de inactivación a lo largo de su expansión clonal<sup>89</sup>.



**Figura I4:** Cronograma de los principales hallazgos referentes al proceso de inactivación del cromosoma X<sup>88,90-99</sup>.

## I 4.1 MECANISMO Y REGULACIÓN

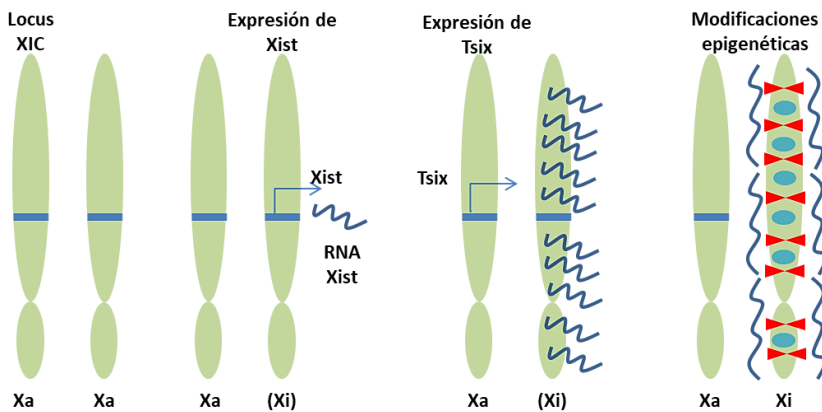
El inicio de la inactivación sucede en un locus del cromosoma X denominado centro de inactivación del cromosoma X (XIC). En esta región del cromosoma se producen numerosos RNA no codificantes, de los cuales uno de ellos es el iniciador de la inactivación, llamado transcrito específico de inactivación del cromosoma X (XIST). Se identificó por primera vez mediante experimentos de hibridación con sondas de cDNA humano, las cuales solo sucedían en muestras procedentes de hembras, localizándose en el XIC<sup>93,100</sup>. Poco tiempo después se descubrió que el RNA de XIST recubre físicamente el cromosoma X inactivo<sup>101</sup>.

Cuando el RNA no codificante de XIST se ancla y recubre el cromosoma X a inactivar, dispara una cascada de modificaciones epigenéticas resultando en la formación de heterocromatina. **(Figura 15 arriba)**. Estas modificaciones incluyen las modificaciones de histonas, la metilación del DNA y el traslado del cromosoma X inactivo a la periferia nuclear<sup>102</sup>. Hay estudios que han sugerido que actúa mediante la acción de complejos proteicos con el fin de modificar la estructura de la cromatina, excluyendo a la maquinaria transcripcional y alterando de este modo la expresión génica<sup>103</sup>.

Las proteínas forman dos complejos, el complejo represivo Polycomb 1 (PRC1) y Polycomb 2 (PRC2), los responsables de las modificaciones de histonas en el cromosoma X inactivo, produciendo la ubiquitinación de lisina 119 en la histona H2A (H2A-K119ub) y la trimetilación de la histona H3 lisina 27 (H3-K27me3)<sup>104,105</sup>. Una vez finalizados los procesos de modificación de histonas, se produce una hipermetilación en multitud de promotores en el cromosoma recubierto por el RNA de XIST. Es un

evento tardío dentro de todo el proceso, pero es crucial para el mantenimiento de la inactivación<sup>106</sup>.

XIC es un nicho de RNA no codificantes en el que se localizan otros transcritos con funciones reguladoras además de XIST (**Figura I5 abajo**). También se encuentra el transcrito antisentido conocido como TSIX, que actúa como represor de XIST inhibiendo la inactivación del cromosoma X que permanecerá activo. Clerc y Avner observaron que las células XO femeninas cuyo único cromosoma X contiene una delección 3' de Xist silvestre, inducen RNA de Xist e inician el silenciamiento del único cromosoma X presente. Posteriormente, este hallazgo se validó mediante pruebas de hibridación in situ de fluorescencia, concluyendo que el fragmento 3' de Xist corresponde a su regulador antisentido Tsix<sup>94,107</sup>.



**Figura I5: Arriba: Esquema del proceso de inactivación del cromosoma X. XIC:** Centro de inactivación del cromosoma X. **Xi:** Cromosoma X inactivo. **Xa:** Cromosoma X activo. **Xist:** Transcrito específico de inactivación del cromosoma X. **Tsix:** Transcrito específico antisentido de inactivación del cromosoma X. **Abajo:** Locus del XIC, albergando numerosos RNA no codificantes (sentido y antisentido) implicados en el proceso de inactivación.

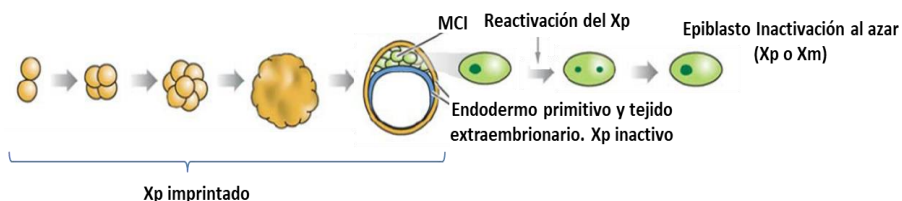
Se ha propuesto que Tsix funcione en los procesos de conteo y elección en la inactivación aleatoria del cromosoma X. Observaciones en células que albergan grupos anormales de cromosomas sexuales, como XXY o XO, respaldan esta teoría<sup>108</sup>. Sin embargo, otros estudios proponen a Tsix como un mecanismo que previene de la inducción de Xist y la inactivación del cromosoma X activo, pero después de que se haya iniciado la inactivación del cromosoma X, excluyendo a Tsix de la elección en la inactivación. Además, en este estudio se demuestra por otro lado, que tampoco participa en el conteo inicial. Por lo tanto, parece que Tsix no participa en el establecimiento del cromosoma X inactivo, sino en el mantenimiento aleatorio de la inactivación en el desarrollo embrionario<sup>109</sup>.

Además de XIST y TSIX, también existen otros reguladores transcripcionales localizados en el XIC. Se ha propuesto que Jpx actúa como un activador *Xist*, siendo necesario para que se lleve a cabo la inactivación del cromosoma X. En estudios de sobreexpresión de Jpx, se comprobó cómo se rescataba la inducción de Xist en células con el Xist endógeno truncado, normalizándose los niveles de éste <sup>110</sup>. La función de RepA consiste en la interacción con las proteínas PRC2 antes de la unión a Xist, por tanto se cree que está implicado en las modificaciones epigenéticas de histonas, ayudando a la inactivación del cromosoma X<sup>111</sup>. Por último mencionar que se ha descrito que los factores de pluripotencia NANOG, SOX2 y OCT4 regulan la actividad de RepA y Jpx<sup>112,113</sup>.

## I 4.2 MOMENTO DE LA INACTIVACIÓN Y MOSAICISMO CELULAR

El proceso de inactivación del cromosoma X se produce durante la embriogénesis. Por motivos éticos, estos estudios se han realizado en ratones, aunque recientemente se están realizando en embriones humanos, habiéndose encontrado algunas diferencias entre ratones y humanos. Las diferencias hacen referencia al momento en la expresión de los diferentes elementos reguladores y su mantenimiento durante el proceso de inactivación<sup>114</sup>.

La inactivación del  $X_p$  tiene lugar en el embrión de ratón de 2-4 células. Una vez formado el blastocisto, el  $X_p$  se mantiene inactivo en el trofoectodermo, pero es reactivado en la masa celular interna (MCI), las células que conforman el pre-epiblasto que darán lugar al embrión propiamente dicho. Más adelante, una vez reorganizadas las células de la MCI, las células del endodermo primitivo inactivan de nuevo el  $X_p$ , por lo que el tejido extraembrionario incluida la placenta, tiene inactivado el  $X_p$  exclusivamente. Con el inicio de la diferenciación celular se produce la segunda inactivación en las células procedentes de la MCI, pero en esta ocasión la inactivación sucede al azar, afectando al  $X_p$  o al  $X_m$ . A partir de este momento, el estado de inactivación se mantiene estable a lo largo de las sucesivas divisiones celulares que formarán al embrión (**Figura I6**).



**Figura I6: Proceso de inactivación del cromosoma X durante la embriogénesis.** Reactivación del cromosoma X paterno previamente imprintado y posterior inactivación al azar en el epiblasto del  $X_m$  o  $X_p$ . Imagen

extraída de<sup>115</sup>. **MCI**: Masa celular interna. **Xp**: Cromosoma X paterno. **Xm**: Cromosoma X materno.

Este proceso parece ser distinto en humanos, puesto que en la placenta se detecta tanto el X<sub>p</sub> como el X<sub>m</sub> inactivos<sup>114</sup>.

Como consecuencia de la herencia clonal del cromosoma X inactivo al azar en las células somáticas a partir del desarrollo embrionario, las hembras eutéricas son mosaicos celulares, portando una mezcla de células que expresan el X<sub>p</sub> o el X<sub>m</sub>. Hay tejidos en los cuales la proporción de células que inactivan uno u otro cromosoma X están dispersadas de forma homogénea, como es el caso de las células sanguíneas<sup>116</sup>. Sin embargo, durante el desarrollo embrionario, los órganos comienzan a desarrollarse a partir de islas celulares, generándose así un mosaico “parcheado” de inactivación de cromosoma X en lugar de homogéneo, sin haber una disposición homogénea en el organismo<sup>117</sup>. Este mosaicismo celular es a menudo ventajoso, protegiendo a las portadoras de mutaciones ligadas al cromosoma X en heterocigosis de las manifestaciones clínicas graves que se observan en los hombres<sup>118</sup>. Sin embargo en ocasiones puede ser un inconveniente, como es el caso en el que las células mutantes tienen una ventaja proliferativa, provocando que estas mujeres finalmente manifiesten los síntomas de la enfermedad que hasta el momento no se había manifestado<sup>119</sup>

#### **I 4.3 SESGO EN LA INACTIVACIÓN DEL CROMOSOMA X**

En un silenciamiento al azar del cromosoma X, se espera que aproximadamente un 50% de las células expresan el X<sub>m</sub> y un 50% el X<sub>p</sub>. Sin embargo, es posible que el silenciamiento en las células que conforman un órgano este sesgado hacia uno u otro cromosoma X<sup>120</sup>. Se considera un silenciamiento sesgado cuando



el porcentaje es superior al 75% para cualquiera de los alelos y muy sesgado si es superior al 90%. Las razones por las que se produce un sesgo en el silenciamiento al azar del cromosoma X, pueden ser muy variadas y no siempre son conocidas.

En primer lugar, puede ser un proceso puramente estocástico, produciéndose en mujeres aparentemente sanas<sup>120</sup>. En segundo lugar puede ser un sesgo familiar, esto es, heredado. Es probable que sean el resultado de mutaciones en los reguladores de la inactivación del cromosoma X <sup>121,122</sup>. En este caso se produce un sesgo generalizado en múltiples tejidos.

En tercer lugar, se cree que la causa más común del sesgo es una selección negativa o positiva, de tal modo que se favorece o no la proliferación de las células que presentan activo el cromosoma X mutante<sup>123</sup>. Por último, mencionar que algunos estudios demuestran que gemelas monocigóticas, presentan diferentes grados de sesgo en el silenciamiento del cromosoma X<sup>124</sup>.

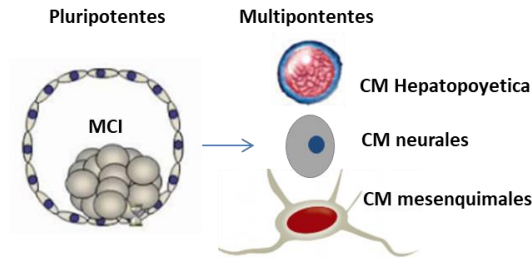
## **I 5 TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS: TERAPIA CELULAR Y MEDICINA REGENERATIVA**

La terapia celular describe el proceso de la utilización de células con fines terapéuticos. La mayoría de las terapias son actualmente experimentales, con algunas excepciones como el trasplante de células madre hematopoyéticas<sup>125</sup>, trasplante de condrocitos<sup>126</sup> o células de la sangre del cordón umbilical<sup>127</sup>. Los diversos tipos de terapias celulares pueden clasificarse por la indicación terapéutica que pretenden abordar, por ejemplo, hepática, cardiovascular, endocrina; o bien por si comprenden células extraídas y administradas al mismo individuo (autólogas) o derivadas de un donante (allogénicas). Más comúnmente se clasifican por los tipos de células, utilizando la clasificación reglamentaria de la unión

europea. La clasificación de terapias celulares discrimina entre células mínimamente manipuladas para uso homólogo, esto es trasplantes o transfusiones, y aquellas reguladas como medicamentos que deben obtener una autorización para su uso y comercialización<sup>128</sup>.

Los tratamientos en terapia celular y medicina regenerativa se centraron inicialmente en las denominadas células madre o células troncales. Son utilizadas como agentes terapéuticos debido a que poseen la capacidad para diferenciarse en las células específicas para la reparación de un tejido u órgano. Pueden clasificarse según dos criterios: por su potencialidad y por su origen. En función de su potencialidad existen células totipotenciales, pluripotenciales, multipotenciales y unipotenciales. En función de su origen se pueden distinguir células madre embrionarias, fetales, adultas y artificiales<sup>129</sup>. A continuación nombraremos brevemente los principales tipos celulares utilizados actualmente en investigación.

Las **células madre embrionarias (CME)** son líneas celulares pluripotentes derivadas de la masa celular interna (MCI) del blastocisto (**Figura I7**). Poseen la capacidad de diferenciarse en todos los tipos celulares procedentes de las tres capas germinales. En 1998 un grupo de investigadores de la Universidad de Wisconsin consiguió obtener células troncales de la MCI del blastocisto y establecer a partir de ellas líneas celulares in vitro<sup>130</sup>. Las células troncales embrionarias crecidas in vitro en presencia de los factores de crecimiento apropiados pueden dar lugar a células diferenciadas de múltiples tejidos.



**Figura I7: Esquema de los diferentes tipos celulares propuestos para su uso en terapia celular.** MCI: Masa celular interna con carácter pluripotente, capaces de formar células de las 3 líneas germinales con carácter multipotente.

Las **células madre embrionarias muy pequeñas**, identificadas por primera vez en 2006<sup>131</sup>. Se localizan en los tejidos adultos y su morfología es similar a la de una célula de la masa celular interna del blastocito. Se ha comprobado que expresan marcadores de la MCI, como *SSEA*, *Oct-4A* y *Nanog*<sup>132</sup>. Aunque hay numerosos laboratorios que avalan su existencia, también los hay que la cuestionan<sup>133,134</sup>.

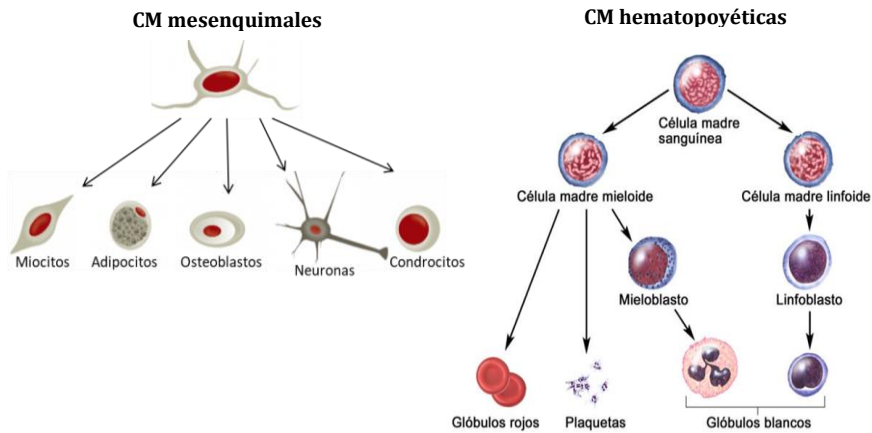
**Células madre por transferencia nuclear.** La técnica de transferencia nuclear de células somáticas consiste en la implantación del núcleo de una célula somática en un ovocito enucleado. El resultado final genera un organismo con DNA casi idéntico al organismo original, un clon del donante nuclear. La oveja Dolly fue el primero clon reproductivo de un mamífero obtenido mediante esta técnica<sup>135</sup>. Actualmente se han clonado numerosas especies, siendo la más prometedora la de los macacos, pudiendo revolucionar la investigación en el campo de las enfermedades humanas<sup>136</sup>.

Las **células madre reprogramadas o inducidas** Son células pluripotentes generadas en el laboratorio a partir de una célula somática. Haremos especial mención a estos tipos celulares en I 5.1.

Las **células madre adultas (CMA)** son células no diferenciadas, multipotentes, dispersas por todo el organismo después del desarrollo. Son muchos los tipos existentes, pero todas tienen en común la función de reponer las células viejas que van muriendo y regenerar los tejidos dañados. Dos de los tipos celulares más importantes dentro de este grupo son las células madre mesenquimales (CMM) y las células madre hematopoyéticas (CMH) (**Figura I8**).

Las CMM son las más utilizadas en la actualidad debido a su fácil obtención y a los buenos resultados que se están obteniendo en los ensayos clínicos que se están llevando a cabo<sup>137</sup>. Aunque fueron aisladas inicialmente de la médula ósea<sup>129,138</sup>, también se han identificado en otros de tejidos adultos como en la sangre del cordón umbilical, tejido adiposo, placenta, líquido amniótico, hígado, páncreas o pulmón<sup>129</sup>. En cuanto a su capacidad de diferenciación, hay estudios que demuestran in vitro e in vivo la capacidad de estas células de diferenciarse y favorecer la regeneración del miocardio<sup>139</sup>, el cartílago<sup>140</sup>, o el hueso<sup>141</sup>, todos ellos tejidos derivados del mesoderma.

Las CMH se localizan mayoritariamente en la médula ósea, aunque en menor proporción también en sangre periférica. Su carácter multipotente les confiere la capacidad de generar todos los tipos celulares sanguíneos durante la hematopoyesis. Actualmente se están utilizando para realizar trasplantes, además de haber más de 2000 ensayos clínicos en marcha.



**Figura 18: Esquema de los principales tipos de células madre adultas (CMA).** Su carácter multipotente las capacita para genera multitud de tipos celulares diferentes.

Debido a su carácter pluripotente cabe pensar que las candidatas ideales para su uso en terapia celular sean las CME. Sin embargo presentan una serie de limitaciones. Son difíciles de obtener. Su cultivo es complicado y durante su mantenimiento in vitro pierden su carácter pluripotente con rapidez. También existen limitaciones éticas y legales referentes a la manipulación de embriones para su uso clínico. Debido al carácter alogénico pueden desencadenarse trastornos inmunológicos, y se ha comprobado que tienen capacidad tumorigénica in vivo.

En la actualidad se han producido grandes avances en el estudio con CMA, viendo que presentan algunas ventajas sobre las CME. Las CMA no presentan los inconvenientes anteriormente descritos, siendo de fácil acceso y pudiéndose obtener en mayor cantidad. Tampoco presentan limitaciones éticas ni generan neoplasias<sup>142</sup>.

Además, en los últimos años se ha comprobado que este tipo de células madre tienen una capacidad conocida como plasticidad celular. Bajo determinadas condiciones ambientales, las células pueden diferenciarse en células de tejidos diferentes con el que la célula madre se encuentra comprometida<sup>143,144</sup>.

### **I 5.1 REPROGRAMACIÓN A PLURIPOTENCIA (iPSC)**

Debido a los problemas existentes relacionados con el uso de células madre embrionarias pluripotentes, la comunidad científica ha tratado de reproducir un tipo celular con características similares, evitando así los problemas éticos entre otros. Gracias a las investigaciones y los conocimientos adquiridos desde la década de los 60, en 2006 el laboratorio del Dr. Yamanaka publicó un artículo en el que se reprogramaron fibroblastos de ratón a iPSC (células pluripotentes inducidas, del inglés *induced pluripotent stem cells*) mediante la sobreexpresión de los factores de transcripción (FT), Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc<sup>145</sup>. Otros estudios posteriores determinaron que las iPSC eran funcionalmente idénticas a las CME, pudiéndose diferenciar a células adultas de cualquier linaje celular<sup>146,147</sup>.

Desde su descubrimiento y hasta la fecha, un gran número de grupos de investigación han acogido las iPSC en sus laboratorios, los cuales han modificado, eliminado o incluido los factores de transcripción originales para la generación de iPSC humanas y de ratón<sup>148-150</sup>. También se han producido modificaciones en cuanto a los métodos de expresión de los factores de transcripción.

Los virus Sendai, virus de RNA (-) monocatenario se han utilizado para la generación de iPSC sin integración del genoma viral. Este virus se replica en el citoplasma celular, no integrándose en el DNA de la célula hospedadora<sup>151</sup>. También se han utilizado vectores episomales con capacidad de replicarse fuera del

cromosoma, de manera que tampoco se produce integración en el genoma<sup>152</sup>. Por último, se han utilizado RNA sintéticos como RNA mensajero (mRNA) o micro RNA (mi-RNA) generados in vitro. Debido a la rápida degradación de los mRNA, se consiguen generar iPSC sin integraciones en el genoma<sup>153</sup>. Los mi-RNA, moléculas RNA monocatenario de un tamaño entre 18-24 nucleótidos<sup>154</sup>, actúan como reguladores epigenéticos de la expresión génica. Es por ello que se propusieron para su uso en reprogramación celular, habiéndose conseguido reprogramar células somáticas a iPSC con una combinación de mi-RNA sin la utilización de los factores clásicos de Yamanaka<sup>155</sup>.

Aunque han pasado 14 años desde su generación y se han producido numerosos avances en la reprogramación a pluripotencia, las iPSC actualmente siguen teniendo una serie de limitaciones que las hace incompatibles para su uso terapéutico. Una de las principales limitaciones es que no se conocen bien los mecanismos moleculares que gobiernan la reprogramación celular. Este hecho dificulta la tarea de encontrar soluciones a los problemas que presentan estas células, como la baja eficacia de las técnicas empleadas para su obtención<sup>156</sup>, su reprogramación incompleta<sup>157</sup> o la mutagénesis derivada de la inserción de genes exógenos que pueden producir tumores<sup>158</sup>. Por todo ello todavía no se puede afirmar que las iPSC sean seguras para su uso en terapia celular.

## **I 5.2 REPROGRAMACIÓN DIRECTA CON FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN, TRANSDIFERENCIACIÓN.**

La reprogramación directa o transdiferenciación se puede definir como la conversión de un tipo celular funcional a otro tipo celular funcional de diferente linaje, sin pasar por un estadio pluripotente intermedio<sup>159,160</sup>. El proceso generalmente incluye la introducción o regulación de factores clave para la conversión de la identidad y función celular. Al evitar el paso por estadios de pluripotencia se reduce el tiempo de reprogramación considerablemente, el riesgo de aparición de mutaciones y la formación de tumores. Todo ello ha hecho que la reprogramación directa se haya convertido estrategia muy atractiva, siendo en la actualidad la elección para la reprogramación de numerosos laboratorios de investigación.

Esta estrategia de reprogramación se demostró por primera vez durante el estudio del efecto de fármacos en cultivos de fibroblastos. En este estudio y en otros posteriores se observó que la 5-azacitidina actuaba como inhibidor de la metilación del DNA<sup>161</sup>. Como consecuencia se sintetizaba un mRNA (MyoD) responsable de dicha conversión celular. Más tarde se validó este descubrimiento mediante la conversión de fibroblastos a mioblastos *in vitro*, mediante la sobreexpresión de MyoD<sup>162</sup>.

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

Tras el descubrimiento de MyoD y generación de iPSC, el uso de factores de transcripción linaje-específicos ha adquirido protagonismo y ha progresado rápidamente, dando como resultado la identificación de nuevos factores para la reprogramación, además del desarrollo de nuevas estrategias para mejorar la maduración funcional de las células inducidas.



La transdiferenciación se puede lograr de tres formas principales: Mediante la introducción de factores de transcripción (FT) exógenos<sup>163</sup>, mediante la manipulación y edición del DNA con métodos como CRISPR/Cas9<sup>164</sup>, o mediante el uso de agentes farmacológicos cuyos efectos desencadenan una cascada de remodelaciones epigenéticas en las células<sup>165</sup>. El uso de vectores virales para introducir transgenes exógenos en las células es actualmente el método más destacado para la reprogramación directa, aunque también presenta una serie de limitaciones. Los transgenes pueden introducirse en las células a través de otros métodos no virales y no integrativos, como las transfecciones transitorias<sup>166</sup>. Estos métodos expresan el transgén temporalmente, y actualmente siguen presentando problemas de eficiencia, causas por las que están quedando en desuso en estudios de transdiferenciación. En esta tesis nos centraremos en la transdiferenciación mediante sobreexpresión exógena utilizando métodos virales.

Los lentivirus y retrovirus son los vectores virales más utilizados en estudios de transdiferenciación. Ambos poseen la capacidad de integrarse eficazmente en el genoma de la célula huésped<sup>167</sup>. Una diferencia notable entre los dos es que los retrovirus necesitan que la célula huésped entre en fase de división para su integración, mientras que los lentivirus también pueden infectar células que no se dividen<sup>168</sup>. Por otro lado los adenovirus<sup>169</sup> y los virus Sendai<sup>170</sup> también se han utilizado en estudios de reprogramación directa. Sin embargo, con estos métodos se obtienen eficiencias de reprogramación inferiores a las obtenidas con el uso de lentivirus o retrovirus.

El principal desafío a la hora de inducir la transdiferenciación es elegir qué FT sobreexpresar. Los FT activos durante el desarrollo o que se conoce que promueven la diferenciación de las CM son habitualmente los primeros candidatos utilizados<sup>171-</sup>

<sup>173</sup>. Actualmente se utilizan FT individuales o varios en conjunto para la reprogramación directa. Mientras que en ocasiones es necesario el uso de varios FT simultáneamente para la transdiferenciación, los estudios realizados también revelan que una reducción del número puede contribuir a mejorar el fenotipo final deseado. En la siguiente tabla se muestran algunos de los diferentes FT usados en reprogramación directa de fibroblastos humanos, haciendo especial mención a los utilizados para la obtención de hepatocitos inducidos (**Tabla I2**).

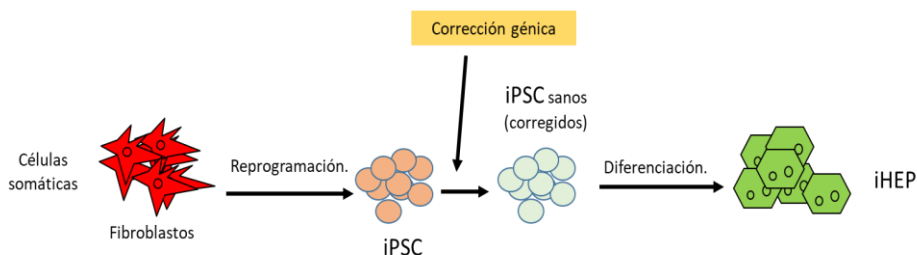
<b>Fuente celular</b>	<b>Célula reprogramada</b>	<b>Factores de transcripción</b>	<b>Referencia</b>
Fibroblastos	Hepatocitos	<i>FOXA2, HNF4A, C / EBPB, C-MYC</i>	172
		<i>HNF1A, HNF4A, FOXA3</i>	173
		<i>HNF1A, HNF4A, HNF6, CEBPA, ATF5, PROX1, p53-siRNA, C-MYC</i>	174
	Neuronas	<i>ASCL1</i>	175
		<i>BRN2, MTY1L, miRNA-124</i>	176
	Células endoteliales	<i>ETV2</i>	177
Cardiomiocitos	<i>GATA4, MEF2C, TBX5, MYOCD, MESP1</i>	178	
Melanocitos	<i>MITF, SOX10, PAX3</i>	179	

**Tabla I2: Principales factores de transcripción utilizados en la reprogramación directa de fibroblastos humanos.** Tabla extraída de <sup>180,181</sup>.

Por último, hay que mencionar que en la actualidad existen sistemas para modular la expresión de los FT exógenos introducidos en las células a reprogramar. Un ejemplo es la transducción con FT de fibroblastos humanos haciendo uso de un vector lentiviral policistrónico inducible por tetraciclina. Estos sistemas utilizan los plásmidos denominados Tet-On y Tet-Off<sup>182</sup>.

### I 5.2.1 Terapia celular alternativa en enfermedades genéticas ligadas al cromosoma X

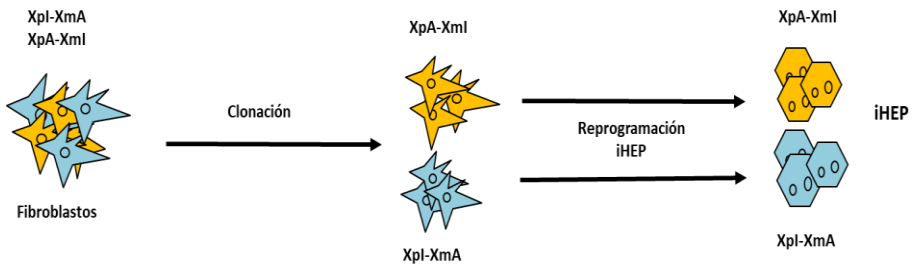
En la mayoría de enfermedades que están sujetas a estudios para su tratamiento mediante terapia celular, se reprograman células somáticas o CM del paciente que posteriormente son trasplantadas de nuevo para corregir un defecto o regenerar un tejido u órgano. En el caso de pacientes que padecen enfermedades monogénicas y congénitas potencialmente letales, es necesaria la corrección del defecto genético antes de reintroducir las células. Para este grupo de enfermedades se lleva a cabo el método clásico, consistente en una primera etapa de reprogramación celular, seguida de la edición del defecto genético y posterior diferenciación, para finalmente ser trasplantadas (**Figura I9**).



**Figura I9: Estrategia clásica en terapia celular.** Ésta consistente en la reprogramación de células somáticas a iPSC, seguido de la edición génica para la corrección del defecto de partida, y posterior diferenciación al tipo celular de interés. **iPSC:** Células pluripotentes inducidas. **iHEP:** Hepatocitos inducidos.

En primer lugar, se generan iPSC que portan todavía las mutaciones que producen la enfermedad. Éstas sirven de material para la corrección in vitro del gen mutante, diferenciación y posterior trasplante con el defecto genético corregido.

Sin embargo, existen un grupo de enfermedades en las que existe una alternativa a la corrección del defecto mediante edición genómica, evitando así los inconvenientes que supone la utilización de esa metodología (**Figura I10**). Este grupo de enfermedades lo constituyen aquellas ligadas al cromosoma X padecidas por mujeres heterocigotas, entre otras la DOTC. Aunque la mutación se presente en heterocigosis, estos pacientes muestran un sesgo marcado en el estado de inactivación del cromosoma X (ver I 4.1), padeciendo la enfermedad con diferentes grados de severidad en el caso de pacientes con DOTC. Aunque exista un sesgo marcado, éste no sucede por igual en todos los tejidos del individuo, pudiendo utilizar como fuente celular para la reprogramación tejidos donde el estado de inactivación sea del 50% aproximadamente.



**Figura I10: Estrategia alternativa en terapia celular para enfermedades ligadas al cromosoma X.** Mediante la selección clonal de células que hayan silenciado el alelo mutado que produce la enfermedad, se pueden reprogramar células somáticas hacia un fenotipo final diferente sin necesidad de edición génica. **XpA**: cromosoma X paterno activo. **Xpl**: cromosoma X paterno inactivo. **XmA**: cromosoma X materno activo. **Xml**: cromosoma X materno inactivo. **iHEP**: Hepatocitos inducidos.

Partiendo de la base de que el sesgo en el silenciamiento en el cromosoma X no afecta a todos los órganos por igual, es posible obtener una población homogénea de células somáticas de pacientes heterocigotas con DOTC que hayan silenciado el cromosoma X portador del alelo mutante, reprogramarlas a hepatocitos y demostrar que es posible obtener hepatocitos funcionalmente sanos de pacientes afectas de DOTC. Con esta nueva estrategia de reprogramación podemos obtener células genéticamente sanas para el defecto genético que presentan los hepatocitos del paciente, las cuales después de ser reprogramadas expresarán *OTC* y teóricamente serán capaces de realizar el ciclo de la urea.



# **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **M1 CULTIVOS CELULARES**

## **CULTIVOS CELULARES**

Todo el trabajo con cultivos celulares se realizó en el departamento de Hepatología experimental y trasplante hepático, situado en el IIS La Fe.

En nuestro grupo de investigación disponemos de tres salas cultivos celulares. Una está dedicada al trabajo con biopsias y cultivos primarios. Otra está dedicada al cultivo y expansión celular convencional. La tercera está disponible exclusivamente para el trabajo con cultivos infectados con virus. Cada sala está equipada con una cabina de flujo laminar (*MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinets, ThermoScientific*), baños, centrífugas e incubadores de CO<sub>2</sub> (*Heracell 150, ThermoScientific*) para el mantenimiento celular a 37°C, en atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.

La presencia de micoplasma se evaluó periódicamente por PCR en todos los cultivos usados en esta tesis.

### **M 1.1 TECNICAS GENERALES**

#### **M 1.1.1 Descongelación**

Los viales se encuentran almacenados en tanques de nitrógeno. Para su descongelación, se transportan en recipientes con nitrógeno líquido hasta la unidad de cultivos celulares, donde se descongelan en el baño a 37°C.

Se transfiere el volumen a un tubo de 15 ml que contiene 8 ml de medio de cultivo calentado previamente a 37°C. Posteriormente se centrifuga durante 5 minutos a 1500 RPM y se descarta el sobrenadante. El "pellet" celular se resuspende en 1ml del medio

de cultivo correspondiente. Finalmente las células se diluyen para sembrarlas en frascos y placas de cultivo según las necesidades.

## **M 1.1.2 Mantenimiento de cultivos**

### ***M 1.1.2.1 Cambio de medio***

En función del tipo celular con el que estemos trabajando, el cambio de medio se realiza cada 1-3 días. Se aspira el medio usado y se añade medio fresco previamente precalentado.

### ***M 1.1.2.2 Pase celular. Tripsinización***

Una vez el cultivo alcanza confluencia, se aspira el medio de la placa y se lava con PBS para eliminar posibles restos. Se aspira de nuevo y se añade tripsina al 0,05% (Gibco). Las placas se mantienen durante 5-10 minutos en el incubador a 37°C. Tras comprobar que la monocapa celular se ha despegado se añaden 3 ml de medio de cultivo para resuspenderla. Con una pipeta se transfiere el volumen a un tubo estéril de 15ml. Se centrifuga 5 minutos a 1.500 RPM. Se descarta el sobrenadante y se añade medio fresco al “*pellet*” celular para su resuspensión. Con un contador de células automático (*BioRad*) se cuentan y siembran a la densidad deseada en el medio correspondiente.

## **M 1.1.3 Congelación**

Todos los cultivos celulares utilizados en esta tesis tienen un proceso de congelación muy parecido. Su congelación se realiza en sus medios de mantenimiento añadiéndoles un 5% de

Dimetilsulfóxido (DMSO). La única excepción es el medio de congelación de iHEP, que consiste en medio HMM (ver M 1.2.3) sin compuestos lábiles, 30% de FBS y 5% DMSO.

Después de tripsinizar y contar las células, se resuspenden en su medio de congelación sin DMSO. Se añade 1,9 ml por criovial, que se completa con 100µl de DMSO añadidos lentamente. Se cierra el criovial y se agita con cuidado para homogeneizar el volumen. Después se transfiere a un contenedor (*Nalgene*) con 250ml de isopropanol y se congela a -80°C durante 24 horas. Finalmente se almacena en un contenedor de nitrógeno.

#### **M 1.1.4 Microscopía**

De manera periódica se evaluó la morfología, así como la viabilidad celular y las posibles contaminaciones de los cultivos. Las placas se visualizaron con un microscopio óptico invertido (*CKX41, OLYMPUS*).

Las imágenes se tomaron con una cámara digital (*Leica DFC350 FX*) acoplada un microscopio invertido de fluorescencia (*Leica DMI 4000 B*). Para las capturas se utilizó el software de imagen (*Leica Application Suite v 3.6.0*).

### **M 1.2 TIPOS CELULARES Y MEDIOS DE CULTIVO**

#### **M1.2.1 293T**

Línea celular derivada de la línea 293 o HEK293, de células humanas embrionarias de riñón. La línea celular 293T es una variante celular “empaquetadora” que expresa el oncogen *SV40 large T antigen*, que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación del SV40. De

esta manera, pueden amplificar los plásmidos transfectados y generar virus. Son muy fáciles de cultivar además de altamente transfectables por medio de varias técnicas, incluyendo el método del fosfato de calcio, alcanzando eficiencias cercanas al 100%. Por ello se utilizaron para la generación de partículas lentivirales.

Las células crecieron y se mantuvieron en medio *Dulbecco's Modified Eagle medium* (DMEM, Gibco #41966-029), suplementado con 4,5 gr/L de glucosa, 10% FBS, L-glutamina 2mM (Gibco) y 100U/ml penicilina/estreptomicina (Gibco).

### **M 1.2.2 Fibroblastos humanos**

En esta Tesis se han empleado fibroblastos dérmicos humanos (HDF) comerciales de la *American Type Culture Collection* (ATCC® n° CRL-2429) y fibroblastos obtenidos de una biopsia de piel procedente de una paciente heterocigota afecta de DOTC (HDF-FPH4). Así mismo, se obtuvieron líneas inmortalizadas de fibroblastos mediante la expresión del antígeno T del SV40 (HDF<sup>LT</sup>). Todos estos cultivos se mantuvieron en medio de fibroblastos humanos (HFM), el cual se compone de medio DMEM suplementado con 4,5 gr/L de glucosa (Gibco #41966-029), L-glutamina 2mM (Gibco), 10% FBS, 100U/ml penicilina/estreptomicina (Gibco), 1X aminoácidos no esenciales (NEEA, Gibco), mercaptoetanol 0,1 mM (Gibco) y 4ng/ml de bFGF (Peprotech).

### **M 1.2.3 Hepatocitos humanos inducidos**

Los cultivos de hepatocitos humanos inducidos (iHEP/ iHEP<sup>LT</sup>) fueron generados en nuestro laboratorio mediante el método descrito por el Dr. Huang (descripción en M 1.8). Los iHEP/ iHEP<sup>LT</sup>

se sembraron en placas tratadas con colágeno y se mantuvieron con medio de mantenimiento de hepatocitos HMM. El medio consiste en DMEM/F12 1:1 (Gibco # 11320-074), suplementado con 0.544 mg/L ZnCl<sub>2</sub>, 0.75 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 mg/L, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.025mg/L MnSO<sub>4</sub>, Galactosa (Sigma), 2 g/L BSA, 0.1 g/L ornitina (Sigma), 0.03 g/L prolina (Sigma), 0.61 g/L nicotinamida (Sigma), glutamina 2 mM, 1X de suplemento Insulina-transferrina-sodio selenito (ITS, Sigma), 40 ng/ml TGF $\alpha$  (Peprotech), 40 ng/ml EGF (Peprotech), Dexametasona 10  $\mu$ M y 1% FBS. La diferencia entre iHEP e iHEP<sup>LT</sup> radica en que éstos últimos han sido inmortalizados previamente a su reprogramación y expresan el antígeno T, confiriéndoles capacidad proliferativa una vez reprogramados a hepatocitos inducidos.

#### **M 1.2.4 HepG2**

La línea celular de carcinoma hepatocelular humano se obtuvo de la *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC nº 85011430). Su mantenimiento se hizo en medio DMEM (Gibco), suplementado con 4,5 gr/L de glucosa, 10% FBS, glutamina 2mM (Gibco) y 100U/ml penicilina/estreptomina (Gibco).

### **M 1.3 GENERACIÓN DE LENTIVIRUS E INFECCIONES**

#### **M 1.3.1 Plásmidos**

Los plásmidos utilizados en esta tesis se amplificaron en bacterias competentes *E. coli*, y posteriormente se purificaron con el kit (EZNA *Plasmid Maxi Kit, D6922-01 Omega*). Tras cuantificarlos con un espectrofotómetro Nanodrop 2000c (*ThermoScientific*) se

diluyeron a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se describen los plásmidos empleados en esta Tesis:

### **pRRlsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry**

El plásmido obtenido en “Addgene” (#58993), se utilizó para la generación de lentivirus que portan el *SV40 T antigen*, con la finalidad de infectar e inmortalizar los HDF previo a su reprogramación a hepatocitos inducidos (iHEP). El plásmido contiene el CDS de la proteína fluorescente roja mCherry unida a una secuencia IRES, la cual permite la transcripción simultánea del antígeno T y la proteína fluorescente, por lo que las células mCherry positivas también lo son para el antígeno T.

### **pHIV-FOXA3-eGFP**

El vector lentiviral pHIV-FOXA3-eGFP se obtuvo mediante la clonación por PCR de cDNA de FOXA3 humano, en los sitios de restricción de BamHI y XbaI en el plásmido pHIV-eGFP<sup>182,183</sup> (Addgene #21373)

### **pHIV-HNF1 $\alpha$ -RFP657**

El vector lentiviral pHIV-RFP657 se obtuvo mediante la sustitución de eGFP por una secuencia sintética RFP657 en el vector pHIV-eGFP (GeneArt®; ThermoFisher)<sup>182,184</sup>. Posteriormente el vector lentiviral pHIV-HNF1 $\alpha$ -RFP657 se obtuvo mediante la clonación del cDNA de HNF1 $\alpha$  en el plásmido citado previamente (GeneArt®; ThermoFisher).

### **pHIV-HNF4A-dTomato**

El vector lentiviral se obtuvo mediante la clonación del cDNA de HNF4A humano, en los sitios de restricción de EcoRI en el vector pHIV-dTomato. (Addgene #21374).

### **pMD2.G**

Plásmido lentiviral de segunda generación que se co-transfecta junto con pPAX2 y el vector que porta el cDNA de interés para la generación de lentivirus en la línea celular 293T. Este plásmido “*helper*” lleva los genes necesarios para la formación de la envoltura viral (VSV-G) (Addgene #12259).

### **pPAX2**

Plásmido lentiviral de segunda generación que se co-transfecta junto con pMD2.G y el vector que porta el cDNA de interés para la generación de lentivirus en la línea celular 293T. Este plásmido empaquetador “*helper*” porta los genes Gag, Pol, Rev, y Tat para la generación de los lentivirus (Addgene # 12260).

## **M 1.3.2 Protocolo**

La producción de lentivirus se realizó mediante la co-transfección de la línea celular 293T. La co-transfección de los plásmidos se hizo mediante el método del fosfato cálcico, tal y como se describe a continuación.

El día previo a la co-transfección se siembran 3 millones de células 293T en placas de 10 cm<sup>2</sup> (una placa por cada lentivirus), y se mantienen hasta el día siguiente en medio DMEM (ver M1.2.1) Al día siguiente y dos horas antes de la transfección, se reemplazó el



medio de cultivo por uno fresco. En un tubo de 15 ml se añadieron 7,5µg de pPAX2, 5µg de pMD2.G, 10µg de plásmido “lanzadera” lentiviral que contiene el cDNA a expresar, 100µl de CaCl<sub>2</sub> 2,5M y H<sub>2</sub>O estéril hasta completar un volumen 1 ml. Posteriormente se añadió la mezcla, gota a gota y en agitación a una solución de 1ml de HBSS 2X a pH 7,1. La agitación se consigue mediante el burbujeo del HBSS con una pipeta Pasteur de vidrio acoplada a un pipeteador automático (Drummond). Pasados 5 minutos de incubación se añadió todo el volumen, gota a gota, a la placa que contiene las células 293T y se mantuvieron en el incubador. Pasadas 19 horas se cambió el medio y se incubaron 24 horas más.

Pasadas 48 horas desde el inicio, se recogió el sobrenadante que porta las partículas lentivirales (9 ml aproximadamente). Se filtró con filtros de acetato de celulosa de 0,45µm de diámetro (Sartorius) y se concentró 12x con el kit Lenti X concentrator tal como se indica en las instrucciones (Takara #631232). Cada lentivirus se resuspendió en 750 µl de DMEM completo conteniendo 4 µg/ml de *polybrene* (Sigma # TR-1003-G), un polímero catiónico que incrementa la eficiencia de la infección evitando la agregación de partículas virales.

Los lentivirus pueden congelarse, aunque se producen pérdidas significativas en la eficiencia de infección. En nuestro caso, para garantizar la máxima infectividad utilizábamos lentivirus concentrados “frescos”. Sin embargo, en infecciones en las que no necesitamos niveles de infectividad muy altos, como en la inmortalización de cultivos celulares, se utilizaron alícuotas de virus almacenados a -80°C.

### **M 1.3.3 Infecciones**

El día previo a la infección se sembraron 18.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos con medio HFM (ver M 1.2.2). Al día siguiente se aspira el medio, se añade el sobrenadante conteniendo los lentivirus y se mantienen en el incubador a 37°C. Pasadas 5 horas se completó el medio hasta un volumen de 500µl. Al día siguiente se retiró el medio a la placa y se le añadió medio fresco.

### **M 1.4 OBTENCIÓN DE BIOPSIAS DE PIEL PARA LA GENERACIÓN DE CULTIVOS CELULARES**

La biopsia de una paciente heterocigota afectada de DOTC se obtuvo a través de la Dra. Ribes-Koninckx, jefa de la sección de Gastrohepatología pediátrica del Hospital Universitario La Fe, después de obtener los pertinentes consentimientos informados y con el visto bueno del comité de ética del Hospital Universitario La Fe.

### **M 1.5 AISLAMIENTO Y MANTENIMIENTO DE FIBROBLASTOS PROCEDENTES DE BIOPSIAS DE PIEL (HDF-FPH4)**

La biopsia de piel del brazo tipo “punch” de la paciente afectada por DOTC se obtuvo por el personal sanitario del Hospital Universitario La Fe. El procesamiento de la muestra se realizó en la Unidad de Terapia Celular del IISLAFE. El aislamiento se basa en la disgregación enzimática de la dermis y el cultivo de las células obtenidas (mayoritariamente fibroblastos). Aquellas células presentes en la dermis que no son fibroblastos, desaparecen durante el cultivo porque no proliferan o no son adherentes.

La muestra se transfirió inmediatamente a un tubo estéril de 15 ml con medio DMEM con 100U/ml penicilina/estreptomicina. Se aspiró el medio y se añadió 1 ml de medio de digestión compuesto por DMEM (Gibco 10569-010), 20% FBS, 100 mg Colagenasa tipo I (Worthington-biochem, 235U/mg 0,25% final), 20 mg DNAsa I (0,05% final, Sigma DN25-100) y 100U/ml penicilina estreptomicina y se incubó toda la noche a 37°C en una estufa de cultivos celulares.

Al día siguiente se agitó la muestra digerida durante 20 segundos. Se puede apreciar perfectamente la separación de la epidermis y la descelularización de la dermis. Se añadieron 7ml de medio DMEM (Gibco 10569-010), 20% FBS y 100U/ml Penicilina-estreptomicina. Todo el volumen se pipeteó arriba y abajo, se filtró a través de gases estériles y posteriormente se transfirió la suspensión celular a un frasco de cultivo T75. El frasco de cultivo se mantuvo en el incubador 3 días a 37°C sin moverlo, favoreciendo así la adhesión de las células a su superficie. Cuando el medio de cultivo se acidificó (3-5 días), se renovó por medio fresco con 10% de FBS en lugar de 20%. Finalmente, al alcanzar confluencia se pasaron a razón 1:3, expandiendo así el cultivo para su posterior congelación y almacenamiento en tanques con nitrógeno.

## **M 1.6 OBTENCIÓN DE POBLACIONES CLONALES DE FIBROBLASTOS**

El objetivo de este proceso es obtener poblaciones clonales homogéneas de fibroblastos de la paciente afecta de DOTC (HDF-FPH4) que tuviesen inactivo el cromosoma  $X_m$  o el  $X_p$ .

Se descongeló un vial de HDF-FPH4 y se sembraron y mantuvieron en un T75 en medio HFM (ver M 1.2.2) hasta alcanzar confluencia. Para obtener poblaciones clonales se utilizó

el método de dilución límite, explicado brevemente a continuación. Tras tripsinizar y contar las células con un contador automático (Biorad), se hicieron diluciones seriadas 1/100 para obtener suspensiones celulares de 5 células/mL. Se sembraron 200 µl/pocillo (una célula) en placas de 96 pocillos. Las placas se mantuvieron en una estufa de cultivos celulares a 37°C sin manipular durante 2 semanas. A continuación, se cambió el medio y se mantuvieron en cultivo expandiendo a placas de mayor tamaño aquellos pocillos que contenían células. Tras alcanzar el tamaño de placa de 6 cm, se tripsinizaron se guardó una alícuota con el fin de aislar el gDNA y el resto se congeló.

### **M 1.7 INMORTALIZACIÓN DE FIBROBLASTOS HUMANOS (HDF<sup>LT</sup>)**

Una vez obtenidos los cultivos de HDF, se seleccionaron los clones que se van a inmortalizar. De esta forma conseguimos que las células sean expandibles in vitro después de ser reprogramadas a iHEP. Se seleccionaron los clones E2 y E6, con inactivación completa del alelo 1 (paterno, 25 repeticiones CAG), y los clones D6 y F5 con inactivación completa del alelo 2 (materno, 28 repeticiones CAG).

La inmortalización de los HDF se realizó mediante la expresión del *antígeno T*. Para ello se generaron lentivirus que expresan el antígeno T basados en el plásmido lentiviral pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry. La generación de virus y posterior infección de los HDF se ha descrito en (M 1.3.2), aunque en esta ocasión no fue necesaria la concentración de los lentivirus al obtener infecciones próximas al 100% utilizando el sobrenadante de las células 293T filtrado directamente. Al filtrado se añadió 4µg/ml de *polybrene*.

El día previo a la infección se sembraron 18.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos con medio HFM (ver M 1.2.2). Al día siguiente se retiró el medio de cultivo, se añadieron 200µl/pocillo de sobrenadante lentiviral y se mantuvieron en el incubador a 37°C. Pasadas 5 horas se completó el medio hasta un volumen de 500µl. Al día siguiente se renovó el medio de la placa. Los HDF infectados se expandieron 3 veces en un ratio 1:30 (un pocillo de 24 a una placa de 10 cm<sup>2</sup>), tras lo cual el 100% de las células eran mCherry-positivas, sin síntomas de senescencia.

## **M 1.8 REPROGRAMACIÓN CELULAR A iHEP**

### **Reprogramación directa**

Los HDF humanos (HDF y HDF<sup>LT</sup>) se reprograman a iHEP/ iHEP<sup>LT</sup> mediante la expresión de HNF1α, HNF4A y FOXA3 tal como hemos realizado en otras ocasiones en nuestro laboratorio, siguiendo el protocolo descrito por el Dr Huang<sup>173,185</sup>. La expresión de dichos factores de transcripción se consiguió mediante la infección con lentivirus concentrados generados a partir de los plásmidos HIV-HNF1α-RFP657, HIV-HNF4A-TOM y HIV-FOXA3-eGFP (M 1.3). Para conseguir infectividades altas, los lentivirus se generaron y se concentraron el día de la infección, sin pasar un proceso de congelación por lo que se tuvo que sincronizar los cultivos de 293T y HDF para cada experimento.

Un día antes de la infección, se colagenizaron las placas de cultivo donde se siembra e infecta los HDF. Para ello se hizo una solución de colágeno tipo I de cola de rata (Gibco # A1048301) en ácido acético 20mM estéril, a una concentración final de 50ng/ml. Se añade el volumen de colágeno necesario para cubrir la superficie de los pocillos y se incuban durante 1 hora a temperatura

ambiente. Posteriormente se aspira el colágeno y se lava con PBS para eliminar los restos de ácido acético. Inmediatamente se sembraron 18.000 células por pocillo en placas de 24 pocillos y se mantuvieron en medio de fibroblastos humanos (HFM) (ver M 1.2.2).

Tras la generación y concentración lentiviral (12x) disponíamos de 750 µl de DMEM completo con 4µg/ml de *polybrene*. Los volúmenes de los 3 concentrados lentivirales se mezclaron en un ratio 1:1:1 y se agitaron para obtener una muestra homogénea con los 3 virus (2250 µl totales). Posteriormente se añadieron 100µl/pocillo a las placas conteniendo los HDF y se mantuvieron en el incubador durante 5 horas. Pasado este tiempo se completó el volumen de los pocillos hasta 500 µl con HFM y se mantuvieron en el incubador hasta el día siguiente en el que se cambió el medio. Pasadas 48 horas desde la infección se cambió el medio HFM por el medio de mantenimiento de hepatocitos HMM (ver M 1.2.3) Las placas se mantuvieron renovando diariamente el medio de cultivo.

En el caso de HDF, la reprogramación conlleva la pérdida de proliferación (iHEP), mientras que en las HDF<sup>LT</sup>, las células siguen proliferando (iHEP<sup>LT</sup>), por lo que paralelamente se procedió a su expansión y almacenamiento a diferentes pases en medio HMM con 30% FBS y 5% DMSO.

## **M 2 PREPARADO DE MUESTRAS PROCEDENTES DE CULTIVOS CELULARES**

## **M 2.1 RNA**

Para determinar la abundancia relativa de los diferentes genes que se midieron mediante PCR cuantitativa, se aisló el RNA total de las diferentes células en cultivo.

### **M 2.1.1 Extracción**

El aislamiento de RNA se hizo en una campana de extracción de gases (*Köttermann*), disponible en nuestros laboratorios. Se aspiró el medio de las placas que contienen las células, se lavaron con PBS y seguidamente se añadieron 350µl/pocillo de tampón de lisis TRK (Omega BIO-TEK) suplementado con β-mercaptoetanol (1:50). Los pocillos se rascaron con la base de una punta de pipeta y se transfirió a un eppendorf libre de nucleasas. A continuación, se aisló el RNA tal como se describe en el protocolo del kit *MicroElute Total RNA Kit* (Omega bio-tek # R6831-02), o bien se congelaron los lisados celulares a -80°C para su posterior aislamiento.

### **M 2.1.2 Cuantificación y conservación**

Inmediatamente después de obtener el RNA, se cuantificó mediante el uso de un espectrofotómetro *Nanodrop 2000c* (Thermo Scientific). Nos indica la concentración de RNA por cada µl de muestra, así como el cociente de absorbancia 260/280 para comprobar su pureza. El RNA se congeló a -80°C para conservarlo hasta su uso.



## **M 2.2 DNA GENÓMICO**

### **M 2.2.1 Extracción**

Para el aislamiento de DNA genómico de los cultivos celulares hicimos uso del kit *illustra™ triplePrep* (GE Healthcare, #28-9425-44). Los pocillos con las células se tripsinizaron y centrifugaron, obteniendo un “pellet” que se procesó tal como indica el fabricante.

### **M 2.2.2 Cuantificación y conservación**

Una vez aislado y resuspendido el gDNA se cuantificó haciendo uso del espectrofotómetro *Nanodrop 2000c*. Posteriormente se almacenó congelándolo a -20°C hasta su uso.

## **M 3 TÉCNICAS ANALÍTICAS**

## **TÉCNICAS DE ANÁLISIS CELULAR Y MOLECULAR:**

### **M 3.1 TEST HUMARA**

Para comprobar el ratio de inactivación de los alelos del cromosoma X en nuestros cultivos, se aisló DNA genómico tal como se describe en (M 2.2). Una vez obtenido y cuantificado se enviaron alícuotas con 20ng/ $\mu$ l de cada muestra a la unidad de genética del IIS la Fe para su determinación<sup>186</sup>.

### **M 3.2 RT-qPCR**

#### **M 3.2.1 Obtención de DNA copia (cDNA)**

La reversotranscripción (RT) se realizó usando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina M-MLV (Invitrogen). La mezcla de reactivos fue la siguiente: 1X Buffer para RT (Gibco BRL), 500 $\mu$ M dNTP's, 10 mM DTT, 3  $\mu$ M oligo d(T)14, 60 U de inhibidor de RNasas (RNaseOUT, Gibco BRL), 250 U de transcriptasa inversa M-MLV y agua libre de nucleasas hasta completar un volumen de 20 $\mu$ l.

Se añadieron 10  $\mu$ l de una solución acuosa con 500 ng de RNA a la mezcla. Posteriormente, el volumen se incubó en un termobloque (Thermo Scientific) durante 50 minutos a 37°C. Para detener la reacción la mezcla se incubó a 70°C durante 15 minutos. La muestra de cDNA obtenido se conservó a -20°C.

#### **M 3.2.2 PCR cuantitativa**

El DNAC proveniente del proceso de reverso transcripción fue amplificado con el termociclador *Light Cycler 480 II (Roche Doagnostics)*. Cada reacción se compuso de 2 µl de una dilución 1/5 del cDNA obtenido previamente (100ng totales), 5 µl de *LightCycler Master Mix SYBR Green I 2X (Roche)*, 0,3mM *primers Up y Down* y agua libre de nucleasas hasta completar 10 µl. El proceso consistió en 8 minutos a 95°C para desnaturalizar el DNA y activar la polimerasa, y 40-45 ciclos de PCR de 15 segundos a 95 °C, 10 segundos a 58-60°C para la unión de los primers y 10-15 segundos a 72°C para la amplificación. La muestra control se obtuvo mediante la combinación del RNA procedente del hígado de 4 donantes (ThermoFisher). La expresión de cada cDNA amplificado se realizó por triplicado, se relativizó al valor del control y se normalizó con respecto a la expresión del gen hidroximetilbalina sintasa (HMBS o PBGD). La cuantificación y el posterior análisis de los productos se realizaron con el software *LightCycler 480 sw 1.5* según las recomendaciones del fabricante. Los primers diseñados y utilizados en esta tesis (ver M5) fueron diseñados, dentro de las posibilidades, flanqueando intrones para evitar la amplificación de gDNA. La especificidad para cada producto amplificado se confirmó mediante el análisis de las curvas de *melting*.

### **M 3.3 SECUENCIACIÓN SANGER DE OTC**

Los productos amplificados por PCR de los clones de iHEP se purificaron con el kit QIAquick PCR purification Kit (28106, Qiagen). Una dilución de 20ng/µl de cada producto purificado fue secuenciado por el personal de la unidad d genómica del IIS la Fe, por el método de sanger en un secuenciador capilar ABI Prism 3500 (Thermo Fisher Scientific). Las muestras se secuenciaron con primers “forward” y “reverse” (ver M 5) diseñados en el exón

del gen OTC, flanqueando la región correspondiente a la secuencia sana (wt) o mutante. Los datos con los resultados de la secuenciación se recogieron en varios formatos y se analizaron con el software "4 Peaks" v1.7.2.

### **M 3.4 CITOMETRÍA**

La determinación del porcentaje de células infectadas (positivas para las proteínas fluorescentes eGFP, Tomato y RFP657) se realizó con un citómetro de flujo FACSCanto-II (Becton Dickinson). Las células se tripsinizaron, se centrifugaron y se resuspendieron en 1ml de medio DMEM. Los datos adquiridos se monitorizaron y analizaron con el software FACS Diva (Becton Dickinson). Los voltajes y los parámetros de dispersión frontal de la luz (FSC), dispersión lateral (SSC) y fluorescencia se ajustaron y compensaron para eliminar el debris y los posibles dobletes.

### **M 3.5 TINCIÓN DE ÁCIDO PERIÓDICO DE SCHIFF (PAS)**

Esta tinción fue utilizada para valorar la cantidad de glucógeno almacenado en las células en cultivo. Se aspiró el medio de las placas, se lavaron con PBS y las células fueron fijadas con paraformaldehído (PFA, #28908 Thermo Scientific) diluido con PBS al 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se lavaron con agua destilada y se añadieron 500 µl/pocillo de una solución de ácido periódico al 0,5%. Tras incubarlas 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron de nuevo y se añadieron 500 µl/pocillo de reactivo se Schiff (Sigma). Las placas se incubaron durante 15-30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación fueron lavadas para la toma de imágenes en campo claro.

### **M 3.6 ALMACENAMIENTO DE VERDE INDOCIANINA (ICG)**

Este anión orgánico se utilizó como colorante inocuo para ver la capacidad de transporte celular. Brevemente, se preparó una solución 1 mg/ml de Cardiogreen (Sigma #21980-100) mediante su disolución en DMSO y posteriormente en medio DMEM. Tras aspirar el medio de cultivo se añadieron 500ul/pocillo a placas de 24 pocillos. Se incubaron durante 1 hora a 37°C y se retiró el medio, que fue renovado por el habitual para la toma de imágenes y posterior mantenimiento.

### **M 3.7 SÍNTESIS UREA**

Para determinar la producción celular de urea, los cultivos celulares se incubaron durante 24 horas con medio HMM completo, utilizando DMEM/F12 sin rojo fenol (Gibco™ 21041025) para evitar interferencias con el kit de cuantificación de urea. Además, al medio se le añadió cloruro amónico (NH<sub>4</sub>Cl) 0,1mM. El medio de cultivo remanente no utilizado se empleó como blanco (tiempo=0) en el momento de la cuantificación. Tras incubar los cultivos durante 24 horas, se recogieron los sobrenadantes y se cuantificó la producción de urea con el kit QuantiChrom™ Urea Assay Kit (BioAssay Systems) tal y como indica el fabricante. Para la cuantificación final, se determinó la densidad óptica de cada pocillo mediante la lectura de la placa en el lector HaloLed 96 (Dynamica) a una longitud de onda de 520nm. EL kit incluye un estándar para preparar una curva patrón.

### **M 3.8 INMUNOCITOQUÍMICA**

Para la visualización de proteínas hepáticas en nuestros cultivos, las células se tripsinizaron y contaron con un contador automático (Biorad). Se sembraron 2000 células/cm<sup>2</sup> en portas con pocillos (IBIDI) y se incubaron 24 horas a 37°C. Al día siguiente fueron fijadas con 4% PFA durante 15 minutos a RT. Tras retirar el fijador se lavaron y bloquearon durante 60 minutos a RT, en 100ul/pocillo de una solución con 5% suero de burro (donkey serum) y 0,3% Triton X-100 (Chemical book, # T6878) en PBS.

Una vez pasado el tiempo de incubación y retirada la solución de bloqueo, se añadieron 100ul/pocillo del anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo (SB) 0,1X (ver tabla de anticuerpos utilizados, M5). Los portaobjetos se incubaron a 4 °C “overnight”. Al día siguiente fueron lavados y se añadieron 100ul/pocillo del anticuerpo secundario en una dilución 1/500 en SB 0,1X. Los portaobjetos se incubaron durante 45 minutos a RT en oscuridad. Finalmente se lavaron y se añadieron 100ul/pocillo de DAPI (200mg/ml en PBS). Se incubaron 15 minutos a RT en oscuridad y seguidamente se montaron con medio de montaje (Dako mounting media, #S3023) y se almacenaron en oscuridad.

La visualización de las células y las imágenes de fluorescencia fueron tomadas con microscopio con confocal Olympus FV1000 montado en el microscopio invertido IX81 situado en la facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Las imágenes se procesaron con el software Cellprofiler.

### **M 3.9 ELISA**

La cantidad de albumina humana secretada al medio en nuestros cultivos, así como la concentración secretada en el suero de los animales trasplantados se midió con el kit ELISA (Bethyl E88-129)

tal como se indica en las instrucciones. El sobrenadante de 24 horas de los cultivos fue recogido y diluido 1/6 con el buffer de dilución 1X incluido en el kit, mientras que suero obtenido de los ratones trasplantados se diluyó 1/2 con el mismo buffer. Como valor de referencia para nuestros cultivos celulares se utilizó la concentración de albúmina secretada por el cultivo primario de hepatocitos humanos, obtenida previamente en nuestro grupo de investigación<sup>182,187</sup>

### **M 3.10 PROTEÍNAS**

Con el fin de normalizar las cuantificaciones realizadas en placa de cultivo (ELISA) es necesario cuantificar el contenido de proteína en las placas de cultivo. Para ello se realizó el método de Lowry adaptado a pequeños volúmenes.

#### **M 3.10.1 Aislamiento y cuantificación**

A las placas de 24 pocillos conteniendo los cultivos se les retiró el medio y se lavaron con PBS. A continuación, se añadieron 200µl/pocillo de una solución de hidróxido sódico (sosa) 0,5N y se aplicaron tres ciclos de congelación y descongelación a -20°C. Cuando las placas se descongelaron por tercera vez, se rascó la superficie de cada pocillo con la punta de una pipeta de 1ml. Tras recoger todo el volumen y transferirlo a un tubo estéril de 1,5ml, las muestras se conservaron a -80°C hasta su cuantificación por el método de Lowry.



### **M 3.11 ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA**

La actividad de la  $\beta$ -galactosidasa refleja la tasa de envejecimiento celular in vitro. Mediante la presencia de un precipitado azul-verdoso, producto de la reacción sobre el sustrato X-Gal, podemos observar qué cultivos presentan un estado avanzado de senescencia.

Las placas de cultivo se lavaron con PBS. Posteriormente las células se fijaron con una solución compuesta por 50% glutaraldehído y 37% formaldehído diluido en PBS. Tras incubar las células durante 5 minutos y lavar posteriormente dos veces más con PBS, se añadió la solución de tinción, consistente en una dilución de PBS/citrato, ferrocianuro potásico 200mM, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ) 200mM, cloruro sódico (NaCl) 6M y 50 mg/ml del sustrato X-Gal diluido en DMSO. Se incubaron durante 2 horas en la oscuridad. Pasado el tiempo de incubación las placas conteniendo las células se visualizaron con un microscopio óptico invertido (*CKX41, OLYMPUS*).

## **M 4 EXPERIMENTACIÓN IN VIVO**

Los experimentos in vivo se realizaron en las instalaciones del animalario del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y del Science Park Biopolis de Singapur. Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Institucional de Ética Animal del Instituto de Investigación Sanitaria La Fe y Generalitat Valenciana (número de referencia IP.RBM. # 6A-3-2015) así como por el comité institucional de uso y cuidado de Animales A\*STAR (IACUC # 151054).

### **M 4.1 MODELOS ANIMALES:**

#### **M 4.1.1 B6EiC3Sn a/A-Otc<sup>spf-ash</sup>/J (OTC<sup>spf-ash</sup>).**

Ratón mutante con deficiencia en OTC. La mutación hipomorfa anormal de la piel y el pelo (*sparse fur-abnormal skin and hair*, *spf-ash*) en el cromosoma X resultan en el 5-10% de actividad OTC normal, pudiéndose generar episodios de hiperamonemia y la acumulación de amonio en sangre en machos hemizigotos. También acumulan ácido orótico en sangre y orina, síntomas similares a los producidos en humanos<sup>188</sup>. Por ello, este modelo es útil para evaluar la eficacia de los iHEP en terapia celular, mediante el ajuste de la descompensación metabólica causada por la mutación. Los animales fueron adquiridos en Jackson Laboratories (JAX # 001811). Se adquirió un macho hemizigoto mutante y tres hembras sanas para generar la colonia. Mediante su cruzamiento, se obtuvieron hembras heterocigotas con las que posteriormente se generaron los machos hemizigotos que se utilizaron en los trasplantes celulares con iHEP<sup>LT</sup>.

#### **M 4.1.2 CB17/Icr-Prkdc scid/Crl (NOD/SCID).**

Estos ratones presentan una inmunodeficiencia combinada severa (severe combined immunodeficiency disease SCID) congénita que afecta a los linfocitos B y T, particularidad que los convierte en candidatos idóneos para trasplantes celulares. Los ratones macho de 4 semanas de edad fueron adquiridos de los Laboratorios Charles River.

#### **M 4.1.3 FRG<sup>®</sup> (Fah<sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup> and Il2rg<sup>-/-</sup>)**

El modelo murino con tirosinemia tipo I, (FRG<sup>®</sup>: Fah<sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup> and Il2rg<sup>-/-</sup>) con fondo del modelo inmunodeficiente NOD fue adquirido de los laboratorios Yecuris. Fue utilizado durante mi estancia internacional en el A\*Star Genome Institute of Singapore, en el laboratorio del Dr. Torsten Wuestefeld en Singapur. El mantenimiento de este modelo se llevó a cabo en jaulas en racks ventilados, con un suministro de 16mg/L de nitisinona (NTBC) en una solución acuosa de dextrosa al 3% en el agua de los biberones. Además, al agua también se le añadieron antibióticos, en concreto 640µg/ml de sulfametoxazol (SMX) y 128µg/ml de trimetropima (TMP). El tratamiento con NTBC y antibióticos se retiró al inicio de las intervenciones durante 4 días, volviéndose a administrar durante los 3 días siguientes, manteniendo esta pauta hasta el punto final de los experimentos.

#### **M 4.1.4 Genotipado de ratones OTC<sup>spf-ash</sup>**

El genotipo de las crías obtenidas en los cruzamientos, se realizó mediante aislamiento del gDNA de sus colas con el método del fenol/cloroformo descrito a continuación. Se cortó 0,5cm del extremo de la cola de una cría y se coloca en un tubo de 1,5 ml. Se

añaden 0,5 ml de solución de digestión, consistente en Tris-HCl 50mM (pH 8) EDTA 100mM (pH 8), NaCl 100 mM, 1% SDS y 0,5 mg/ml de proteinasa K, y se incubó “overnight” a 55°C en agitación en un termobloque (Thermo Scientific). Pasado el tiempo de incubación se añaden 0,7 ml de fenol/cloroformo/isoamil alcohol 25:24:1 (Sigma # P3803-100) y se dejan en rotación en una noria durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, el tubo con la muestra se centrifugó a 17.000 rpm durante 5 minutos y con una pipeta se transfirió la fase superior conteniendo el DNA a un tubo nuevo. Se añade 1 ml de etanol 100% al volumen recogido previamente y se invierte el tubo varias veces hasta que vemos precipitar el DNA, formando hilos visibles. La muestra se centrifugó 5 minutos a 17.000 rpm nuevamente y se descartó el sobrenadante. A continuación, se añadió etanol 70% enfriado a -20°C, se invirtió el tubo nuevamente para ver el pellet de DNA antes de centrifugarlo de nuevo a 17000 rpm. Tras descartar de nuevo el sobrenadante el tubo se dejó abierto en una gradilla hasta la completa evaporación del etanol. Finalmente, el pellet de gDNA se resuspendió en 100 µl de agua libre de nucleasas. La muestra se incubó durante 15 minutos a 65°C para favorecer la resuspensión del DNA. Tras cuantificarlo con el Nanodrop 2000c y diluirlo a una concentración de 100ng/µl las muestras se congelaron a -20°C hasta su uso.

Una vez obtenido el gDNA de las crías de ratón, se realizó el análisis de sus genotipos mediante PCR de punto final tal y como se describe en Jackson Laboratories (<https://www.jax.org/strain/001811>)

## **M 4.2 ACONDICIONAMIENTO ANIMAL PREVIO A LAS INTERVENCIONES CON IHEP**

### **M 4.2.1 Ayuno**

Todos los animales de los modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID utilizados en los experimentos fueron sometidos a ayuno, siendo privados de alimento y agua durante las 3 horas previas al inicio de las intervenciones y en las 3 horas previas al sacrificio.

### **M 4.2.2 Inmunosupresión**

El modelo OTC<sup>spf-ash</sup> fue sometido a un proceso de inmunosupresión mediante la administración por vía subcutánea de Tacrolimus (Astellas Pharma) a una concentración final de 2,5mg/kg/día. El tratamiento comenzó 48 horas antes de las intervenciones con iHEP<sup>LT</sup>, y se administró diariamente hasta el punto final de los experimentos.

### **M 4.2.3 Inducción de daño hepático con paracetamol (APAP)**

Con el fin de conseguir una colonización hepática óptima de nuestros iHEP en el hígado de los ratones, se indujo daño hepático mediado por acetaminofén (paracetamol, APAP) previo a las intervenciones en los modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID. A los animales se les administró una dosis de entre 300-400 mg/kg de APAP vía intraperitoneal 3 horas antes de las intervenciones con iHEP<sup>LT</sup>.

## **M 4.3 INTERVENCIONES**

### **M 4.3.1 Modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID**

El trasplante de iHEP en los modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID se realizó tal y como se describe en<sup>187</sup>.

Pasadas 3 horas desde la inducción del daño hepático con APAP, cada ratón fue anestesiado en una mesa de anestesia con una mezcla de sevofuorano/O<sub>2</sub> inhalada y administrada a flujo continuo. Además, se administró analgesia intraoperatoria vía intraperitoneal (20 µg/kg fentanilo). Se depiló el flanco izquierdo y seguidamente se realizó una incisión de 1cm para exponer el extremo inferior del bazo. A cada ratón se le administró un total de 2 millones de iHEP en 150 µl de tampón fosfato salino (PBS), mediante una inyección en la parte ventral del extremo inferior del bazo con una aguja de insulina de 30G de calibre. Tras la infusión celular, se cauterizó la posible hemorragia causada por la punción y el bazo fue colocado cuidadosamente en su lugar. La incisión se cerró con hilo de sutura absorbible. Finalmente se administró analgesia postoperatoria (0,1 mg/kg buprenorfina) vía intraperitoneal y el animal se devolvió a su jaula para monitorizar su recuperación.

### **M 4.3.2 Modelo FRG<sup>®</sup>**

El trasplante de iHEP en ratones FRG<sup>®</sup> se realizó siguiendo el protocolo desarrollado en el laboratorio del Dr. Wuestefeld. Brevemente, cada ratón se anestesió con una mezcla de sevofluorano / O<sub>2</sub> mediante inhalación continua. Tras depilar la parte media del tórax se hizo una incisión de 1,5 cm. Se realizó presión con dos dedos cuidadosamente rodeando la incisión para

exponer el lóbulo mayor de hígado. A continuación, se inyectaron 4 millones de iHEP en un volumen de 150  $\mu$ l de PBS en la cápsula del hígado. La posible hemorragia derivada de la inyección fue cauterizada de inmediato. Finalmente, el lóbulo hepático expuesto se colocó en su lugar, se limpió la zona operada con etanol 70% y la incisión se cerró con hilo de sutura. Se retiró la anestesia inhalada y el ratón se devolvió a su jaula para monitorizar su recuperación. Los animales trasplantados se mantuvieron durante los 4 días siguientes sin tratamiento con antibióticos y NTBC, reanudando de nuevo su administración durante los siguientes 3 días (ver M4.1.3).

## **M 4.4 SACRIFICIO, OBTENCIÓN Y PROCESADO DE MUESTRAS**

### **M 4.4.1 Sacrificio**

Los animales trasplantados se mantuvieron entre 7 y 30 días hasta el día del sacrificio. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical bajo anestesia con una mezcla de sevoflurano/O<sub>2</sub>. A continuación se procedió a la obtención de muestras.

### **M 4.4.2 Obtención y procesado de muestras**

#### **M 4.2.2.1 Sangre**

En el modelo FRG<sup>®</sup> se tomaron muestras de 200  $\mu$ l de sangre semanalmente hasta el punto final, mediante la punción en el seno retro-orbital con un capilar y se transfirió a un tubo de 1,5ml. En los modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID la sangre se recogió a día 14 y a punto final.

Cada muestra se mantuvo durante una hora a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 1.500 G durante 10 minutos. El sobrenadante conteniendo el suero se transfirió a un nuevo tubo de 1,5ml y se preservó a -80°C hasta su uso.

#### **M 4.2.2.2 Orina**

La orina se recolectó semanalmente en el modelo FRG® aislando a los ratones en jaulas limpias y vacías durante 30 minutos, para posteriormente recuperar las micciones con una micropipeta y transferirlas a tubos de 1,5 ml. En los modelos OTC<sup>spf-ash</sup> y NOD/SCID la orina se recogió a día 14 y a punto final de mismo modo. Tras su recolección las muestras se congelaron a -80°C hasta su uso.

#### **M 4.2.2.3 Hígado**

Tras el sacrificio, a cada animal se le practicó una incisión desde la parte media del tórax hasta el abdomen para acceder y extraer el hígado al completo. Tras colocarlo en una placa de Petri conteniendo PBS, todos los lóbulos fueron troceados con un bisturí haciéndose piezas de 0,5x0,5 cm aproximadamente. Las porciones se lavaron 2 veces más en placas de Petri nuevas con PBS. Las porciones una vez lavadas se procesaron a partes iguales tal como se describe a continuación.

##### **M 4.2.2.3.3 Fijación en PFA y generación de bloques de parafina para cortes histológicos.**

El último tercio de piezas de hígado de cada ratón fueron introducidas en un tubo de 15 ml conteniendo PFA al 4%. Los



tubos con los hígados de todos los ratones se fijaron en una noria y se incubaron en rotación durante 20 horas a 4°C. Pasado el tiempo de incubación, las piezas de cada tubo se lavaron con PBS y fueron procesadas para la formación de bloques de parafina tal como se describe en<sup>189</sup>. Las piezas de hígado fueron deshidratadas a 4°C a través de una serie con metanol/PBT (PBS + 0,1% Tween 20 Merck) 0/100, 25/75, 50/50, 75/25 y 100/0 (x2), con un periodo de incubación de 1 hora en cada fase. Las piezas de hígado deshidratadas se pueden conservar a -20°C o proceder a la formación de bloques de parafina.

Para la formación de los bloques de parafina, se colocaron 3-4 piezas de hígado del mismo ratón en 1 "cassette" y se incubó 2 x 30 minutos con etanol 100%. Posteriormente se incubó en una solución de etanol/xilol (50/50) durante 30 minutos más, para seguidamente ser incubado 2 x 30 minutos en xilol 100%. A continuación, el "cassette" fue incubado en una mezcla de xilol/parafina durante 1 hora en una estufa a 60°C. Finalmente, se incubó 3 x 3 horas en parafina a 60°C. Pasado el periodo de incubación, se abrió el "cassette" para recuperar las piezas de hígado y se incluyeron en parafina haciendo uso del inclusor disponible en las instalaciones del instituto de investigación.

#### ***M 4.2.2.4 Microtomía***

Después de incluir las piezas de hígado en bloques de parafina, se procedió a realizar cortes histológicos. Para ello se hicieron secciones de 7 µm de grosor mediante el uso de un micrótopo. Las cuchillas fueron renovadas periódicamente. Las secciones se recogieron con un pincel y se llevaron a un baño de agua a 37°C para estirarlas y ser recogidas posteriormente con un portaobjetos limpio (Superfrost plus, Thermo Scientific).

## **M 4.5 TECNICAS ANALÍTICAS**

### **M 4.5.1 Tinción con Hematoxilina-Eosina**

Las secciones de hígado de los bloques de parafina fueron desparafinadas mediante su lavado con xilol durante 3 turnos de 5 minutos, realizando el último lavado con xilol nuevo. A continuación, las secciones fueron rehidratadas mediante su lavado en una serie de etanol con graduación decreciente. Las secciones se lavaron 2 x 5 minutos en etanol 100%, 5 minutos en etanol 90%, 80% y 70% y 5 minutos finales en agua destilada.

Una vez desparafinadas y rehidratadas las secciones, se incubaron durante 3 minutos en hematoxilina filtrada previamente. Pasado el tiempo de incubación se lavaron con alcohol ácido durante 30 segundos y posteriormente con agua durante 5 minutos. A continuación, se incubaron con eosina durante 30 segundos y se lavaron y deshidrataron durante 30 segundos en etanol 80%, 30 segundos en etanol 90% y 5 minutos en etanol 100%. Finalmente, los portaobjetos con las secciones se lavaron con xilol durante 5 minutos y se montaron con cubreobjetos y medio de montaje.

### **M 4.5.2 Inmunohistoquímica**

Los portaobjetos con las secciones de hígado embebidas en parafina se desparafinaron y rehidrataron tal como se describe en (hematoxilina-eosina). Una vez hidratadas, se hirvieron a presión durante 3 minutos a 95°C en una solución 10 mM de citrato a pH6 o pH9 (OTC) para la recuperación del antígeno. Una vez hervidas, las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y posteriormente se lavaron en 3 rondas de 5 minutos en PBT. A continuación, las secciones se incubaron 1 hora a temperatura

ambiente con solución de bloqueo, compuesta por PBT con 10% de suero de burro (Donkey serum, Sigma). Pasado el tiempo de incubación se retiró la solución de bloqueo y las secciones se incubaron "Overnight" a 4°C con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo al 0,1% (ver tabla para anticuerpo y diluciones, M5). Pasado el tiempo de incubación, las secciones se lavaron en 3 turnos de 10 minutos para posteriormente ser incubadas con 100 µl/sección de una dilución 1/500 del anticuerpo secundario en solución de bloqueo al 0,1%, a temperatura ambiente y en oscuridad (ver tabla de anticuerpos M5). Pasado el tiempo de incubación las secciones fueron lavadas con PBT en dos turnos de 15 minutos. Se añadieron 100 µl de una solución de DAPI (1ug/ml en PBS) a cada sección y se incubaron en oscuridad durante 4 minutos adicionales. Finalmente, los portaobjetos con las secciones fueron lavados con PBS y se montaron con cubres y medio de montaje (Dako mounting médium).

### **M 4.5.3 ELISA**

Los sueros obtenidos de los animales operados se diluyeron y procesaron tal como se describe en (M 3.9)

### **M 4.5.4 Cuantificación de ácido orótico en orina**

La toma de muestras de orina se realizó siempre después de un ayuno de 3 h. La orina se diluyó 1/10 con agua / FA (99,8: 0,2) que contenía 1 ppm del estándar interno Fenilalanina-d5 (FA).

La cuantificación de ácido orótico en orina se realizó utilizando UPLC-MSMS (QqQ) 1290-6460 de Agilent. La separación por UPLC se realizó en un sistema LC Agilent 1290 Infinity II equipado con

una columna Synergi-Hydro C18 de 150 mm × 2,1 mm y 4 μm de tamaño de partícula (Phenomenex Inc). La fase móvil fue agua / FA (99,8: 0,2) y acetonitrilo. Se utilizó fenilalanina-d5 como patrón interno a 1 ppm. El proceso de cuantificación y análisis se llevó a cabo por la unidad de metabolómica del IIS La Fé.



## **M5 TABLAS**

## Tablas:

### Primers

Gen/tránsito	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
ALB	TAAGGAGACCTGCTTTGCCG	AGACAGGGTGTGGCTTTACA
HGD	GGACTTGATGCTGACTGCTT	AAGTGGCTCTTGAGTGGCTC
SLC25a18	CCGACTGTGCCAGGAACTC	CCTTGCCCTCTAGGCTAA
SLC1A1	GTTTCGAGAACACAGCAACC	CAGCGCGAGACCAATTTTT
SLC1A2	GGTGCACACAACCTGTGCAT	GCAGTCGGCTGACTTTCCAT
GLS2	CGAAGGTTGCCTTGTGAGC	AGAGTGTGTAGGAGTCTGGT
GLUD1	CTTGGGCTCCCTGTTGGAG	TCAAAGGCCCTGGCCAAAT
NNMT	GACTACTCAAGACCAGACCTGC	GTCACATCACACTTCAGCACCT
GOT1	CTGGGATTGACCCAACCTCG	CCAGATGGGAAGCCCTGATA
CDKN1A	CCATGTGGACCTGTCACTGT	CTTCCTGTGGGCGGATTAGG
CDKN2A	GGCCTTCGGCTGACTGG	ACCGTAACTATTCGGTGCGTT
PBGD	CGGAAGAAAACAGCCCAAAGA	TGAAGCCAGGAGGAAGCACAGT
TAT	TCTCTGTTATGGGGCGTTGG	TGGACAGACTGCTCAGCAAC
GLUL	TGGGAAGTGGAAATGGTGCAG	CCAGTTAGACGTGGGGCATT
HEX	CGGACGGTGAACGACTACA	TTTGACCTGTCTCTCGCTGA
HPD	GACGGCCAAGATCAAGGTGA	TGCACCGGTTTGGTGAAGAT
ALDH4A1	CTGGACGGGGTTGTGCATT	CCCTGCGTGAAGGCTAAGAC
CYP3A4	CAAGAAGAACAAGGACAACATAGA	TTTACAAGTGTGAAGGAGAAGTT
OTC-secuenciación RTqPCR	AAATGATCCATTGGAAGCAGCG	CTTCTGGGCAAGCAGTGTA AAA
OTC-secuenciación genómico	TGGTACCAAGCTGTTGCTGA	GTAACCTGGTAACCTTGGAAAGC
OTC-genómico qPCR	TGAGTTGGTTTATGGGGAAAAGAGA	CAAAGCATATCATACGGTTCACCC
PBGD-genómico qPCR	CCTTGATGACTGCCTTGCCCT	AGGCTGTTGCTTGGACTTCT
Genotipado OTC spf-ash	CAA GAC ATT CAC TTG GGT GTG	GGG GAG ACC ATT ATC TAA GGA GA
Sonda Taq fluoroforo 1 (silvestre)	ACA CCG CTC GGT TTG TAA A	
Sonda Taq fluoroforo 2 (mutante)	AGA CAC CGC TCA GTT TGT AAA AC	

### Anticuerpos

ANTICUERPOS PRIMARIOS	ANIMAL	REFERENCIA	DILUCIÓN
Goat anti-human albumin	cabra	Bethyl Laboratories, RRID: AB_67018	1/500
Rabbit anti-A1-Antitrypsin	conejo	Cell Marque-RRID: AB_1160952	1/500
Rabbit anti-fumarylacetoacetate hydrolase	conejo	Abcam, RRID: AB_1860393	1/200
ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
Alexa Fluor 594 donkey anti-rabbit IgG(H+L)		Invitrogen A21207	1/500
Alexa Fluor 488 donkey Anti-rabbit IgG(H+L)		Invitrogen A21206	1/500
Alexa Fluor 488 phalloidin		Invitrogen A12379	1/50





# **RESULTADOS**

## **R 1 OBTENCIÓN DE POBLACIONES HOMOGÉNEAS DE FIBROBLASTOS DE LA PACIENTE CON DEFICIENCIA EN OTC CON EL MISMO CROMOSOMA X (Xp O Xm) INACTIVO**

El primer objetivo de esta investigación y herramienta fundamental para el desarrollo de esta tesis es la obtención de cultivos de HDF homogéneos respecto al estado de inactivación del cromosoma Xp y Xm. Así pues, el paso inicial en el proceso de obtención de poblaciones homogéneas de iHEP que hayan silenciado el Xp o el Xm es obtener poblaciones clonales (originados a partir de una sola célula) de HDF de la paciente con DOTC.

Para su obtención, los HDF procedentes de la biopsia se sembraron mediante el método de dilución límite tal y como se describe en (M1.6). Con el fin de comprobar el estado de inactivación del cromosoma X en los clones expandidos se llevó a cabo el test HUMARA (*human androgen receptor assay*). Es la herramienta molecular mayormente utilizada para la evaluación del patrón de inactivación en células humanas. Se basa en la amplificación por PCR de un fragmento del gen del receptor de andrógenos humano, y la determinación de su tamaño y estado de metilación. Este locus presenta un polimorfismo de secuencias -CAG- repetidas en tándem (STR), que se repiten un número variable de veces, siendo ese número el elemento diferenciador entre los alelos procedentes de cada cromosoma X. Con este método podemos ver qué alelo está metilado y como consecuencia inactivado.

Tras aislar el gDNA genómico y analizar el estado de inactivación del cromosoma Xp o Xm, se comprobó que varios clones de HDF presentan una inactivación completa de uno de los dos alelos del cromosoma X. Como observamos en la **Tabla R1**, se obtuvieron clones con inactivación completa de un cromosoma X (alelo 1, 25 triplete CAG; clones E2, E6, A6 y G4), así como clones con

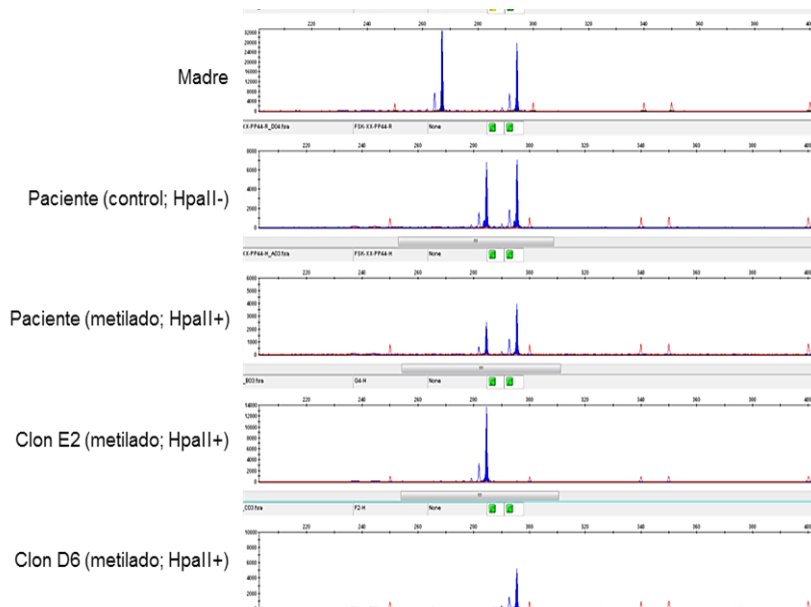
inactivación completa del otro cromosoma X (alelo 2, 28 tripletes CAG; clones F2, F5, D6, G9 y G12). También se obtuvo un clon con HDF que presentan inactivación del Xp y Xm con ratio aproximado 50:50 (A2), consecuencia probable de la siembra de 2 células con estados de inactivación diferentes durante el inicio de la clonación.

Muestra	Alelo1 (N° tripletes CAG)	% Inactivación alelo 1	Alelo 2 (N° tripletes CAG)	% Inactivación alelo 2
FSK-XX-PP44	25	35%	28	65%
MADRE	18	82%	28	18%
G4	25	100%	28	0%
F2	25	0%	28	100%
F5	25	0%	28	100%
D6	25	0%	28	100%
E6	25	100%	28	0%
A6	25	100%	28	0%
G12	25	0%	28	100%
A2	25	53%	28	47%
E2	25	100%	28	0%
G9	25	0%	28	100%

**Tabla R1: Análisis del estado de inactivación del cromosoma X mediante el análisis del marcador (CAG)<sub>n</sub> en el gen del receptor de andrógenos (AR; test HUMARA).** Resultados del porcentaje de inactivación del cromosoma X en los diferentes cultivos clonales analizados. Cultivos clonales de la paciente con inactivación completa del cromosoma X materno: F2, F5, D6, G12 y G9. Inactivación completa del cromosoma X paterno: G4, E6, A6 y E2.

Los HDF de la paciente con DOTC anteriores a la expansión clonal presentaron un ratio de inactivación de los cromosomas X de 35:65, conteniendo dichos alelos 25 y 28 repeticiones CAG respectivamente. La muestra procedente de la madre de la paciente nos permitió determinar que el cromosoma X heredado

de la madre corresponde al que presenta 28 repeticiones CAG (**Tabla R1, Figura R1**). Por tanto, el cromosoma X heredado del padre corresponde al que presenta 25 repeticiones CAG. Así mismo, los HDF de la paciente con DOTC anteriores a la expansión clonal presentaron un ratio de inactivación Xp:Xm de 35:65, confirmando que no existe un defecto congénito en el mecanismo de silenciamiento al azar del cromosoma X.

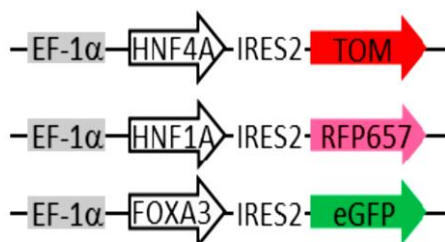


**Figura R1: Electroferogramas representativos del test de HUMARA.** Paneles representativos del total de clones correspondientes a la muestra de la paciente, su madre y los clones E2 y D6.

## R 2 REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE FIBROBLASTOS A iHEP

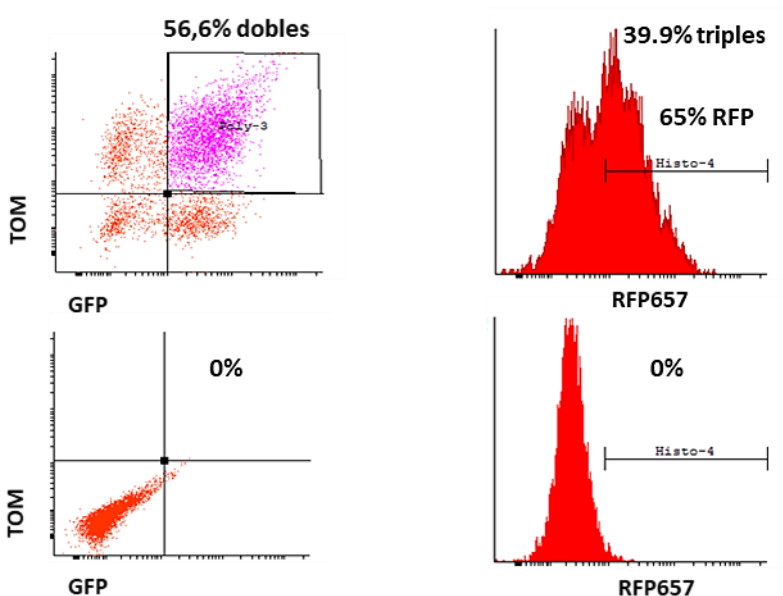
Para la obtención de hepatocitos inducidos seguimos el protocolo de reprogramación directa descrito<sup>173</sup>. Este protocolo de 108

reprogramación consiste en la expresión de los factores de transcripción HNF1 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$  y FOXA3. La expresión de dichos factores se realizó con vectores lentivirales que coexpresaban proteínas fluorescentes desde un cassette policistrónico tipo IRES (Figura R2). El uso de proteínas fluorescentes con espectros de absorción-emisión no solapados nos permite monitorizar los niveles de co-expresión mediante citometría de flujo.



**Figura R2: Esquema de los cassettes de expresión lentivirales utilizados en el protocolo de reprogramación directa.** Cada vector co-expresa desde un mismo mRNA un factor de transcripción con su proteína fluorescente. **TOM:** proteína fluorescente roja. **eGFP:** proteína fluorescente verde. **RFP657:** proteína fluorescente rojo lejano. **EF-1 $\alpha$ :** promotor del factor de elongación 1 $\alpha$ . **IRES2:** secuencia del *internal ribosome entry site*, que permite la traducción desde un mismo mRNA del factor de transcripción y la proteína fluorescente que incluye el vector.

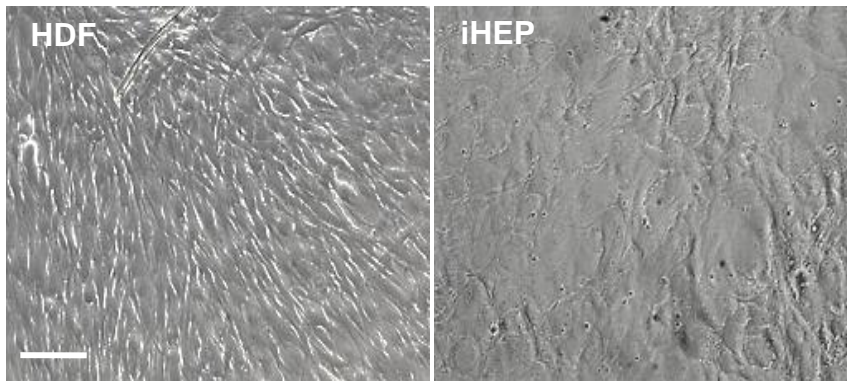
Con el fin de comprobar nuestra capacidad para reproducir el protocolo de reprogramación, se hizo una primera aproximación reprogramando HDF comerciales (ATCC CRL-2429) tal y como se describe en M1.8. Transcurridos 12 días desde la infección, se evaluó el porcentaje de células infectadas mediante citometría. Del total de células analizadas, el porcentaje de células infectadas simultáneamente con HNF4-TOM y FOXA3-eGFP fue del 56,6% (dobles infectadas) (Figura R3).



**Figura R3: Análisis de la infectividad lentiviral con factores de transcripción HNF1A-RFP657, HNF4A-TOM y FOXA3-eGFP mediante citometría. Arriba:** HDF co-infectados con los 3 virus simultáneamente. El porcentaje de células positivas para eGFP y TOM fue del 56.6%, de las cuales, el 65% son RFP657 positivas. Por lo tanto, el número estimado de células triple infectadas fue del 39%. **Abajo:** análisis del control negativo (HDF sin infectar) con 99.9% de células negativas.

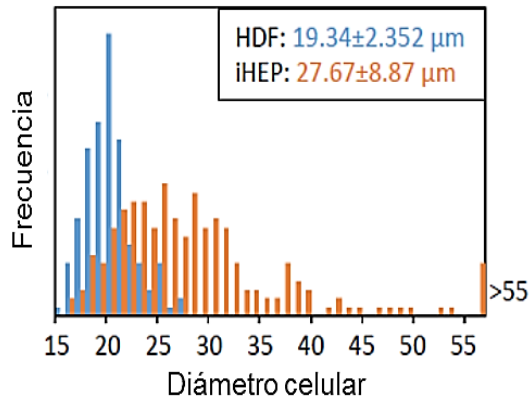
Del total de células positivas para los dos factores anteriores, el 65% fueron positivas para HNF1-RFP657, estimándose por tanto una eficiencia de infección con los 3 factores de transcripción del 39% (HNF1-RFP657, HNF4-TOM y FOXA3-eGFP positivas).

Doce días después de la infección se aprecia un importante cambio morfológico. Los HDF presentan su típica forma alargada y estrecha, con una disposición en paralelo. Por el contrario, los iHEP han perdido la forma anteriormente citada, adquiriendo una forma más poligonal e irregular (**Figura R4**).



**Figura R4: Imágenes representativas de HDF e iHEP (12 días después de la infección con HNF1 $\alpha$ -RFP657, HNF4 $\alpha$ -TOM y FOXA3-eGFP).** Imágenes tomadas en microscopio con contraste de fases con objetivo 20x. Barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

Para tener una mejor evidencia del cambio morfológico, se midió el diámetro celular en ambos cultivos utilizando el contador automático Scepter 2.0 (Millipore-Sigma). El diámetro medio de los HDF fue de 19  $\mu$ m, situándose la mayoría de células en un rango de entre 18 y 21  $\mu$ m. El número de células analizadas con diámetros superiores a 21  $\mu$ m fue muy bajo. Por el contrario, el diámetro medio de los iHEP fue de 27  $\mu$ m. El rango en el que se localizaron la mayoría de iHEP se situó entre 22 y 32  $\mu$ m. Aunque se aprecia mayor heterogeneidad en el tamaño celular de iHEP, la mayoría de células analizadas superaron las 21  $\mu$ m (**Figura R5**). Por tanto, el diámetro de los iHEP ha aumentado significativamente comparado con el de los HDF.

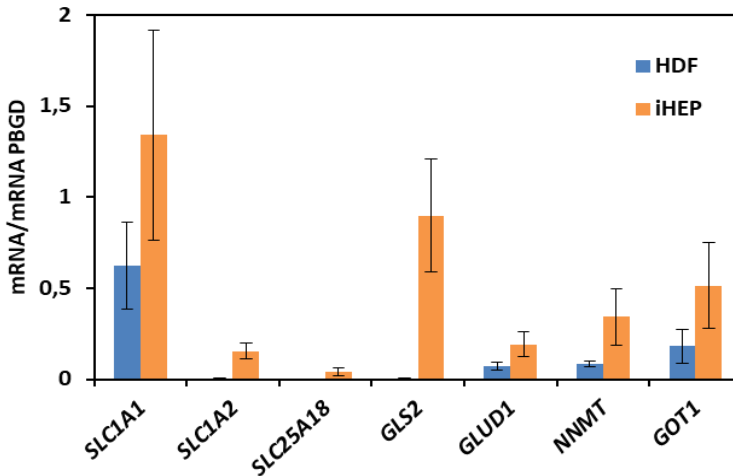


**Figura R5: Diámetro medio de HDF e iHEP.** Gráfico de frecuencias de distribución de diámetros celulares de HDF e iHEP en suspensión. **Azul:** HDF. **Naranja:** iHEP.

El fenómeno de reprogramación celular implica, además de cambios morfológicos, la inducción de genes propios de la célula objetivo. Para comprobar si se había producido una reprogramación a iHEP, se analizó la expresión de un paquete de genes típicamente hepáticos. Para ello se aisló RNA de los cultivos reprogramados y se analizaron los niveles de expresión de mediante RT-qPCR. Los cultivos de iHEP presentan expresión *de novo* o inducción significativa de genes hepáticos comparado con cultivos paralelos de HDF (**Figura R6**). Cabe destacar la expresión del enzima N-metil transferasa (*NNMT*), cuya función es el metabolismo de drogas y otros xenobióticos mediante su N-metilación, alcanzándose una expresión del 35% respecto al hígado humano. Por otro lado, cuantificamos la expresión enzimas implicadas en la liberación de amonio a partir de glutamina y glutamato, la glutaminasa 2 (*GLS2*) y la glutamato dehidrogenasa (*GLUD*) alcanzando valores del 90% y 18% respectivamente. Estos iHEP también expresan las transaminasas *GOT1* en un 50%, así como las proteínas transportadoras de membrana *SLC1A2* en un 15%, *SLC1A1* en un 125% y *SLC25A18* en un 4%. Por tanto, los



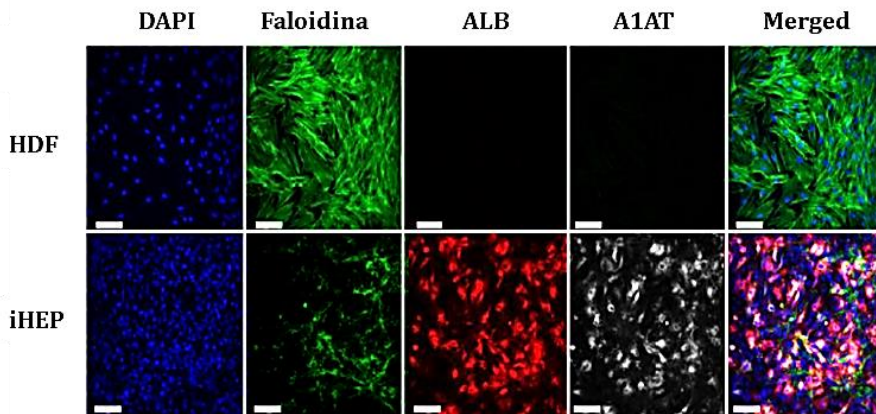
iHEP generados expresan genes con funciones metabólicas o de transporte propias de hepatocitos humanos.



**Figura R6: Niveles de expresión relativa de marcadores hepáticos en iHEP** evaluados mediante RT-qPCR (hígado humano=1). *SLC1A2*: Proteína transportadora 1A2. *SLC1A1*: Proteína transportadora 1A1. *SLC25A18*: Proteína transportadora 25A18. *GLS2*: glutaminasa 2 *GLUD1*: glutamato dehidrogenasa 1 *NNMT*: N-metil transferasa. *GOT1*: aspartato aminotransferasa.

Una vez evaluada la expresión de marcadores hepáticos, se determinó si los iHEP habían adquirido algunas funciones propias de hepatocitos. Para tal fin se analizó la expresión de albúmina y  $\alpha$ -1 antitripsina (A1AT) mediante inmunocitoquímica. Los iHEP expresan ambas proteínas simultáneamente, siendo indetectables en HDF (**Figura R7**). En la imagen se puede apreciar cómo la disposición de los filamentos de actina ha cambiado de forma notoria. En iHEP los filamentos de actina se sitúan próximos a las membranas plasmáticas, delimitando la silueta de las células. Sin embargo en HDF su disposición es en forma de husos a lo largo de todo el citoplasma celular. Este cambio de disposición en las proteínas estructurales puede ser una de las causas de los

cambios morfológicos sufridos como consecuencia de la reprogramación.

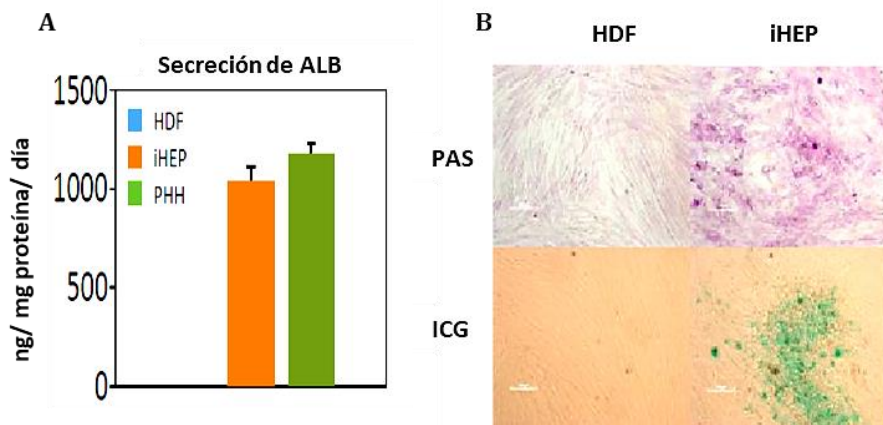


**Figura R7: Expresión de marcadores hepáticos en iHEP.** Expresión de albúmina y A1-antitripsina (ALB y A1AT) humanas en iHEP. Faloidina muestra los filamentos de actina celulares. Diferencias en la cantidad y disposición de los filamentos sugieren una transición mesénquima-epitelio (MET). Barras de escala corresponden a 100  $\mu\text{m}$ .

El análisis de marcadores hepáticos se complementó con la determinación de la secreción de albúmina al medio de cultivo. Tras el análisis vemos como los iHEP producen 1  $\mu\text{g}$  de albúmina/gr de proteína/24 horas (**Figura R8A**). Los niveles de ALB secretados fueron similares a los producidos en hepatocitos primarios en cultivo (PHH).

Con el fin de determinar el grado de madurez y llevar a cabo una caracterización más completa de nuestros iHEP, evaluamos su capacidad para almacenar glucógeno en el interior celular. Mediante la tinción PAS, cuyo reactivo es una sustancia incolora que se vuelve roja cuando entra en contacto con grupos aldehído, podemos ver la presencia y acumulación intracelular de carbohidratos. Como vemos en la **figura R8B**, la mayoría de

células del cultivo de iHEP han adquirido un tono rojizo, consecuencia de la acumulación de glucógeno en su interior.



**Figura R8: Evaluación de la funcionalidad de iHEP.** **A:** ELISA de albúmina humana. iHEP y PHH secretan cantidades muy similares de albúmina. No hay secreción en el control negativo (HDF). **B:** Los iHEP almacenan glucógeno (arriba) y transportan verde indocianina (debajo). **PAS:** Tinción con ácido peryódico de Schiff. **ICG:** Transporte de verde indocianina. **HDF:** Fibroblastos dérmicos humanos. **iHEP:** Hepatocitos inducidos. **PHH:** Hepatocitos primarios humanos. Barras de escala corresponden a 100  $\mu$ m.

Por último, para poner de manifiesto la capacidad transportadora de nuestros iHEP, esto es, determinar si los iHEP tenían la capacidad de introducir xenobióticos en su interior, hicimos uso de la tinción con verde indocianina. Es un colorante inocuo comúnmente utilizado en medicina como sustancia indicadora de afecciones cardíacas o hepáticas, y sirve como herramienta para la evaluación de, entre otras, la función hepática. Añadiendo el colorante al medio de cultivo, podemos ver si los iHEP tiene la capacidad de transportarlo al interior celular. Como vemos en la imagen, muchos de los iHEP del cultivo tienen sus citoplasmas teñidos de un color verde intenso, poniendo de manifiesto su

capacidad de transportar sustancias al interior, así como la presencia de transportadores de membrana y su funcionalidad (**Figura R8B**).

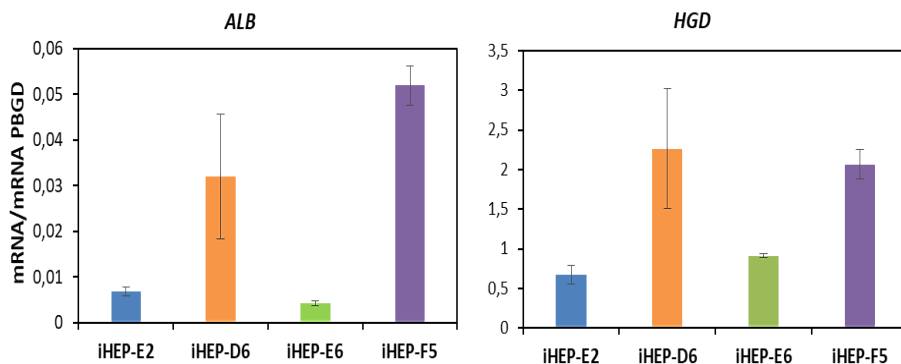
En vista de los resultados obtenidos, concluimos que se ha conseguido reproducir el protocolo de reprogramación directa en nuestro laboratorio, reprogramando HDF hasta iHEP expresando genes y proteínas propios de hepatocitos. Además, también cumplen algunas de las funciones que llevan a cabo los hepatocitos humanos, como el almacenamiento de glucógeno o la capacidad transportadora y secretora.

### **R 3 REPROGRAMACIÓN A iHEP DE CLONES DE HDF DE LA PACIENTE CON DOTC**

Una vez comprobada la funcionalidad de los hepatocitos inducidos generados, se procedió a repetir el protocolo de reprogramación con los clones de HDF de la paciente con DOTC. Para ello seleccionamos dos clones que habían silenciado el cromosoma X paterno (E2 y E6) y dos que habían silenciado el cromosoma X materno (D6 y F5).

Los porcentajes de infección fueron similares a los obtenidos en la reprogramación de HDF comerciales. Con el fin de evaluar la nueva reprogramación a iHEP, pasados 12 días desde la infección determinamos mediante RT-qPCR la expresión de albúmina humana (*ALB*) y homogentisato 1,2 deshidrogenasa (*HGD*), dos genes característicos del hepatocito. La expresión de mRNA en ambos marcadores resultó ser muy variable. Mientras que para los clones D6 y F5 los niveles estaban en el rango de los HDF

comerciales (ver más arriba), los clones E2 y E6 presentaban niveles entre 3 y 5 veces inferiores (**Figura R9**).

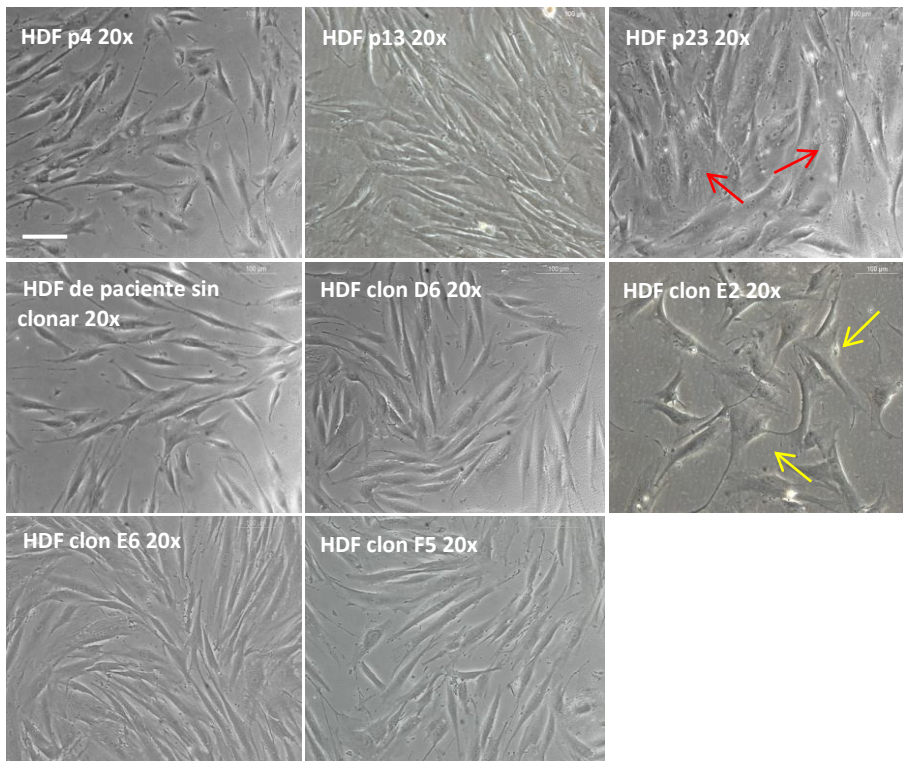


**Figura R9: Variabilidad en los niveles de expresión de clones de iHEP.** Análisis mediante RT-qPCR de la expresión de los genes hepáticos albúmina humana *ALB* y homogentisato deshidrogenasa *HGD*. Niveles de expresión 12 días después de la infección significativamente variables entre los diferentes clones analizados. Expresión relativa a hígado humano=1.

### R 3.1 LA SENESCENCIA AFECTA NEGATIVAMENTE A LA REPROGRAMACIÓN A iHEP

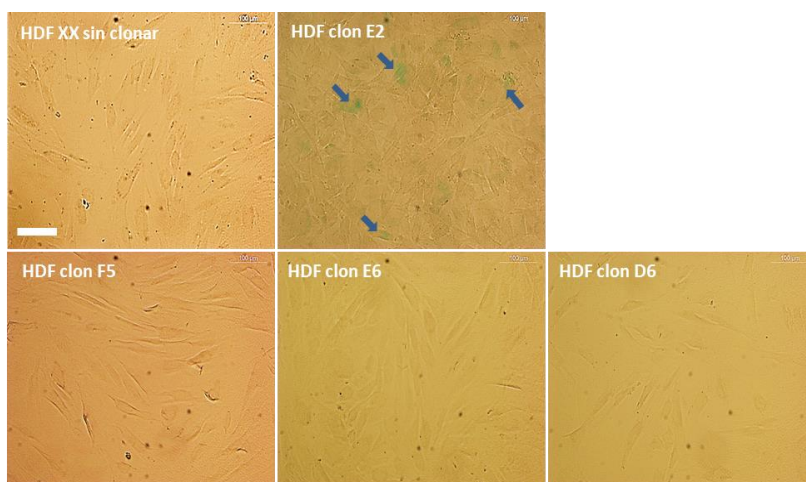
Está descrito que la senescencia perjudica la reprogramación a iPSC<sup>190</sup>, por lo que nos preguntamos si la peor reprogramación en los clones E2 y E6 era consecuencia de presentar un mayor grado de senescencia. Para determinar el grado de senescencia de los cultivos de clones de HDF evaluamos la morfología de los cultivos, la actividad del enzima  $\beta$ -galactosidasa y la expresión de inhibidores de kinasas dependientes de ciclinas (CDKN1A y CDKN2A). Como referencia utilizamos HDF comerciales de diferentes pases, (p4, p13 y p23), siendo las células de p23 claramente senescentes al microscopio. Los cultivos de HDF comerciales de p4 y p13, así como los HDF de la paciente sin

clonar, y los clones D6, E6 y F5, poseen una morfología típica de fibroblastos, siendo células relativamente estrechas y alargadas (**Figura R10**). Esta morfología se acentúa cuando los HDF proliferan y alcanzan confluencia, compactándose y estrechándose, adquiriendo un aspecto mucho más fusiforme. Por el contrario, los HDF comerciales de p23 y el clon E2 de la paciente, son menos alargados y considerablemente más anchos, en ocasiones presentando prolongaciones irregulares de sus citoplasmas, y adquiriendo un aspecto de “huevo frito” (flechas rojas y amarillas). Además, la capacidad proliferativa del clon E2 era muy limitada y los HDF p23 apenas proliferaban, al contrario que los HDF de pase más bajo utilizados.



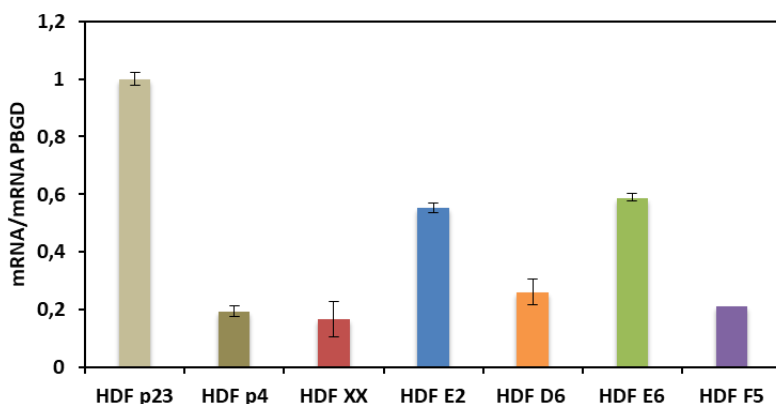
**Figura R10: Morfología de HDF comerciales a diferentes pases y de HDF clonados y sin clonar, procedentes de la paciente con DOTC.** Diferencias morfológicas entre HDF de pases bajos y HDF de pase alto. Los HDF más jóvenes muestran una morfología alargada y estrecha, con forma de huso (p4 y p13). HDF de pase más alto (p23) pierden ese aspecto fusiforme, siendo más anchas y menos alargadas (arriba derecha, **flechas rojas**). Se aprecian las mismas diferencias morfológicas entre HDF sin clonar de la paciente (debajo izquierda) y los mismo HDF clonados y expandidos (clon E2 únicamente, debajo derecha, **flechas amarillas**). Imágenes tomadas con objetivo 20x. Barra de escala corresponde a 100  $\mu\text{m}$ .

Para tener mayor evidencia del grado de senescencia en los HDF de la paciente de DOTC, se realizó el ensayo de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa lisosomal. Este enzima se sobreexpresa y acumula en células senescentes hasta un punto en el que la actividad puede ser detectada a pH 6.0 (subóptimo). El clon E2 resultó positivo para dicha actividad, apreciándose células que acumulan un precipitado azul-verdoso, correspondiente al producto de la actividad enzimática sobre el sustrato X-gal. Dicho precipitado no se detectó en los clones E6, F5 y D6 (**Figura R11**). En conclusión, el clon E2 es abiertamente senescente, mientras que los clones D6, E6 y F5, no muestran esta característica.



**Figura R11: Evaluación de la acumulación de  $\beta$ -Gal en cultivos de HDF.** Los cultivos clonales de fibroblastos presentan diferentes grados de senescencia. Imágenes tomadas en campo claro con objetivo 20x. **Flechas azules** muestran la acumulación de  $\beta$ -Gal (tinción azul-verdosa) en HDF E2. Barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. **HDF-FPH4:** Fibroblastos dérmicos humanos sin clonar procedentes de la paciente con DOTC.

Para determinar de una manera más sensible la senescencia de los diferentes clones, determinamos los niveles de expresión de ciclinas dependientes de quinasas CDKN1A y CDKN2A mediante RT-qPCR. Con el fin de obtener un grado de senescencia cuantificable realizamos la media aritmética de los niveles de CDKN1A y CDKN2A, normalizando al valor del 100% correspondiente al HDF p23. De esta manera, se aprecia claramente que los clones E2 y E6 son más senescentes que los clones D6 y F5 (**FIGURA R12**).

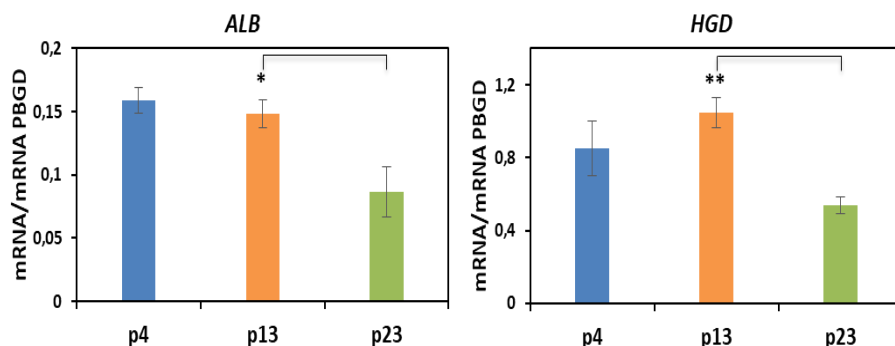


**Figura R12: Media aritmética de la expresión relativa de CDKN1A y CDKN2A en poblaciones de HDF de la paciente con DOTC.** HDF p23 y p4: Fibroblastos comerciales de fase 23 y fase 4 respectivamente. **HDF-FPH4:** Fibroblastos dérmicos humanos sin clonar procedentes de la paciente con DOTC. **HDF E2, D6, E6 y F5:** Diferentes cultivos clonales de fibroblastos de la paciente con DOTC. Medias de 3 réplicas por cada ciclina y desviación estándar. (HDF p23=1).



Estos resultados sugieren que la menor eficiencia en la reprogramación a iHEP de los HDF de los clones E2 y E6 es debida a su mayor grado de senescencia.

Para confirmar esta hipótesis, se reprogramaron HDF comerciales de diferentes pases obtenidos a partir del mismo vial. Para ello se infectaron HDF de p4, p13 y p23, aislamos RNA y analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de *ALB* y *HGD* (**Figura R13**). Los cultivos de pase más bajo se reprogramaron mejor que los cultivos de pase más alto. Se puede apreciar una caída muy abrupta de la expresión de *HGD* desde el p13 al p23, alcanzándose una reducción en la expresión del 85% ( $p < 0,001$ ). En cuanto a la expresión de *ALB*, se reduce un 40% en HDF de p23 ( $p < 0,05$ ),  $n=4$ . Por tanto, podemos afirmar que los cultivos celulares con mayor grado de senescencia se reprograman peor, alcanzando un fenotipo hepático inferior al que adquieren los cultivos reprogramados más jóvenes.



**Figura R13: Expresión de *ALB* y *HGD* en HDF comerciales a diferentes pases.** La expresión de ambos marcadores es superior en HDF de pase inferior a 23. Valores de expresión determinados mediante RT-qPCR y relativos al hígado humano (Hígado humano=1) *HGD*: Homogentisato deshidrogenasa. *ALB*: Albúmina. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ;  $n=4$ .

Las conclusiones de este análisis pueden estar limitadas por la diferente capacidad de infectarse de los fibroblastos con diferente grado de senescencia. Nos preguntamos entonces si los cultivos con mayor grado de senescencia se infectan peor que los cultivos más jóvenes. Para comprobarlo se infectaron HDF de p4, p13, p21 y p23 con un lentivirus que expresa eGFP. El análisis por citometría de estas células evidenció que los cultivos de fibroblastos con mayor número de pases y mayor grado de senescencia se infectan igual que los cultivos con menor número de pases y no senescentes, por tanto, la senescencia no afecta a la capacidad de ser infectadas por los lentivirus (**Tabla R2**).

	eGFP+ (%)
HDF p4	43
HDF p13	43
HDF p21	40
HDF p23	40

**Tabla R2. Porcentaje de HDF a diferentes pases eGFP-positivos tras infección con lentivirus que expresa eGFP**

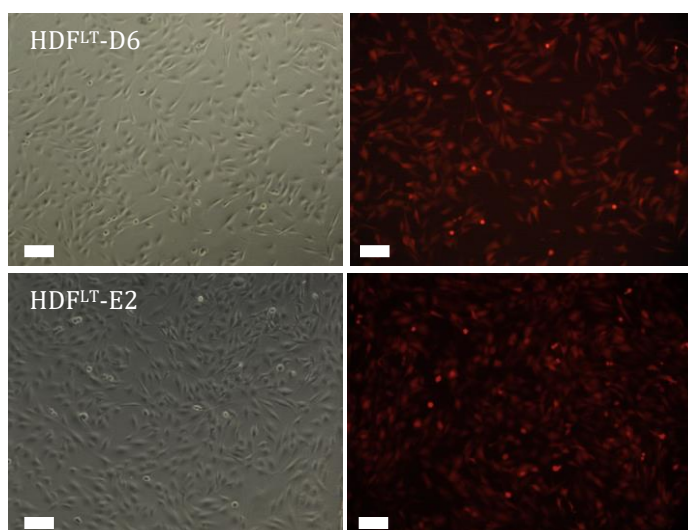
En conclusión, se confirma que la senescencia celular perjudica la reprogramación directa de HDF a iHEP.

#### **R 4 INMORTALIZACIÓN DE CLONES DE HDF DE LA PACIENTE CON DOTC**

Debido a que la senescencia afecta a la proliferación y reprogramación celular, sumado a la necesidad de obtener grandes cantidades de iHEP para los siguientes experimentos in vitro e in vivo, se procedió a immortalizar los clones de HDF de la paciente con DOTC antes de su reprogramación. Los clones E2 y

D6 de HDF fueron immortalizados mediante la expresión del antígeno T del virus SV40 (*simian virus 40*). Para ello utilizamos el vector de expresión lentiviral pRRLsin-SV40, que permite monitorizar la expresión del antígeno T a través de la expresión de la proteína mCherry gracias al cassette policistrónico [antígeno T-IRES(*internal ribosome entry site*)-mCherry].

La expresión del antígeno T en las células immortalizadas indujo un aspecto más epitelial (**Figura R14**, paneles izquierdos).



**Figura R14: Clones E2 y D6 de HDF immortalizados. Izquierda:** imágenes en contraste de fases. **Derecha:** imágenes de fluorescencia. La totalidad de HDF en ambos clones (E2 y D6), han sido infectados e immortalizados con el vector lentiviral pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry, emitiendo fluorescencia roja. Tras la infección inicial, las células se sometieron a 3 pases 1/10 consecutivos. Imágenes tomadas con objetivo 20x. Barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m.

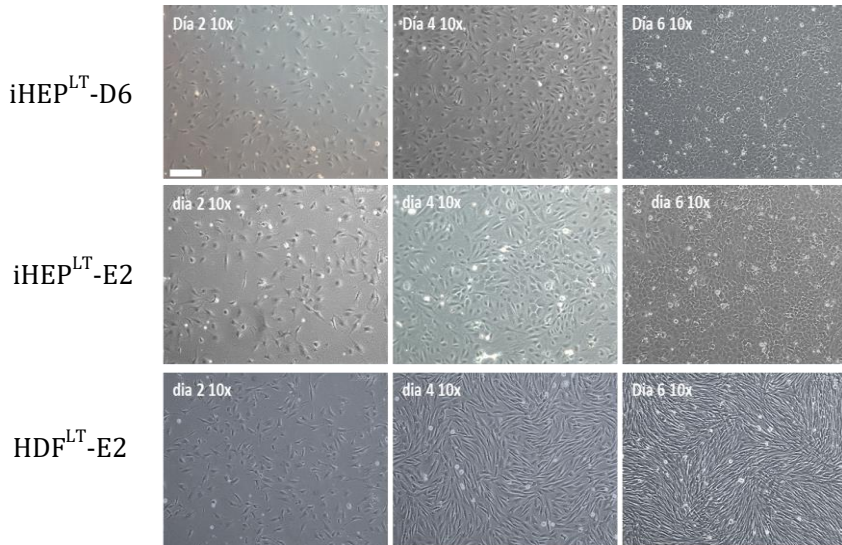
La immortalización de los HDF se monitorizó mediante los cambios morfológicos y la expresión de la proteína mCherry. No se observó al microscopio células senescentes ni una disminución de la proliferación en los sucesivos pases. Así mismo, las células presentaban fluorescencia roja (**Figura R14**, paneles derechos).

En vista del cambio morfológico y la fluorescencia emitida por los clones de HDF infectados con el vector lentiviral pRRLsin-SV40 T antigen-IRES-mCherry, podemos afirmar que han sido inmortalizados

## **R 5 REPROGRAMACION A iHEP DE CLONES HDF<sup>LT</sup> DE LA PACIENTE CON DOTC**

Después de inmortalizar con éxito los clones E2 y D6 de HDF (HDF<sup>LT</sup>-E2 y HDF<sup>LT</sup>-D6) se procedió a reprogramarlos a iHEP. Cabe esperar que después de su reprogramación a iHEP<sup>LT</sup> continúen manteniendo su capacidad proliferativa tal y como se describió<sup>173</sup>. Tras la infección con HNF4A, HNF1A y FOXA3, se estimó la eficiencia de la infección, se evaluó la conversión del fenotipo mediante un análisis de la morfología celular y la expresión de genes hepáticos, y se determinó su funcionalidad y grado de madurez con los mismos ensayos anteriormente realizados en la reprogramación de HDF comerciales.

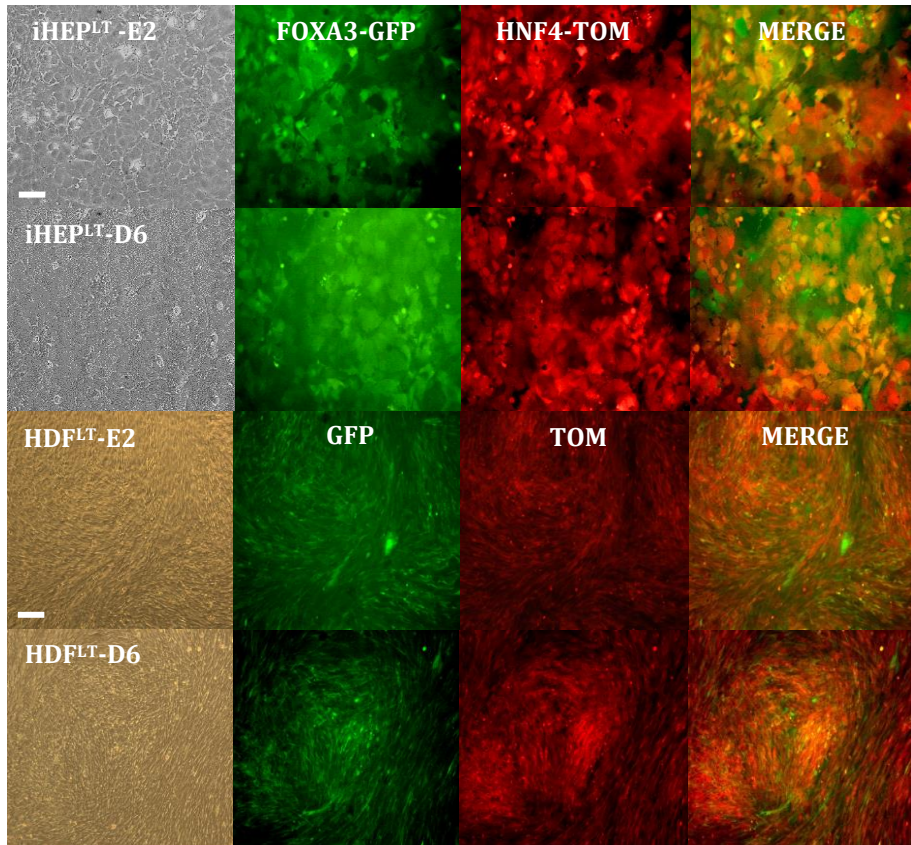
Tal y como sucedía en los clones de HDF sin inmortalizar y HDF comerciales, pasados 6 días desde la reprogramación se aprecia claramente un cambio en la morfología en los dos clones reprogramados al ser comparados con los mismos cultivos infectados con virus vacíos (**Figura R15, iHEP<sup>LT</sup> vs HDF<sup>LT</sup>**). En esta ocasión se observa con mayor claridad el contorno de las células y su disposición en el cultivo, viendo cómo se compactan al alcanzar confluencia sin perder su morfología epitelial.



**Figura R15: Morfología de los clones E2 y D6 de iHEP<sup>LT</sup>.** Filas 1 y 2: Hepatocitos inducidos inmortalizados de los clones D6 y E2 **Fila 3:** Fibroblastos inmortalizados e infectados con virus vacíos. Imágenes de HDF<sup>LT</sup>-E2 en representación de ambos clones. Se aprecian importantes cambios morfológicos entre HDF<sup>LT</sup> e iHEP<sup>LT</sup>. Imágenes tomadas con objetivo 10x. Barra de escala corresponde a 200  $\mu$ m.

Estos cambios morfológicos no se observaron en los 2 clones infectados con virus vacíos (HDF<sup>LT</sup> clones E2 y D6), manteniendo la misma morfología fusiforme y disposición en paralelo después de la infección (**Figura R15**).

Para poner de manifiesto de una manera visual la presencia de los virus y los transgenes en los clones de iHEP, se tomaron imágenes de fluorescencia para HNF4A-TOM y FOXA3-eGFP (**Figura R16**). Gran parte de las iHEP<sup>LT</sup> son positivas para dTomato y eGFP, por lo que aparecen en un tono amarillento/anaranjado, resultado de la mezcla del rojo y verde. En esta imagen también se pone de manifiesto el cambio morfológico y de disposición que presentan los iHEP<sup>LT</sup> de los dos clones respecto a los HDF<sup>LT</sup> infectados con virus vacíos.

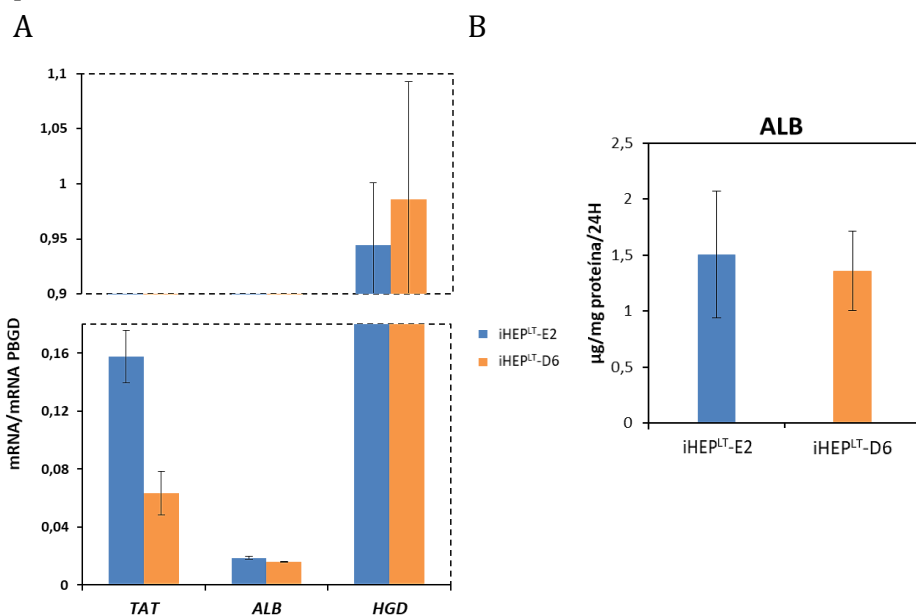


**Figura R16: Microscopía de fluorescencia de clones de HDF<sup>LT</sup> infectados con vectores lentivirales. iHEP<sup>LT</sup>:** Hepatocitos inducidos, clones E2 y D6. Imágenes tomadas con objetivo 20x, barra de escala corresponde a 100  $\mu$ m. **HDF<sup>LT</sup>:** Fibroblastos infectados con virus vacíos 3V, clones E2 y D6. Imágenes tomadas con objetivo 10x, barra de escala corresponde a 200  $\mu$ m. **eGFP:** Proteína fluorescente verde. **TOM:** proteína roja TOMATO.

Cabe destacar que a diferencia de los iHEP generados con los clones E2 y D6 sin immortalizar, los iHEP<sup>LT</sup> continúan proliferando tras su reprogramación. Ambos clones sufrieron varios pases celulares hasta el día 14, poniendo de manifiesto su expansibilidad y con ello el éxito en la immortalización previa con el antígeno T.

iHEP<sup>LT</sup>-D6

Antes de realizar el análisis más exhaustivo de la expresión de genes hepáticos, se hizo un análisis preliminar cuantificando la expresión de *ALB*, *HGD* y *TAT* pasados 14 días desde las infecciones lentivirales (**Figura R17A**). Así mismo, se evaluó la capacidad de secreción de albúmina en el medio de cultivo, tal como se hizo en la reprogramación de HDF comerciales. Las cantidades de albúmina secretadas al medio de cultivo en 24 horas son similares a las obtenidas en iHEP, a las de hepatocitos humanos en cultivo obtenidas previamente en nuestro grupo, así como a las descritas en la bibliografía (**Figura R17B**). En resumen, este análisis preliminar satisfactorio nos permite continuar con la caracterización de los iHEP<sup>LT</sup>.



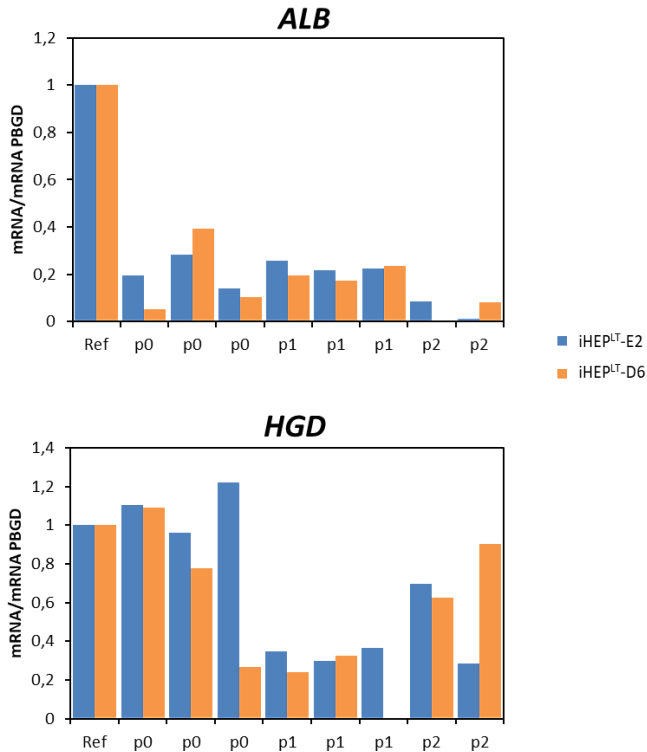
**Figura R17: Caracterización preliminar de los clones de iHEP<sup>LT</sup>.** **A:** Expresión relativa de marcadores hepáticos medidos por RT-qPCR. Hígado humano=1. **B:** Cuantificación de albúmina humana en los sobrenadantes de los cultivos mediante **ELISA**, n=3. **TAT:** Tirosina aminotransferasa. **ALB:** Albúmina. **HGD:** Homogentisato deshidrogenasa. **iHEP<sup>LT</sup>-D6:** Hepatocitos inducidos inmortalizados, clon D6. **iHEP<sup>LT</sup>-E2:** Hepatocitos inducidos inmortalizados, clon E2.

## **R 5.1 LA DENSIDAD CELULAR ES UN FACTOR DETERMINANTE PARA EL MANTENIMIENTO DEL FENOTIPO HEPÁTICO.**

A continuación llevamos a cabo un estudio para determinar la estabilidad del fenotipo durante los pases celulares y la congelación/descongelación de los iHEP<sup>LT</sup>. Como ya mencionamos, el número de células necesario para los posteriores experimentos in vivo es muy elevado, por lo que la expansión y congelación de stocks celulares son dos procesos necesarios.

Durante el proceso de expansión de los clones de iHEP<sup>LT</sup>, se conservó RNA total de células a diferentes pases. Se caracterizó de nuevo, mediante RT-qPCR, la expresión de *ALB* y *HGD* (**Figura R18**). La variabilidad intra e inter pases es demasiado elevada para identificar algún patrón, impidiéndonos obtener una conclusión aceptable sobre el mantenimiento del fenotipo durante la expansión celular. Además, todas las muestras analizadas presentaron niveles de expresión inferiores a los obtenidos en iHEP<sup>LT</sup> sin congelar ni expandir. Los niveles de expresión de *ALB* fueron un 25% del obtenido inicialmente, mientras que los niveles de expresión de *HGD* disminuyeron en todos los casos más de un 60% en el primer pase. Por tanto, con estos resultados inconcluyentes no podemos afirmar si hay un mantenimiento o pérdida del genotipo en nuestros clones de iHEP<sup>LT</sup>.

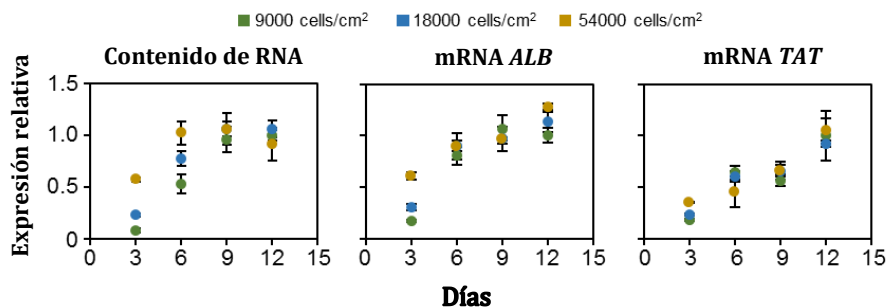




**Figura R18: Expresión de marcadores hepáticos en clones de iHEP<sup>LT</sup> a diferentes pases.** *ALB*: Albúmina. *HGD*: Homogentisato deshidrogenasa. Expresión relativa analizada por RT-qPCR. Hígado humano=1 **Ref**: Valor obtenido 14 días después de la infección sin pases. **p0**, **p1** y **p2**: muestras procedentes de una placa de diferentes pases celulares.

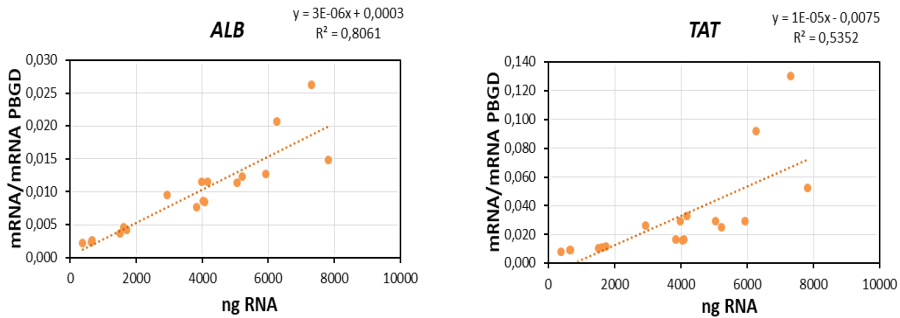
La variabilidad obtenida en la expresión de *ALB* y *HGD* sugiere que estamos ignorando algún factor esencial en la eficiencia de la reprogramación. Uno de estos factores es la densidad celular o confluencia. Para determinar si la densidad celular es un factor clave para la reprogramación a iHEP, se diseñó el siguiente experimento. Se sembraron iHEP de ambos clones a diferentes densidades. Posteriormente se aisló RNA a 3, 6, 9 y 12 días y se

cuantificó la expresión de *ALB* y *TAT*, dos marcadores típicos del hepatocito embrionario y maduro respectivamente (**Figura R19**). El nivel de confluencia/densidad celular se puede estimar a partir del contenido de RNA. De esta manera, la confluencia se obtendría a los 6 días para el cultivo sembrado a una densidad de 54.000 células/cm<sup>2</sup> y a los 9 días para las otras dos densidades de siembra. La expresión de *ALB* y *TAT* son claramente inferiores a 3 días, cuando a ninguna densidad se ha alcanzado la confluencia. Una vez alcanzada la confluencia, se estabilizan los niveles de expresión, aunque parece haber una mejoría en la expresión de *TAT* a medida que transcurre unos días tras alcanzar la confluencia.



**Figura R19: Contenido total de RNA y expresión relativa de ALB y TAT en iHEP<sup>LT</sup>-D6 a días 3, 6, 9 y 12 a diferentes densidades de siembra (día 0). *ALB*: Albúmina. *TAT*: Tirosina aminotransferasa. Hígado humano=1.**

Para tener una mayor evidencia de la importancia de la densidad celular se correlacionaron los niveles de expresión de *ALB* y *TAT* con el contenido de RNA total. Como podemos observar, existe una correlación positiva entre la cantidad de RNA (como estimación surrogada de la densidad celular) y los niveles de expresión (**Figura R20**).



**Figura R20: Correlación entre la cantidad de RNA y los niveles de expresión de ALB y TAT en iHEP<sup>LT</sup>. Datos extraídos de la Figura R19.**

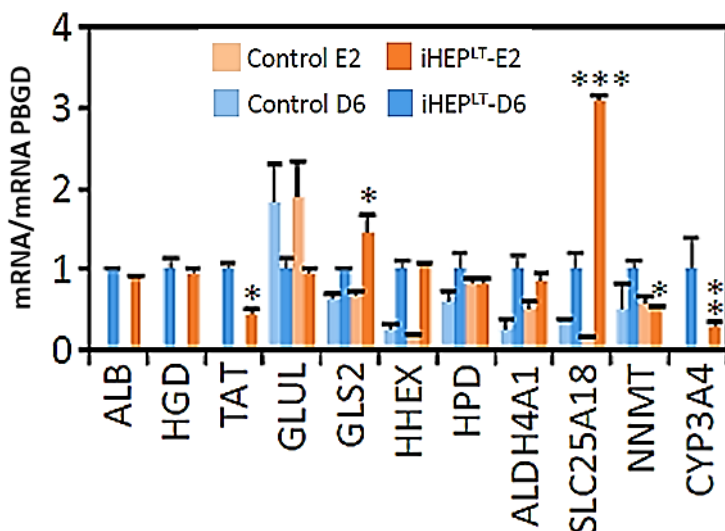
Se obtuvieron resultados similares al analizar los niveles de expresión de los iHEP<sup>LT</sup> del clon E2. Ambos clones de iHEP<sup>LT</sup>, por tanto, recuperan la expresión de marcadores hepáticos inicial, siendo la densidad celular (confluencia) un factor determinante para el mantenimiento del fenotipo hepático. Para la realización de los experimentos siguientes se decidió que la densidad de siembra fuera de 54.000 células/cm<sup>2</sup>, siendo necesario un cultivo de 6 días en HMM antes de su caracterización o su uso en experimentación in vivo.

En este experimento también se comprobó de manera indirecta que los clones de iHEP<sup>LT</sup> no sufren pérdida de fenotipo tras varios ciclos de congelación. Además, en un análisis posterior de la expresión de marcadores hepáticos realizada durante una estancia en el laboratorio del Dr. Torsten Wuestefeld del Genome Institute of Singapore, revalidaron este resultado.

## R 5.2 LOS IHEP<sup>LT</sup> DE LOS CLONES E2 Y D6 EXPRESAN GENES HEPÁTICOS Y REALIZAN FUNCIONES PROPIAS DE HEPATOCITOS HUMANOS.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de siembra de los clones de iHEP<sup>LT</sup>, se completó el análisis de la expresión génica. Se cuantificó la expresión de una selección de genes metabólicamente relevantes en base a su expresión en hepatocitos embrionarios, hepatocitos inmaduros o adultos<sup>191</sup>. De este modo, al caracterizarlos podemos determinar el grado de madurez de nuestros iHEP.

Se aprecia claramente la expresión *de novo* de *ALB*, *HGD*, *TAT* y *CYP3A4*, marcadores específicos del hepatocito (**Figura R21**).



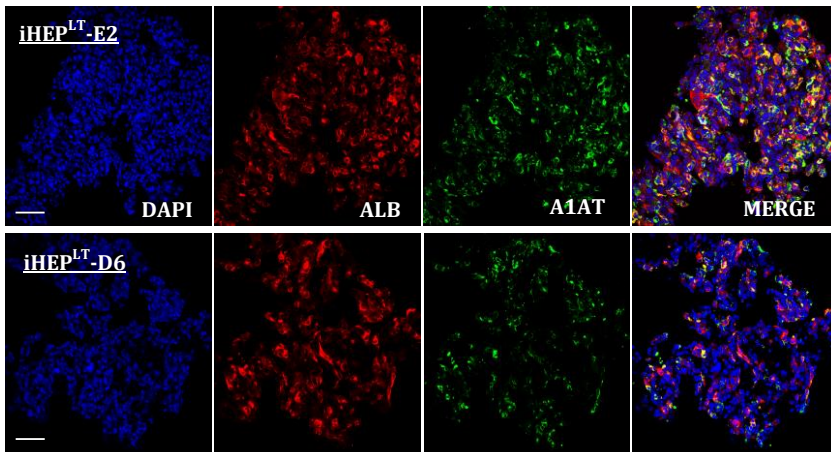
**Figura R21: Expresión relativa de genes hepáticos medidos en iHEP<sup>LT</sup> por RT-qPCR.** Expresión relativa a iHEP<sup>LT</sup>-D6. Controles E2 y D6 corresponden a HDF infectados con virus vacíos cultivados en paralelo. **ALB:** Albúmina; **HGD:** Homogentisato deshidrogenasa; **TAT:** Tirosina aminotransferasa; **GLUL:** Glutamina sintetasa; **GLS2:** Glutaminasa 2; **HHEX:** proteína homeobox

hematopoyética; **HPD**: Hidroxifenilpiruvato deshidrogenasa; **ALDH4A1**: Aldehído deshidrogenasa 4A1; **SLC25A18**: Proteína transportadora 25A18; **NNMT**: Nicotinamida N-metil transferasa; **CYP3A4**: Citocromo P450-3A4. \*, **p <0,05**; \*\*, **p <0,01**; \*\*\*, **p <0,005**. **Comparación de clones de iHEP<sup>LT</sup>**.

Se observa una inducción significativa respecto de los HDF control de *HHEX*, *GLS2*, *ALDH4A1* y *SLC25A18*, genes implicados en el metabolismo del glutamato/glutamina y su conexión con el metabolismo del nitrógeno tan importante en el hígado. De hecho, el enzima GLUL, responsable de la síntesis de glutamina a partir de glutamato y amonio se reprime, en consonancia con la función excretora de amonio en forma de urea propia del hepatocito. Al comparar los niveles de expresión entre ambos clones de iHEP<sup>LT</sup>, vemos como la expresión de *GLS2* y *SLC25A18* son significativamente más elevadas en iHEP<sup>LT</sup>-E2 (p<0,05 y p<0,005 respectivamente). Sin embargo, sucede lo contrario con *CYP3A4* siendo mayor su expresión en iHEP<sup>LT</sup>-D6 (p<0,01).

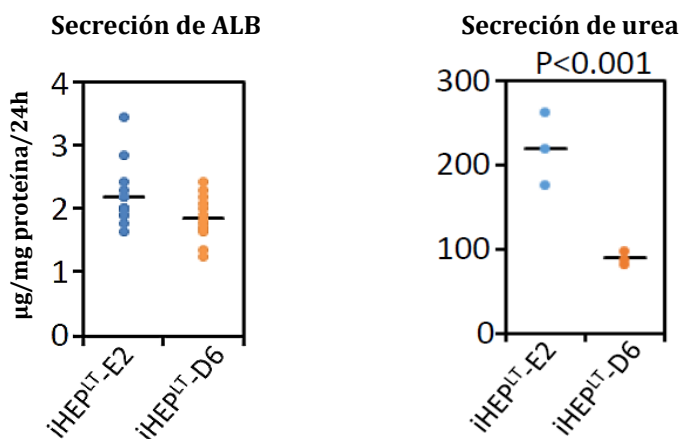
En resumen, basándonos en el perfil obtenido, definimos a los clones de iHEP<sup>LT</sup> como hepatocitos inmaduros. Respecto a la comparación entre los iHEP<sup>LT</sup>-E2 y D6, se aprecian diferencias significativas en algunos marcadores, sin llegar a revestir cambios respecto a la funcionalidad de ambos clones y que pueden ser considerados idiosincráticos.

De hecho, ambos clones expresan niveles similares de albúmina y alfa1-antitripsina (**Figura R22**) y secretan cantidades equivalentes, y similares a las de hepatocitos humanos en cultivo, de albúmina al medio de cultivo (**Figura R23 A, PHH en figura 8**).



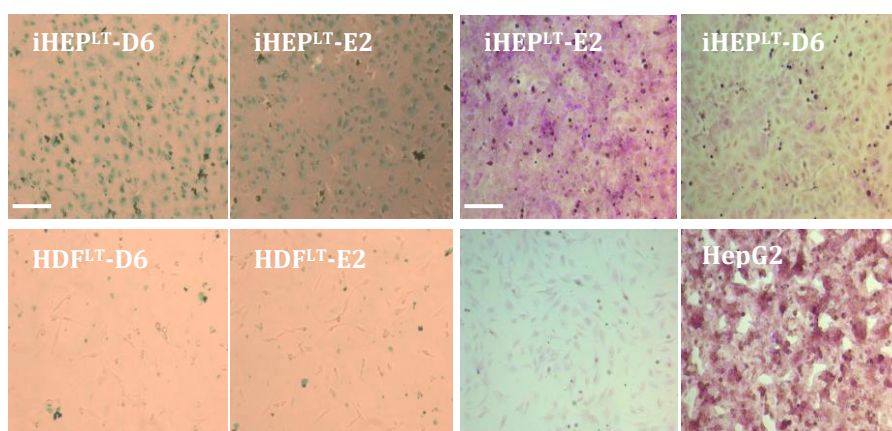
**Figura R22: Imágenes representativas de microscopia de fluorescencia de iHEP<sup>LT</sup>.** Co-inmunofluorescencia contra Albúmina y Alfa 1 antitripsina en los clones de iHEP<sup>LT</sup>. **ALB:** Albúmina humana. **A1AT:** Alfa 1 antitripsina. **Derecha:** aumento de la imagen. Imágenes tomadas con objetivo de 40X. Barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m. Ver tabla de anticuerpos.

Finalmente, se evaluó la capacidad de producir urea a partir de amonio, incubando las células con una solución 10  $\mu$ M de cloruro de amonio. Como se observa (**Figura R23 B**), ambos clones producen urea, aunque el clon de iHEP<sup>LT</sup>-E2, secreta al medio cantidades significativamente mayores que el clon D6 ( $p < 0,001$ ), sugiriendo que el clon iHEP<sup>LT</sup>-E2 expresa la forma silvestre del enzima OTC.



**Figura R23: Análisis de la secreción in vitro de clones de iHEP<sup>LT</sup>.** A: Secreción de albúmina humana; n= 8. B: Producción de urea. n= 3. El clon E2 secreta concentraciones de urea significativamente mayores que el clon D6; p<0,001.

En relación a la capacidad transportadora, los dos clones transportan a su interior el colorante verde indocianina, adquiriendo el tono verdoso característico (**Figura R24 izquierda**). Este transporte por el contrario, no sucedió en los cultivos control de HDF<sup>LT</sup> infectados con virus vacíos.



**Figura R24: Capacidad de transporte de verde de indocianina (ICG) y almacenamiento de glucógeno de iHEP<sup>LT</sup>.** **Izquierda:** transporte ICG desde el medio de cultivo. **Derecha:** tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Imágenes tomadas con objetivo de 10X. Barras de error = 200  $\mu$ m. iHEP<sup>LT</sup> infectados con virus con los 3 FT. HDF<sup>LT</sup>: HDF inmortalizados e infectados con virus vacíos (sin los FT). **HepG2:** control positivo, línea celular de hepatoma.

También fueron capaces de acumular cantidades significativas de glucógeno (**Figura R24 derecha**), función propia del hígado (tono violáceo en sus citoplasmas). El clon iHEP<sup>LT</sup>-E2 parece tener mayor capacidad de almacenamiento comparado con el clon iHEP<sup>LT</sup>-D6.

Aunque existen diferencias entre los dos clones de iHEP<sup>LT</sup> analizados, ambos presentan funciones de almacenamiento y transporte.

Por tanto, a la vista de estos resultados, se puede concluir que los clones E2 y D6 de iHEP<sup>LT</sup> generados en el laboratorio expresan marcadores hepáticos, sintetizan proteínas propias de hepatocitos, y cumplen algunas funciones hepáticas, habiendo adquirido capacidad secretora, de transporte y de almacenamiento.

### **R 5.3 LA INMORTALIZACIÓN Y REPROGRAMACIÓN DIRECTA NO MODIFICAN EL ESTADO DE INACTIVACIÓN DE LOS CROMOSOMAS X.**

Durante el proceso de generación de iHEP<sup>LT</sup>, los clones de HDF de partida de la paciente con DOTC han sido sometidos a varios procesos de infección con lentivirus (inmortalización y reprogramación). Nos preguntamos si este hecho puede haber modificado el estado de inactivación del cromosoma X. Por ello se evaluó su silenciamiento analizando de nuevo su estado de metilación (Test Humara). Los clones de iHEP<sup>LT</sup>-E2 y D6 presentan



el mismo estado de inactivación del cromosoma X que los HDF originales (Tabla R3).

MUESTRA	Alelo1	% Metilación	Alelo2	% Metilación
iHEP <sup>LT</sup> -D6	25	0	28	100
HDF <sup>LT</sup> -D6	25	0	28	100
HDF-D6	25	0	28	100
iHEP <sup>LT</sup> -E2	25	100	28	0
HDF <sup>LT</sup> -E2	25	100	28	0
HDF-E2	25	100	28	0

**Tabla R3: Estado de inactivación del cromosoma X en clones de HDF posteriormente a su immortalización y reprogramación a iHEP.** Ambos clones de iHEP mantienen inalterado el estado de inactivación de sus cromosomas X, independientemente de si se han immortalizado, reprogramado o han sufrido ambos procesos de forma consecutiva. **iHEP<sup>LT</sup>**: hepatocitos inducidos immortalizados, clones E2 y D6. **HDF<sup>LT</sup>**: Fibroblastos immortalizados de la paciente con DOTC, clones E2 y D6. **HDF**: Fibroblastos de la paciente con DOTC, clones E2 y D6.

Podemos afirmar, por tanto, que la immortalización con el antígeno T y la reprogramación directa con HNF1, HNF4 y FOXA3 no alteran el estado inicial de inactivación del cromosoma X inicial.

## **R 6 EXPRESIÓN DE LOS ALELOS SILVESTRE Y MUTANTE DEL GEN OTC EN LOS CLONES DE iHEP<sup>LT</sup> REPROGRAMADOS.**

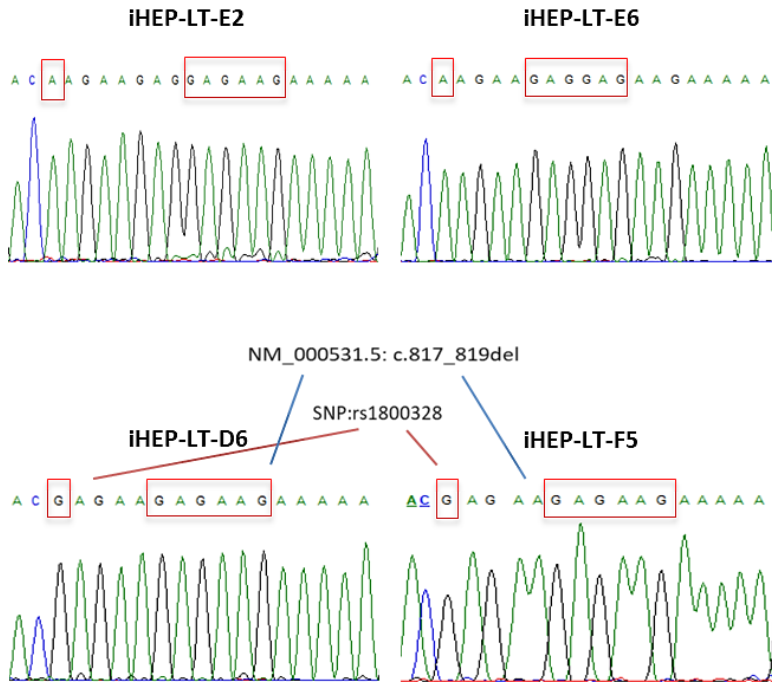
El objetivo fundamental del proyecto se basa en obtener clones de iHEP expandibles, que expresen el alelo silvestre del gen de la OTC, o bien el alelo mutante. Una vez hemos conseguimos clonar, immortalizar y reprogramar los fibroblastos a iHEP, se comprobó qué alelo de la OTC se está expresando en nuestros clones. En primer lugar, secuenciamos el gDNA de la madre y de la paciente



Al carecer de muestra del padre, no es posible confirmar la mutación *de novo*, aunque dada la gravedad de la enfermedad en pacientes masculinos, parece altamente improbable que se trate de herencia paterna. Del mismo modo, sin la muestra paterna no podemos asegurar que la transmisión del SNP: rs1800328 sea por vía materna, aunque dada la frecuencia en la población española, parece lo más probable.

Existen informes previos de esta mutación por SNP<sup>192</sup> así como de la delección, descrita en dos ocasiones en dos pacientes sin parentesco<sup>193,194</sup>.

Para confirmar la presencia de la delección GAG en la posición 817-819 en heterocigosis, se procedió a secuenciar el mRNA de *OTC* en los clones reprogramados. Se amplificó la región mutada utilizando primers específicos en el exón 8 del mRNA, se purificó y se secuenció (ver tabla de primers en M5). Como se puede apreciar en los cromatogramas obtenidos, en los iHEP<sup>LT</sup>-E2 e iHEP<sup>LT</sup>-E6 se ven dos tripletes GAG consecutivos y no se ve presencia del SNP (**Figura R26, arriba**. Marca rojas). Sin embargo, en el cromatograma correspondiente al clon D6 se aprecia el SNP, seguido de la pérdida de uno de los dos tripletes GAG consecutivos, mostrándose con ello la expresión del alelo mutante (NM\_000531.5: c.817\_819del) (**Figura R26, abajo**. Marcas rojas). En resumen, los iHEP<sup>LT</sup> del clon E2 expresan el alelo silvestre de la *OTC* y no contienen el polimorfismo, mientras que el clon D6 presenta la delección GAG en la posición 817-819 así como el polimorfismo detectado previamente.



**Figura R26: Secuencias de *OTC* en los clones E2, E6, D6 y F5 de iHEP<sup>LT</sup>. Cromatogramas. Arriba:** Secuencia de la *OTC* silvestre. iHEP<sup>LT</sup>-E2 = iHEP<sup>LT</sup>-E6 **Abajo:** Secuencias de la *OTC* mutante con delección de un triplete -GAG- (NM\_000531.5: c.817\_819del), y presencia del SNP (rs1800328). iHEP<sup>LT</sup>-D6= iHEP<sup>LT</sup>-F5.

Están presentes los dos tripletes consecutivos GAG en la secuencia amplificada (marcado con recuadro rojo), correspondiente a la secuencia silvestre (**Figura R26**).

Durante los experimentos de reprogramación, también se reprogramaron los clones de HDF no inmortalizados E6 y F5. Estos HDF presentan estados de inactivación del cromosoma X idénticos a los clones inmortalizados E2 y D6 respectivamente (E2=E6 y D6=F5). Tras reprogramarlos y caracterizarlos por RT-qPCR se recuperaron los productos amplificados de *OTC* y se secuenciaron. El clon de iHEP-E6 presentó una secuencia idéntica a la del clon iHEP<sup>LT</sup>-E2, i.e. expresa el alelo silvestre y no se detecta

el SNP. En caso del clon de iHEP-F5, los resultados fueron idénticos a los obtenidos del clon de iHEP<sup>LT</sup>-D6. Aparece el polimorfismo 8 nucleótidos aguas arriba de la delección del triplete GAG.

Teniendo en cuenta que los clones E2 y E6 expresan el alelo silvestre de OTC y han silenciado el cromosoma X paterno, podemos concluir que la mutación de novo se ha producido en el cromosoma del padre, lo que es habitual en mutaciones de novo en OTC.

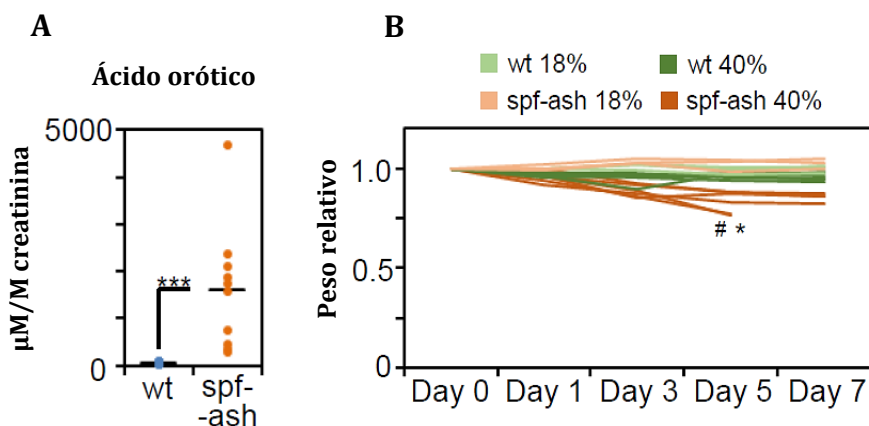
## **R 7 VALIDACIÓN EN MODELOS ANIMALES MURINOS**

Una vez logrado con éxito la generación de clones de iHEP<sup>LT</sup> de la misma paciente pero que expresan la forma silvestre o mutante de OTC, se generaron stocks celulares para su uso posterior en experimentos in vivo.

El modelo animal utilizado para los trasplantes celulares fue el ratón B6EiC3Sn a/A-Otc<sup>spf-ash</sup> (OTC<sup>spf-ash</sup>; ver M4.1.1). Dicho ratón presenta una mutación en el exón 8 del gen de la OTC, obteniéndose como resultado una actividad enzimática del 5% del hígado sano<sup>195</sup>. Dicha actividad residual es suficiente para que los ratones no presenten ningún síntoma de hiperamonemia cuando se mantienen con una dieta estándar (16-18% proteína) o hipoproteica (10% proteína). Sin embargo, desarrollan aciduria orótica, esto es, se secretan grandes cantidades de ácido orótico en la orina (**Figura R27 A**). De hecho, el ácido orótico en orina es un utilizado como un marcador de la DOTC en humanos y ratones<sup>196,197</sup>.

Para validar el uso de este modelo animal en nuestros experimentos, comprobamos si los ratones secretan ácido orótico

en la orina, así como si este marcador resulta ser fiable e informativo, esto es, nos permitiría detectar el rescate del modelo animal por parte de nuestros clones de iHEP<sup>LT</sup>. De manera paralela también se comprobó si el modelo animal sufre síntomas similares a los descritos en humanos. Se analizó la concentración de ácido orótico presente en la orina de ratones OTC<sup>spf-ash</sup> y sanos (wt: B6EiC3SnF1) mantenidos con una dieta normal (18% de proteínas). Los análisis muestran que los ratones sanos producen concentraciones muy bajas de ácido orótico (33,8-100,1 mM / M creatinina), mientras que los ratones OTC<sup>spf-ash</sup> secretaron cantidades mucho más elevadas (277,8-4684,2 mM / M de creatinina) (**Figura R27A**). A pesar de la variabilidad obtenida en la concentración de ácido orótico de los distintos animales analizados, las diferencias entre ratones sanos y mutantes son estadísticamente muy significativas ( $p < 0,005$ ;  $n = 9$ ), validándose por tanto el ácido orótico como marcador a medir en los animales tratados.



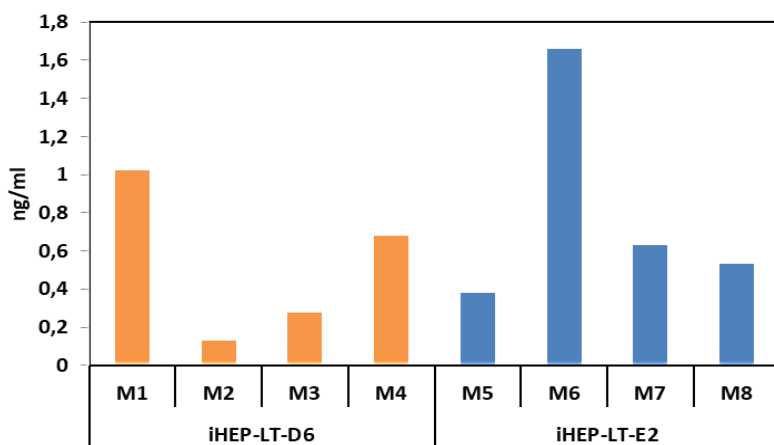
**Figura R27: Producción de ácido orótico y peso de ratones OTC<sup>spf-ash</sup> y sanos mantenidos con diferentes dietas. (A)** Secreción de ácido orótico en orina con una dieta normal (18% de proteína). \*\*\*,  $p < 0,005$ ;  $n=9$ . **Wt** (sanos): ratones B6EiC3SnF1 / J. Valor mínimo-máximo 33,8-100,1 mM / M. **Spf-ash**: ratones OTC<sup>spf-ash</sup>. Valor mínimo-máximo: 277,8-4684,2 mM / M de creatinina. **(B)** Peso de ratones relativos al día 0 mantenidos con diferentes dietas (18% y

40% en proteínas). # Dos ratones fueron sacrificados el día 5 debido al drástico descenso del peso y los permanentes signos de letargo. \*,  $p < 0.05$  (día0 vs día5 en ratones spf-ash),  $n = 6$ .

Por otro lado, debido a la limitada actividad de la OTC mutada, los ratones OTC<sup>spf-ash</sup> sufren alteraciones severas cuando se mantienen con una dieta hiperprotéica (40% de proteínas). No se observaron diferencias en el peso de los ratones sanos y los OTC<sup>spf-ash</sup> mantenidos con una dieta estándar (**Figura R27B**). Sin embargo, el grupo de ratones alimentados con la dieta hiperprotéica descendieron significativamente de peso (**Figura R27B**, spf-ash 40%; \*,  $p < 0.05$ ,  $n=6$ ). . En concreto el grupo de ratones OTC<sup>spf-ash</sup> perdieron hasta un 20% del peso en el inicio del experimento. De hecho, dos de los ratones tuvieron que ser sacrificados antes de finalizar el experimento (**Figura R27B**. # día 5) debido a síntomas de letargo y a la rápida pérdida de peso

Tras validar el modelo animal se realizaron las intervenciones. Los clones iHEP<sup>LT</sup>-E2 e iHEP<sup>LT</sup>-D6 se trasplantaron tal como se describe en M 4.3.1. Para hacer un seguimiento y ver si los clones de iHEP<sup>LT</sup> habían colonizado el hígado, en el punto intermedio del experimento se analizó la concentración de ALB presente en la sangre de los ratones.

Las concentraciones de albúmina humana, independientemente del clon utilizado, fueron inferiores a 2 ng/ml. La concentración más alta en los ratones intervenidos con el clon E2 fue de 1,5 ng/ml, mientras que la obtenida en los animales intervenidos con el clon D6 fue de 0,6 ng/ml (**Figura R 28**). En el punto final del experimento (día 30) no hubo aumento en las concentraciones analizadas (datos no mostrados). Estos resultados indican que la colonización de iHEP<sup>LT</sup> es muy baja.



**Figura R 28: Secreción de albúmina humana en sangre de ratones  $OTC^{spf-ash}$  intervenidos con iHEP<sup>LT</sup>, medida mediante ELISA.** Ratones bajo inducción de daño hepático con 300 mg/kg de APAP.

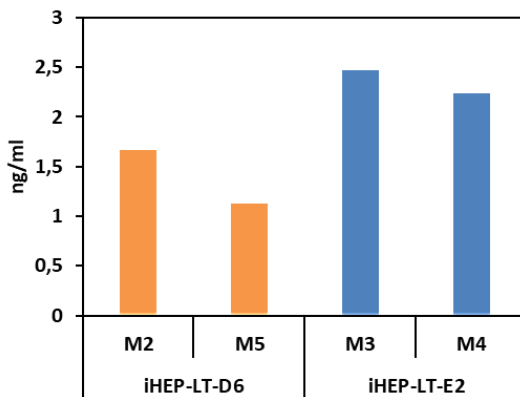
La baja concentración de albúmina humana en el suero de los ratones es un reflejo del bajo grado de colonización de las iHEP<sup>LT</sup> en el hígado de los ratones  $OTC^{spf-ash}$ . En consonancia con estos análisis, no detectamos células ALB-positivas y/o eGFP-positivas en el hígado mediante inmunohistoquímica.

Otro inconveniente presentado por el modelo animal utilizado es que son inmunocompetentes, esto es, su sistema inmune está activo. Aunque los ratones intervenidos han sido sometidos a un tratamiento de inmunosupresión antes de, y durante todo el experimento, es posible que la respuesta inmune residual tras los tratamientos sea suficiente para que los iHEP<sup>LT</sup> no logren una colonización eficaz. Para tratar de solucionar este problema, hicimos uso del modelo NOD/SCID (ver M 4.1.2).

Pasados 14 días desde de las intervenciones, analizamos de nuevo la concentración de albúmina humana secretada en el suero en este modelo animal. Aunque se detecta un leve aumento en la concentración de albúmina humana sérica, respecto a las



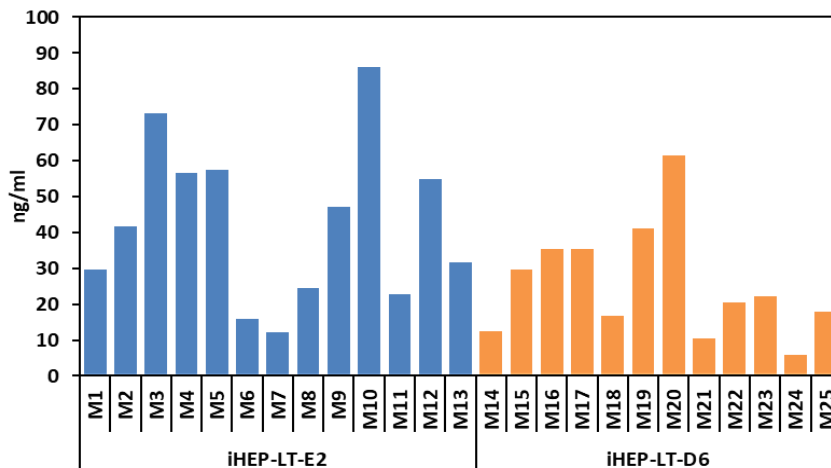
obtenidas con el modelo OTC<sup>spf-ash</sup>, sigue siendo insuficiente para nuestros objetivos (**Figura R29**).



**Figura R29: Secreción de albúmina humana** en sangre de ratones NOD/SCID intervenidos con iHEP<sup>LT</sup> medida mediante ELISA. Inducción de daño hepático con 300 mg/kg de APAP.

Es conocida la enorme dificultad en la colonización hepática de iHEP en modelos murinos con un hígado completamente sano. Por ello, los modelos comúnmente usados se basan en sistemas que favorecen de alguna manera a los iHEP introducidos respecto a los hepatocitos residentes. El modelo de referencia es el ratón deficiente en fumarilacetoacetato (Fah<sup>-/-</sup>) y su homólogo inmunosuprimido FRG<sup>®</sup> (Fah<sup>-/-</sup>, Rag2<sup>-/-</sup> and Il2rg<sup>-/-</sup>)<sup>198</sup>. Este modelo animal presenta una deficiencia en el encima Fah. Para la supervivencia de los animales, estos deben ser tratados con Nitisinona (NTBC) durante el mantenimiento de la colonia. Si retiramos el tratamiento rápidamente se produce daño hepático, generándose espacios en el parénquima, y por lo tanto, favoreciendo la colonización de los iHEP<sup>LT</sup>. Los experimentos con este modelo de ratón se realizaron durante una estancia en el laboratorio del Dr. Torsten Wuestefeld, en el Genome Institute en Singapur (ver M 4.1.3).

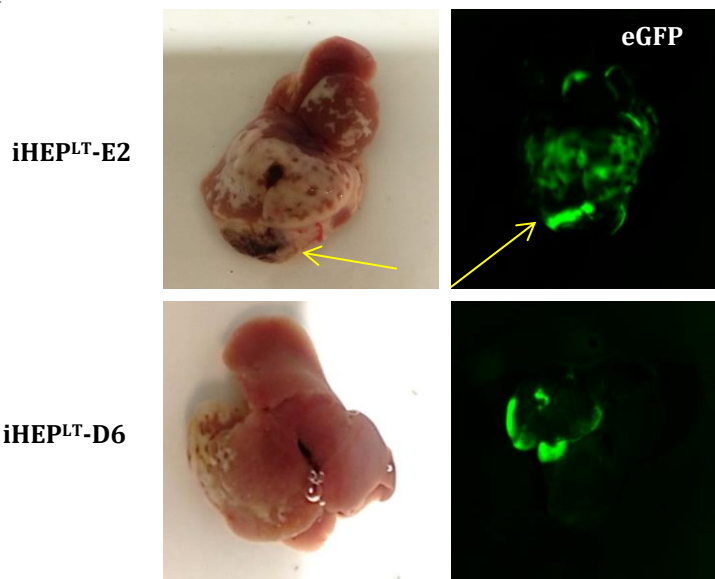
Se trasplantaron un total de 4 millones de iHEP<sup>LT</sup> a cada ratón, tal como se describe en M 4.3.2. Pasados 7 días desde las intervenciones, analizamos de nuevo la concentración de albúmina humana en la sangre de los ratones intervenidos. En esta ocasión las concentraciones obtenidas fueron notablemente superiores a las obtenidas en los modelos animales utilizados con anterioridad. Los ratones intervenidos con el clon E2 presentaron concentraciones séricas de albúmina humana entre 12 y 86 ng/ml (n=8; media de 36,8 ng/ml), mientras que los intervenidos con el clon D6 presentaron concentraciones que oscilan entre 5 y 61 ng/ml (n=8; 24,43 ng/ml) **(Figura R30)**. Estas concentraciones son entre 2 y 70 veces las obtenidas en el modelo NOD/SCID. Así pues, procedimos a la localización de las células trasplantadas en el hígado mediante inmunohistoquímica.



**Figura R30: Secreción de albúmina humana en ratones FRG<sup>®</sup> intervenidos con iHEP<sup>LT</sup> medida mediante ELISA, n=12-13.**

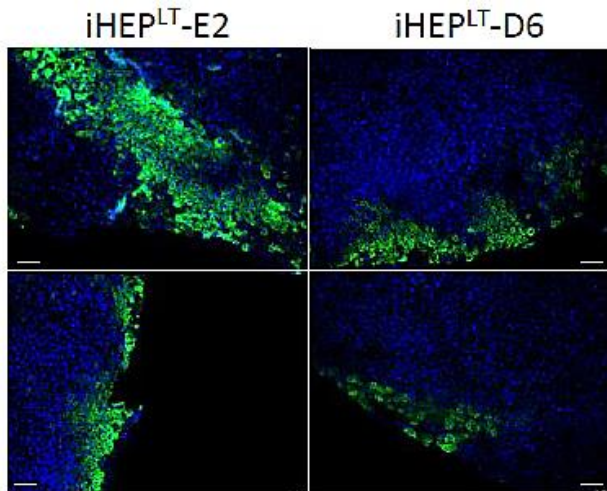
Para ello, tras el punto final del experimento y el sacrificio de los animales se procesó el hígado para los siguientes análisis (ver M

4.2.2.3). Antes de dividir en porciones el hígado de los ratones trasplantados, se tomaron imágenes en fresco. En varios de los ratones trasplantados se aprecia una mancha blanquecina, próxima a la zona de la intervención y dispersándose a lo largo del tejido de forma heterogénea (**Figura R 31, izquierda**). Estas manchas corresponden a células eGFP-positivas, confirmando la identidad de iHEP<sup>LT</sup> trasplantadas (**Figura R31, flechas**). Como podemos ver, las zonas fluorescentes más intensas se localizan flanqueando el punto de infusión de los iHEP<sup>LT</sup>. No obstante, también se ven parches fluorescentes en lóbulos diferentes al trasplantado, en zonas lejanas al punto de infusión, constatando que ha habido dispersión celular a lo largo del parénquima hepático.



**Figura R31: Presencia y distribución de los clones de iHEP<sup>LT</sup> en los hígados de ratones FRG<sup>®</sup> trasplantados. Izquierda:** Manchas blanquecinas distribuidas por el parénquima hepático correspondientes a iHEP<sup>LT</sup>. **Derecha:** Imágenes de fluorescencia. Las manchas blanquecinas emiten fluorescencia eGFP. **Flechas amarillas:** Puntos de infusión de clones de iHEP<sup>LT</sup> en el lóbulo mayor del hígado de los ratones. Zona oscura corresponde a la cauterización posterior a la infusión.

Posteriormente se obtuvieron varias porciones de hígado conteniendo parte de la mancha blanquecina, con el objetivo de localizar los clones de iHEP<sup>LT</sup> mediante inmunohistoquímica. Los ratones FRG<sup>®</sup> se caracterizan por carecer de la enzima Fah. Por tanto, las células que expresen el enzima corresponden a los iHEP<sup>LT</sup> trasplantados. Los hígados analizados presentaron parches más o menos extensos de células Fah-positivos (**Figura R32**). Como se puede observar, los clones de iHEP<sup>LT</sup> se disponen en el hígado en grupos fluorescentes, mayoritariamente en la zona más superficial del parénquima hepático.



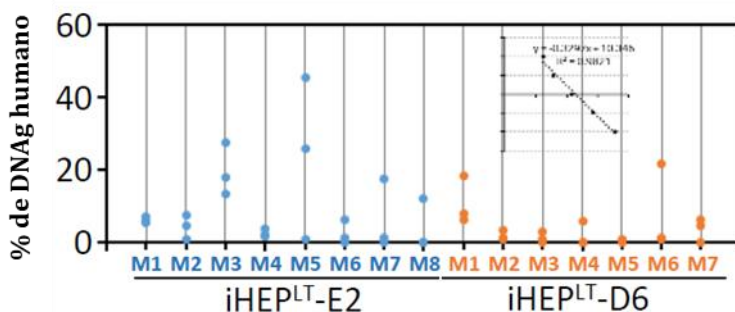
**Figura R32: Imágenes de microscopia de fluorescencia representativas de hígados tras inmunohistoquímica frente fumarilacetoacetato hidrolasa.** Secciones de 7 $\mu$ m de hígado procedente de un ratón FRG<sup>®</sup> trasplantado con los clones E2 (**izquierda**) y D6 (**derecha**) de iHEP<sup>LT</sup>. Anticuerpo secundario Alexa-488 (verde). Objetivo 20X, barra de escala corresponde a 50  $\mu$ m.

Después de localizar los clones de iHEP<sup>LT</sup> en el hígado de varios ratones trasplantados, quisimos cuantificar el grado de colonización de las células trasplantadas. Para tal fin se evaluó el contenido de gDNA humano en los hígados de los ratones

trasplantados. Se aisló gDNA de 3 piezas de hígado de cada ratón, cercanas a los dominios fluorescentes (ver M 2.2.1). De este modo comprobamos mediante otras técnicas que las células fluorescentes corresponden a nuestros iHEP<sup>LT</sup>.

Para cuantificar el gDNA humano en el hígado de los ratones trasplantados, preparamos una curva de calibración que contiene una mezcla de gDNA humano y de ratón con ratios entre 1:10000 a 100:0. Se amplificaron regiones genómicas específicas de los genes PBGD y OTC humanos mediante qPCR (ver M 3.2.2 y tabla de primers M 5).

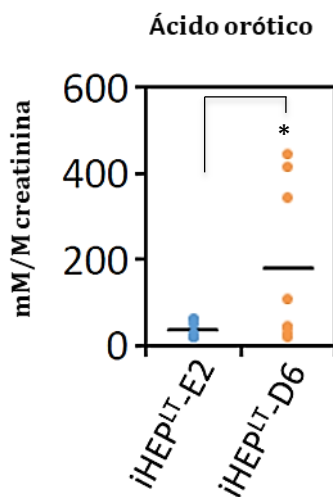
Tras el análisis observamos una gran variabilidad en el contenido de gDNA humano para cada hígado de ratón (**Figura R33**).



**Figura R33: Proporción de gDNA humano presente en las porciones de hígado de ratones FRG<sup>®</sup>. Puntos azules:** piezas de hígado de ratones operados con el clon iHEP<sup>LT</sup>-E2. **Puntos naranjas:** piezas de hígado de ratones operados con el clon iHEP<sup>LT</sup>-D6. Análisis de 3 piezas por cada ratón.

Como consecuencia, también detectamos mucha variabilidad dentro de cada grupo de ratones trasplantados con iHEP<sup>LT</sup>-E2 e iHEP<sup>LT</sup>-D6. Los porcentajes de gDNA humano fueron de  $8,7 \pm 11,2$  y  $4,0 \pm 5,9$  para los grupos iHEP<sup>LT</sup>-E2 e iHEP<sup>LT</sup>-D6 respectivamente, no detectándose diferencias estadísticamente significativas.

Finalmente se analizó la concentración de ácido orótico presente en la orina de los ratones intervenidos (ver M 4.5.4). Al analizar los resultados, encontramos una excreción significativamente mayor de orótico en ratones trasplantados con iHEP<sup>LT</sup>-D6 (180,9 ± 186,1 mM/M creatinina) que en ratones trasplantados con iHEP<sup>LT</sup>-E2 (37,2 ± 18,1 mM/M creatinina);  $p < 0,05$ ). (Figura R34).



**Figura R34: Secreción de ácido orótico en orina de ratones FRG® trasplantados con iHEP<sup>LT</sup>.** Concentración expresada en mmoles/mol de creatinina (n=8). \*,  $p < 0,05$ .

La variabilidad obtenida en las concentraciones de ácido orótico en la orina de los ratones intervenidos con iHEP<sup>LT</sup>-D6, van en consonancia con las proporciones de gDNA determinado en las piezas de hígado anteriores (Figura R33 y R34, puntos naranjas). A pesar de la variabilidad en la concentración de ácido orótico en los ratones intervenidos con el clon D6, varios ratones secretaron cantidades muy por encima de las obtenidas en los ratones intervenidos con el clon E2 (valor medio de ambos clones). Considerando que ambos clones de iHEP<sup>LT</sup> colonizan el hígado de

los ratones de forma equivalente, y que el clon E2 expresa el alelo silvestre mientras que el D6 expresa el mutante, se puede confirmar que el clon iHEP<sup>LT</sup>-D6 recapitula el fenotipo OTC deficiente mientras que iHEP<sup>LT</sup>-E2 recapitula el fenotipo OTC silvestre.





# **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

- 1- Hemos obtenido clones de fibroblastos humanos homogéneos para el estado de inactivación de cromosoma X, a partir de una biopsia cutánea procedente de una paciente con deficiencia en ornitina trascarbamilasa.
- 2- La senescencia afecta negativamente a la reprogramación celular de fibroblastos a hepatocitos inducidos.
- 3- Hemos inmortalizado y reprogramado de manera directa los clones de fibroblastos humanos homogéneos a hepatocitos inducidos, mediante el uso de lentivirus y la sobreexpresión ectópica de los factores de transcripción HNF1, HNF4 y FOXA3.
  - a. Los hepatocitos inducidos inmortalizados tienen capacidad proliferativa, siendo expandibles y criopreservables.
  - b. Los hepatocitos inducidos inmortalizados expresan marcadores hepáticos y realizan funciones propias de hepatocitos.
  - c. La densidad celular o confluencia es un factor determinante para el mantenimiento del fenotipo hepático adquirido.
- 4- Los hepatocitos inducidos inmortalizados derivados del clon E2 (iHEP<sup>LT</sup>-E2) expresa en alelo silvestre del gen de la OTC, mientras que los derivados del clon D6 (iHEP<sup>LT</sup>-D6) expresa el alelo mutante.
- 5- El alelo OTC mutante contiene una sustitución adicional potencialmente deletérea (p.Gln270Arg) 8 bases aguas arriba de la mutación previamente descrita en la paciente.
- 6- Los hepatocitos inducidos inmortalizados de los clones E2 y D6 colonizan el hígado de ratones FRG<sup>®</sup> de forma equivalente y recapitulan el fenotipo sano (clon E2) y mutante (clon D6) de la OTC in vivo.



## ARTÍCULOS PUBLICADOS DURANTE EL TRANCURSO DE LA TESIS DOCTORAL

RESEARCH

Open Access

### Direct conversion of human fibroblast to hepatocytes using a single inducible polycistronic vector



Maria Ballester<sup>1</sup>, Miguel Bolonio<sup>1,2</sup>, Ramon Santamaria<sup>1</sup>, José V. Castell<sup>1,3</sup>, Carmen Ribes-Koninckx<sup>2</sup> and Roque Bort<sup>1</sup>

Stem cell research and therapy

SCIENTIFIC  
REPORTS

natureresearch

OPEN

### Glutamine/glutamate metabolism rewiring in reprogrammed human hepatocyte-like cells

Maria Ballester<sup>1</sup>, Enrique Sentandreu<sup>4</sup>, Giovanna Luongo<sup>5</sup>, Ramon Santamaria<sup>4</sup>, Miguel Bolonio<sup>2</sup>, Maria Isabel Alcoriza-Balaguer <sup>3</sup>, Martina Palomino-Schätzlein<sup>2</sup>, Antonio Pineda-Lucena<sup>2</sup>, Jose Castell<sup>1</sup>, Agustín Lahoz<sup>3</sup> & Roque Bort <sup>1\*</sup>

Scientific reports

<sup>1</sup>Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, CIBERehd, Avda. Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain.

## ARTÍCULO ENVIADO PENDIENTE DE PUBLICACIÓN

### **Derivation of *Healthy* Hepatocyte-Like Cells from a Female Patient with Ornithine Transcarbamylase Deficiency Through X Inactivation Selection.**

#### **Cell reports.**

Ramon Santamaria<sup>1</sup>, Maria Ballester<sup>1</sup>, Francisco Martinez<sup>2</sup>, Marina Blazquez<sup>1</sup>, Carmen Ribes-Koninckx<sup>3</sup>, Jose V. Castell<sup>1,4</sup>, Torsten Wuestefeld<sup>5</sup> and Roque Bort<sup>1,\*</sup>.

<sup>1</sup>Unidad de Hepatología Experimental, Instituto de Investigación Sanitaria La Fe, Hospital Universitari i Politècnic La Fe, CIBERehd, Avda. Fernando Abril Martorell 106, 46026 Valencia, Spain.

<sup>5</sup>Stem Cell & Regenerative Biology, Genome Institute of Singapore (GIS), 60 Biopolis Street, #02-01 Genome, Singapore 138672.



## **BIBLIOGRAFÍA**

## Bibliografía

1. Russell, A., Levin, B., Oberholzer, V. G. & Sinclair, L. Hyperammonaemia. A new instance of an inborn enzymatic defect of the biosynthesis of urea. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 699–700 (1962).
2. Short, E. M., Conn, H. O., Snodgrass, P. J., Campbell, A. G. & Rosenberg, L. E. Evidence for x-linked dominant inheritance of ornithine transcarbamylase deficiency. *N. Engl. J. Med.* **288**, 7–12 (1973).
3. Ricciuti, F. C., Gelehrter, T. D. & Rosenberg, L. E. X-chromosome inactivation in human liver: confirmation of X-linkage of ornithine transcarbamylase. *Am. J. Hum. Genet.* **28**, 332–338 (1976).
4. Krebs, H. A. S. & Henseleit, K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Klin. Wochenschr.* (2005) doi:10.1007/BF01757657.
5. Walker, V. Ammonia toxicity and its prevention in inherited defects of the urea cycle. *Diabetes Obes. Metab.* **11**, 823–835 (2009).
6. Walser, M. Urea cycle enzymopathies. *Semin. Liver Dis.* **2**, 329–339 (1982).
7. Morris, S. M. Regulation of Enzymes of the Urea Cycle and Arginine Metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **22**, 87–105 (2002).
8. Jackson, M. J., Beaudet, A. L. & O'Brien, W. E. Mammalian Urea Cycle Enzymes. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 431–464 (1986).



9. Schimke, R. T. Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.* **237**, 459–468 (1962).
10. Kadowaki, M. & Kanazawa, T. Amino acids as regulators of proteolysis. *J. Nutr.* **133**, 2052S-2056S (2003).
11. de Cima, S. *et al.* Structure of human carbamoyl phosphate synthetase: deciphering the on/off switch of human ureagenesis. *Sci. Rep.* **5**, 16950 (2015).
12. Saheki, T., Katsunuma, T. & Sase, M. Regulation of urea synthesis in rat liver. Changes of ornithine and acetylglutamate concentrations in the livers of rats subjected to dietary transitions. *J. Biochem. (Tokyo)* **82**, 551–558 (1977).
13. Saheki, T., Ohkubo, T. & Katsunuma, T. Regulation of urea synthesis in rat liver. Increase in the concentrations of ornithine and acetylglutamate in rat liver in response to urea synthesis stimulated by the injection of an ammonium salt. *J. Biochem. (Tokyo)* **84**, 1423–1430 (1978).
14. Lindgren, V., de Martinville, B., Horwich, A. L., Rosenberg, L. E. & Francke, U. Human ornithine transcarbamylase locus mapped to band Xp21.1 near the Duchenne muscular dystrophy locus. *Science* **226**, 698–700 (1984).
15. Horwich, A. L. *et al.* Structure and expression of a complementary DNA for the nuclear coded precursor of human mitochondrial ornithine transcarbamylase. *Science* **224**, 1068–1074 (1984).

16. Hata, A. *et al.* Isolation and characterization of the human ornithine transcarbamylase gene: structure of the 5'-end region. *J. Biochem. (Tokyo)* **100**, 717–725 (1986).
17. Caldovic, L., Abdikarim, I., Narain, S., Tuchman, M. & Morizono, H. Genotype–Phenotype Correlations in Ornithine Transcarbamylase Deficiency: A Mutation Update. *J. Genet. Genomics Yi Chuan Xue Bao* **42**, 181–194 (2015).
18. Summar, M. L., Dobbelaere, D., Brusilow, S. & Lee, B. Diagnosis, Symptoms, Frequency and Mortality of 260 Patients with Urea Cycle Disorders from a 21-Year, Multicentre Study of Acute Hyperammonaemic Episodes. *Acta Paediatr. Oslo Nor. 1992* **97**, 1420–1425 (2008).
19. Savy, N. *et al.* Acute pediatric hyperammonemia: current diagnosis and management strategies. *Hepatic Med. Evid. Res.* **10**, 105–115 (2018).
20. Gordon, N. Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* **7**, 115–121 (2003).
21. McCullough, B. A. *et al.* Genotype spectrum of ornithine transcarbamylase deficiency: correlation with the clinical and biochemical phenotype. *Am. J. Med. Genet.* **93**, 313–319 (2000).
22. Choi, J.-H. *et al.* Clinical outcomes and the mutation spectrum of the OTC gene in patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *J. Hum. Genet.* **60**, 501–507 (2015).

23. Batshaw, M. L., Tuchman, M., Summar, M. & Seminara, J. A longitudinal study of urea cycle disorders. *Mol. Genet. Metab.* **113**, 127–130 (2014).
24. Stepien, K. M., Geberhiwot, T., Hendriks, C. J. & Treacy, E. P. Challenges in diagnosing and managing adult patients with urea cycle disorders. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 1136–1146 (2019).
25. Martín-Hernández, E. *et al.* Urea cycle disorders in Spain: an observational, cross-sectional and multicentric study of 104 cases. *Orphanet J. Rare Dis.* **9**, 187 (2014).
26. Summar, M. L. & Mew, N. A. Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. *Pediatr. Clin. North Am.* **65**, 231–246 (2018).
27. Burton, B. K. Urea cycle disorders. *Clin. Liver Dis.* **4**, 815–830, vi (2000).
28. Pearson, D. L. *et al.* Neonatal pulmonary hypertension--urea-cycle intermediates, nitric oxide production, and carbamoyl-phosphate synthetase function. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1832–1838 (2001).
29. Campbell, A. G. M., Rosenberg, L., Snodgrass, P. & Nuzum, C. LETHAL NEONATAL HYPERAMMONÆMIA DUE TO COMPLETE ORNITHINE-TRANSCARBAMYLASE DEFICIENCY. *The Lancet* **298**, 217–218 (1971).

30. Campbell, A. G. M., Rosenberg, L. E., Snodgrass, P. J. & Nuzum, C. T. Ornithine Transcarbamylase Deficiency. *N. Engl. J. Med.* **288**, 1–6 (1973).
31. Bergmann, K. R. *et al.* Late-onset ornithine transcarbamylase deficiency: treatment and outcome of hyperammonemic crisis. *Pediatrics* **133**, e1072-1076 (2014).
32. Lichter-Konecki, U., Caldovic, L., Morizono, H. & Simpson, K. Ornithine Transcarbamylase Deficiency. in *GeneReviews®* (eds. Adam, M. P. *et al.*) (University of Washington, Seattle, 1993).
33. Myers, J. H. & Shook, J. E. Vomiting, ataxia, and altered mental status in an adolescent: late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Am. J. Emerg. Med.* **14**, 553–557 (1996).
34. Daijo, K. *et al.* Late-onset ornithine transcarbamylase deficiency associated with hyperammonemia. *Clin. J. Gastroenterol.* **10**, 383–387 (2017).
35. D’Onofrio, V. *et al.* Hyperammonemic coma in a patient with late-onset OTC deficiency. *Pediatr. Medica E Chir. Med. Surg. Pediatr.* **36**, 9 (2014).
36. Sprouse, C. *et al.* Investigating neurological deficits in carriers and affected patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **113**, 136–141 (2014).
37. Ahrens, M. J. *et al.* Clinical and biochemical heterogeneity in females of a large pedigree with ornithine transcarbamylase

- deficiency due to the R141Q mutation. *Am. J. Med. Genet.* **66**, 311–315 (1996).
38. Ausems, M. G. *et al.* Asymptomatic and late-onset ornithine transcarbamylase deficiency caused by a A208T mutation: clinical, biochemical and DNA analyses in a four-generation family. *Am. J. Med. Genet.* **68**, 236–239 (1997).
39. Häberle, J. *et al.* Suggested guidelines for the diagnosis and management of urea cycle disorders: First revision. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 1192–1230 (2019).
40. Cartagena, A. *et al.* Recurrent encephalopathy: NAGS (N-acetylglutamate synthase) deficiency in adults. *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* **40**, 3–9 (2013).
41. Auron, A. & Brophy, P. D. Hyperammonemia in review: pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr. Nephrol. Berl. Ger.* **27**, 207–222 (2012).
42. Rapp, B. *et al.* Genetic analysis of carbamoylphosphate synthetase I and ornithine transcarbamylase deficiency using fibroblasts. *Eur. J. Pediatr.* **160**, 283–287 (2001).
43. Engel, K. *et al.* Analysis of mRNA transcripts improves the success rate of molecular genetic testing in OTC deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **94**, 292–297 (2008).
44. Kamoun, P. *et al.* Prenatal diagnosis of the urea cycle diseases: a survey of the European cases. *Am. J. Med. Genet.* **55**, 247–250 (1995).

45. Jv, L., Mp, W. P. & Aa, M. Hypothesis: proposals for the management of a neonate at risk of hyperammonaemia due to a urea cycle disorder. *European journal of pediatrics* vol. 167 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17436013/?dopt=Abstract> (2008).
46. Häberle, J. & Koch, H. G. Genetic approach to prenatal diagnosis in urea cycle defects. *Prenat. Diagn.* **24**, 378–383 (2004).
47. Kumar, R. *et al.* Persistent hyperammonemia is associated with complications and poor outcomes in patients with acute liver failure. *Clin. Gastroenterol. Hepatol. Off. Clin. Pract. J. Am. Gastroenterol. Assoc.* **10**, 925–931 (2012).
48. Leonard, J. V. The nutritional management of urea cycle disorders. *J. Pediatr.* **138**, S40-44;discussion S44-45 (2001).
49. Matsumoto, S. *et al.* Urea cycle disorders-update. *J. Hum. Genet.* **64**, 833–847 (2019).
50. Guidelines for acute management of hyperammonemia in the Middle East region. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4820220/>.
51. Picca, S., Bartuli, A. & Dionisi-Vici, C. Medical Management and Dialysis Therapy for the Infant With an Inborn Error of Metabolism. *Semin. Nephrol.* **28**, 477–480 (2008).
52. Brusilow, S. W. Arginine, an indispensable amino acid for patients with inborn errors of urea synthesis. *J. Clin. Invest.* **74**, 2144–2148 (1984).

53. Molema, F. *et al.* Evaluation of dietary treatment and amino acid supplementation in organic acidurias and urea-cycle disorders: On the basis of information from a European multicenter registry. *J. Inherit. Metab. Dis.* **42**, 1162–1175 (2019).
54. Brusilow, S. W. & Batshaw, M. L. Arginine therapy of argininosuccinase deficiency. *Lancet Lond. Engl.* **1**, 124–127 (1979).
55. Matoori, S. & Leroux, J.-C. Recent advances in the treatment of hyperammonemia. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **90**, 55–68 (2015).
56. Wilnai, Y. *et al.* Prenatal treatment of ornithine transcarbamylase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* **123**, 297–300 (2018).
57. Long-term safety and efficacy of glycerol phenylbutyrate for the management of urea cycle disorder patients | Elsevier Enhanced Reader.  
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1096719219303233?token=1FF2AF451CB8996566573C84723ABE711BE50DA35F44A70C405423EFE532935B45ACFEB76CB482F8F5C8D4B5442ED434> doi:10.1016/j.ymgme.2019.07.004.
58. Savy, N. *et al.* Acute pediatric hyperammonemia: current diagnosis and management strategies. *Hepatic Medicine: Evidence and Research* vol. 10 105–115  
<https://www.dovepress.com/acute-pediatric->

- hyperammonemia-current-diagnosis-and-management-strate-peer-reviewed-fulltext-article-HMER (2018).
59. Dixon: Clinical paediatric dietetics - Google Scholar. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?hl=en&publication\\_year=2007&pages=357-389&author=M+Dixon&title=Clinical+Pediatric+Dietetics](https://scholar.google.com/scholar_lookup?hl=en&publication_year=2007&pages=357-389&author=M+Dixon&title=Clinical+Pediatric+Dietetics).
60. S, P. *et al.* Short-term survival of hyperammonemic neonates treated with dialysis. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* vol. 30 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25185886/> (2015).
61. Warady, B. A., Schaefer, F. & Alexander, S. R. *Pediatric Dialysis*. (Springer Science & Business Media, 2011).
62. S, P., A, B. & C, D.-V. Medical management and dialysis therapy for the infant with an inborn error of metabolism. *Seminars in nephrology* vol. 28 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18790367/> (2008).
63. Chan, W. K. Y., But, W. M. & Law, C. W. Ammonia detoxification by continuous venovenous haemofiltration in an infant with urea cycle defect. *Hong Kong Med. J. Xianggang Yi Xue Za Zhi* **8**, 207–210 (2002).
64. Rh, S., We, H. & K, J. Acute hemodialysis of infants weighing less than five kilograms. *Kidney international* vol. 45 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8196295/?dopt=Abstract> (1994).



65. T, H., T, N., M, T., T, K. & A, K. Continuous venovenous hemodiafiltration in neonatal onset hyperammonemia. *American journal of perinatology* vol. 19 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12012284/?dopt=Abstract> (2002).
66. S, P. *et al.* Extracorporeal dialysis in neonatal hyperammonemia: modalities and prognostic indicators. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* vol. 16 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11685590/?dopt=Abstract> (2001).
67. Rh, S. Nutritional management of patients with urea cycle disorders. *Journal of inherited metabolic disease* vol. 30 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18034368/> (2007).
68. Whitelaw, A., Bridges, S., Leaf, A. & Evans, D. Emergency treatment of neonatal hyperammonaemic coma with mild systemic hypothermia. *Lancet Lond. Engl.* **358**, 36–38 (2001).
69. Jalan, R., Olde Damink, S. W. M., Deutz, N. E. P., Hayes, P. C. & Lee, A. Moderate hypothermia in patients with acute liver failure and uncontrolled intracranial hypertension. *Gastroenterology* **127**, 1338–1346 (2004).
70. R, J. & C, R. Hypothermia in acute liver failure. *Metabolic brain disease* vol. 19 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15554417/> (2004).
71. U, L.-K. *et al.* Feasibility of adjunct therapeutic hypothermia treatment for hyperammonemia and

- encephalopathy due to urea cycle disorders and organic acidemias. *Molecular genetics and metabolism* vol. 109 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23791307/> (2013).
72. Pf, W. *et al.* Liver transplantation for the treatment of urea cycle disorders. *Journal of inherited metabolic disease* vol. 21 Suppl 1 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9686349/?dopt=Abstract> (1998).
73. Morioka, D. *et al.* Current role of liver transplantation for the treatment of urea cycle disorders: a review of the worldwide English literature and 13 cases at Kyoto University. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **11**, 1332–1342 (2005).
74. Campeau, P. M. *et al.* Early orthotopic liver transplantation in urea cycle defects: follow up of a developmental outcome study. *Mol. Genet. Metab.* **100 Suppl 1**, S84-87 (2010).
75. Alonso, E. M. *et al.* Functional outcomes of pediatric liver transplantation. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **37**, 155–160 (2003).
76. Yu, L., Rayhill, S. C., Hsu, E. K. & Landis, C. S. Liver Transplantation for Urea Cycle Disorders: Analysis of the United Network for Organ Sharing Database. *Transplant. Proc.* **47**, 2413–2418 (2015).

77. Ensenauer, R. *et al.* Management and outcome of neonatal-onset ornithine transcarbamylase deficiency following liver transplantation at 60 days of life. *Mol. Genet. Metab.* **84**, 363–366 (2005).
78. McBride, K. L. *et al.* Developmental outcomes with early orthotopic liver transplantation for infants with neonatal-onset urea cycle defects and a female patient with late-onset ornithine transcarbamylase deficiency. *Pediatrics* **114**, e523–526 (2004).
79. Perito, E. R., Rhee, S., Roberts, J. P. & Rosenthal, P. Pediatric liver transplantation for urea cycle disorders and organic acidemias: United Network for Organ Sharing data for 2002–2012. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **20**, 89–99 (2014).
80. Chen, C.-Y. *et al.* Development of autoantibodies after pediatric liver transplantation. *Pediatr. Transplant.* **17**, 144–148 (2013).
81. Kim, J. J. & Marks, S. D. Long-term outcomes of children after solid organ transplantation. *Clinics* **69**, 28–38 (2014).
82. Madan, R. P. & Herold, B. C. Viral infections in pediatric solid organ transplantation recipients and the impact of molecular diagnostic testing. *Curr. Opin. Organ Transplant.* **15**, 293–300 (2010).
83. Narkewicz, M. R. *et al.* Decreasing incidence of symptomatic Epstein-Barr virus disease and posttransplant

- lymphoproliferative disorder in pediatric liver transplant recipients: report of the studies of pediatric liver transplantation experience. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **19**, 730–740 (2013).
84. Rabier, D. *et al.* Arginine remains an essential amino acid after liver transplantation in urea cycle enzyme deficiencies. *J. Inherit. Metab. Dis.* **14**, 277–280 (1991).
85. Sundaram, S. S., Alonso, E. M. & Whittington, P. F. Liver transplantation in neonates. *Liver Transplant. Off. Publ. Am. Assoc. Study Liver Dis. Int. Liver Transplant. Soc.* **9**, 783–788 (2003).
86. Acosta Lobo, M. E., Vásquez Araque, N. A. & Londoño Franco, L. F. X chromosome inactivation in mammalian embryonic development. *CES Med. Vet. Zootec.* **8**, 108–119 (2013).
87. Augui, S., Nora, E. P. & Heard, E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 429–442 (2011).
88. Lyon, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). *Nature* **190**, 372–373 (1961).
89. Avner, P. & Heard, E. X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 59–67 (2001).

90. Russell, L. B. Mammalian X-Chromosome Action: Inactivation Limited in Spread and in Region of Origin. *Science* **140**, 976–978 (1963).
91. Cattanach, B. M. & Isaacson, J. H. Controlling Elements in the Mouse X Chromosome. *Genetics* **57**, 331 (1967).
92. Rastan, S. Non-random X-chromosome inactivation in mouse X-autosome translocation embryos—location of the inactivation centre. *Development* **78**, 1–22 (1983).
93. Brown, C. J. *et al.* A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature* **349**, 38–44 (1991).
94. Lee, J. T., Davidow, L. S. & Warshawsky, D. Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat. Genet.* **21**, 400–404 (1999).
95. Huynh, K. D. & Lee, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. *Nature* **426**, 857–862 (2003).
96. Navarro, P. *et al.* Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* **321**, 1693–1695 (2008).
97. Navarro, P. *et al.* Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* **468**, 457–460 (2010).
98. Tian, D., Sun, S. & Lee, J. T. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* **143**, 390–403 (2010).

99. Jeon, Y. & Lee, J. T. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell* **146**, 119–133 (2011).
100. Maclary, E., Hinten, M., Harris, C. & Kalantry, S. Long Non-coding RNAs in the X-inactivation Center. *Chromosome Res. Int. J. Mol. Supramol. Evol. Asp. Chromosome Biol.* **21**, 601–614 (2013).
101. Clemson, C. M., McNeil, J. A., Willard, H. F. & Lawrence, J. B. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J. Cell Biol.* **132**, 259–275 (1996).
102. Lucchesi, J. C., Kelly, W. G. & Panning, B. Chromatin remodeling in dosage compensation. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 615–651 (2005).
103. Chaumeil, J., Le Baccon, P., Wutz, A. & Heard, E. A novel role for Xist RNA in the formation of a repressive nuclear compartment into which genes are recruited when silenced. *Genes Dev.* **20**, 2223–2237 (2006).
104. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* **469**, 343–349 (2011).
105. Gieni, R. S. & Hendzel, M. J. Polycomb group protein gene silencing, non-coding RNA, stem cells, and cancer. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* **87**, 711–746 (2009).
106. Csankovszki, G., Nagy, A. & Jaenisch, R. Synergism of Xist Rna, DNA Methylation, and Histone Hypoacetylation in

- Maintaining X Chromosome Inactivation. *J. Cell Biol.* **153**, 773–784 (2001).
107. Clerc, P. & Avner, P. Role of the region 3' to Xist exon 6 in the counting process of X-chromosome inactivation. *Nat. Genet.* **19**, 249–253 (1998).
108. Monkhorst, K., Jonkers, I., Rentmeester, E., Grosveld, F. & Gribnau, J. X inactivation counting and choice is a stochastic process: evidence for involvement of an X-linked activator. *Cell* **132**, 410–421 (2008).
109. Gayen, S., Maclary, E., Buttigieg, E., Hinten, M. & Kalantry, S. A primary role for the Tsix lncRNA in maintaining random X-chromosome inactivation. *Cell Rep.* **11**, 1251–1265 (2015).
110. Tian, D., Sun, S. & Lee, J. T. The long noncoding RNA, Jpx, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* **143**, 390–403 (2010).
111. Zhao, J., Sun, B. K., Erwin, J. A., Song, J.-J. & Lee, J. T. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**, 750–756 (2008).
112. Leeb, M., Steffen, P. A. & Wutz, A. X chromosome inactivation sparked by non-coding RNAs. *RNA Biol.* **6**, 94–99 (2009).
113. Makhlof, M. & Rougeulle, C. Linking X chromosome inactivation to pluripotency: Necessity or fate? *Trends Mol. Med.* **17**, 329–336 (2011).

114. Patrat, C., Ouimette, J.-F. & Rougeulle, C. X chromosome inactivation in human development. *Development* **147**, (2020).
115. Lucchesi, J. C., Kelly, W. G. & Panning, B. Chromatin remodeling in dosage compensation. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 615–651 (2005).
116. Goto, T. & Monk, M. Regulation of X-Chromosome Inactivation in Development in Mice and Humans. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 362–378 (1998).
117. Gunter, C. Genome biology: she moves in mysterious ways. *Nature* **434**, 279–280 (2005).
118. Migeon, B. R. X Inactivation, Female Mosaicism, and Sex Differences in Renal Diseases. *J. Am. Soc. Nephrol.* **19**, 2052–2059 (2008).
119. Puck, J. M. & Willard, H. F. X Inactivation in Females with X-Linked Disease. *N. Engl. J. Med.* **338**, 325–328 (1998).
120. Sharp, A., Robinson, D. & Jacobs, P. Age- and tissue-specific variation of X chromosome inactivation ratios in normal women. *Hum. Genet.* **107**, 343–349 (2000).
121. Pegoraro, E. *et al.* Familial skewed X inactivation: a molecular trait associated with high spontaneous-abortion rate maps to Xq28. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 160–170 (1997).
122. Naumova, A. K. *et al.* Genetic mapping of X-linked loci involved in skewing of X chromosome inactivation in the human. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **6**, 552–562 (1998).



123. Puck, J. M. & Willard, H. F. X inactivation in females with X-linked disease. *N. Engl. J. Med.* **338**, 325–328 (1998).
124. Watkiss, E. *et al.* X inactivation patterns in female monozygotic twins and their families. *J. Med. Genet.* **31**, 754–757 (1994).
125. Weissman, I. L. & Shizuru, J. A. The origins of the identification and isolation of hematopoietic stem cells, and their capability to induce donor-specific transplantation tolerance and treat autoimmune diseases. *Blood* **112**, 3543–3553 (2008).
126. Charafe-Jauffret, E. *et al.* Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiol. J. Immunopathol. Mol. Cell. Biol.* **75**, 75–84 (2008).
127. Gupta, A. O. & Wagner, J. E. Umbilical Cord Blood Transplants: Current Status and Evolving Therapies. *Front. Pediatr.* **8**, (2020).
128. Mount, N. M., Ward, S. J., Kefalas, P. & Hyllner, J. Cell-based therapy technology classifications and translational challenges. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, (2015).
129. Liu, G., David, B. T., Trawczynski, M. & Fessler, R. G. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev. Rep.* **16**, 3–32 (2020).
130. Thomson, J. A. *et al.* Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **282**, 1145–1147 (1998).

131. Ratajczak, M. Z. *et al.* The pleiotropic effects of the SDF-1-CXCR4 axis in organogenesis, regeneration and tumorigenesis. *Leukemia* **20**, 1915–1924 (2006).
132. Ratajczak, M. Z., Ratajczak, J. & Kucia, M. Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSELs). *Circ. Res.* **124**, 208–210 (2019).
133. Bhartiya, D. *et al.* Endogenous, very small embryonic-like stem cells: critical review, therapeutic potential and a look ahead. *Hum. Reprod. Update* **23**, 41–76 (2016).
134. Miyanishi, M. *et al.* Do pluripotent stem cells exist in adult mice as very small embryonic stem cells? *Stem Cell Rep.* **1**, 198–208 (2013).
135. Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A. & Wilmut, I. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* **380**, 64–66 (1996).
136. Cyranoski, D. First monkeys cloned with technique that made Dolly the sheep. *Nature* **553**, 387–388 (2018).
137. Miana, V. V. & González, E. A. P. Adipose tissue stem cells in regenerative medicine. *ecancermedicalscience* **12**, (2018).
138. Sousa, B. R. *et al.* Human adult stem cells from diverse origins: an overview from multiparametric immunophenotyping to clinical applications. *Cytom. Part J. Int. Soc. Anal. Cytol.* **85**, 43–77 (2014).

139. Schaun, M. I. *et al.* Cell Therapy in Ischemic Heart Disease: Interventions That Modulate Cardiac Regeneration. *Stem Cells Int.* **2016**, 2171035 (2016).
140. Latief, N. *et al.* Adipose stem cells differentiated chondrocytes regenerate damaged cartilage in rat model of osteoarthritis. *Cell Biol. Int.* **40**, 579–588 (2016).
141. Lendeckel, S. *et al.* Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J. Cranio-Maxillo-fac. Surg. Off. Publ. Eur. Assoc. Cranio-Maxillo-fac. Surg.* **32**, 370–373 (2004).
142. Hernández Ramírez, P. & Dorticós Balea<a name=cargo></a>, E. Medicina regenerativa: Células madre embrionarias y adultas. *Rev. Cuba. Hematol. Inmunol. Hemoter.* **20**, 0–0 (2004).
143. D'Amour, K. A. & Gage, F. H. Are somatic stem cells pluripotent or lineage-restricted? *Nat. Med.* **8**, 213–214 (2002).
144. Kørbling, M. & Estrov, Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *N. Engl. J. Med.* **349**, 570–582 (2003).
145. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663–676 (2006).
146. Karumbayaram, S. *et al.* Directed differentiation of human-induced pluripotent stem cells generates active motor neurons. *Stem Cells Dayt. Ohio* **27**, 806–811 (2009).

147. Dimos, J. T. *et al.* Induced Pluripotent Stem Cells Generated from Patients with ALS Can Be Differentiated into Motor Neurons. *Science* **321**, 1218–1221 (2008).
148. Hong, H. *et al.* Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature* **460**, 1132–1135 (2009).
149. Tsubooka, N. *et al.* Roles of Sall4 in the generation of pluripotent stem cells from blastocysts and fibroblasts. *Genes Cells* **14**, 683–694 (2009).
150. Hanna, J. *et al.* Direct Reprogramming of Terminally Differentiated Mature B Lymphocytes To Pluripotency. *Cell* **133**, 250–264 (2008).
151. Nishimura, K. *et al.* Development of Defective and Persistent Sendai Virus Vector A UNIQUE GENE DELIVERY/EXPRESSION SYSTEM IDEAL FOR CELL REPROGRAMMING. *J. Biol. Chem.* **286**, 4760–4771 (2011).
152. Yu, J. *et al.* Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* **318**, 1917–1920 (2007).
153. Warren, L. *et al.* Highly Efficient Reprogramming to Pluripotency and Directed Differentiation of Human Cells with Synthetic Modified mRNA. *Cell Stem Cell* **7**, 618–630 (2010).
154. Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb. Haemost.* **107**, 605–610 (2012).

155. Miyoshi, N. *et al.* Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell Stem Cell* **8**, 633–638 (2011).
156. Patsch, C. *et al.* Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat. Cell Biol.* **17**, 994–1003 (2015).
157. Kim, K. *et al.* Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol.* **29**, 1117–1119 (2011).
158. Ichida, J. K. *et al.* Notch inhibition allows oncogene-independent generation of iPS cells. *Nat. Chem. Biol.* **10**, 632–639 (2014).
159. Graf, T. & Enver, T. Forcing cells to change lineages. *Nature* **462**, 587–594 (2009).
160. Thier, M. *et al.* Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* **10**, 473–479 (2012).
161. Jones, P. A. & Taylor, S. M. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* **20**, 85–93 (1980).
162. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
163. Morita, R. *et al.* ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 160–165 (2015).

164. Rubio, A. *et al.* Rapid and efficient CRISPR/Cas9 gene inactivation in human neurons during human pluripotent stem cell differentiation and direct reprogramming. *Sci. Rep.* **6**, 37540 (2016).
165. Kaur, K., Yang, J., Eisenberg, C. A. & Eisenberg, L. M. 5-azacytidine promotes the transdifferentiation of cardiac cells to skeletal myocytes. *Cell. Reprogramming* **16**, 324–330 (2014).
166. Tanabe, K. *et al.* Transdifferentiation of human adult peripheral blood T cells into neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, 6470–6475 (2018).
167. Merrell, A. J. & Stanger, B. Z. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**, 413–425 (2016).
168. Dufait, I. *et al.* Retroviral and lentiviral vectors for the induction of immunological tolerance. *Scientifica* **2012**, (2012).
169. Meng, F. *et al.* Induction of fibroblasts to neurons through adenoviral gene delivery. *Cell Res.* **22**, 436–440 (2012).
170. Ban, H. *et al.* Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 14234–14239 (2011).
171. Ambasudhan, R. *et al.* Direct Reprogramming of Adult Human Fibroblasts to Functional Neurons under Defined Conditions. *Cell Stem Cell* **9**, 113–118 (2011).

172. Kogiso, T., Nagahara, H., Otsuka, M., Shiratori, K. & Dowdy, S. F. Transdifferentiation of human fibroblasts into hepatocyte-like cells by defined transcriptional factors. *Hepatol. Int.* **7**, 937–944 (2013).
173. Huang, P. *et al.* Direct reprogramming of human fibroblasts to functional and expandable hepatocytes. *Cell Stem Cell* **14**, 370–384 (2014).
174. Du, Y. *et al.* Human hepatocytes with drug metabolic function induced from fibroblasts by lineage reprogramming. *Cell Stem Cell* **14**, 394–403 (2014).
175. Chanda, S. *et al.* Generation of induced neuronal cells by the single reprogramming factor ASCL1. *Stem Cell Rep.* **3**, 282–296 (2014).
176. Ambasudhan, R. *et al.* Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* **9**, 113–118 (2011).
177. Morita, R. *et al.* ETS transcription factor ETV2 directly converts human fibroblasts into functional endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 160–165 (2015).
178. Wada, R. *et al.* Induction of human cardiomyocyte-like cells from fibroblasts by defined factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 12667–12672 (2013).
179. Yang, R. *et al.* Direct conversion of mouse and human fibroblasts to functional melanocytes by defined factors. *Nat. Commun.* **5**, 5807 (2014).

180. Grath, A. & Dai, G. Direct cell reprogramming for tissue engineering and regenerative medicine. *J. Biol. Eng.* **13**, (2019).
181. Xu, J., Du, Y. & Deng, H. Direct Lineage Reprogramming: Strategies, Mechanisms, and Applications. *Cell Stem Cell* **16**, 119–134 (2015).
182. Ballester, M. *et al.* Direct conversion of human fibroblast to hepatocytes using a single inducible polycistronic vector. *Stem Cell Res. Ther.* **10**, 317 (2019).
183. Welm, B. E., Dijkgraaf, G. J. P., Bledau, A. S., Welm, A. L. & Werb, Z. Lentiviral transduction of mammary stem cells for analysis of gene function during development and cancer. *Cell Stem Cell* **2**, 90–102 (2008).
184. Morozova, K. S. *et al.* Far-red fluorescent protein excitable with red lasers for flow cytometry and superresolution STED nanoscopy. *Biophys. J.* **99**, L13-15 (2010).
185. Ballester, M. *et al.* Glutamine/glutamate metabolism rewiring in reprogrammed human hepatocyte-like cells. *Sci. Rep.* **9**, 17978 (2019).
186. Fieremans, N. *et al.* Identification of Intellectual Disability Genes in Female Patients with a Skewed X-Inactivation Pattern. *Hum. Mutat.* **37**, 804–811 (2016).
187. Tolosa, L. *et al.* Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem Cell Res. Ther.* **6**, (2015).



188. Marini, J. C., Lee, B. & Garlick, P. J. Reduced Ornithine Transcarbamylase Activity Does Not Impair Ureagenesis in Otcspf-ash Mice. *J. Nutr.* **136**, 1017–1020 (2006).
189. Bort, R., Martinez-Barbera, J. P., Beddington, R. S. P. & Zaret, K. S. Hex homeobox gene-dependent tissue positioning is required for organogenesis of the ventral pancreas. *Dev. Camb. Engl.* **131**, 797–806 (2004).
190. Banito, A. & Gil, J. Induced pluripotent stem cells and senescence: learning the biology to improve the technology. *EMBO Rep.* **11**, 353–359 (2010).
191. Zabulica, M. *et al.* Guide to the Assessment of Mature Liver Gene Expression in Stem Cell-Derived Hepatocytes. *Stem Cells Dev.* **28**, 907–919 (2019).
192. Arranz, J. A., Riudor, E., Marco-Marín, C. & Rubio, V. Estimation of the total number of disease-causing mutations in ornithine transcarbamylase (OTC) deficiency. Value of the OTC structure in predicting a mutation pathogenic potential. *J. Inherit. Metab. Dis.* **30**, 217–226 (2007).
193. Ducich, N., Ah Mew, N. & Bedoyan, J. K. The E273del variant of uncertain significance of the ornithine transcarbamylase gene - a case for reclassification. *Mol. Genet. Metab. Rep.* **23**, (2020).
194. Oppliger Leibundgut, E., Wermuth, B., Colombo, J.-P. & Liechti-Gallati, S. Identification of four novel splice site

- mutations in the ornithine transcarbamylase gene. *Hum. Genet.* **97**, 209–213 (1996).
195. Marini, J. C., Lee, B. & Garlick, P. J. Reduced ornithine transcarbamylase activity does not impair ureagenesis in Otc(spf-ash) mice. *J. Nutr.* **136**, 1017–1020 (2006).
196. Cunningham, S. C. *et al.* AAV2/8-mediated Correction of OTC Deficiency Is Robust in Adult but Not Neonatal Spflash Mice. *Mol. Ther.* **17**, 1340–1346 (2009).
197. Raper, S. E. *et al.* A pilot study of in vivo liver-directed gene transfer with an adenoviral vector in partial ornithine transcarbamylase deficiency. *Hum. Gene Ther.* **13**, 163–175 (2002).
198. Azuma, H. *et al.* Robust expansion of human hepatocytes in Fah<sup>-/-</sup>/Rag2<sup>-/-</sup>/Il2rg<sup>-/-</sup> mice. *Nat. Biotechnol.* **25**, 903–910 (2007).