



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y  
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.



**DESARROLLO DE UN VECTOR pAAV-Pou5F1-  
IRES-GFP COMO REPORTERO CELULAR DE  
PLURIPOTENCIA EN LÍNEAS CELULARES hESC**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN  
BIOTECNOLÓGICA**

PRESENTA

**KAREN JAQUELINE JUAREZ NAVARRO**

DIRECTOR: DR. EMMANUEL DIAZ MARTINEZ  
CO-DIRECTOR: DR. OSCAR RENE HERNANDEZ PEREZ  
CO-DIRECTOR: DR. FABIAN DIAZ MARTINEZ  
ASESORES: DR. EDUARDO PADILLA CAMBEROS  
DRA. INÉS JIMENEZ PALOMAR



GOBIERNO DE  
MÉXICO



CONACYT  
Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología



Guadalajara, Jalisco, a 02 de agosto de 2022  
Ref. CP/1065/2022

**KAREN JAQUELINE JUÁREZ NAVARRO**  
ESTUDIANTE DE MAESTRÍA EN  
CIENCIAS EN INNOVACIÓN BIOTECNOLÓGICA  
NÚMERO DE MATRÍCULA 1903MF6487  
PRESENTE

Por este medio le informo que el trabajo de tesis **"Desarrollo de un vector pAAV-Pou5F1-IRES-GFP como reportero celular de pluripotencia en líneas celulares hESC"** desarrollado bajo la dirección del siguiente comité tutorial:

Dr. Néstor Emmanuel Díaz Martínez. Director de tesis  
Dr. Oscar René Hernández Pérez. Co-director de tesis  
Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez. Co-director de tesis  
Dra. Inés Jiménez Palomar. Asesora de tesis  
Dr. Eduardo Padilla Camberos. Asesor de tesis

ha sido aprobado para su impresión definitiva y defensa correspondiente para la obtención de grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica.

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**Dra. Erika Nahomy Marino Marmolejo**  
Directora Adjunta de Investigación y Posgrado





Guadalajara, Jalisco a 25 de julio de 2022

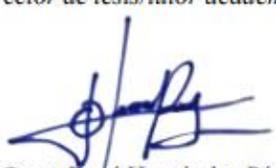
CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del comité tutorial del (la) estudiante **Karen Jaqueline Juárez Navarro**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “DESARROLLO DE UN VECTOR pAAV-Pou5F1-IRES-GFP COMO REPORTERO CELULAR DE PLURIPOTENCIA EN LÍNEAS CELULARES hESC” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por el/la estudiante para aspirar al grado de Maestro en Ciencias en Innovación Biotecnológica con especialidad en Biotecnología Médica y Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 25 del mes de julio del año dos mil veintidós.

  
Dr. Emmanuel Díaz Martínez  
*Director de tesis/tutor académico*

*EDUARDO PADILLA CAMBEROS*  
Dr. Eduardo Padilla Camberos  
*Asesor/Asesora*

  
Dr. Oscar René Hernández Pérez  
*Co-director de tesis/tutor en planta*

  
Dra. Inés Jiménez Palomar  
*Asesor/Asesora*

  
Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez  
*Co-director de tesis/tutor en planta*

**Director de tesis**

Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

Biotecnología Médica y Farmacéutica

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,  
A.C.

**Co-director**

Dr. Oscar René Hernández Pérez

Biotecnología Médica y Farmacéutica

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,  
A.C.

**Co-director**

Dr. Néstor Fabián Díaz Martínez

Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular

Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

**Asesores**

Dr. Eduardo Padilla Camberos

Biotecnología Médica y Farmacéutica

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,  
A.C.

Dra. Inés Jiménez Palomar

inMateriis

## **Jurado de Examen de Grado**

### **Presidente**

Dra. Inés Jiménez Palomar  
INMATERIIS S.A. DE C.V

### **Secretario**

Dra. Daniela Ávila González  
Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular  
Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes

### **Vocal**

Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,  
A.C.

La presente tesis de maestría se llevó a cabo gracias a la beca CONACYT otorgada al IBT. Karen Jaqueline Juárez Navarro y a los proyectos aprobados por el COECYTJAL. Fondo de Desarrollo Científico de Jalisco (FODECIJAL) para Atender Problemas Estatales 2019 (Proyecto: 8084-2019); COECYTJAL. Gobierno del Estado de Jalisco. Programa de Innovación en Jalisco 2019 (Proyecto: 7597) y CONACYT. Convocatoria 2019 Apoyos para Adquisición y Mantenimiento de Infraestructura en Instituciones y Laboratorios de Investigación Especializada (Proyecto 300638).

*“Eres aquella persona que pidió caer sobre la tierra para hacer algo ( algo que significa mucho para ti y que no podrías hacer en otro espacio ni en otro tiempo.”*

*“La principal razón por la que no conoces las respuestas es porque no has formulado las preguntas”*

-Richard Bach

## **Dedicatoria**

Dedico este trabajo a mi familia; a mis padres, Marcos Juárez Caballero y Petra Navarro Espinoza y a mis hermanos, Karina Juárez Navarro y Marcos Emmanuel Juárez Navarro, porque sin su apoyo y cariño esto no hubiese sido posible.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, por acompañarme y apoyarme durante el proceso, porque sin su apoyo y amor incondicional esto no habría sido posible.

A mi papá, por inculcarme que mis limitaciones son las que yo decida y ser una gran fuente de apoyo, amor y motivación. Gracias papá.

A mi mamá, por ser mi gran ejemplo de superación y fortaleza, por ser fan de cada uno de mis logros, por su cariño y apoyo incondicional

A mis hermanos, por ser una gran fuente de apoyo y amor. Gracias Karina y Marcos, por todo su apoyo y por siempre estar al pie del cañón a mi lado.

A mi compañero, por ser un gran apoyo en el proceso, por todas las experiencias acumuladas, por su cariño, paciencia y comprensión en este proceso, aún en los momentos complicados.

Al Dr. Oscar Hernández, por recordarme lo bonita, apasionante y maravillosa que puede ser la ciencia. Gracias por todas sus enseñanzas y por todo su apoyo en el proceso.

Al Dr. Emmanuel Díaz, por acogerme como parte de su laboratorio y permitirme aprender y ser parte de diversos proyectos; por transmitirme su conocimiento y apoyarme en el proceso.

A mi gran amiga Amairani, porque, aunque hayamos tomado caminos distintos en el posgrado, sigues siendo una fuente inagotable de apoyo, cariño y consejos.

A mis amigas, Vanessa, Tonantzin y demás amigos del posgrado, porque sin ellos esta aventura no hubiera sido tan amena.

A mi compañera de laboratorio, Carla Barragán, por su gran apoyo en el proceso.

## Índice de contenido

Índice de tablas .....	13
Índice de figuras y gráficos.....	14
Lista de abreviaturas y símbolos .....	15
1. Resumen.....	16
2. Introducción.....	17
3. Marco teórico.....	19
3.1 Células troncales e Historia sobre el estudio de la pluripotencia .....	19
3.1.2 Reprogramación celular. ....	23
3.2 Línea celular hESC H9 .....	24
3.3 Línea celular Amicqui-1 .....	25
3.4 Factores de pluripotencia.....	26
3.4 Caracterización de células troncales pluripotentes.....	34
3.4.1 Técnicas de evaluación de pluripotencia.....	35
3.5 Clonación molecular.....	38
3.6 Vectores recombinantes .....	40
3.6.1 Vectores reporteros con GFP.....	41

4. Planteamiento del problema.....	43
5. Justificación.....	44
6. Hipótesis.....	45
7. Objetivos .....	45
7.1 General .....	45
7.2 Específicos .....	45
8. Métodos experimentales .....	46
8.1 Diseño experimental .....	46
8.2 Tipo de estudio .....	46
8.3 Criterios de inclusión/exclusión.....	46
8.4 Grupos de estudio .....	47
8.5 Análisis estadístico .....	47
9. Materiales y métodos .....	48
9.1 Primera fase experimental: Desarrollo del reportero pAAV-POU5F1-IRES-GFP .....	48
9.1.1 Diseño y preparación de vector.....	48
9.2 Segunda fase experimental: Transfección y evaluación de funcionalidad del reportero pAAV-Pou5F1-IRES-GFP .....	53

9.2.1 Cultivo celular y transfección.....	53
9.2.2 Citometría de flujo .....	54
9.2.3 Selección de células positivas GFP .....	55
9.2.4 Cinética de proliferación celular.....	55
9.2.5 Análisis de perfil pluripotente .....	56
10. Resultados .....	58
10.1 Desarrollo del vector reportero pAAV-pou5f1-IRES-GFP .....	58
10.2 Evaluación de expresión de GFP .....	59
10.3 Evaluación de la proliferación celular.....	61
10.4 Evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia .....	63
11. Discusión.....	66
12. Conclusiones.....	71
REFERENCIAS.....	71

## Índice de tablas

Tabla 1. Grupos de estudio del proyecto.....	46
Tabla 2. Digestión por enzimas de restricción.....	49
Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificación de región promotora de POU5F1... ..	49
Tabla 4. PCR para amplificación de secuencia promotora <i>POU5F1</i> .....	50
Tabla 5. Condiciones de amplificación de secuencias promotoras .....	50
Tabla 6. Reacción de ligación .....	51
Tabla 7. PCR para amplificación de secuencia promotora <i>POU5F1</i> .....	52
Tabla 8. Mezclas de reactivos para transfección con <i>Lipofectamine™ Stem Transfection Reagent</i> .....	53
Tabla 9. Proporciones de anticuerpos empleados para inmunocitoquímica .....	57

## Índice de figuras y gráficos

Figura 1. Relación entre desarrollo embrionario y la potencia. ....	20
Figura 2. Registro internacional de células troncales pluripotentes humanas (hPSCreg).. ....	25
Figura 3. Expresión de Oct3/4 en el ciclo de vida de ratón. ....	28
Figura 4. Relación entre los niveles de expresión de Oct3/4 y los destinos celulares de las células troncales. ....	29
Figura 5. Formación de quimeras para evaluar la pluripotencialidad. ....	38
Figura 6. Pasos de clonación molecular.....	40
Figura 7. Mapa de restricción de pAAV-IRES-GFP.....	49
Figura 8. Desarrollo del vector reportero pAAV-POU5F1-IRES-GFP.....	59
Figura 9. Evaluación de la expresión del reportero GFP en las líneas celulares transfectadas.....	60
Figura 10. Cinética de crecimiento celular de las líneas celulares H9 y Amicqui-1. ....	63
Figura 11. Expresión de los marcadores de pluripotencia Oct3/4, Nanog y Sox2. ....	65

## Lista de abreviaturas y símbolos

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>bFGF</b>	Basic Fibroblast Growth Factor
<b>BSA</b>	<i>Bovine Serum Albumin solution</i>
<b>dsDNA</b>	ADN de doble cadena
<b>EB</b>	Cuerpos Embrioides
<b>ESC</b>	Célula troncal embrionaria
<b>ESCs</b>	Células troncales embrionarias
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i>
<b>GFP</b>	Proteína Verde Fluorescente
<b>hiPSC</b>	Human Induced Pluripotent Stem Cell
<b>ICM</b>	Inner Cell Mass
<b>iPSCs</b>	Células pluripotentes inducidas
<b>Klf4</b>	4 Kruppel-like factor
<b>mARN</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>miARN</b>	micro ARN
<b>MSC</b>	Célula troncal mesenquimal
<b>ng</b>	nanogramos
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline
<b>PCR</b>	Reacción en cadena polimerasa
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reverse transcription polymerase chain reaction
<b>V</b>	Volts
<b>VHC</b>	Virus de Hepatitis
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>µL</b>	Microlitros

## 1. Resumen

Las células troncales embrionarias humanas (hESC), por su capacidad de diferenciación hacia cualquier linaje de las tres capas germinales y autorrenovación son de gran importancia para la investigación y las terapias de medicina regenerativa; sin embargo, el estado de pluripotencia en las células hESC es un factor determinante y limitante para su posterior aplicación terapéutica. Por lo que, resulta de vital importancia el evaluar esta singularidad en las hESC de manera continua, no obstante, los métodos de selección y evaluación utilizados actualmente presentan desventajas como la alta demanda de tiempo, los altos costos y no son métodos escalables. En el presente trabajo, se desarrolló el reportero celular pAAV-POU5F1-IRES-GFP que contiene la secuencia del promotor de Pou5f1, un gen fundamental en el mantenimiento de pluripotencia. El vector desarrollado se transfectó a las líneas hESC H9 y Amicqui-1 aislando las células positivas a GFP (GFP+) para comparar su tasa de proliferación y expresión de marcadores de pluripotencia Oct3/4, Nanog y Sox2. Se observó una correcta expresión del reportero GFP+ posterior a su inserción en las líneas hESCs H9 y Amicqui-1. Adicionalmente, las células GFP+ seleccionadas en la línea H9 presentaron un incremento significativo ( $p < 0.001$ ) en la tasa de proliferación en comparación con las células control; en contraste no se observaron cambios significativos ( $p < 0.91$ ) en la línea Amicqui-1. Así mismo, la expresión de Oct3/4 fue mayor en las células GFP+ con respecto a los controles en ambas líneas, sin embargo, solo estadísticamente significativa para las células Amicqui-1 GFP+ ( $p < 0.002$ ). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de los marcadores Sox2 y Nanog en ninguna de las dos líneas. Los resultados obtenidos sugieren, que la selección de poblaciones positivas al reportero celular pAAV-POU5F1-IRES-GFP, conlleva la obtención de poblaciones celulares con un incremento en la expresión de Oct3/4 y con una mayor tasa de proliferación; sin embargo, aún es necesario obtener mayor evidencia para determinar la funcionalidad del vector sobre distintas líneas celulares y estados de pluripotencia.

## 2. Introducción

Las células troncales pluripotentes embrionarias (hESC) se definen como células con capacidad de autorrenovación y diferenciación hacia las tres capas germinales. (Terryn et al., 2018). El uso de células hESC presentan ventajas tales como el estudio de fenotipos de enfermedades humanas difíciles de replicar en modelos animales, el estudio de procesos de biología del desarrollo, la generación de terapias nuevas basadas en la medicina regenerativa y de precisión, además de favorecer la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas (Cota-Coronado et al., 2019;).

La pluripotencialidad, que es una característica fundamental de las células troncales se controla a través de la regulación de la expresión génica de diversos factores de transcripción, incluidos Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, entre otros (Akberdin et al., 2018). De estos, Oct3/4 (también conocido como POU5F1) destaca como un elemento fundamental para el mantenimiento y generación de líneas pluripotentes. Actualmente, se ha logrado identificar que al menos la expresión de 581 genes relacionados al estado pluripotente está vinculados a la expresión de Oct3/4 en hESCs, y se ha reportado que los niveles de expresión de Oct3/4 modulan el estado pluripotente de las líneas hESC (Maurizo & Hans R., 2001; Radziskeuskaya & Silva, 2014).

Un paso crítico para establecer y mantener líneas hESC en la investigación, implica la evaluación de su estado de pluripotencia. Para esto, ya se han descrito distintos métodos para estudiarla, como el ensayo de fosfatasa alcalina, la inducción de teratomas, la reacción en cadena de la polimerasa, la inmunocitoquímica (entre otros), no obstante, se considera que estos métodos presentan algunas desventajas como la alta demanda de tiempo y recursos (Lakshmipathy, 2014; Zhao et al., 2012).

El presente proyecto tuvo como objetivo el desarrollo de un reportero celular del estado de pluripotencia de células hESC a través del vector pAAV-IRES-GFP, donde la expresión de GFP está mediada por el promotor de Pou5f1. El vector

desarrollado fue empleado para la selección de células pluripotentes, a las cuales se les evaluó su capacidad proliferativa y la expresión de marcadores característicos de este linaje.

### **3. Marco teórico**

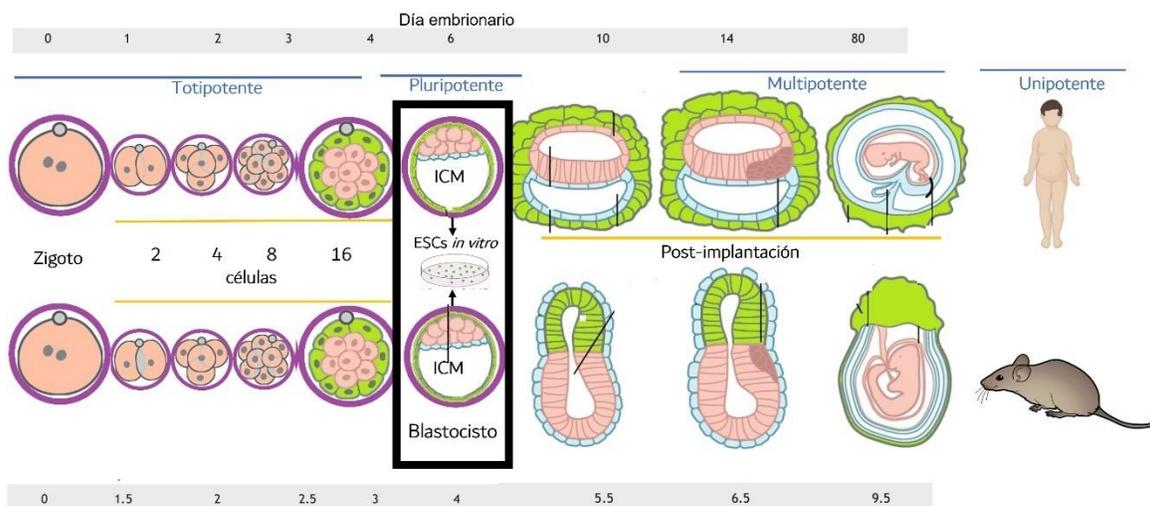
#### **3.1 Células troncales e Historia sobre el estudio de la pluripotencia**

De acuerdo con la *International Society for Stem Cell Research* (ISSCR), las células troncales se definen como células con capacidad de autorrenovación y diferenciación (Kim et al., 2011). Este tipo de células puede encontrarse tanto en el desarrollo embrionario como en la etapa adulta, sin embargo, sus características varían dependiendo de su clasificación (Kolios & Moodley, 2013).

La clasificación de las células troncales se da en función de su capacidad de diferenciación, es decir, la cantidad de linajes celulares a los que se pueden diferenciar, de esta forma, se agrupan en totipotentes, pluripotentes, multipotentes y unipotentes (De Miguel et al., 2010).

La pluripotencia de las células troncales tiene su origen durante el desarrollo embrionario. Posterior a la fecundación del ovocito por el espermatozoide se produce el cigoto, una célula troncal totipotente caracterizada por tener la capacidad de diferenciarse a cualquier estirpe celular y formar un organismo “completo”, que puede generar células extraembrionarias del trofoblasto y de la masa celular interna (ICM), esta etapa del desarrollo tiene lugar en el día E2.0 en los humanos y en los días E0.5 en modelos murinos. Las subsecuentes divisiones celulares durante la embriogénesis generan un grupo de células conocidas como blastómeros que posteriormente se compactan y dan lugar al blastocisto (E4.0 y E6.0 modelo humano y murino respectivamente) donde pueden obtenerse las células troncales embrionarias (ESCs), estas son células pluripotentes caracterizadas por su potencial de diferenciación hacia los tres linajes celulares (endodermo, mesodermo y ectodermo) y tienen origen en la ICM del blastocisto. Conforme avanza la embriogénesis, se inicia la gastrulación, en la que las células pierden su carácter pluripotente y se comprometen con uno de los tres linajes celulares, estas son

células multipotentes que tienen un potencial de diferenciación limitado ya que solo pueden diferenciarse a linajes celulares especializados (por ejemplo, progenitores neurales y células troncales mesenquimales) (Preininger et al., 2016). Finalmente, las células van perdiendo su capacidad de diferenciación siendo restringida a una estirpe celular específica y su capacidad de autorrenovación es limitada (ejemplos) (Preininger et al., 2016; Siddiqui, 2015).



**Figura 1. Relación entre desarrollo embrionario y la potencia.** El desarrollo embrionario comienza con la fertilización. Los cigotos de 1 célula y los blastómeros de embriones de 2 células son totipotentes. La transición de células totipotentes a pluripotentes tiene lugar entre la etapa de 4 células y la de mórula. Las células ICM en los blastocistos son pluripotentes. Durante el desarrollo posterior a la implantación, algunas células madre específicas de tejido o células progenitoras siguen siendo multipotentes, mientras que la mayoría se convierte en células unipotentes y diferenciadas terminalmente. Figura extraída y modificada de Shahbazi (2020).

Se podría considerar que el conocimiento y estudio de las células embrionarias pluripotentes dio inicio alrededor de 1870, como resultado de la teoría del origen embrionario del cáncer, donde se le atribuía el desarrollo de los tumores a la existencia de “restos embriónicos” en el cuerpo, fue así como los teratomas

(benignos) y los teratocarcinomas (malignos), definidos como tumores compuestos de células y tejidos de las tres capas germinales, se convirtieron en el modelo de estudio preferido para entender la tumorigénesis y la proliferación celular (Sell, 2010).

En 1954, Stevens encontró que una línea celular de ratón (linaje 129) presentaba una alta incidencia a desarrollar teratomas testiculares, experimentos posteriores con estos tumores demostraron que se podía obtener cuerpos de tipo embriode al trasplantar los tejidos neoplásicos en la cavidad abdominal del ratón y que era posible generar teratomas y teratocarcinomas implantando material embrionario, óvulos fecundados o gónadas primordiales (provenientes del linaje 129) en los testículos de ratón (Stevens et al., 1954). En 1964 se demostró que los teratocarcinomas contenían células pluripotentes de naturaleza troncal con la capacidad de autorrenovarse tras inyectar intraperitonealmente células únicas provenientes de teratocarcinomas de las gónadas del linaje 129 de ratón y generar la formación de nuevos tumores en el sitio de inyección (Stevens, 1964).

Posteriormente, en la década de los 70's, se logró aislar y cultivar células de teratocarcinoma *in vitro* y a las que se les denominó células de carcinoma embrionario (EC). El estudio de las EC permitió que se desarrollaran condiciones de cultivo particulares para su propagación *ex vivo* sin afectar su capacidad de diferenciación y autorrenovación, esto fue posible gracias al co-cultivo de las mismas sobre una capa de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs por sus siglas en inglés, *Mouse Embryonic Fibroblasts*); los estudios con células EC sentaron las bases para el aislamiento y cultivo de células troncales embrionarias (ESC) (Martin & Evans, 1975; Rosenthal, 1970).

Mas adelante, en 1981 Martin Evans, Matt Kaufman y Gail Martin reportaron el aislamiento de ESC de ratón (mESC). Las líneas celulares fueron aisladas de la ICM y estas fueron cultivadas sobre una capa de MEFs. Las mESC establecidas

mantuvieron sus propiedades de autorrenovación, proliferación y pluripotencia *in vitro* y al igual que las EC tenían la capacidad de generar teratomas y cuerpos embrioides, sin embargo, a diferencia de las EC, las mESC poseían un cariotipo normal (Evans & Kaufman, 1981).

En 1995 se derivó la primera línea de ESC de primate a partir de embriones de mono *Rhesus sp.* Estas células al igual que las EC se cultivaron sobre una capa nodriza de MEFs y se determinó que poseían la capacidad de formación de teratocarcinomas, proliferación extendida y capacidad de diferenciación *in vitro* (Thomson et al., 1995). Este reporte fue la base para la generación de la primera línea celular embrionaria troncal de humano (hESC) que se generaría cuatro años más tarde por el mismo grupo de trabajo. Se utilizaron embriones de pacientes sometidos a fertilización *in vitro* que donaron sus embriones después de completar su tratamiento. A partir de los embriones se lograron derivar cinco líneas hESC que mantuvieron una proliferación indiferenciada y potencial de diferenciación hacia las tres capas germinales. Una de las líneas hESC obtenidas son las H9, que son ampliamente utilizada actualmente en la investigación de hESC y que fue empleada en este proyecto (Thomson et al., 1998).

Además de las EC y ESC, existen otros tipos celulares que también mantienen la capacidad de autorrenovación y pluripotencia, de estos destacan las células troncales pluripotentes inducidas (iPSC), que se definen como células pluripotentes que asemejan a las hESCs y que son obtenidas de células somáticas a través de la reprogramación celular por la inducción de expresión de factores de transcripción de pluripotencia y pueden cultivarse y mantenerse indefinidamente *in vitro* (Terry et al., 2018). Estas líneas celulares, al igual que las hESCs muestran un gran potencial para autorrenovarse y diferenciarse en todos los tejidos (a excepción de los extraembrionarios). Las iPSC son similares a las células embrionarias en

términos de morfología, expresión génica y estado de diferenciación, ambas tanto en *in vitro* como *in vivo* (Gomes et al., 2017).

Otro tipo de células troncales pluripotentes son las células germinales embrionarias (EGC por sus siglas en inglés *Embryonic Germ Cells*). Estas células se obtienen al inicio de la etapa de formación gonadas en el feto y, similar a las ESCs estas presentan la expresión de marcadores de pluripotencia y tienen la capacidad de formar teratomas, sin embargo, estas células, a diferencia de las ESCs poseen una capacidad de proliferar y generar quimeras es limitada (J. A. Thomson & Odorico, 2000). Por otro lado, también encontramos a las células troncales del epiblasto, estas son aisladas posterior a la implantación del blastocisto, en comparación con las hESC, la expresión de marcadores de pluripotencia es baja al igual que su papel en la formación de quimeras (Lai et al., 2015).

### **3.1.2 Reprogramación celular.**

Takahashi & Yamanaka, en el 2006, presentaron por primera vez la tecnología de las iPSC. En su trabajo demostraron que es posible generar células pluripotentes a partir de fibroblastos de ratón mediante de la inducción de cuatro factores de pluripotencia: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4 (denominados factores de Yamanaka). Las iPSC presentan las características morfológicas y moleculares de las células troncales embrionarias, además de la capacidad de diferenciarse hacia las tres capas germinales, inducir teratomas, formar quimeras y de transmitir la línea germinal.

Más tarde, Takahashi et al., 2007, probaron esta técnica de reprogramación con los mismos factores de transcripción en fibroblastos humanos. Los patrones de proliferación, la actividad telomerasa, la capacidad de formación de teratomas y las características morfológicas y moleculares de las células generadas fueron analizadas y los resultados mostraron una amplia similitud entre las células

pluripotentes inducidas y las células humanas embrionarias. Fue así como se dio lugar al término *Human Induced Pluripotent Stem Cell* (hiPSC).

A través de los años, los estudios exhaustivos sobre los mecanismos de reprogramación celular han propiciado el desarrollo de más métodos para la generación de líneas iPSC, incluido el uso de plásmidos, transposones, adenovirus, virus Sendai y mRNA entre otros (Gomes et al., 2017). Dados estos avances, las iPSCs se han utilizado en pruebas preclínicas y ensayos clínicos, pues mediante la reprogramación es posible que las células somáticas provengan de diversas fuentes y tejidos tal como la piel (Cota-Coronado et al., 2019; Gomes et al., 2017).

### **3.2 Línea celular hESC H9**

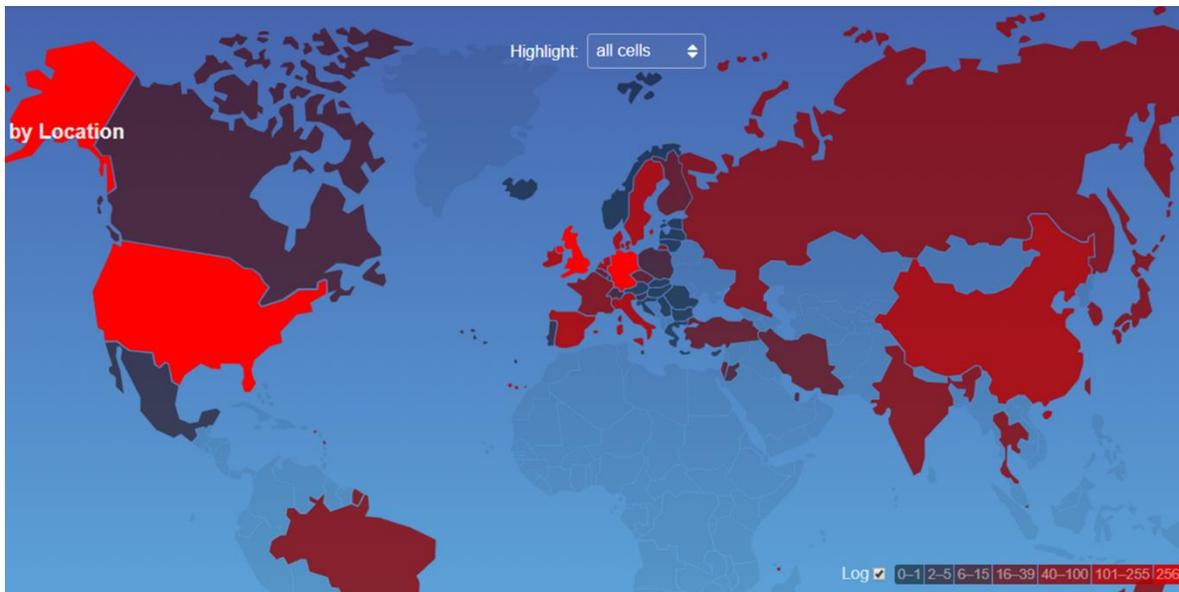
La línea celular hESC H9 fue una de las primeras líneas celulares troncales pluripotentes aisladas por el equipo de Thomson en 1998 y aún sigue siendo ampliamente utilizada en la investigación (Bongso & Richards, 2004). El aislamiento de estas hESC partió de la obtención de embriones donados producidos en una clínica de fertilización in vitro, estos embriones humanos se cultivaron hasta la etapa de blastocisto de donde se aislaron las masas celulares internas pluripotentes de 14 embriones, de las cuales solo se obtuvieron cinco líneas hESC de cinco embriones diferentes. Posterior al aislamiento de células hESC putativas, se observó que estas tenían las características morfológicas “clásicas” de las células ESC como una alta proporción núcleo: citoplasma, nucléolos prominentes y morfología de colonia. Adicionalmente, se buscó determinar que estas líneas celulares fueran, en efecto, pluripotentes, a través de distintos métodos de caracterización (discutidos más adelante).

Se evaluó y determinó que las hESC establecidas si presentaban los factores característicos de este tipo de líneas celulares como la actividad telomerasa; la expresión de marcadores de superficie celular comunes en las líneas hESC y EC SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81 (SSEA por sus siglas en inglés *Stage*

*Specific Embryonic Antigen*); potencial de formación de teratomas y diferenciación hacia las tres capas germinales. En particular, la línea H9 se caracteriza por tener un cariotipo normal (46XX) (Thomson et al., 1998).

### 3.3 Línea celular Amicqui-1

Actualmente existen alrededor de 834 líneas celulares hESC anotadas en el registro de líneas celulares humanas pluripotentes troncales hPSCreg por sus siglas en inglés *The human pluripotent stem cell registry (hPSCreg)*, de las cuales solo dos de ellas han sido desarrolladas y registradas en México; Amicqui-1 y Amicqui-2 (Figura 2).



**Figura 2. Registro internacional de células troncales pluripotentes humanas (hPSCreg).** En el registro internacional de células troncales pluripotentes humanas solo existen dos líneas celulares registradas en México. La cantidad de líneas celulares registradas por país se dividen por colores donde azul indica una cantidad de 0-1 mientras que el rojo brillante en el otro extremo indica que hay más de 256 líneas troncales pluripotentes humanas registradas en la región. Imagen extraída de <https://hpscereg.eu/>.

En el 2015, Ávila y sus colaboradores, establecieron una línea hESC de embriones de mala calidad donados por una clínica de fertilización *in vitro*. Los embriones donados fueron procesados para eliminar la zona pelúcida y posteriormente sembrados en una capa de células humanas amnióticas epiteliales (hAEC por sus siglas en inglés *human amniotic epithelial cells*). Se realizaron pasajes mecánicos de estas células hasta que se obtuvieron colonias con una morfología similar a hESC.

Una vez establecidas las colonias hESC putativas, se realizaron pruebas de caracterización que incluyeron el ensayo de fosfatasa alcalina, el análisis de la expresión de marcadores específicos de pluripotencia de manera cuantitativa y cualitativa (RT-PCR e inmunocitoquímica, respectivamente), el análisis de marcadores específicos de superficie por inmunocitoquímica y su capacidad de diferenciación hacia las tres capas germinales por métodos *in vitro* e *in vivo* (formación de cuerpos embrioides e inducción de teratomas). En adición, el cariotipo de la línea celular Amicqui-1 fue analizado (Normal 46XX). Fue así como se estableció la primera línea hESC registrada en México, Amicqui-1 (Ávila et al., 2015).

### **3.4 Factores de pluripotencia.**

Si bien los factores de Yamanaka son considerados fundamentales para el mantenimiento de la pluripotencia, existen otros factores que también pueden actuar como reguladores clave para reprogramar células somáticas en iPSCs o para mantener el estado indiferenciado y la capacidad proliferativa tanto de las hESC como iPSCs (Shyh-Chang & Daley, 2013). Es importante destacar que cada factor de pluripotencia tiene funciones específicas dentro de las células.

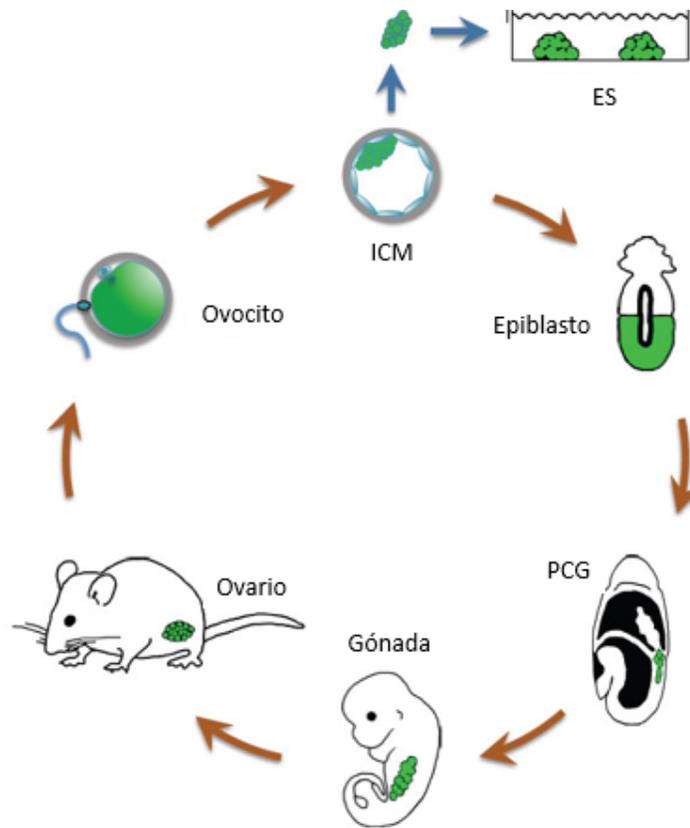
#### *Oct3/4*

Oct3/4 (también conocido como Oct4 o POU5f1) pertenece a la familia de factores de transcripción POU (Pit-Oct-Unc). Esta familia de factores de transcripción POU

puede activar la expresión de sus genes diana mediante la unión de un motivo de secuencia octamérica de una secuencia consenso AGTCAAAT. La característica distintiva de esta familia de factores de transcripción es el dominio POU, que consta de dos subdominios estructuralmente independientes: una región específica de POU (terminal) de 75 aminoácidos (aa) y un homeodominio de terminal de carboxilo (POUh) de 60 aa que hacen contacto específico con el ADN a través de una estructura de hélice-hélice (He et al., 2009; Kehler et al., 2004; Maurizo & Hans R., 2001).

El factor Oct3/4 se distingue por su expresión exclusiva en blastómeros, células embrionarias pluripotentes, células germinales, células de cáncer embrionario, y células germinales embrionarias (Radziskeuskaya & Silva, 2014).

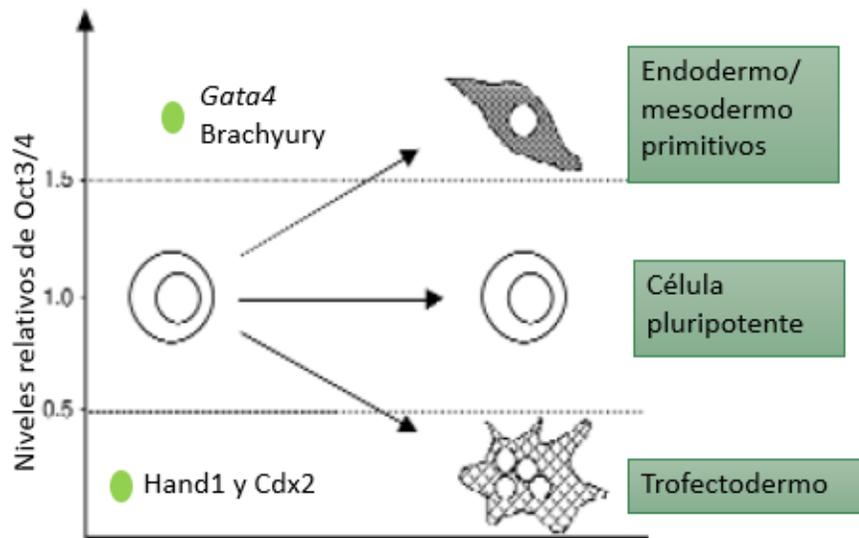
En el modelo murino de desarrollo, la expresión cigótica de Oct3/4 comienza previo a la etapa de ocho células y se mantiene constante en todas las células del embrión a lo largo de la etapa de la mórula, a medida que las células externas del embrión se diferencian en trofoblasto, la expresión de Oct3/4 se restringe a las células de la ICM en el blastocisto. Posterior a la implantación, la expresión de Oct3/4 se mantiene en el epiblasto y, finalmente, la expresión de Oct3/4 se limita únicamente a las células primordiales germinales (PGCs) que darán lugar a los gametos tal como se ilustra en la Figura 3 (Wu & Schöler, 2014).



**Figura 3. Expresión de Oct3/4 en el ciclo de vida de ratón.** La expresión de Oct3/4 comienza en la etapa cigótica y posteriormente es restringida a las células de la ICM en el blastocisto. Una vez iniciados los procesos de diferenciación la expresión de Oct3/4 se encuentra en el epiblasto y luego se limita a las células primordiales germinales (PCG) y finalmente a los gametos. Las células y tejidos que expresan Oct3/4 están marcadas en verde. Figura extraída y modificada de Wu & Schöler, 2014.

En un análisis cuantitativo de la expresión de Oct3/4 se determinó que niveles precisos de este factor de transcripción pueden mediar el destino de las células troncales embrionarias. Un incremento del doble en la expresión de Oct3/4 induce la diferenciación de las ESC hacia endodermo primitivo y mesodermo, aumentando

la expresión de marcadores de mesodermo y endodermo (Brachyury y Gata4, respectivamente), por el contrario, si la expresión de Oct3/4 se reduce, las células pierden pluripotencia, aumentando los niveles de expresión de los marcadores Hand1 y Cdx2 (característicos de trofotodermo) y las células se diferencian hacia linajes extraembrionarios, por lo que se requieren valores precisos de Oct3/4 para que las células ESC o iPSC puedan mantener su capacidad de autorrenovación y diferenciación (Figura 4) (Niwa et al., 2000).



**Figura 4. Relación entre los niveles de expresión de Oct3/4 y los destinos celulares de las células troncales.** Para mantener el estado de pluripotencia los niveles de expresión de Oct3/4 no deben exceder ni disminuir el 50% de la expresión diploide normal. Si la expresión de Oct3/4 aumenta más allá del 50% las células se diferencian hacia endodermo o mesodermo primitivo y se incrementa la expresión de marcadores de estos linajes, por otro lado, si la expresión de Oct3/4 disminuye las células troncales se redirigen al linaje del trofotodermo. Los puntos verdes indican algunos de los marcadores que aumentan su expresión en función de la cantidad de Oct3/4 expresada. Imagen extraída y modificada de Niwa et al., 2000.

Aún no se ha podido dilucidar completamente como es que la expresión del factor de transcripción Oct3/4 afecta la pluripotencia de las células, sin embargo, se ha logrado identificar que al menos la expresión de 581 genes está vinculada a la de Oct3/4 en ESCs humanas mientras que en células ESCs de ratón existen 963 genes regulados por la expresión de este factor de transcripción de los que se considera que solo 49 de ellos son genes diana primarios destacando a *Dgf4*, *Utf1*, *Fbx15*, *Sox2*, *Pdffa*, *Rex1*, *Nanog* y *Tc11* (Matoba et al., 2006). Cabe señalar que los niveles de Oct3/4 regulan la expresión de los genes asociados a este, por lo que, para un mantenimiento de la pluripotencia y capacidad proliferativa de las ESCs es necesario que la expresión de Oct3/4 se encuentre en niveles apropiados, es decir, algunos genes pueden ser reprimidos o activados en función de la cantidad de Oct3/4 presente (Matoba et al., 2006; Pan & Thomson, 2007; Zeineddine et al., 2014).

Esto sugiere que Oct3/4 interactúa con otros factores de transcripción formando bucles de autorregulación y regulación cruzada para mantener o no el estado pluripotente, además se ha reportado que Oct3/4 puede reclutar factores de transcripción y complejos represores como NuRD y PRC1 a locis genómicos de factores linaje- específicos para prevenir la diferenciación (Shi & Jin, 2010).

Si bien algunos de los genes relacionados directamente a la expresión de Oct3/4 ya han sido descubiertos, el nivel de expresión de Oct3/4 está modulado por múltiples factores y mecanismos que aún se desconocen y se requieren esfuerzos continuos para develar la compleja red reguladora asociada con el control preciso de la expresión de Oct3/4, en particular para comprender cómo se reactiva la expresión de Oct3/4 durante la reprogramación.

## Sox2

*Sex determining region Y-box* también conocido como Sox2 es un factor que pertenece a la familia de factores de transcripción SoxB1. Las proteínas de la familia

Sox comparten un grupo de alta movilidad de unión al ADN altamente conservado. Sox2 es considerado un regulador transcripcional importante de las células troncales pluripotentes y puede ejercer diferentes funciones biológicas dependiendo del contexto en función de su interacción con otros factores y cofactores (Zhang, 2014).

La expresión de Sox2 se detecta en la etapa de mórula y su expresión se restringe a la ICM del blastocisto y epiblasto en etapas posteriores, esto implica que Sox2 tiene un rol importante en la formación de células embrionarias troncales pluripotentes tempranas, de hecho, la delección de este factor es letal para el desarrollo embrionario ya que impide la formación del epiblasto pluripotente, además, su ausencia promueve la formación del trofotodermo (Maucksch et al., 2013).

Experimentos previos para determinar el rol de Sox2 en el mantenimiento de la pluripotencia de células ESCs han demostrado que una reducción en su expresión conlleva a la pérdida del estado pluripotente, lo cual se hace evidente por la alteración en la morfología celular, la pérdida de la expresión de antígenos de pluripotencia y la diferenciación de las células troncales principalmente a trofotodermo. Además, la desregulación de Sox2 decreta los niveles de Oct3/4 y Nanog (Fong et al., 2008). Experimentos subsecuentes han llevado a la aseveración de que Sox2 es un compañero regulador de Oct3/4 y que en conjunto dirigen la capacidad de autorrenovación y pluripotencia pues los elementos reguladores de los genes diana contienen elementos de Oct-Sox; por lo que es necesario que Sox2 y Oct3/4 trabajen de manera sinérgica para activar la expresión de estos genes incluyendo Oct3/4, Sox2, Nanog, y Fgf4, entre otros; todos ellos con un papel importante en el mantenimiento de la pluripotencia (Strebinger et al., 2019; Zhang, 2014).

En adición, Sox2 está altamente expresado en células de neuroectodermo, progenitores neurales y en células troncales neurales del cerebro adulto, en donde destaca su función en la prevención de la diferenciación de precursores neurales a un estado maduro (Avilion et al., 2003).

### *Nanog*

El factor de transcripción Nanog se caracteriza por ser una proteína con una secuencia *homeobox*, la proteína Nanog humana consta de 305 aa y posee 3 dominios funcionales: el N-terminal, el homeodominio y el C-terminal. La expresión de este factor fue inicialmente descubierta por su capacidad para contraponerse a las señales de diferenciación, lo que lo hace esencial para mantener las ESCs (Abranches et al., 2013; Gawlik-Rzemieniewska & Bednarek, 2016).

Este factor de transcripción se asocia a la autorrenovación de las células pluripotentes troncales y su expresión se encuentra en el epiblasto posterior proximal, el prosencéfalo y las células germinales (Chambers et al., 2003).

A pesar de que este factor no se encuentra contemplado en los factores de Yamanaka y con frecuencia es excluido de los cocteles de reprogramación (es inicialmente prescindible) su expresión leve o nula está asociada a células reprogramadas incompletas. *In vivo*, en un embrión sin Nanog la pluripotencia no se desarrolla y la masa celular interna queda atrapada en un estado indeterminado pre-pluripotente que resulta inviable, además, se ha demostrado que Nanog regula el desarrollo del epiblasto temprano del embrión y que esta función se recapitula en la culminación de la reprogramación de las células somáticas (Chambers et al., 2007; Silva et al., 2009). Se ha propuesto que Nanog modula la red transcripcional en conjunto con Oct3/4 y Sox2, pues la dinámica Nanog es el resultado de sus interacciones con otros genes de pluripotencia y vías de señalización, esto fue comprobado a través de ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina, donde se encontraron regiones de los genes en co-ocupancia de Nanog, Sox2 y Oct3/4

(Marucci, 2017; Pan & Thomson, 2007). En total son 352 los genes que muestran esta co-ocupación simultánea de esta red reguladora transcripcional y se ha demostrado que estos factores se unen a sus propios promotores, formando así un bucle de autorregulación para mantener la identidad de las células ES, por ejemplo, Oct3/4 mantiene la expresión de Nanog por una unión directa a su promotor, pero la reprime cuando los niveles de Oct3/4 se encuentran por encima de lo normal (Loh et al., 2006; Pan & Thomson, 2007; Zhou et al., 2017).

### c-Myc

c-Myc, junto con N-Myc y L-Myc son factores de transcripción que pertenecen a la superfamilia de proteínas de unión a ADN básicas hélice-bucle-hélice. Estos tres miembros principales de la familia Myc están involucrados en procesos celulares básicos que incluyen el metabolismo, la división celular, la diferenciación y la muerte celular (Murphy et al., 2005; Smith & Dalton, 2010).

En células ES, se considera que la expresión de c-Myc sirve para mantener la autorrenovación y potencia de las células, particularmente en las interacciones entre las células troncales y su microambiente (Liao et al., 2018). Se ha demostrado que la deficiencia de c-Myc en células ES inhibe la formación de cuerpos embrioides y al ser injertadas en ratones inmunodeficientes muestran una tumorigenicidad reducida y una vascularización escasa (Yoshida, 2018).

Actualmente se hipotetiza que c-Myc puede contribuir a la autorrenovación de las ESCs por dos modelos; (1) Regulación del ciclo celular específicamente para la autorrenovación, (2) modificación de patrones epigenéticos para promover la potencia e impedir la diferenciación, en cuanto a este modelo ya se ha reportado que este factor de transcripción facilita la acetilación de histonas, lo que resulta en una compactación laxa de la cromatina (eucromatina) permitiendo que Oct3/4 y Sox2 accedan a sus loci del genoma (Knoepfler, 2008).

En contraparte, c-Myc es un protooncogén frecuentemente asociado a carcinogénesis humana y tiene la capacidad de causar varios tipos de cáncer, por lo que algunos cocteles de reprogramación reemplazan este factor por L-myc (Chin et al., 2009; Crook et al., 2010).

### **3.4 Caracterización de células troncales pluripotentes**

La caracterización de las líneas ES fundamental, ya que es requerida por los organismos reguladores internacionales con el objetivo de confirmar la identidad, pureza, estabilidad genética y capacidad de diferenciación; además de comprobar que son seguras y útiles para su uso en investigación, ensayos clínicos y en la fabricación de productos biológicos. La Iniciativa Internacional del Banco de Células Troncales ha establecido criterios específicos que deben cumplirse antes de almacenar, utilizar y comercializar una línea ES (Gomes et al., 2017). La mayoría de los biobancos comparten métodos de caracterización para establecer líneas pluripotentes troncales que incluyen:

1. Observación de morfología de tipo embrionario
2. Evaluación de pluripotencia, incluyendo análisis o detección de fosfatasa alcalina
3. Detección de marcadores pluripotentes y la capacidad de renovación
4. Potencial de diferenciación tanto *in vitro* (formación del cuerpo embriode) como *in vivo* (inducción de teratomas)
5. Análisis de cariotipo para detectar anomalías cromosómicas
6. Ensayos microbiológicos para asegurar que el cultivo esté libre de posibles contaminantes biológicos (Gomes et al., 2017).

Por otro lado, las buenas prácticas de cultivos celulares, que deben llevarse a cabo durante todos los aspectos del manejo, almacenamiento y preparación de los cultivos, reguladas por la Organización Mundial de la Salud y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) establecen que debe desarrollarse una evaluación de los

donadores que incluya pruebas de detección del Virus de Inmunodeficiencia Humano (VIH-1 y VIH-2), virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC) y *Treponema pallidum* (sífilis) (Preininger et al., 2016).

La mayoría de los biobancos tienen métodos de caracterización comunes y trabajan bajo procedimientos estandarizados con la finalidad de garantizar la obtención de células de alta calidad con una alta tasa de supervivencia (Lin et al., 2019).

### **3.4.1 Técnicas de evaluación de pluripotencia**

Un paso crítico para establecer y mantener líneas de ES implica la identificación temprana de clones ES verdaderos y su posterior caracterización para garantizar la pluripotencia funcional (Hackett & Fortier, 2011). Se utilizan diversas técnicas de caracterización entre las que encontramos los siguientes:

#### *Ensayo de fosfatasa alcalina*

La fosfatasa alcalina es una enzima que cataliza la hidrólisis de esteres fosfato en condiciones alcalinas y se puede encontrar en procariotas y eucariotas (Sharma et al., 2014; Štefková et al., 2015). Esta enzima se encuentra altamente expresada en células pluripotentes troncales como las células embrionarias germinales (EG), ESC e iPSC. Los ensayos de fosfatasa alcalina son utilizados como un indicador inicial de reprogramación exitosa o del mantenimiento de pluripotencia en hESC, sin embargo, no es un reportero de alta sensibilidad pues los niveles de expresión de esta enzima fluctúan entre las células indiferenciadas y diferenciadas dependiendo del linaje. Esta técnica requiere de la fijación celular y la mayoría de las veces deja residuos de sustrato, lo que imposibilita el uso de las colonias teñidas ya que pierden su morfología y ya no pueden ser proliferadas una vez que se ha realizado el ensayo (Singh et al., 2012). Cabe destacar que los ensayos de actividad de fosfatasa alcalina no son suficientes para asegurar y caracterizar las células pluripotentes por lo que muchas veces es necesario complementar con más ensayos.

### *Ensayos de inmunocitoquímica*

La inmunocitoquímica permite determinar poblaciones celulares homogéneas en función de marcadores moleculares específicos, estas técnicas se basan en la detección de antígenos a través de reacciones inmunológicas y químicas. Para identificar células pluripotentes comúnmente se hacen estos ensayos utilizando de marcadores diana a los genes de pluripotencia Nanog, Oct3/4, Sox2, Klf4, y otros marcadores como SSEA-4, SSEA-3, TRA-1-160 y TRA-1-81, etc. (Bharathan et al., 2017; Hubert et al., 2011; Ramos-Vara, 2011).

### *Formación de cuerpos embrioides*

Las células troncales pluripotentes tienen la capacidad de formar cuerpos embrioides, compuestos por una agrupación de células pluripotentes que pueden ser inducidas a la diferenciación en función de la composición del medio, sin embargo; este ensayo no es considerado un método importante para demostrar pluripotencia (Schell,2012). Para la generación de estos agregados celulares es importante prevenir la adhesión de las células a las paredes de las cajas de cultivo, es decir, es necesario cultivarlas en suspensión. Los métodos estándar para el desarrollo de cuerpos embrioides pueden ser por vía goteo o por suspensión (Schell, 2012).

### *Perfil de expresión génica*

La expresión de los factores fundamentales de la pluripotencia puede ser empleada para determinar el estado de pluripotencia de las células troncales. Para esto se emplean métodos como la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (RT-PCR) para examinar los niveles de expresión de los factores de transcripción, de tal forma que es posible identificar y monitorear la expresión de los factores de pluripotencia, que junto con la generación datos cuantitativos del transcriptoma confirman la pluripotencia funcional y caracterizan a

las células pluripotentes con base a sus perfiles de expresión (Baghbaderani et al., 2016; Lakshmipathy, 2014; Ruff & Lieu, 2013).

#### *Inducción de teratomas*

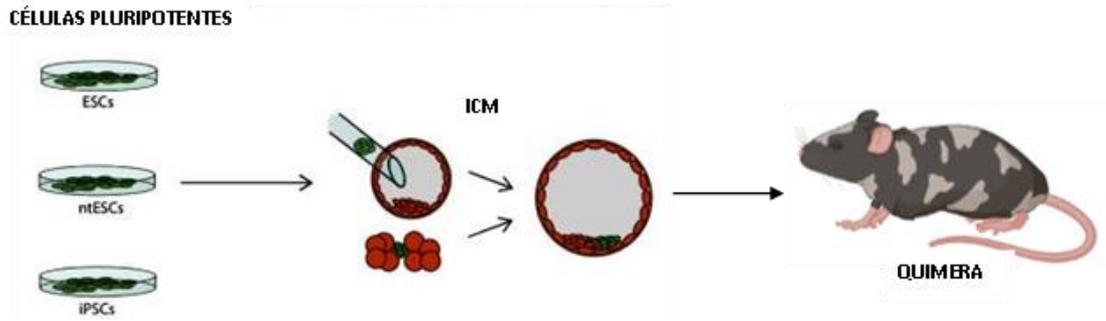
Un teratoma es un tumor benigno que contiene células características de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo) (Inoshima et al., 2012). La formación de teratomas es considerada el estándar de oro para definir la pluripotencia de las células troncales, durante estos ensayos las células pluripotentes putativas se trasplantan EN QUE REGION a ratones inmunodeficientes para posteriormente diferenciarse de forma espontánea (Gutierrez-Aranda et al., 2010).

#### *Formación de quimeras*

En biología, el termino quimera hace referencia a un organismo creado a partir de dos o más poblaciones celulares genéticamente diferentes originadas por distintos cigotos y son consideradas junto con la inducción de teratomas un estándar de oro para la evaluación de pluripotencia de líneas iPSC o ESC (Mascetti & Pedersen, 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, las líneas celulares ESCs e iPSCs comparten la característica fundamental de ser o asemejarse a células derivadas de embrión, lo que por defecto las hace capaces de contribuir a la formación de un organismo, y, en este sentido, esta capacidad puede ser fácilmente comprobada por la habilidad para formar quimeras (Levine & Gabel, 2017).

El procedimiento de formación de quimeras a partir de líneas celulares pluripotentes es relativamente sencillo pues solo requiere de la inserción de las líneas a probar dentro de la masa celular interna, tal como ilustra la Figura 5 (Polejaeva & Mitalipov, 2013).



**Figura 5. Formación de quimeras para evaluar la pluripotencialidad.** Las células pluripotentes a evaluar son inyectadas en un blastocisto de huésped y contribuyen a la formación del epiblasto más no del endodermo primitivo Figura extraída y modificada de Polejaeva & Mitalipov, 2013.

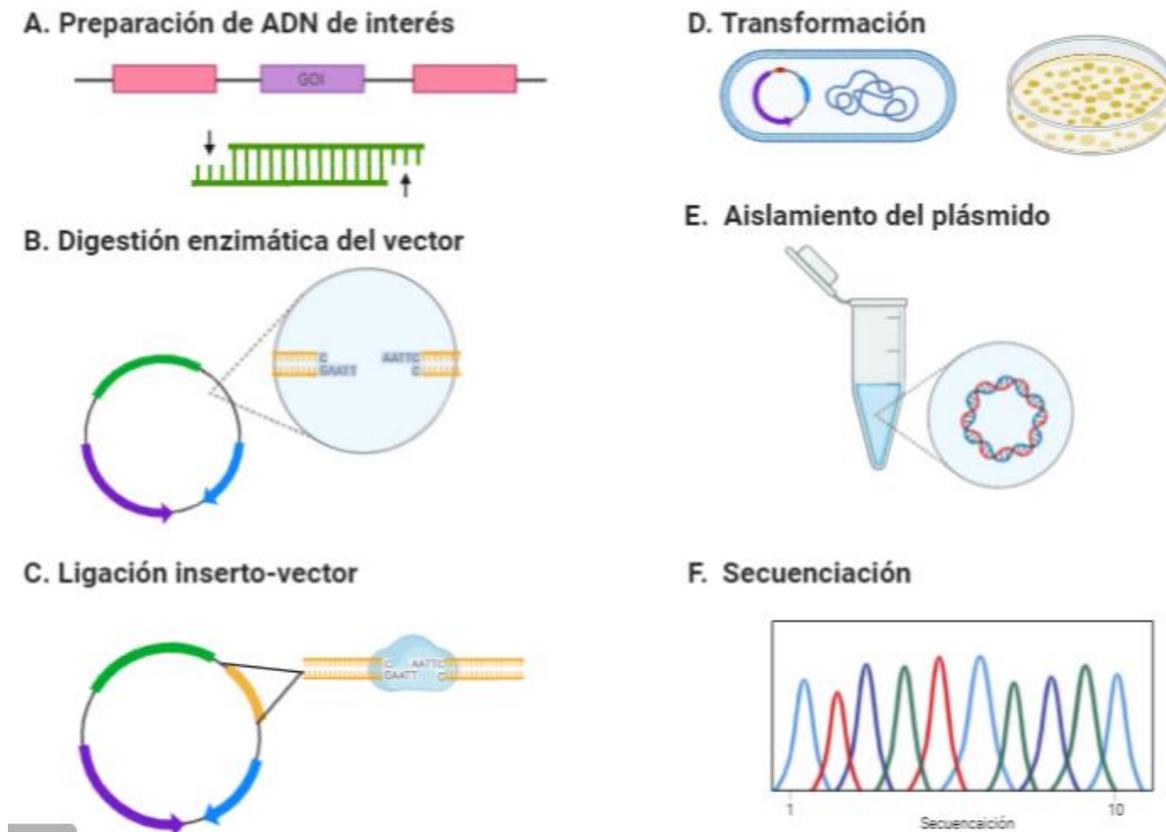
### 3.4 Clonación molecular

El proceso de clonación molecular consiste en insertar una secuencia de ADN exógena de interés para integrarla a un ADN circular conocido como vector para su posterior introducción a un huésped. Una vez dentro de la célula huésped, el vector se multiplica produciendo copias idénticas tanto de sí mismo como de la secuencia de interés. Los protocolos convencionales de clonación incluyen seis pasos básicos enlistados a continuación:

1. Preparación del ADN de interés (inserto): En este paso el ADN de interés es aislado comúnmente por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) adicionando sitios de restricción en los extremos para su posterior ligación. Es importante resaltar que para que los sitios de restricción generen extremos cohesivos, estos deben encontrarse también en el sitio de inserción dentro del plásmido (Figura 6 A).
2. Preparación del vector para la clonación: La preparación del vector de clonación consiste en la linearización de este a través de su digestión con enzimas de

restricción, para generar cortes en el sitio donde se desea insertar el ADN exógeno (Figura 6 B).

3. Ligación inserto-vector: El proceso de ligación consiste en la unión del ADN exógeno con el ADN del vector a través de la formación de enlaces fosfodiéster por acción de la enzima ligasa (Figura 6 C).
4. Transformación celular: Consiste en la introducción de material genético exógeno a bacterias empleando un vector plasmídico (Figura 6 D).
5. Identificación de colonias que contengan el vector recombinante y aislamiento de ADN plasmídico: La identificación de las bacterias transformadas con éxito es posible gracias a los marcadores de selección contenidos en el plásmido que, por lo general, confieren resistencia a antibióticos como la ampicilina y cloranfenicol (Figura 6 D).
6. Aislamiento y secuenciación del vector: La secuenciación permite determinar la secuencia nucleotídica del ADN y es relevante en la generación de un vector recombinante ya que permite caracterizarlo e identificar los posibles cambios genéticos en el plásmido y/o inserto (Figura 6 E y F) (Salazar et al., 2013).



**Figura 6. Pasos de clonación molecular.** (A) Preparación de ADN de interés o inserto que usualmente incluye la amplificación por PCR y adición de sitios de restricción en primers; (B) Digestión enzimática o linealización del vector; (C) Ligación inserto vector a través de la enzima ligasa; (D) Transformación de células químico o electrocompetentes; (E) Aislamiento de ADN plasmídico de colonias positivas a transformación; (D) Secuenciación de vector de clonación. Figura obtenida de Salazar et al., 2013.

### 3.5 Vectores recombinantes

Un vector es una molécula de ADN de doble cadena que tiene la capacidad de alojar un fragmento de ADN exógeno.

Los vectores se pueden clasificar en dos grupos de acuerdo con su tipo de aplicación; Vectores de clonación y vectores de expresión. Los vectores de

clonación corresponden a aquellos vectores cuyo fin último es el almacenamiento de secuencias y la obtención de grandes cantidades del ADN exógeno o de la molécula recombinante, estos suelen ser plásmidos, fagos, fagémidos o cósmidos. Los vectores de expresión son ampliamente usados con la finalidad de producir un transcrito o la proteína producto de este (Ezashi et al., 2016).

Como regla general, todos los vectores de clonación deben estar compuestos por elementos fundamentales como; el origen de replicación, marcador de selección para la identificación de células que hayan incorporado al vector y el sitio de clonación múltiple (Robinton & Daley, 2012).

### **3.5.1 Vectores reporteros con GFP**

La proteína verde fluorescente, mejor conocida como GFP (por sus siglas en inglés *Green Fluorescent Protein*) se aisló por primera vez en 1960 de la medusa *Aequorea victoria* y se convirtió en una de las proteínas más estudiadas y explotadas en las áreas de investigación gracias a su capacidad de autofluorescencia y emisión eficiente (Shimoura et al., 1962). Tras su descubrimiento, se logró clonar al gen de GFP en 1992 (Prasher et al., 1992); la proteína codificada por el gen de GFP consiste en 238 aa, tiene un espectro de absorbancia de 395-470 nm y emisión de 509-540 nm. A diferencia de otras proteínas fluorescentes, el gen de GFP contiene la secuencia del cromóforo responsable para la fluorescencia de GFP dentro de su región codificante (Stearns, 1995). En los 90's, Martin Chalfie y sus colaboradores lograron expresar GFP en *E. coli* y *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*); en *C. elegans* GFP se producía cuando una proteína con actividad específica se expresaba dentro de la célula (Chalfie et al., 1993); fue así como una de las primeras (y aún vigente) aplicaciones de GFP fue detectar la expresión génica *in vivo*.

Actualmente, la GFP es considerada un gen reportero, término que hace referencia a un gen con un fenotipo fácilmente detectable sobre el resto de las proteínas

endógenas. La clonación de regiones reguladoras y/o promotores cascada arriba de GFP y la exposición de células vivas a este constructo exógeno han sido ampliamente utilizadas para el monitoreo de la expresión génica en tiempo real (Clark et al., 2019).

#### 4. Planteamiento del problema

Las células troncales embrionarias humanas (hESC), son de gran importancia para la investigación por su capacidad de diferenciación, hacia cualquier linaje de las tres capas germinales, y autorrenovación, tanto para comprender los procesos del desarrollo humano como para la generación de sistemas de cultivo *in vitro* para estudiar las enfermedades humanas, perfiles génicos y el descubrimiento de dianas terapéuticas y fármacos. Actualmente, se considera a las hESC como una herramienta en las terapias de reemplazo y en medicina regenerativa relacionada con enfermedades crónico-degenerativas (Serra et al., 2012). La pluripotencia en las hESC es un factor determinante y limitante para su posterior aplicación, por lo cual resulta esencial monitorear el estado celular pluripotente e identificar a las células que presentan características no deseadas tales como deficiencias en la diferenciación, una baja tasa de crecimiento y una morfología anormal (Kato et al., 2014).

Debido a la importancia de la pluripotencia en las hESC, se emplean distintos métodos de evaluación de pluripotencia como la tinción con fosfatasa alcalina, la identificación y cuantificación de expresión de marcadores de pluripotencia por PCR en tiempo real, inmunotinciones y la inducción de teratomas. Sin embargo, los métodos *in vitro* actuales presentan desventajas tales como una alta demanda de tiempo, dificultad de estandarización, baja escalabilidad y disrupción o daño celular que imposibilita el uso de las células analizadas en ensayos posteriores (Cota-Coronado et al., 2019).

Es necesario el desarrollo de nuevos métodos de selección como una alternativa simple. Un enfoque para la solución de este problema es el desarrollo de reporteros celulares que contengan la secuencia de un promotor característico del estado de pluripotencia con un gen reportero como GFP. Este reportero permitirá evaluar y

monitorear el estado pluripotente en tiempo real y sin dañar a las hESCs con base a la fluorescencia emitida por la GFP.

## **5. Justificación.**

La investigación con células troncales pluripotentes embrionarias provee información relevante sobre el desarrollo temprano. Adicionalmente, las ESC son utilizadas para evaluar medicamentos, modelar enfermedades, y recientemente su aplicación en la medicina regenerativa y terapias de reemplazo ha crecido exponencialmente lo que se refleja en el número de ensayos clínicos registrados, donde se encuentran 54 registros (<https://clinicaltrials.gov>), los cuales utilizan a las hESC como tratamiento en diferentes padecimientos como la disfunción cardíaca, heridas severas y quemaduras, degeneración de la vista y problemas en la médula espinal, Parkinson y diabetes, entre otros. Los primeros resultados sugieren que los enfoques utilizados están funcionando y que las células hESC continúan siendo una alternativa altamente prometedora en el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas y genéticas.

Las células ES son cruciales hoy en día para comprender mejor la biología del desarrollo y para mejorar la aplicación médica de cualquier célula pluripotente, sin embargo, se tienen que considerar algunos factores críticos previos a su uso como lo es la selección, el mantenimiento y evaluación de la pluripotencia en estos linajes celulares, para lo cual se debe recurrir a métodos moleculares puesto que muchas veces las células en cultivo *in vitro* pueden mantener morfología similar a las células hESC y carecer de características moleculares y funcionales comparables. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de herramientas moleculares que informen fielmente sobre el estado de potencia y que no representen ningún riesgo en la aplicación clínica de las hESC.

## **6. Hipótesis**

La integración exitosa del reportero pAAV-Pou5F1-IRES-GFP a líneas hESC permitirá el monitoreo, identificación y selección de cultivos de células humanas troncales pluripotentes.

## **7. Objetivos**

### **7.1 General**

Desarrollar un nuevo reportero pAAV-Pou5F1-IRES-GFP para monitorear el estado de pluripotencia y seleccionar células troncales pluripotentes.

### **7.2 Específicos**

1. Construir un vector de expresión reportero pAAV-Pou5F1-IRES-GFP.
2. Integrar el vector reportero a líneas celulares hESC.
3. Seleccionar y aislar células hESC pluripotentes con base a la expresión de GFP.
4. Evaluar la capacidad de proliferación y la presencia de marcadores de pluripotencia en las líneas hESC seleccionadas a través del vector.

## 8. Métodos experimentales

### 8.1 Diseño experimental

El presente trabajo considera probar la funcionalidad del vector generado en dos líneas celulares pluripotentes hESC (H9 y Amicqui-1). Adicionalmente, se empleó una línea celular no pluripotente de fibroblastos humanos como control negativo de la expresión de GFP y un vector vehículo sin promotor como control negativo del tratamiento como se muestra en la Tabla 1.

**Tabla 1. Grupos de estudio del proyecto**

	Tratamiento	
Línea celular	Vector vehículo (control negativo)	Vector pAAV-POU5F1-IRES-GFP
H9		
Amicqui-1		
Fibroblastos (control negativo)	---	---

### 8.2 Tipo de estudio

El estudio realizado se considera un estudio experimental puro con un diseño clásico que considera la comparación entre grupo control y grupo de tratamiento.

### 8.3 Criterios de inclusión/exclusión

*Criterios de inclusión:*

Morfología y capacidad proliferativa normal

Líneas celulares pluripotentes previamente establecidas (H9, Amicqui-1).

Expresión de GFP posterior a la transfección

*Criterios de exclusión:*

Anormalidades morfológicas

Ausencia de expresión del gen reportero GFP, posterior a la transfección.

#### **8.4 Grupos de estudio**

Tal como se muestra en la Tabla 1, se considera un grupo control y un grupo test por cada línea celular incluida en el presente trabajo. Teniendo así un total de seis grupos de estudio en el presente proyecto (3X2).

#### **8.5 Análisis estadístico**

Inicialmente, se analizó la distribución de los datos obtenidos para determinar su normalidad a través de la prueba Shapiro-Wilk. Posteriormente, se realizaron análisis ANOVA de una y dos vías, según el caso, con prueba *post-hoc* tukey considerando un valor de significancia de  $p < 0.05$ .

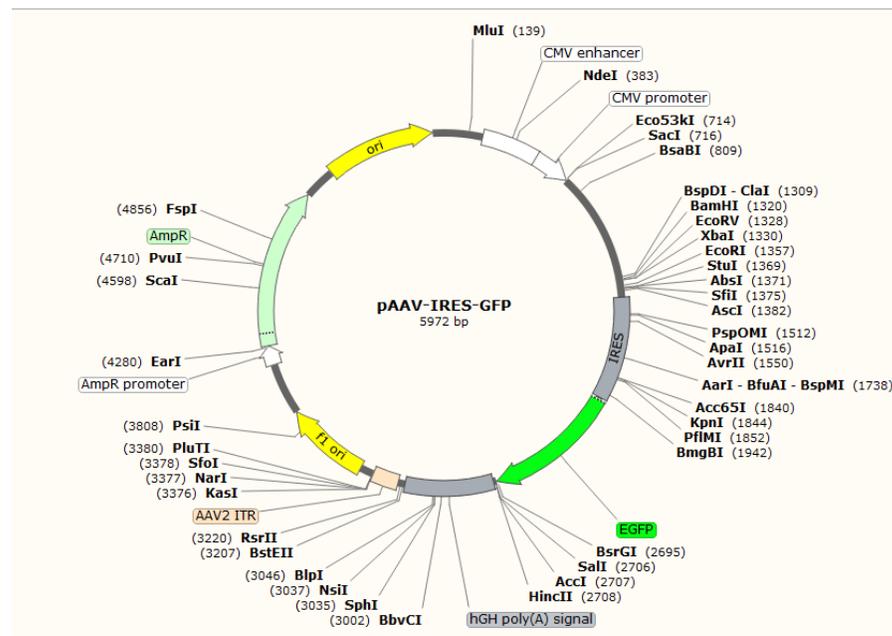
## 9. Materiales y métodos

### 9.1 Primera fase experimental: Desarrollo del reportero pAAV-POU5F1-IRES-GFP

#### 9.1.1 Diseño y preparación de vector

Para la generación del vector reportero se partió del vector comercial *pAAV-IRES-GFP expression vector* (cellbiolabs VPK-418). La secuencia del vector se ingresó en los programas *SnapGene* y *CLC Sequence viewer* para trazar un mapa de restricción del vector como se muestra en la Figura 7, donde se seleccionaron las enzimas de restricción BamHI y XbaI (Thermofisher Scientific ER0051 y ER0682, respectivamente).

La digestión del vector se realizó de acuerdo a las recomendaciones del proveedor como se muestra en la Tabla 2 incubando la reacción a 37°C por 2h. Finalmente, la inactivación de las enzimas se realizó a 80°C por 2h.



**Figura 7. Mapa de restricción de pAAV-IRES-GFP.** El mapa de restricción del vector pAAV-POU5F1-IRES-GFP se realizó a través del software SnapGene. Con base al mapa se seleccionaron las enzimas de restricción BamHI y XbaI.

**Tabla 2. Digestión por enzimas de restricción**

<b>Orden</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
1°	Agua grado Biología Molecular	Hasta completar 20 µL
2°	ADN plasmídico	500 ng
3°	Buffer Tango (10x)	2 µL
4°	BamHI	1 µL
5°	XbaI	1 µL

La secuencia del promotor Pou5f1 fue amplificada por PCR utilizando oligonucleótidos diseñados en la plataforma PRIMER3 con las bases de datos de *Genecode* y *Genecards* (ver tabla 3). El diseño de los oligonucleótidos se realizó con base al trabajo previamente reportado de Yang et al., 2005 y se añadieron los sitios de restricción correspondientes. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa OLIGO T4 (León, Guanajuato, México).

Para la amplificación de los promotores se utilizó el kit de la enzima *Phusion High Fidelity* de *New England Biolabs* (Cat. M0530S) de acuerdo con lo especificado por el proveedor como se muestra en la tabla 4, bajo las condiciones de amplificación presentadas en la tabla 5, por 35 ciclos. Posterior al aislamiento de la secuencia promotora, esta fue digerida bajo las mismas condiciones y enzimas de restricción previamente utilizadas para el vector.

**Tabla 3. Oligonucleótidos para amplificación de región promotora de POU5F1.**

Código	secuencia	Bp	Tm	Alineamiento	Producto (bp)
Y7_FW	AGCGGATCCCCAGAAAAACAGACCCTGA	29		65	1689
Y7_YR	TGCTCTAGAGATGGGTGGAGGAGAGGGAGG	30			

Azul: sitios de restricción

**Tabla 4. PCR para amplificación de secuencia promotora *POU5F1***

Orden	Reactivo	Cantidad
1°	Agua libre de nucleasas	Hasta completar 50 µL
2°	Buffer Phusion 5X	10.0 µL
3°	10 mM dNTPs	1.0 µL
4°	10 µM Forward Primer	2.5 µL
5°	10 µM Reverse Primer	2.5 µL
6°	ADN	250 ng
7°	Polimerasa Phusion	0.5 µL

**Tabla 5. Condiciones de amplificación de secuencias promotoras**

Etapa	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos
Desnaturalización	95°C	30 s
Alineación	Ver tabla 4	2 min
Elongación	72°C	1 min
Extensión final	72°C	10 min

La amplificación de la secuencia promotora y la linearización del vector se verificaron por electroforesis en gel de agarosa. Para la electroforesis se preparó un gel de agarosa *UltraPure* de *Thermo Fisher Scientific* al 1% y se tiñó con *SyberSafe DNA Gel Stain* (1x), además, se utilizó el marcador de peso molecular de 1kb *Invitrogen Plus Ladder*. Las condiciones de corrida fueron de 90V por 2h. La región del inserto correspondiente al tamaño de 1,689 pares de bases se purificó a través del kit QIAGEN gel extraction kit, de acuerdo con las instrucciones del proveedor

Una vez que se verificó el éxito en el aislamiento de la región promotora y la digestión del vector, se realizó una ligación inserto-vector para agregar la región promotora de Oct3/4 al vector. Para la reacción de ligación se tomaron en cuenta las recomendaciones del manual de la enzima ANZA T4 ligasa de *Thermo Fisher* cat. EL0011 (Tabla 6) considerando un radio molar de 5:1 (inserto: vector). Nuevamente, la ligación del vector se comprobó por electroforesis en gel de agarosa.

**Tabla 6. Reacción de ligación**

<b>Orden</b>	<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
1°	ADN libre de nucleasas	Hasta completar 20 µL
2°	Buffer de ligasa (5X)	4 µL
3°	ADN de vector	3-30 fmol
4°	ADN de inserto	15-150 fmol
5°	T4 ligasa	1 µL

Una vez ligada la secuencia promotora de Oct3/4 al vector, este fue transfectado en células *E. coli* TG4 electrocompetentes. En condiciones de esterilidad y en hielo, fueron agregados 130 µg de ADN plasmídico (3.2 µL) a un vial de células electrocompetentes (~50µL) y se mezcló delicadamente por pipeteo. La mezcla células-plásmido se transfirió a una cubeta de electroporación para posteriormente

introducirla en la cámara de electroporación. Las condiciones de electroporación fueron 1.5 V, 25  $\mu$ F por  $\sim$ 5.0 msec. La suspensión celular se transfirió a un tubo con 1 mL de medio Luria-Bertani (LB) y se incubó a 37°C por 1h. Una hora después, la suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 3 minutos, se descartó el sobrenadante y el pellet celular se sembró en dos placas Petri con agar de cultivo LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Finalmente, se dejó incubar durante 24h a 37°C.

Pasadas 24 h de incubación, fueron seleccionadas seis colonias distintas para comprobar la presencia del plásmido en el cultivo. Se realizó una PCR de colonia con el fin de identificar y seleccionar aquellas colonias bacterianas que presentaran la secuencia inserta de interés utilizando los oligos previamente diseñados de acuerdo con las indicaciones del proveedor del kit DreamTaq PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific cat. K1071) las proporciones utilizadas se enlistan en la Tabla 7, esta PCR de colonia se realizó bajo las condiciones previamente indicadas en la Tabla 5, por 35 ciclos.

**Tabla 7. PCR para amplificación de secuencia promotora *POU5F1***

<b>Orden</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
1°	Agua libre de nucleasas	Hasta completar 50 $\mu$ L
2°	DreamTaq PCR Master Mix	25.0 $\mu$ L
3°	10 $\mu$ M Foward Primer	1.5 $\mu$ L
4°	10 $\mu$ M Reverse Primer	1.5 $\mu$ L
6°	ADN	250 ng

Las colonias positivas a la presencia del vector fueron incubadas en 30 mL de medio de cultivo LB suplementado con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) y se incubaron a 37°C por

24h. Posteriormente, se purificó el ADN plásmidico del vector utilizando el kit QIAGEN miniprep (cat. 27106) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

El vector fue secuenciado por secuenciación Sanger en el Laboratorio de servicios genómicos (LABSERGEN), LANGEBIO, Cinvestav unidad Irapuato.

## **9.2 Segunda fase experimental: Transfección y evaluación de funcionalidad del reportero pAAV-Pou5F1-IRES-GFP**

### **9.2.1 Cultivo celular y transfección**

Las líneas celulares hESC H9 y Amicqui-1 se cultivaron sobre matrigel con medio de cultivo de mantenimiento hESC previamente condicionado en MEFs (DMEM/F12, 20% KOSR, aminoácidos no esenciales, L-glutamina, mercaptoetanol (0.05mM) y 4 ng/mL de FGF2) bajo condiciones de incubación de 37°C y 5%CO<sub>2</sub>.

Previo a la transfección del vector, se sembraron 50,000 células/pozo en placas de cultivo de 24 pozos previamente recubiertas con matrigel y se les realizó cambio de medio diariamente hasta obtener una confluencia celular del ~85% para su posterior transfección. Todos los ensayos de transfección se realizaron por triplicados.

Las células fueron transfectadas con el reactivo *Lipofectamine*<sup>™</sup> *Stem Transfection Reagent* (ThermoFisher STEM00001). De acuerdo con las indicaciones del proveedor, el primer día de la transfección se mezclaron los componentes de la Tabla 8 como se indica en la misma. Posterior a la mezcla de los reactivos por separado (tubo 1 y 2), las mezclas se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente mediante pipeteo integrar los componentes del tubo 2 al tubo 1 y ser incubados por 15 minutos a temperatura ambiente.

### **Tabla 8. Mezclas de reactivos para transfección con *Lipofectamine*<sup>™</sup> *Stem Transfection Reagent***

<b>Tubo</b>	<b>Componente</b>	<b>Volumen</b>
<b>1</b>	Medio Opti-MEM I	25 $\mu$ L
	<i>Lipofectamine Stem reagent</i>	2 $\mu$ L
<b>2</b>	Medio Opti-MEM I	13 $\mu$ L
	pAAV-POU5F1-IRES-GFP (43ng/ $\mu$ L)	12 $\mu$ L (500ng/ $\mu$ L)

En las placas de cultivo con las líneas hESCs, se retiró todo el medio de cultivo y se agregaron 150  $\mu$ L de medio de mantenimiento y 50  $\mu$ L de la mezcla anterior. Los cultivos se incubaron por 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 200  $\mu$ L de medio de mantenimiento a cada pozo y los cultivos se incubaron nuevamente a 37°C 5% CO<sub>2</sub> por 24h.

Como control negativo, un vector control sin promotor se transfectó a cada una de las líneas hESC. Adicionalmente se transfectaron de fibroblastos humanos con el vector diseñado como control negativo de acuerdo con el protocolo previamente descrito; el medio de mantenimiento de fibroblastos usado fue DMEM, SFB 10% y penicilina-estreptomicina 0.1%.

### **9.2.2 Citometría de flujo**

24 h posteriores a la transfección, se verificó la expresión de GFP a través del microscopio de fluorescencia invertido ZEISS Axio Vert con el filtro FITC. Las células transfectadas fueron analizadas por citometría de flujo para determinar el porcentaje de expresión de GFP en las líneas celulares transfectadas. Para esto, las células se lavaron dos veces con PBS 1X (.01M) previamente atemperado y se despegaron agregando 200  $\mu$ L/pozo de tripsina (0.025% v/v) y se incubaron por tres minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, la reacción se inactivó agregando 400  $\mu$ L de medio de mantenimiento para hESC. La suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm y se descartó el sobrenadante. El botón celular se lavó dos veces con 300  $\mu$ L

de PBS 1X, y fue resuspendido en una dilución DAPI: PBS (1:3000) incubando por 15 minutos a temperatura ambiente. Nuevamente la suspensión celular se centrifugó por 5 minutos a 1000 rpm y se le realizaron tres lavados con PBS. Finalmente, el botón celular se resuspendió en 500 µL de PBS 1X. Las muestras se analizaron en el citómetro BDFACS Melody para detectar el porcentaje celular de expresión de GFP. El citómetro se programó para detectar la fluorescencia de GFP y DAPI con la finalidad de establecer una relación porcentual entre el número de células presentando GFP sobre el número total de células analizadas (DAPI). Inicialmente se analizaron células de la misma estirpe sin marcaje con DAPI y sin expresión de GFP para establecer los parámetros de tamaño y granularidad celular.

### **9.2.3 Selección de células positivas GFP**

La selección de células positivas a GFP (H9 GFP+ y Amicqui-1 GFP+) se realizó manualmente designando las áreas que mostraban la expresión del reportero a través de microscopia de fluorescencia. Las células en las cuales se detectó la expresión de GFP se despegaron de cultivo de manera manual con ayuda de un *Scraper* celular y se recuperaron en medio de mantenimiento hESC. Después, se sembraron células únicas con expresión de GFP en una placa de 96 pozos completa. Para esto, las células seleccionadas se diluyeron a una concentración de 10 células/mL y se sembraron 100uL/pozo de la suspensión celular en una placa de cultivo de 96 pozos y se revisó detalladamente cada pozo sembrado para verificar que cada uno de estos contuviera una célula, aquellos pozos sin presencia de células o con una mayor densidad celular fueron descartados.

Los pozos con células únicas positivas a GFP fueron utilizados para los experimentos posteriores (cinética celular e inmunocitoquímica).

### **9.2.4 Cinética de proliferación celular**

La cinética celular de la línea H9 se realizó por un periodo de 15 días, determinando la densidad celular los días 5, 7, 9, 11, 13 y 15 posteriores a la siembra de célula

única. En el caso de la línea celular Amicqui-1, la proliferación se evaluó durante un periodo de 19 días y la determinación de densidad celular se realizó los días 7, 10, 13, 16 y 19. Para ambas líneas, los conteos celulares se realizaron por triplicado.

Los conteos celulares se realizaron con el dispositivo *Scepter Cell Count 2.0 (Millipore)* de acuerdo con las indicaciones del proveedor. En los días de conteo, las células se lavaron dos veces con PBS 1X previamente atemperado y se despegaron aplicando 50  $\mu$ L de tripsina por pozo para su posterior incubación por 4 minutos a 37°C. La reacción se inactivó con 100  $\mu$ L de medio de mantenimiento y las suspensiones celulares se recuperaron en microtubos de 1.5 mL para centrifugarlas por 5 minutos a 1000 rpm. Se descartó el sobrenadante y las pastillas celulares se resuspendieron en 100  $\mu$ L de PBS 1X; las suspensiones celulares en PBS 1X se analizaron con el sistema automatizado de *Scepter Cell Count 2.0 Millipore*.

#### **9.2.5 Análisis de perfil pluripotente**

Para confirmar la presencia de marcadores característicos de pluripotencia en las células GFP+ se realizó un ensayo de inmunocitoquímica para los marcadores Oct3/4, Sox2 y Nanog. Para este ensayo las células GFP+ y sus respectivos controles se sembraron en placas de cultivo de 8 pozos (*8-well culture slide* Falcon 354118) previamente cubiertas con matrigel. Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con paraformaldehído al 4% por 20 minutos en agitación continua y finalmente se realizaron tres lavados con PBS durante 5 minutos cada uno. Posteriormente, las células se permeabilizaron y bloquearon incubándolas durante una hora a temperatura ambiente en 100  $\mu$ L de la solución 1 (Suero normal de caballo al 10% y TritónX100 al 0.3% en PBS 1X/BSA 1%). Se retiró la solución 1 y se añadió el anticuerpo primario (Tabla 9.7) diluido en PBS 1X (0.01M) adicionado con suero normal de caballo al 10%, la incubación en el anticuerpo se llevó a cabo durante 18 horas a 4°C. Una vez terminado el periodo de incubación, las células se lavaron dos veces

en agitación lenta por 5 minutos con 200  $\mu$ L de la solución de lavado (PBS 1X y BSA 1mg/mL) se adicionaron los anticuerpos secundarios (Alexa 488 y Alexa 568) diluidos de acuerdo con la Tabla 9 en una solución de suero normal de caballo al 10% en PBS 1X. La reacción se incubó por dos horas a temperatura ambiente en agitación constante protegiendo las muestras de la luz y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente, las muestras se montaron con 30  $\mu$ L del reactivo para montaje *Vectashield mounting Reagent* con DAPI. Las tinciones fueron visualizadas bajo un microscopio de fluorescencia invertido ZEISS Axio Vert. A1 y se realizaron conteos estereológicos a una amplificación de 40X (área de focal de 0.0024 mm<sup>2</sup>) para determinar el porcentaje de expresión de marcadores pluripotentes en las células GFP+ con su respectivo control. Los experimentos se realizaron por triplicado.

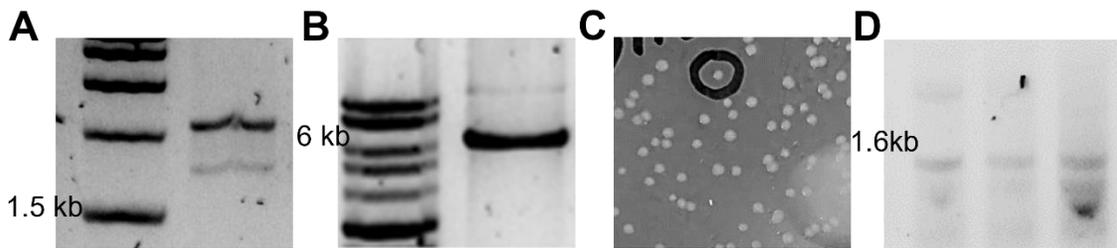
**Tabla 9. Proporciones de anticuerpos empleados para inmunocitoquímica**

<b>Anticuerpos primarios</b>	
<b>Anticuerpo</b>	<b>Factor de dilución</b>
Oct4 anti-rabbit 1mg/mL (abcam 19857)	(1:500)
Sox 2 anti-mouse 1mg/mL (abcam ab5603)	(1:500)
Nanog 1 mg/mL (Prepotech 500 P2-36)	(1:500)
<b>Anticuerpos secundarios</b>	
Alexa fluor 488 anti-rabbit 2mg/mL (a11034)	(1:1000)
Alexa fluor 568 anti-mouse 2mg/mL (a11004)	(1:1000)

## 10. Resultados

### 10.1 Desarrollo del vector reportero pAAV-pou5f1-IRES-GFP

Se aisló a la región promotora de Oct3/4 y se obtuvo un producto de 1689 pares de bases (bp) verificado por electroforesis en gel de agarosa como se muestra en la Figura 8. Además, la marca correspondiente al vector pAAV-POU5F1-IRES-GFP (Figura 8 B) muestra la integridad genómica el vector desarrollado (~6kb). En adición, se obtuvieron colonias *E. coli* TG4 positivas a la presencia del vector, de las cuales se seleccionaron seis colonias aleatoriamente para comprobar la presencia del vector con promotor Oct3/4 (Figura 8 C). Tres colonias *E. coli* fueron positivas a la presencia de pAAV-POU5F1-IRES-GFP (Figura 8 D). Asimismo, los resultados de secuenciación del vector mostraron una similitud del 95% con la secuencia promotora de Oct4 (ID: AJ297527.1) registrada en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus



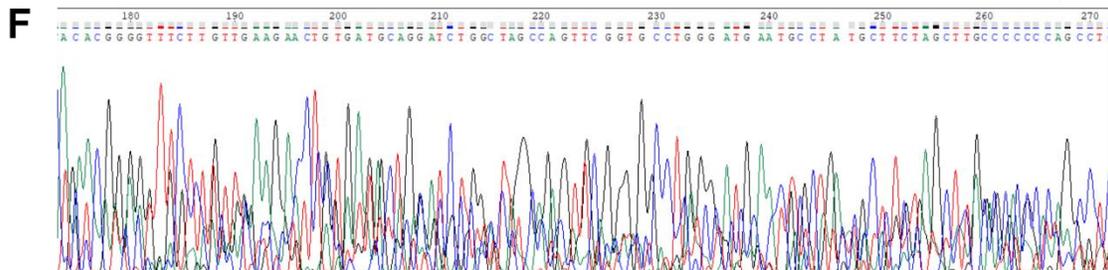
### E Homo sapiens Oct-4 gene promoter sequence

Sequence ID: [AJ297527.1](#) Length: 3204 Number of Matches: 1

Range 1: 1386 to 3083 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps
2700 bits(1462)	0.0	1623/1702(95%)	6/1702(0%)

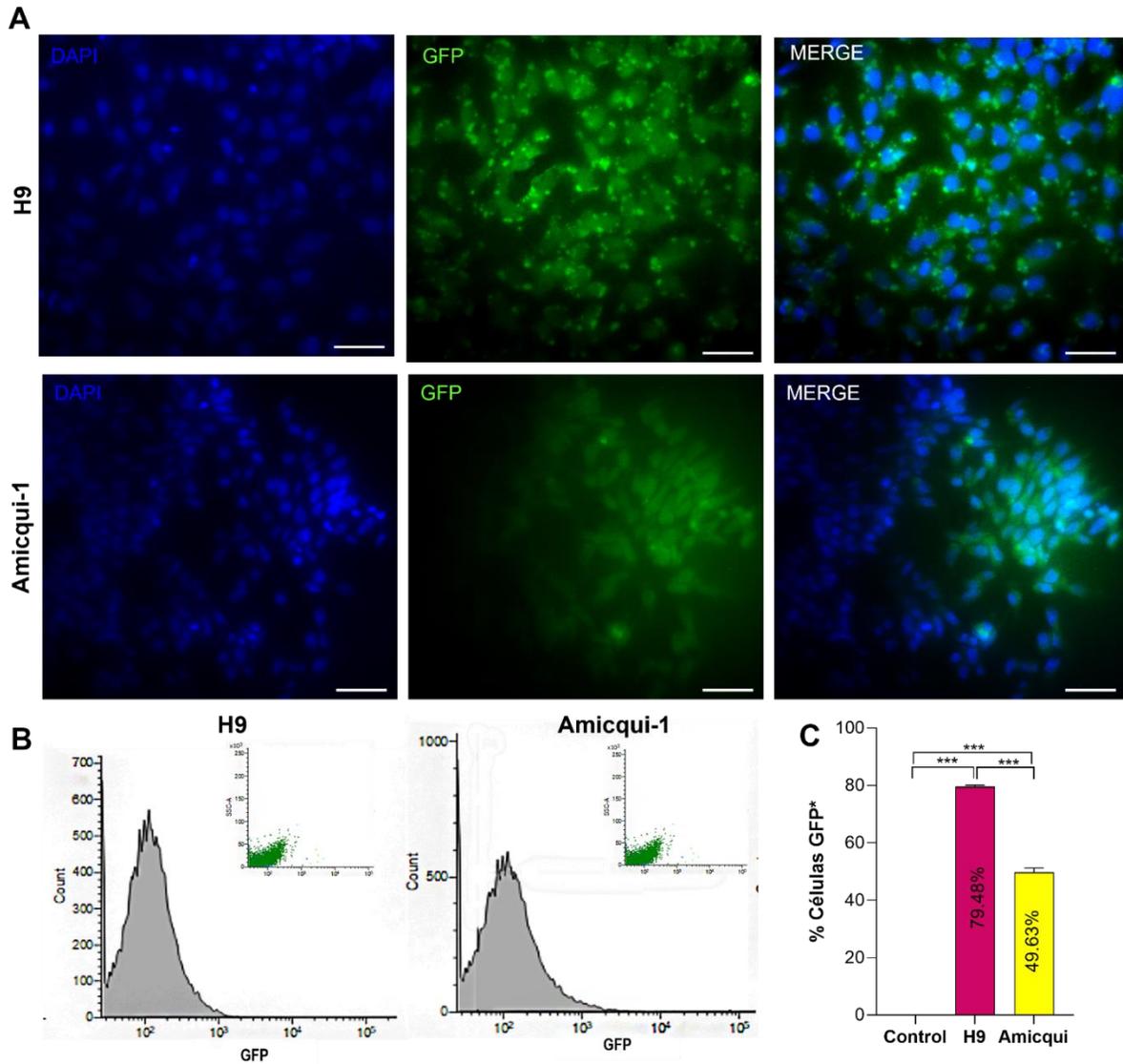


siglas en inglés, *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) Figura 8 E y F.

**Figura 8. Desarrollo del vector reportero pAAV-POU5F1-IRES-GFP.** (A) Electroforesis en gel de agarosa del aislamiento de la región promotora de Oct3/4 de 1689f bp (pares de bases). (B) Integridad del vector ligado a la secuencia promotora de Oct3/4; el tamaño del vector en 6kb (kilobases)(C) Colonias seleccionadas de *E. coli* transfectadas con el vector pAAV-POU5F1-IRES-GFP de manera aleatoria (en círculo). (D) PCR de colonias positivas a la presencia de la región promotora de Oct3/4; productos de PCR en tamaño de 1.6 kb, correspondiente con el tamaño del inserto (1689 kb). (E) Resultados obtenidos del análisis de alineamiento de la secuencia del vector en el genoma humano; el inserto presenta una similitud del 95% con la secuencia promotora Oct4 (ID: AJ297527.1).

## 10.2 Evaluación de expresión de GFP

Se evaluó la presencia de la expresión del vector reportero por microscopia de fluorescencia de manera cualitativa (Figura 9 A). Diferencias aparentes fueron observadas tanto en la cantidad de células que expresaron GFP, así como en la intensidad de fluorescencia entre las dos líneas celulares (H9 y Amicqui-1, respectivamente). No se observó la presencia del reportero GFP en la línea celular fibroblastoide (control negativo de línea celular) ni en las líneas celulares transfectadas con el vector control (control negativo de vector). Posteriormente, los análisis cuantitativos por citometría de flujo de la expresión celular de GFP (porcentaje) mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos analizados (control, H9 y Amicqui-1) [(F<sub>2,15</sub> =10091, p<.0001)] tal como se muestra en la Figura 9 B. La línea celular H9, presentó un mayor número de células positivas a la expresión de GFP (79.48%) en comparación a la población celular Amicqui-1 (49.63%) como se ilustra en la Figura 9 C.



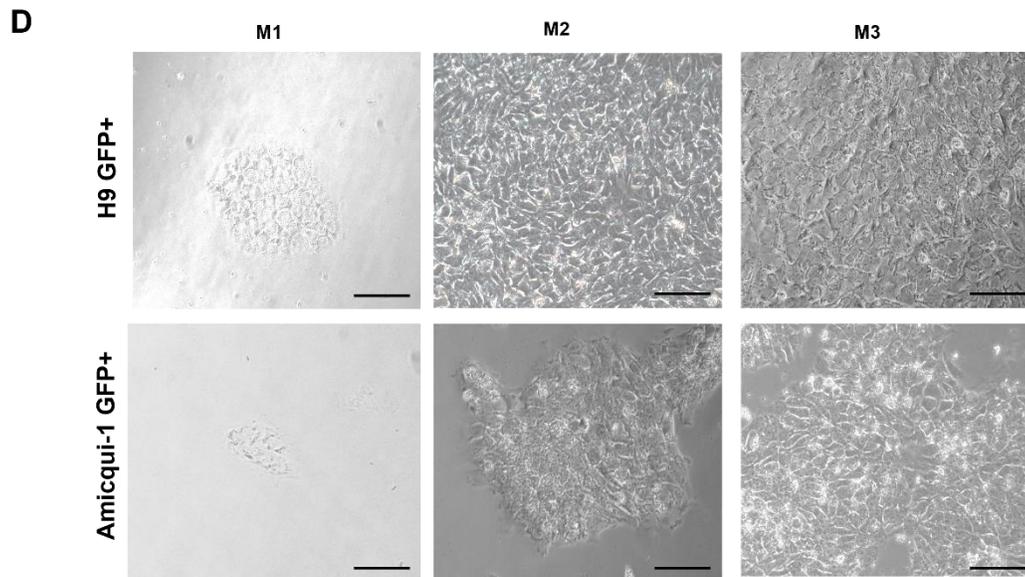
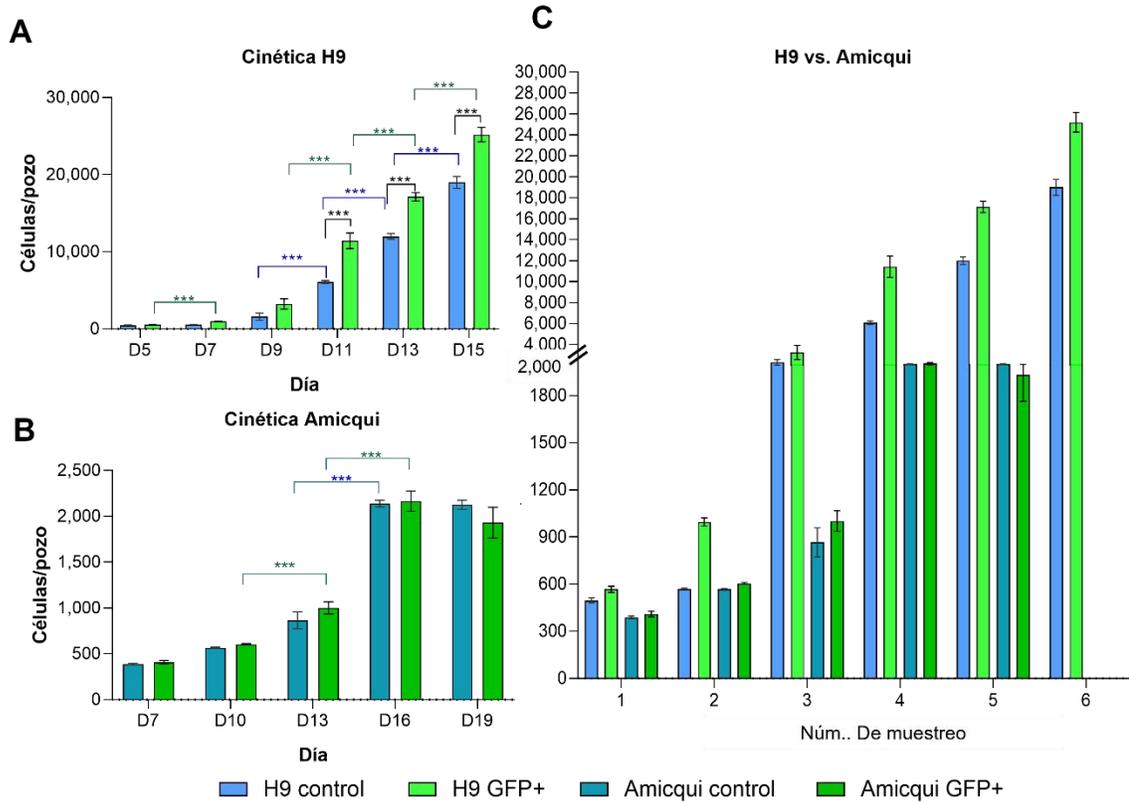
**Figura 9. Evaluación de la expresión del reportero GFP en las líneas celulares transfectadas.** (A) Imágenes de fluorescencia de la expresión de GFP en las líneas celulares H9 y Amicqui-1, 24 horas post-transfección. De izquierda a derecha se observa: marcaje de núcleos con DAPI, expresión de GFP y colocalización DAPI-GFP. (B) Histograma de conteo de células GFP+ por citometría de flujo; en la esquina superior derecha se observan los gráficos de proporción celular (tamaño FSC o detector de dispersión frontal por sus siglas en inglés *Foward Scatter* y SSC detector de dispersión

lateral por sus siglas en inglés *Side Scatter* en ejes X y Y, respectivamente). (C) Porcentaje celular de la expresión de GFP, se observan diferencias significativas entre los grupos analizados. Los resultados son expresados como medias  $\pm$  SEM. ANOVA de una vía seguida de la prueba post hoc de Tukey. Barra de escala: 50  $\mu$ m. \*\*\*  $p < 0.001$ ,  $n = 3$  en todos los grupos.

### 10.3 Evaluación de la proliferación celular

Para determinar si la selección de poblaciones celulares a través del vector reportero ejercía algún efecto sobre las colonias celulares, se comparó el índice de proliferación celular de las células que expresaron la GFP+ seleccionadas vs. su respectivo control.

Como se observa en la Figura 10 A, se observaron diferencias en la proliferación celular entre los grupos control y los grupos GFP+, estas diferencias fueron altamente significativas para las células H9 control vs H9 GFP+ ( $F_{1,56} = 86.30$ ,  $p < 0.0001$ ), siendo corroborado mediante la prueba *post-hoc Tukey* con una diferencia significativa entre el grupo H9 control vs. H9 GFP+ en los días 11 (control:  $6080 \pm 179$  . vs. GFP:  $11419 \pm 1006$ ), 13 [ $11991 \pm 363$ ,  $17131 \pm 532$ ] y 15 [ $19005 \pm 767$ ,  $25,198 \pm 937$ ] ( $p < .0001$ ) IC 95%. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en la proliferación de los grupos control y GFP+ de la línea celular Amicqui-1 ( $F_{(1,50)} = 0.0123$ ,  $p = 0.912$ ) como se observa en la Figura 10 B. Se observó que la tasa de proliferación de la línea celular Amicqui-1 fue menor a la línea H9 [ $F_{(3,100)} = 87.33$   $p < .0001$ ] tal como se ilustra en la Figura 10 C. Adicionalmente, se encontró que existe una diferencia significativa en el incremento de la población celular en función a los días en cultivo tanto en los grupos de H9 como en Amicqui-1 ( $F_{(5,56)} = 459.7$ ,  $p < .0001$  y  $F_{(4,50)} = 232$ ,  $p < .0001$ , respectivamente) (Figura 10).



**Figura 10. Cinética de crecimiento celular de las líneas celulares H9 y Amicqui-1.** (A) Se observaron diferencias significativas entre los grupos H9 Control vs. H9 GFP+, durante la cinética de proliferación celular durante los días ( $F_{(5,56)} = 459.7$ ,  $p < 0.0001$ ) así como debido a la expresión de GFP ( $F_{1,56} = 86.30$ ,  $p < 0.0001$ ). (B) Se encontraron diferencias significativas entre los grupos Amicqui-1 control y Amicqui-1 GFP+ durante la cinética de proliferación celular durante los diferentes días ( $F_{(4,50)} = 232$ ,  $p < 0.0001$ ) pero no por la expresión de GFP ( $F_{(1,50)} = 0.0123$ ,  $p = 0.912$ ,  $n = 3$ ). (C) Comparación general de la tasa de proliferación de las líneas celulares H9 y Amicqui-1 por día de muestreo; para H9 (días 5, 7, 9, 13, y 15) y para Amicqui-1 (días 7, 10, 13, 16 y 19). (D) Imágenes representativas en campo claro de las líneas celulares H9 GFP+ y Amicqui-1 GFP+ durante la cinética celular por cada muestreo (M1, M2 y M3). Los resultados son expresados como medias  $\pm$  SEM. Se utilizó ANOVA de dos vías seguida de la prueba post-hoc de Tukey. \*\*\* =  $p < 0.0001$ ;  $n = 3$  en todos los análisis. Barra de escala: 50  $\mu$ m.

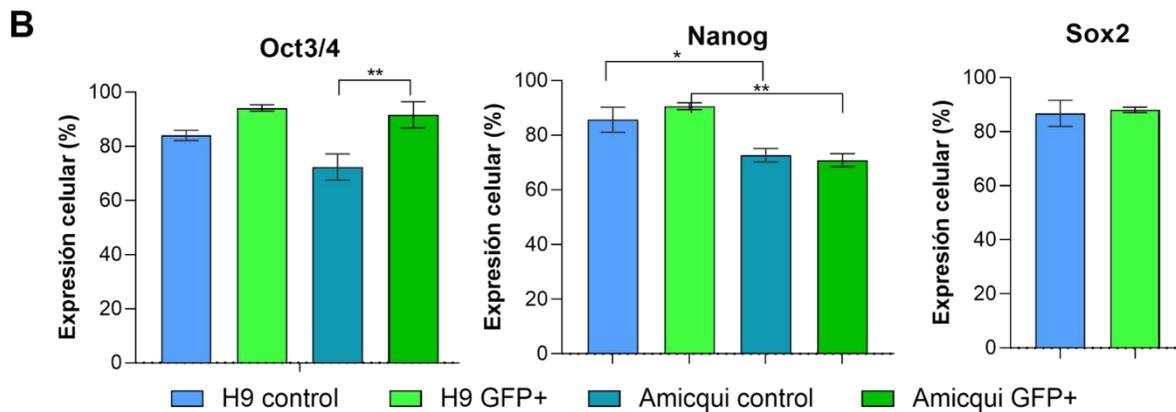
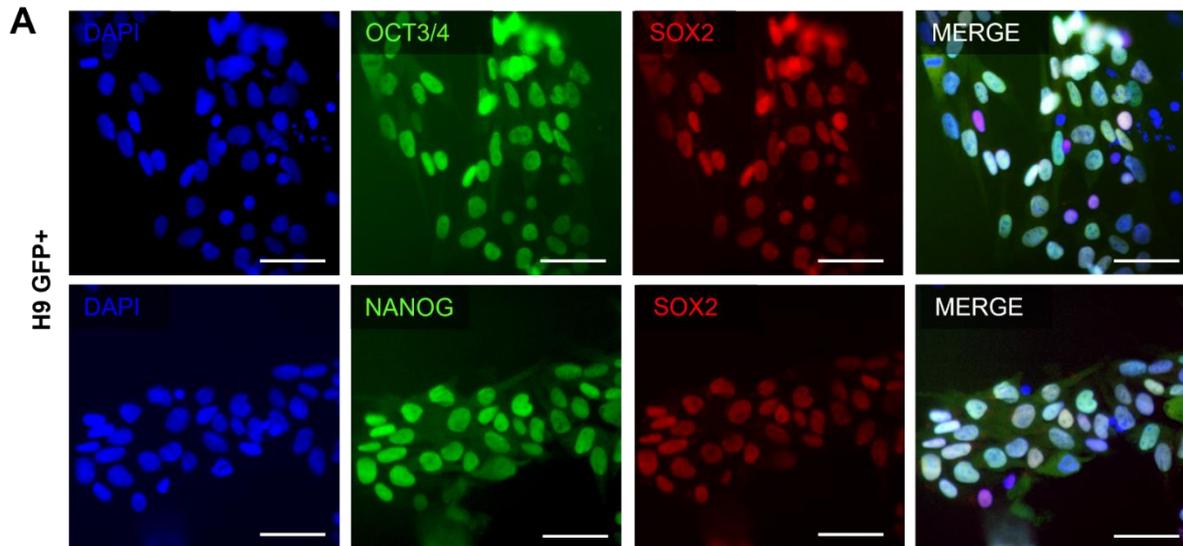
#### 10.4 Evaluación de la expresión de marcadores de pluripotencia

Al evaluar la expresión de marcadores de pluripotencia sobre los grupos de la línea H9 (Control y GFP+) se observó una diferencia significativa en la expresión de Oct3/4 ( $F_{(3,18)} = 5.659$ ,  $p = 0.0065$ ) tal como se muestra en la Figura 11 B. Se observaron diferencias no significativas ( $p > 0.578$ ) entre el porcentaje de expresión de Oct3/4 entre los grupos control ( $87 \pm 3.04\%$ ) y la línea celular H9 GFP+ ( $94.1 \pm 1.18\%$ ); las imágenes representativas de la expresión de marcadores de pluripotencia en la línea H9 se ilustran en la Figura 11 A. El análisis *post-hoc de Tukey* mostró que existe una diferencia significativa ( $p < 0.035$ ) en la expresión de Oct3/4 entre los grupos control ( $74.5 \pm 5.42\%$ ) y Amicqui-1 GFP+ ( $91.67 \pm 4.81\%$ ).

Respecto a la expresión de Nanog en los grupos evaluados, los resultados del ANOVA de una vía muestran que existen diferencias significativas en la expresión de Nanog entre los grupos ( $F_{(3,18)} = 9.806$ ,  $p = 0.0005$ ). Sin embargo, los resultados post-hoc muestran que no hay diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.6377$ ) entre las células H9 control ( $85.6 \pm 4.56\%$ ) y H9 GFP+ ( $90.6 \pm 1.25\%$ );

Adicionalmente, los grupos de la línea Amicqui-1 mostraron una expresión de Nanog del  $72.7 \pm 2.46$  y  $70.83 \pm 2.40$  %, estadísticamente no significativo ( $p=0.977$ ). En contraste, si se observó una diferencia significativa al comparar la expresión de Nanog entre las líneas celulares H9 control ( $85.67 \pm 4.56\%$ ) vs Amicqui-1 control ( $72.70 \pm 2.46\%$ ) ( $p=0.0021$ ) y H9 GFP+ y Amicqui-1 GFP+ ( $p=0.0023$ ) (Figura 11 A).

Finalmente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de Sox2 entre los grupos H9 control y H9 GFP+ (Figura 11) siendo las medias  $86.78 \pm 4.80$  y  $88.47 \pm 0.96$  %, respectivamente ( $t= 0.2566$ ;  $P=8027$ ).



**Figura 11. Expresión de los marcadores de pluripotencia Oct3/4, Nanog y Sox2.** (A) Microfotografías de fluorescencia de la expresión de marcadores de pluripotencia. De izquierda a derecha, tinción de núcleos con DAPI, Oct3/4 o Nanog, Sox2 y finalmente la colocalización celular de la presencia de estos marcadores. (B) Porcentaje de expresión celular de los marcadores Oct3/4, Nanog y Sox2 en los grupos control y GFP+ de las líneas celulares H9 y Amicqui. Se observa una diferencia significativa entre el grupo Amicqui-1 control y Amicqui-1 GFP+ ( $p < 0.002$ ). En la expresión de Nanog únicamente se observa una diferencia significativa entre las líneas celulares comparando los controles (H9 y Amicqui-1 control) y los GFP+, H9 y Amicqui-1 GFP+ ( $p < .02$  y  $p < 0.023$ , respectivamente). No hay diferencia significativa en la expresión de Sox2 entre los grupos H9 control y H9 GFP+, análisis t de student ( $t = 0.2566$ ;  $P = 8027$ ). ANOVA de una vía, análisis seguido de post hoc Tukey,  $n = 3$  (\* =  $p \leq 0.05$ , \*\* =  $p \leq 0.01$ , \*\*\* =  $p \leq 0.001$ ). Barra de escala 25  $\mu\text{m}$ .

## 11. Discusión

La capacidad de monitorear el estado de la pluripotencia en líneas celulares hESC e iPSC es de suma importancia tanto para la optimización y propagación de su cultivo, así como para su posterior aplicación en la investigación. En el presente trabajo se describe el diseño, desarrollo y evaluación de un vector reportero basado en el promotor de Oct3/4 para dirigir la expresión de GFP con la finalidad de determinar el estado pluripotente de líneas hESC. Para ello, se partió del diseño y construcción del vector y su posterior transfección a dos líneas celulares troncales pluripotentes (H9 y Amicqui-1) para determinar si este nuevo reportero celular tenía la capacidad de seleccionar células pluripotentes. Los resultados obtenidos sugieren que el reportero pAAV-IRES-GFP desarrollado es capaz de seleccionar células que tiene una tasa de proliferación mayor, sin embargo, los resultados en el análisis del perfil pluripotente por inmunocitoquímica no son concluyentes.

Se sabe con certeza que la expresión de Oct3/4 tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia en las células y que cuando la expresión de este se reduce, las células se diferencian (Niwa et al., 2000; Radzisceuskaya & Silva, 2014). Anteriormente, Yang et al., (2005), estudiaron la secuencia río arriba del gen Oct3/4 y determinaron que además de la región promotora, existían otras regiones reguladoras en esta región, el equipo concluyó que el aislamiento del promotor y parte de la región reguladora río arriba (-2,601bp) mostraban una fuerte actividad promotora para el establecimiento de un vector reportero Oct3/4 por lo que en el presente trabajo se aisló esta secuencia promotora-reguladora de Oct3/4 acortándola a -1689bp para introducirla dentro del vector reportero. Una vez insertada la secuencia reguladora dentro del vector, este se transfectó a células electrocompetentes y se realizó una PCR de colonia para verificar la presencia de la región promotora en las células transfectadas. Tres de las colonias seleccionadas

presentaban la secuencia reguladora de 1689bp y asimismo la integridad del vector generado fue adecuada.

Una vez generado el vector reportero, se evaluó su funcionalidad para la selección de células pluripotentes en función a la expresión de GFP. El reportero se transfectó en una línea celular control no pluripotente (fibroblastos) y las líneas celulares hESC H9 y Amicqui-1. Inicialmente, se detectó la presencia de la expresión de GFP de manera cualitativa por microscopia de fluorescencia en las células hESC (Figura 9), se observó una diferencia notoria en la cantidad de células expresando GFP entre las dos líneas hESC. Posteriormente se realizó un análisis cuantitativo de la expresión de GFP en las tres poblaciones celulares, este análisis confirmó la aseveración anterior; se observó una diferencia significativa alta entre el porcentaje de células expresando GFP (GFP+) de las líneas H9 y Amicqui-1 siendo 79,48% y 49.63%, respectivamente. Anteriormente, Ghorbani et al., (2013), reportaron la generación de un vector reportero Oct3/4-EGFP para líneas ESC de ratón, sus resultados de citometría mostraron que el 95% de la población mESC transfectada presentaba expresión de GFP. La diferencia entre la cantidad de células expresando GFP reportero puede deberse a características particulares de las poblaciones celulares analizadas, principalmente a su estado de pluripotencia en el momento del análisis.

Después de la transfección del reportero, las células GFP+ de cada línea celular fueron aisladas para análisis posteriores. Inicialmente se evaluó la tasa de proliferación de estas poblaciones con su respectivo control partiendo de una célula única. Observamos una diferencia significativa en la tasa de proliferación de las células H9 control vs H9 GFP+, asimismo, el patrón de crecimiento presentado en esta línea celular es consistente con lo reportado en la literatura. Posterior a la siembra de las células, se observó una fase de retraso o *lag* (dentro de este modelo de los días D1-D7), luego, el cultivo pasó a una fase exponencial donde el número

de células se incrementa significativamente y posteriormente el cultivo entraría en una fase estacionaria para finalmente pasar a la fase de muerte o declive por falta de nutrientes o condiciones inadecuadas (Sakthiselvan & Fasullo, 2019). El patrón de crecimiento de las células H9 hasta el día 15 solo llegó a la fase exponencial. En consistencia con estas observaciones, se ha reportado que en la línea H9 no se observa una fase estacionaria durante la proliferación y que la fase exponencial comienza a partir del muestreo 3 a 4, al igual que el comportamiento observado en estos resultados. Es necesario mencionar que, estos reportes solo monitorean la tasa de proliferación hasta un periodo máximo de siete días y que la densidad de siembra fue de alrededor 10,000 células por pozo (Ardehali et al., 2011; Fernandes et al., 2009; Kunova et al., 2013). Por otro lado, Vanuytsel et al., (2014) reporta que existe un retraso en el crecimiento celular en función al tiempo en que las líneas se mantienen en cultivo y su número de pasaje.

En cuanto a los grupos de la línea celular Amicqui-1, si bien, si se observa una diferencia en la tasa de proliferación entre el grupo control y el grupo GFP+, siendo mayor la tasa del grupo GFP+, la diferencia no es estadísticamente significativa. En adición, el patrón de crecimiento de esta línea celular si presenta el inicio de una fase estacionaria y posiblemente de muerte celular. Actualmente no hay reportes sobre el comportamiento y las tasas de proliferación de esta línea celular. Por otro lado, los grupos de la línea celular H9 mostraron una mayor tasa de proliferación y rendimiento a diferencia de los de Amicqui-1 obteniendo 25,198 células/pozo de H9 GFP+ en el día 15 y tan solo 1,932 células/pozo de Amicqui-1 en el día 19.

La baja tasa de proliferación celular en células troncales puede deberse al número de pasaje, la pérdida de pluripotencia, senescencia celular, producción aberrante de mitógenos y/o ciclinas o un arresto celular relacionado con daño al DNA (Liu et al., 2019; Pucci et al., 2000). Las células Amicqui-1 evaluadas corresponden a un número de pasaje 33, mientras que la literatura reporta la expansión de esta línea

celular hasta un pasaje 40 aun manteniendo estables sus características de pluripotencia (Ávila-González et al., 2015). Por lo anteriormente expuesto, es necesario realizar mayor número de pruebas para establecer la viabilidad, senescencia y potencia de la línea celular empleada.

Adicionalmente, evaluamos y comparamos la presencia de algunos marcadores de pluripotencia sobre las líneas seleccionadas a través de este vector reportero. Tal como se esperaba, observamos una diferencia en la expresión de Oct3/4 entre los grupos control y GFP+ de la línea celular H9 (82.67 y 94.75%, respectivamente), sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ( $p < 0.0654$ ). Esto podría sugerir que el vector es útil para seleccionar poblaciones celulares que expresan Oct3/4, no obstante, es necesario realizar pruebas con distintas líneas celulares hESC y líneas hESC comprometidas a un proceso de diferenciación para evaluar la eficiencia del vector en la selección de líneas meramente pluripotentes. Por otro lado, la diferencia entre los grupos control y GFP+ de Amicqui-1 mostraron una diferencia significativa en la expresión de Oct3/4 ( $p < 0.002$ ,  $\alpha = 0.05$ ) siendo 72.3% y 91.67% para los grupos control y GFP+, respectivamente, esto refuerza el supuesto de que el vector reportero es capaz de seleccionar células Oct3/4 positivas. Adicionalmente no se observó ninguna diferencia significativa en la expresión de Oct3/4 entre las líneas celulares H9 GFP+ y Amicqui-1 GFP+ (expresión del 94.75% y 91.67%, respectivamente). En adición, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de Nanog en los grupos evaluados. Las células H9 mostraron un 85.6 y 90.6% de expresión en H9 control y H9 GFP+, respectivamente; la diferencia no es considerada estadísticamente significativa ( $p < 0.0637$ ). Adicionalmente los grupos de la línea Amicqui-1 mostraron una expresión de Nanog del 72.7 y 70.83 %, estadísticamente no significativo ( $p < .9772$ ). En contraste, si se observó una diferencia significativa al comparar la expresión de Nanog entre las líneas celulares H9 control vs Amicqui-1 control ( $p < .02$ ) y H9 GFP+ y Amicqui-1 GFP+ ( $p < .0023$ ). Esto sugiere que la línea celular

H9 presenta un mejor panel de pluripotencia que la línea Amicqui-1 evaluada. Finalmente, no se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión de Sox2 en los grupos de la línea celular H9 ( $p < .8027$ ) siendo las medias 86.78 y 88.47 % para los grupos control y GFP+, respectivamente.

Previamente, Ávila-González et al., (2019) compararon el porcentaje de colonias expresando estos marcadores de pluripotencia entre las líneas H9 y la línea celular Amicqui-1, en consistencia con estos resultados, se reportó la expresión de Oct3/4 en la mayoría de las colonias celulares (~95%). Por otro lado, nuestros resultados muestran un porcentaje de expresión del 91.67 para el grupo Amicqui-1 GFP+, que, en consistencia con Ávila et al., (2019) el análisis de la expresión de marcadores de pluripotencia en Amicqui-2 es de alrededor del (~90-95%). Cabe destacar que los experimentos del presente proyecto se realizaron con pasajes 55 y 58 (H9 y Amicqui-1, respectivamente).

## 12. Conclusiones

La generación e integración del reportero pAAV-POU5F1-IRES-GFP en las líneas H9 y Amiqui-1 es útil para el monitoreo, identificación y selección del estadio pluripotente en células que presenten una mayor tasa de proliferación. Además, podemos concluir que la selección de poblaciones con la expresión de la GFP+ conlleva a obtener una mayor cantidad de células Oct3/4+, sin embargo, aún.

es necesario realizar más experimentos para establecer si el perfil pluripotente de las líneas celulares seleccionadas a través de pAAV-IRES-GFP es el óptimo

## REFERENCIAS

Abranches, E., Bekman, E., & Henrique, D. (2013). Generation and Characterization of a Novel Mouse Embryonic Stem Cell Line with a Dynamic Reporter of Nanog Expression. *PLoS ONE*, 8(3), 1–13.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059928>

Akberdin, I. R., Omelyanchuk, N. A., Fadeev, S. I., Leskova, N. E., Oschepkova, E. A., Kazantsev, F. v., Matushkin, Y. G., Afonnikov, D. A., & Kolchanov, N. A. (2018). Pluripotency gene network dynamics: System views from parametric analysis. *PLoS ONE*, 13(3), 1–24.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194464>

Ardehali, R., Inlay, M. A., Ali, S. R., Tang, C., Drukker, M., & Weissman, I. L. (2011). Overexpression of BCL2 enhances survival of human embryonic stem cells

during stress and obviates the requirement for serum factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(8), 3282–3287. <https://doi.org/10.1073/pnas.1019047108>

Ávila-González, D., Martínez-Alarcón, O., García-López, G., Díaz-Martínez, N. E., Razo-Aguilera, G., Valdespino-Vázquez, M. Y., Moreno-Verduzco, E. R., Vega-Hernández, E., Regalado-Hernández, J. C., de la Jara-Díaz, J. F., Molina-Hernández, A., Flores-Herrera, H., Portillo, W., & Díaz, N. F. (2019). Establishment of human embryonic stem cell line Amicqui-2 using poor-quality embryos from Mexican population. *Stem Cell Research*, 34. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.101364>

Ávila-González, D., Vega-Hernández, E., Regalado-Hernández, J. C., de la Jara-Díaz, J. F., García-Castro, I. L., Molina-Hernández, A., Moreno-Verduzco, E. R., Razo-Aguilera, G., Flores-Herrera, H., Portillo, W., Díaz-Martínez, N. E., García-López, G., & Díaz, N. F. (2015). Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos. *Stem Cell Research*, 15(2), 322–324. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2015.07.006>

Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2

function. *Genes and Development*, 17(1), 126–140.  
<https://doi.org/10.1101/gad.224503>

Baghbaderani, B. A., Syama, A., Sivapatham, R., Pei, Y., Mukherjee, O., Fellner, T., Zeng, X., & Rao, M. S. (2016). Detailed Characterization of Human Induced Pluripotent Stem Cells Manufactured for Therapeutic Applications. *Stem Cell Reviews and Reports*, 12(4), 394–420. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9662-8>

Bharathan, S. P., Manian, K. V., Aalam, S. M. M., Palani, D., Deshpande, P. A., Pratheesh, M. D., Srivastava, A., & Velayudhan, S. R. (2017). Systematic evaluation of markers used for the identification of human induced pluripotent stem cells. *Biology Open*, 6(1), 100–108. <https://doi.org/10.1242/bio.022111>

Bongso, A., & Richards, M. (2004). History and perspective of stem cell research. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 18(6), 827–842. <https://doi.org/10.1016/J.BPOBGYN.2004.09.002>

Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W., & Prasher, D. C. (1993). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263, 802–804.  
[www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org)

Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003). Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining

factor in embryonic stem cells. *Cell*, 113(5), 643–655.  
[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00392-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00392-1)

Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., & Smith, A. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development. *Nature*, 450(7173), 1230–1234.  
<https://doi.org/10.1038/nature06403>

Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwu, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostov, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., ... Lowry, W. E. (2009). Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5(1), 111–123. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.06.008>

Clark, D. P., Pazdernik, N. J., & McGehee, M. R. (2019). Chapter 21 - Analysis of Gene Expression. In D. P. Clark, N. J. Pazdernik, & M. R. McGehee (Eds.), *Molecular Biology (Third Edition)* (pp. 654–690). Academic Cell.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813288-3.00021-5>

Cota-Coronado, A., Ramírez-Rodríguez, P. B., Padilla-Camberos, E., Díaz, éNstor F., Flores-Fernández, J. M., Ávila-González, D., & Diaz-Martinez, N. E. (2019). Implications of human induced pluripotent stem cells in metabolic disorders:

from drug discovery toward precision medicine. *Drug Discovery Today*, 24(1), 334–341. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.10.001>

Crook, J. M., Hei, D., & Stacey, G. (2010). The International Stem Cell Banking Initiative (ISCBI): raising standards to bank on. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal*, 46(3–4), 169–172. <https://doi.org/10.1007/s11626-010-9301-7>

Evans, M. J., & Kaufman, M. H. (1981). Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*, 292(5819), 154–156. <https://doi.org/10.1038/292154a0>

Ezashi, T., Yuan, Y., & Roberts, R. M. (2016). Pluripotent Stem Cells from Domesticated Mammals. *Annual Review of Animal Biosciences*, 4(1), 223–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021815-111202>

Fernandes, A. M., Marinho, P. A. N., Sartore, R. C., Paulsen, B. S., Mariante, R. M., Castilho, L. R., & Rehen, S. K. (2009). Stirred microcarrier culture of hES cells Successful scale-up of human embryonic stem cell production in a stirred microcarrier culture system. In *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* (Vol. 42, Issue 6). [www.bjournal.com.br](http://www.bjournal.com.br)

Fong, H., Hohenstein, K. A., & Donovan, P. J. (2008). Regulation of Self-Renewal and Pluripotency by Sox2 in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 26(8), 1931–1938. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-1002>

- Gawlik-Rzemieniewska, N., & Bednarek, I. (2016). The role of NANOG transcriptional factor in the development of malignant phenotype of cancer cells. *Cancer Biology & Therapy*, 17(1), 1–10. <https://doi.org/10.1080/15384047.2015.1121348>
- Ghorbani, R., Emamzadeh, A., Khazaie, V., Dormiani, K., Ghaedi, K., Rabbani, M., Foruzanfar, M., Karbalaie, K., Karamali, F., Lachinani, L., Kiani-Esfahani, A., Nematollahi, M., & Esfahani, M. H. N. (2013). Constructing a mouse Oct4 promoter/EGFP vector, as a whole-cellular reporter to monitor the pluripotent state of cells. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 5(1), 2–9.
- Gomes, K. M. S., Costa, I. C., dos Santos, J. F., Dourado, P. M. M., Forni, M. F., & Ferreira, J. C. B. (2017). Induced pluripotent stem cells reprogramming: Epigenetics and applications in the regenerative medicine. *Revista Da Associacao Medica Brasileira*, 63(2), 180–189. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.63.02.180>
- Gutierrez-Aranda, I., Ramos-Mejia, V., Bueno, C., Munoz-Lopez, M., Real, P. J., Mácia, A., Sanchez, L., Ligeró, G., Garcia-Parez, J. L., & Menendez, P. (2010). Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells*, 28(9), 1568–1570. <https://doi.org/10.1002/stem.471>

- Hackett, C. H., & Fortier, L. A. (2011). Embryonic stem cells and iPS cells: sources and characteristics. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 27(2), 233–242. <https://doi.org/10.1016/j.cveq.2011.04.003>
- He, H., McHaney, M., Hong, J., & Weiss, M. L. (2009). Cloning and Characterization of 3.1kb Promoter Region of the Oct4 Gene from the Fischer 344 Rat. *The Open Stem Cell Journal*, 1(1), 30–39. <https://doi.org/10.2174/1876893800901010030>
- Hubert, E., Nehtercott, D., Brick, J., Philip, H., & Schwartz, H. (2011). Immunocytochemical Analysis of Human Pluripotent Stem Cells. *Methods in Molecular Biology*, 17(6), 201–220. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4\\_15](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-201-4_15).
- Inoshima, I., Inoshima, N., Wilke, G., Powers, M., Frank, K., Wang, Y., & Wardenburg, J. B. (2012). *Teratoma Formation: A Tool for Monitoring Pluripotency in Stem Cell Research Raman*. 17(10), 1310–1314. <https://doi.org/10.1038/nm.2451.A>
- Kato, H., Abe, K., Yokota, S., Matsuno, R., Mikekado, T., Yokoi, H., & Suzuki, T. (2014). Establishment of oct4:gfp transgenic zebrafish line for monitoring cellular multipotency by GFP fluorescence. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal*, 51(1), 42–49. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9805-7>
- Kehler, J., Tolkunova, E., Koschorz, B., Pesce, M., Gentile, L., Boiani, M., Lomelí, H., Nagy, A., McLaughlin, K. J., Schöler, H. R., & Tomilin, A. (2004). Oct4 is

- required for primordial germ cell survival. *EMBO Reports*, 5(11), 1078–1083.  
<https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400279>
- Kim, J. S., Choi, H. W., Choi, S., & Do, J. T. (2011). Reprogrammed pluripotent stem cells from somatic cells. *International Journal of Stem Cells*, 4(1), 1–8.  
<https://doi.org/10.15283/ijsc.2011.4.1.1>
- Knoepfler, P. S. (2008). Why Myc? An Unexpected Ingredient in the Stem Cell Cocktail. *Cell Stem Cell*, 2(1), 18–21.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.12.004>
- Kolios, G., & Moodley, Y. (2013). Introduction to Stem Cells and Regenerative Medicine. *Respiration*, 85(1), 3–10. <https://doi.org/10.1159/000345615>
- Kunova, M., Matulka, K., Eiselleova, L., Salykin, A., Kubikova, I., Kyrlyenko, S., Hampl, A., & Dvorak, P. (2013). Adaptation to Robust Monolayer Expansion Produces Human Pluripotent Stem Cells With Improved Viability. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(4), 246–254. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0081>
- Lai, D., Wang, Y., Sun, J., Chen, Y., Li, T., Wu, Y., Guo, L., & Wei, C. (2015). Derivation and characterization of human embryonic stem cells on human amnion epithelial cells. *Scientific Reports*, 5. <https://doi.org/10.1038/srep10014>
- Lakshmipathy, U. (2014). *Options for Identification and Characterization of Pluripotent Stem Cells*. Cell Culture Dish. <https://cellculturedish.com/options-identification-characterization-pluripotent-stem-cells/>

- Levine, S., & Grabel, L. (2017). The contribution of human/non-human animal chimeras to stem cell research. *Stem Cell Research*, 24, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.scr.2017.09.005>
- Liao, Y. J., Chen, Y. S., Lee, J. X., Chen, L. R., & Yang, J. R. (2018). Effects of Klf4 and c-myc knockdown on pluripotency maintenance in porcine induced pluripotent stem cell. *Cell Journal*, 19(4), 640–646. <https://doi.org/10.22074/cellj.2018.4428>
- Lin, W., Huang, L., Li, Y., Fang, B., Li, G., Chen, L., & Xu, L. (2019). Mesenchymal Stem Cells and Cancer: Clinical Challenges and Opportunities. *BioMed Research International*, 2019, 2820853. <https://doi.org/10.1155/2019/2820853>
- Liu, L., Michowski, W., Kolodziejczyk, A., & Sicinski, P. (2019). The cell cycle in stem cell proliferation, pluripotency and differentiation. In *Nature Cell Biology* (Vol. 21, Issue 9, pp. 1060–1067). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0384-4>
- Loh, Y. H., Wu, Q., Chew, J. L., Vega, V. B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K. Y., Sung, K. W., Lee, C. W. H., Zhao, X. D., Chiu, K. P., Lipovich, L., Kuznetsov, V. A., Robson, P., Stanton, L. W., ... Ng, H. H. (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*, 38(4), 431–440. <https://doi.org/10.1038/ng1760>

- Martin, G. R., & Evans, M. J. (1975). *Differentiation of Clonal Lines of Teratocarcinoma Cells: Formation of Embryoid Bodies In Vitro (mouse tumors/tissue culture/pluripotent cells/cell determination/endoderm)* (Vol. 72, Issue 4).
- Marucci, L. (2017). Nanog dynamics in mouse embryonic stem cells: Results from systems biology approaches. *Stem Cells International*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/7160419>
- Mascetti, V. L., & Pedersen, R. A. (2016). Contributions of Mammalian Chimeras to Pluripotent Stem Cell Research. *Cell Stem Cell*, 19(2), 163–175. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.07.018>
- Matoba, R., Niwa, H., Masui, S., Ohtsuka, S., Carter, M. G., Sharov, A. A., & Ko, M. S. H. (2006). Dissecting Oct3/4-regulated gene networks in embryonic stem cells by expression profiling. *PloS One*, 1(1), e26–e26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000026>
- Maucksch, C., Jones, K. S., & Connor, B. (2013). Concise review: the involvement of SOX2 in direct reprogramming of induced neural stem/precursor cells. *Stem Cells Translational Medicine*, 2(8), 579–583. <https://doi.org/10.5966/sctm.2012-0179>
- Maurizo, P., & Hans R., S. (2001). Oct-4: Gatekeeper in the beginnings of Mammalian Development. *Stem Cells*, 180–192.

- Murphy, M. J., Wilson, A., & Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends in Cell Biology*, 15(3), 128–137. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.01.008>
- Niwa, H., Miyazaki, J., & Smith, A. G. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*, 24(4), 372–376. <https://doi.org/10.1038/74199>
- P. De Miguel, M., Fuentes-Julián, S., & Alcaina, Y. (2010). Pluripotent Stem Cells: Origin, Maintenance and Induction. *Stem Cell Reviews and Reports*, 6(4), 633–649. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9170-1>
- Pan, G., & Thomson, J. A. (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*, 17(1), 42–49. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310125>
- Polejaeva, I., & Mitalipov, S. (2013). Stem cell potency and the ability to contribute to chimeric organisms. *Reproduction (Cambridge, England)*, 145(3), R81–R88. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0396>
- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein (Bioluminescence; Cnidaria; aequorin; energy transfer; chromophore; cloning). In *Biochemistry and Molecular Biology. Mayo Foundation* (Vol. 111, Issue 908).

- Preininger, M. K., Singh, M., Xu, C., Preininger, M. K., Xu, • C, Coulter, W. H., & Singh, M. (2016). Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 951). [https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3_10)
- Pucci, B., Kasten, M., & Giordano, A. (2000). Cell Cycle and Apoptosis 1. *Neoplasia*, 2(4), 291–299. [www.nature.com/neo](http://www.nature.com/neo)
- Radzsheuskaya, A., & Silva, J. C. R. (2014). Do all roads lead to Oct4? The emerging concepts of induced pluripotency. *Trends in Cell Biology*, 24(5), 275–284. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.11.010>
- Ramos-Vara, J. A. (2011). Principles and methods of immunohistochemistry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 691, 83–96. [https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-60761-849-2_5)
- Robinton, D. A., & Daley, G. Q. (2012). The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*, 481(7381), 295–305. <https://doi.org/10.1038/nature10761>
- Rosenthal, M. W. R. S. G. (1970). In vitro growth and differentiation of clonal populations of multipotential mouse clls derived from a transplantable testicular teratocarcinoma. *Natl Cancer Inst.*, 44(5), 1001–1014.

- Ruff, D., & Lieu, P. T. (2013). Profiling stem cells using quantitative PCR protein assays. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 997, 225–236. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0\\_18](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-348-0_18)
- Sakthiselvan, P., & Fasullo, R. M. E.-B. V. E.-M. (2019). Kinetic Studies on Cell Growth. In S. S. Meenambiga (Ed.), *Cell Growth* (p. Ch. 2). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84353>
- Salazar, A., Sandoval, A., & Armendariz, J. (2013). *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones*. Mc.
- Schell, J. P. (2012). Spontaneous Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells via Embryoid Body Formation. In *Human Stem Cell Manual* (Second Edi). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385473-5.00023-0>
- Sell, S. (2010). On the stem cell origin of cancer. In *American Journal of Pathology* (Vol. 176, Issue 6, pp. 2584–2594). American Society for Investigative Pathology Inc. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091064>
- Serra, M., Brito, C., Correia, C., & Alves, P. M. (2012). Process engineering of human pluripotent stem cells for clinical application. In *Trends in Biotechnology* (Vol. 30, Issue 6, pp. 350–359). <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2012.03.003>
- Shahbazi, M. N. (2020). Mechanisms of human embryo development: From cell fate to tissue shape and back. In *Development (Cambridge)* (Vol. 147, Issue 14). Company of Biologists Ltd. <https://doi.org/10.1242/dev.190629>

- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: An overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269–278.  
<https://doi.org/10.1007/s12291-013-0408-y>
- Shi, G., & Jin, Y. (2010). Role of Oct4 in maintaining and regaining stem cell pluripotency. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(5), 39.  
<https://doi.org/10.1186/scrt39>
- Shimoura, O., Johnson, K. H., & Saiga, Y. O. (1962). *Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, Aequorea*. doi: 10.1002/jcp.1030590302.
- Shyh-Chang, N., & Daley, G. Q. (2013). Lin28: primal regulator of growth and metabolism in stem cells. *Cell Stem Cell*, 12(4), 395–406.  
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.03.005>
- Siddiqui, S. (2015). Therapeutic Potential of Totipotent, Pluripotent and Multipotent Stem Cells. *MOJ Cell Science & Report*, 2(5), 4–10.  
<https://doi.org/10.15406/mojcsr.2015.02.00041>
- Silva, J., Nichols, J., Theunissen, T. W., Guo, G., van Oosten, A. L., Barrandon, O., Wray, J., Yamanaka, S., Chambers, I., & Smith, A. (2009). Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State. *Cell*, 138(4), 722–737.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.039>

- Singh, U., Quintanilla, R. H., Grecian, S., Gee, K. R., Rao, M. S., & Lakshmiopathy, U. (2012). Novel Live Alkaline Phosphatase Substrate for Identification of Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, 8(3), 1021–1029. <https://doi.org/10.1007/s12015-012-9359-6>
- Smith, K., & Dalton, S. (2010). Myc transcription factors: key regulators behind establishment and maintenance of pluripotency. *Regenerative Medicine*, 5(6), 947–959. <https://doi.org/10.2217/rme.10.79>
- Stearns, T. (1995). The green revolution. Green fluorescent protein allows gene expression and protein localization to be observed in living cells. *Current Biology*, 5(3).
- Štefková, K., Procházková, J., & Pacherník, J. (2015). Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells International*, 2015(2006). <https://doi.org/10.1155/2015/628368>
- Stevens, L. (1964). *EXPERIMENTAL PRODUCTION OF TESTICULAR TERATOMAS IN MICE*. 52(3), 654–661.
- Stevens, L. C., Little, C. C., & Jackson, R. B. (1954). *SPONTANEOUS TESTICULAR TERATOMAS IN AN INBRED STRAIN OF MICE* (Vol. 17). Princeton University Press.
- Strebinger, D., Deluz, C., Friman, E. T., Govindan, S., Alber, A. B., & Suter, D. M. (2019). Endogenous fluctuations of OCT 4 and SOX 2 bias pluripotent cell fate

decisions . *Molecular Systems Biology*, 15(9), 1–19.  
<https://doi.org/10.15252/msb.20199002>

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131(5), 861–872.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Terryn, J., Tricot, T., Gajjar, M., & Verfaillie, C. (2018). Recent advances in lineage differentiation from stem cells: hurdles and opportunities? [version 1; peer review: 2 approved]. *F1000Research*, 7(220).  
<https://doi.org/10.12688/f1000research.12596.1>

Thomson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker, R. A., & Hearn, J. P. (1995). Isolation of a primate embryonic stem cell line. In *Developmental Biology* (Vol. 92).

Thomson, J. A., & Odorico, J. S. (2000). Human embryonic stem cell and embryonic germ cell lines. *Trends in Biotechnology*, 18, 53–57.  
[doi:10.1016/s0167-7799\(99\)01410-9](https://doi.org/10.1016/s0167-7799(99)01410-9)

- Thomson, J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S., Waknitz, M., Swiergiel, J., Marshall, V., & Jones, J. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, *6*(282), 1145–1172. [10.1126/science.282.5391.1145](https://doi.org/10.1126/science.282.5391.1145)
- Vanuytsel, K., Cai, Q., Nair, N., Khurana, S., Shetty, S., Vermeesch, J. R., Ordovas, L., & Verfaillie, C. M. (2014). FANCA knockout in human embryonic stem cells causes a severe growth disadvantage. *Stem Cell Research*, *13*(2), 240–250. <https://doi.org/10.1016/J.SCR.2014.07.005>
- Wu, G., & Schöler, H. R. (2014). Role of Oct4 in the early embryo development. *Cell Regeneration (London, England)*, *3*(1), 7. <https://doi.org/10.1186/2045-9769-3-7>
- Yang, H. M., Do, H. J., Oh, J. H., Kim, J. H., Choi, S. Y., Cha, K. Y., Chung, H. M., & Kim, J. H. (2005). Characterization of putative cis-regulatory elements that control the transcriptional activity of the human Oct4 promoter. *Journal of Cellular Biochemistry*, *96*(4), 821–830. <https://doi.org/10.1002/jcb.20588>
- Yoshida, G. J. (2018). Emerging roles of Myc in stem cell biology and novel tumor therapies. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *37*(1), 173. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0835-y>
- Zeineddine, D., Hammoud, A. A., Mortada, M., & Boeuf, H. (2014). The Oct4 protein: More than a magic stemness marker. *American Journal of Stem Cells*, *3*(2), 74–82.

- Zhang, S. (2014). Sox2, a key factor in the regulation of pluripotency and neural differentiation. *World Journal of Stem Cells*, 6(3), 305. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i3.305>
- Zhao, W., Ji, X., Zhang, F., Li, L., & Ma, L. (2012). Embryonic Stem Cell Markers. *Molecules*, 17(6), 6196–6236. <https://doi.org/10.3390/molecules17066196>
- Zhou, Y., Song, N., Li, X., Han, Y., Ren, Z., Xu, J.-X., Han, Y.-C., Li, F., & Jia, X. (2017). Changes in the methylation status of the Oct3/4, Nanog, and Sox2 promoters in stem cells during regeneration of rat tracheal epithelium after injury. *Oncotarget*, 8(2), 2984–2994. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13818>

