

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUATEMALA

FAECULTAD DE MEDICINA



OBTENCIÓN DE CELULAS PROGENALES PLURIPOTENTES
INDUCIDAS A PARTIR DE CELULAS EPITELIALES RENALES
HUMANAS AISLADAS DE CEMVA

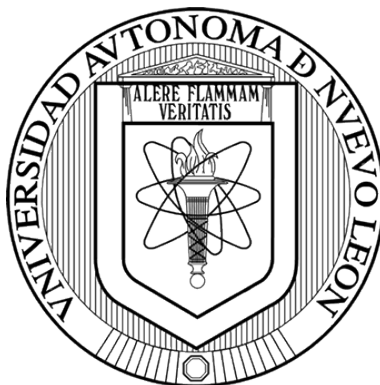
POC:

MG. CINTIA ABIGAIL ROBLES RODRIGUEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACION
EN MICROBIOLOGIA

JUNIO 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**“OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES
INDUCIDAS A PARTIR DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES
HUMANAS AISLADAS DE ORINA”**

POR:

MC. OLIVIA ABIGAIL ROBLES RODRÍGUEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MORFOLOGÍA**

JUNIO 2020

**“OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR
DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES HUMANAS AISLADA DE ORINA”**

Aprobación de tesis:



Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Director



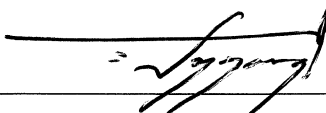
Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director



Dra. C. Odila Saucedo Cárdenas
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Arnulfo Villanueva Olivo
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. C. Rigoberto Vargas Zapata
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirección de Estudios de Posgrado

**“OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR
DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES HUMANAS AISLADAS DE ORINA”**

Presentado por

M.C. Olivia Abigail Robles Rodríguez

El presente trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la dirección de la Dra. C. María de Jesús Loera Arias y la co-dirección del Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna



Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Director



Dr. C. Roberto Montes de Oca Luna
Co-Director

DEDICATORIA

*A mi familia, por ser mi motor, por su amor y su apoyo,
por siempre creer en mí, incluso cuando yo no lo he hecho.*

*A Brian, por su amor y comprensión, por ser y estar,
soy afortunada de haberte conocido.*

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por todo el apoyo y amor que me demuestran día a día, por mantenernos unidos tanto en los momentos más felices como en los más difíciles, gracias por sus palabras de motivación y admiración.

A mi asesora, la Dra. María de Jesús Loera Arias a la cual estoy muy agradecida por todas las enseñanzas que me ha transmitido, el tiempo invertido en el mejoramiento de mi desempeño en el laboratorio, así como su apoyo constante durante este largo proceso.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna por sus enseñanzas, por la oportunidad de ser parte de este proyecto y su apoyo académico desde que llegue a su laboratorio hasta la realización de esta etapa académica.

A mi comisión de tesis, la Dra. Odila Saucedo Cárdenas, el Dr. Arnulfo Villanueva Olivo, el Dr. Rigoberto Vargas Zapata por formar parte de este proyecto, por el tiempo dedicado y sus aportaciones para la mejora en la realización de esta tesis.

A mis compañeros de posgrado: Sheila Villa, Alejandra Martínez, Ana Duarte, Yareth Gopar, José Juan Pérez Trujillo, David Martínez, Daniel Salas y Alfredo González, porque de alguna forma han contribuido en esta etapa de mi vida, por todos los valiosos momentos compartidos y haber sido parte en el camino.

A la familia, a los amigos y a los maestros que de alguna forma han contribuido en mi formación académica y en mi crecimiento personal.

A CONACYT, por el apoyo económico, con el número de becario 296354 para la realización del Doctorado en Ciencias.

CONTENIDO TEMÁTICO

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN	1
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1. TERAPIA CELULAR	5
2.2. REPROGRAMACIÓN CELULAR MEDIANTE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	7
2.3. MÉTODOS DE REPROGRAMACIÓN CELULAR	9
2.4. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS.....	11
2.5. CÉLULAS DE LA ORINA	13
2.6. CÉLULAS EPITELIALES RENALES.....	14
2.7. MATRICES EXTRACELULARES.....	17
2.8. TRANSFECCIÓN CELULAR	19
CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA	21
3.1. JUSTIFICACIÓN.....	21
3.2. OBJETIVO GENERAL	22
3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. ESTRATEGIA GENERAL.....	23
4.2. MATERIALES	24
4.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO	24
4.2.2. REACTIVOS DE CULTIVO CELULAR.....	25
4.2.3. REACTIVOS ESPECIALES.....	26
4.2.4. EQUIPO.....	26
4.2.5. CONSUMIBLES	27
4.3. MÉTODOS	28
4.3.1. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD.....	28
4.3.2. SUJETOS DE INVESTIGACIÓN	28
4.3.3. RECOLECCIÓN DE ORINA Y EXPANSIÓN CELULAR.....	28
4.3.4 CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES.....	30
4.3.5. GENERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS	31

4.3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS	32
4.3.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE PLURIPOTENCIA EN LAS iPSCs.....	33
4.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	34
CAPÍTULO 5. RESULTADOS	35
5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES DE MUESTRAS DE ORINA DE SUJETOS SANOS.....	35
5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES	38
5.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3: REPROGRAMACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES RENALES USANDO VECTORES NO VIRALES Y DIFERENTES MATRICES EXTRACELULARES	42
5.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4: LAS CÉLULAS SIMILARES A CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES EXPRESAN MARCADORES DE PLURIPOTENCIA	46
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN.....	49
CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES.....	55
CAPÍTULO 8. LITERATURA CITADA	56
ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS.....	68

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Métodos de reprogramación celular.

Figura 2. Tipos de células troncales.

Figura 3. Morfología de las células epiteliales renales.

Figura 4. Características de las matrices extracelulares Matrigel® y Geltrex®.

Figura 5. Día 1 del cultivo de células aisladas de muestras de orina.

Figura 6. Cultivo primario de células epiteliales renales aislado a partir de muestra de orina.

Figura 7. Células epiteliales renales.

Figura 8. Células epiteliales renales teñidas con hematoxilina y eosina.

Figura 9. Expresión de marcadores específicos de diferenciación epitelial en las células epiteliales renales.

Figura 10. Expresión de marcadores específicos de diferenciación de células epiteliales renales de los túbulos proximales.

Figura 11. Diagrama de flujo de las etapas para establecer el cultivo primario de células epiteliales renales.

Figura 12. Diagrama de flujo de las etapas para establecer el cultivo de células similares a iPSCs.

Figura 13. Colonia representativa de células similares a iPSCs.

Figura 14. Comparación de la matriz extracelular Matrigel y los reactivos de transfección Lipofectamina stem cell y FuGENE.

Figura 15. Comparación de matrices extracelulares y reactivos de transfección para mejorar la generación de colonias de células similares a iPSCs.

Figura 16. Caracterización de células similares a iPSCs mediante inmunofluorescencia.

Figura 17. Expresión génica de marcadores de pluripotencia.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos usados en PCR tiempo real.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Centígrados
μl	Microlitros
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
CERs	Células epiteliales renales
CO ₂	Dióxido de carbono
DMEM/F-12	Dulbecco's Eagle Modified Medium F-12
EHS	Engelbreth-Holm-Swarm
ESCs	Células troncales embrionarias
SFB	Suero fetal bovino
g	Fuerza centrífuga relativa
GAPDH	Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase
hESCs	Células troncales embrionarias humanas
iPSCs	Células troncales pluripotentes inducidas
Klf4	Kruppel-like factor 4
L	Litros
MEC	Matriz extracelular
MSCs	Células troncales mesenquimales
mL	Mililitros
nM	Nanomoles
Oct3/4	Octamer binding transcription factor 4
PBS	Buffer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RECBM	Renal Epithelial Cell Basal Medium
RECG	Renal Epithelial Cell Growth Kit
Rex1	Reduced expression protein 1
rhVTN-T	Vitronectina recombinante humana
RT	Retrotranscriptasa inversa

Sox2

Sex determining region Y-box 2

U

Unidades

USCs

Células troncales de la orina

RESUMEN

MC. Olivia Abigail Robles Rodríguez

Fecha de titulación: junio 2020

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: “OBTENCIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES HUMANAS”

Páginas de la tesis: 78

Área de Estudio: Morfología

**Candidato para el grado de Doctor en
Ciencias con Orientación en Morfología**

Propósito y Método de Estudio:

El descubrimiento de que las células somáticas pueden ser inducidas a células troncales pluripotentes mediante la exposición a factores de transcripción definidos ha abierto oportunidades sin precedentes en investigación básica, como lo son el descubrimiento de nuevos fármacos, la generación de modelos *in vitro* para diversas enfermedades y la terapia con células troncales. En este estudio, cultivamos células de la orina de sujetos sanos para establecer un cultivo primario de células epiteliales renales (CERs). Después, estas células se caracterizaron por inmunofluorescencia para marcadores de diferenciación epitelial: citoqueratina, E-caderina, β -catenina y ZO-1. Para determinar que estas células epiteliales provienen de los túbulos proximales en el riñón, se hicieron inmunofluorescencias para marcadores específicos de CERs de los túbulos proximales: Endopeptidasa neutra (CD10) y Aminopeptidasa N (CD13). Posteriormente, para llevar a cabo la reprogramación celular se sembraron CERs en tres matrices extracelulares: Matrigel, Geltrex y vitronectina. Las CERs se transfectaron con vectores no virales que expresan los factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *L-Myc* y *Lin28*, mediante los reactivos de transfección Lipofectamina Stem Cell o FuGENE. Las colonias de células similares a iPSCs mostraron una morfología de células troncales embrionarias humanas (hESC) y expresaron marcadores de pluripotencia específicos *Oct3/4*, *Nanog*, *Lin28* y *Klf4*.

Conclusiones y contribuciones:

Se estableció un cultivo primario de células epiteliales renales de muestras de orina de sujetos sanos. A partir de las células epiteliales renales se obtuvieron células similares a iPSCs mediante un sistema libre del uso de virus o células alimentadoras. De los reactivos de transfección comparados, el reactivo Lipofectamina Stem Cell es más efectivo que el FuGENE para obtener células similares a iPSCs. Por otro lado, las tres matrices extracelulares son comparables en su eficiencia para obtener células similares a iPSCs.



Dra. C. María de Jesús Loera Arias
Director

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de que las células somáticas pueden ser inducidas a células troncales pluripotentes mediante la exposición a factores de reprogramación definidos ha abierto oportunidades sin precedentes en investigación experimental como los son el descubrimiento de nuevos fármacos, la generación de modelos *in vitro* para diversas enfermedades y la terapia con células troncales (Crandall & Lalande, 2013).

El primer reporte de la generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs) mediante el empleo de factores de reprogramación celular, actualmente conocidos como factores Yamanaka, fue en fibroblastos de ratón usando un vector retroviral que expresa los factores de transcripción *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* (Takahashi & Yamanaka, 2006), pero no fue hasta un año después que se lograron obtener iPSCs a partir de fibroblastos adultos humanos usando los mismos factores (Takahashi et al., 2007). En otro grupo de investigación se logró obtener iPSCs a partir de fibroblastos embrionarios humanos mediante vectores retrovirales usando la combinación de otros factores reprogramación celular, *Oct4*, *Sox2*, *Lin28* y *Nanog*; en este estudio se evitó el uso de *c-Myc* debido al papel que tiene en la diferenciación y muerte de las células troncales embrionarias (ESCs) (Yu et al., 2007).

La obtención de iPSCs evitando el uso de vectores virales es un punto crítico para su posible aplicación en medicina regenerativa y terapia génica. Esto debido al riesgo de integración del genoma retroviral en el genoma del huésped lo que

aumenta la posibilidad de mutagénesis y activación de oncogenes (Anson, 2004). Debido a esto, un grupo de investigadores lograron implementar un método de obtención de iPSC, en el que no se hacía uso de vectores virales (retrovirales), al emplear vectores de expresión episomal para la reprogramación de fibroblastos obtenidos de embriones de ratón (Okita et al., 2008).

Las iPSCs pueden obtenerse de distintas células somáticas, como fibroblastos, células de sangre periférica, células del endometrio y las células en la orina. Estas últimas tienen un importante interés clínico debido a que su obtención no involucra un procedimiento invasivo, lo cual puede disminuir el riesgo en pacientes hemofílicos o pacientes diabéticos (Ding et al., 2015).

En la orina se encuentran diferentes tipos celulares, como son: podocitos, células sanguíneas, células epiteliales renales (CERs), células de transición, células escamosas y células troncales. De éstas las más estudiadas son las células troncales y las células epiteliales renales (Manaph et al., 2018).

Para la obtención de iPSCs, además de la fuente de células somáticas, también se deben considerar las condiciones de cultivo necesarias. A través de los años se han estudiado los componentes de la matriz extracelular para su cultivo, debido a las variaciones que existen en las células obtenidas en distintas condiciones de cultivo (Sun et al., 2009; Nagasaka et al., 2017).

La mejora y estandarización de la metodología para obtener iPSCs con variaciones mínimas en el genotipo y la expresión génica, y que permitan que expresen los marcadores celulares característicos de estas células, independientemente de la fuente celular de origen, posibilitará lograr un proceso

eficiente y reproducible para generar iPSCs cumpliendo las buenas prácticas de manufactura lo que podría hacer posible su aplicación definitiva en la clínica.

Debido a lo anterior, ha sido de nuestro interés establecer las condiciones óptimas para su obtención. En este trabajo se logró generar células similares a iPSCs a partir CERs aisladas de la orina de sujetos sanos empleando diferentes matrices y reactivos de transfección. Este trabajo aporta un protocolo experimental para la generación de células similares a iPSCs a partir de biopsias no invasivas que podría emplearse para futuras investigaciones de terapia celular en diferentes enfermedades.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. TERAPIA CELULAR

La terapia celular surge de la necesidad de encontrar una solución a largo plazo a las enfermedades hereditarias y degenerativas, consiste en el uso de células con actividad biológica que causen un efecto deseado *in vitro* o *in vivo*, como la producción de las proteínas de interés terapéutico, esto con el propósito de prevenir, tratar o mitigar enfermedades. Tiene un gran potencial terapéutico ya que a diferencia del empleo de moléculas terapéuticas, ADN o proteínas, las células son un producto dinámico que puede migrar, proliferar, diferenciarse y responder a su ambiente *in vitro* o *in vivo* (Savitz & Parsha, 2016). En la terapia celular, las células pueden aislarse directamente del paciente o de otro donador para ser cultivadas *in vitro*. Las células aisladas pueden ser mantenidas en cultivo para ser expandidas o modificadas genéticamente y ser regresadas al paciente como agente terapéutico.

Aunque el uso de la terapia celular en ensayos clínicos ha ido en aumento, presenta grandes desafíos, estos incluyen la vida útil limitada de las células, el volumen limitado de la muestra para las pruebas necesarias antes de la aplicación terapéutica, la viabilidad de las células del paciente y la heterogeneidad del cultivo (Bartel, 2015). Por lo que es necesario contar con métodos estandarizados para ofrecer a los pacientes un tratamiento consistente, seguro y eficaz sin importar el tipo celular o la aplicación. Esto implica un proceso que va desde el aislamiento de las células, la caracterización de las células, la optimización de las condiciones de

cultivo, la expansión celular y la eliminación de contaminantes (Campbell et al., 2015).

Una fuente de células para realizar esta terapia celular son las células troncales pluripotentes, cómo las células troncales embrionarias (ESCs), las células troncales mesenquimales (MSCs) y las células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs). Las ESCs presentan desafíos como el rechazo inmune después de su transplante heterólogo en los pacientes, además de cuestionamientos éticos sobre el uso de embriones humanos. Mientras que las MSCs aunque son de fácil obtención su diferenciación esta limitada al tejido de origen. Por otra parte, las células troncales pluripotentes inducidas pueden ser la solución debido a derivarse directamente de células somáticas de los pacientes (Hochedlinger & Jaenisch, 2006; Glicksman, 2018).

La obtención de células troncales pluripotentes a partir de células somáticas ha sido demostrada por tres métodos experimentales: transferencia nuclear, fusión celular y transducción con factores de transcripción. Con estos métodos es posible inducir a una célula somática a expresar genes característicos de las células troncales embrionarias, adquiriendo la habilidad de poder diferenciarse a todas las células del cuerpo. Este extraordinario descubrimiento en plasticidad celular tiene importantes aplicaciones médicas (Yamanaka & Blau, 2010).

2.2. REPROGRAMACIÓN CELULAR MEDIANTE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

El fenómeno de reprogramación celular fue demostrado por primera vez mediante la transferencia nuclear realizada en células somáticas. Este conocimiento no hubiera sido posible sin el experimento de “Dolly”, que consistió en la transferencia del núcleo de una célula somática a un oocito enucleado. El citoplasma del oocito induce la reprogramación del núcleo de la célula somática para que comience a expresar los genes que dirigen a la célula a un estado de pluripotencia y renovación celular (Wilmut et al., 1997; Lagutina et al., 2013).

Después de 10 años de este experimento, dos equipos de investigación trabajando de manera independiente llegaron a la conclusión de que existen factores desconocidos en el citoplasma del oocito que conducen a la reprogramación nuclear. Fue así como se establecieron protocolos para la obtención de células troncales pluripotentes mediante la introducción de factores de transcripción definidos (Wilmut et al., 2015). En el 2006 Takahashi y Yamanaka demostraron en fibroblastos embrionarios y adultos de ratón, que las células somáticas pueden ser inducidas en condiciones de cultivo a iPSCs mediante los factores de transcripción *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. Las células que lograron inducir presentaron las características morfológicas, propiedades de crecimiento, y la expresión de genes característicos de células troncales embrionarias. Además cuando estas células se trasplantaron por vía subcutánea en ratones desnudos, estos desarrollaron tumores formados por tejidos que provienen de las tres capas germinativas y cuando fueron inyectadas en blastocitos contribuyeron al desarrollo del embrión (Takahashi & Yamanaka, 2006). Sin embargo, estas células presentan

un patrón de expresión global distinto a las células troncales embrionarias y no contribuyen en el desarrollo de ratones quiméricos. Es importante que las células reprogramadas estén presentes en los ratones quiméricos, ya que deben de ser capaces de diferenciarse a las tres líneas germinales para formar un organismo. En el 2007 fue posible producir ratones quiméricos a partir de la selección de clonas de iPSCs que expresan *NANOG* y no expresan los genes *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*. De estas clonas solo fue posible la transmisión en la línea germinal a la siguiente generación en una clona, pero el 20% de la descendencia desarrollaron tumores atribuibles al uso del gen *c-myc* en la reprogramación celular (Okita et al., 2007).

Fue hasta el siguiente año que dos laboratorios lograron la inducción de células somáticas a iPSCs a partir de fibroblastos humanos fetales y adultos usando una combinación diferente de factores de transcripción, para los fibroblastos fetales se emplearon los factores *Oct3/4*, *Sox2*, *NANOG* y *Lin28*, mientras que para los fibroblastos adultos se usaron los factores *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*. En ambos casos las iPSCs presentaron características similares a las células troncales embrionarias: fueron capaces de diferenciarse a líneas celulares de las tres capas germinales, expresaron actividad de la telomerasa, fueron similares en morfología, proliferación, antígenos de superficie y expresión de genes de pluripotencia (Takahashi et al., 2007; Yu et al., 2007).

Es interesante que dos factores de transcripción en la combinación Thomson/Yu son diferentes a la combinación Yamanaka: *NANOG* y *Lin28*. La combinación de los factores Yamanaka se ha usado en más estudios debido a que son más eficientes en la reprogramación. Sin embargo, se ha demostrado que la

adición de *NANOG* y *Lin28*, en especial *Lin28*, aumenta la eficiencia de reprogramación de los factores Yamanaka (Liao et al., 2008). Por otro lado, se ha demostrado que *Oct3/4* y *Sox2* son factores esenciales para la reprogramación, siendo suficientes para generar iPSCs a partir de células humanas, como fibroblastos y células sanguíneas CD34⁺ (Huangfu et al., 2008; Meng et al., 2012).

2.3. MÉTODOS DE REPROGRAMACIÓN CELULAR

La reprogramación de células somáticas a iPSCs, se ha considerado el avance más importante en las ciencias de la vida desde el descubrimiento de la estructura del ADN (Zhang, 2013). La primera vez que se generaron iPSCs fue entregando los factores de reprogramación celular mediante métodos integrativos retrovirales y lentivirales. En los métodos integrativos los transgenes son insertados en secuencias específicas distribuidas a lo largo del genoma junto con el genoma del virus, esto puede producir mutaciones insercionales que pueden influir en el potencial de diferenciación, resultar en tumorigenesis o causar efectos impredecibles en la integridad funcional o regulación de los genes cercanos, ya que los transgenes integrados de manera estable no son silenciados completamente y pueden reactivarse durante la diferenciación (Zhou & Zeng, 2013; Schlaeger et al., 2015). La expresión residual de los transgenes puede afectar el comportamiento de las iPSCs; éstos pueden eliminarse mediante recombinasas, pero este proceso es laborioso y puede afectar el genoma de manera impredecible (Sommer et al., 2010).

Debido a estos problemas se han desarrollado métodos no integrativos de reprogramación. Estos consisten en la exposición transitoria de las células

somáticas a los factores de reprogramación. Se han generado exitosamente iPSCs mediante virus Sendai, adenovirus, transducción de proteínas, así como transfección de mRNAs, microRNAs, mini-círculos y vectores episomales basados en ADN plasmídico (Figura 1) (Trevisan et al., 2017). De los métodos no integrativos los vectores basados en el virus Sendai y los vectores episomales son los más utilizados en investigación, aunque los ARN modificados representan el estándar de oro en la clínica (Mandal & Rossi, 2013). Los vectores basados en el virus Sendai representan la estrategia basada en virus más segura en comparación a los otros virus empleados; están entre los más eficientes para generar iPSCs debido a que se mantienen en el citoplasma y se diluyen con las divisiones celulares. Sin embargo, siguen existiendo preocupaciones acerca del empleo de un sistema basado en virus y el costo de esta técnica es elevado (Fusaki et al., 2009).

Por otro lado, los vectores episomales representan una estrategia eficiente, segura y de bajo costo para generar iPSCs ya que, a diferencia de los vectores virales, sólo se replican una vez por ciclo celular lo que permite mantener una expresión alta del transgén sin la integración del vector en el genoma de la célula. Estos vectores se han usado para generar iPSCs a partir de fibroblastos, células sanguíneas y célula epiteliales renales (Okita et al., 2011; Schlaeger et al., 2015).

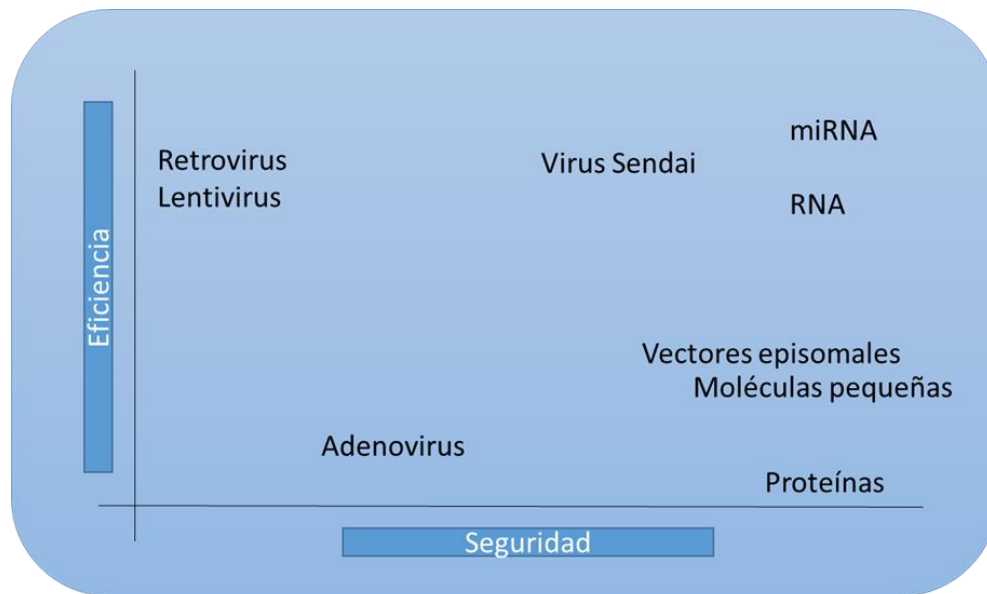


Figura 1. Métodos de reprogramación celular. Métodos virales y no virales empleado en la reprogramación de células somáticas a iPSCs.

2.4. CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Las iPSCs generadas por la expresión episomal de factores de reprogramación celular tienen características similares a las células troncales embrionarias (Figura 2), como lo son la capacidad de renovación indefinida y plasticidad celular, siendo un aspecto importante para el modelaje de enfermedades y su potencial uso en terapia clínica (Wang et al., 2017). Los fibroblastos fueron las primeras células somáticas empleadas exitosamente en la generación de iPSCs y siguen siendo ampliamente utilizados a pesar de que ya se ha demostrado que existen otras fuentes de células somáticas. Las iPSCs específicas de paciente han sido extensamente utilizadas para el estudio del mecanismo de diversas enfermedades y para probar nuevas terapias farmacológicas en una variedad de enfermedades humanas (Crandall & Lalande, 2013).

Las iPSCs se han utilizado en el estudio de enfermedades neurodegenerativas. Dimos y colaboradores generaron iPSCs de un paciente con esclerosis lateral amiotrófica, observando que estas células podían ser diferenciadas a neuronas motoras, el tipo de neuronas que se ve principalmente afectado en esta enfermedad (Dimos et al., 2008). Así mismo, en el 2009 Ebert y colaboradores generaron iPSCs a partir de fibroblastos de un paciente con atrofia muscular espinal. Estas células eran difíciles de expandir, pero mantuvieron el genotipo de la enfermedad y generaron neuronas motoras que mostraron déficit al ser comparadas con las neuronas motoras obtenidas de la madre del paciente. Este fue el primer estudio en el cual se reportó la capacidad de las iPSCs para emplearse como modelo específico en el estudio de enfermedades hereditarias (Ebert et al., 2009).

Las iPSCs pueden ser generadas a partir de varias fuentes celulares, que van desde fibroblastos de la piel hasta células sanguíneas. Las células somáticas también pueden ser obtenidas de una forma no invasiva, como las células del endometrio y células de la orina, esto es crucial para pacientes sensibles a cualquier operación traumática como lo son las personas con diabetes o hemofilia (Ding et al., 2015).

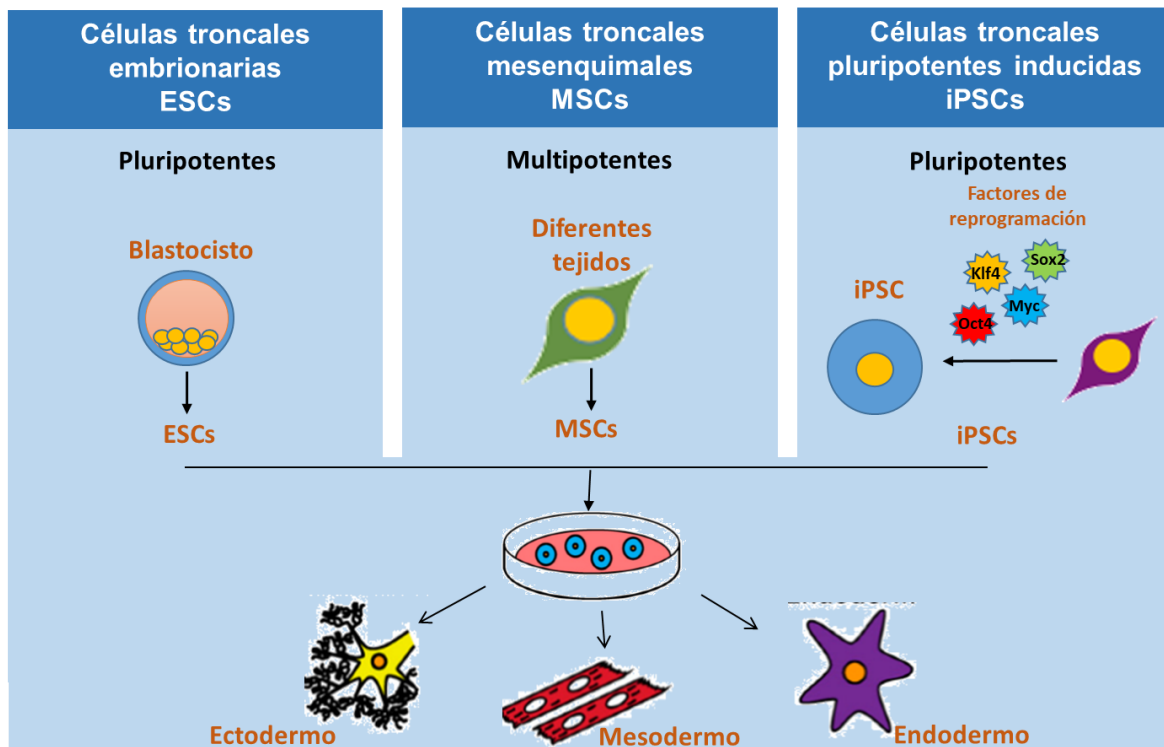


Figura 2. Tipos de células troncales.

2.5. CÉLULAS DE LA ORINA

Los riñones tienen una extensa red de túbulos con una superficie total mayor que la piel. Como parte de la fisiología normal alrededor de 2,000-7,000 células se desprenden de este sistema tubular y de otras partes del tracto urinario (uréteres, vejiga y uretra) y son excretadas diariamente en la orina. Estas células son completamente funcionales y pueden utilizarse para estudios *in vitro* (T. Zhou et al., 2011).

La obtención de células derivadas de la orina tiene la ventaja de ser una fuente celular accesible, las muestras pueden colectarse en cualquier lugar, el aislamiento de las células es simple y se expanden fácilmente, es un método

económico y universal (puede ser aplicable a cualquier edad, género y raza). El protocolo completo es relativamente rápido, alrededor de 2 semanas para el cultivo de células de orina y 3-4 semanas para la reprogramación. Las iPSCs obtenidas a partir de células de orina muestran un excelente potencial de diferenciación, por lo que son una elección para producir células pluripotentes de individuos sanos o de pacientes con enfermedades genéticas (T. Zhou et al., 2012).

Xue y colaboradores describieron un método práctico para generar iPSCs derivadas de células de la orina libres del uso de virus, suero, células alimentadoras (fibroblastos) y del oncogén c-Myc. Este grupo de investigadores lograron generar un banco de 93 líneas celulares de 20 donadores con diferentes enfermedades. Este banco de líneas de iPSCs representa un recurso valioso para la investigación y su futura aplicación en humanos (Xue et al., 2013).

2.6. CÉLULAS EPITELIALES RENALES

Las células epiteliales renales de los túbulos proximales tienen un papel importante en la reabsorción de moléculas como glucosa y aminoácidos, así como el control en el balance ácido-base mediante la excreción de bicarbonato y síntesis de amonio. También participan en la excreción de productos finales del metabolismo, como urea y amoniaco. Además, estas células son particularmente susceptibles a isquemia y daño por xenobióticos (Hauwaert et al., 2013).

Las CERs de los túbulos proximales fueron separadas por primera vez de las células del riñón mediante anticuerpos monoclonales para los marcadores CD10

(endopeptidasa neutra) y CD13 (aminopeptidasa N). Las células doble positivo para los marcadores CD10/CD13 muestran una morfología característica de células epiteliales de los túbulos proximales mientras que las células doble negativo para estos marcadores presentan la morfología de las células epiteliales de los túbulos distales. (Baer, Nockher, Haase, & Scherberich, 1997; Helbert, Dauwe, Van der Biest, Nouwen, & De Broe, 1997).

En el cultivo de células de la orina las primeras células en encontrarse son células escamosas y eritrocitos, pero después de 3-6 días se empiezan a formar pequeñas colonias de células epiteliales renales, que crecen rápidamente. Las colonias tienen dos morfologías principales: tipo I y tipo II (figura 3). Las colonias tipo I, tienen células que se caracterizan por presentar bordes irregulares y estar acomodadas de forma aleatoria, mientras que las colonias tipo II presentan células pequeñas con bordes lisos (T. Zhou et al., 2011; Dörrenhaus et al., 2000a).

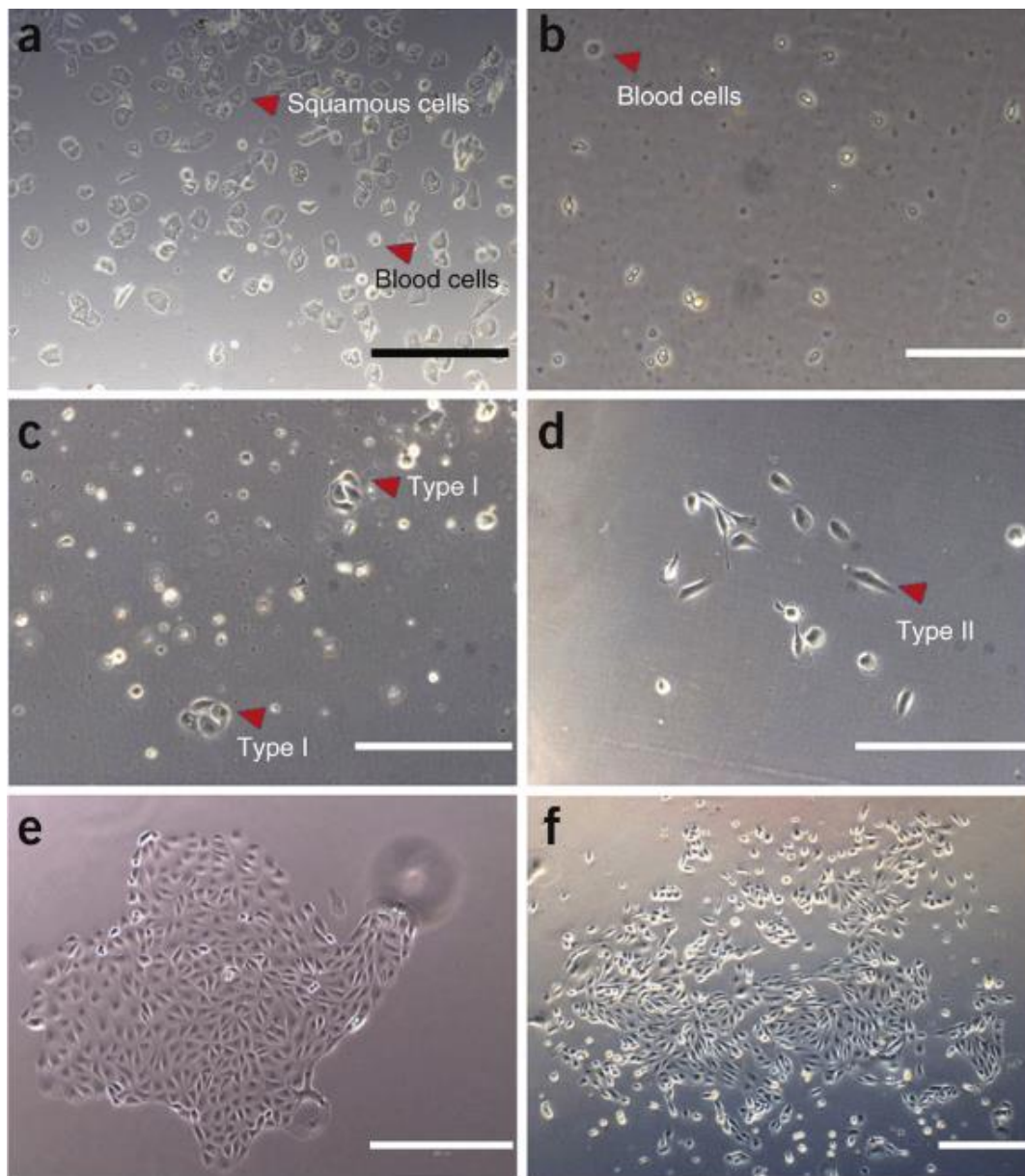


Figura 3. Morfología de las células epiteliales renales. a) Muestra de orina de mujer compuesta principalmente por células escamosas y eritrocitos. b) Muestra de orina de hombre compuesta principalmente eritrocitos. c) Células Tipo I. d) Células Tipo II. e y f) colonias de células de orina Tipo I y Tipo II (T. Zhou et al., 2012).

2.7. MATRICES EXTRACELULARES

La matriz extracelular (MEC) es una red macromolecular tridimensional no celular compuesta de colágeno, glicoproteínas, proteoglicanos, glucosaminoglicanos. Dentro de las glicoproteínas se encuentran la elastina, nectina, fibronectina, laminina y una gran cantidad de otras glicoproteínas; su composición varía dependiendo del tejido de origen. Los componentes de la MEC se unen entre ellos formando una red a la cual las células se unen a través de integrinas, dando lugar a una red compleja en la cual están embebidas todas las células de los tejidos y órganos. Las integrinas de las células unidas a la MEC transducen señales a la célula para que lleve a cabo procesos de supervivencia, crecimiento, migración, diferenciación y morfogénesis, lo que hace a la MEC no solo un soporte físico sino un componente importante que regula muchos procesos celulares, siendo vital para mantener la homeostasis celular (Theocharis et al., 2016).

Las MEC se clasifican en dos tipos principales, que varían bioquímica y morfológicamente: membranas basales y matrices intersticiales. Las membranas basales son láminas de matriz extracelular que separan los epitelios del tejido conectivo, están compuestas principalmente por colágeno tipo IV, laminina, entactina y heparán sulfato. Por otro lado, las matrices intersticiales rodean a la célula, están compuestas por colágeno I, III, V, VI, VII, XII entre otros, así como condroitín sulfato y heparán sulfato (Laurila & Leivo, 1993).

Para la propagación estable de iPSCs con finalidad terapéutica se han empleado distintas matrices extracelulares buscando mejorar las condiciones de

cultivo. Una de las matrices extracelulares comerciales más utilizadas es el Matrigel o Geltrex (Figura 4), ésta es una matriz extracelular derivada del sarcoma murino Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) que se emplea en combinación con medios condicionados o químicamente definidos para un cultivo celular libre de células alimentadoras. Sin embargo, debido a su origen xenogénico conlleva un rechazo inmunológico inherente, limitando su uso en la clínica (Peng et al., 2012). Debido a esto, uno de los retos para el cultivo de iPSCs es establecer la combinación óptima de los componentes de la matriz extracelular requeridos, para definir un sistema libre de componentes derivados de animales no humanos. Para sustituir el uso de Matrigel o Geltrex se ha probado la vitronectina recombinante como alternativa en el cultivo de iPSCs, así como otras proteínas de la matriz extracelular, como laminina y fibronectina. La vitronectina recombinante ha demostrado ser un candidato prometedor para el cultivo a largo plazo de las células troncales embrionarias, manteniendo su pluripotencia o diferenciación a linajes específicos (Prowse et al., 2010).

Todas las células interactúan con la matriz extracelular vía integrinas, receptores transmembrana multifuncionales compuestos de subunidades α y β , las cuales son requeridas para la adhesión y proliferación celular. Se ha estudiado la interacción de las integrinas de las iPSCs con los componentes del Matrigel/Geltrex y la vitronectina. Las integrinas $\beta 1$ de las iPSCs son importantes para su adhesión al Matrigel mientras que la $\alpha v \beta 5$ es requerida para la adhesión a la vitronectina. En ambas matrices las iPSCs presentan un nivel similar de adhesión. En cuanto a la proliferación, las iPSCs necesitan de la interacción de $\beta 1$ y $\alpha v \beta 5$ para su

proliferación en vitronectina, y solo la interacción de $\beta 1$ en Matrigel/Geltrex (Rowland et al., 2010).

Característica	Matrigel (hESC- qualified)	Geltrex (hESC- qualified)
Tiempo de vida	24 meses	18 meses
Concentración de proteína	8-12 mg/ml	15 mg/ml
Origen	Células tumorales murinas de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).	Células tumorales murinas de Engelbreth-Holm-Swarm (EHS).
Composición	Laminina, colágeno IV, heparán sulfato, entactina/nidógeno. Baja concentración de factores de crecimiento	Laminina, colágeno IV, heparán sulfato, entactina/nidógeno. Baja concentración de factores de crecimiento
Usos	Cultivo en 3D, Cultivo en 2D, Cultivo de estructuras similares a tejidos, Cultivo de iPSCs.	Cultivo en 3D, Cultivo en 2D, Cultivo de estructuras similares a tejidos, Cultivo de iPSCs.

Figura 4. Características de las matrices extracelulares Matrigel® y Geltrex®.

2.8. TRANSFECCIÓN CELULAR

La transfección es un procedimiento por el cual se introduce ácidos nucleicos foráneos a la célula para producir células genéticamente modificadas. Es un método útil para estudiar la función y regulación de los genes, así como la función de las proteínas. El material genético puede introducirse a la célula mediante métodos físicos, químicos y biológicos. El ADN o ARN que se introduce puede existir de

manera estable o transitoria dependiendo de la naturaleza del material genético (Kim & Eberwine, 2010).

Generalmente los vectores episomales se transportan al citoplasma de la célula por electroporación. Una de las ventajas de este método es la versatilidad en la optimización de los parámetros de electroporación dependiendo del tamaño y tipo de molécula, así como el tipo de célula y su estado en el ciclo celular. Las desventajas de este método es el costo del equipo, muerte celular alta, desequilibrio de la homeostasis y permeabilización permanente de la membrana plasmática (Han et al., 2015). Para sobrellevar estos problemas, los vectores episomales se unen con reactivos de transfección para formar complejos. Estos complejos facilitan el transporte del vector en el citoplasma sin la necesidad de usar electroporación.

Existe una gran cantidad de reactivos de transfección basados en lípidos o en polímeros, como Lipofectamina, FuGene, Turbofect, X-fect, entre otros. Las vesículas catiónicas de lípidos o “liposomas” son conocidos por ser reactivos de transfección eficiente, capaces de interactuar con el ADN y facilitar su entrega en la célula mediante la fusión con la membrana celular. Los lípidos catiónicos recubren la carga negativa del ADN/ARN creando una carga positiva neta o neutralizando la molécula, esto permite que la molécula se introduzca a través de la membrana celular de carga negativa. Debido a sus características los reactivos de transfección basados en lípidos son ideales para la transfección de distintos tipos celulares, como cultivos primarios y células de difícil transfección (Rahimi et al., 2018).

CAPÍTULO 3. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

3.1. JUSTIFICACIÓN

Actualmente se ha logrado la generación de células troncales pluripotentes inducidas a partir de la exposición de células somáticas a factores de reprogramación (Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4). Esto ha abierto oportunidades sin precedentes para el desarrollo de estrategias que involucran tanto la investigación experimental y la clínica.

Existen diferentes métodos para reprogramar las células somáticas a iPSCs, mediante vectores virales o no virales. La obtención de iPSCs empleando vectores no virales es un punto crítico para su aplicación en ensayos clínicos. Por otro lado, el cultivo primario de células epiteliales renales presentes en la orina es de gran interés debido a que la obtención de estas células no es invasiva. Por lo que son una fuente accesible de células somáticas para la generación de iPSCs.

Aunque existen diferentes métodos para la obtención de iPSCs no existe en la literatura algún estudio que compare entre las diferentes matrices y agentes de transfección que permita mejorar los procesos de obtención de iPSCs a partir de células epiteliales renales. Debido a lo anterior, ha sido de nuestro interés establecer las condiciones óptimas para su obtención con diferentes matrices extracelulares y reactivos de transfección.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Obtener células troncales pluripotentes inducidas a partir de un cultivo primario de células epiteliales renales humanas aisladas de orina.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecimiento de un cultivo primario de células epiteliales renales humanas a partir de muestras de orina.
2. Caracterización del cultivo primario de células epiteliales renales
3. Comparación de la eficiencia de tres matrices extracelulares y reactivos de transfección en la generación de células similares a iPSCs.
4. Demostración de que las células obtenidas son células similares a iPSCs.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. ESTRATEGIA GENERAL



4.2. MATERIALES

4.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Muestras de orina de sujetos sanos

Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal murino anti-Oct-4A humano (MAB17591, R&D Systems)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-Klf4 humano (AF3640, R&D Systems)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-Lin28A humano (AF3757, R&D Systems)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-NANOG humano (AF1997, R&D Systems)
- Anticuerpo monoclonal murino anti-citoqueratina humano (Z0622, Dako)
- Anticuerpo monoclonal murino anti-E-caderina humano (610181, BD Biosciences)
- Anticuerpo monoclonal murino anti- β -catenina humano (610153, BD Biosciences)
- Anticuerpo monoclonal murino anti-ZO-1 humano (33-9100, Invitrogen)
- Anticuerpo monoclonal murino anti-CD10 humano (Biocare medical, CM129C)
- Anticuerpo monoclonal murino anti-CD13 humano (MAB3815, R&D Systems)
- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con CF594A (20111, Biothium)

- Anticuerpo policlonal de cabra anti-IgG de ratón conjugado con NL557 (NL999, R&D Systems)

4.2.2. REACTIVOS DE CULTIVO CELULAR

- Antibiótico-antimicótico: penicilina-estreptomicina (11360070, Gibco)
- CryoSOfree DMSO-free (C9249, Sigma)
- Geltrex LDEV-free hESC-qualified (A14133-01, Gibco)
- Gentle cell dissociation reagent (07174, STEMCELL)
- Matrigel hESC-qualified matrix (354277, Corning)
- Medio DMEM/ F-12 1:1 + Glutamax (1X) (10565-018, Gibco)
- mTeSR1 basal medium (05851, STEMCELL)
- Opti-MEM I (1X) (31985-070, Gibco)
- ReLeSR (05872, STEM CELL)
- Renal epithelial cell basal medium (PCS-400-030, ATCC)
- Renal epithelial cell growth kit (PCS-400-040, ATCC)
- Suero de caballo (16050, Gibco)
- Suero fetal bovino (26140-079, Gibco)
- Tryple express (12604-013, Gibco)
- Vitronectina (rhVTN-N) (A14700, Gibco)

4.2.3. REACTIVOS ESPECIALES

- 4'6-Diamidino-2-Fenilindol DAPI (D1306, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Epi5 episomal iPSC reprogramming kit (A15958 y A15959, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- FuGENE HD transfection reagent (E2311/2, Promega)
- GeneJET RNA purification kit (K0731, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Lipofectamine stem transfection reagent (STEM00003, Invitrogen)
- Maxima first strand cDNA synthesis kit for RT-qPCR (K1641, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Maxima SYBR Green/ROX qPCR master mix (K0221, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Metanol 100% (M6125, Jalmek)
- Vectashield “antifade mounting media” (H-1000, Corning)

4.2.4. EQUIPO

- Baño de perlas para cultivo celular (74300-714, LabArmor)
- Cámara de Neubauer (BBC, Propper)
- Cámara Infinity 1 (Lumenera)
- Cámara micropublisher 5.0 RTV (MP5.0-RTV-CLR-10, QImaging)
- Campana de flujo laminar nivel II (UN-425-400, LabGard)
- Centrifuga para tubos tipo falcón 50 ml (Sorval STR 16R, Thermo Fisher Scientific Inc.)

- Centrifuga de tubos tipo eppendorf 1.5 ml (A1-15K, Sigma)
- Incubadora de CO₂ para cultivo celular (370, Thermo Electron Corporation)
- Micropipetas 0.5 µl-10 µl, 20 µl -200 µl, 200 µl -1000 µl (Labnet)
- Microscopio de fluorescencia (DM1000, Leica)
- Microscopio invertido (9804439, Southern Precision Instrument)
- Refrigerador 4°C/-20°C (RS25J5008SP, Samsung)
- Software para capturar imágenes Qcapture Pro 7 (QImaging)
- Software para gráficas y análisis estadísticos (GraphPad Prism 6)
- StepOne real time PCR system (Applied Biosystems)
- Ultracongelador (RevcoValue Plus, Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Vórtex (Genie 2, Daigger &CO, Inc.)

4.2.5. CONSUMIBLES

- Cajas de cultivo celular 25 cm² y 75 cm² (Corning)
- Criotubos de 2 ml (Corning)
- Frascos estériles de 200 ml (KIMAP1310)
- Pipetas serológicas 5 ml y 10 ml (Corning)
- Pipetor para cultivo celular (Labnet)
- Platos de 6, 12, 24, 48 y 96 pozos (Corning)
- Puntillas 10 µl, 200 µl y 1000 µl (Sorenson, BioScience Inc.)
- Tubos tipo eppendorf de 1.7 ml (Costar) y 600 µl (Corning)
- Tubos tipo falcón de 50 ml y 15 ml (Corning)

4.3. MÉTODOS

4.3.1. CONSIDERACIONES DE BIOSEGURIDAD

El protocolo fue autorizado por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina con el número de registro HT17-00002.

Como medida de seguridad para evitar la contaminación de la muestra se llevó a cabo una descontaminación diaria de la campana de flujo laminar con luz ultravioleta y etanol 70%, se usó equipo de protección personal como bata, cubrebocas, guantes de nitrilos y calzado cerrado para la manipulación de las muestras. Así mismo, todos los materiales plásticos utilizados fueron depositados en bolsa roja para su desecho y los residuos de la muestra fueron descontaminados con hipoclorito de sodio al 4% previo a su desecho en el drenaje.

4.3.2. SUJETOS DE INVESTIGACIÓN

En este estudio se incluyó sujetos de investigación como donadores. Los criterios de inclusión fueron sujetos sanos, de sexo masculino y mayores de edad. Se obtuvo el consentimiento informado escrito de los sujetos de investigación (ver anexo A).

4.3.3. RECOLECCIÓN DE ORINA Y EXPANSIÓN CELULAR

Se recolectaron muestras de orina de un volumen de 100 a 200 ml de sujetos sanos del Departamento de Histología para aislar las células presentes en la orina.

La muestra de orina se manejó como producto biológico no infeccioso, para desecharla se agregó hipoclorito de sodio al 4% y se desechó en el drenaje.

Para el establecimiento de un cultivo primario a partir de células epiteliales renales se procedió a la obtención de muestras de orina.

Previo a la obtención de la muestra, se les pidió a los sujetos donadores a que limpiaran bien el área alrededor del orificio externo de la uretra con toallas desechables estériles pre-humedecidas; se les indicó que la primera porción de la orina fuera desechada antes de recolectarla en el recipiente estéril. Se recolectaron 100-200 ml de orina por muestra. La muestra se transfirió a tubos de 50 ml, y se centrifugó a 300 g por 10 minutos a 22 °C. El sobrenadante fue descartado dentro del cuarto de cultivo, y se dejó un remanente de orina de aproximadamente 1 ml o menos. La pastilla celular fue resuspendida en 10 ml de PBS con penicilina/estreptomicina para prevenir el crecimiento de bacterias y hongos. Posteriormente, los sobrenadantes fueron centrifugados a 300 g por 10 minutos, estos pasos se realizaron tres veces en cada muestra. Después, se descartó una parte del sobrenadante y se dejó alrededor de 0.2 ml. Se agregó 1 ml de medio primario para resuspender las células. El medio primario contiene Dulbecco's Eagle Modified Medium/Nutrient mixture F-12 (DMEM/F-12 1:1) suplementado con suero bovino fetal (SBF) al 10%, Renal Epithelial Cell Growth Kit (RECG) y penicilina/estreptomicina 100 U/ml. Las células fueron transferidas a un plato de 12 pozos cubierta con 0.1 % de L-gelatina. Las células fueron incubadas a 37 °C con 5% CO₂. En los primeros 3 días, se añadió 1 ml de medio primario cada día. En el día 4 se aspiraron 3 ml de medio y se añadió 1 ml Renal Epithelial Cell Basal Medium

(RECBM) suplementado con RECG y penicilina/estreptomicina 100 U/ml. La mitad del medio fue remplazada diariamente hasta aparecieron las primeras colonias de células. Una vez que aparecieron las colonias de células se hizo el primer cambio completo de medio. Cuando el cultivo alcanzó una confluencia de 80-90%, las células se despegaron con TrypLE® Express durante 5 min, y se subcultivaron en platos de 12 pozos con Renal Epithelial Cell Basal Medium (RECBM) suplementado con RECG y penicilina/estreptomicina 100 U/ml, para obtener suficientes células para los experimentos de caracterización de las CERs y generación de las células similares a iPSCs.

4.3.4 CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES

Para la caracterización de las células epiteliales renales primero se realizó una tinción de hematoxilina y eosina para observar la morfología general del cultivo primario de las CERs, para esto se sembraron 6×10^4 células sobre cubreobjetos en platos de 24 pozos. Al día siguiente las células se fijaron con metanol y acetona, se lavaron con PBS 1X y fueron teñidas con los colorantes hematoxilina y eosina. Estas se observaron al microscopio de campo claro se capturaron microfotografías con el programa Q-Image Pro-7.

Para una caracterización más específica se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para detectar marcadores de diferenciación epitelial. Se sembraron 6×10^4 células sobre cubreobjetos en platos de 24 pozos. Después de 12 horas se realizó una fijación química con metanol y acetona, se lavó con PBS 1X y se bloquearon con suero de caballo al 3% durante 1 hora a 4°C. Las células se

lavarón con PBS 1X y fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-Citoqueratina (1:100), anti-E-caderina (1:100), anti-ZO-1 (1:100), anti-CD13 (1:100) y anti-CD10 (1:100) toda la noche a 4°C. Al siguiente día las células fueron lavadas con PBS 1X para retirar el anticuerpo primario y se incubaron con el anticuerpo secundario: anti-ratón CF594A (1:200) durante 3 horas a 4°C en la oscuridad. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (286 nM en PBS 1X) por 10 minutos y las células se lavaron con PBS 1X. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con VectaShield y se analizaron mediante microscopia de Epifluorescencia (Leica). Para el análisis de las CERs con los diferentes anticuerpos, se capturaron microfotografías con el programa Q-Image Pro-7.

4.3.5. GENERACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Los cultivos de células epiteliales renales con menos de 4 subcultivos fueron utilizados para inducir la reprogramación a células troncales pluripotentes. Las células se despegaron con TrypLE® Express durante 5 min y se disgregaron suavemente. Se sembraron 6×10^4 CERs en platos de 24 pozos cubiertos con diferentes matrices extracelulares: Matrigel (1:100), Geltrex (1:100) y vitronectina (1:100). Después de incubarse durante 24 horas, las células se transfectaron con los plásmidos pCE-hOCT3/4 (Oct4), pCE-hSK (Sox2, Klf4), and pCE-hUL (L-Myc, Lin28), pCEmp53DD (mp53DD) y pCXB-EBNA1 (EBNA1) (Epi5 Episomal iPSC Reprogramming); para las transfecciones se usaron los reactivos Lipofectamine Stem Cell y FuGENE HD de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para la formación de los agregados de DNA plasmídico y liposomas se usó el medio Opti-

MEM. 24 horas después de la transfección se realizó un cambio del medio secundario y se colocó el medio basal mTeSR1® suplementado con penicilina/estreptomicina (100 U/ml). Las células se observaron diariamente en el microscopio invertido a una magnificación de 100X para detectar la aparición de las primeras colonias de células similares a iPSCs. Las colonias que presentaron la morfología reportada en la literatura, células poliédricas de escaso citoplasma y núcleo prominente, fueron seleccionadas y sembradas en platos de 96 pozos para su expansión. Cuando las colonias alcanzaron una confluencia del 80 % se despegaron y disgregaron con el reactivo ReLeSR Stem Cell. Después se sembraron en platos de 48 pozos para continuar con la expansión y realizar los experimentos de caracterización y análisis de expresión de genes de pluripotencia en las células similares a iPSCs.

4.3.6. CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS

Para la caracterización de las células similares a iPSCs obtenidas a partir de la reprogramación de células epiteliales renales con los factores de reprogramación, se sembraron 6×10^4 células sobre cubreobjetos en placas de 24 pozos. Después de 12 horas las células fueron fijadas con metanol y acetona, se lavaron con PBS 1X y se bloquearon con suero de caballo al 3% durante 1 hora a 4°C. Las células se lavaron con PBS 1X y fueron incubadas con los anticuerpos primarios: anti-Oct4A (1:50), anti-Klf4 (1:50), anti-Lin28A (1:50) y anti-NANOG (1:50), toda la noche a 4°C. Al siguiente día las células fueron lavadas con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario: anti-ratón CF594A (1:200) y anti-cabra NL557 (1:200)

durante 3 horas a 4°C en la oscuridad. Los núcleos fueron contrateñidos con DAPI (286 nM en PBS 1X) por 10 minutos y las células se lavaron con PBS 1X. Finalmente, los cubreobjetos se montaron con VectaShield y se analizaron mediante microscopia de Epifluorescencia (Leica). Para el análisis de las células similares a iPSCs con los diferentes anticuerpos, se capturaron microfotografías de varios campos con el programa Q-Image Pro-7.

4.3.7. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE PLURIPOTENCIA EN LAS iPSCs

Para el análisis de la expresión de genes se realizó el aislamiento del RNA de las clonas obtenidas de células similares a iPSCs con el kit GeneJet RNA Purification siguiendo las instrucciones del fabricante. Después a partir de 1µg de los transcritos de RNA se realizó el cDNA mediante retrotranscripción inversa con el kit Maxima First Strand cDNA Synthesis para RT-PCR siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez obtenido el cDNA se llevó a cabo la qPCR con el Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix con los siguientes oligonucleótidos:

Oligonucleótidos	Forward	Reverse
Oct3/4	F-GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAGG	R-CTTCCCTCCAACCAGTTGCCCAAAC
Sox2	F- GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAGAGG	R-TTGCGTGAGTGTGGATGGGATTGGTG
LIN28	F-GGAGGCCAAGAAAGGGAATATGA	R-AACAATCTTGTGGCCACTTTGACA
NANOG	F-CAGCCCCGATTCTCCACCAGTCCC	R-CGGAAGATTCCAGTCGGGTTTAC
NODAL	F-GGGCAAGAGGCACCGTCGACATCA;	R-GGGACTCGGTGGGCTGGTAACGTTTC
REX1	F-CAGATCCTAAACAGCTCGAGAAT	R-CAGATCCTAAACAGCTCGAGAAT
GAPDH	F-GTGGACCTGACCTGCCGTCT	R-GGAGAGTGCGGTGTCGTGT

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos usados en PCR tiempo real.

Las reacciones de qPCR se hicieron con el equipo StepOne Real Time PCR System. Los cálculos se hicieron con la fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ y normalizaron con la expresión del gen endógeno GAPDH.

4.3.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico de los resultados se realizó con el programa GraphPad, utilizando la prueba de ANOVA one-way. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos. Se hicieron al menos dos repeticiones independientes de los experimentos y se graficó el promedio $\pm$ la desviación estándar.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

5.1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1: ESTABLECIMIENTO DE UN CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES DE MUESTRAS DE ORINA DE SUJETOS SANOS

En la obtención de las células troncales pluripotentes inducidas a partir de un cultivo primario de células epiteliales renales humanas aisladas de orina, fue posible establecer cultivos primarios de células epiteliales renales a partir de las células aisladas de la orina de sujetos sanos. En estos cultivos se observaron colonias del tipo I y tipo II como está reportado en la literatura (Dörrenhaus et al., 2000a). En los días 1-5 fue posible observar células escamosas y células redondeadas, de tamaño pequeño (Figura 5).

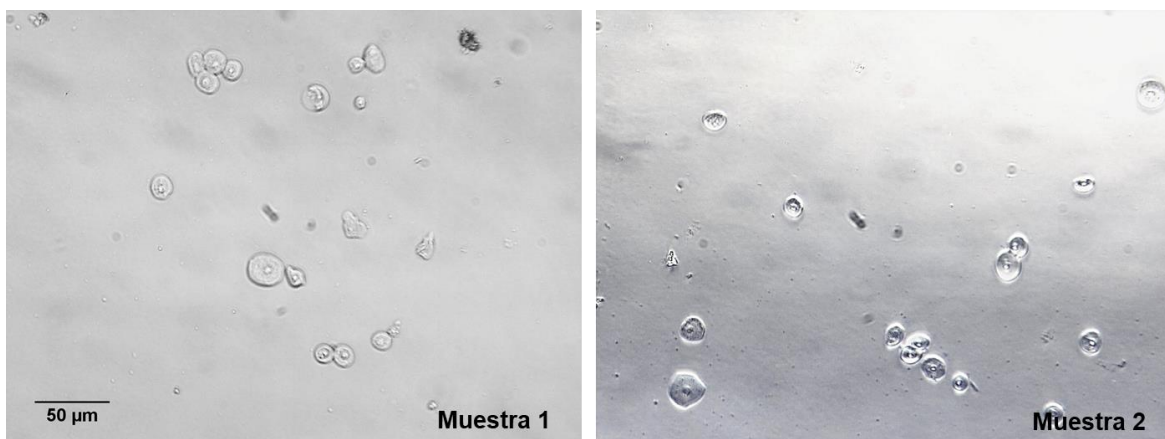


Figura 5. Día 1 del cultivo de células aisladas de muestras de orina. Microfotografías representativas de las células presentes en dos muestras de orina. Microscopio de campo claro, barra de escala = 50 µm.

Entre los días 6-9 se observó la aparición de colonias, las colonias y las células de estas colonias son diferentes en su morfología. Se observó un cultivo

confluente a los 12 días después del aislamiento de las células derivadas de orina (Figura 6).

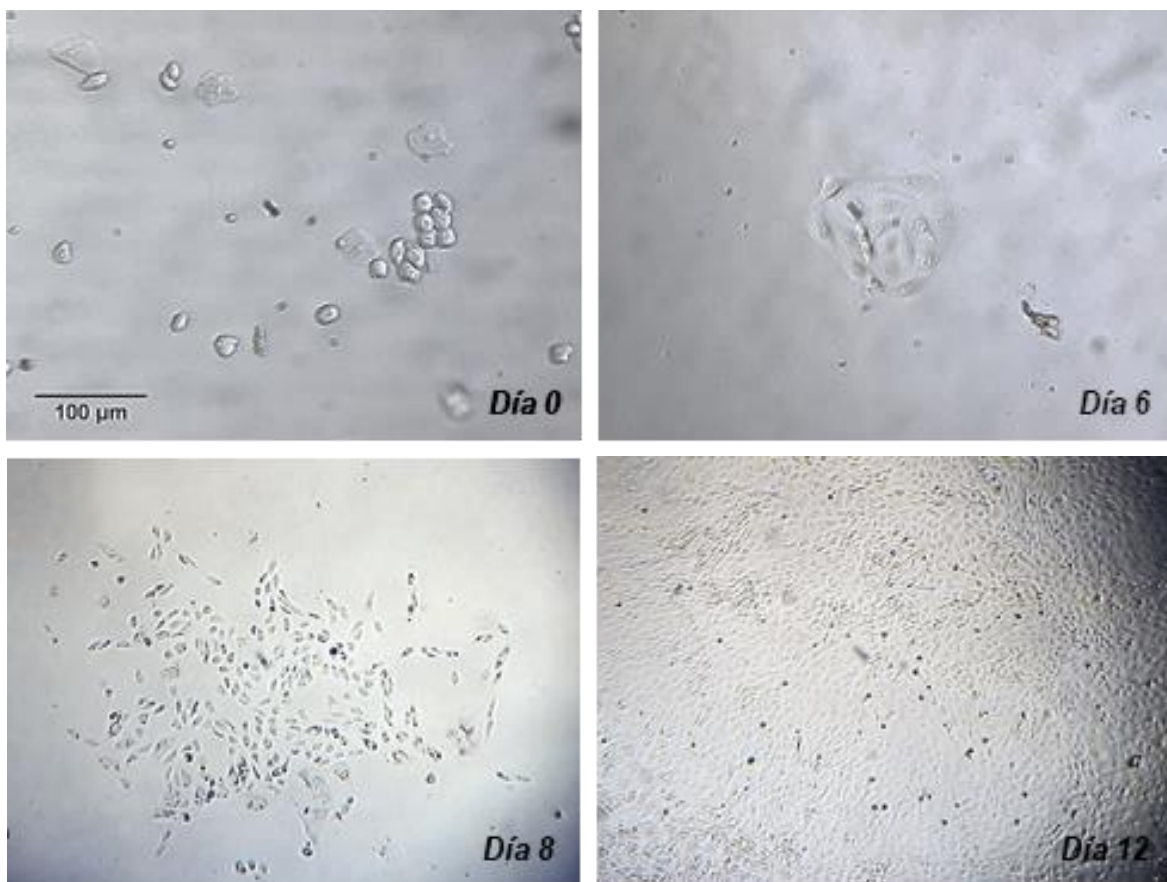


Figura 6. Cultivo primario de células epiteliales renales aislado a partir de una muestra de orina. Microscopio de campo claro, barra de escala = 100 µm.

En el cultivo establecido de células epiteliales renales se logró observar colonias del tipo I estas son compactas y las células que la conforman presentan morfología redondeada, en cambio las colonias tipo II son de forma irregular y las células presentan una morfología ahusada (Figura 7).

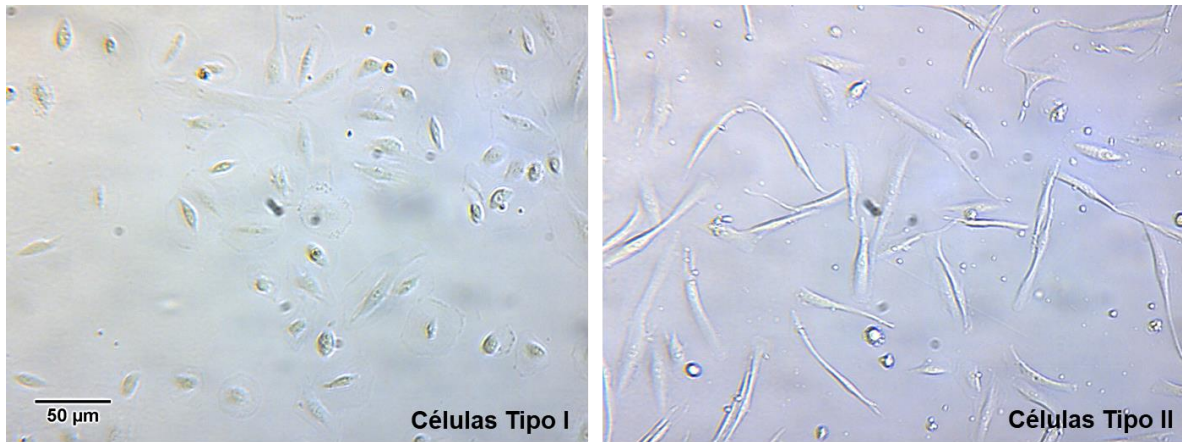


Figura 7. Células epiteliales renales. Tipo I. Células redondeadas, crecen en colonias compactas. Tipo II. Células ahusadas, crecen en colonias más dispersas. Microscopio de campo claro, barra de escala = 50 µm.

5.2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2: CARACTERIZACIÓN DEL CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS

EPITELIALES RENALES

Para la caracterización del cultivo primario de las células epiteliales renales primero se realizó una tinción de hematoxilina y eosina para observar la morfología general de las células en cultivo, en estas microfotografías se puede observar una mezcla de dos tipos celulares, compuesto de células ahusadas y células redondeadas, más a detalle se puede observar cómo estas células tienen un núcleo central con nucléolo prominente, bien definido, característico de células metabólicamente activas (Figura 8).

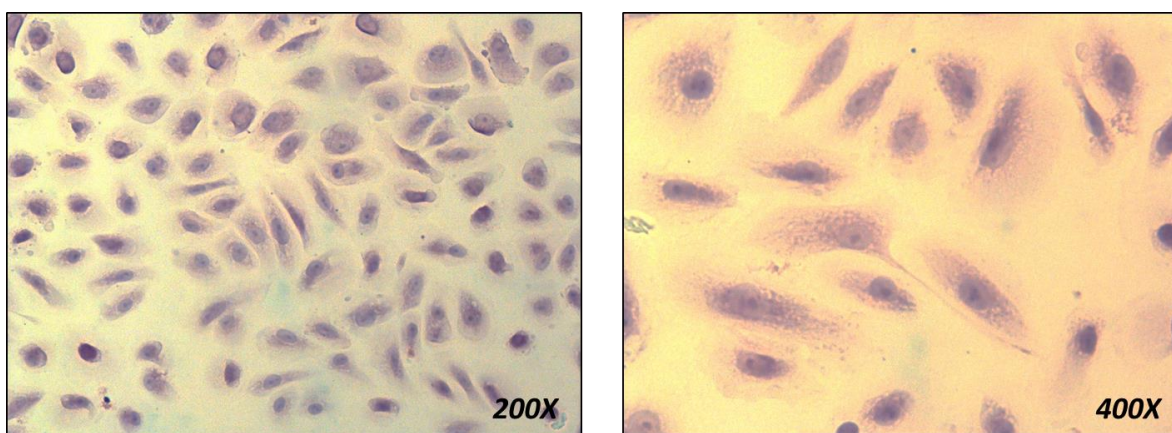


Figura 8. Células epiteliales renales teñidas con hematoxilina y eosina. El cultivo de CERs se muestra con una mezcla de dos tipos celulares. Microscopio de campo claro, magnificación 200x y 400x.

En la literatura se ha reportado que las CERs expresan marcadores específicos de diferenciación epitelial, como E-cadherina, citoqueratina 7, β -catenina, zonula occludens-protein 1 (ZO-1) y actina, así como marcadores específicos de células epiteliales renales de los túbulos proximales CD10 y CD13 (T. Zhou et al., 2012). En base a ese antecedente se realizaron ensayos de

inmunofluorescencia a los cultivos celulares de CERs. Mediante este ensayo se observó la expresión de la proteína estructural de los filamentos intermedios del citoesqueleto *citoqueratina*, así como las proteínas de uniones adherentes célula-célula *E-cadherina* y β -*catenina*, así como la proteína de uniones ocluyentes *ZO-1* (Figura 9).

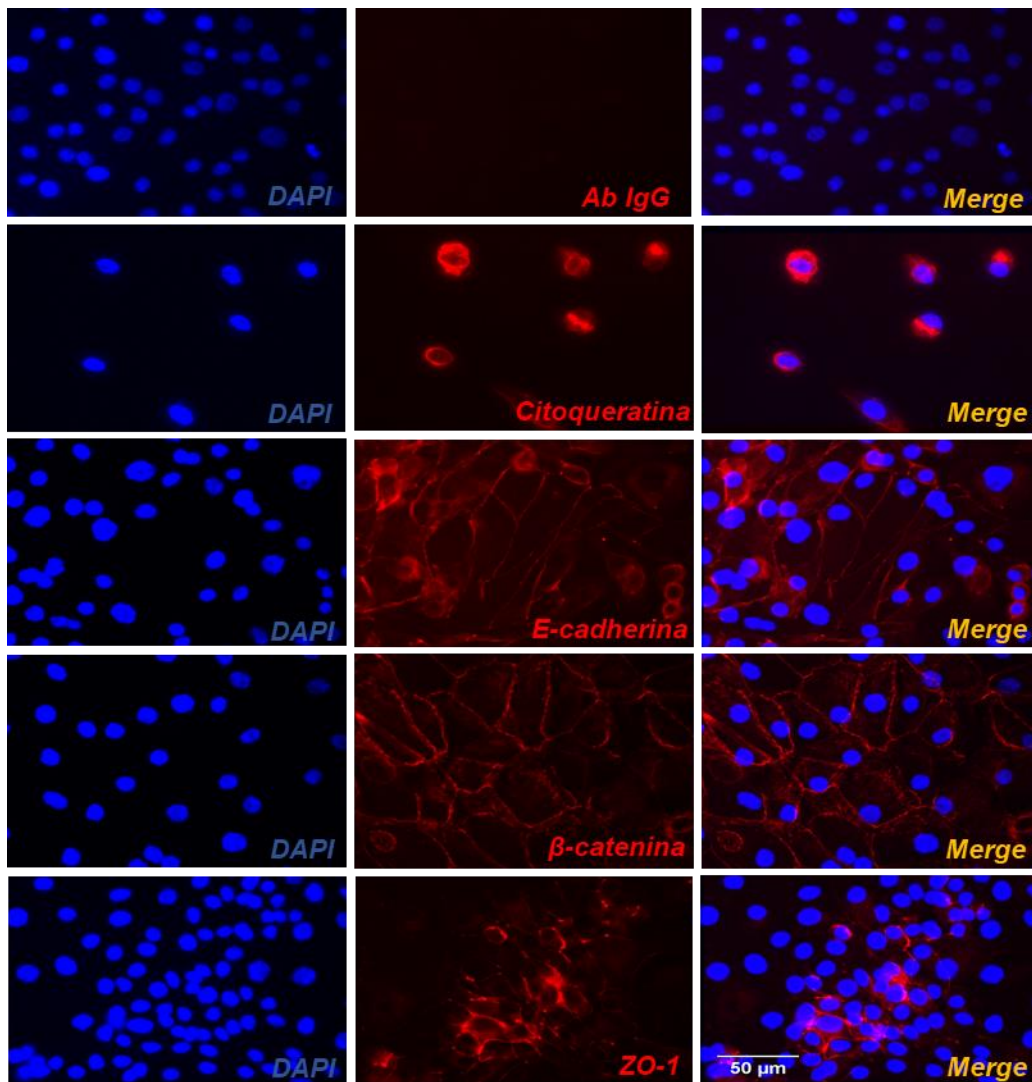


Figura 9. Expresión de marcadores específicos de diferenciación epitelial en las células epiteliales renales. Las microfotografías muestran señales positivas (canal rojo) para los marcadores citoqueratina, E-cadherina, β -catenina, y ZO-1. Los núcleos se tiñeron con DAPI (color azul). Microscopia de fluorescencia, barra de escala = 50 μ m.

Así mismo las CERs aisladas de orina expresaron los marcadores característicos de células epiteliales renales de los túbulos proximales: endopeptidasa neutra (CD10) y aminopeptidasa N (CD13) (Figura 11). Se determinó mediante inmunofluorescencias el establecimiento de un cultivo primario de CERs a partir de muestras de orina y que además estas corresponden a células epiteliales renales de los túbulos proximales.

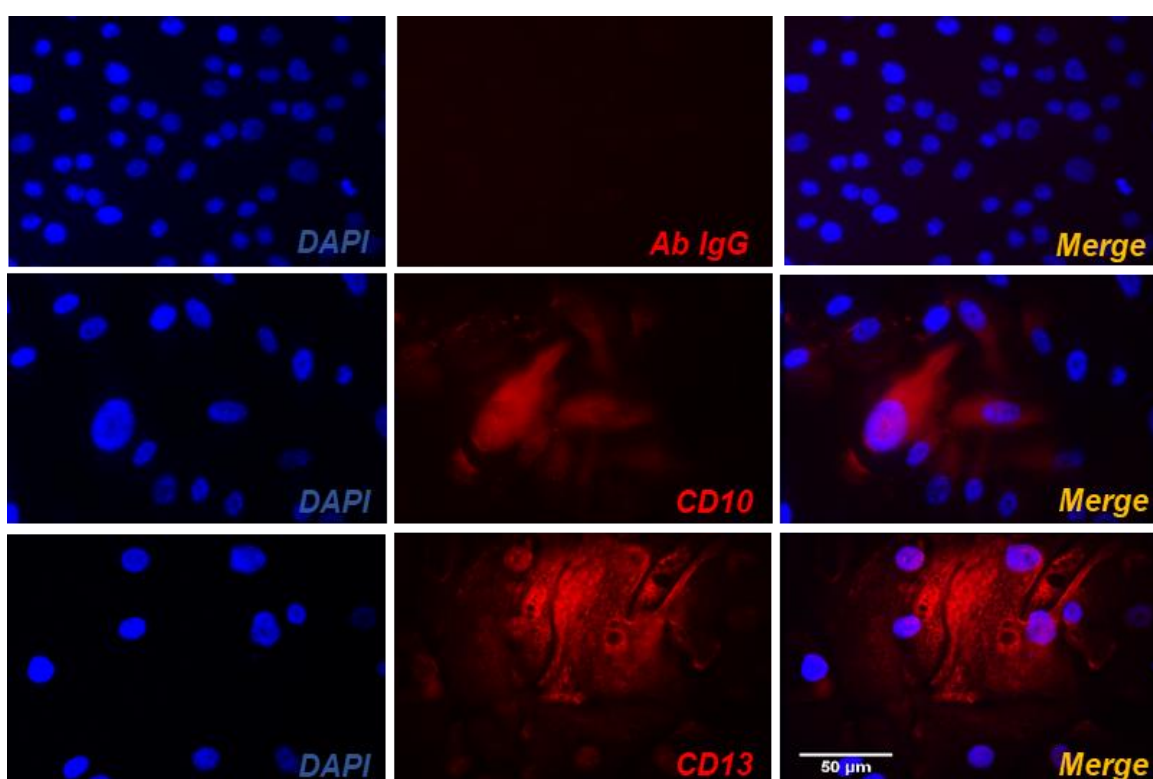


Figura 10. Expresión de marcadores específicos de diferenciación de células epiteliales renales de los túbulos proximales. Las microfotografías muestran señales positivas (canal rojo) para los marcadores CD10 (endopeptidasa neutra) y CD13 (aminopeptidasa M) en las CERs. Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul). Microscopía de fluorescencia, barra de escala = 50 μm .

En los días 12-15 el cultivo alcanzo una confluencia de 80 %, adecuada para realizar el primer subcultivo celular para continuar con la caracterización de las CERS y el ensayo de reprogramación celular (Figura 11).

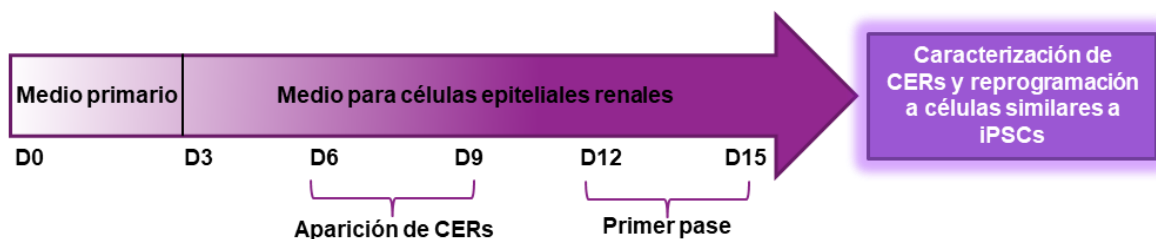


Figura 11. Diagrama de flujo de las etapas para establecer el cultivo primario de células epiteliales renales.

5.3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3: REPROGRAMACIÓN DE LAS CÉLULAS EPITELIALES RENALES USANDO VECTORES NO VIRALES Y DIFERENTES MATRICES EXTRACELULARES

Las células somáticas pueden ser reprogramadas a iPSCs mediante la expresión episomal de ciertos factores de reprogramación definidos. Las iPSCs pueden generarse usando vectores no integrativos como adenovirus o plásmidos, siendo los vectores plasmídicos preferidos para la aplicación clínica, debido a presentan una mayor seguridad al utilizarlos (Stadtfield, Nagaya, Utikal, Weir, & Hochedlinger, 2008; Okita et al., 2013). En este trabajo se transfectaron CERs con menos de 3 pases con vectores no virales que expresan los factores de reprogramación *Oct4*, *Sox2*, *Lin28*, *L-Myc* y *Klf4* para inducir la reprogramación a células similares a iPSCs. Después de 12 días de la transfección fue posible observar colonias pequeñas compuestas de células poliédricas de escaso citoplasma y núcleo prominente (Figura 12).

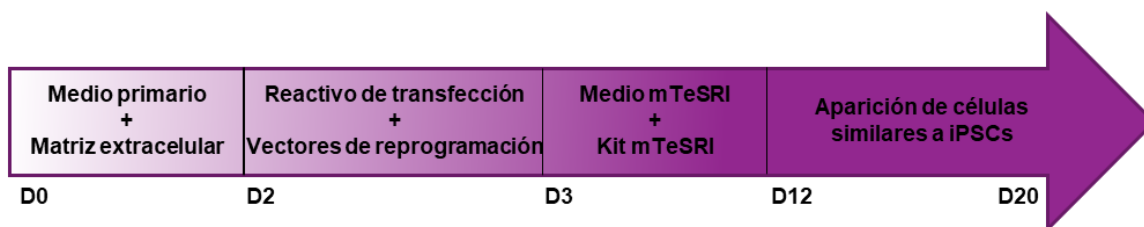


Figura 12. Diagrama de flujo de las etapas para establecer el cultivo de células similares a iPSCs.

Los cambios morfológicos son indicativos de la reprogramación celular. El criterio morfológico para la identificación de colonias de iPSCs en cultivo es: colonias compactas con bordes distintos y bordes definidos formadas por células con núcleos prominentes centrales y con escaso citoplasma, estas células son

morfológicamente similares a las células troncales embrionarias (Nagasaka et al., 2017). Al día 20 después de la transfección con los factores de reprogramación, se observaron colonias compactas, las colonias se seleccionaron y expandieron para realizar la caracterización con los marcadores de pluripotencia de las células similares a iPSCs mediante ensayo de inmunofluorescencia y PCR tiempo real (Figura 13).

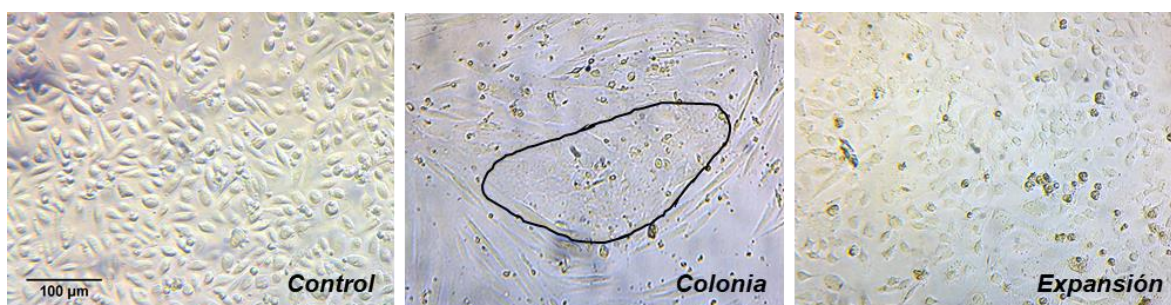


Figura 13. Colonia representativa de células similares a iPSCs. Control: cultivo primario de células epiteliales renales. Estas células fueron transfectadas con los vectores plasmídicos que expresan los factores de reprogramación: pCE-hOCT3 / 4 (Oct4), pCE-hSK (Sox2, Klf4) y pCE-hUL (L-Myc, Lin28). Colonia: una colonia células similares a iPSCs (línea color negra) rodeada por CERs. Expansión: expansión de las colonias de células similares a iPSCs, se observan células poliédricas de escaso citoplasma y núcleo prominente. Microscopía de campo claro, barra de escala = 100 µm.

Una vez que se obtuvieron células similares a iPSCs a partir de las CERs para el mejoramiento del protocolo de obtención de células similares a iPSCs se probaron tres matrices extracelulares y dos reactivos de transfección. En el primer ensayo, se sembraron CERs en Matrigel y se transfectaron con el kit Epi5 usando dos reactivos de transfección: Lipofectamina Stem Cell o FuGENE. Se generaron más colonias de células similares a iPSCs en la combinación de Matrigel con

Lipofectamina Stem Cell que en las células transfectadas con FuGENE, pero no hubo diferencia significativa (Figura 14).

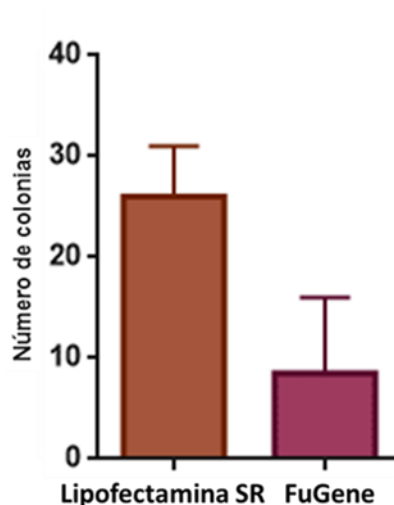


Figura 14. Comparación de la matriz extracelular Matrigel y los reactivos de transfección Lipofectamina stem cell y FuGENE. En la gráfica se muestra el número de colonias de células similares a iPSCs obtenidas con estas condiciones.

En base a lo obtenido con Matrigel se prosiguió a utilizar otros dos tipos de matrices extracelulares, Geltrex y vitronectina. En este ensayo se observó que con el uso del reactivo Lipofectamina Stem Cell se obtenía mayor número de células similares a iPSCs a diferencia del uso del reactivo FuGENE. Cada reactivo se utilizó en combinación con los tres tipos de matrices (Figura 15).

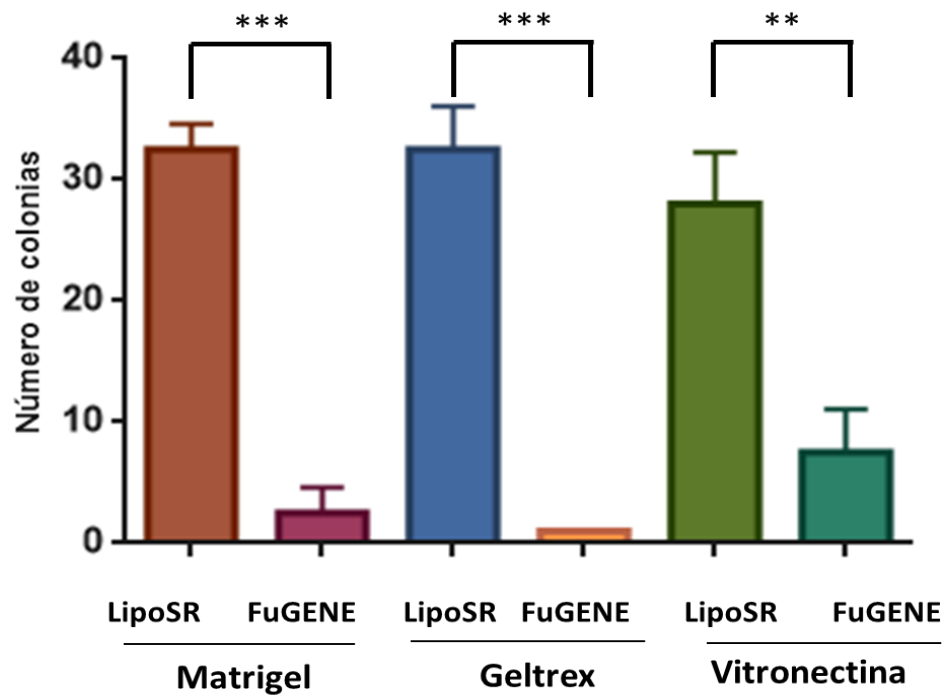


Figura 15. Comparación de matrices extracelulares y reactivos de transfección para mejorar la generación de colonias de células similares a iPSCs. El grafico muestra el número de colonias de células similares a iPSCs obtenidas con las matrices extracelulares Matrigel, Geltrex y vitronectina.

5.4. OBJETIVO ESPECÍFICO 4: LAS CÉLULAS SIMILARES A CÉLULAS TRONCALES PLURIPOTENTES INDUCIDAS A PARTIR DE CÉLULAS EPITELIALES RENALES EXPRESAN MARCADORES DE PLURIPOTENCIA

Nuestro siguiente objetivo fue determinar si las colonias de células similares a iPSCs expresaban marcadores de pluripotencia después de la expansión clonal. Para determinar esto se realizó una inmunofluorescencia que confirmó que las células similares a iPSCs con no más de tres pasajes expresaron las siguientes proteínas específicas de pluripotencia después de su expansión: Oct4, Klf4, NANOG y Lin28 (Fig. 16). La expresión de los marcadores asociados a la pluripotencia indicó la generación exitosa de células similares a iPSCs a partir de células epiteliales renales.

Para determinar si las células similares a iPSCs expresan otros marcadores de pluripotencia después de su expansión se realizó RT-PCR y qPCR. Se determinó que las células similares a iPSCs expresan genes pluripotencia característicos de ESCs, como *oct4*, *sox2*, *nanog*, *lin28*, *nodal* y *rex1* (Fig. 17).

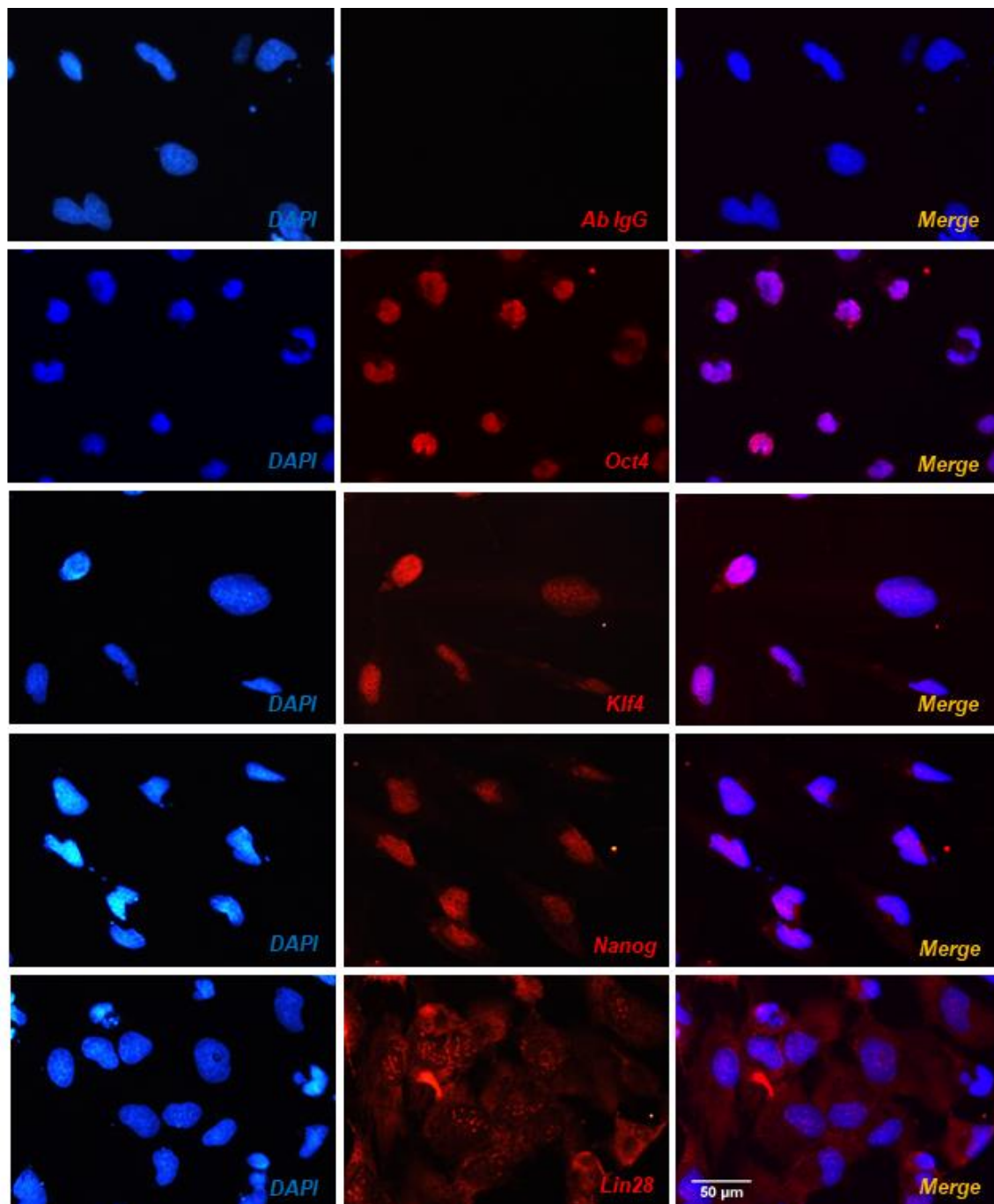


Figura 16. Caracterización de las células similares a iPSCs mediante inmunofluorescencia. Las microfotografías muestran señales positivas (canal rojo) para los marcadores de pluripotencia Nanog, Lin28, Oct4 y Klf4. Los núcleos se tiñeron con DAPI (canal azul). Microscopía de fluorescencia, barra de escala = 50 µm.

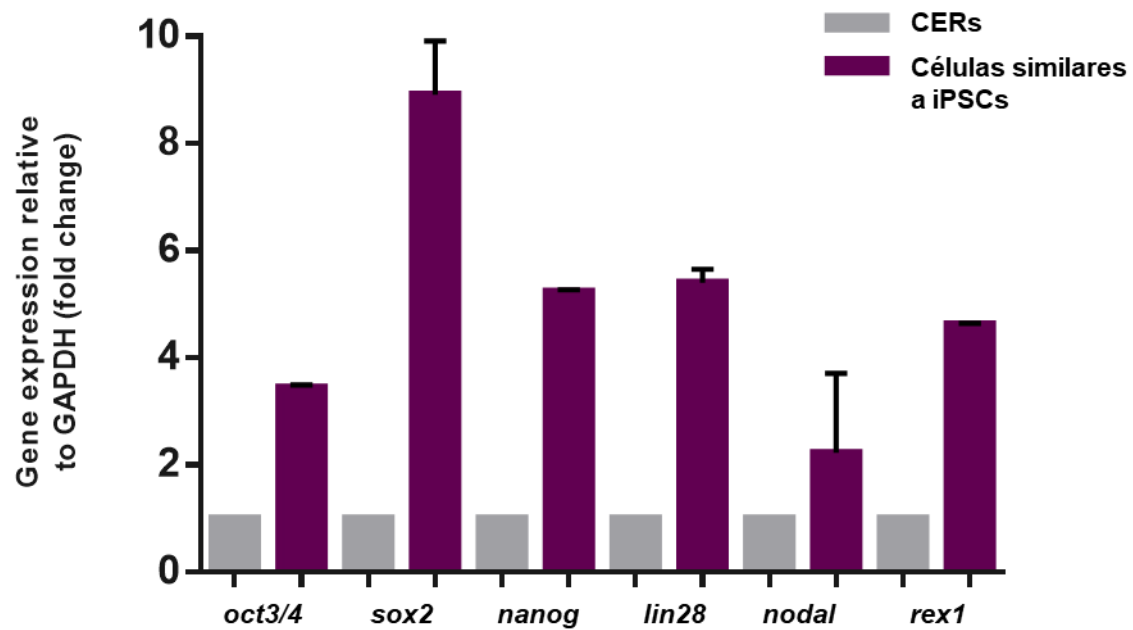


Figura 17. Expresión génica de marcadores de pluripotencia. Las células similares a iPSCs se analizaron mediante PCR tiempo real. El gráfico muestra la expresión de los genes de pluripotencia Oct3 / 4, Sox2, NANOG, Lin28, NODAL y Rex1. Los controles de referencia fueron las células epiteliales renales antes de la reprogramación celular. GAPDH endógeno se utilizó para la normalización.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

La fuente celular ideal para su aplicación clínica en terapias celulares debe ser accesible, no invasiva y universal. Esto es importante para su aplicación en la mayoría de las enfermedades sin ser una limitante la condición del paciente, ya que uno de los puntos a considerar en el momento de la obtención de las células es su vulnerabilidad.

El riñón humano contiene una extensa red de túbulos; las células del sistema tubular renal y del tracto urinario se desprenden y se excretan diariamente en la orina, a estas células se les denomina células derivadas de la orina. Las células derivadas de orina son una fuente de células somáticas obtenidas sin intervención invasiva, que es la principal ventaja de las células derivadas de orina sobre las células somáticas de otras fuentes, como las células troncales derivadas de tejido adiposo, los fibroblastos dérmicos o las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Se encuentran diferentes tipos de células en la orina, pero las células principales en la orina son las células troncales de la orina (USCs) y las células epiteliales renales debido a su alta capacidad de expansión. Los otros tipos de células en la orina son los podocitos y las células epiteliales del túbulo proximal, pero estas células tienen menos capacidad de expansión y menor vida útil que las USCs y las células epiteliales renales (Manaph et al., 2018).

En este estudio, describimos el aislamiento de células derivadas de orina de donantes adultos sanos, para el establecimiento de cultivos primarios de células epiteliales renales y su posterior reprogramación en células similares a iPSCs mediante el uso de vectores no virales que expresan Oct4, Sox2, L-Myc, Lin- 28 y

Klf4. Además, comparamos las capacidades de diferentes matrices extracelulares comerciales y reactivos de transfección y se obtuvo la mejor combinación de estos reactivos que permitió una adquisición eficiente de células similares a iPSCs.

Existen varios estudios en los que se aíslan células derivadas de la orina de pacientes con diferentes enfermedades, como hemofilia, β -thalassemia, esclerosis lateral amiotrófica, distrofia muscular de Duchenne, entre otras (Xue et al., 2013; Park et al., 2015; Afzal & Strande, 2015). Nuestro estudio se basa en un método de cultivo previamente reportado (T. Zhou et al., 2011). Nosotros utilizamos DMEM / F-12 suplementado con factores para el crecimiento de células epiteliales renales como medio primario para el establecimiento del cultivo primario de células epiteliales renales y el medio basal para células epiteliales renales suplementado con factores para el crecimiento de células epiteliales renales como medio secundario para el cultivo de las células aisladas de la orina. Mientras tanto, Zhou y colaboradores utilizaron DMEM / F-12 y medio basal para células epiteliales renales complementado con factores SingleQuot. Nosotros observamos colonias con bordes irregulares y lisos que aparecieron después de 3-6 días de cultivo, lo que es consistente con las observaciones de Zhou y colegas (T. Zhou et al., 2011). Los cultivos CERs se establecieron a partir del 75% de los aislamientos de muestras de sujetos sanos que contenían células viables; este porcentaje es más alto que las tasas de aislamiento del 37% y el 52% reportadas de muestras de sujetos sanos (Dörrenhaus et al., 2000b; Belik et al., 2008).

A continuación, sembramos células epiteliales renales en Matrigel, Geltrex o vitronectina y reprogramamos las CERs a células similares a iPSCs utilizando

vectores no virales para la expresión episomal de factores de reprogramación. Las células similares a iPSCs obtenidas del cultivo en Matrigel, Geltrex o vitronectina tenían una morfología similar a las hESCs con núcleos centrales y prominentes, citoplasma escaso y formaron colonias pequeñas con células poliédricas. Es importante destacar que las colonias similares a colonias de iPSCs expresaron los marcadores de pluripotencia Oct4, Klf4, Lin28 y NANOG, esto se comprobó mediante ensayos de inmunofluorescencia y PCR tiempo real. Además, confirmamos mediante qPCR la expresión de los genes de pluripotencia Oct3/4, Sox2, NANOG, Lin28, NODAL y Rex1, característicos de las células troncales embrionarias humanas. Por supuesto, se deben realizar varios ensayos para juzgar la pluripotencia relativa de las células similares a iPSCs obtenidas, y así poder compararlas con el perfil de expresión de las ESCs (Chin et al., 2009).

A lo largo de los años se ha avanzado en la definición de la disposición molecular de los componentes en la membrana basal debido a la variación entre las líneas iPSCs obtenidas con diferentes sistemas libres de células alimentadores y condiciones de cultivo (Amit, Shariki, Margulets, & Itskovitz-Eldor, 2004; Sun et al., 2009; Nagasaka et al., 2017). El Matrigel, es una de las matrices extracelulares más utilizadas para el crecimiento de hESC sin células alimentadoras. Esta matriz extracelular se extrae del tumor de ratón Engelbreth-Holm-Swarm y consiste en una mezcla de laminina, colágeno IV, proteoglicano de sulfato de heparán y nidogeno-1, que anteriormente se llamaba entactina (Kleinman et al., 1982; Stojkovic et al., 2005).

Los componentes individuales de la membrana basal han sido examinados en diferentes estudios. De los estudios realizados, los cultivos mantenidos en laminina, colágeno IV y fibronectina consistieron en colonias compactas de hESC, aunque los cultivos mantenidos en fibronectina o colágeno IV no contenían tantas colonias como las mantenidas en Matrigel o laminina (Xu et al., 2001), lo que sugiere la importancia de todos los componentes de la membrana basal para el establecimiento de las colonias hESC.

Además, se ha investigado la expresión y función de los receptores de integrina de la matriz extracelular en el cultivo de iPSCs utilizando células alimentadoras, Matrigel o vitronectina para comprender mejor los mecanismos moleculares de adhesión celular, supervivencia y proliferación. Los cultivos mantenidos en Matrigel requieren integrinas $\beta 1$ para la adhesión, mientras que los cultivos mantenidos en vitronectina requieren $\alpha \beta 5$ para la adhesión. En contraste, el bloqueo de las integrinas $\beta 1$ no afectó la adhesión a la vitronectina, y la inhibición de $\alpha \beta 5$ no afectó la adherencia a Matrigel. Sin embargo, se demostró que las integrinas $\beta 1$ y $\alpha \beta 5$ median la proliferación de iPSCs en vitronectina, mientras que solo se requirió $\beta 1$ para la proliferación de iPSCs en Matrigel (Rowland et al., 2010). En este trabajo utilizamos Matrigel y vitronectina como sustratos para la obtención de colonias de células similares a iPSCs. Al comparar los resultados con la literatura se observó que hubo una mayor obtención de colonias de células similares a iPSCs con Matrigel al compararlo con vitronectina. Esta observación podría deberse al alto contenido de laminina y colágeno IV del Matrigel, que interactúan con las integrinas $\alpha 2 \beta 1$, $\alpha 3 \beta 1$, $\alpha 7 \beta 1$ y $\alpha 11 \beta 1$ para la adhesión de las iPSCs, mientras que solo las

integrinas $\alpha\beta 5$ son responsables de la adherencia a la vitronectina (Braam et al., 2008; Miyazaki et al., 2008).

El otro proceso esencial para la obtención de las iPSCs es la transfección de los vectores no virales para la expresión de los factores de reprogramación. Nosotros observamos más colonias de células similares a iPSCs usando el reactivo de transfección Lipofectamine Stem Cell que el reactivo FuGENE combinado con Matrigel o vitronectina. La superioridad en la eficiencia y capacidad de transfección del reactivo Lipofectamine 2000 en comparación con el reactivo FuGENE se reportó en la transfección de células troncales embrionarias de ratón usando vectores no virales (Tamm et al., 2016), pero en este estudio se comparó el reactivo Lipofectamine Stem Cell con el reactivo FuGENE.

Existen controversias éticas y riesgos reportados en los métodos virales utilizados actualmente para inducir la pluripotencia en las células somáticas para sus aplicaciones clínicas, además del riesgo de obtener células somáticas de pacientes vulnerables, como pacientes con enfermedades hemorrágicas anormales o enfermedades renales (Y. Zhou & Zeng, 2013; Ji et al., 2017; Molinari & Sayer, 2019). En este proyecto, probamos un método no viral para generar células similares a iPSCs libres de integración en diferentes condiciones de cultivo sin células alimentadoras y reactivos de transfección utilizando células epiteliales renales aisladas de orina, que se obtienen sin intervención invasiva.

En comparación con los métodos no virales utilizados actualmente que utilizan métodos de transfección sofisticados para obtener iPSCs a partir de células derivadas de orina y otras células somáticas obtenidas a través de procedimientos

invasivos en diferentes enfermedades (M Lee et al., 2017; Li et al., 2016), las condiciones probadas en este trabajo representan una mejora en la tecnología de iPSCs para la investigación experimental debido a la accesibilidad para obtener células similares a iPSCs de células derivadas de la orina utilizando diferentes reactivos de transfección y matrices extracelulares.

En esta tesis reportamos diferentes condiciones para obtener células similares a iPSCs, estos resultados pueden ser muy útiles al decidir qué método usar en la investigación experimental.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES

1. Se estableció un cultivo primario de células epiteliales renales de muestras de orina de pacientes con hemofilia y sujetos sanos.
2. Se obtuvieron células similares a iPSCs a partir de un cultivo primario de células epiteliales renales mediante un sistema libre del uso de virus o células alimentadoras.
3. El reactivo de transfección Lipofectamina Stem Cell mostró mayor efectividad para obtener células similares a iPSCs.
4. Las tres matrices fueron comparables en su eficiencia para obtener células similares a iPSCs.

CAPÍTULO 8. LITERATURA CITADA

- Afzal, M. Z., & Strande, J. L. (2015). Generation of induced pluripotent stem cells from muscular dystrophy patients: Efficient integration-free reprogramming of urine derived cells. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 95, 52032. <https://doi.org/10.3791/52032>
- Amit, M., Shariki, C., Margulets, V., & Itskovitz-Eldor, J. (2004). Feeder layer- and serum-free culture of human embryonic stem cells. *Biology of Reproduction*, 70(3), 837-845. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.021147>
- Anson, D. S. (2004). The use of retroviral vectors for gene therapy-what are the risks? A review of retroviral pathogenesis and its relevance to retroviral vector-mediated gene delivery. *Genetic Vaccines and Therapy*, 2, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-0556-2-9>
- Baer, P. C., Nockher, W. A., Haase, W., & Scherberich, J. E. (1997). Isolation of proximal and distal tubule cells from human kidney by immunomagnetic separation. Technical note. *Kidney International*, 52(5), 1321-1331. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.457>
- Bartel, R. L. (2015). Chapter 8 - Stem Cells and Cell Therapy: Autologous Cell Manufacturing. En A. Atala & J. G. Allickson (Eds.), *Translational Regenerative Medicine* (pp. 107-112). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410396-2.00008-6>
- Belik, R., Follmann, W., Degen, G. H., Roos, P. H., Blaszkewicz, M., Knopf, H. J., & Golka, K. (2008). Improvements in culturing exfoliated urothelial cells in vitro

- from human urine. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 71(13-14), 923-929. <https://doi.org/10.1080/15287390801988871>
- Braam, S. R., Zeinstra, L., Litjens, S., Ward-van Oostwaard, D., van den Brink, S., van Laake, L., Lebrin, F., Kats, P., Hochstenbach, R., Passier, R., Sonnenberg, A., & Mummery, C. L. (2008). Recombinant vitronectin is a functionally defined substrate that supports human embryonic stem cell self-renewal via $\alpha 5 \beta 1$ integrin. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 26(9), 2257-2265. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-0291>
- Campbell, A., Brieva, T., Raviv, L., Rowley, J., Niss, K., Brandwein, H., Oh, S., & Karnieli, O. (2015). Concise Review: Process Development Considerations for Cell Therapy. *STEM CELLS Translational Medicine*, 4(10), 1155-1163. <https://doi.org/10.5966/sctm.2014-0294>
- 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>
- Crandall, L., & Lalande, M. (2013). Is urine the next source of stem cells? *Regenerative Medicine*, 8(3), 235-236. <https://doi.org/10.2217/rme.13.24>
- Dimos, J. T., Rodolfa, K. T., Niakan, K. K., Weisenthal, L. M., Mitsumoto, H., Chung, W., Croft, G. F., Saphier, G., Leibel, R., Golland, R., Wichterle, H., Henderson, C. E., & Eggan, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated from

- patients with ALS can be differentiated into motor neurons. *Science (New York, N.Y.)*, 321(5893), 1218-1221. <https://doi.org/10.1126/science.1158799>
- Ding, Z., Sui, L., Ren, R., Liu, Y., Xu, X., Fu, L., Bai, R., Yuan, T., Hao, Y., Zhang, W., Pan, H., Liu, W., Yu, H., Esteban, C. R., Yu, X., Yang, Z., Li, J., Wang, X., Belmonte, J. C. I., ... Qu, J. (2015). A widely adaptable approach to generate integration-free iPSCs from non-invasively acquired human somatic cells. *Protein & Cell*, 6(5), 386-389. <https://doi.org/10.1007/s13238-014-0117-1>
- Dörrenhaus, A., Müller, J. I., Golka, K., Jedrusik, P., Schulze, H., & Föllmann, W. (2000a). Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system. *Archives of Toxicology*, 74(10), 618-626.
- Dörrenhaus, A., Müller, J. I., Golka, K., Jedrusik, P., Schulze, H., & Föllmann, W. (2000b). Cultures of exfoliated epithelial cells from different locations of the human urinary tract and the renal tubular system. *Archives of Toxicology*, 74(10), 618-626.
- Ebert, A. D., Yu, J., Rose, F. F., Mattis, V. B., Lorson, C. L., Thomson, J. A., & Svendsen, C. N. (2009). Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient. *Nature*, 457(7227), 277-280. <https://doi.org/10.1038/nature07677>
- Fusaki, N., Ban, H., Nishiyama, A., Saeki, K., & Hasegawa, M. (2009). Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome.

- Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85(8), 348-362. <https://doi.org/10.2183/pjab.85.348>
- Glicksman, M. A. (2018). Induced Pluripotent Stem Cells: The Most Versatile Source for Stem Cell Therapy. *Clinical Therapeutics*, 40(7), 1060-1065. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2018.06.004>
- Han, N. R., Lee, H., Baek, S., Yun, J. I., Park, K. H., & Lee, S. T. (2015). Delivery of episomal vectors into primary cells by means of commercial transfection reagents. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 461(2), 348-353. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.037>
- Hauwaert, C. V. der, Savary, G., Gnemmi, V., Glowacki, F., Pottier, N., Bouillez, A., Maboudou, P., Zini, L., Leroy, X., Cauffiez, C., Perrais, M., & Aubert, S. (2013). Isolation and Characterization of a Primary Proximal Tubular Epithelial Cell Model from Human Kidney by CD10/CD13 Double Labeling. *PLOS ONE*, 8(6), e66750. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066750>
- Helbert, M. J., Dauwe, S. E., Van der Biest, I., Nouwen, E. J., & De Broe, M. E. (1997). Immunodissection of the human proximal nephron: Flow sorting of S1S2S3, S1S2 and S3 proximal tubular cells. *Kidney International*, 52(2), 414-428. <https://doi.org/10.1038/ki.1997.348>
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2006). Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature*, 441(7097), 1061-1067. <https://doi.org/10.1038/nature04955>
- Huangfu, D., Osafune, K., Maehr, R., Guo, W., Eijkelenboom, A., Chen, S., Muhlestein, W., & Melton, D. A. (2008). Induction of pluripotent stem cells from primary human fibroblasts with only Oct4 and Sox2. *Nature Biotechnology*, 26(11), 1269-1275. <https://doi.org/10.1038/nbt.1502>

- Ji, X., Wang, M., Chen, F., & Zhou, J. (2017). Urine-Derived Stem Cells: The Present and the Future. *Stem Cells International*, 2017, 4378947. <https://doi.org/10.1155/2017/4378947>
- Kim, T. K., & Eberwine, J. H. (2010). Mammalian cell transfection: The present and the future. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(8), 3173-3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., & Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*, 21(24), 6188-6193. <https://doi.org/10.1021/bi00267a025>
- Lagutina, I., Fulka, H., Lazzari, G., & Galli, C. (2013). Interspecies Somatic Cell Nuclear Transfer: Advancements and Problems. *Cellular Reprogramming*, 15(5), 374-384. <https://doi.org/10.1089/cell.2013.0036>
- Laurila, P., & Leivo, I. (1993). Basement membrane and interstitial matrix components form separate matrices in heterokaryons of PYS-2 cells and fibroblasts. *Journal of Cell Science*, 104 (Pt 1), 59-68.
- Li, D., Wang, L., Hou, J., Shen, Q., Chen, Q., Wang, X., Du, J., Cai, X., Shan, Y., Zhang, T., Zhou, T., Shi, X., Li, Y., Zhang, H., & Pan, G. (2016). Optimized Approaches for Generation of Integration-free iPSCs from Human Urine-Derived Cells with Small Molecules and Autologous Feeder. *Stem Cell Reports*, 6(5), 717-728. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2016.04.001>
- Liao, J., Wu, Z., Wang, Y., Cheng, L., Cui, C., Gao, Y., Chen, T., Rao, L., Chen, S., Jia, N., Dai, H., Xin, S., Kang, J., Pei, G., & Xiao, L. (2008). Enhanced efficiency of generating induced pluripotent stem (iPS) cells from human

- somatic cells by a combination of six transcription factors. *Cell Research*, 18(5), 600-603. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.51>
- M Lee, Y., Zampieri, B. L., Scott-McKean, J. J., Johnson, M. W., & Costa, A. C. S. (2017). Generation of Integration-Free Induced Pluripotent Stem Cells from Urine-Derived Cells Isolated from Individuals with Down Syndrome. *Stem Cells Translational Medicine*, 6(6), 1465-1476. <https://doi.org/10.1002/sctm.16-0128>
- Manaph, N. P. A., Al-Hawaas, M., Bobrovskaya, L., Coates, P. T., & Zhou, X.-F. (2018). Urine-derived cells for human cell therapy. *Stem Cell Research & Therapy*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0932-z>
- Mandal, P. K., & Rossi, D. J. (2013). Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA. *Nature Protocols*, 8(3), 568-582. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.019>
- Meng, X., Neises, A., Su, R.-J., Payne, K. J., Ritter, L., Gridley, D. S., Wang, J., Sheng, M., Lau, K.-H. W., Baylink, D. J., & Zhang, X.-B. (2012). Efficient reprogramming of human cord blood CD34+ cells into induced pluripotent stem cells with OCT4 and SOX2 alone. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(2), 408-416. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.258>
- Miyazaki, T., Futaki, S., Hasegawa, K., Kawasaki, M., Sanzen, N., Hayashi, M., Kawase, E., Sekiguchi, K., Nakatsuji, N., & Suemori, H. (2008). Recombinant human laminin isoforms can support the undifferentiated growth of human embryonic stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 375(1), 27-32. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.07.111>

- Molinari, E., & Sayer, J. A. (2019). Using human urine-derived renal epithelial cells to model kidney disease in inherited ciliopathies. *Translational Science of Rare Diseases*, 4(1-2), 87-95. <https://doi.org/10.3233/TRD-190034>
- Nagasaka, R., Matsumoto, M., Okada, M., Sasaki, H., Kanie, K., Kii, H., Uozumi, T., Kiyota, Y., Honda, H., & Kato, R. (2017). Visualization of morphological categories of colonies for monitoring of effect on induced pluripotent stem cell culture status. *Regenerative Therapy*, 6, 41-51. <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.12.003>
- Okita, K., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2007). Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448(7151), 313-317. <https://doi.org/10.1038/nature05934>
- Okita, K., Matsumura, Y., Sato, Y., Okada, A., Morizane, A., Okamoto, S., Hong, H., Nakagawa, M., Tanabe, K., Tezuka, K., Shibata, T., Kunisada, T., Takahashi, M., Takahashi, J., Saji, H., & Yamanaka, S. (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nature Methods*, 8(5), 409-412. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1591>
- Okita, K., Nakagawa, M., Hyenjong, H., Ichisaka, T., & Yamanaka, S. (2008). Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, 322(5903), 949-953. <https://doi.org/10.1126/science.1164270>
- Okita, K., Yamakawa, T., Matsumura, Y., Sato, Y., Amano, N., Watanabe, A., Goshima, N., & Yamanaka, S. (2013). An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 31(3), 458-466. <https://doi.org/10.1002/stem.1293>

- Park, C.-Y., Kim, D. H., Son, J. S., Sung, J. J., Lee, J., Bae, S., Kim, J.-H., Kim, D.-W., & Kim, J.-S. (2015). Functional Correction of Large Factor VIII Gene Chromosomal Inversions in Hemophilia A Patient-Derived iPSCs Using CRISPR-Cas9. *Cell Stem Cell*, 17(2), 213-220. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.001>
- Peng, Y., Bocker, M. T., Holm, J., Toh, W. S., Hughes, C. S., Kidwai, F., Lajoie, G. A., Cao, T., Lyko, F., & Raghunath, M. (2012). Human fibroblast matrices bio-assembled under macromolecular crowding support stable propagation of human embryonic stem cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 6(10), e74-e86. <https://doi.org/10.1002/term.1560>
- Prowse, A. B. J., Doran, M. R., Cooper-White, J. J., Chong, F., Munro, T. P., Fitzpatrick, J., Chung, T.-L., Haylock, D. N., Gray, P. P., & Wolvetang, E. J. (2010). Long term culture of human embryonic stem cells on recombinant vitronectin in ascorbate free media. *Biomaterials*, 31(32), 8281-8288. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.037>
- Rahimi, P., Mobarakeh, V. I., Kamalzare, S., SajadianFard, F., Vahabpour, R., & Zabihollahi, R. (2018). Comparison of transfection efficiency of polymer-based and lipid-based transfection reagents. *Bratislavske Lekarske Listy*, 119(11), 701-705. https://doi.org/10.4149/BLL_2018_125
- Rowland, T. J., Miller, L. M., Blaschke, A. J., Doss, E. L., Bonham, A. J., Hikita, S. T., Johnson, L. V., & Clegg, D. O. (2010). Roles of integrins in human induced pluripotent stem cell growth on Matrigel and vitronectin. *Stem Cells and Development*, 19(8), 1231-1240. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0328>

- Savitz, S. I., & Parsha, K. (2016). 60—Enhancing Stroke Recovery with Cellular Therapies. En J. C. Grotta, G. W. Albers, J. P. Broderick, S. E. Kasner, E. H. Lo, A. D. Mendelow, R. L. Sacco, & L. K. S. Wong (Eds.), *Stroke (Sixth Edition)* (pp. 981-991). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29544-4.00060-8>
- Schlaeger, T. M., Daheron, L., Brickler, T. R., Entwisle, S., Chan, K., Cianci, A., DeVine, A., Ettenger, A., Fitzgerald, K., Godfrey, M., Gupta, D., McPherson, J., Malwadkar, P., Gupta, M., Bell, B., Doi, A., Jung, N., Li, X., Lynes, M. S., ... Daley, G. Q. (2015). A comparison of non-integrating reprogramming methods. *Nature Biotechnology*, 33(1), 58-63. <https://doi.org/10.1038/nbt.3070>
- Sommer, C. A., Sommer, A. G., Longmire, T. A., Christodoulou, C., Thomas, D. D., Gostissa, M., Alt, F. W., Murphy, G. J., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2010). Excision of reprogramming transgenes improves the differentiation potential of iPS cells generated with a single excisable vector. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 28(1), 64-74. <https://doi.org/10.1002/stem.255>
- Stadtfield, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5903), 945-949. <https://doi.org/10.1126/science.1162494>
- Stojkovic, P., Lako, M., Przyborski, S., Stewart, R., Armstrong, L., Evans, J., Zhang, X., & Stojkovic, M. (2005). Human-Serum Matrix Supports Undifferentiated Growth of Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*, 23(7), 895-902. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0326>

- Sun, N., Panetta, N. J., Gupta, D. M., Wilson, K. D., Lee, A., Jia, F., Hu, S., Cherry, A. M., Robbins, R. C., Longaker, M. T., & Wu, J. C. (2009). Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *106*(37), 15720-15725. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908450106>
- 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>
- Tamm, C., Kadekar, S., Pijuan-Galitó, S., & Annerén, C. (2016). Fast and Efficient Transfection of Mouse Embryonic Stem Cells Using Non-Viral Reagents. *Stem Cell Reviews*, *12*(5), 584-591. <https://doi.org/10.1007/s12015-016-9673-5>
- Theocharis, A. D., Skandalis, S. S., Gialeli, C., & Karamanos, N. K. (2016). Extracellular matrix structure. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *97*, 4-27. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2015.11.001>
- Trevisan, M., Desole, G., Costanzi, G., Lavezzo, E., Palù, G., & Barzon, L. (2017). Reprogramming Methods Do Not Affect Gene Expression Profile of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(1), 206. <https://doi.org/10.3390/ijms18010206>

- Wang, Y., Bi, Y., & Gao, S. (2017). Epigenetic regulation of somatic cell reprogramming. *Current Opinion in Genetics & Development*, 46, 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2017.07.002>
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385(6619), 810-813. <https://doi.org/10.1038/385810a0>
- Wilmut, Ian, Bai, Y., & Taylor, J. (2015). Somatic cell nuclear transfer: Origins, the present position and future opportunities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 370(1680), 20140366. <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0366>
- Xu, C., Inokuma, M. S., Denham, J., Golds, K., Kundu, P., Gold, J. D., & Carpenter, M. K. (2001). Feeder-free growth of undifferentiated human embryonic stem cells. *Nature Biotechnology*, 19(10), 971-974. <https://doi.org/10.1038/nbt1001-971>
- Xue, Y., Cai, X., Wang, L., Liao, B., Zhang, H., Shan, Y., Chen, Q., Zhou, T., Li, X., Hou, J., Chen, S., Luo, R., Qin, D., Pei, D., & Pan, G. (2013). Generating a Non-Integrating Human Induced Pluripotent Stem Cell Bank from Urine-Derived Cells. *PLOS ONE*, 8(8), e70573. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070573>
- Yamanaka, S., & Blau, H. M. (2010). Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*, 465(7299), 704-712. <https://doi.org/10.1038/nature09229>
- Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. I., & Thomson,

- J. A. (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1917-1920.
<https://doi.org/10.1126/science.1151526>
- Zhang, X.-B. (2013). Cellular Reprogramming of Human Peripheral Blood Cells. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(5), 264-274.
<https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.001>
- Zhou, T., Benda, C., Dunzinger, S., Huang, Y., Ho, J. C., Yang, J., Wang, Y., Zhang, Y., Zhuang, Q., Li, Y., Bao, X., Tse, H.-F., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., Pei, D., & Esteban, M. A. (2012). Generation of human induced pluripotent stem cells from urine samples. *Nature Protocols*, 7(12), 2080-2089.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.115>
- Zhou, T., Benda, C., Duzinger, S., Huang, Y., Li, X., Li, Y., Guo, X., Cao, G., Chen, S., Hao, L., Chan, Y.-C., Ng, K.-M., Ho, J. C., Wieser, M., Wu, J., Redl, H., Tse, H.-F., Grillari, J., Grillari-Voglauer, R., ... Esteban, M. A. (2011). Generation of induced pluripotent stem cells from urine. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 22(7), 1221-1228.
<https://doi.org/10.1681/ASN.2011010106>
- Zhou, Y., & Zeng, F. (2013). Integration-free Methods for Generating Induced Pluripotent Stem Cells. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(5), 284-287. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.09.008>

ANEXO: ARTÍCULOS PUBLICADOS EN REVISTAS INDEXADAS

1. Pérez-Trujillo JJ, **Robles-Rodríguez OA**, Garza-Morales R, García-García A, Rodríguez-Rocha H, Villanueva-Olivo A, Segoviano-Ramírez JC, Esparza-González SC, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Loera-Arias MJ. Antitumor Response by Endoplasmic Reticulum-Targeting DNA Vaccine Is Improved by Adding a KDEL Retention Signal. *Nucleic Acid Ther.* 2018 Aug;28(4):252-261. doi: 10.1089/nat.2017.
2. **Robles-Rodríguez OA**, Pérez-Trujillo JJ, Barrón-Cantú JA, Torres-Cerda A, Gutiérrez-Puente Y, García-García A, Rodríguez-Rocha H, Villanueva-Olivo A, Zavala-Flores LM, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R, Loera-Arias MJ. Antitumor effect of adenovirus expressing modified versions of E7 from HPV16 fused to calreticulin. *JBUON.* 2020 Jan; 25(1):543-548.
3. **Robles-Rodríguez OA**, Pérez-Trujillo JJ, Villanueva-Olivo A, Villarreal-Martínez L, Marfil-Rivera LJ, Rodríguez-Rocha H, García-García A, Saucedo-Cárdenas O, Loera-Arias MJ, Montes-de-Oca-Luna R. Advances in gene therapy for hemophilia. *JBSC.* May 2020. Aceptado.
4. **Robles-Rodríguez OA**, Loera-Arias MJ, Pérez-Trujillo JJ, Villanueva-Olivo A, Picón-Galindo Ernesto, Villarreal-Martínez L, Soto-Domínguez A, Rodríguez-Rocha H, García-García A, Saucedo-Cárdenas O, Montes-de-Oca-Luna R. Improvement of transfection with reprogramming factors in urine-derived cells. *BIOCELL.* May 2020. Aceptado.