



Memoria del XLIX Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Reprogramación celular de fibroblastos humanos a células pluripotenciales a través de la transfección de plásmidos episomales.

Reprogramming human fibroblast into induced pluripotent stem cells with episomal plasmids.

Cabrera-Wrooman, Alejandro^{1*}; Magadan, Samuel¹; Romero-Chaveste, Adrián¹.

1. Laboratorio de Tejido Conjuntivo, Centro Nacional de Investigación y Atención de Quemados, Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra".

*Correspondencia: Calzada México-Xochimilco 289, Colonia Arenal de Guadalupe, Tlalpan, México City 14389, México. Tel + 52(55)59991000 ext 14701 y 14706, aca_w@yahoo.com.mx, acabrera@inr.gob.mx *

Resumen

Desde el descubrimiento de la tecnología de las células pluripotenciales inducidas hace más de 15 años, se abrió un amplio panorama en medicina regenerativa y en el estudio de las células troncales. El proceso de reprogramación resultó ser relativamente sencillo desde una perspectiva técnica, en donde se necesitan una mezcla de 4 factores de transcripción OCT3/4, SOX2, KLF4 y MYC conocidos como OSKM. Esta reprogramación ofrece una oportunidad para generar líneas celulares específicas de pacientes que nos ayuden a prevenir y curar enfermedades. Existen diferentes métodos para generar células troncales pluripotenciales inducidas, se dividen en dos grupos, métodos integrativos y no integrativos. Algunos de estos son más adecuados para el estudio de terapia celular, y otros para hacer más eficiente la reprogramación. En esta ocasión nos basamos en un método no integrativo, el cual consiste en transfectar plásmidos episomales en fibroblastos humanos, para generar células pluripotenciales inducidas.

Palabras claves: reprogramación, células troncales humanas, iPSC, plásmidos episomales

Abstract

Since the discovery of induced pluripotent stem cells technology 15 years ago, offers a great opportunity for the regenerative medicine on the stem cells field. The reprogramming technology seems to be relatively simple from a technical perspective. Because, needs the host cells and the cocktail plasmids with the 4 transcriptions factors OCT3/4, SOX2, KLF4 y MYC, as we know of Yamanaka factors. This technology gave us an opening for generate patients specific line cells for the personalized medicine. There are two main groups for reprogramming, non-integrative and integrative for obtain induced pluripotent stem cells, in how do more effective or in how could use for cell therapy. In this chapter we described a non-integrative method, episomal plasmids for reprogramming human fibroblasts.

Keywords: reprogramming, human stem cells, iPSC episomal plasmids

Introducción

Las células troncales han sido y seguirán siendo utilizadas en el campo de la medicina regenerativa y en la medicina personalizada, ayudando a encontrar tratamientos específicos para diferentes enfermedades. Las células troncales embrionarias (ESCs) presentan gran potencial, ya que son células pluripotenciales, lo que nos indica que a partir de ellas se pueden obtener las tres capas germinales: ectodermo, mesodermo y endodermo pudiendo ser utilizadas para regenerar tejidos dañados y diferenciar hacia tejidos específicos. Las ESC se aíslan de la masa interna del blastocisto, por lo que genera una gran controversia en la sociedad sobre problemas éticos, morales y religiosos. En el 2006 el grupo del Dr. Yamanaka en Japón logró reprogramar con éxito células somáticas (fibroblastos) hacia células troncales pluripotentes o también conocidas como células pluripotenciales inducidas por sus siglas en inglés (iPSC), lo que le otorgó el premio Nobel en el 2012 (1). Las células somáticas pueden ser reprogramadas cuando son expuestas a un gran número de factores de transcripción que se encuentran expresados en el citoplasma del cigoto (2). Es importante destacar que el grupo de Yamanaka descubrió que la expresión ectópica de solo 4 factores de transcripción, conocidos como los factores de Yamanaka: Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM) son necesarios para reprogramar fibroblastos en células troncales pluripotentes, esto fue demostrado primero en fibroblastos de ratón (1) y después en fibroblastos humanos (3-5).

La reprogramación es un evento epigenético que no altera directamente la secuencia del DNA. La regulación epigenética incluye la eliminación de marcas epigenéticas, las cuales se combinan con la inducción de modificaciones epigenéticas similares a las de las células embrionarias, como son: metilación del DNA, desmetilación de histonas y remodelaje de histonas (6). El objetivo de generar iPSC es que presenten una alta eficiencia y que cumplan con los requisitos para utilizarse en terapia celular. La metodología para derivar líneas celulares de iPSC que puedan ser utilizadas en la clínica se ha estado desarrollando en los últimos 15 años.

Los métodos de reprogramación se dividen en dos grupos: integrativos y no integrativos, esta clasificación se basa en si los vectores se integran al genoma de la célula hospedera o no, siendo los más eficaces los integrativos (7). En el método integrativo se utilizan retrovirus (8) y lentivirus, ambos tipos de virus se integran en el genoma de la célula hospedera, lo que deriva en la expresión de los factores OSKM.

El retrovirus fue con el que se inició la reprogramación. Los lentivirus son de la familia Retroviridae, esta clase de virus presenta algunas desventajas ya que genera mutagénesis, y activación de transgenes. Al presentar un silenciamiento más lento de los factores de reprogramación que los retrovirus, esto ocasiona una mayor eficiencia en la reprogramación (9). Dentro de los no integrativos se encuentran los virus de Sendai, los cuales son ARN de cadena sencilla, el cual se replica en las células blanco y codifica los factores de transcripción OSKM (10). En la reprogramación Epi (11), las secuencias de los factores están insertados en el virus Epstein-Barr, lo que facilita la replicación episomal del DNA en las células en replicación. Estos plásmidos episomales expresan los factores OCT4, SOX2, KLF4, LMYC, y LIN28A combinado con un knock-down de P53 (shP53) (11). La reprogramación con mRNA, las células son transfectadas con mRNA que transcriben para los factores OSKM, y LIN28A Y GFP, esta técnica presenta algunas desventajas ya que necesitan ser transfectadas las células con los mRNA cada 24 horas, debido a su vida media corta, Además, de que es limitada la activación del sistema inmune innato (12) (8) (9).

En el siguiente protocolo detallaremos la técnica para reprogramar fibroblastos de piel de la línea celular BJ la cual fue aislada de prepucio humano, hacia células pluripotenciales inducidas iPSC utilizando plásmidos episomales para la reprogramación.

Materiales y reactivos

Buffer PBS 1X

- NaCl 137 mM
- KCl 2.7mM
- Na₂HPO₄ 10mM
- NaH₂PO₄ 2mM

Tripsina 0.3% 1L

- EDTA 0.201g
- KCl 0.4g
- NaCl 8g
- Tris Base 3.04g
- Ajustar a pH 7.5
- Agregar 3 g de Tripsina

Cultivo y pase de fibroblastos BJ

- Células Human Dermal Fibroblast BJ (ATCC CRL-2522)
- Matrices de cultivo celular T75 para células adherentes (Nest 708003)

- Medio DMEM (Gibco™ 11995073) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco™ 16000044) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco™ 15240062)
- Tripsina (SIGMA T4799) 0.3%
- Tubos de centrifuga (Corning 430790) de 15ml

Plásmidos Episomales

- pCXLE-EGFP (Addgene plasmid #27082)
- pCXLE-hUL (Addgene plasmid #27080)
- pCXLE-hSK (Addgene plasmid #27078)
- pCXLE-hOCT3/4 (Addgene plasmid #27076)

Transfección con el Kit Amaxa™ Basic Nucleofector™ Nucleofector™ (Cat. No. VPI-1002)

- Dispositivo Nucleofector™
- Solución Nucleofector™ (suplementada a temperatura ambiente)
- Cubetas certificadas (suministradas con el kit)
- Vector pmaxGFP™ (suministrado con el kit)
- Células BJ (3 x 10⁵ células por muestra)
- Placa de Petri de poliestireno
- Tripsina – EDTA 0.3%
- Medio de cultivo DMEM 10% SFB y 1% de penicilina/estreptomicina

NOTA: Precalear el volumen adecuado de medio de cultivo a 37 °C (1.5 ml por muestra)

Pasaje de MEF

- Matraces tratados con gelatina 0.5% T75 (Nest 709001)
- Contador de células o cámara de Neubauer
- PBS 1X
- 0.3% de tripsina-EDTA
- Medio de cultivo DMEM 10% SFB y 1% de penicilina/estreptomicina

Materiales para la inactivación y plaqueo de MEF

- Recipientes tratados con gelatina al 0.5% (placas de 6 pocillos y/o matraces T75)
- Solución estéril de gelatina al 0.5% en agua
- Fuente de irradiación capaz de emitir 4000 rad (40 Gy)
- Medio de cultivo DMEM 10% SFB + 1% de penicilina/estreptomicina + Glutamina 1%

Selección y picado de colonias

- Placas de 6 pocillos (Nuclon™ 115812) tratados con gelatina al 0.5%
- Solución estéril de gelatina al 0.5% en agua destilada
- Colágenasa tipo IV 1 mg/ml

Reactivos para medio de cultivo para iPSC

- 80% Knockout™ DMEM (Gibco 10829-018)
- 20% Knockout™ reemplazo del suero (SR) (Gibco 10828-028)
- 1% solución de aminoácidos no esenciales (100 x MEM solución de aminoácidos no esenciales) (Gibco 11140-035)
- 1% L-glutamina 1 mM (Gibco 21051-016, 200mM)
- 0.5% Penicilina/Estreptomicina (Gibco 15140-122)
- 0.1 mM 2-mercaptoetanol. 0.2% (Gibco 31350-010, 50 mM)
- 8 ng/ml bFGF humano (Invitrogen13256-029).

Medio de cultivo iPSC	250ml
KNOCKOUT DMEM (Gibco 1x)	200 ml
SUERO REPLACEMENT (Gibco)	50 ml
L-glutamina	2.5 ml
Aminoácidos no esenciales	2.5 ml
0,1 mM 2-mercaptoetanol (0.2%)	500 µl
Penicilina/streptomicina	1.25 ml
bFGF humano 10 µg/ml en PBS + 0.1% albúmina	106.25

NOTA: La duración de este medio (con mercaptoetanol incluido) es de 1 semana a 4°C.

Protocolo. Reprogramación celular de fibroblastos humanos

Como se mencionó anteriormente existen distintos métodos que pueden ser utilizados para inducir la expresión de los factores de reprogramación, clasificados en dos categorías: métodos integradores y no integradores (13). Los métodos no integradores pueden ser tanto virales como los virus Sendai (14) y no virales, como los basados en episomas; este proceso de reprogramación tiene un mejor perfil de seguridad en comparación con los métodos integradores que utilizan virus.

Hemos dividido la metodología en tres etapas:

1. *Pre-transfección*

1.1 Cultivo de fibroblastos BJ

La línea celular de fibroblastos BJ, se cultivan en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) y 1% de estreptomina. Las células se incuban en un matraz 3X T175 con 10 ml de medio DMEM hasta alcanzar una confluencia óptima para la transfección, a una temperatura de 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂. El recambio del medio se realiza cada 2 días, el pasaje celular debe realizarse cuando el cultivo celular alcance un 70-90% de confluencia.

NOTA: La confluencia óptima antes de realizar la transfección es del 80-90%.

1.2 Tripsinización/pasaje celular

El método enzimático para realizar el pasaje de las células que se describe en este protocolo es utilizando tripsina. Se inicia con la remoción del medio del cultivo celular, se lavan dos veces con PBS 1X estéril para retirar el exceso de medio. Se agrega un volumen de 5 ml de tripsina (atemperada) y se deja incubar por 8 minutos, se procede a neutralizar la reacción agregando un volumen de 5 ml de medio DMEM (se debe pipetear la base del matraz para realizar el arrastre de las células que pudieran haber quedado pegadas) y se procede a transferir las células en un tubo de centrifuga de 15 ml. Las células se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, terminando este tiempo se retira el medio dejando solo el pellet en el tubo. El pellet es resuspendido en 1 ml de medio DMEM y se cuantifican las células. La cuantificación de las células se lleva a cabo en una cámara de Neubauer, a una dilución 1:20 de las células, resembrando 5X10⁵ células el matraz T75 para que el mantenimiento del cultivo celular.

NOTA: La neutralización de la reacción de tripsina debe de realizarse una vez que la mayoría de las células se ha despegado (>90%), a los 8 minutos revisar en el microscopio si las células se han despegado, si se requiere incubar máximo durante 2 minutos más, ya que si se deja más tiempo las células se maltratan.

1.3 Derivación e irradiación de fibroblastos embrionarios de ratón

Las iPSC deben de ser cultivadas en una matriz extracelular o en co-cultivos con capas alimentadoras, principalmente sobre fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) arrestados en el ciclo celular Go ya sea irradiados (4000rads) o tratados con mitomicina C a una concentración de 10µg/ml. Los MEF tratados con ciclos celulares detenidos mantienen a las células troncales embrionarias (ES) o iPSC en un estado indiferenciado, sin perder su pluripotencia (15).

En este protocolo, detallamos los pasos necesarios para derivar, propagar y preparar MEF para su uso en cultivos celulares de iPSC. Un día antes de la extracción de fibroblastos, agregar gelatina al 0.5% en cajas de cultivo de 15 cm durante la noche en una incubadora a 37 °C. El día de la derivación planificada, preparar una variedad de instrumentos estériles (pinzas estériles afiladas y romas con dientes, tijeras de disección) y bandejas de acero inoxidable estériles. Preparar 4 tubos (de 15cm) y dos cajas de Petri con 5 ml de PBS estéril cada uno, manteniéndolos en hielo.

Se utilizan ratones con 13.5 días de gestación, se sacrifica a la hembra por dislocación cervical, se coloca sobre la rejilla de la caja y con ayuda de unas pinzas quirúrgicas apoyarlas sobre el cuello y jalar el tren posterior de la hembra hasta romper la médula cervical. El manejo de los animales se realiza bajo la norma NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Posteriormente se coloca el ratón boca arriba sobre un papel absorbente limpio o una toalla de papel sobre la mesa. Lavar con alcohol (70%) el vientre de la hembra y cortar con una incisión transversa en la región suprapélvica (en la parte baja del abdomen). Al cortar, levantar con una pinza de disección para evitar cortar estructuras inferiores. Cortar simultáneamente piel y músculo abdominal para exponer la cavidad abdominopélvica de un solo movimiento. Extraer ambos cuernos y cortar sus mesotelios (estructuras que lo sostienen a la pared posterior del abdomen). Tenga cuidado de no tocar el exterior del ratón.

Una vez extraídos los cuernos con los embriones, colocarlos sobre una de las cajas de Petri con PBS. Transfiera la placa que contiene el cuerno uterino a una campana de bioseguridad. A partir de este momento, el uso de técnicas asépticas es crítico. Con

unas pinzas de disección con dientes, sujetar el útero, y la placenta, y cortar con pinzas para exponer, retirar el embrión en su saco amniótico. Pasarlo a la siguiente caja de Petri para eliminar el exceso de sangre y restos de tejidos. Repetir el mismo procedimiento con los demás embriones. Finalmente, retirar los embriones de sus sacos amnióticos. Visualizar los embriones al microscopio estereoscópico (manteniendo la esterilidad). Remover la cabeza de cada uno de los embriones; desde la apertura que quedó en el cuello al retirar la cabeza, cortar con tijeras a lo largo de la línea media ventral, retirar todas las vísceras desde el cuello hasta la pelvis.

Transferir el embrión al tubo de 15 cm. Poner de 4 a 5 embriones por tubo (preferentemente 4). Cada tubo ha de corresponder a una caja de cultivo de 15 cm. Finalmente retirar el PBS teniendo en cuenta de no tomar accidentalmente alguno de los embriones y lavar 3 veces con PBS. Agregar 3 ml de medio (DMEM alto en glucosa, glutamina, 10% SFB y Pen/Estrept), incubar a una temperatura de 37°C en atmósfera humidificada con 5% CO₂.

Al día siguiente los fragmentos de los embriones se habrán pegado a la caja y de ellos saldrán los MEFs para adherirse a la caja (algunos fragmentos no se pegarán). A las 24-48 horas de post-siembra hacer el pase de los fragmentos (las cajas deben estar confluentes). Para hacer el pase, lavar la caja con PBS 1X y agregarlo muy lentamente para evitar que los fragmentos se despeguen (para evitar que se pierdan). Agregar 5 ml de tripsina al 0.3% por 5 min. Agregar 5 ml de medio completo para neutralizar la tripsina, pasar a un tubo y centrifugar por 5 min a 1000 rpm a temperatura ambiente, retirar el medio y resuspender el botón celular con medio completo DMEM. Criopreservar los MEF durante el pase 0 y resembrar el resto de los MEF en matraces T75, con 10-12 ml de medio completo DMEM en una incubadora humidificada a 37 °C/5% de CO₂.

Antes de colocar el matraz dentro de la incubadora moverlo suavemente y de manera cuidadosa de adelante hacia atrás y hacia los lados durante un par de veces con la finalidad de distribuir uniformemente las células. Las células pueden crecer sin necesidad de cambio del medio hasta que estén listas para un nuevo pase (en el día 3 o 4, deben de haber alcanzado una confluencia del 90-100%).

NOTA: Al realizar cada pase etiquetar las cajas con pase +1, previo al pase anterior. Idealmente los MEF se pueden congelar 2/3 (pase 0) y resembrar el resto (1/3). La densidad de siembra óptima en un matraz

T75 es de 5 millones aproximadamente. No utilizar más allá del pase 4 (posterior a este pase su calidad disminuye como células alimentadoras).

1.4 Irradiación de MEF

Se expanden los cultivos celulares de los MEFs hasta tener a confluencia 6 cajas T75, esto con el objetivo de irradiar el mayor número de células. El día del experimento, se levantan las células con tripsina al 0.3%, incubándolas a 37°C durante 8 min, se agrega medio DMEM para parar la reacción, posteriormente se centrifugan a 1000 rpm durante 5 min. Se retira el exceso de medio y el botón de las células se resuspenden en 1 ml de DMEM, se cuantifican las células como se indicó previamente en la sección 1.2. Las células se resuspenden en 20 ml de medio DMEM y se colocan en un tubo falcón de 50 ml, el tubo es introducido en un irradiador con fuente de cobalto 60, en donde se irradiarán las células a 40 Gy. Posteriormente se vuelven a introducir en la campana de cultivo y se hacen alícuotas para congelar con 1X10⁶ células. Los criotubos se mantienen en nitrógeno líquido para su almacenamiento.

NOTA: Los criotubos se van utilizando dependiendo la cantidad de células que se necesiten para reprogramar. Los MEFs irradiados no deben de pasar del pasaje 4.

2. Transfección de fibroblastos BJ

Para el proceso de transfección utilizando plásmidos episomales se utiliza el kit AmaxaTM Basic NucleofectorTM (Lonza), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante.

Antes de dar inicio al proceso de transfección preparar una placa de cultivo de 6 pozos, cada pozo se incuba (37°C/5% de CO₂) con 1 ml de gelatina al 0.5%, durante una hora. Eliminar la gelatina y adicionar 1.5 ml de medio de cultivo DMEM suplementado y se introduce en la incubadora para atemperar el medio. Mezclar la solución de nucleofección, la cual se prepara con 82 µl de la solución de Nucleofector y 18 µl de suplemento para llegar a un volumen final de 100 µl.

Las células se tripsinizan, se cuentan, como se describió previamente, 3X10⁵ células se resuspenden en 100 µl de la Solución NucleofectorTM, a temperatura ambiente. Posteriormente, se agrega 1µg de cada uno de los plásmidos episomales. Se transfiere la suspensión de células/DNA a un tubo (incluidos en el kit); la muestra debe cubrir el fondo

del tubo, evitando la formación de burbujas de aire, cerrar el tubo con la tapa. La cubeta se introduce en el Nucleofector™ y se selecciona el programa U-023.

Posteriormente, dentro de la campana se agregan 500 μ l del medio de cultivo DMEM suplementado y atemperado al tubo y transferir suavemente la muestra inmediatamente en la placa de poliestireno tratada previamente con gelatina. Utilizar las pipetas suministradas en el kit y evitar la aspiración repetida de la muestra.

NOTA: Las células BJ no deben de pasar del pasaje 6. El pasaje celular se debe de realizar entre el día 1 y 2. La confluencia óptima antes de la transfección es del 50%.

3. Post-transfección

Incubar las células a 37 °C/5% de CO₂ hasta el análisis. La expresión génica o la regulación a la baja, respectivamente, a menudo se detecta después de solo 4 a 8 horas, pero lo ideal es que las células no se alteren durante 24 horas.

NOTA: Las células que han sido transfectadas con éxito con el vector pmaxGFPTM y muy

probablemente los genes de pluripotencia, expresan la proteína verde fluorescente GFP por lo que pueden visualizarse con un microscopio de fluorescencia posterior a 4 horas post- transfección.

3.1 Cultivo de células transfectadas

Al segundo día post-transfección, realizar el cambio del medio DMEM cada dos días. El día 5 post transfección se prepara una caja de 10cm con gelatina al 0.5%, al día siguiente se retira la gelatina y se agregan 1.5X10⁶ de MEFs irradiados en DMEM. El día 7 post transfección se tripsinizan y se resiembran sobre los MEFs las células previamente transfectadas con medio DMEM. Al día siguiente se sustituye el medio DMEM por medio DMEM KnockOut suplementado. La renovación del medio se realiza cada dos días durante 2-3 semanas posterior a la transfección (periodo en el cual se pueden visualizar los cambios morfológicos que sufren las células y durante el cual alrededor de los días 15-20 comienzan a visualizarse la formación de colonias individuales con aspecto similar a colonias de células troncales embrionarias) (Figura 1). Las células deben mantenerse en incubación en una incubadora humidificada a 37 °C/5% de CO₂.

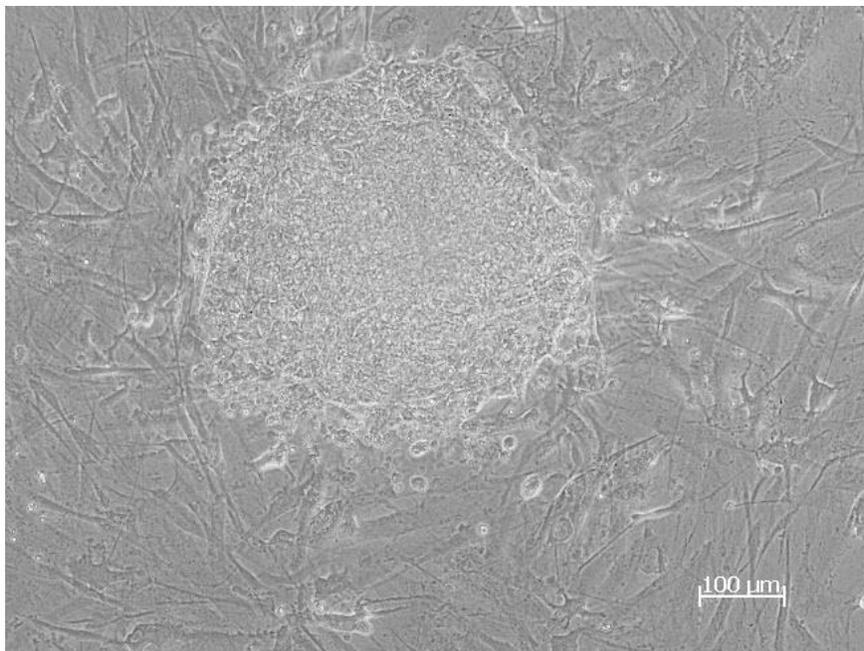


Figura 1. Inducción de colonia hiPSC reprogramada a partir de la línea celular de fibroblastos humanos (BJ), con plásmidos episomales los cuales contienen los factores de Yamanaka. Foto de una colonia de iPSC en campo claro a un aumento 20X.

3.2 Selección y picado de colonias

Luego de 2-3 semanas post-transfección las colonias individuales de iPSCs que presentan las características morfológicas similares a colonias de células troncales embrionarias (bien delimitadas y translucidas) y que han alcanzado un tamaño suficiente para ser picadas. Marcar las colonias que serán picadas. Eliminar casi en la totalidad el medio de la caja (para poder hacer más fácil el picado de las colonias), con la punta de una micropipeta bordear la circunferencia de la colonia y posteriormente raspar suavemente la colonia, revisar que la totalidad de la colonia ha sido despegada y transferirla a un pozo. Cada colonia se resiembrará por pozo en caja de 24 pozos sobre una capa de MEFs irradiados 3×10^5 , en medio DMEM KnockOut suplementado. Realizar este procedimiento con cada una de las colonias. Crecer las colonias en una incubadora humidificada a $37^\circ\text{C}/5\%$ de CO_2 .

NOTA: Las cajas en donde se siembran los MEFs irradiados deben de ser tratadas 24 hrs previas con gelatina al 0.5%.

Las cajas en donde se siembran las colonias deben de tener una capa de MEFs irradiados (capa alimentadora o feeders). Para facilitar el picado de las colonias se recomienda realizar el procedimiento ayudándose de un microscopio estereoscópico instalado en una campana de flujo horizontal (Figura 2).

3.3 Caracterización de células pluripotenciales inducidas

Una vez que las colonias han sido expandidas y mantenidas adecuadamente, es necesario una caracterización la cual puede ser morfológica y

molecular. Para que una colonia pueda ser considerada pluripotente debe de cumplir con los siguientes criterios:

- a. Las colonias deben de presentar actividad de fosfatasa alcalina.
- b. Deben de expresar marcadores de pluripotencia como son Nanog, Oct3/4, Sox2 y SSEA4, la expresión de proteína se observa a través la técnica de Fluorescencia y la expresión de mensajero a través de la técnica de RT-PCR en tiempo real.
- c. Las iPSC deben de poder generar teratomas en ratones inmunodeficientes y estos tumores poder diferenciarse a las tres capas germinales, esta última prueba es considerada como la prueba de oro para la pluripotencia.

Conclusiones

El descubrimiento de la tecnología de reprogramación celular ofrece generar células pluripotentes inducidas paciente-específicas para así poder desarrollar medicina personalizada. La generación de líneas de iPSC específicas abre oportunidades sin precedentes para el estudio sobre regeneración de órganos y tejidos específico, modelaje de enfermedades y descubrimiento de nuevos fármacos. En la actualidad existen diferentes ensayos clínicos en donde utilizan iPSC para tratar diversas enfermedades degenerativas y daño a órganos. Sin embargo, esta terapia celular está iniciando y existen varios obstáculos a vencer antes de que presente un real potencial para la terapia celular.

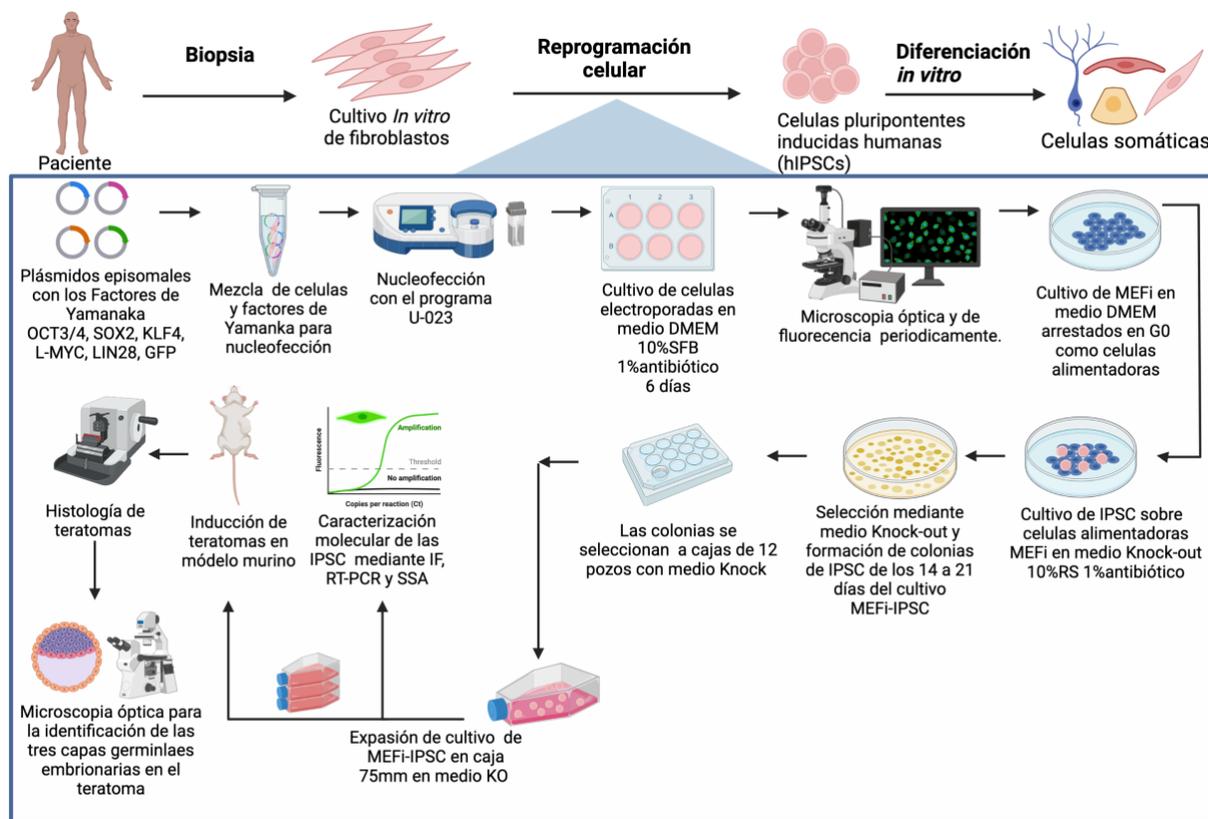


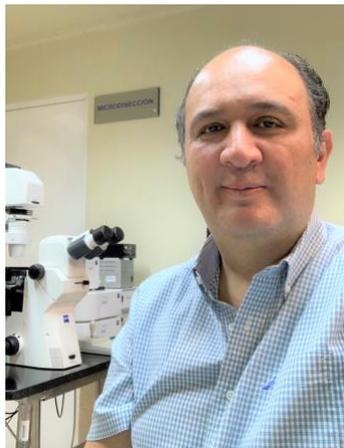
Figura 2. Esquema del diagrama de flujo de la reprogramación celular hacia células pluripotenciales inducidas. Imagen realizada con el programa Biorender.

Referencias

- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 126, 663–676
- GURDON, J. B., ELSDALE, T. R., and FISCHBERG, M. (1958) Sexually mature individuals of *Xenopus laevis* from the transplantation of single somatic nuclei. *Nature*. 182, 64–5
- 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., and Thomson, J. A. (2007) Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 318, 1917–20
- Wernig, M., Meissner, A., Foreman, R., Brambrink, T., Ku, M., Hochedlinger, K., Bernstein, B. E., and Jaenisch, R. (2007) In vitro reprogramming of fibroblasts into a pluripotent ES-cell-like state. *Nature*. 448, 318–24
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131, 861–72
- Cieślak-Pobuda, A., Knoflach, V., Ringh, M. v., Stark, J., Likus, W., Siemianowicz, K., Ghavami, S., Hudecki, A., Green, J. L., and Los, M. J. (2017) Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1864, 1359–1369
- Rodríguez-Polo, I., and Behr, R. (2022) Non-human primate pluripotent stem cells for the preclinical testing of regenerative therapies. *Neural Regeneration Research*. 17, 1867
- Hotta, A., and Ellis, J. (2008) Retroviral vector silencing during iPS cell induction: An epigenetic beacon that signals distinct pluripotent states. *Journal of Cellular Biochemistry*. 105, 940–948
- Hu, K. (2014) All Roads Lead to Induced Pluripotent Stem Cells: The Technologies of iPSC Generation. *Stem Cells and Development*. 23, 1285–1300
- FUSAKI, N., BAN, H., NISHIYAMA, A., SAEKI, K., and HASEGAWA, M. (2009) Efficient induction of transgene-free human pluripotent stem cells using a vector based on Sendai virus, an RNA virus that does not integrate into the host genome. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 85, 348–362
- 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., and Yamanaka, S. (2011) A more efficient method to generate integration-free human iPSCs. *Nat Methods*. 8, 409–12
- Warren, L., Manos, P. D., Ahfeldt, T., Loh, Y.-H., Li, H., Lau, F., Ebina, W., Mandal, P. K., Smith, Z. D., Meissner, A., Daley, G. Q., Brack, A. S., Collins, J. J., Cowan, C., Schläeger, T. M., and Rossi, D. J. (2010) Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 7, 618–30
- Wang, A. Y. L., and Loh, C. Y. Y. (2019) Episomal Induced Pluripotent Stem Cells: Functional and Potential Therapeutic Applications. *Cell Transplantation*. 28, 112S-131S
- Malik, N., and Rao, M. S. (2013) A Review of the Methods for Human iPSC Derivation, pp. 23–33, 10.1007/978-1-62703-348-0_3

15. Yue, X.-S., Fujishiro, M., Nishioka, C., Arai, T., Takahashi, E., Gong, J.-S., Akaike, T., and Ito, Y. (2012) Feeder cells

support the culture of induced pluripotent stem cells even after chemical fixation. *PLoS One.* 7, e32707



DR. ALEJANDRO CABRERA WROOMAN
ORCID: 0000-0003-2178-9349

Estudio la carrera de Químico Farmacéutico Biólogo en la Facultad de Química de la UNAM. Realizó su tesis bajo la tutoría de la Dra. Marta Menjivar Iraeta en la Facultad de Química de la UNAM. Posteriormente realizó el doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la tutoría del Dr. Jesús Adolfo García Sáinz en el Instituto de Fisiología de la UNAM. Sus estudios doctorales consistieron en el estudio de los sitios de fosforilación involucrados en la función e internalización de los receptores adrenérgicos. Del 2012 al 2014 realizó tres estancias posdoctorales, la primera con el Dr. Ignacio Camacho Arroyo, la segunda con el Dr. Michael Conn en el centro de primates de Oregon, y el último con el Dr. Iván Velasco en la UNAM en donde trabajó con la reprogramación de fibroblastos humanos hacia células pluripotenciales inducidas.

En el 2014 de incorporó como Investigador en el laboratorio de Tejido Conjuntivo del Instituto Nacional de Rehabilitación "Luis Guillermo Ibarra Ibarra.