



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología

GRADO EN BIOLOGÍA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Uso de células iPS en terapia regenerativa renal: obtención
de células iPS mediante vector no integrativo y
diferenciación hacia podocitos.

Nombre: Rut Molinuevo.

Convocatoria: Julio, 2013.

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

ÍNDICE.

1.	Preámbulo	Página 3.
2.	Resumen	Página 4.
3.	Introducción y objetivos	Página 5.
4.	Metodología	Página 13.
5.	Cronograma.....	Página 18.
6.	Presupuesto.....	Página 20.
7.	Bibliografía	Página 22.

PREÁMBULO.

En este documento se presenta un Trabajo de Fin de Grado de Biología, basado en la propuesta de un proyecto de investigación en el ámbito de la Biología Celular, Molecular y Genética. El diseño del proyecto, así como sus objetivos, han sido establecidos en su totalidad por la autora del mismo, Rut Molinuevo. El proceso se ha realizado bajo la tutorización de Ana Aguirre, profesora del departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal de la Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea.

El diseño de este proyecto está pensado para ser llevado a cabo en un laboratorio en el que se trabaja con procedimientos propios del campo de la Biología Celular, Molecular y Genética y que está equipado de forma adecuada para realizar las técnicas habituales en este campo.

RESUMEN.

En las sociedades modernas existe una creciente preocupación por el aumento de la incidencia de la enfermedad renal crónica. Debido a la deficiencia de donantes de órganos y al elevado coste del tratamiento de diálisis, existe la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos para estos pacientes. La medicina regenerativa basada en la aplicación de células iPS es una opción prometedora para el tratamiento de esta enfermedad. Sin embargo, la falta de conocimientos sobre el estado pluripotencial de las células y sobre su proceso de diferenciación, así como las limitaciones derivadas del propio procedimiento de reprogramación, impiden su aplicación clínica en un futuro inmediato. Para que se convierta en realidad, numerosas investigaciones se están llevando a cabo con el objetivo de mejorar el procedimiento y hacerlo adecuado para su aplicación clínica. En este trabajo se propone un método que permitiría obtener células iPS a partir de células mesangiales mediante la transfección con un vector no integrativo, el virus Sendai, portador de los genes Oct3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc. Al tratarse de un vector no integrativo, se minimizaría el efecto del proceso de reprogramación sobre la estabilidad del genoma celular. Además, en este proyecto se estudiará la capacidad de las células iPS obtenidas para diferenciarse en células progenitoras de podocitos que puedan ser aplicadas específicamente en terapias regenerativas para enfermos renales crónicos.

SUMMARY

In modern societies there is a growing concern about the increasing incidence of chronic kidney disease. Due to deficiency of donor organs and the high cost of dialysis treatment, there is the need to develop new treatments for these patients. Regenerative medicine based on the application of iPS cells is a promising option for the treatment of this disease. However, the lack of knowledge of the pluripotent state of the cells and the process of differentiation as well as the limitations imposed by reprogramming process itself, preclude its clinical application in the immediate future. For a reality, numerous investigations are being carried out with the aim of improving the procedure and make it suitable for clinical application. In this paper we propose a procedure for obtaining iPS cells from mesangial cells transfected with a non-integrative vector, Sendavirus, carrying Oct3/4, Sox2, Klf4 and c-Myc genes. Being a non-integrative vector, minimizes the effect of the reprogramming process on the cellular genome stability. In addition, this project will study the ability of iPS cells to differentiate into cells derived progenitor podocytes that can be applied specifically in regenerative therapies for chronic renal patients.

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS.

La enfermedad renal crónica causa una preocupación creciente en las sociedades modernas, debido al incremento de su incidencia y a su relación con enfermedades cardiovasculares. Esta enfermedad consiste en una pérdida progresiva e irreversible de las funciones renales, que tiene como consecuencia la incapacidad del riñón para eliminar los desechos, concentrar la orina y conservar los electrolitos en la sangre (Mezzano *et al.*, 2005). Los actuales tratamientos existentes para esta enfermedad incluyen la diálisis y los trasplantes. La diálisis es un procedimiento invasivo y agresivo, aunque vital, para el paciente que influye inevitablemente en su día a día. Los trasplantes se ven limitados por la existencia de insuficientes donantes de órganos, lo cual puede alargar la permanencia de un paciente en la lista de espera durante años. Ambos métodos resultan caros y necesitan de continuas intervenciones por lo que se trabaja activamente en el desarrollo de nuevas terapias que faciliten y mejoren la vida de estos pacientes y que, a la vez, resulten económicamente rentables y sostenibles. Las terapias regenerativas podrían llegar a ser una herramienta útil para alcanzar estos dos objetivos.

Tipos de células para terapias regenerativas: ventajas y limitaciones.

Las terapias regenerativas se basan en la utilización de células madre con capacidad de generar *`de novo'* células diferenciadas (Álvarez *et al.* 2012). Las células madre se encuentran en los organismos de manera natural (Martin, 1981), pero también pueden inducirse mediante reprogramación de células somáticas (Yamanaka *et al.* 2007) o pueden obtenerse a partir de células madre embrionarias (Tachibana *et al.* 2013).

Las células madre adultas presentan expresión de una serie de marcadores pluripotenciales, pero también de marcadores característicos de los tejidos de los que forman parte (Álvarez *et al.* 2012). Por esta razón, cuando hablamos de células madre adultas debemos referirnos a ellas como multipotentes, es decir, son células progenitoras específicas de cada tipo tisular. En los riñones adultos existen células madre multipotenciales, capaces de autorrenovarse y de diferenciarse en los diferentes tipos celulares que componen el órgano (Yamanaka *et al.* 2012). A pesar de sus características, estas células no son capaces de regenerar los tejidos cuando la enfermedad renal es crónica. Además, su uso en medicina regenerativa se encuentra limitado por las dificultades que entraña su identificación, dado que su presencia en el riñón adulto es del orden de 0,1% del total de células renales (Challen *et al.* 2006).

Las células madre embrionarias se encuentran en la masa de células interna (ICM) de los blastocitos, antes de su implantación en el útero (Álvarez *et al.* 2012). Estas células son pluripotenciales, es decir, tienen capacidad de diferenciarse hacia cualquier tipo celular y dar lugar a un organismo completo. Además, tienen capacidad de proliferación *in vitro* sin perder su estado pluripotencial (Martin, 1981). Estas células se caracterizan por presentar expresión de marcadores moleculares específicos,

responsables del mantenimiento del estado pluripotencial. Estos marcadores pueden ser factores de transcripción, enzimas involucrados en rutas metabólicas o proteínas de la superficie celular (Zhao *et al.* 2012). A pesar de su amplia capacidad de diferenciación, el uso de células embrionarias en terapias regenerativas presenta dos problemas que deben ser resueltos antes de que puedan ser utilizadas clínicamente. El primero de estos problemas tiene que ver con la reacción inmunológica: si las células embrionarias no son genéticamente compatibles con las del receptor, provocan el rechazo del organismo que las recibe debido a problemas de histocompatibilidad (Osafune, 2010). Una de las posibles soluciones a este problema sería la creación de bancos de células embrionarias que estuviesen disponibles para los pacientes que las necesiten; otra opción sería generar embriones histocompatibles con el receptor. El segundo de los problemas que presentan las células madre embrionarias es más controvertido, ya que es de carácter ético. Una parte de la sociedad actual se muestra contraria al uso de embriones en terapias celulares puesto que potencialmente pueden desarrollarse hacia un organismo completo. Este problema podría ser resuelto estableciendo líneas de células embrionarias derivadas de uno de los blastómeros (Chung *et al.* 2006; 2008). Este escenario no incluiría la destrucción del embrión ya que, una vez que se ha retirado el blastómero del embrión, los siete blastómeros restantes mantienen la capacidad de desarrollarse de manera normal si se implantan en el útero de una mujer.

Por todo lo anterior, la utilización de células madres del propio paciente y la utilización de células embrionarias no son en este momento estrategias de utilidad para la terapia renal regenerativa.

En los últimos años se han llevado a cabo numerosas investigaciones centradas en la identificación de los procesos moleculares responsables del mantenimiento del estado pluripotencial de las células embrionarias, así como del proceso de diferenciación. El objetivo último de estas investigaciones consiste en desarrollar un procedimiento que permita desdiferenciar cualquier tipo de célula somática, de forma que se comporten como células madre. Así sería posible obtener células madres inducidas, genéticamente compatibles con las del paciente, que podrían ser utilizadas en terapias regenerativas. La desdiferenciación de células humanas ha conseguido llevarse a cabo mediante dos procedimientos: reprogramación mediante transferencia nuclear (Tachibana *et al.* 2013) y reprogramación directa mediante transducción con factores de reprogramación (Takahashi *et al.* 2007).

Estrategias para la obtención de células pluripotenciales inducidas.

Se sabe que moléculas citoplasmáticas presentes en los ovocitos maduros poseen la capacidad de reprogramar el núcleo de las células somáticas hacia un estado embrionario y pluripotencial. Este fenómeno fue descubierto por primera vez en anfibios (Gurdon, 1962). Desde entonces, la reprogramación de células somáticas mediante transferencia nuclear se ha llevado a cabo con éxito en diferentes mamíferos, demostrando que esta característica del citoplasma de los ovocitos es universal

(Solter, 2000). Debido a la falta de conocimientos sobre cuáles son los factores específicos que intervienen en el proceso y su mecanismo de acción, la obtención de células embrionarias humanas mediante transferencia nuclear no se ha llevado a cabo hasta recientemente (Tachibana *et al.* 2013). Aunque se habían realizado investigaciones previas, en la mayoría de los casos las células pluripotenciales embrionarias no progresaban más allá del estado de ocho células, presuntamente porque los protocolos utilizados no permitían la activación de los genes embrionarios endógenos del núcleo de la célula somática (Egli *et al.* 2011; Noggle *et al.* 2011). Desarrollando un novedoso protocolo recientemente se han obtenido células pluripotenciales embrionarias a partir de fibroblastos de origen fetal, capaces de desarrollarse hasta el estado de blastocito (Tachibana *et al.* 2013). Estas células expresan marcadores específicos de células pluripotenciales, como *OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2*, *SSEA-4*, *TRA-1-60* y *TRA-1-81*, y producen teratomas en ratones inmunodeprimidos. Por todo lo anterior, las células embrionarias obtenidas mediante transferencia nuclear son importantes candidatas para ser aplicadas en terapias regenerativas. Sin embargo, se deberán realizar más estudios con el fin de adecuarlas a este propósito.

En el año 2006 los investigadores Takahashi y Yamanaka consiguieron la reprogramación directa de fibroblastos de ratón. Para ello, realizaron transfecciones múltiples de esos fibroblastos utilizando un vector retroviral basado en el plásmido pMXs portador de diferentes genes. Este vector se inserta en el genoma de células en división de manera aleatoria. En total generaron y utilizaron 24 vectores diferentes, cada uno portando un gen altamente expresado en células embrionarias. De esos 24 genes candidatos, encontraron que la combinación de cuatro de ellos era suficiente para llevar a cabo la reprogramación. Estos cuatro genes fueron *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4* y el oncogén *c-myc*, conocidos como combinación OSKM. Las células pluripotenciales inducidas así obtenidas (denominadas células iPS) aparecen con una eficiencia de 0,01% y son muy similares a las células pluripotenciales embrionarias en varios aspectos: morfología, expresión de marcadores pluripotenciales, patrón de cambios epigenéticos y capacidad para diferenciarse en líneas celulares derivadas de cualquiera de las tres capas germinales.

Poco después de obtener las células iPS de ratón, el mismo grupo consiguió células iPS humanas mediante transducción de fibroblastos humanos con un vector retroviral portador de la misma combinación OSKM (Takahashi *et al.* 2007).

Actualmente existen numerosos grupos de investigación trabajando activamente para obtener células iPS que puedan ser diferenciadas hacia diversos tipos celulares ya que sus ventajas en terapias regenerativas son claras: no se observa reacción inmunológica en el organismo sobre el que se aplica el tratamiento, ya que derivan del propio paciente; y además no suscitan problemas éticos puesto que no tienen un origen embrionario.

¿Qué ocurre durante la reprogramación?

Oct3/4, *Sox2* y *Klf4*, denominados genes pluripotenciales, son genes altamente expresados en células embrionarias que actúan sobre las regiones promotoras e intensificadoras de un gran conjunto de genes embrionarios de alto nivel de expresión (Jiang *et al.*, 2008; Boyer *et al.*, 2005). *Oct3/4* es universalmente requerido para el estado pluripotencial. De hecho, los blastocitos deficientes en *Oct3/4* no pueden desarrollarse en ratones (Nichols *et al.*, 1998). Además, se sabe que los niveles de expresión de *Oct3/4* en células embrionarias están cuidadosamente regulados, de forma que un incremento o una reducción de los niveles de expresión induce la diferenciación hacia líneas del trofoectodermo y del endodermo primitivo, respectivamente (Niwa *et al.*, 2000). Se han identificado más de 400 genes diana de *Oct3/4*, que también son diana de *Sox2* y *Nanog* (Chavez *et al.*, 2009; Li, 2010; Sharov *et al.*, 2008). *Sox2* a su vez es regulado por *Oct3/4* (Grinnell *et al.*, 2007) y se une a diferentes promotores sólo o formando complejos con *Oct3/4*. *Oct3/4* y *Sox2*, junto con *Nanog*, forman una red transcripcional necesaria para el mantenimiento del estado pluripotencial de las células embrionarias (Chavez *et al.*, 2009). *Nanog* es una de las principales diana del complejo *Sox2-Oct3/4* (Yates & Chambers, 2005) que se activa en las últimas etapas de la reprogramación (Cox & Rizzino, 2010). *Klf4* también participa en la red transcripcional cooperando con *Sox2* y *Oct3/4* en la activación de diferentes factores (Li *et al.*, 2005). Varios estudios demuestran que la red transcripcional controlada por *Oct3/4-Sox2-Nanog* (Boyer *et al.*, 2005; Chavez *et al.*, 2009; Loh *et al.*, 2000; Sharov *et al.*, 2008) tiene más de 1400 genes diana, que pueden ser divididos en cuatro grupos: factores de transcripción, factores remodeladores de la cromatina, factores reguladores del ciclo celular y factores supresores de señales. *Oct3/4-Sox2-Nanog* funcionan principalmente como reguladores transcripcionales positivos y sólo 40 genes de los 1400 sobre los que actúan son reprimidos por este trío. La mayoría de los genes cuya expresión incrementan están involucrados en la represión de factores de transcripción que inducen la diferenciación celular. Por eso, aunque el proceso de reprogramación no es completamente conocido, diversos estudios sugieren que se trata de una serie de activaciones secuenciales de marcadores pluripotenciales (Brambrik *et al.*, 2008; Stadtfeld *et al.*, 2008). En las primeras etapas de la reprogramación se produce la inhibición de la expresión de genes somáticos mediante la activación de sus inhibidores (Boyer *et al.*, 2005). Posteriormente, los genes pluripotenciales endógenos se activan y se silencian los transgenes pluripotenciales (Cox & Rizzino, 2010). Coincidiendo con ese momento, las células reprogramadas presentan actividad telomerasa (Takahashi & Yamanaka, 2006) y reactivación del cromosoma X (Stadtfeld *et al.*, 2008). La telomerasa protege a las células de la apoptosis por el acortamiento de los telómeros, provocado por las divisiones celulares (Zhao & Daley., 2008). *Sox2-Nanog-Oct3/4* incrementan la expresión de algunas proteínas asociadas a la telomerasa, incluyendo Terf1, Terf2 y RIF (Krueger *et al.*, 2010). Este trío también participa en la reactivación del cromosoma X, bien inhibiendo *Xist* o activando *Tsix*. *Xist* y *Tsix* son dos genes no codificantes ligados al cromosoma X, situados en el centro inactivador del cromosoma, y que parecen tener un papel fundamental en la activación e inactivación del mismo (Barakat & Gribnau, 2012). *Oct4*, *Sox2* y *Klf* actúan uniéndose al promotor o al

intensificador de *Tsix* (Donohoe et al., 2009; Donohoe et al., 2007; Navarro et al., 2010). *Nanog*, y también *Oct3/4* y *Sox2*, actúan inhibiendo el gen *Xist* (Navarro et al, 2008).

El trío *Sox2-Oct3/4-Nanog* también regula las metiltransferasas de histonas y contribuye a la transcripción de diferentes genes mediante la activación de diferentes factores asociados a la RNA polimerasa II (Chavez et al., 2009). La metilación del DNA es uno de los mecanismos involucrados en el mantenimiento del estado pluripotencial (Medvedev et al., 2011). Los promotores de los genes pluripotenciales se encuentran hipometilados en células indiferenciadas, e hipermetilados en células somáticas (Pan et al., 2007; Zhao et al., 2007), de forma que las células iPS experimentan un cambio global en el patrón de metilación durante la reprogramación (Lister et al., 2011; Mikkelsen et al., 2008; Lagarkova et al, 2010). Otro evento importante, que parece ocurrir relativamente tarde durante la reprogramación, es la modificación de la maquinaria que controla el ciclo celular, en particular el punto de control de la fase G1 (Singh et al., 2009). Se sabe que las células embrionarias pluripotenciales carecen del punto de control G1, por lo que resulta necesario que durante la reprogramación se restablezca la estructura del ciclo celular embrionario (Singh et al., 2009). Este modelo de ciclo celular se caracteriza por presentar hiperfosforilación de la proteína RB, elevada actividad de las ciclinas E y A asociadas a quinasas, y carencia de expresión de los principales inhibidores de CDKs (Stead et al., 2002).

Por otro lado, *c-myc* es un oncogén regulador del ciclo celular. Tiene un conjunto de genes diana muy diferentes a los de *Oct3/4*, *Sox2* y *Klf4*, relacionados con el ciclo celular y el metabolismo, y forma una red transcripcional completamente diferente (Kim et al., 2008; Chen et al., 2008; Boyer et al., 2005). Aunque su función en la reprogramación no se conoce completamente, se cree que activa genes pluripotenciales y ayuda a mantener el estado pluripotencial de las células madre embrionarias (Cartwright et al., 2005). Parece que *c-myc* funciona activando factores de transcripción y modelando la cromatina hacia una conformación abierta (Knoepfler et al., 2006). Esta conformación abierta, eucromatina, permite a los factores de transcripción activar el conjunto de genes involucrados en mantener el estado pluripotencial (Cox & Rizzino, 2011). Además, *c-myc* es requerido para la activación de la telomerasa, necesaria para la adecuada proliferación de las células iPS (Liu et al., 2008). Sin embargo, la naturaleza oncogénica de *c-myc* lo hace poco deseable para la reprogramación celular con fines regenerativos (Miyazaki et al., 2012). De hecho, se ha observado que *c-myc* no es estrictamente requerido para la reprogramación, pero cuando es omitido del protocolo OSKM, el tiempo necesario para que ésta sea completa es mucho mayor; además, se observa una significativa pérdida de eficiencia cuando no se incluye *c-myc* entre los genes que dirigen la reprogramación (Werning et al., 2008). Por estas razones, se han desarrollado otras combinaciones de factores de reprogramación que permitan reprogramar, de forma eficaz y segura, las células iPS. Es el caso, por ejemplo, de la combinación SOLN, *Sox2*, *Oct3/4*, *Lin28* y *Nanog* (Yu et al., 2007).

Limitaciones de la reprogramación.

A pesar de las características que las células iPS presentan en común con las células embrionarias pluripotenciales, en diferentes estudios se ha demostrado que también poseen ciertas características no observadas en las células embrionarias, y que son propias de la célula somática de la que provienen (Chin *et al.*, 2009; Nishino *et al.*, 2011). Atendiendo a las regiones metiladas identificadas en las células iPS, se pueden diferenciar dos grupos. Por un lado estaría el patrón de metilación específico de las células iPS y que sería equivalente al de las células embrionarias. Por otro lado, se observan regiones metiladas que coinciden con el patrón de metilación de la célula somática de la que derivan (Chin *et al.*, 2009); se trata de la llamada memoria epigenética celular. Estas características pueden condicionar la capacidad de diferenciación de las células iPS. Con el fin de minimizar este efecto y optimizar los procedimientos, más investigaciones son necesarias para comprender por completo el funcionamiento de la red que mantiene el estado pluripotencial en las células embrionarias y para identificar cada uno de los cambios que tienen lugar en las células somáticas durante la reprogramación.

Además de la memoria epigenética, las células iPS presentan otras limitaciones en cuanto a su aplicación clínica, relacionadas con su elevado potencial mutagénico. El protocolo desarrollado por Yamanaka en 2006 utilizaba vectores retrovirales para insertar la combinación OSKM. Estos vectores son muy utilizados para la transferencia de genes a células de mamíferos, dado que se insertan aleatoriamente en el DNA cromosómico con una gran eficiencia y mantienen una expresión muy duradera. Además, los vectores retrovirales son propensos a sufrir silenciamiento epigenético (Matsui *et al.*, 2010), proceso necesario tras la activación de los genes pluripotenciales endógenos de la célula reprogramada (Brambrink *et al.*, 2008). Sin embargo, el uso de vectores retrovirales para aplicaciones clínicas es arriesgado. En primer lugar, la integración viral puede provocar que el genoma celular se vuelva inestable, derivando en mutagénesis (Amabile *et al.* 2009; Kane *et al.*, 2008). En segundo lugar, el silenciamiento de los genes virales puede ser incompleto o prematuro, lo que podría afectar a la eficiencia de la reprogramación y a la futura diferenciación de la célula (Hanna *et al.*, 2008).

Por estas razones, diferentes investigaciones han desarrollado protocolos alternativos al uso de virus integrativos para la reprogramación de células iPS de manera segura y eficaz. Se han obtenido células iPS mediante la utilización de un vector adenoviral no integrativo, que permanece en las células en forma de epicromosoma. Sin embargo, la eficiencia de la reprogramación mediante este procedimiento es muy baja (Stadtfield *et al.*, 2008; Okita *et al.*, 2010). A pesar de ello, el éxito en la obtención de células iPS mediante este vector no integrativo demostró que la integración en el genoma de los factores de transcripción no es requerida para la reprogramación de células somáticas, lo que impulsó el desarrollo de nuevos procedimientos de reprogramación basados en vectores no virales. Sin embargo, la eficiencia conseguida mediante estos métodos dista mucho de la obtenida mediante vectores virales, a excepción de los métodos basados en la reprogramación mediante mRNAs (Oh *et al.*, 2011).

La utilización del virus no integrativo Sendai puede ser una buena opción para generar células iPS seguras y con una elevada eficiencia de reprogramación (Rao & Malik; 2012). El virus Sendai es un virus de RNA con capacidad de producir grandes cantidades de proteínas sin entrar en el núcleo de la célula infectada. Este virus permanece en el citoplasma de las células infectadas hasta el pase número diez, cuando se pierde completamente (Rao & Malik, 2012). El primer estudio publicado en el que utilizaba el virus Sendai para la reprogramación de fibroblastos humanos, utilizando la combinación OSKM, afirmaba que ésta se había realizado con una eficiencia del 1% (Fusaki *et al.*, 2009). Debe destacarse que es difícil comparar de forma directa las eficiencias de reprogramación de los distintos métodos debido a los diferentes criterios utilizados para calcularla, al uso de diferentes combinaciones de factores de reprogramación y al tipo de célula somática que se está reprogramando.

Terapias regenerativas en tejidos renales.

Dado que los riñones son órganos compuestos por varios tipos celulares, para la terapia regenerativa de este órgano deberían ser desarrollados protocolos que permitan la reprogramación de cada tipo celular o, al menos, de los que se ven más afectados en el proceso de disfunción renal.

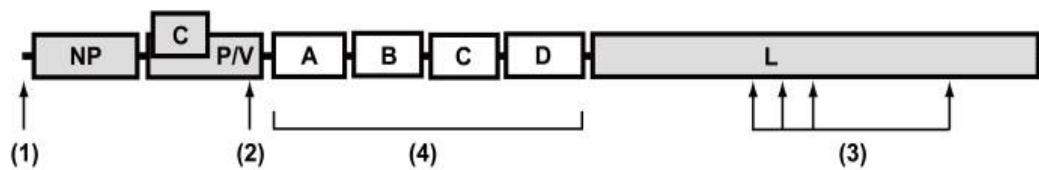
Los podocitos glomerulares tienen un papel muy importante en el desarrollo de la enfermedad renal crónica. Estas células controlan la filtración de sustancias de desecho por la capsula de Bowman en el glomérulo. La pérdida de funcionalidad de estas células se traduce en la pérdida de la capacidad de filtración del glomérulo (Wiggins, 2007; Sato *et al.*, 2009). Los podocitos son células altamente diferenciadas con una capacidad muy limitada de replicación (Kriz, 2003). En 2011 Song *et al.*, desarrollaron un protocolo mediante el cual consiguieron obtener células iPS derivadas de células mesangiales humanas del glomérulo renal, para posteriormente diferenciarlas en células progenitoras de podocitos. La reprogramación de las células mesangiales se realizó utilizando vectores retrovirales que contenían los factores de transcripción *C-MYC*, *SOX2*, *OCT3/4* y *KLF4*. 12 días después de la transfección se obtuvieron colonias con una morfología muy similar a la de las células embrionarias pluripotenciales. Las células iPS obtenidas expresaban los marcadores pluripotenciales *OCT3/4*, *NANOG*, *SOX2*, el factor de crecimiento de fibroblastos, la proteína de reducción de la expresión (REX1), la telomerasa y proteínas asociadas al desarrollo pluripotencial (DPPA2, DPPA4 y DPPA5). El equipo confirmó además el silenciamiento de los transgenes retrovirales. Las células iPS obtenidas por el equipo de Song eran capaces de desarrollar teratomas en los ensayos *in vivo*. Posteriormente, se indujo la diferenciación de las células iPS obtenidas a podocitos (Song *et al.*, 2012). Estos podocitos iPS mantenían la capacidad proliferativa propia de las células pluripotenciales, a la vez que expresaban marcadores propios de podocitos maduros como Pax-2, WT1, sinaptopodina y nefrina. Además, mostraban otras características de podocitos maduros, como respuesta contráctil a la presencia del vasopresor Angiotensina-II (All) y consumo de albúmina. Los podocitos maduros poseen un sistema contráctil basado en la actina, acompañada de otras proteínas estructurales como la talina (Mundel *et al.* 1997),

que se contrae en presencia de AII. Además, tras un ensayo de reagregación *in vivo*, los podocitos iPS fueron capaces de integrarse en estructuras nefríticas en desarrollo. A pesar de todos estos resultados prometedores, la utilización del vector retroviral para la reprogramación de estas células, las hace poco apropiadas para su aplicación clínica. Por esta razón, en este trabajo se propone un procedimiento alternativo para la reprogramación de células mesangiales, mediante transducción de los factores *SOX2*, *OCT3/4*, *KLF4* y *C-MYC*, utilizando un vector no integrativo, derivado del virus Sendai, con alta eficiencia de reprogramación. Dado que se trata de un vector de expresión transitoria, la presencia de *C-MYC* factor de reprogramación, no comprometerá la estabilidad del genoma celular. Las células iPS obtenidas de esta manera estarán libres de transgenes cuando se complete la reprogramación y serán más aplicables clínicamente que las células iPS obtenidas mediante vectores integrativos. Posteriormente se estudiará la capacidad de diferenciación de las células iPS obtenidas a podocitos iPS, con vistas a una futura aplicación en terapias regenerativas para la enfermedad renal crónica.

METODOLOGÍA

Transducción de células iPS.

Para la reprogramación de las células mesangiales se utilizará el kit CytoTune™-iPS Reprogramming Kit de Invitrogen. Este kit contiene cuatro vectores basados en el virus Sendai, cada uno de ellos conteniendo uno de los cuatro factores de reprogramación (*OCT3/4*, *SOX2*, *KLF4* y *C-MYC*). Un esquema del vector se representa en la Figura 1.



Key Structure of SeVdp Vector

- (1) Insertion of Gene-End Signal
- (2) Mutation in P gene (P517H)
- (3) Mutation in L gene (V981I, S1088A, C1207S, V1618L)
- (4) Deletion of M,F and HN genes, and Installation of exogenous genes

Figura 1. Estructura genómica del vector Sendai virus. SeV presenta mutaciones en el gen *P*, que codifica para la subunidad pequeña de la RNA polimerasa, y el gen *L*, que codifica para la subunidad grande. Estas mutaciones son responsables de la baja citotoxicidad del vector. Los genes *M* (envoltura del virus), *F* (proteína de fusión con la membrana celular) y *HN* (proteína de reconocimiento del receptor de membrana) han sido eliminados y reemplazados por *C-MYC*, *SOX2*, *KLF4* y *OCT3/4* en cada caso.

Las células mesangiales humanas (NHMC) serán cultivadas a 37°C en medio DMEM, conteniendo un 5% de suero fetal bovino (Song *et al.* en 2011). Dos días antes de la transducción, las células serán sembradas en placas de 6 pocillos. En cada pocillo se sembrarán 5×10^5 células. Pasado ese tiempo, se añadirá a las células el volumen indicado de cada uno de los vectores a 2mL de medio DMEM precalentado a 37°C. Se retirará el medio de cultivo de las células y se añadirá el medio conteniendo los vectores. Las células se cultivarán toda la noche a 37°C y 5% de CO₂. 24 horas después se retirará el medio y se añadirá medio nuevo. Las células se mantendrán en cultivo durante 10 días y después se transferirán, a un medio con células SLN alimentadoras para evitar la diferenciación espontánea, en una nueva placa de 6 pocillos. Pasado un día, las células se transferirán a medio de cultivo para embriones de primate, que deberá cambiarse cada día, y se mantendrán durante cuatro semanas.

- Determinación de la eficiencia de reprogramación.

Se realizarán un total de 10 pases para asegurarnos que la reprogramación haya sido completa y de que las células se han desprendido del vector SeV. La eficiencia de reprogramación se calculará como el número de colonias de células iPS formadas, entre el número de células infectadas. Las células iPS se identificarán morfológicamente comparándolas con células embrionarias. Se realizará una tinción con fosfatasas alcalinas para facilitar la identificación de colonias iPS. Para la tinción se utilizará sustrato ALP después de fijarlas con un 10% de buffer neutral de solución de formalina. Mediante citometría de flujo se aislarán células iPS individuales y se cultivarán en placas de 96 pocillos para obtener clones.

- Determinación de la permanencia del vector SeV

Se tomarán alícuotas de cada pocillo y se transferirán a una nueva placa de 96. Se aplicarán anti-SeV para asegurarnos de que los vectores se han desprendido de las células y se seleccionarán las células en las que así sea.

- Cuantificación de la expresión de marcadores específicos.

La expresión de marcadores mesangiales y pluripotenciales embrionarios en las células iPS obtenidas se analizará mediante qPCR. Los niveles de expresión de esos marcadores en las células iPS serán comparados con los niveles de expresión de esos genes en células mesangiales. Para ello, se extraerá y purificará el RNA las células iPS y de las células mesangiales, se obtendrá el cDNA de cada tipo celular mediante RT-PCR y se cuantificará la expresión mediante qPCR. Los cebadores a utilizar para cada gen aparecen en la Tabla 1.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores a utilizar para amplificar los marcadores específicos de células mesangiales y embrionarias humanas.

Tipo de marcador	Gen	Cebador Directo (región 5')	Cebador Reverso (región 3')
Marcadores mesangiales	<i>ANG-1</i>	GGAAATCCCTCCGGTGAATA	CAGGCTGCTCTGTTTTCTG
	<i>MEGSINA</i>	ATCCAAGGCGAATGACCTCT	AGGAATGGGTGGTCAGCTCT
	<i>THY-1</i>	CTAGTGGACCAGAGCCTTCG	TGGAGTGCACACGTGTAGGT
	<i>DESMINA</i>	CTGAGCAAAGGGTTCTGAG	CTTCAGGGAGCAGTGAGGAC
	<i>hαSMA</i>	CTGTTCCAGCCATCCTTCAT	CGGCTTACATCGTATTCCTGT
	<i>hRUNX</i>	CCCTAGGGGATGTTCCAGAT	TGAAGCTTTCCCTCTCCA
Marcadores	<i>NANOG</i>	CAGCCCCGATTCTCCACCAGTCCC	CGGAAGATTCCCAGTCGGGT

embrionarios			TCACC
	SOX2	GGGAAATGGGAGGGGTGCAAAAG AGG	TTGCGTGAGTGTGGATGGGA TTGGTG
	OCT3/4	GACAGGGGGAGGGGAGGAGCTAG G	CTCCCTCCAACCAGTTGCC CAAAC

- Tinción inmunofluorescente de marcadores embrionarios.

Tras la fijación con formaldehído al 4%, se realizará una prueba de inmunofluorescencia para antígenos específicos de células embrionarias humanas. Se utilizarán los anticuerpos primarios TRA-1-60, TRA-1-81 y OCT-3/4.

- Cariotipado.

Con el fin de obtener información sobre la presencia de aberraciones cromosómicas que hayan podido producirse durante la reprogramación, se realizará un cariotipado de las colonias de iPS obtenidas tras el décimo pase. El cariotipado se realizará mediante hibridación fluorescente *in situ* mediante la técnica de bandas G.

- Ensayo de teratoma.

La capacidad de diferenciación *in vivo* de las colonias de iPS seleccionadas se estudiará mediante un ensayo de teratoma. Se seleccionarán aleatoriamente 3 colonias de células iPS que hayan sido caracterizadas como tales durante los anteriores procedimientos y se inyectarán en el riñón de ratones NOD-SCID inmunodeprimidos, según el procedimiento descrito por Song *et al.*. Ocho semanas después de la inyección los tumores serán diseccionados, pesados y fijados con formaldehído. El tejido será seccionado y teñido con hematoxilina y eosina para identificar los tipos celulares que forman el tumor.

Inducción de células iPS progenitoras de podocitos.

- Inducción a la diferenciación *in vitro*.

La inducción a la diferenciación de las células iPS se realizará según el procedimiento descrito por Song *et al.* Las células se cultivarán durante tres días en placas de 6 pocillos con el medio de diferenciación, compuesto de DMEM-F12 (Sigma) con un 2.5% de FBS, 100 µM de aminoácidos no esenciales, 100 µM

de beta mercaptoethanol con 10ng/ml de activina A, 15 ng/ml de BMP7 y 0.1 μ M de ácido retinoico. Las células serán transferidas a placas de cultivo tisular y se mantendrán allí durante una semana con el mismo medio. Al décimo día, las células se cultivarán en medio DMEM-F12 sin la adición de activina A, BMP7 y ácido retinoico. Se realizarán varios pases para la caracterización y el ensayo de integración. La morfología de los podocitos iPS se comparará mediante microscopía electrónica con la de podocitos humanos de cultivo primario obtenidos tras la realización de nefrectomías en hospitales de la zona.

Caracterización de células iPS progenitoras de podocitos.

- Cuantificación de la expresión de marcadores específicos.

La presencia y nivel de expresión de mRNA de marcadores específicos de podocitos humanos durante la diferenciación se estudiará mediante qPCR. Se extraerá el RNA de células iPS derivadas de células mesangiales, de podocitos iPS (tras 3 y 10 días de la diferenciación) y de podocitos humanos de cultivo primario. Se aislará y purificará el RNA de los tres tipos celulares. Se obtendrá el cDNA de los marcadores que se quiere identificar mediante RT-PCR utilizando cebadores para amplificar los marcadores específicos embrionarios (Tabla 2). Se cuantificará la expresión de estos genes mediante qPCR.

Tabla 2. Secuencia de los cebadores utilizados para amplificar los marcadores específicos de podocitos humanos.

Gen	Cebador Directo (región 5')	Cebador Reverso (región 3')
<i>WT-1</i>	GGACAGAAGGGCAGAGCAACCA	GTCTCAGATGCCGACCGTACAA
<i>SINAPTOPIDINA</i>	AGCCCAAGGTGACCCCGAAT	CCCTGTCACGAGGTGCTGGC
<i>PAX 2</i>	AACGACAGAACCCGACTATG	ATCCCACTGGGTCATTGGAG
<i>NEFRINA</i>	CAACTGGGAGAGACTGGGAGAA	AATCTGACAACAAGACGGAGCA

- Tinción inmunofluorescente de marcadores específicos de podocitos.

Se estudiará la expresión de proteínas específicas de podocitos en las células iPS progenitoras de podocitos mediante tinción inmunológica. Los podocitos iPS y los podocitos humanos de cultivo primario, obtenidos tras la realización de nefrectomías en hospitales de la zona, serán fijadas en formaldehído. A continuación se incubarán con anti-nefrina, anti-sinaptopodina, anti-Pax-2, y anti-podocina (NPHS2; todas de Abcam, USA) y anti-WT1 (Santa Cruz, USA). El resultado se analizará

mediante microscopía de fluorescencia. Se seleccionarán los podocitos iPS que expresen todos los marcadores puesto que es señal de un estado de diferenciación avanzado.

- Análisis funcional. Respuesta contráctil a la presencia de AII.

Con el fin de determinar el estado de diferenciación de los podocitos iPS, su respuesta contráctil a la presencia de AII se visualizará cada 15 minutos mediante microscopía por contraste de fases. Se comparará su respuesta con un control de podocitos iPS a los que no se ha aplicado AII.

- Integración *in vitro* de los podocitos iPS.

Para determinar la capacidad de diferenciación e integración de los podocitos iPS se realizará un ensayo de re-agregación tras su interacción con el microambiente de un riñón en desarrollo, según el protocolo descrito por Song *et al.*, en 2012. . Embriones en los estados 13.5 y 15.5 se obtendrán de un ratón C57BL6/J hembra. Las células de los embriones serán disgregadas y centrifugadas con los podocitos iPS marcados con CFSE fluorescente. Se formarán agregados de forma espontánea que se traspasarán a una membrana de policarbonato, donde se incubarán en medio DMEM (5%CO₂ y 37°C) durante 4 días. El medio se cambiará cada 48 horas. Tras cuatro días de cultivo, las muestras serán visualizadas por microscopía de inmunofluorescencia y se comprobará la integración de los podocitos iPS en los agregados renales. Como control, se realizará el mismo procedimiento sustituyendo los podocitos iPS, por podocitos humanos de cultivo primario obtenidos de los hospitales de la zona.

CRONOGRAMA.

TAREAS	MESES							
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	29-21	22-24
Transducción de células mesangiales <ul style="list-style-type: none"> • Obtención y cultivo de células mesangiales humanas • Infección con vectores SeV portadores de genes OSKM • Transferencia a medio con células SNL alimentadoras • Cultivo en medio para embriones de primate 	X							
Determinación de la eficiencia de reprogramación: tinción con fosfatasas alcalinas	X							
Determinación de la permanencia del vector SeV		X						
Selección de células iPS mediante citometría de flujo		X						
Cuantificación de la expresión de marcadores específicos de células iPS y de células mesangiales		X						
Análisis de marcadores de células madre y de células especializadas		X	X					
Determinación de la estabilidad cromosómica mediante cariotipado de bandas G.		X	X					
Ensayo de teratoma <ul style="list-style-type: none"> • Adquisición de los ratones inmunodeprimidos • Inyección de células iPS en los riñones de los ratones • Disección de los tumores • Tinción de los tumores y visualización 		X	X	X				
Selección de las colonias de células iPS más adecuadas para el procedimiento de diferenciación <i>in vitro</i>				X				
Inducción a la diferenciación <i>in vitro</i> . <ul style="list-style-type: none"> • Disociación mecánica de las colonias de iPS seleccionadas y selección mediante citometría de flujo • Cultivo en medio de diferenciación • Transferencia a placas de cultivo tisular 				X	X			
Comparación morfológica de los podocitos iPS con podocitos humanos de cultivo primario. <ul style="list-style-type: none"> • Obtención del cultivo primario de podocitos del centro hospitalario 					X	X		

<ul style="list-style-type: none"> • Comparación mediante microscopía electrónica. 								
<p>Cuantificación de la expresión de marcadores específicos de podocitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Extracción y purificación del RNA de los podocitos iPS, podocitos humanos de cultivo primario y células mesangiales • RT-PCR de marcadores específicos de podocitos maduros • qPCR del cDNA obtenido 				X	X	X		
<p>Análisis de marcadores específicos de podocitos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cultivo con anticuerpos • Visualización mediante microscopía de fluorescencia 					X	X		
<p>Análisis funcional.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Respuesta contráctil a la presencia de AII. 						X	X	
<p>Integración in vitro de los podocitos iPS</p> <ul style="list-style-type: none"> • Adquisición de ratones hembra preñados. • Obtención de los embriones en los estados 13.5 y 15.5 • Obtención de riñones de embriones de ratón y disgregación • Cultivo de los riñones embrionarios con células iPS • Visualización de los agregados formados 						X	X	X

PRESUPUESTO.

		ESTIMACIÓN	TOTAL
Material general	Puntas de micropipeta (blancas, amarillas y azules, con y sin filtro), guantes, tubos Falcon, tubos Eppendorf, pipetas, portas, agarosa, tampones, etc.		2.000 €
Lineas celulares	Adquisición de células mesangiales y feeders.		1.000 €
	Mantenimiento y uso: medio DMEM, FBS, frascos de cultivo, placas de cultivo (96,6 y 1 pocillo), antibióticos, PBS, material de vidrio, trypan blue, criotubos, DMSO, N ₂ líquido, etc.		2.000 €
Cariotipado mediante bandas G.			300 €
Transfección.	Lipofectamina o equivalente.		1.000 €
	CytoTune™-iPS Reprogramming Kit		1.700 €
Anticuerpos		500€/anticuerpo x 8 anticuerpos	4.000 €
RT-PCR	Extracción de RNA y obtención de cDNA mediante kits		2.000 €
	Cebadores específicos		1.300 €
RT-qPCR	Sylver Green Master Mix		400 €
	Cebadores específicos		1.300 €
	Análisis en SGIKER	5€/muestra y gen x 13genes x 20muestras	1.500 €

Diferenciación celular	Medio DMEM-F12, FBS, aminoácidos no esenciales, beta mercaptoethanol, activina A, BMP7, ácido retinoico, etc.		1.500 €
Animales de experimentación	Adquisición y transporte de ratones inmunodeprimidos	90€/ratón x 15 ratones	1.350 €
	Mantenimiento de ratones inmunodeprimidos (SGIKER-Animalario)	0,15€/animal y día x 15 animales x 120 días	1.000 €
	Adquisición y transporte de ratones C57BL6/J	70€/ratón x 12 ratones	840 €
	Mantenimiento de ratones C57BL6/J (SGIKER-Animalario)	0,15€/animal y día x 12 animales y descendencia x 120 días	1.000 €
Citometría de flujo	Análisis en SGIKER	20€/hora x 20 horas	400 €
Microscopía de fluorescencia	Análisis en SGIKER	15€/hora x 30 horas	450 €
IMPREVISTOS (20%)			5.000 €
TOTAL			30.004 €

BIBLIOGRAFÍA.

- Alvarez CV, Garcia-Lavandeira M, Garcia-Rendueles ME, Diaz-Rodriguez E, Garcia-Rendueles AR, Perez-Romero S, Vila TV, Rodrigues JS, Lear PV, Bravo SB. (2012). Defining stem cell types: understanding the therapeutic potential of ESCs, ASCs and iPS cells. *Journal of Molecular Endocrinology* 49: R89-R111.
- Amabile G, Meissner A (2009). Pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine. *Trends Mol Med* 15:59–68.
- Barakat and Gribnau (2012). X chromosome inactivation in the cycle of life. *Development* 139: 2085-2089.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* 122:947-956.
- Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, Lengner CJ, Wernig M, Suh H, Jaenisch R. (2008). Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells. *Cell Stem Cell* 2008; 2: 151-159.
- Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S. (2005). *Development* 132(5), 885-896.
- Challen GA, Bertonecello I, Deane JA, Ricardo SD, Little MH (2006). “Kidney side population reveals multilineage potential and renal functional capacity but also cellular heterogeneity,” *Journal of the American Society of Nephrology* 17:1896–1912.
- Lukas Chavez, Abha S Bais, Martin Vingron, Hans Lehrach, James Adjaye, Ralf Herwig. (2009). In silico identification of a core regulatory network of OCT4 in human embryonic stem cells using an integrated approach. *BMC Genomics* 10:314.
- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* 133:1106-1117.
- Mark H. Chin, Mike J. Mason, Wei Xie, Stefano Volinia, Mike Singer, Cory Peterson, Gayane Ambartsumyan, Otaren Aimiwu, Laura Richter, Jin Zhang, Ivan Khvorostov, Vanessa Ott, Michael Grunstein, Neta Lavon, Nissim Benvenisty, Carlo M. Croce, Amander T. Clark, Tim Baxter, April D. Pyle, Mike A. Teitell, Matteo Pelegri, Kathrin Plath, and William E. Lowry (2009). Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures. *Cell Stem Cell*. 5:111-123.
- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Marh, J., Lu, S. J., Johnson, J., Meisner, L. & Lanza, R. 2006. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature* 439, 216–219.

- Chung, Y., Klimanskaya, I., Becker, S., Li, T., Maserati, M., Lu, S. J., Zdravkovic, T., Ilic, D., Genbacev, O., Fisher, S., Krtolica, A. & Lanza, R. 2008. Human embryonic stem cell lines generated without embryo destruction. *Cell Stem Cell* 2: 113–117.
- Cox & Rizzino (2010). Induced Pluripotent stem cells: What lies beyond the paradigm shift. *Exp Biol Med*; 235:148-158.
- Donohoe, M. E., Zhang, L. F., Xu, N., Shi, Y. and Lee, J. T. (2007). Identification of a Ctfc cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. *Mol. Cell* 25: 43-56.
- Donohoe, M. E., Silva, S. S., Pinter, S. F., Xu, N. and Lee, J. T. (2009). The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctfc and also controls X-chromosome pairing and counting. *Nature* 460: 128-132.
- Egli, D., Chen, A.E., Saphier, G., Ichida, J., Fitzgerald, C., Go, K.J., Acevedo, N., Patel, J., Baetscher, M., Kearns, W.G. (2011). Reprogramming within hours following nuclear transfer into mouse but not human zygotes. *Nat. Commun.* 2: 488.
- Grinnell KL & Bickenbach JR (2007). Skin keratinocytes pre-treated with embryonic stem cell-conditioned medium or BMP4 can be directed to an alternative cell lineage. *Cell Prolif* 40:685-705.
- Gurdon, J.B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 10: 622–640.
- Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, Carey B, Beard C, Wernig M.(2008). Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency. *Cell* 133:250–264.
- Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH (2008). A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 10:353-360.
- Kane NK, Scott M, Denning C, Baker AH. (2008) Viral and non-viral gene delivery and its role in pluripotent stem cell engineering. *Drug Discov Today Tech.* 5:107–115.
- Kim J, Chu J, Shen X, Wang J, Orkin SH (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* 132:1049-1061.
- Paul S Knoepfler, Xiao-yong Zhang, Pei Feng Cheng, Philip R Gafken, Steven B McMahon, and Robert N Eisenman (2006). Myc influences global chromatin structure. *EMBO J* 25:2723-2734.
- Kriz W (2003). Progression of chronic renal failure in focal segmental glomerulosclerosis: consequence of podocyte damage or of tubulointerstitial fibrosis?. *Pediatr Nephrol* 18:617-622.
- Lagarkova M.A., Shutova M.V., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Glazov E.A., Zhang P., Rizvanov A.A., Chestkovl.V., Kiselev S.L. (2010). Induction of pluripotency in human endothelial cells resets epigenetic profile on genome scale. *Cell Cycle* 9: 937–946.
- Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D (2010). Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev* 24:368-380.
- Li Y, McClintick J, Zhong L, Edenberg HJ, Yoder MC, Chan RJ. (2005). Murine embryonic stem cell differentiation is promoted by SOX-3 and inhibited by the zinc transcription factor Klf4. *Blood* 105, 635-637.
- Lister R, Pelizzola M, Kida YS, Hawkins RD, Nery JR, Hon G, Antosiewicz-Bourget J, O'Malley R, Castanon R, Klugman S, Downes M, Yu R, Stewart R, Ren B, Thomson JA, Evans RM, Ecker JR (2011).

Hotspots of aberrant epigenomic reprogramming in human induced pluripotent stem cells. *Nature* 471: 68–73.

- Liu Y, Shen X, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. (2008). EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol. Cell.* 32: 491-502.

- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH (2006). The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* 38:201-212.

- Martin (1981). Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78:7634–7638.

- Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* 464:927–931.

- Medvedev, Elena V. Grigor'eva, Alexander I. Shevchenko, Anastasia A. Malakhova, Elena V. Dementyeva, Alexander A. Shilov, Evgeny A. Pokushalov, Alla M. Zaidman, Maria A. Aleksandrova, Egor Yu Plotnikov, Gennady T. Sukhikh, and Suren M. Zakian. Stem Cells and Development (2011). Human Induced Pluripotent Stem Cells Derived from Fetal Neural Stem Cells Successfully Undergo Directed Differentiation into Cartilage. *Stem. Cells Dev.* 20:1099–1112.

- Mezzano A, Sergio y AROS E, Claudio (2005). Enfermedad renal crónica: clasificación, mecanismos de progresión y estrategias de renoprotección. *Rev. méd. Chile* 133:338-348.

- Mikkelsen T.S., Hanna J., Zhang X., Ku M., Wernig M., Schorderet P., Bernstein B.E., Jaenisch R., Lander E.S., Meissner A. (2008). Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature.* 454: 49–55.

- Mundel P, Reiser J, Kriz W (1997). Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *Journal of American Society of Nephrology* 8:697 – 705.

- Navarro, P., Chambers, I., Karwacki-Neisius, V., Chureau, C., Morey, C., Rougeulle, C. and Avner, P. (2008). Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. *Science* 321, 1693-1695.

- Navarro, P., Oldfield, A., Legoupi, J., Festuccia, N., Dubois, A., Attia, M., Schoorlemmer, J., Rougeulle, C., Chambers, I. and Avner, P. (2010). Molecular coupling of Tsix regulation and pluripotency. *Nature* 468, 457-460.

- Nichols J, Zevnik B, Anastasiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95:379-391.

- Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H., Umezawa A. (2011). DNA Methylation Dynamics in Human Induced Pluripotent Stem Cells over Time. *PLoS Genet.* 7(5): e1002085.

- Niwa et al. (2000). Quantitative expression of Oct3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 24:372-6.
- Noggle, S., Fung, H.L., Gore, A., Martinez, H., Satriani, K.C., Prosser, R., Oum, K., Paull, D., Druckenmiller, S., Freeby, M., et al. (2011). Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state. *Nature* 478: 70–75.
- Seung-Ick Oh,¹ Chang Kyu Lee,¹ Kyung Jin Cho,¹ Kyung-Ok Lee,² Ssang-Goo Cho,³ and Sunghoi Hong¹ (2011). Technological Progress in Generation of induced Pluripotent stem cells for clinical applications. *The Scientific World Journal*. Article ID 417809, 10 pages.
- Okita K, Hong H, Takahashi K, Yamanaka S (2010). Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc* 3: 418-428.
- Osafune (2010). In vitro regeneration of kidney from pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research* 316: 2571–2577.
- Pan G., Tian S., Nie J., Yang C., Ruotti V., Wei H., Jonsdottir G.A., Stewart R., Thomson J.A. (2007). Whole-Genome Analysis of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Methylation in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem. Cell*. 1:299–312.
- Rao & Malik (2012). Assessing iPSC reprogramming methods for their suitability in translational medicine. *J. Cell Biochem*. 113:3061-3068.
- Sato Y, Wharram BL, Lee SK, Wickman L, Goyal M, Venkatareddy M, Chang JW, Wiggins JE, Lienczewski C, Kretzler M, Wiggins RC. (2009). Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:1041-1052.
- Sharov AA, Masui S, Sharova LV, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Xin L, Niwa H, Ko MS (2008). Identification of Pou5f1, Sox2 and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. *BMC Genomics* 9:269-288.
- Singh & Dalton (2009). The cell cycle and myc intersect with mechanisms that regulate the pluripotency and reprogramming. *Cell Stem Cell* 5:141-149.
- Solter, D. (2000). Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat. Rev. Genet.* 1:199–207.
- Song B, Niclis JC, Alikhan MA, Sakkal S, Sylvain A, Kerr PG, Laslett AL, Bernard CA, Ricardo SD. (2011). Generation of Induced Pluripotent Stem Cells from Human Kidney Mesangial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology* 7: 1213–1220.
- Bi Song, Jonathan C. Niclis, Maliha A. Alikhan, Samy Sakkal, Aude Sylvain, Peter G. Kerr, Andrew L. Laslett, Claude A. Bernard, and Sharon D. Ricardo (2012). The directed differentiation of human iPS cells into kidney podocytes. *PLoS ONE* 7(9): e46453.
- Stadtfeld M, Maherali N, Breault DT, Hochedlinger K. (2008). Defining molecular cornerstones during fibroblast to iPS cell reprogramming in mouse. *Cell Stem Cell* 2:230-240.
- Stadtfeld, Masaki Nagaya, Jochen Utikal, Gordon Weir, and Konrad Hochedlinger (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science* 322: 945-949.

- Stead E, White J, Faast R, Conn S, Goldstone S, Rathjen J, Dhingra U, Rathjen P, Walker D, Dalton S. (2002). Pluripotent cell division cycles are driven by ectopic Cdk2, cyclin A/E and E2F activities. *Oncogene* 21:8320–8333.
- Miyazaki S, Yamamoto H, Miyoshi N, Takahashi H, Suzuki Y, Haraguchi N, Ishii H, Doki Y, Mori M (2012). Emerging methods for preparing iPS cells. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 42: 773 – 779.
- Masahito Tachibana, Paula Amato, Michelle Sparman, Nuria Marti Gutierrez, Rebecca Tippner-Hedges, Hong Ma, Eunju Kang, Alimujiang Fulati, Hyo-Sang Lee, Hathaitip Sritanaudomchai, Keith Masterson, Janine Larson, Deborah Eaton, Karen Sadler-Fredd, David Battaglia, David Lee, Diana Wu, Jeffrey Jensen, Phillip Patton, Sumita Gokhale, Richard L. Stouffer, Don Wolf and Shoukhrat Mitalipov (2013). Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153:1-11.
- 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: 861–872.
- Takahashi, Ichisaka, Yamanaka (2006). Identification of genes involved in tumor-like properties of embryonic stem cells. *Methods in Molecular Biology* 329:449-458.
- Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R (2008). c-Myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 2:10–12.
- Wiggins RC (2007). The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular disease. *Kidney Int* 71: 1205-1214.
- Yamanaka *et al.* (2012). “De Novo kidney regeneration with stem cells”. Journal of biomedicine and biotechnology. ID: 453159.
- Yates & Chambers (2005). The homeodomain protein Nanog and pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Biochemical Society Transactions* 33: 1518-1521.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin I, Thomson JA (2007). Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318: 1917–1920.
- Zhao, Xiang Ji, Fangfang Zhang, Liang Li and Lan Ma (2012). Embryonic stem cell markers. *Molecules* 17: 6196-6236.
- Zhao, Xu Han, Joon Lin Chew, Jun Liu, Kuo Ping Chiu, Andre Choo, Yuriy L. Orlov, Wing-Kin Sung, Atif Shahab, Vladimir A. Kuznetsov, Guillaume Bourque, Steve Oh, Yijun Ruan, Huck-Hui Ng, and Chia-Lin We (2007). Whole Genome Mapping of Histone H3, Lys4 and 27 Trimethylations Reveals Distinct Genomic Compartments in Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem. Cell.* 1: 286–298.
- Zhao & Daley (2008). From fibroblasts to iPS cells: Induced pluripotency by defined factors. *Journal of Cellular Biochemistry* 105:949-955.

