



IPICYT

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Efecto de Fármacos Epigenéticos sobre la
Inducción de Genes de Pluripotencia en Células
Somáticas Humanas**

Tesis que presenta

Alain Jesús Aguirre Vázquez

Para obtener el grado de

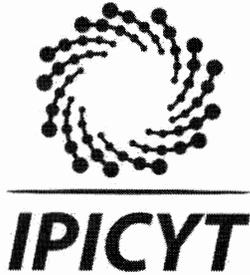
Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo

Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León

San Luis Potosí, S.L.P., Julio de 2017



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "***Efecto de Fármacos Epigenéticos sobre la Inducción de Genes de Pluripotencia en Células Somáticas Humanas***" presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alain Jesús Aguirre Vázquez** y aprobada el **once de julio de dos mil diecisiete** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Codirector de la tesis

Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León
Codirector de la tesis

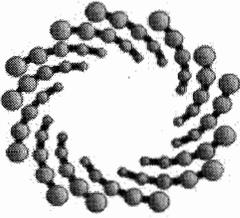
Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga
Miembro del Comité Tutoral



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biotecnología Médica y Pecuaria de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social. El manuscrito se redactó siguiendo las normas para autor de la revista *Archives of Medical Research* bajo la codirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y del Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. 588906) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 164 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 11 días del mes de julio del año 2017, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga	Presidente	IPICYT
Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León	Secretario	CIBIN- IMSS
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alain Jesús Aguirre Vázquez

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de Fármacos Epigenéticos sobre la Inducción de Genes de Pluripotencia en Células Somáticas Humanas

que se desarrolló bajo la dirección de

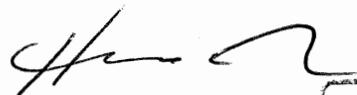
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León (CIBIN-IMSS)

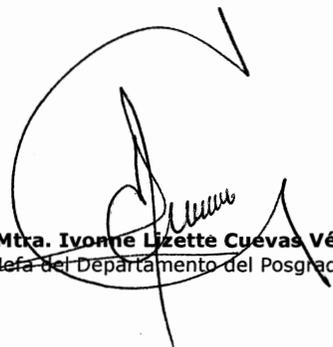
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:25 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 11 días del mes de julio de 2017.


Dr. Horacio Flores Zúñiga
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A mis padres y mis hermanos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por permitirme continuar con mi formación académica, a la Dra. Fabiola Castorena Torres por el apoyo en el análisis estadístico, al Dr. Fei Liu por la donación del *cDNA* de células pluripotentes y , por último, a mis directores de tesis Dr. Luis A. Salazar Olivo y Dr. Mario A. Bermúdez de León por la oportunidad y confianza que me han otorgado. Este proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/PRI0/16/058).

Contenido

Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos Institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
Introducción	2
Materiales y Métodos	5
Resultados	10
Discusión	14
Conclusión	17
Referencias	18
Leyenda de Figuras	22
Figuras	25
Material Suplementario	29

Resumen

Efecto de Fármacos Epigenéticos sobre la Inducción de Genes de Pluripotencia en Células Somáticas Humanas

La generación de células pluripotentes inducidas (*iPSCs*) por la expresión ectópica de los factores *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *KLF4*, *C-MYC*, *NANOG* y *LIN28* ha establecido oportunidades de implementar terapias en el área de medicina regenerativa. Sin embargo, su aplicación clínica está limitada por el uso de vectores virales. Por otro lado, existen fármacos capaces de modificar el epigenoma incrementando la plasticidad celular. El presente trabajo evaluó el efecto de los fármacos epigenéticos sobre la expresión de genes de pluripotencia en células somáticas humanas. Inicialmente, se realizó un ensayo de viabilidad para evaluar la citotoxicidad de los fármacos epigenéticos ácido valproico, hidralazina, talidomida, isotretinoína, ribavirina y azacitidina en una línea celular de fibroblastos dérmicos humanos. Posteriormente, se cultivaron las células humanas en presencia de los fármacos epigenéticos en conjunto con un cóctel de moléculas potenciadoras del proceso de reprogramación. Se comprobó que los fármacos epigenéticos individuales o combinados no causaron una disminución en la viabilidad de los fibroblastos humanos., aunque en combinación con el cóctel de moléculas el efecto citotóxico aumento drásticamente. A consecuencia de esto, se eligió la azacitidina, y el ácido valproico en conjunto con el cóctel de potenciadores de reprogramación con la finalidad de evaluar la expresión de los genes relacionados con la pluripotencia por RT-qPCR. La exposición de los fibroblastos humanos al ácido valproico, azacitidina junto con el cóctel de potenciadores de la reprogramación no fue suficiente para inducir cambios morfológicos, característicos de la transición mesenquimo-epitelio o la activación de los genes relacionados con la pluripotencia. Estos datos sugieren que la modificación de la estructura de la cromatina por el efecto del ácido valproico y azacitidina es solo una parte de una serie de eventos que deben realizarse para inducir la expresión de factores de pluripotencia

Palabras clave: pluripotencia inducida, fármacos epigenéticos, reprogramación de células somáticas.

Abstract

Analysis of pluripotency-related genes by the effect of epigenetic drugs in human somatic cells

Generation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) by ectopic expression of *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *KFL4*, *C-MYC*, *NANOG* and *LIN28* has established new opportunities in stem cell research, drug discovery and disease modeling. Nevertheless, genomic integration of viral vectors reduced their clinical applications. On the other hand, there are drugs that increase cell plasticity by modifying the epigenome, among them are valproic acid, hydralazine, thalidomide, isotretinoin, ribavirin and azacytidine. The aim of this study was to evaluate the effect of epigenetic drugs on the expression of pluripotency-related genes in human somatic cells. First, we performed a viability assay to assess the cytotoxicity of the epigenetic drugs in a human cell line. Afterwards, we cultured the human cells in presence of all the epigenetic drugs which we tested. Our results indicate a low cytotoxic effect by the presence of sole and combined epigenetic drugs, although not with the cocktail of reprogramming enhancers. Then, we chose valproic acid, azacytidine, and the cocktail of reprogramming enhancers in order to evaluate the expression of pluripotency-related genes by qPCR. Exposure of the human fibroblasts to valproic acid, azacytidine, and a cocktail of reprogramming enhancers was not enough to induce morphological changes, characteristic of the MET transition, or activation of the pluripotency-related genes. These data suggest, that the modification of the chromatin structure by the effect of valproic acid and azacytidine is only one part of a series of events that must be carried out to induce the expression of pluripotency factors.

Key words: epigenetic drugs, induced pluripotency, somatic cell reprogramming

Efecto de fármacos epigenéticos sobre la inducción de genes de pluripotencia en células somáticas humanas

Aguirre-Vázquez, Alain^{a,b}, Bermúdez de León, Mario^b, Salazar-Olivo, Luis^a

^a IPICYT, División de Biología Molecular, San Luis Potosí, México.

^b Departamento de Biología Molecular, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social, Monterrey, Nuevo León, México.

Introducción

La medicina regenerativa es un campo multidisciplinario de investigación y aplicaciones clínicas enfocado en la reparación, sustitución o regeneración de células, tejidos u órganos para restaurar funciones alteradas por defectos congénitos, envejecimiento, traumas y enfermedades. El uso de células con potencial de diferenciación a diversos linajes involucra el aislamiento y obtención de células troncales, su multiplicación en cultivo, su inducción a la diferenciación terminal o la potenciación de nuevas capacidades, diferenciar las células al tejido específico que se desea y finalmente trasplantarlas para el remplazo de células o tejidos dañados. Sin embargo, a pesar de los posibles beneficios terapéuticos que implica el uso de células troncales, como las células embrionarias, su uso conlleva a una serie de implicaciones éticas.

Takahashi y Yamanaka(1) reportaron el desarrollo de células pluripotentes humanas inducidas (*iPSCs*, *Induced Pluripotent Stem Cells*) por la expresión ectópica de los factores de transcripción *POU5F1* (*OCT4*), *SOX2*, *KLF4* y *c-MYC*. Este abordaje permitió generar cambios metabólicos, morfológicos y de expresión génica en las células somáticas confiriéndoles un estado de pluripotencia semejante al de las células embrionarias. Sin embargo, los vectores virales son capaces de integrarse de manera aleatoria al genoma de la célula hospedera y pueden causar transformación maligna(2,3). Por ello, se han buscado métodos alternativos para la obtención de *iPSCs* que omitan la incorporación de vectores integrativos(4–7). En años recientes, el uso de moléculas pequeñas capaces de modular diversas vías metabólicas, transformar la producción de energía de la célula y modificar el epigenoma han aumentado la eficiencia de reprogramación

hasta llegar a reemplazar por completo el uso de factores de reprogramación exógenos(8).

Una de las características más importantes durante el proceso de reprogramación son las modificaciones que sufre el epigenoma de las células. Se han reportado como efectores de cambios epigenéticos a los metales pesados, los plaguicidas, el humo de tabaco, virus, bacterias y algunos fármacos(9) a los que se les conoce como fármacos epigenéticos(10). Estos fármacos pueden alterar la homeostasis epigenética y epigenómica por mecanismos directos o indirectos(11). Por ejemplo, la hidralazina, fármaco usada para tratar la hipertensión y la insuficiencia cardíaca, y la azacitidina, fármaco utilizado para el tratamiento de la leucemia mieloide aguda, son capaces de inhibir directamente la metilación de DNA(12-13). El valproato de sodio, un fármaco indicado para tratar crisis de ausencia, causa hiperacetilación de las histonas H3 y H4 por inhibición directa de la actividad enzimática de las desacetilasas de histonas o HDACs(14). Por otro lado, se sabe que la talidomida, un potente teratógeno indicado inicialmente como sedante e hipnótico y que hoy se prescribe para casos de lepra, no tiene un efecto directo pero se sabe que puede interferir con la metilación del DNA y provocar una expresión genética aberrante(15). Un efecto indirecto de modificación epigenética también se ha observado en la isotretinoína, una isoforma del ácido retinoico y usada para tratar acné severo(11). Asimismo, la ribavirina, utilizada para el tratamiento de la hepatitis C, disminuye la metilación de la H3 por metil transferasas de histonas(16). Por consiguiente, el objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de los factores implicados en la generación de *iPSCs* en

cultivos de células somáticas humanas por efecto de los fármacos epigenéticos previamente descritos.

Materiales y Métodos

Fármacos

Los fármacos fueron adquiridos con Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y se manejaron de acuerdo a las especificaciones del proveedor. La hidralazina hidrociorada, sal sódica de ácido valproico y 5-aza-2 deoxicitidina (5-azadC) se resuspendieron en PBS 1x. La talidomida, ribavirina e isotretinoína se resuspendieron en DMSO. Los reactivos fueron almacenados a -20 °C hasta su uso.

Cultivo celular

Los fibroblastos dérmicos humanos primarios, obtenidos en la *American Tissue Culture Collection* (ATCC PCS-201-012), se cultivaron en DMEM/F12 adicionado con 2.5 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (Gibco, Carlsbad, CA, USA), 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina (Gibco). Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera a 37°C con 5% de CO₂. Los fármacos epigenéticos se ensayaron en este medio de cultivo a concentraciones de 10 µM de hidralazina, 1 mM de valproato de sodio, 10 µg/ml de talidomida, 10 µM de Isotretinoína, 0.5 µM de ribavirina y 2 µM de 5-azadC. Los cultivos en tratamiento se mantuvieron en una atmósfera a 37°C con 5% de CO₂ con cambio de medio cada 72 h.

Cultivo de fibroblastos humanos con valproato de sodio y 5-aza-2 desoxicitidina (5-azadC)

Se sembraron 4x10⁴ células en placas de 6 pozos en medio DMEM/F12 adicionado con 2.5 mM de L-glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de

estreptomycin. Posterior a las 48 h se retiró el medio estándar, se realizó un lavado con PBS 1x y se añadió el medio Etapa 1: DMEM/F12, 2.5 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 10% de *Knockout Serum Replacemnet* (Gibco), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 1 mM de valproato de sodio, 0.5 µM de 5-azadC, 5 µM de CHIR99021 (Sigma-Aldrich) y 50 µg/ml de ácido ascórbico (Sigma-Aldrich) con cambio de medio cada 48 h por un periodo de 15 días. Al día 10 de cultivo se aspiró el medio, se realizó un lavado con PBS y las células se tripsinizaron con 0.25% de Tripsina-EDTA a 37 °C por 4-6 min. Se añadieron 2 mL de medio Etapa 1 y las células se resuspendieron en el medio hasta obtener una suspensión celular homogénea. Las células se sembraron en placas de 6 pozos y 24 h después se les cambio el medio Etapa1. Posterior a 15 días de cultivo en medio Etapa 1 se cambió el medio a Etapa 2 formulado con: DMEM/F12, 2.5 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos no esenciales, 10% de *Knockout Serum Replacemnet*, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin, 1 mM de valproato de sodio, 0.5 µM de 5-azadC, 5 µM de CHIR99021, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 0.5 µM de A-83-01 (Sigma-Aldrich) y 25 ng/mL de bFGF (Invitrogen) con cambio de medio cada 48 h por un periodo de 15 días.

Determinación de concentraciones inocuas de los fármacos epigenéticos para fibroblastos dérmicos humanos

Para la evaluación de la viabilidad celular se sembraron 2×10^4 células por pozo en placas de 96 pozos. Luego de 24 h se agregaron los fármacos, individuales y combinados en un rango de concentraciones, y se analizó cada 24 h por un

periodo de 96 h la muerte celular mediante el kit *CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay* (Promega) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de los fibroblastos humanos se realizó con el reactivo TRIzol (Ambion) siguiendo las instrucciones del proveedor. Brevemente, se agregó 1 mL del reactivo TRIzol a los fibroblastos dérmicos humanos en cultivo, se incubó a temperatura ambiente por 10 min y se colectó el lisado celular en un microtubo de 1.5 mL. Posteriormente se añadieron 0.2 mL de cloroformo y se agito por inversión por 15 s. Las muestras se incubaron durante 2-3 min a temperatura ambiente y después se realizó la centrifugación a 12,000 × *g* por 15 min a 4 °C en una centrífuga refrigerada. Se recuperó la fase acuosa y el RNA total se precipitó con 0.5 mL de isopropanol absoluto, se centrifugó a 12,000 × *g* por 10 min a 4 °C y se realizó un lavado con etanol. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 7,500 × *g* por 5 min a 4 °C y el RNA total se resuspendió en 30 µL de agua libre de nucleasas (Invitrogen). La integridad del RNA se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed (Biotium®, Hayward, CA., USA). La concentración y pureza del RNA total se determinó por absorbancia a 260/280 nm en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Boston, MA, USA). Aquellas muestras con valores <1.7 de absorbancia en la relación 260/280nm o con posible degradación fueron descartadas.

Transcripción Reversa y ensayos de PCR cuantitativa (RT-qPCR)

La síntesis del DNA complementario (*cDNA*) se realizó con la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Brevemente, 1 µg de RNA junto con *random primers* y *dNTPs* (*deoxynucleotide*

triphosphates) fueron utilizados para preparar la mezcla 1, la cual se incubó a 65 °C por 5 min y se colocó en hielo. Posteriormente, la mezcla se preparó con *First Stand buffer*, *DTT* y *RNase OUT* (Invitrogen). la mezcla 2 se agregó a la mezcla 1 y se incubó a 37 °C por 2 min. Se agregó la transcriptasa reversa M-MLV (200 U/μL) al tubo de reacción, se incubó a 25 °C por 10 min, seguido de una incubación a 37 °C por 50 min; finalmente, se inactivó la enzima a 70 °C por 15 min. La funcionalidad del *cDNA* fue determinada por amplificación del gen 18S ribosomal (Tabla 1) por PCR punto final. La PCR cuantitativa (*qPCR*) se realizó con *primers* y sondas TaqMan (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) para los genes *POU5F1 (OCT4)*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *LIN28*, *NANOG*, *S100A4* y *FBX15* en un sistema Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). La reacción de *qPCR* se llevó a cabo en un volumen de 20 μL con 10 μL de TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 μL primers/sonda, 2 μL de cDNA y 7 μL de agua libre de nucleasas. La amplificación de las muestras se llevó a cabo en condiciones estándar con una incubación inicial a 50 °C por 2 min, seguido de 95 °C por 10 min, y después por 40 ciclos a 95 °C por 15 s y 60 °C por 1 min. Se estableció el rango dinámico de amplificación con diluciones seriadas de 1:16 a 1:1024. Se realizaron triplicados técnicos de las muestras a la dilución 1:128. Como control endógeno se realizó el análisis en paralelo con las muestras de expresión del gen *GAPDH* (Applied Biosystems). Los resultados obtenidos fueron procesados utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ (17).

Análisis estadístico

Para determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos en la PCR cuantitativa, se llevó a cabo un análisis de la prueba no paramétrica de Mann-

Whitney. Los promedios de cada grupo fueron comparados y se tomó el criterio de significación aquellos con valores $P < 0.05$.

Resultados

Con la intención de verificar que las dosis utilizadas de fármacos epigenéticos no generaran un alto porcentaje de muerte celular, se realizaron curvas dosis respuesta para los seis fármacos por un periodo de 96 h. Se observó que el tratamiento individual de los fármacos epigenéticos no indujo una disminución en la viabilidad celular mayor al 30% (Figura 1a). Después los fibroblastos humanos fueron cultivados en combinación con los seis fármacos epigenéticos, y se comprobó que las dosis seleccionadas no alteraron significativamente la viabilidad de los fibroblastos humanos con respecto a los controles utilizados (Figura 1b).

Con la finalidad de generar cambios morfológicos característicos del proceso de reprogramación (18), se realizó un cultivo continuo por 40 días en combinación con los seis fármacos epigenéticos. Posterior al periodo establecido, se observó un cambio en la morfología de los fibroblastos humanos al presentar una estructura más ordenada con respecto al control, así como una disminución en el porcentaje de confluencia en comparación al control (Figura 1c y 1d). Además, se observó la aparición de cuerpos celulares no definidos anclados a los fibroblastos humanos. Por último, se observó la formación elevaciones celulares a consecuencia del alto porcentaje de confluencia en los controles. A pesar de los cambios morfológicos observados, el tratamiento combinado de los fármacos epigenéticos no indujo una morfología característica de la transición mesenquimo-epitelio. Por esta razón fue necesario modificar las condiciones de cultivo a unas similares a las establecidas para el cultivo de células pluripotentes; además se utilizaron otras moléculas (*i.e.*, CHIR99021 y A-83-01) que favorecen el proceso de reprogramación. Sin embargo, debido a la formulación del nuevo medio de

cultivo la viabilidad celular de los fibroblastos humanos se disminuyó drásticamente posteriori a las 96 h (datos no mostrados). Por esta razón, se decidió utilizar un medio de cultivo suplementado con moléculas potenciadoras de la reprogramación junto con los fármacos valproato de sodio y 5-azadC, debido a que su mecanismo está mejor descrito en la literatura en comparación con los otros fármacos. Esto con la finalidad de inducir la expresión de los genes de pluripotencia sin afectar la viabilidad celular.

Se diseñó una estrategia experimental de dos etapas por un periodo de 30 días (Figura 2a) para el tratamiento de los fibroblastos humanos con los fármacos valproato de sodio y 5-azadC en conjunto con el inhibidor de la glucógeno sintasa quinasa 3 beta (*GSK3β*), CHIR99021, y el inhibidor del factor de crecimiento transformante beta (*TGFβ*), A-83-01. El medio de cultivo para cada etapa y el medio estándar control se formularon como se describe en los materiales y métodos. Durante el tratamiento en medio etapa 1 se observó una disminución en el porcentaje de confluencia en relación al control (Figura 2b y 2c), sin embargo, la viabilidad de los fibroblastos en tratamiento no fue afectada. Posteriormente, durante el tratamiento con el medio etapa 2, al agregar el A83-01 (inhibidor del *TGFβ*) se observó un aumento en la proliferación celular lo que indujo la aparición de elevaciones celulares similares al control (Figura 3d y 3e). Por último, al finalizar cada etapa se realizó la extracción de RNA total (Figura 3a), se sintetizó el *cDNA* y se verificó su funcionalidad mediante la amplificación del gen ribosomal 18S (Figura 3b).

Con la intención de verificar que los datos obtenidos en la PCR cuantitativa fueron confiables se determinó la eficiencia de amplificación de los genes de interés. A

excepción del gen *FBX15*, se obtuvo una pendiente de $-3.3 \pm 10\%$ para los genes a evaluar (Fig. S1). Posteriormente, se validó dicha eficiencia de amplificación con respecto al control endógeno (*GAPDH*). Se obtuvo una pendiente >-0.1 y <0.1 para los genes de interés (Fig. S2). Con esto se verifica que el ensayo se realizó correctamente.

Después de los tratamientos, se evaluó la expresión de los genes relacionados con pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*, *LIN28*, *NANOG* y el gen específico de fibroblastos, *S100A4* (Figura 4). Se intentó evaluar la expresión del gen específico de células embrionarias, *FBX15*, sin embargo, no fue posible debido a la escasez del transcrito. Además, se utilizó como referencia un cultivo subconfluyente de fibroblastos dérmicos humanos (*HDF*) y de células pluripotentes inducidas (*iPSCs*). En el ensayo de PCR cuantitativa se observó un aumento en la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2* y *S100A4* en los fibroblastos humanos cultivados en medio Etapa 1. A diferencia de los dos primeros, este incremento fue significativo para *S100A4* ($P < 0.05$). Por otro lado, la expresión de *KLF4* en el medio Etapa 1 se vio disminuida de manera significativa ($P < 0.01$). Posteriormente, al añadir el inhibidor del *TGF β* (A-83-01) y bFGF, lo cual indica el inicio de la segunda etapa, *OCT4* y *SOX2* mantuvieron una expresión similar a la observada en la primera etapa. Curiosamente, la expresión de *KLF4* tuvo un incremento significativo ($P < 0.05$) en comparación a lo observado con el medio Etapa 1, lo que ocasionó una marcada diferencia con el control y la primera etapa. Asimismo, *S100A4* mantuvo una mayor expresión con respecto al control ($P < 0.001$) y también tuvo un aumento en comparación al primer tratamiento ($P < 0.05$). Por otra parte, se observó una hipervariabilidad en la expresión de *c-MYC* y

NANOG (Fig. S3), lo que dificultó su análisis. Por último, la expresión de *LIN28* no fue detectada en los fibroblastos humanos en condiciones estándar ni en los tratamientos formulados.

Discusión

Al analizar la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2*, *cMYC*, *KLF4*, *NANOG* y *S100A4* en los cultivos control y con los medios E1 y E2 es evidente la disminución de la expresión de los marcadores de pluripotencia en comparación con la referencia del cultivo de fibroblastos dérmicos humanos subconfluentes. Esta disminución en la expresión en ambas condiciones de cultivo se atribuye a un alto porcentaje de confluencia que presentaban las células durante el periodo de los tratamientos. Además, se ha reportado el silenciamiento progresivo de genes relacionados con pluripotencia por acción de proteínas remodeladoras de la cromatina durante el proceso de diferenciación celular(19). Esto sugiere que al tener un alto porcentaje de confluencia las células entran en un estado quiescente que reprime la expresión de genes no asociados al linaje celular original. Esto se observó con el marcador específico de fibroblastos *S100A4*, que mantuvo una expresión similar a los fibroblastos subconfluentes.

A pesar de lo previamente mencionado, los genes *OCT4* y *SOX2*, esenciales para la generación de *iPSCs*, mantuvieron una mayor expresión en los fibroblastos cultivados con los medios E1 y E2 en comparación con los controles lo cual indica que la combinación de los fármacos valproato de sodio y 5-azadC, en conjunto con los componentes del medio, evitan que los factores de pluripotencia sean completamente silenciados. Esto podría deberse a la capacidad de los fármacos valproato de sodio y 5-azadC en mantener abierta la estructura de la cromatina evitando su compactación. Marchion y colaboradores(20) reportaron que el ácido valpróico induce la descondensación de la cromatina al inducir la acetilación de las histonas 3 y 4, lo que promueve una mayor interacción del DNA con agentes

intercalantes. Asimismo, la 5-azadC induce la desmetilación de islas CpG en regiones promotoras lo que disminuye la ocupación de nucleosomas en el DNA, provoca un aumento en la marca epigenética H3K4me3 y prioriza el uso de la histona H2A.Z relacionada con la activación génica(21).

Por otro lado, la hipervariabilidad en la expresión génica de *c-MYC* y *NANOG* en cultivos tratados bajo las mismas condiciones se atribuye al “ruido” en la expresión génica causado por fluctuaciones aleatorias en la producción del *mRNA* y proteínas(22) lo que provoca una marcada heterogeneidad entre cultivos. De igual manera, Kumar y colaboradores(23) reportaron que *c-Myc* y *Nanog*, en células embrionarias de ratón, son genes con fluctuaciones lentas lo que aumenta la heterogeneidad de su expresión entre colonias al mostrar respuestas variadas a estímulos externos, a diferencia de genes con fluctuaciones de expresión rápidas (e.g., *Oct4* y *Sox2*). Además, la variabilidad celular puede ser causada por una “memoria celular”, dependiente del ciclo celular, que ocasiona el comportamiento inusual de un conjunto celular dentro de una población(24). Esto podría indicar que el efecto de los fármacos epigénicos y de los componentes de los medios E1 y E2 provocó cambios en un sector de la población celular el cual a consecuencia del alto porcentaje de confluencia no fue capaz de proliferar.

Posteriormente, se ha reportado que *KLF4* y *S100A4* tienen roles antagónicos al inducir la expresión de genes epiteliales(25) y mantener el linaje mesenquimal(26), respectivamente, por lo que se esperaba que la expresión de *KLF4* aumentara al inhibir la acción del *TGFβ* y que *S100A4* se redujera, sin embargo, la inhibición del *TGFβ* durante la segunda etapa del tratamiento provocó el aumento en la proliferación celular y una mayor expresión de *KLF4* y *S100A4*. Igualmente, en un

modelo *in vivo* la inhibición de la ruta del $TGF\beta$ induce la proliferación de fibroblastos S100A4+, lo cual promueve su interacción con células tumorales lo que ocasiona la invasión a otros tejidos(27). Esto indica que al inhibir el $TGF\beta$ las células podrían transformarse en “fibroblastos activados” caracterizados por un aumento en la proliferación celular y una mayor secreción de proteínas de la matriz extracelular(26), esto último se ve reflejado en la aparición de fibras entre las células tratadas.

Por último, la mecano-transducción de señales provenientes de la matriz extracelular hacia la envoltura nuclear tienen un rol crucial en la regulación génica(28). Interesantemente, el grado de tensión celular atribuido a la rigidez del sustrato ocasiona un proceso de diferenciación a diversos linajes celulares a consecuencia de un aumento en la expresión de miosinas no musculares II (*NM-II*)(29). Además, la inhibición de *NM-II* en células embrionarias humanas induce un aumento de colonias *OCT4+* y *NANOG+*(30). Lo anterior indica, que al cultivar los fibroblastos humanos sobre un sustrato rígido la mecano-transducción de señales fue un obstáculo para la inducción de los factores de pluripotencia, aunado a que una mayor rigidez del sustrato favorece la expresión de genes mesenquimales (31), esto pudo ocasionar la constante expresión de *S100A4* y la nula expresión de *LIN28*.

Conclusión

En conclusión, los fármacos epigenéticos en conjunto con las moléculas potenciadoras de la reprogramación provocaron la muerte celular de los fibroblastos dérmicos humanos. Sin embargo, el uso de valproato de sodio y 5-azadC provocaron cambios en la estructura de la cromatina los cuales no son suficientes para inducir la expresión de los factores implicados en la generación de *iPSCs*. No obstante, la modificación en las marcas epigenéticas, que provocan alteraciones en la arquitectura del genoma, son solo parte de una serie de eventos que se deben llevar a cabo para inducir la expresión de los factores de pluripotencia y dar origen a las *iPSCs*. Por esta razón, es necesario combinar el efecto de los fármacos epigenéticos en un cultivo celular en proliferación constante con un microambiente favorable para generar una plasticidad celular que nos permita inducir la expresión de los factores esenciales en el proceso de reprogramación.

Referencias

1. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131:861–72.
2. El Khatib MM, Ohmine S, Jacobus EJ, Tonne JM, Morsy SG, Holditch SJ, et al. Tumor-Free Transplantation of Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cell Progeny for Customized Islet Regeneration. *Stem Cell Transl Med*. 2016;5:694–702.
3. Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011;8(5):409–12.
4. Diecke S, Lu J, Lee J, Termglinchan V, Kooreman NG, Burrridge PW, et al. Novel codon-optimized mini-intronic plasmid for efficient, inexpensive, and xeno-free induction of pluripotency. *Sci Rep [Internet]*. 2015;5:8081.
5. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequence. *Science (80-)*. 2009;324(June):797–802.
6. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell*. 2010;7(5):618–30.
7. Zhou H, Wu S, Young Joo J, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*. 2009;4:381–4.
8. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science (80-) [Internet]*. 2013;341(6146):651–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23868920>
9. Weinhold B. Epigenetics: the science of change. *Environ Heal Perspect*. 2006;114(3):160–7.
10. Hassler MR, Schiefer A-I, Egger G. Combating the epigenome: epigenetic drugs against non-Hodgkin's lymphoma. *Epigenomics*. 2013;5(4):397–415.

11. Csoka AB, Szyf M. Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses* [Internet]. Elsevier Ltd; 2009;73(5):770–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2008.10.039>
12. Kao Y-H, Cheng C-C, Chen Y-C, Chung C-C, Lee T-I, Chen S-A, et al. Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Lab Invest* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;91(9):1291–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/labinvest.2011.92>
13. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation : mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002;21:5483–95.
14. Duenas-Gonzalez A, Coronel J, Cetina L, Gonzalez-Fierro A, Chavez-Blanco A, Taja-Chayeb L. Hydralazine-valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2014;10(10):1433–44.
15. Fard AD, Kaviani S, Noruzinia M, Soleimani M, Abroun S, Chegeni R, et al. Evaluation of H3 histone methylation and colony formation in erythroid progenitors treated with thalidomide and sodium butyrate. *Lab Hematol* [Internet]. 2013;19(1):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23538327>
16. De La Cruz-Hernandez E, Medina-Franco JL, Trujillo J, Chavez-Blanco A, Dominguez-Gomez G, Perez-Cardenas E, et al. Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncol Rep*. 2015;33(5):2384–92.
17. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* [Internet]. 2001 Dec [cited 2014 Jul 9];25(4):402–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>
18. Li R, Liang J, Ni S, Zhou T, Qing X, Li H, et al. A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2010;7(1):51–63.

19. Mattout A, Cagianca DS, Gasser SM. Chromatin states and nuclear organization in development — a view from the nuclear lamina. *Genome Biol* [Internet]. *Genome Biology*; 2015;1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13059-015-0747-5>
20. Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN. Valproic Acid Alters Chromatin Structure by Regulation of Chromatin Modulation Proteins. *Cancer Res.* 2005;65(9):3815–23.
21. Yang X, Noushmehr H, Han H, Andreu-vieyra C, Liang G. Gene Reactivation by 5-Aza-2'-Deoxycytidine – Induced Demethylation Requires SRCAP – Mediated H2A . Z Insertion to Establish Nucleosome Depleted Regions. *PLoS Genet.* 2012;8(3).
22. Sanchez A, Golding I. Genetic Determinants and Cellular Constraints in Noisy Gene Expression. *Science (80-)*. 2013;342:1188–93.
23. Kumar RM, Cahan P, Shalek AK, Satija R, Daleykeyser A, Li H, et al. Deconstructing transcriptional heterogeneity in pluripotent stem cells. *Nature.* 2014;516:56–61.
24. Sigal A, Milo R, Cohen A, Geva-zatorsky N, Klein Y, Liron Y, et al. Variability and memory of protein levels in human cells. *Nature.* 2006;444:28–31.
25. Tiwari N, Meyer-schaller N, Arnold P, Antoniadis H, Pachkov M, Van E, et al. Klf4 Is a Transcriptional Regulator of Genes Critical for EMT, Including Jnk1 (Mapk8). *PLoS One.* 2013;8(2).
26. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006;6:392–401.
27. Cheng N, Bhowmick NA, Chytil A, Gorksa AE, Brown KA, Muraoka R, et al. Loss of TGF- β type II receptor in fibroblasts promotes mammary carcinoma growth and invasion through upregulation of TGF- α , MSP- and HGF-mediated signaling networks. *Oncogene.* 2005;24:5053–68.
28. Wang N, Tytell JD, Ingber DE. Mechanotransduction at a distance: mechanically coupling the extracellular matrix with the nucleus. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009;10:75–82.
29. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix Elasticity Directs Stem

Cell Lineage Specification. *Cell*. 2006;126:677–89.

30. Walker A, Su H, Conti MA, Harb N, Adelstein RS, Sato N. Non-muscle myosin II regulates survival threshold of pluripotent stem cells. *Nat Commun* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;1:1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1074>
31. Chaudhuri O, Koshy ST, Branco C, Shin J, Verbeke CS, Allison KH, et al. Extracellular matrix stiffness and composition jointly regulate the induction of malignant phenotypes in mammary epithelium. *Nat Mater*. 2014;13:970–8.

Tablas

Tabla 1. *Primers* utilizados en este estudio para los ensayos de PCR.

Gen	Primers (5'-3')
r18S - PCR punto final	F - GTT AAT TCC AGC TCC AAT AGC GTA R - GAA CTA CGA CGG TAT CTG ATC GTC
OCT4 - PCR tiempo real	ID Hs04260367_gH (Applied Biosystems)
SOX2 - PCR tiempo real	ID Hs00602736_s1 (Applied Biosystems)
cMYC - PCR tiempo real	ID Hs00153408_m1 (Applied Biosystems)
KLF4 - PCR tiempo real	ID Hs00358836_m1 (Applied Biosystems)
NANOG - PCR tiempo real	ID Hs02387400_g1 (Applied Biosystems)
LIN28 - PCR tiempo real	ID Hs01013729_m1 (Applied Biosystems)
FBX15 - PCR tiempo real	ID Hs01080238_m1 (Applied Biosystems)
S100A4 - PCR tiempo real	ID Hs00243202_m1 (Applied Biosystems)

Leyenda de Figuras

Fig. 1. Evaluación de la citotoxicidad de los fármacos epigenéticos y su efecto sobre la estructura celular de fibroblastos dérmicos humanos. La citotoxicidad de distintas concentraciones de cada fármaco (a) o de su aplicación combinada (b) (HVTIRA; 10 μ M de hidralazina, 1 mM de valproato de sodio, 10 μ g/ml de talidomida, 10 μ M de Isotretinoinda, 0.5 μ M de ribavirina y 2 μ M de 5-azadC) se determinó a los tiempos indicados mediante ensayo flúorométrico de reducción del reactivo resazurina. Como control negativo de citotoxicidad se usó medio basal con DMSO al 0.1% y como control positivo medio basal con H₂O₂ al 100 μ M. (c) Fibroblastos dérmicos humanos se mantuvieron por 40 d en medio basal o (d) medio basal suplementado con la mezcla de fármacos epigenéticos. Las flechas muestran la aparición de los cuerpos celulares no definidos y las cabezas de flecha zonas de sobrecrecimiento celular.

Fig. 2. Cultivo de fibroblastos humanos con valproato de sodio y 5-azadC. a) Estrategia experimental del tratamiento de los fibroblastos humanos con los fármacos valproato de sodio y 5-azadC. b) Cultivo control de fibroblastos dérmicos humanos en la Etapa 1; c) Cultivo de fibroblastos humanos en medio Etapa 1. d) Cultivo control de fibroblastos dérmicos humanos en la Etapa 2; e) Cultivo de fibroblastos humanos en medio Etapa 2.

Fig. 3. Extracción de RNA total y determinación de la funcionalidad del cDNA de fibroblastos dérmicos humanos al finalizar la etapa 1 y la etapa 2. a) Se

comprobó la integridad de las muestras al observar la presencia de las subunidades 28S y 18S ribosomal en un gel de agarosa al 1 %. b) Se comprobó la funcionalidad del cDNA por amplificación del gen 18S ribosomal al observar el producto amplificado esperado de 450 pb. C1-C3 y Tx1-Tx3 representan tres experimentos independientes de las muestras control. MPM, marcador de peso molecular; Neg, control negativo; Pos, control positivo; Tx, tratamientos; C, control; E1, etapa 1; E2, etapa 2.

Fig. 4. Análisis de expresión de los fibroblastos humanos en medio Etapa 1 y Etapa 2. Se analizó la expresión de los genes asociados a pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC*, *KLF4*, *LIN28* y *NANOG* y el marcador de fibroblastos *S100A4*. El gen *GAPDH* se utilizó como control endógeno para normalizar los datos y los valores están expresados en unidades relativas (UR). HDF, fibroblastos dérmicos humanos subconfluentes; Ctrl-E1, control etapa 1; Tx-E1, tratamiento etapa 1; Ctrl-E2, control etapa 2; Tx-E2, tratamiento etapa 2. ***, $P < 0.001$; **, $P < 0.01$; * $P < 0.05$. Los replicados biológicos están representados en el material suplementario (Fig. S3).

Figuras

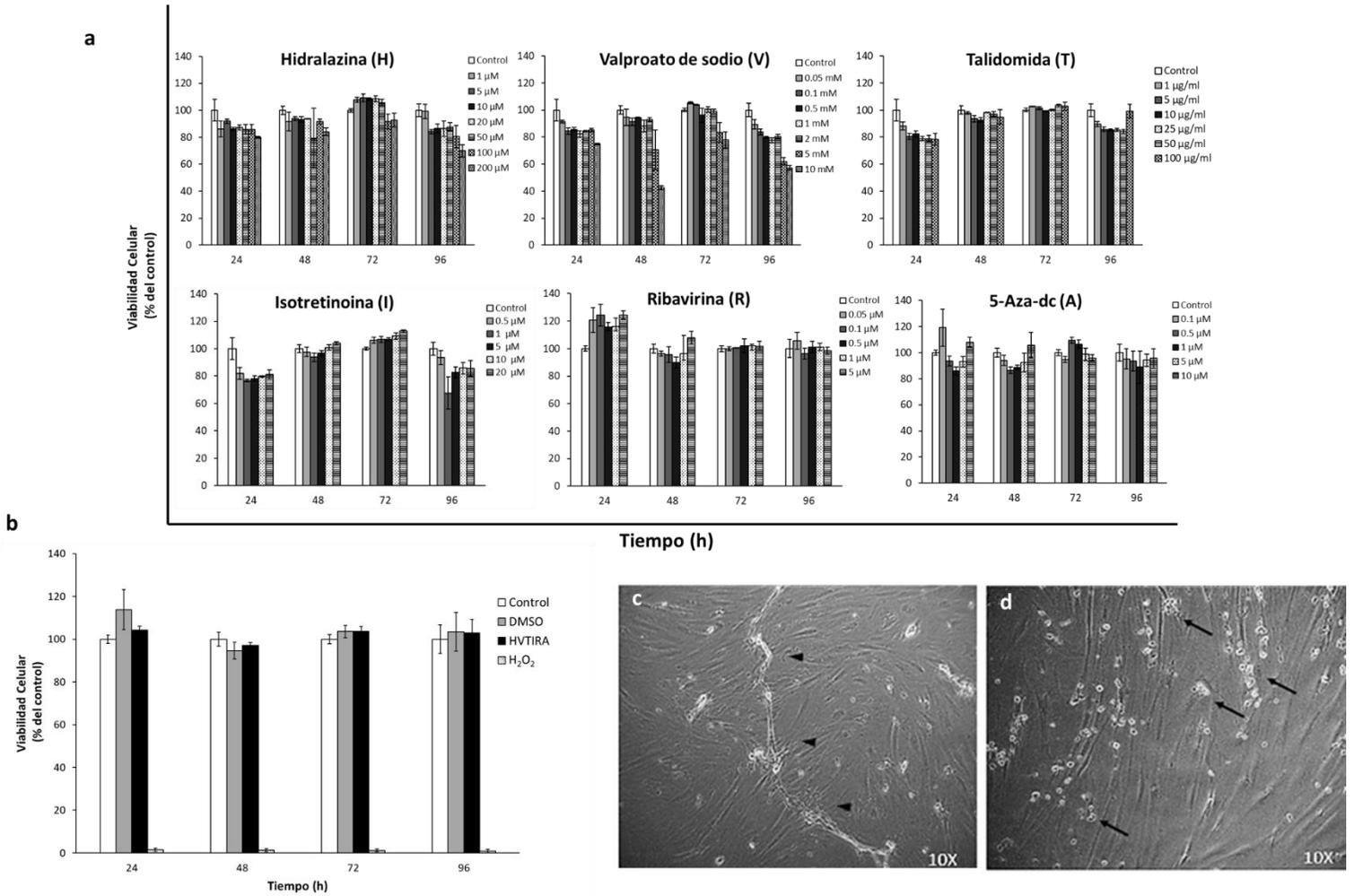


Figura 1

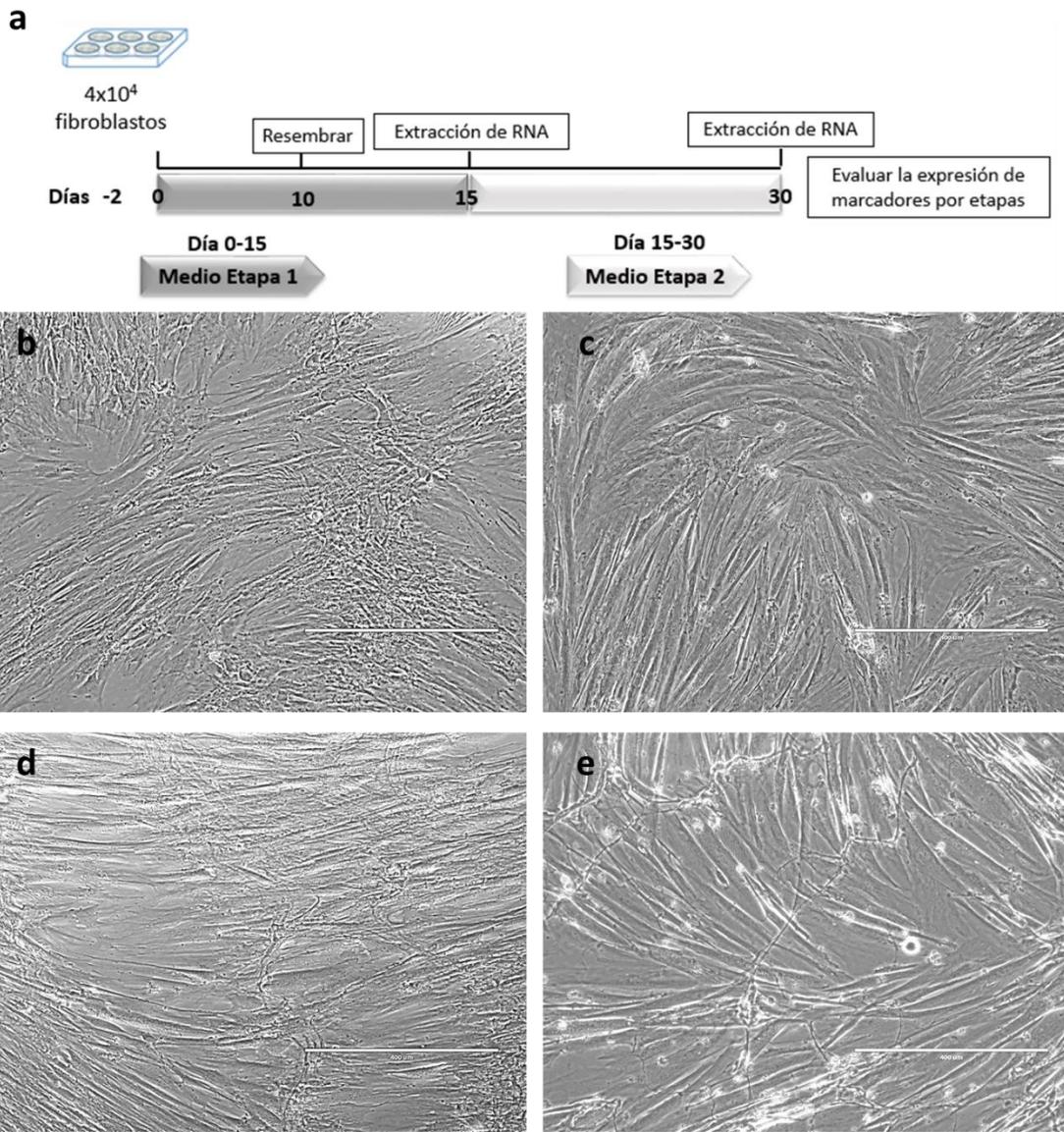


Figura 2

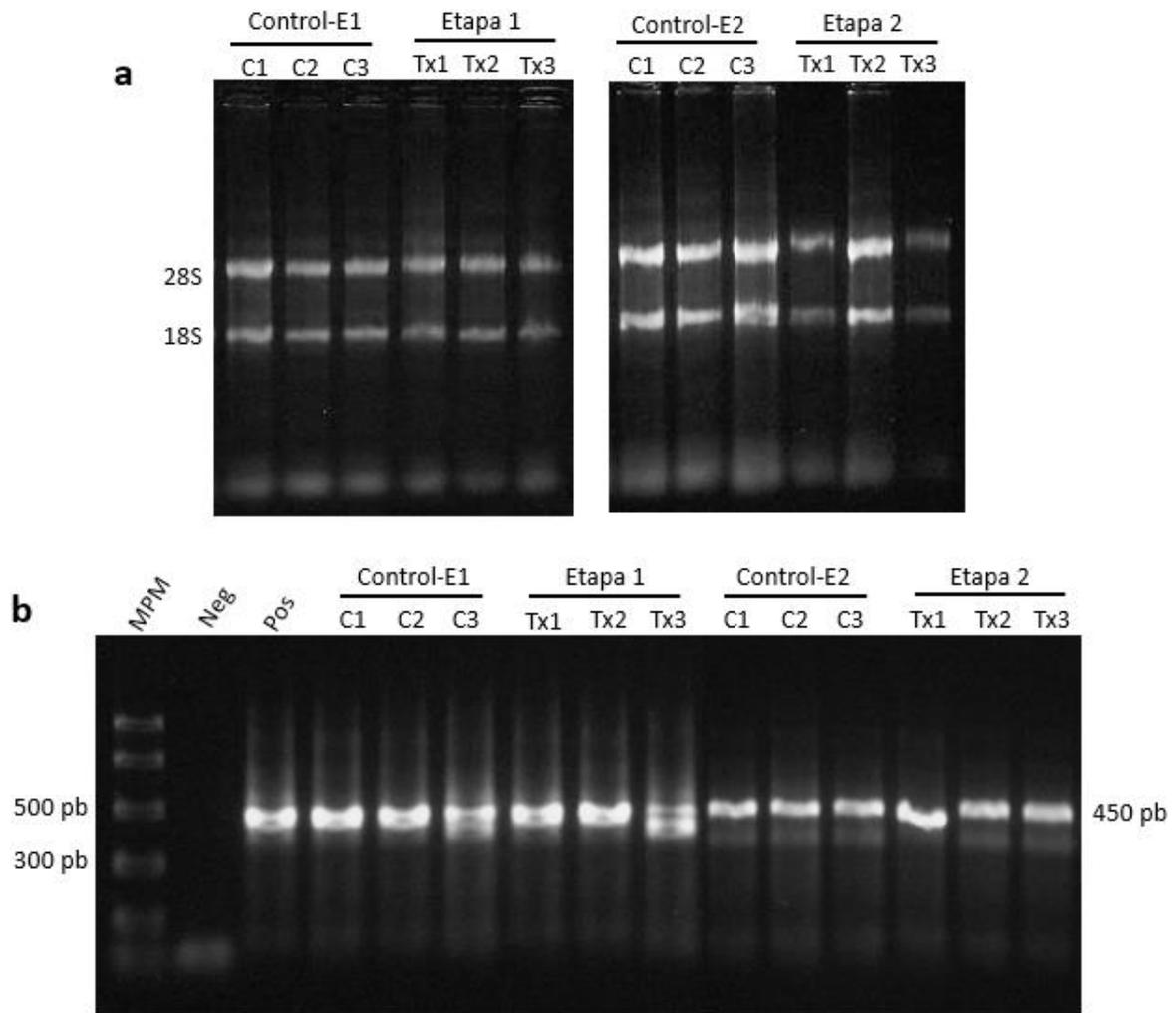


Figura 3

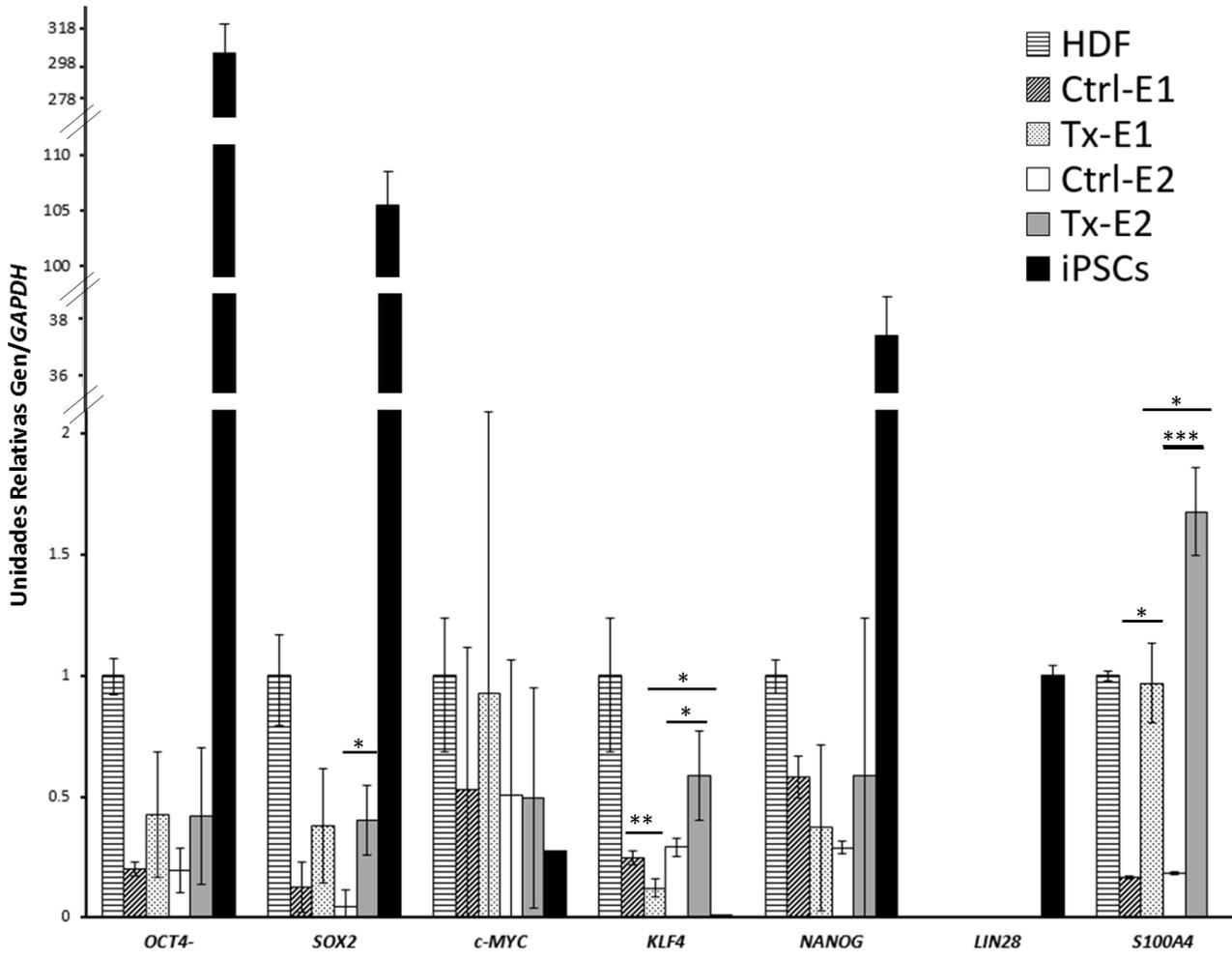


Figura 4

Material Suplementario

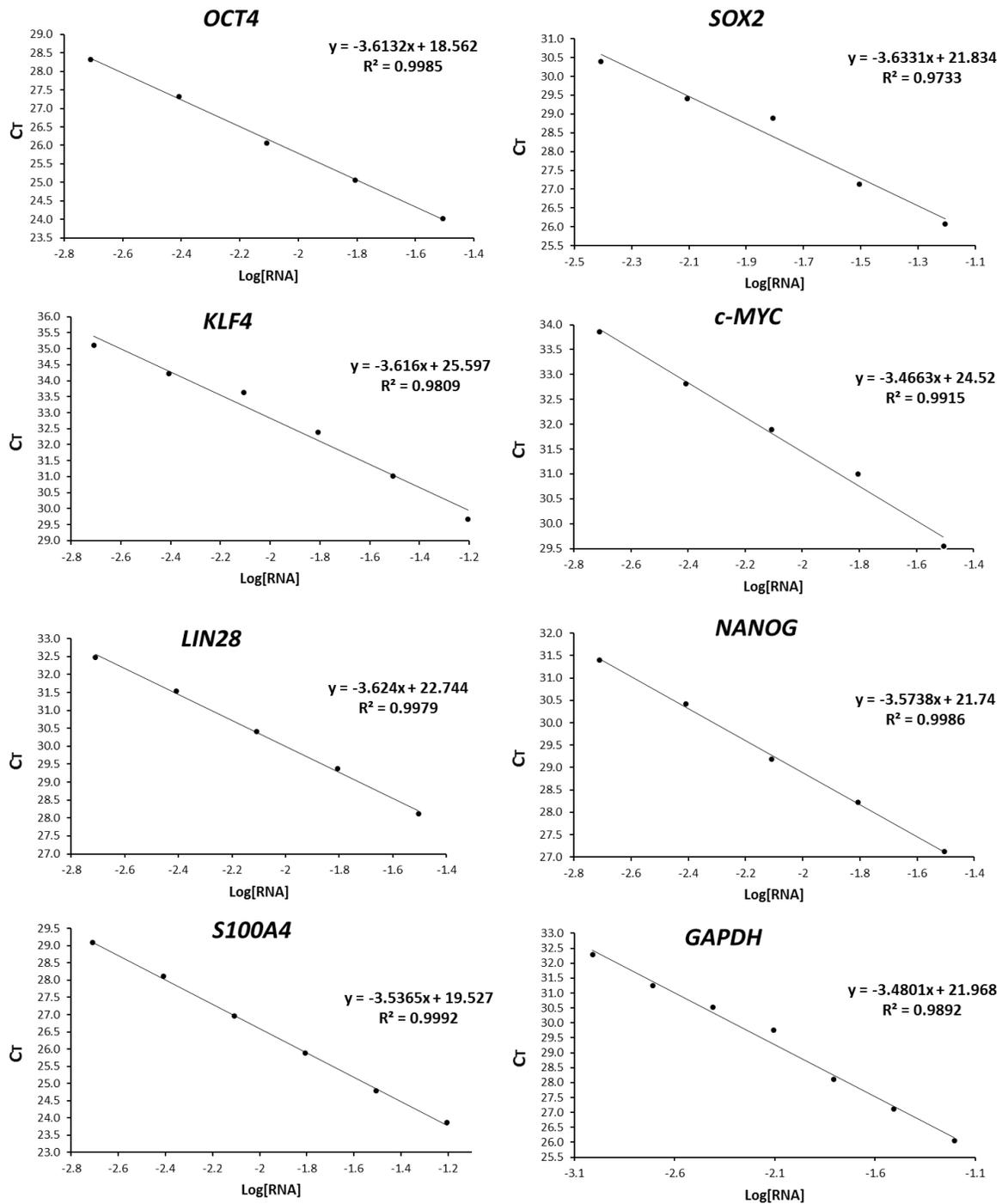


Fig. S1. Evaluación de la eficiencia de amplificación de los genes *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC*, *KLF4*, *LIN28*, *NANOG*, *S100A4* y *GAPDH*. El eje de las ordenadas muestra los valores de C_t con respecto al eje de las abscisas que

corresponden a las diluciones utilizadas escala logarítmica ($\text{Log}[\text{RNA}]$). Se muestra la ecuación de la pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2).

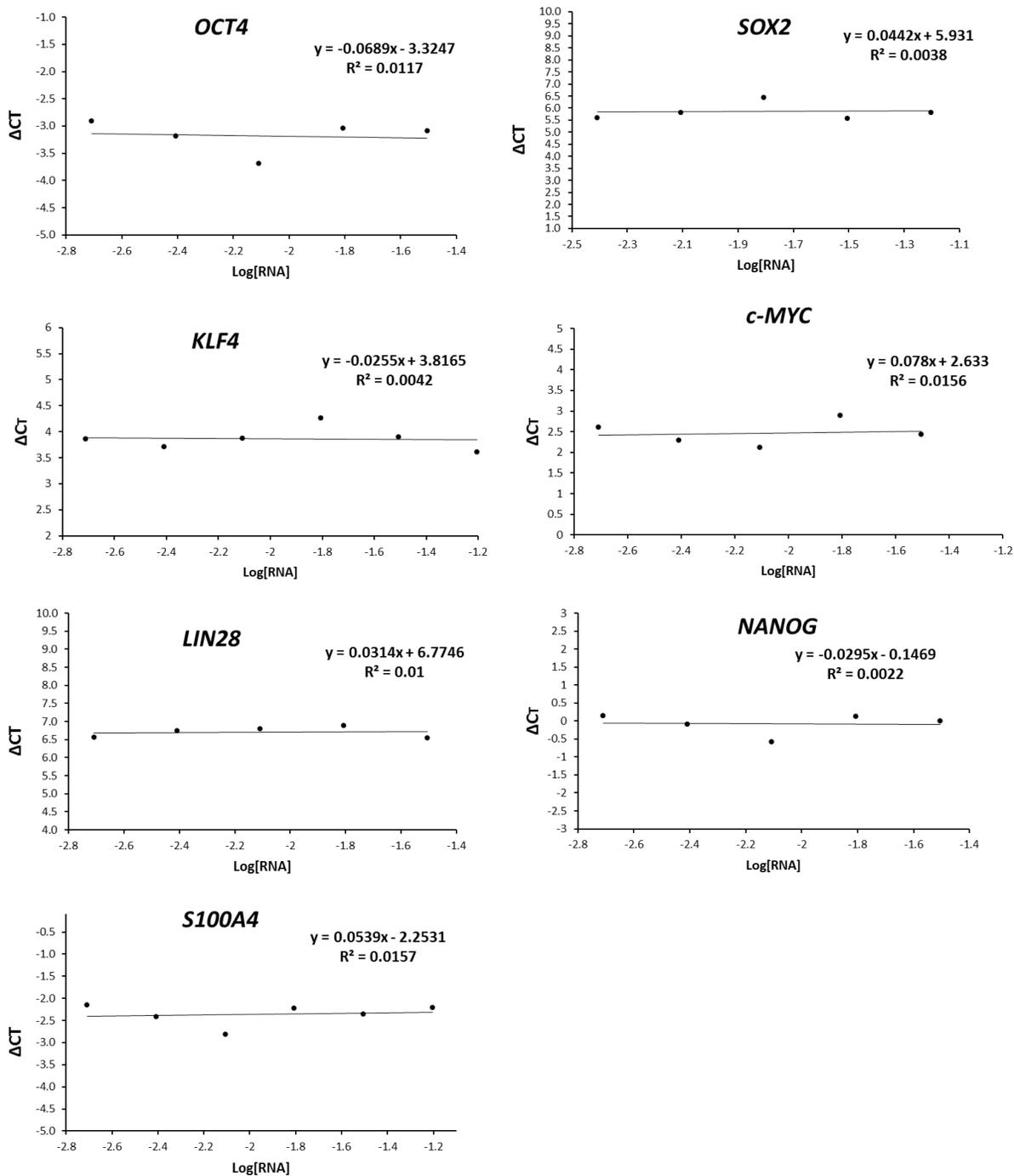
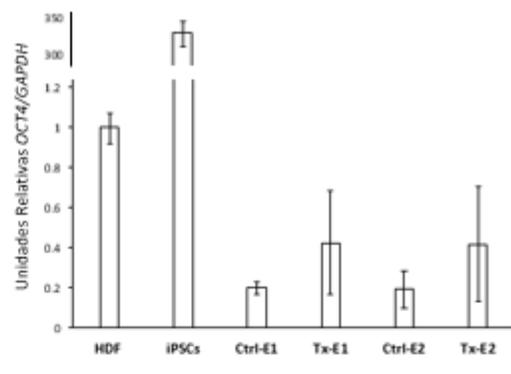
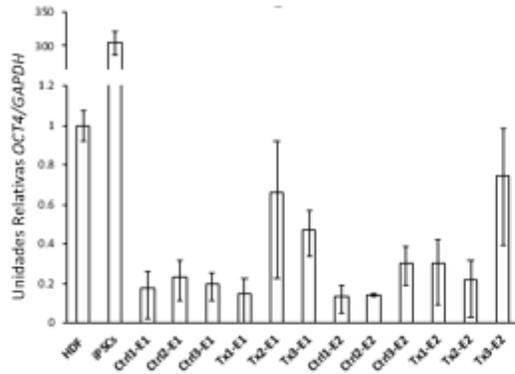
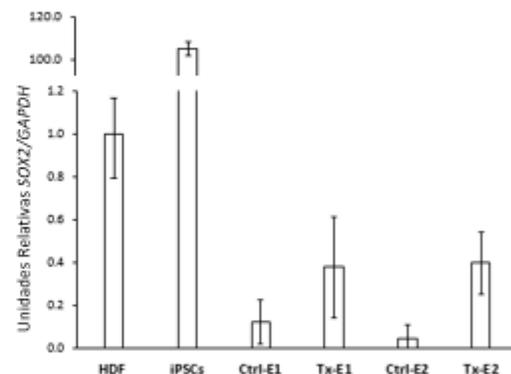
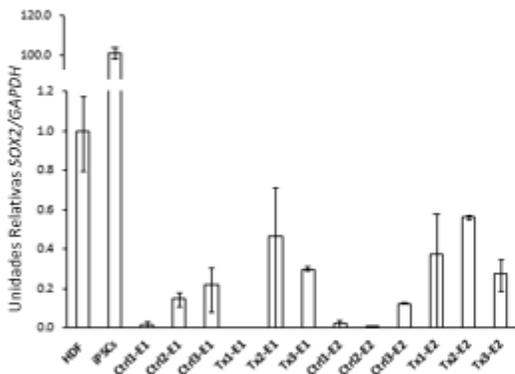
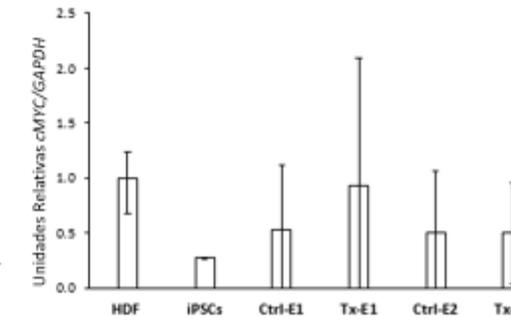
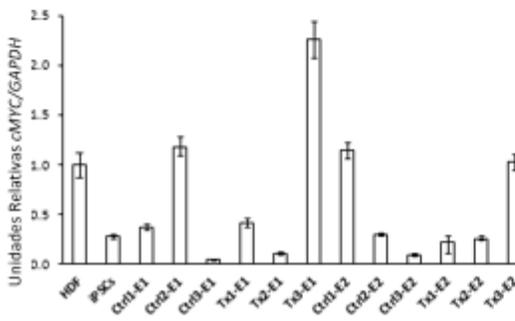
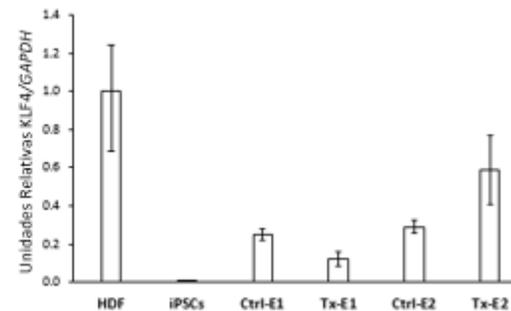
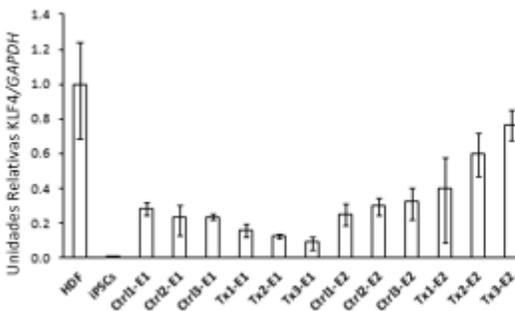


Fig. S2. Evaluación de la eficiencia de amplificación de los genes *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC*, *KLF4*, *LIN28*, *NANOG* y *S100A4* en relación al gen *GAPDH*. El eje de las ordenadas muestra los valores ΔCT que representa la diferencia entre el

ciclo umbral de los genes a evaluar y el C_T del gen *GAPDH* con respecto al eje de las abscisas correspondiente a la dilución utilizada en escala logarítmica (Log[RNA]). Se muestra la ecuación de la pendiente (y) y el valor predictivo de confianza (R^2).

OCT4**SOX2****C-MYC****KLF4**

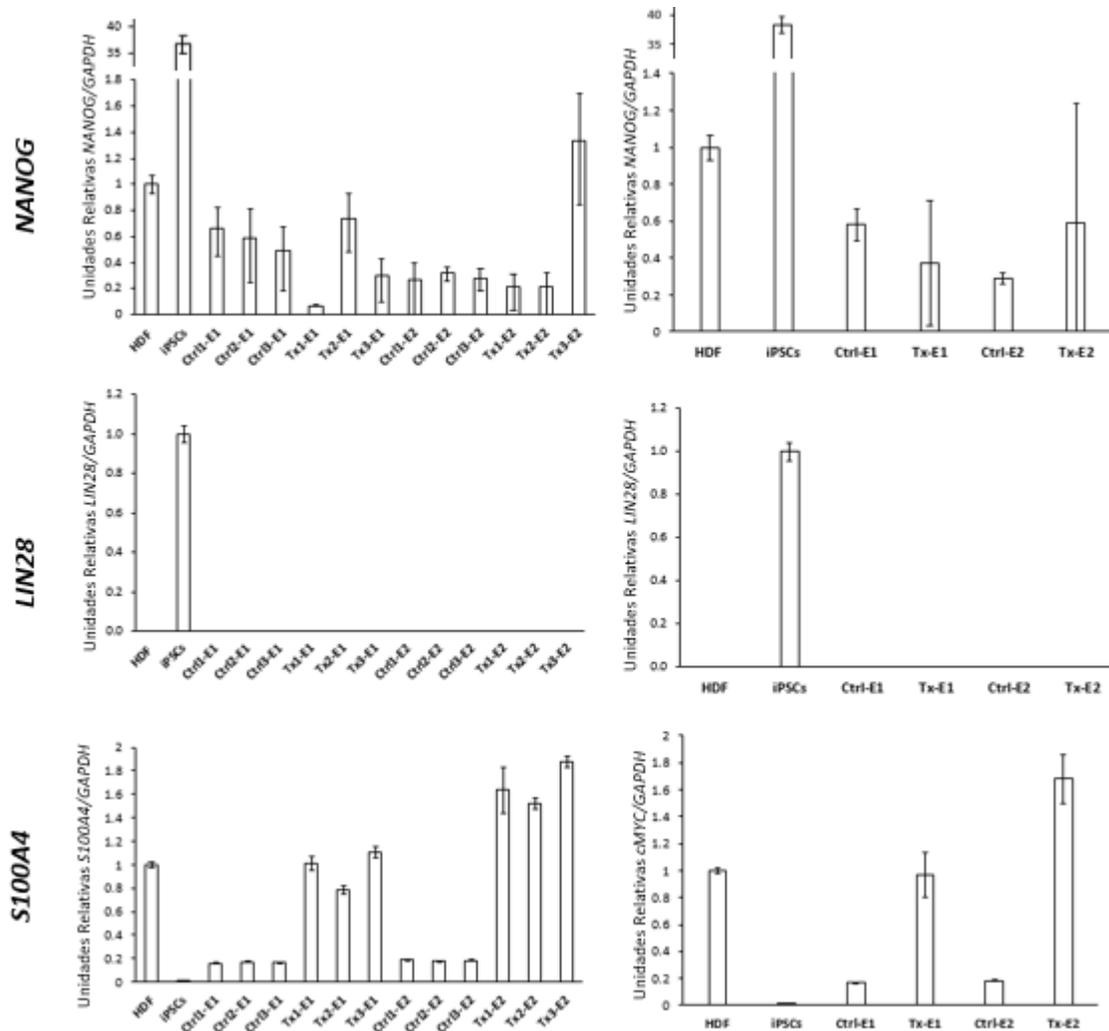


Fig. S3. Evaluación de la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2*, *c-MYC*, *KLF4*, *LIN28*, *NANOG* y *S100A4*. Las gráficas de la columna izquierda representan tres experimentos independientes para cada uno de los tratamientos y las gráficas de la columna derecha representan el promedio de los triplicados para cada uno de los tratamientos. El gen *GAPDH* se utilizó como control endógeno para normalizar los datos y los valores están expresados en unidades relativas (UR). HDF, fibroblastos dérmicos humanos subconfluentes; Ctrl-E1, control etapa 1; Tx-E1, tratamiento etapa 1; Ctrl-E2, control etapa 2; Tx-E2, tratamiento etapa 2.