



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Efecto de la hidralazina y el ácido valproico sobre la
expresión de genes relacionados con la pluripotencia
inducida en células somáticas humanas**

Tesis que presenta

Alain Jesús Aguirre Vázquez

Para obtener el grado de

Doctor 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 2021



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Efecto de la hidralazina y ácido valproico sobre la expresión de genes relacionados con la pluripotencia inducida en células somáticas humanas**" presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Alain Jesús Aguirre Vázquez** y aprobada el **2 de julio de 2021** 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. J. Sergio Casas Flores
Miembro del Comité Tutorial

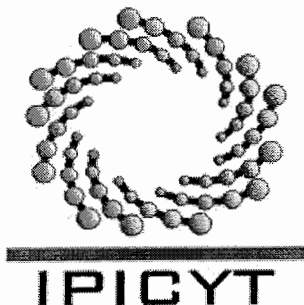
Dr. Rubén Hipólito López Revilla
Miembro del Comité Tutorial



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., bajo la codirección del Dr. Luis Antonio Salazar Olivo y en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social bajo la codirección 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 (número de registro 588906) y un apoyo complementario del Instituto Mexicano del Seguro Social (registro 97205589)



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 124 del Libro Segundo de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 16 días del mes de julio del año 2021, se reunió a las 11:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Rubén Hipólito López Revilla	Presidente	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo	Sinodal	IPICYT

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

DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Alain Jesús Aguirre Vázquez

sobre la Tesis intitulada:

Efecto de la hidralazina y el ácido valproico sobre la expresión de genes relacionados con la pluripotencia inducida en células somáticas humanas

que se desarrolló bajo la dirección de

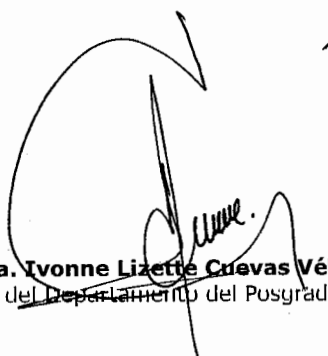
Dr. Luis Antonio Salazar Olivo
Dr. Mario Abelardo Bermúdez de León (IMSS)

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 14:50 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 16 días del mes de julio de 2021.


Mtra. Yvonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A mi madre por ser siempre un apoyo en mi vida, por tus consejos, por tus desvelos, por tus palabras sinceras y sobre todo por tu amor incondicional.

A mi padre por enseñarme que con el trabajo continuo y la disciplina se pueden alcanzar las metas propuestas.

A mis hermanos y hermanas por nunca dejarme solo, por preocuparse por mí y enseñarme que siempre debemos estar unidos.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de doctorado, al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) por permitirme continuar con mi formación académica.

A la Dra. Fabiola Castorena Torres y al Dr. Iván Velasco por darme la oportunidad de integrarme a sus grupos de investigación, sus asesorías a lo largo del proyecto de tesis y el apoyo con insumos y materiales para la realización de esta tesis.

A mis codirectores de tesis el Dr. Luis A. Salazar Olivo y Dr. Mario A. Bermúdez de León por la oportunidad y confianza que me han otorgado para realizar este proyecto.

A los miembros del comité tutorial, el Dr. J. Sergio Casas Flores y el Dr. Rubén Hipólito López Revilla, por sus valiosas observaciones, correcciones y sugerencias durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, al Instituto Mexicano del Seguro Social por el financiamiento otorgado (FIS/IMSS/PROT/PRI0/16/058).

Contenido

CONSTANCIA DE APROBACIÓN DE LA TESIS	II
CRÉDITOS INSTITUCIONALES	III
ACTA DE EXAMEN DE GRADO	IV
DEDICATORIAS	V
AGRADECIMIENTOS	VI
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS	4
2.1 Fármacos	4
2.2 Cultivo celular	4
2.3 Ensayo de viabilidad celular y determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀)	5
2.4 Extracción de RNA total	5
2.5 Transcripción Reversa y ensayos de PCR cuantitativa (RT-qPCR)	6
2.6 Ensayo de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación acoplado a qPCR (MSRE-qPCR)	8
2.7 Aislamiento, cultivo e inactivación de fibroblastos embrionarios de ratón	11
2.8 Caracterización de los vectores episomales	11

2.9 Generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)	12
2.10 Ensayos de inmunofluorescencia	13
2.11 Análisis estadístico	15
3. RESULTADOS	16
4. DISCUSIÓN	41
5. CONCLUSIÓN	47
6. REFERENCIAS	48
7. ANEXO	55

Lista de tablas

TABLA 1. SECUENCIAS DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA EL ENSAYO <i>MSRE-qPCR</i> .	10
--	----

Lista de figuras

FIGURA 1. AISLAMIENTO Y ESTABLECIMIENTO DE CULTIVOS PRIMARIOS DE FIBROBLASTOS EMBRIONARIOS DE RATÓN.	17
FIGURA 2. CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS EMBRIONARIAS HUMANAS H9-EGFP.	18
FIGURA 3. GENERACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (IPSCS) POR VECTORES EPISOMALES.	20
FIGURA 4. SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CÉLULAS PLURIPOTENTES INDUCIDAS (IPSCS) POR VECTORES EPISOMALES.	22
FIGURA 5. EFECTO DE LA HIDRALAZINA (HYD) Y ÁCIDO VALPROICO (VPA) SOBRE LA VIABILIDAD CELULAR DE FIBROBLASTOS DE ADULTO Y NEONATO.	24
FIGURA 6. LA CONCENTRACIÓN MEDIA INHIBITORIA (IC₅₀) DE HIDRALAZINA (HYD) Y ÁCIDO VALPROICO (VPA) EN FIBROBLASTOS DE ADULTO Y NEONATO.	26
FIGURA 7. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE PLURIPOTENCIA POR EFECTO DE LA HIDRALAZINA (HYD) Y ÁCIDO VALPROICO (VPA).	29
FIGURA 8. ANÁLISIS DE METILACIÓN DE SITIOS CPG DE LA REGIÓN PROMOTORA DE <i>OCT4</i> Y <i>NANOG</i> EN FIBROBLASTOS DE ADULTO Y NEONATO POR EFECTO DE HIDRALAZINA.	31
FIGURA 9. EXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA METILACIÓN DEL DNA Y COMPLEJOS MODIFICADORES DE LA CROMATINA.	34
FIGURA 10. EVALUACIÓN DE LA EFICIENCIA DE REPROGRAMACIÓN POR EFECTO DE LA HIDRALAZINA (HYD) EN FIBROBLASTOS ADULTOS Y NEONATO.	36
FIGURA 11. CARACTERIZACIÓN DE COLONIAS <i>IPSC</i> GENERADAS A PARTIR DE FIBROBLASTOS DE ADULTO Y NEONATO.	38
FIGURA 12. EVALUACIÓN DE BLANCOS MOLECULARES MODIFICADOS POR LA HIDRALAZINA.	40

Abreviaturas

5-mC	5-metilcitosina
DNMT	DNA metiltransferasas, del inglés <i>DNA Methyltransferases</i>
ESCs	Células troncales embrionarias, del inglés <i>Embryonic Stem Cells</i>
GFP	Proteína verde fluorescente, del inglés <i>Green Fluorescent Protein</i>
HDAs	Desacetilasas de histonas, del inglés <i>Histone deacetylases</i>
iMEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón inactivados, del inglés <i>inactivated Mouse Embryonic Fibroblasts</i>
iPSCs	Células troncales pluripotentes inducidas, del inglés <i>induced Pluripotent Stem Cells</i>
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>
qPCR	PCR cuantitativa, del inglés <i>quantitative PCR</i>

Resumen

Efecto de la hidralazina y el ácido valproico sobre la expresión de genes relacionados con la pluripotencia inducida en células somáticas humanas.

La reprogramación de células somáticas humanas a células troncales pluripotentes inducidas (*iPSCs*, por sus siglas en inglés) ha generado oportunidades prometedoras para la investigación en medicina regenerativa. A pesar del enorme potencial en investigación, la reprogramación celular es un proceso ineficiente debido a las firmas epigenéticas residuales de las células somáticas. Actualmente es de particular interés la búsqueda de moléculas que generen cambios en la estructura de la cromatina y reactiven la expresión de genes relacionados con la reprogramación celular. En este trabajo reportamos el efecto individual y combinado de dos fármacos epigenéticos, hidralazina y ácido valproico, sobre la expresión de genes de pluripotencia en células somáticas humanas. El ácido valproico incrementó al doble la expresión de *NANOG* en fibroblastos adultos. El efecto combinado del ácido valproico e hidralazina anuló el efecto de cada fármaco sobre la expresión de genes de pluripotencia, excepto para *cMYC* que aumentó en fibroblastos de neonato. Interesantemente, la hidralazina aumentó significativamente la expresión de *OCT4* y *NANOG* 2.5 y 4 veces, respectivamente; sin embargo, no redujo la metilación del DNA de los promotores *OCT4* y *NANOG* y no modificó la eficiencia de reprogramación. Para verificar el papel de la hidralazina en la modificación del epigenoma, demostramos que este fármaco regula negativamente la expresión de los genes *DNMT1*, *ARID1A* y *ARID2*. Finalmente obtuvimos resultados preliminares que sugieren que la hidralazina incrementa la expresión, propicia la estabilización y la translocación nuclear del factor inducible por hipoxia 1- α , HIF1A, el cual podría estar involucrado en la regulación de *OCT4* y *NANOG*. Nuestros datos proporcionan evidencia, por primera vez, de que la hidralazina regula la expresión de *OCT4* y *NANOG* en células somáticas humanas.

Palabras clave: reprogramación celular, pluripotencia, ácido valproico, hidralazina

Abstract

Hydralazine promotes the expression of pluripotency genes *OCT4* and *NANOG* in human somatic cells.

Generation of human-induced pluripotent stem cells (iPSC) has established promising opportunities for stem cell research, drug discovery, and disease modeling. Despite their enormous potential in research, cell reprogramming is an inefficient process due to iPSCs contain epigenetic signatures from their origin cells. This epigenetic memory constitutes one of the greatest obstacles in cell reprogramming. Currently, the search for small molecules that generate changes in chromatin structure and reactivate the expression of genes related to cellular reprogramming is of particular interest. Here we report the single and combined effect of valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, and hydralazine, a DNA methyltransferase inhibitor, on the expression of pluripotency genes in adult and newborn fibroblasts. Our results show that valproic acid upregulates *NANOG* expression by 2-fold in adult fibroblast. The combined effect of valproic acid and hydralazine nullifies the effect of each drug over pluripotency genes expression, except for *cMYC* which is increased in newborn fibroblasts. Interestingly, hydralazine significantly increases *OCT4* and *NANOG* expression by 2.5-fold and 4-fold, respectively in adult fibroblasts. However, hydralazine did not reduce the DNA methylation of *OCT4* and *NANOG* promoters in these cells, and no changes in reprogramming efficiency were observed. Furthermore, to confirm the role of hydralazine on cell epigenome, we demonstrate that hydralazine downregulates the expression of *DNMT1*, *ARID1A*, and *ARID2* genes. Finally, preliminary results suggest that hydralazine enhance the expression, stabilization, and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor 1-alpha, *HIF1A*, which could be involved in the upregulation of *OCT4* and *NANOG*. Our data provide evidence, for the first time, that hydralazine regulates *OCT4* and *NANOG* expression in human somatic cells.

Keywords: cellular reprogramming, pluripotency, valproic acid, hydralazine.

1. Introducción

Las células troncales pluripotentes inducidas (*iPSCs*) son células pluripotentes derivadas de células somáticas que han sido reprogramadas a un estadio de células embrionarias [1]. La reprogramación de células somáticas se genera al inducir la expresión de genes asociados con la regulación y mantenimiento de células embrionarias [2,3]. Debido a que las secuencias genómicas entre las células de origen y las *iPSC* no muestran diferencias genéticas evidentes, el proceso de reprogramación se basa en una reestructuración del epigenoma celular. El proceso de reprogramación implica la remodelación de la memoria epigenética somática para el establecimiento de firmas epigenéticas semejantes a las del estadio embrionario [4,5]. Sin embargo, la baja eficiencia de la reprogramación de células somáticas a *iPSCs* es uno de los principales inconvenientes. Esta baja eficiencia de reprogramación se asocia con la memoria epigenética residual de las células somáticas que perdura durante y después del proceso de reprogramación [6,7]. Recientemente, nuestro grupo de investigación identificó un coctel de moléculas capaces de inducir la expresión de los genes *OCT4*, *SOX2* y *KLF4*, pero indujo la expresión del gen *S100A4* asociado a metástasis en células cancerosas [8]. Por lo anterior, es de gran importancia la búsqueda de moléculas que modifiquen la estructura del epigenoma y reactiven la expresión de genes relacionados con la reprogramación celular.

Se han identificado fármacos con efectos regulatorios sobre el epigenoma, denominados “fármacos epigenéticos” [9]. Los fármacos epigenéticos se dividen principalmente en dos categorías: los inhibidores de la metilación del DNA (*DNMTs*) y los inhibidores de desacetilasas de histonas (*HDACs*) [10]. Dentro de estos grupos

de fármacos se encuentran la hidralazina y el ácido valproico. La hidralazina es un vasodilatador periférico de acción directa que actúa principalmente sobre las arterias causando una relajación directa del músculo liso [11]. La hidralazina está indicada para el tratamiento de trastornos hipertensivos e insuficiencia cardíaca; sin embargo, su uso actual está limitado a los trastornos hipertensivos durante el embarazo [12]. El efecto de la hidralazina sobre el epigenoma está relacionado con cambios en patrones de metilación del DNA. Además, la hidralazina modifica la metilación del DNA al disminuir la expresión de las metiltransferasas de DNA 1 (*DNMT1*) [10,13]. Por otro lado, el ácido valproico es un ácido graso de cadena corta prescrito para el tratamiento de la epilepsia y el trastorno bipolar. Los mecanismos de su acción terapéutica no se conocen bien. El ácido valproico puede actuar aumentando los niveles del neurotransmisor ácido γ -aminobutírico (GABA) en el cerebro o alterando las propiedades de los canales de sodio [12,14]. El ácido valproico pertenece a la clase de fármacos epigenéticos que inhiben a las histonas desacetilasas de clase I [15,16]. En consecuencia, el ácido valproico genera una hiperacetilación de las histonas H3 y H4 provocando cambios en la estructura de la cromatina que culmina en la activación transcripcional de diversos promotores [12,15]. Por consiguiente, en este trabajo hemos propuesto el uso de hidralazina y ácido valproico como una nueva estrategia para aumentar la eficiencia de reprogramación en células somáticas humanas.

En el siguiente trabajo reportamos el efecto de los fármacos hidralazina y ácido valproico sobre la viabilidad celular de fibroblastos humanos de adulto y neonato, al igual que el cálculo de la concentración media inhibitoria (IC_{50}) para cada fármaco. Además, evaluamos el efecto individual y combinado de los fármacos sobre la

expresión de genes de pluripotencia. Asimismo, analizamos la metilación en los promotores de los genes *OCT4* y *NANOG* por efecto de la hidralazina y la modificación en genes involucrados con la metilación de DNA y complejos remodeladores de la cromatina. Finalmente, evaluamos el efecto de la hidralazina sobre la eficiencia de reprogramación y las posibles rutas de señalización que pudieran estar involucrados en la modificación en la expresión de los genes de pluripotencia.

2. Materiales y métodos

2.1 Fármacos

El clorhidrato de hidralazina (, pureza del 99 %, catálogo H1753) y la sal sódica del ácido valproico (, pureza del 98 %, catálogo P4543) se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). Para los experimentos, la hidralazina y ácido valproico se diluyeron en medio de cultivo a partir de una solución acuosa.

2.2 Cultivo celular

Las células H9-GFP [17] se cultivaron sobre una capa fibroblastos embrionarios de ratón inactivados por radiación gamma en medio KnockOut DMEM suplementado con 20 % de KnockOut Serum Replacement (Gibco, Carlsbad, CA, EE. UU.), 2.5 mM de Glutamax (Gibco), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol (Sigma), 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco) y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (Prepotech, Rocky Hill, NJ, EE. UU.). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora (Nuair, Syracuse, NY, EE. UU.) a 37 °C con 5 % de CO₂ con cambio de medio cada 24 h.

Los fibroblastos de prepucio de neonato y los fibroblastos dérmicos humanos de adulto, fueron obtenidos en la *American Tissue Culture Collection* con los códigos de identificación ATCC-CRL-2522 y ATCC-PCS-201-012, respectivamente. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio DMEM adicionado con 4.5 g/L de D-glucosa, 2.5 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino (Gibco) y 1 % de aminoácidos no esenciales (Gibco). Los cultivos se mantuvieron en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂.

Para los ensayos de expresión génica y la determinación del porcentaje de metilación en regiones promotoras, fibroblastos de adulto y neonato fueron

sembrados a una densidad de 4.2×10^3 y 4.7×10^3 células/cm², respectivamente. Cada 24 h por un periodo de 72 h medio fresco se añadió con hidralazina, ácido valproico y su combinación.

2.3 Ensayo de viabilidad celular y determinación de la concentración media inhibitoria (IC₅₀)

La evaluación de la viabilidad celular se realizó por medio del reactivo *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* (Promega, Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Los fibroblastos de adulto y neonato fueron sembrados en placas de 96 pozos a una densidad de 5.6×10^3 y 6.3×10^3 células/cm², respectivamente. Cada 24 h por un periodo de 96 h medio fresco se añadió con hidralazina, ácido valproico y su combinación. Previo a la cuantificación del ensayo se añadió medio fresco con el reactivo *CellTiter-Blue*. Las placas fueron incubadas por 4 h en una incubadora a 37 °C con 5 % de CO₂. La sensibilidad al fármaco se determinó *in vitro* mediante la lectura de la absorbancia a longitudes de onda de 570/600 nm utilizando el lector de placas *800 TS Absorbance Reader* (BioTek Instruments, Winooski, VT, EE. UU.). Los valores IC₅₀ fueron determinados mediante el ajuste de la curva dosis-respuesta a 72 h aplicando el método analítico del log (inhibición).

2.4 Extracción de RNA total

La extracción de RNA total de los fibroblastos humanos se realizó con el reactivo TRIzol (Ambion, Austin, TX, EE. UU.) 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 el tubo se agitó por inversión por 15 s. Las muestras se incubaron durante 2-3 min a temperatura ambiente y después se realizó la centrifugación a $12,000 \times g$ 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 $12,000 \times g$ por 10 min a 4°C y se realizó un lavado con etanol. Finalmente, las muestras se centrifugaron a $7,500 \times g$ por 5 min a 4°C y el RNA total se resuspendió en 30 μL de agua libre de nucleasas (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La integridad del RNA se visualizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % teñido con GelRed (Biotium, Hayward, CA., EE. UU.). La concentración y pureza del RNA total se determinó por absorbancia a 260/280 nm en un equipo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Boston, MA, EE. UU.). Aquellas muestras con valores >1.7 de absorbancia en la relación 260/280nm y sin degradación fueron incluidas en ensayos posteriores.

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

La síntesis de DNA complementario se llevó a cabo utilizando la transcriptasa inversa M-MLV (Invitrogen) y *random primers* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se utilizó 1 μg de RNA total más 150 ng *random primers* y 0.5 μM *dNTPs* para preparar la mezcla 1. La mezcla 1 se incubó a 65°C durante 5 min y luego se enfrió en hielo. Por separado, la Mezcla 2 se preparó usando $1\times$ *First Strand* buffer, 10 mM DTT y 40 unidades RNase OUT (Invitrogen). La Mezcla 2 se añadió a la Mezcla 1 y se incubó a 37°C durante 2 min. Luego se añadió 1 μL de la transcriptasa inversa M-MLV (200 U/ μL) al tubo de reacción y se establecieron las siguientes condiciones: incubación a 25°C durante 10 min, seguido de incubación a 37°C durante 50 min, y se inactivó la enzima a

70 °C durante 15 min. La funcionalidad del cDNA se evaluó mediante PCR para el gen ribosomal 18S con los siguientes cebadores: F 5'-GTT ATT TCC AGC TCC AAT AGC GTA-3 'y R 5'-GAA CTA CGA CGG TAT CTG ATC GTC-3'. La PCR cuantitativa se realizó con el equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystem, Foster City, CA. EE. UU.) utilizando ensayos de cebadores y sondas TaqMan® para los siguientes genes: *OCT4* (POU5F1, Hs01895061_u1), *NANOG* (Hs02387400_g1), *KLF4* (Hs100358836_m), *MYC* (Hs00153408_m1), *TET3* (Hs00896441_m1), *ARID1A* (Hs00195664_m1), *ARID2* (Hs00326029_m1) y *HIF1A* (Hs00153153_m1) (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 20 µL usando TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem, Carlsbad, CA. EE. UU.), 1 µL de la mezcla de cebadores/sonda 20× y 3 µL de cDNA a las diluciones 1:32-1:128. La amplificación se realizó en el modo estándar utilizando las siguientes condiciones de reacción: una incubación inicial a 50 °C durante 2 min, seguida de 95 °C durante 10 min, y luego 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 1 min. La cuantificación de la expresión del gen *DNMT1* se evaluó utilizando los cebadores: F 5'-TAC CTG GAC GAC CCT GAC CTC-3 'y R 5'-CGT TGG CAT CAA AGA TGG ACA-3'; previamente reportados [18]. Para la amplificación del gen *DNMT1*, la reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen de 10 µL utilizando EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen) y 0.35 nM de cada cebador, más 3 µL de cDNA a la dilución 1:32. La amplificación se realizó en el modo estándar utilizando las siguientes condiciones de reacción: una incubación inicial a 50 °C durante 2 min, seguida de 95 °C durante 5 min, y luego 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 60 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Después de la reacción de qPCR, se generó una

curva de disociación para validar la especificidad de los cebadores. Los datos se analizaron utilizando el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ [19] y se informaron como el cambio de veces en la expresión génica normalizada al gen de control endógeno *GAPDH* y en relación con las células no tratadas como control. Se utilizó como control endógeno al gen *GAPDH* humano (*GAPDH*) (4310884E, Applied Biosystems), el cual se realizó en paralelo con los ensayos de expresión génica TaqMan. Para la amplificación de *GAPDH* por PCR en tiempo real usando SYBR Green se utilizaron los siguientes cebadores: F 5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3 'y R 5'- TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3 '. Se incluyeron controles de negativos para todos los ensayos. Este último ensayo permitió la normalización del gen *DNMT1*.

2.6 Ensayo de digestión con enzimas de restricción sensibles a metilación acoplado a qPCR (MSRE-qPCR)

El DNA genómico de fibroblastos de adultos y neonato se extrajo con el kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Las células controles y tratadas se tripsinizaron, se lavaron con PBS y se lisaron con 600 μ L de solución de lisis de núcleos con RNasa. Se añadió una solución de precipitación de proteínas y la muestra se agitó durante 20 s a alta velocidad. El DNA genómico se recuperó mediante precipitación con isopropanol y se lavó con etanol al 70 %. El DNA genómico se resuspendió, se cuantificó y se visualizó en gel de agarosa teñido con GelRed (Biotium). Posteriormente, se realizó el análisis de metilación del DNA con el kit de análisis de metilación de DNA EpiJET (*MspI* / *HpaII*) (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, LT) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La digestión del DNA con las enzimas *MspI*, *HpaII* o la reacción de control no digerida se llevó a cabo en 20 μ L con 200 ng de DNA

genómico durante 4 h a 37 °C. Después, las muestras se incubaron a 90 °C durante 10 min. Posteriormente, se llevó a cabo la PCR cuantitativa con 1 µL de DNA genómico digerido (*MspI/HpaII*) o no digerido en un volumen de 10 µL utilizando el EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix Universal (Invitrogen) y 0.35 nM de cebador sentido / antisentido. Las secuencias de cebadores utilizadas en este ensayo se muestran en la Tabla 1. La amplificación se realizó en el modo estándar utilizando las siguientes condiciones de reacción: una incubación inicial a 50 °C durante 2 min, seguida de 95 °C durante 5 min y luego 40 ciclos a 95 °C durante 15 s, 63 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s. Después de la reacción de qPCR, se generó una curva de disociación para validar la especificidad de los cebadores. El porcentaje de modificación de 5-mC se calculó con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ metilación} = -2(\mathbf{Ct HpaII} - \mathbf{Ct control}) \cdot 100$$

Donde:

Ct *HpaII* corresponde al ciclo de amplificación de la muestra digerida con la enzima *HpaII*.

Ct control corresponde al ciclo de amplificación de la muestra sin digerir.

Los experimentos de validación se realizaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Tabla 1. Secuencias de los cebadores utilizados para el ensayo *MSRE-qPCR*.

Gen	Sitio	Secuencia (5'-3')	Amplicón
OCT4 región promotora	1	F-CCT GCA CTG AGG TCC TGG A	81 pb
		R-CCT AAT GGT GGT GGC AAT GGT	
	2	F-GGG TTG AGC ACT TGT TTA GGG	112 pb
		R- AGG TTC AAA GAA GCC TGG GAG	
	3	F-CCC ACT GCC TTG TAG ACC TTC	124 pb
		R-CCC ACT CTT ATG TTG CCT CTG T	
	4	F-CTG CCT CAA CCT CCC ATC AG	149 pb
		R-CGA GAG GGA CGC AGA CAA G	
NANOG región promotora	1	F-CCA CGG CCT CCC AAT TTA CTG	172 pb
		R-ACC TGA AGA CAA ACC CAG CAA C	
	2	F-CCT GAA GCA TGA TGT ACT AGC CC	186 pb
		R-CTG GCT TTG CTC CCA CAC AAG	
	3	F-GCG AAG AAT GTA GTA AGT CGG C	87 pb
		R-CCA TTG TGT CTA GGG TAA GAG C	

pb, pares de bases.

2.7 Aislamiento, cultivo e inactivación de fibroblastos embrionarios de ratón

Los fibroblastos embrionarios de ratón se obtuvieron a partir de embriones de ratón BALB/c de 13.5 días post-coito. Brevemente, se sacrificó a la hembra preñada, se extrajeron los cuernos uterinos y se aislaron los embriones en 10 mL de medio DMEM adicionado con 4.5 g/L de D-glucosa y 10 % de suero fetal bovino. Se eliminó la cabeza, extremidades y vísceras, y la fracción restante se colocó en una placa de cultivo de 150 mm y se disoció mecánicamente. Se agregaron 5 mL de tripsina-EDTA al 0.25 %, se incubó a 37 °C por 15 min y se centrifugó a 3,000 rpm. Se retiró el sobrenadante y se añadió medio fresco. A continuación, se sembró el equivalente a dos embriones por cada frasco T-75 y los cultivos se mantuvieron en una atmósfera a 37 °C con 5 % de CO₂. Para la inactivación mitótica de los fibroblastos embrionarios de ratón se expandieron las células previo al pasaje 4, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente, se añadió medio DMEM adicionado con 10 µg/mL de mitomicina C (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, EE. UU.) y se incubó por 2.5 h. Después, se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS. Posterior a la inactivación, los fibroblastos inactivados (*iMEFs*) fueron cultivados en DMEM adicionado con 4.5 g/L de glucosa, 10 % de suero fetal bovino y se mantuvieron en una atmósfera a 37 °C con 5 % de CO₂.

2.8 Caracterización de los vectores episomales

La caracterización de los vectores episomales se llevó a cabo por restricción enzimática. Brevemente, 500 ng de cada vector fueron digeridos por 1 h a 37 °C. Posteriormente, se realizó una separación por electroforesis en un gel de agarosa al 0.7 % teñido con GelRed para visualizar el patrón de restricción. pCXLE-

hOCT3/4-shp53 fue digerido con *EcoRV* y *BglII*; pCXLE-hSK y pCXLE-eGFP fue digerido con *EcoRV*, *BglII* y *BamHI*; pCXLE-hUL fue digerido con *EcoRV* y *SacI*.

2.9 Generación de células troncales pluripotentes inducidas (iPSCs)

La generación de *iPSC* se llevó a cabo por el método de reprogramación con los vectores episomales pCXLE-hOCT3/4-shp53, pCLXE-hSK y pCLXE-hUL [20], con el apoyo del Laboratorio de Reprogramación Celular a cargo del Dr. Iván Velasco, del Instituto de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez” y del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, en la Ciudad de México.

Se utilizaron 3 µg de cada vector en 4×10^5 células en un dispositivo Nucleofector (Lonza, Allendale, N.J., EE. UU.) utilizando el kit *Amaxa Human Dermal Fibroblast Nucleofector* (programa U023) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. Después, las células se cultivaron por siete días en medio DMEM adicionado con 4.5 g/L de glucosa, 10 % de suero fetal bovino, 1 mM de ácido valproico, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Al día ocho, las células fueron cosechadas sembradas sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente en medio KnockOut DMEM suplementado con 20 % de KnockOut Serum Replacement, 2.5 mM de Glutamax, 0.1 mM de 2-mercaptoetanol, 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA) y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos (*bFGF*).

Para la realización de la reprogramación celular en el Laboratorio de Biología Molecular del Centro de Investigación Biomédica del Noreste, se transfectaron 2.5 µg de cada vector en 1×10^6 células en un dispositivo *Neon Transfection System* (Invitrogen) de acuerdo con las especificaciones del proveedor. El equipo fue

facilitado por el Dr. Gerardo García, del Tecnológico de Monterrey. Las condiciones para los fibroblastos de neonato fueron 1,650 V, 10 ms con tres pulsos y las condiciones para los fibroblastos de adulto fueron 1,800 V, 20 ms con un pulso. Las células fueron cultivadas por siete días en medio de reprogramación en ausencia o presencia de 30 μM de hidralazina. El medio de reprogramación se formuló con DMEM adicionado con 4.5 g/L de D-glucosa, 2.5 mM de L-glutamina, 10 % de suero fetal bovino, 10 % de remplazo de suero (Gibco), 1 % de aminoácidos no esenciales (NEAA), 3 μM de CHIR99021(Sigma-Aldrich) y 0.5 μM A83-01 (Sigma-Aldrich). Durante los primeros siete días se cambió el medio a las células cada 48 h. Posteriormente, las células fueron cosechadas y sembradas sobre fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente con mitomicina C. Al día siguiente el medio de cultivo fue cambiado por medio KnockOut DMEM (Gibco) suplementado con 20 % de remplazo de suero (Gibco), 2.5 mM de L-alanil-L-glutamina (Corning, NY, EE. UU.), 0.1 mM de 2-mercaptoetanol, 1 % de aminoácidos no esenciales y 10 ng/mL de factor de crecimiento de fibroblastos (*bFGF*) (Corning). En ambos eventos de reprogramación, los cultivos se mantuvieron en una atmósfera a 37 °C con 5 % de CO₂ con cambio de medio cada 24 h. Finalmente, entre el día 15 a 25 se contó el número de colonias con características de colonias pluripotentes humanas descritas por Healy y Ruban [22] y por Schwartz y colaboradores [21], las cuales incluyen: alto grado de compactación de las colonias, bordes definidos, un núcleo de gran tamaño, citoplasma escaso y nucléolos prominentes.

2.10 Ensayos de inmunofluorescencia

Se cultivaron colonias de *iPSC*, fibroblastos adultos y neonato en placas de 24 pozos con cubreobjetos de vidrio recubiertos previamente con gelatina al 0.5 % de

acuerdo con las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Después de los tratamientos, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4 % durante 20 min. Las células se permeabilizaron y bloquearon durante 1 h en PBS con Triton X-100 al 0.2 %, BSA al 1 % y suero normal al 10 % obtenido de la especie animal donde se producen los anticuerpos secundarios. Para la detección del marcador de superficie SSEA4, se omitió la permeabilización con Triton X-100. Luego, se realizó la incubación con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo durante toda la noche a 4 °C. Después del lavado las células se incubaron en la oscuridad con los anticuerpos secundarios apropiados durante 1 h a temperatura ambiente, se contratiñeron con DAPI y se montaron con SlowFade Diamond (Invitrogen). Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-OCT4 de cabra (R&D Systems AF1759, dilución 1: 100), anti-SOX2 de ratón (R&D Systems MAB2018, 1: 100), anti-NANOG de conejo (Preprotech 500-P236, dilución 1: 1,000), ratón anti-SSEA4 (R&D Systems MAB1435, dilución 1: 100), anti-NRF2 de conejo (Abcam ab31163, dilución 1: 200) y anti-HIF1A (Santa Cruz Biotechnology sc-13515, dilución 1:25). Los anticuerpos primarios utilizados para la detección de OCT4, SOX2 y SSEA4 fueron los incluidos en el Panel Plus de anticuerpos marcadores de células troncales pluripotentes humanas (R&D Systems). Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anti-ratón de cabra conjugado con Alexa Flour 594 (Thermo Fisher Scientific, dilución 1:500), anti-conejo de cabra conjugado con Alexa Flour 488 (Thermo Fisher Scientific, dilución 1:500) y anti-cabra de burro conjugado con Alexa Flour 568 (Thermo Fisher Scientific, dilución 1:500) según las instrucciones del proveedor a una dilución de 1:

500. Las inmunotinciones se analizaron y fotografiaron con el sistema EVOS FL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, Bothell, WA, EE. UU.).

2.11 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con el *software GraphPad Prism* versión 6. Se utilizó una ANOVA bidireccional con pruebas de comparación múltiple de Dunnett para las comparaciones entre el control y otros grupos. También, se utilizó la prueba *t* de *Student* para las comparaciones entre grupos. Las pruebas estadísticas utilizadas están especificadas en cada pie de figura. Los valores se expresan como media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre el control y los otros grupos se consideró significativa cuando $P < 0.05$.

3. Resultados

Con la finalidad de adquirir experiencia en el cultivo de células pluripotentes y en la generación de *iPSCs* humanas, se realizó el cultivo de las células embrionarias H9-*eGFP* y se reprogramaron fibroblastos humanos. Debido a que el cultivo de células pluripotentes requiere de una capa de células alimentadoras que proporcionen los factores de crecimiento para su mantenimiento [21], fue necesario establecer el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón como células alimentadoras. Primero, se sacrificó a una hembra preñada a los 13.5 días post-coito y se realizó la disección de los cuernos uterinos (Figura 1A y 1B). Posteriormente, se obtuvieron los embriones y se les removieron las vísceras, cabeza y extremidades (Figura 1C), se maceraron y trataron con tripsina para disociar las células y establecer el cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (*MEFs*) (Figuras 1D y 1E). Finalmente, la proliferación celular de los fibroblastos embrionarios de ratón fue inhibida con mitomicina C para ser utilizados como células alimentadoras en los siguientes experimentos. Al tener las condiciones de cultivo adecuadas para el mantenimiento de células pluripotentes, se realizó el cultivo de la línea celular H9-*eGFP*, que son células troncales embrionarias (*ESCs*) y que derivan de la masa celular interna de un blastocisto humano y expresan, de manera constitutiva, al gen de la proteína verde fluorescente (*GFP*) [17]. Las células H9-*eGFP* muestran un alto grado de compactación de las colonias, bordes definidos, un núcleo de gran tamaño, citoplasma escaso y nucléolos prominentes (Figura 2A). Asimismo, se detectó por ensayos de inmunofluorescencia los marcadores de pluripotencia OCT4, SOX2, NANOG y el marcador de superficie SSEA4. Lo anterior demuestra la condición de células no diferenciadas de la línea celular H9-*eGFP* (Figura 2B).

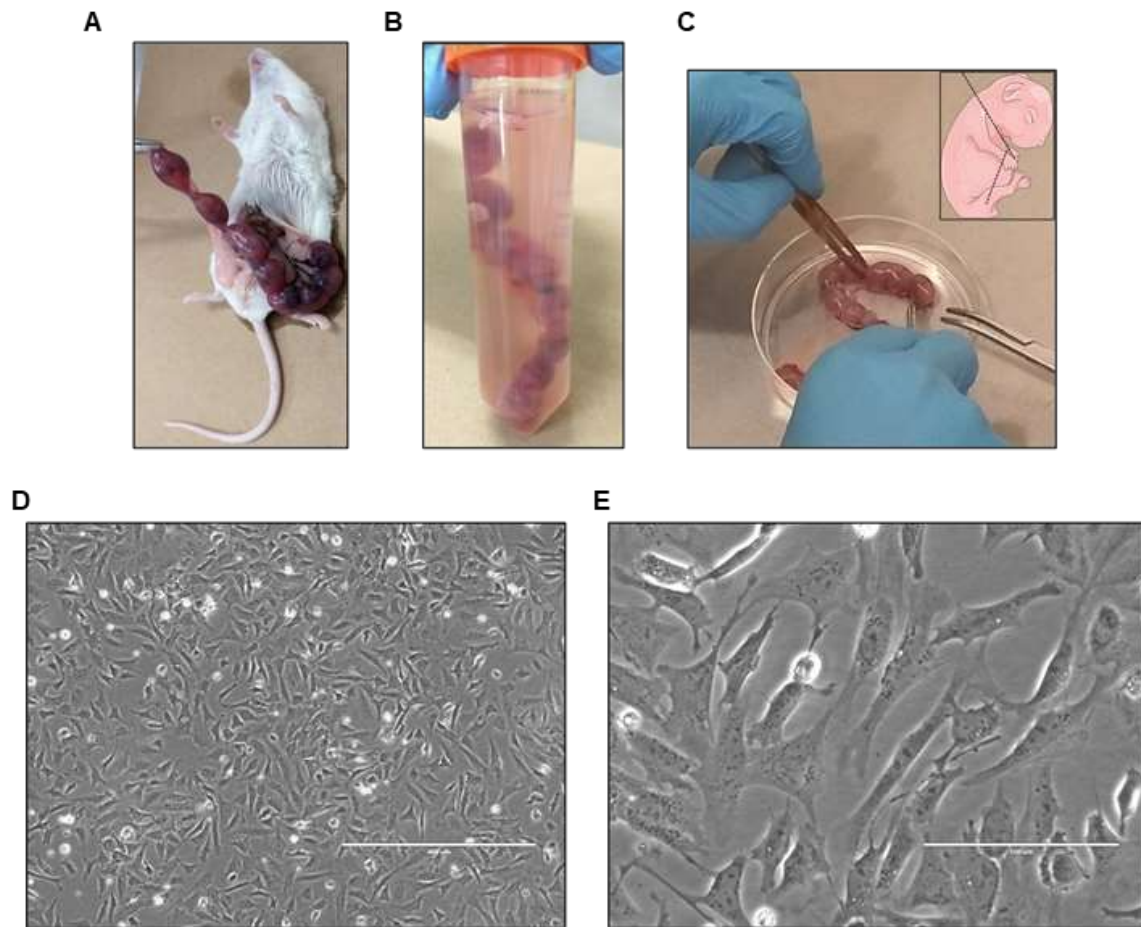


Figura 1. Aislamiento y establecimiento de cultivos primarios de fibroblastos embrionarios de ratón. Panel A, sacrificio de hembra preñada a los 13.5 días post-coito y disección de los cuernos uterinos. Panel B, lavado de los cuernos uterinos. Panel C, disección de embriones de ratón. Se retira la cabeza, viseras y extremidades. Paneles D y E, cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (escala: 400 μm en D, 100 μm en E).

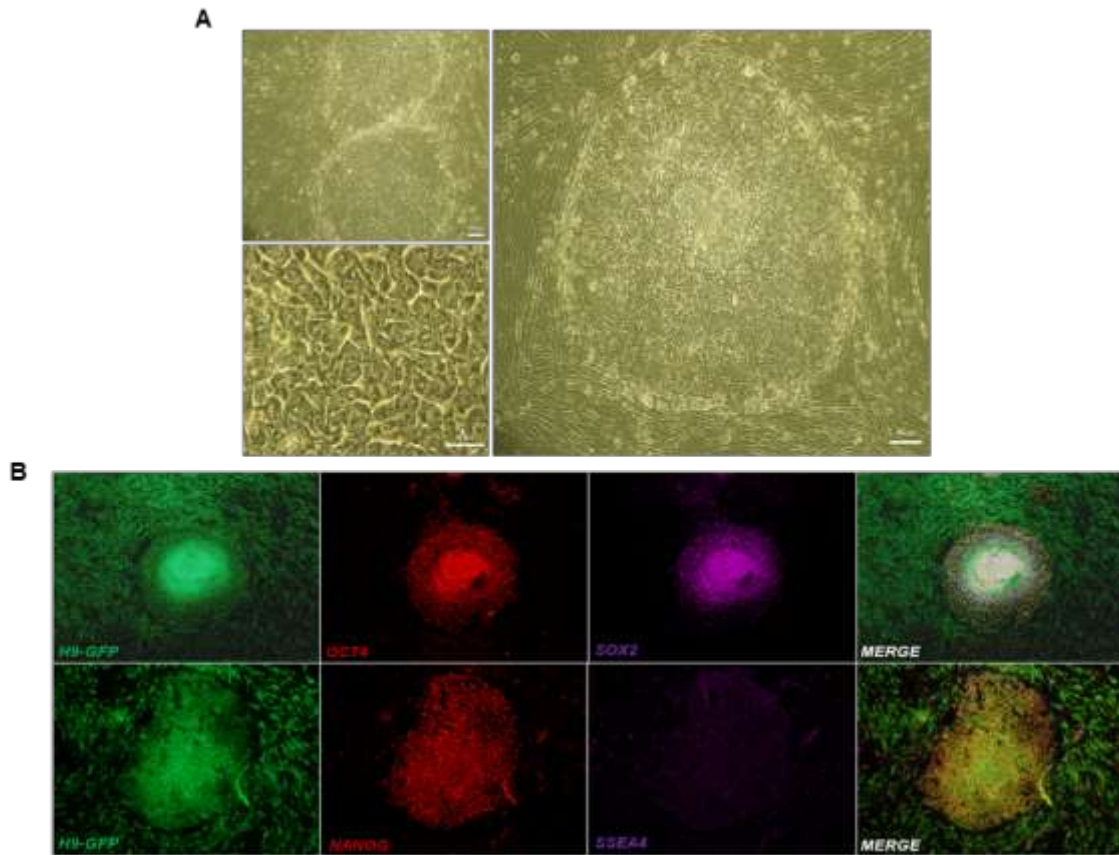


Figura 2. Cultivo y caracterización de células embrionarias humanas H9-eGFP. Panel A, morfología característica de las células embrionarias humanas H9-eGFP. Las escalas representan 100 μm , y en la micrografía ampliada corresponde a 50 μm . Panel B, detección de marcadores de pluripotencia OCT4 (rojo), NANOG (rojo), SOX2 (magenta) y SEE4 (magenta) por inmunofluorescencia y la sobreposición de imágenes (MERGE). Las células H9-eGFP son positivas para el gen GFP (verde), y se muestran en la primera columna de la serie.

Lo siguiente fue generar células pluripotentes humanas inducidas (*iPSCs*) a partir de células somáticas humanas. Para la generación de *iPSCs* humanas se utilizaron cuatro vectores episomales que expresan los factores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *L-MYC*, *LIN28*, el RNA interferente del gen *p53* y el gen reportero *GFP* (Figura 3A). Los vectores fueron caracterizados (Figura 3B) y transfectados en fibroblastos de neonato (Figura 3C). Posterior a la transfección se observó un alto porcentaje de células *GFP*⁺, las cuales comenzaron a perder su morfología mesenquimal y a generar agrupaciones celulares características de la transición mesenquimal a epitelio [23] (Figura 3D). Asimismo, al día doce comenzó la aparición de pequeñas colonias *GFP*⁺ que gradualmente fueron aumentando de tamaño. Al día 16 las células perdieron la morfología mesenquimal, se compactaron y delimitando en colonias con morfología similar a *ESCs* humanas (Figuras 3E y 3F). Entre los días 25 a 30 se seleccionaron las colonias con morfología característica a *ESCs* para el proceso de expansión, mantenimiento y caracterización. Durante el proceso de expansión, las colonias seleccionadas mantuvieron una morfología similar a las *ESCs* con un núcleo alargado, alto grado de compactación y delimitación de las colonias (Figura 4A). Además, se detectó por inmunofluorescencia los marcadores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2*, *NANOG* (Figura 4B) y el marcador de membrana *SSEA4* característicos de células pluripotentes (dato no mostrado), lo cual confirma que las células somáticas han reactivado la red de pluripotencia. Con estos resultados, se demostró la capacidad para mantener, seleccionar y caracterizar células pluripotentes, y llevar a cabo procesos de reprogramación a partir de células somáticas humanas.

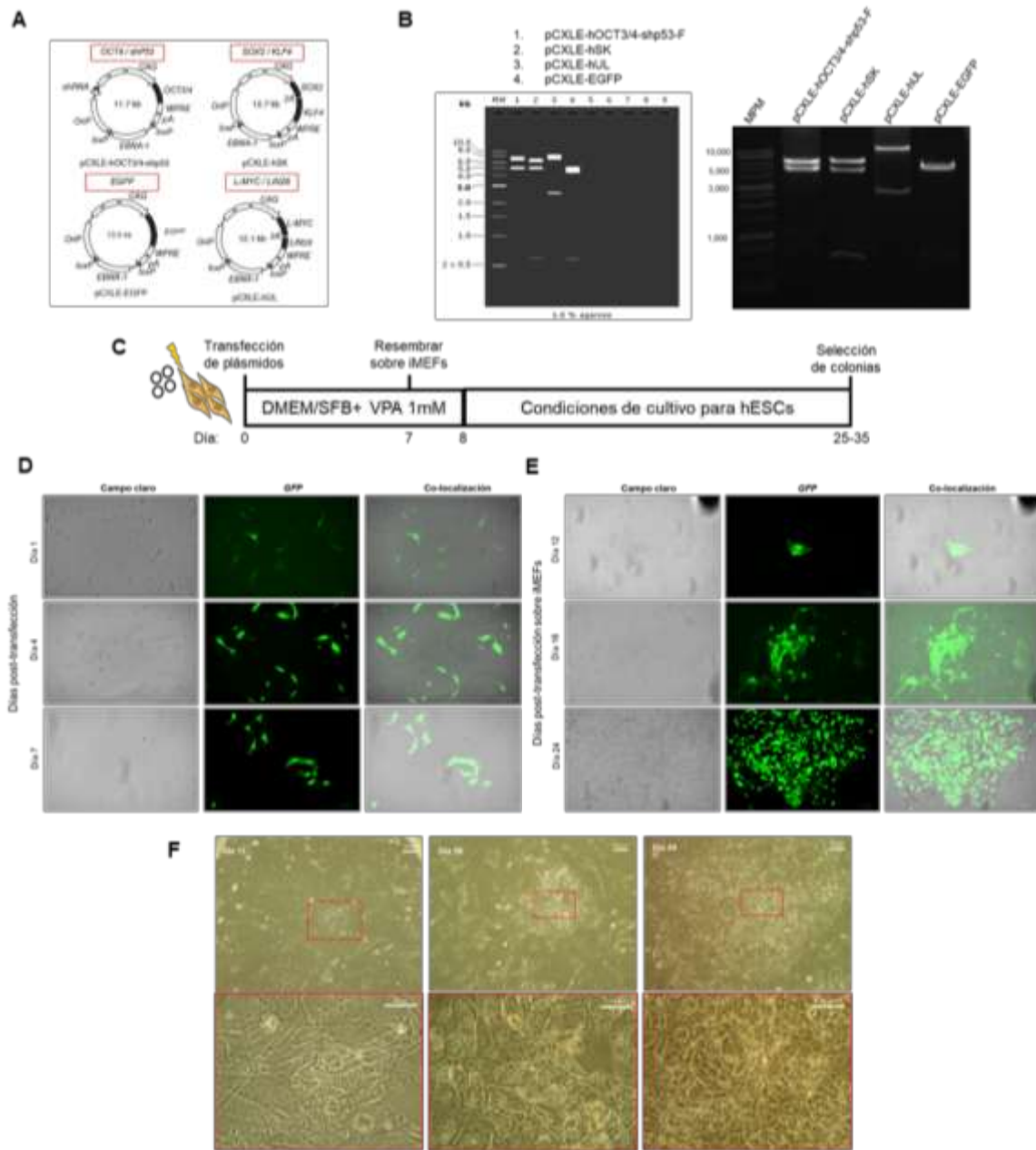


Figura 3. Generación de células pluripotentes inducidas (*iPSCs*) por vectores episomales. Panel A, vectores episomales utilizados para la generación de *iPSCs* humanas [20]. Panel B, simulación *in silico* y caracterización de los vectores episomales por digestión enzimática; los fragmentos generados para cada vector son los siguientes: pCXLE-hOCT3/4-shp53 6,531 pb y 5,150 pb; pCXLE-hSK 6,940 pb, 5,150 pb y 603 pb; pCXLE-hUL 9,542 pb y 2,509 pb; pCXLE-EGFP 5,159 pb,

5,150 pb y 602 pb. MPM, marcador de peso molecular. Panel C, Esquema de reprogramación celular utilizando vectores episomales. Panel D, pérdida de la morfología mesenquimal y generación de agrupaciones celulares en etapas tempranas del proceso de reprogramación. La escala representa 100 μm . Panel E, generación de colonias con morfología similar a células embrionarias (*ESC*'s) humanas. La escala representa 100 μm . *iMEFs*, fibroblastos embrionarios de ratón inactivados. Panel F, adquisición gradual de colonias con morfología similar a las *ESCs* humanas. Las barras de escala representan 100 μm , y en las micrografías amplificadas corresponde a 50 μm .

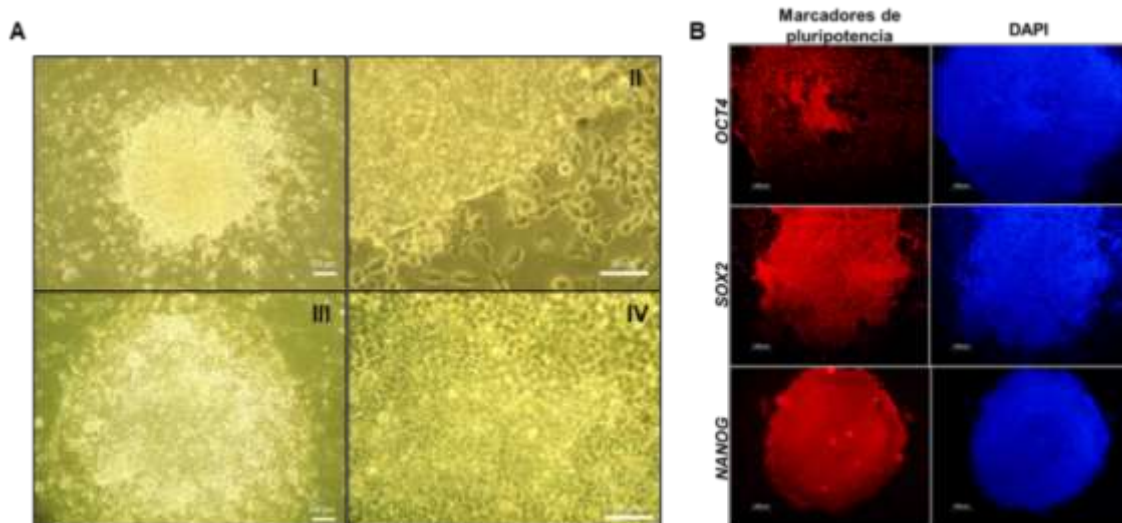


Figura 4. Selección y caracterización de células pluripotentes inducidas (*iPSCs*) por vectores episomales. Panel A, imágenes representativas de la morfología característica de las colonias de *iPSC*. Las imágenes I-II y III-IV representan una colonia del pase 3 y 5, respectivamente. La escala representa 100 μm , y en las micrografías amplificadas corresponde a 50 μm . Panel B, detección de los marcadores de pluripotencia *OCT4*, *SOX2* y *NANOG* (rojo) en colonias con morfología similar a células embrionarias (*ESC's*) humanas. Se realizó la contratinción del núcleo con el colorante DAPI (azul).

Posteriormente, con el objetivo de establecer y validar una concentración de hidralazina y ácido valproico que no redujera drásticamente la viabilidad de los fibroblastos de adulto y neonato, se realizaron curvas dosis-respuesta de los fármacos por un periodo de 24, 48, 72 y 96 h. Se observó una disminución en la viabilidad celular relacionada al aumento de la concentración y al periodo de exposición a la hidralazina (Figuras 5A y 5B) y al ácido valproico (Figuras 5C y 5D) en ambas líneas celulares. De acuerdo con los ensayos de viabilidad se seleccionaron las concentraciones de 30 μM de hidralazina y 1 mM de ácido valproico para ensayos posteriores. A continuación, se evaluó el efecto combinado de los fármacos sobre la viabilidad de los fibroblastos de adulto y neonato por 24, 48, 72 y 96 h. Los fibroblastos de adulto tuvieron una disminución de la viabilidad del 17 % y 15 % a las 72 y 96 horas de tratamiento, respectivamente (Figura 5E). Por otro lado, los fibroblastos de neonato mostraron una disminución de la viabilidad del 11 % a partir de las 24 horas hasta alcanzar un 36 % a las 96 horas (Figura 5F). Nuestros resultados señalan que las concentraciones seleccionadas de los fármacos son aptas para los ensayos posteriores al no disminuir drásticamente la viabilidad de los fibroblastos humanos. Además, las curvas generadas nos permitieron calcular los valores de concentración media inhibitoria (IC_{50}) para hidralazina y ácido valproico a las 72 h en ambas líneas celulares. Para los fibroblastos de adulto se calculó una IC_{50} de 95.86 μm para hidralazina (Figura 6A) y 7.517 mM de ácido valproico (Figura 6C). Los fibroblastos de neonato mostraron una mayor sensibilidad a los fármacos al presentar valores de IC_{50} de 80.86 μM para hidralazina (Figura 6B) y 1.872 mm de ácido valproico (Figura 6D).

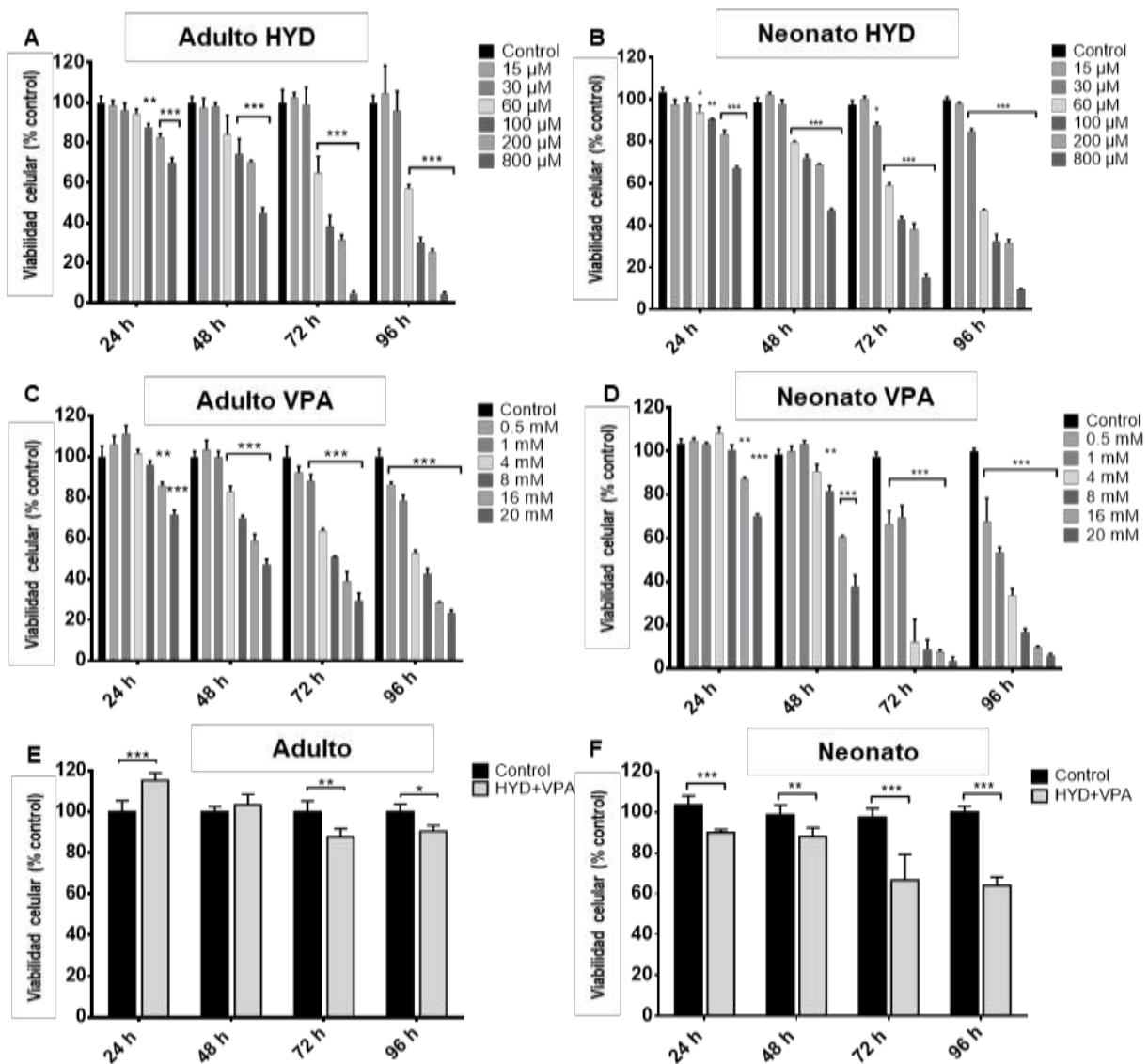


Figura 5. Efecto de la hidralazina (HYD) y ácido valproico (VPA) sobre la viabilidad celular de fibroblastos de adulto y neonato. Se realizaron curvas dosis-tiempo respuesta para evaluar el efecto de HYD (panel A y B) y VPA (panel C y D) sobre la viabilidad celular de fibroblastos adulto y neonato. Se utilizó una ANOVA bidireccional con pruebas de comparación múltiple de Dunnett para las comparaciones entre el control y otros grupos. Efecto combinado de HYD 30 µM y VPA 1 mM sobre la viabilidad celular de fibroblastos adultos (panel E) y neonato (panel F). Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos

independientes. Se utilizó la prueba t de *Student* para las comparaciones entre grupos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

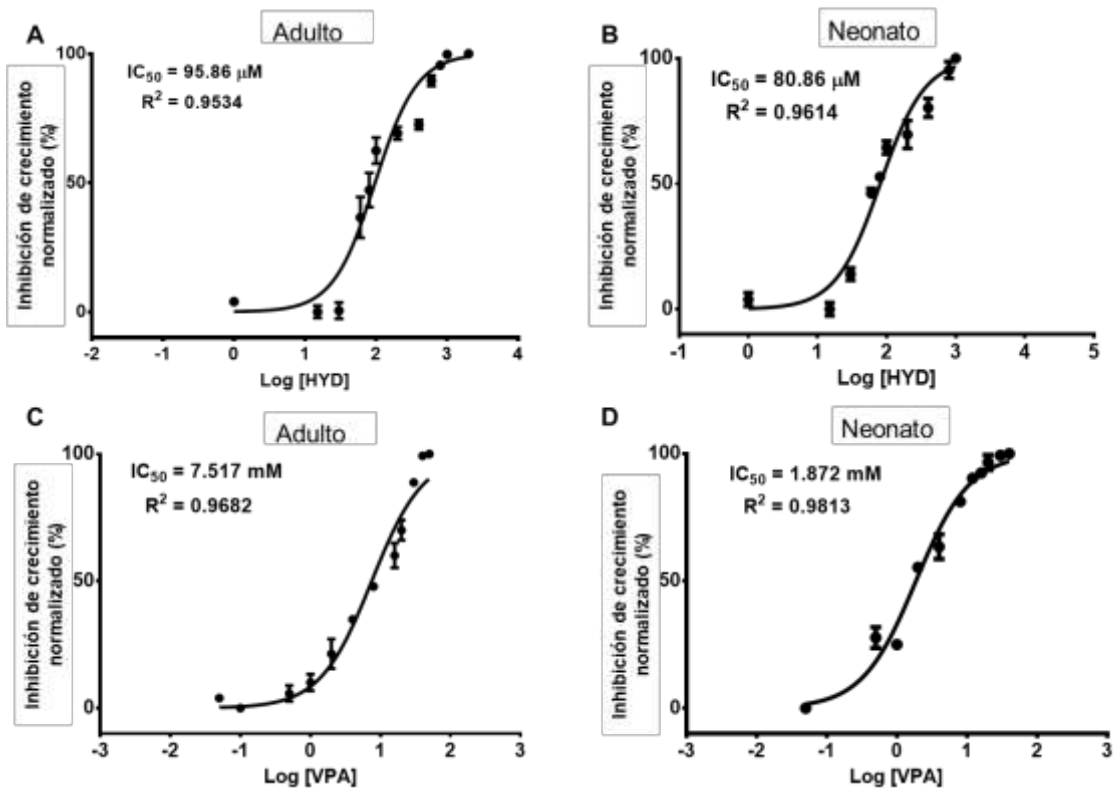


Figura 6. La concentración media inhibitoria (IC_{50}) de hidralazina (HYD) y ácido valproico (VPA) en fibroblastos de adulto y neonato. Los valores de IC_{50} para HYD (panel A y B) y VPA (panel D y C) en fibroblastos adultos y neonato se determinaron mediante el ajuste de la curva dosis-respuesta a 72 h aplicando el método analítico del log (inhibición). Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se muestran los valores de R^2 .

Con el objetivo de evaluar los niveles de expresión de los genes de pluripotencia por el efecto individual y combinado de los fármacos, fibroblastos de adulto y neonato fueron expuestos a hidralazina 30 μ M y ácido valproico 1 mM por 72 h. En fibroblastos de adulto, el análisis por RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR), mostró que la hidralazina incrementa tres veces la expresión del gen *OCT4* (Figura 7A). Además, se observó que la combinación de los fármacos anula el incremento provocado por la hidralazina sobre la expresión de *OCT4*. Al evaluar los fibroblastos de neonato no se observó una diferencia en la expresión de *OCT4* por el efecto de los fármacos (Figura 7A). Después, se decidió evaluar por RT-qPCR la expresión de los genes *NANOG*, *cMYC* y *KLF4*, relacionados con el proceso de reprogramación celular en ambas líneas celulares. Al evaluar la expresión de *NANOG* se detectó un incremento en los niveles de transcrito de cinco y dos veces por efecto individual de la hidralazina y ácido valproico en fibroblastos de adulto, respectivamente (Figura 7B). Para el caso de los fibroblastos de neonato, se observó una tendencia al incremento en la expresión de *NANOG* por efecto de la hidralazina, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo. Similar a lo observado con los niveles de expresión de *OCT4*, al combinar ambos fármacos no se observó un cambio en la expresión de *NANOG* en ambas líneas celulares. Al analizar la expresión del gen *cMYC* se observó una disminución en la expresión por efecto del ácido valproico y la combinación de los fármacos en fibroblastos de adulto (Figura 7C). Contrario a lo previamente observado, los fibroblastos de neonato mostraron un incremento en la expresión del gen *cMYC* por efecto del ácido valproico y su combinación con hidralazina (Figura 7C). Al evaluar la

expresión del gen *KLF4* no se detectó un cambio por efecto de los fármacos en ambas líneas celulares (Figura 7D). Al evaluar al factor *SOX2*, no fue posible determinar su nivel de expresión en fibroblastos humanos. En conclusión, se observó que la hidralazina induce la expresión de los genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG* en fibroblastos humanos.

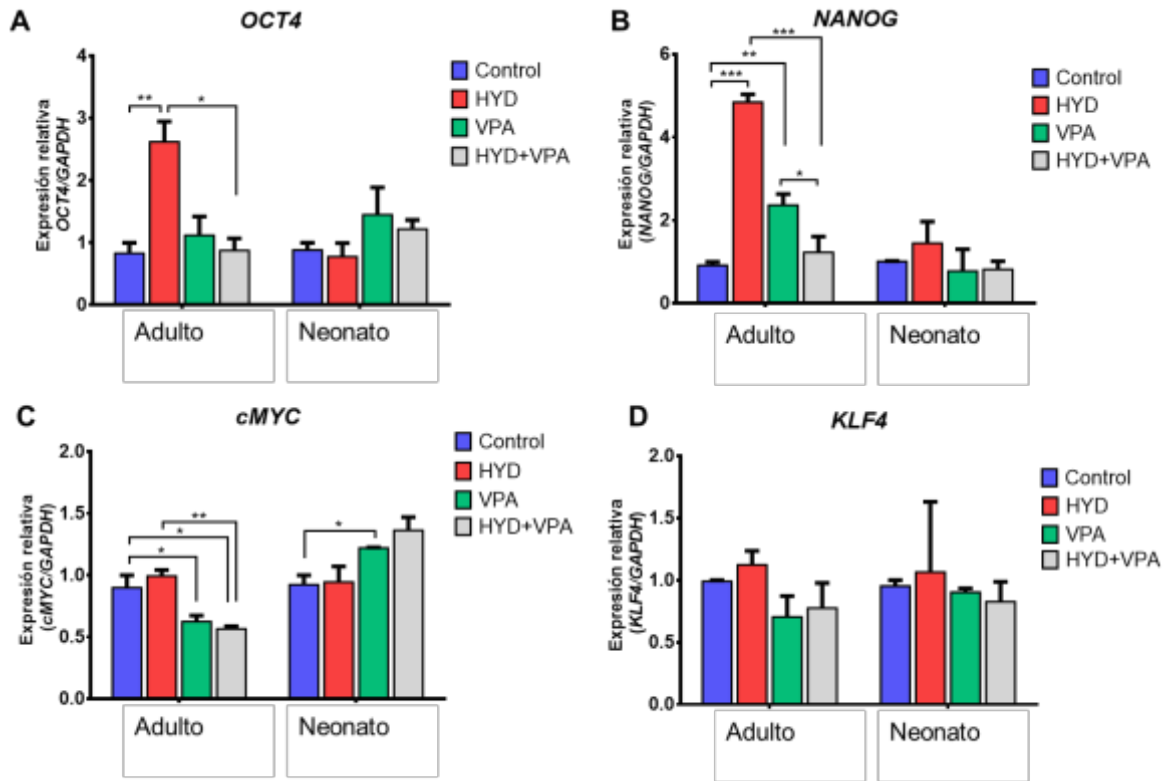


Figura 7. Evaluación de la expresión de genes de pluripotencia por efecto de la hidralazina (HYD) y ácido valproico (VPA). Se realizaron ensayos de RT-qPCR para la evaluación de los genes *OCT4* (panel A), *NANOG* (panel B), *cMYC* (panel C) y *KLF4* (panel D). Los fibroblastos de adultos y neonato fueron tratados por 72 h con HYD 30 μ M (rojo), VPA 1 mM (verde) o la combinación de ambos (gris). Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se incluyó para referencia un grupo control sin tratamiento (azul). Se utilizó la prueba t de *Student* para las comparaciones entre grupos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

Se decidió evaluar los patrones de metilación en las regiones promotoras de los genes *OCT4* y *NANOG* por efecto de hidralazina. El porcentaje de metilación (5mC) en sitios 5'-CCGG-3' específicos de las regiones promotoras de *OCT4* y *NANOG* se determinó por digestión enzimática acoplada a PCR cuantitativa. Contrario a lo esperado, nuestros resultados no reflejan una posible disminución del porcentaje de metilación en las regiones promotoras de los genes evaluados. En el caso de los fibroblastos de adulto no se observa un cambio en el porcentaje de metilación de los sitios analizados (Figuras 8B y 8C). Por otro lado, los fibroblastos de neonato mostraron una tendencia al incremento en el porcentaje de metilación, particularmente en los sitios evaluados para la región promotora de *NANOG* (Figura 8E). Es posible que este efecto sea consecuencia de una mayor sensibilidad a la hidralazina por parte de los fibroblastos de neonato, pero es necesario realizar otros estudios para definirlo. Conjuntamente, los resultados muestran que la hidralazina 30 μ M por 72 h no disminuye la metilación del DNA en fibroblastos de adulto y neonato.

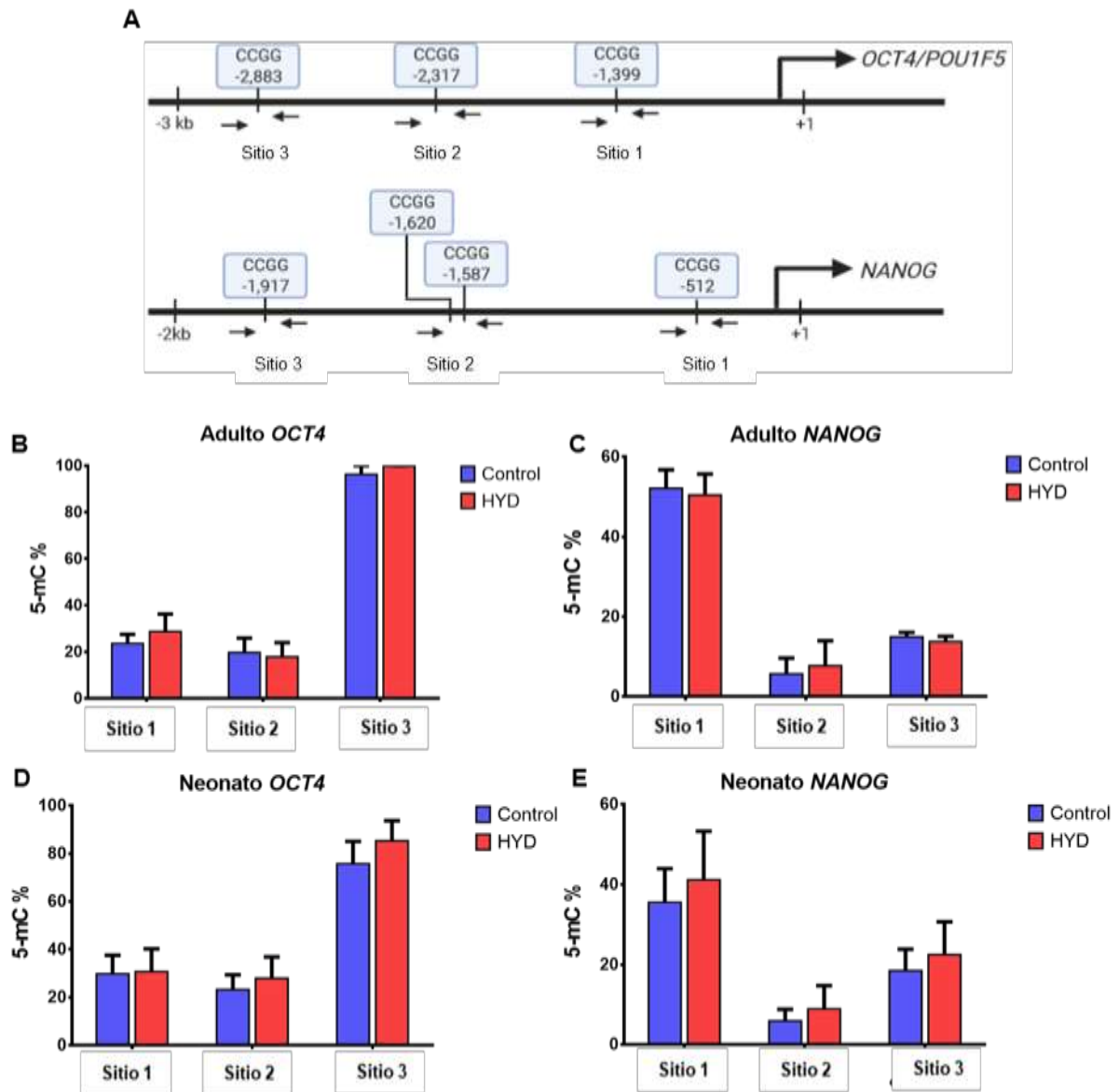


Figura 8. Análisis de metilación de sitios CpG de la región promotora de *OCT4* y *NANOG* en fibroblastos de adulto y neonato por efecto de hidralazina. Panel A, representación esquemática de los sitios 5'-CCGG-3' en los promotores *OCT4* y *NANOG*. Análisis de metilación de los sitios CpG de los promotores *OCT4* y *NANOG* en fibroblastos adultos (panel B y C) y neonato (panel D y E), respectivamente. Los fibroblastos adultos y neonato fueron tratados durante 72 h con HYD 30 μ M (rojo) y se incluyeron grupos control sin tratamiento (azul). Los valores se expresan como

media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba t de *Student* para las comparaciones entre grupos.

Con la intención de observar el efecto de hidralazina sobre genes clave en el proceso de remodelación epigenética, se evaluó por RT-qPCR los niveles de expresión de los genes *TET3* y *DNMT1* involucrados en los procesos de desmetilación y metilación de DNA, respectivamente. Al analizar la expresión del gen *TET3* no se observó un cambio significativo en ambas líneas celulares, sin embargo, fue evidente la tendencia al incremento en fibroblastos de neonatos (Figura 9A). Asimismo, al evaluar la expresión de la *DNMT1* se observó una disminución significativa en su expresión por efecto de la hidralazina, no obstante, esta disminución únicamente se observó en fibroblastos de neonato (Figura 9B). A continuación, se decidió evaluar la expresión de los genes *ARI1A* y *ARID2*, ambos involucrados con complejos remodeladores de la cromatina. Los análisis de RT-qPCR mostraron que la expresión de *ARI1A* y *ARID2* disminuyeron 20% (Figura 9C) y 21% (Figura 9D), respectivamente, en fibroblastos de neonato. Los fibroblastos de adulto no mostraron cambios significativos. Lo anterior confirma el efecto de la hidralazina en el epigenoma de los fibroblastos humanos.

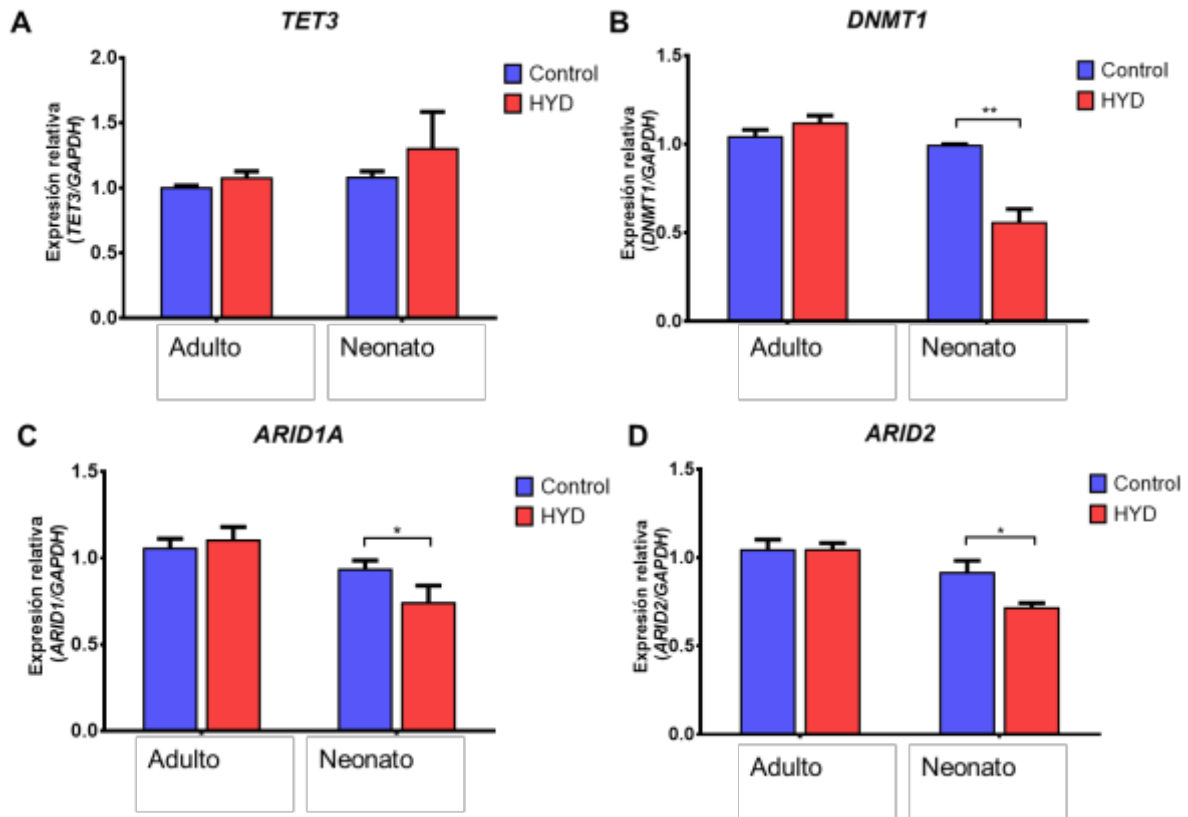


Figura 9. Expresión de genes implicados en la metilación del DNA y complejos modificadores de la cromatina. Evaluación de los genes *TET3* (panel A) y *DNMT1* (panel B), *ARID1A* (panel C) y *ARID2* (panel D) en fibroblastos de adulto y neonato. Los fibroblastos adulto y neonato fueron tratados durante 72 h con HYD 30 μ M (rojo) y se incluyeron grupos control sin tratamiento (azul). Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba t de *Student* para las comparaciones entre grupos. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Al comprobar que la hidralazina tiene un efecto sobre la expresión de genes de pluripotencia y de genes modificadores del epigenoma, se decidió evaluar su efecto sobre la generación de *iPSCs* a partir de fibroblastos de adulto y neonato. Se diseñó un esquema de tratamiento con hidralazina 30 μM en las etapas iniciales del proceso de reprogramación (Figura 10A). En ambas líneas celulares, se monitoreó periódicamente la formación progresiva de colonias con fenotipo de células pluripotentes. Estas colonias generadas se caracterizaron por un alto grado de compactación, bordes definidos y redondeados, y con un núcleo de gran tamaño (Figura 10B). Para evaluar la eficiencia de reprogramación se contaron el número total de colonias generadas para ambas líneas celulares. El criterio de selección se realizó con base en la morfología característica de las colonias de células pluripotentes humanas descritas por Healy y Ruban [22] y por Schwartz y colaboradores [21]. Se observó que el tratamiento con hidralazina no incrementó el número de colonias reprogramadas en fibroblastos de adulto (Figura 10C) y neonato (Figura 10D). Finalmente, las colonias seleccionadas de adulto y neonato fueron caracterizadas con ensayos de inmunofluorescencia por la detección de los marcadores de pluripotencia OCT4, NANOG, SOX2 y el marcador de superficie SSEA4. Todas las colonias seleccionadas mostraron la expresión de los marcadores mencionados. Esto nos confirmó que el proceso de reprogramación fue exitoso en fibroblastos de adulto (Figura 11A) y neonato (Figura 11B) en colonias controles y aquellas expuestas a hidralazina. En conjunto, estos resultados demuestran que la hidralazina 30 μM no aumenta el número de colonias de células pluripotentes en fibroblastos de adulto y neonato, pero no modifica la generación de células reprogramadas.

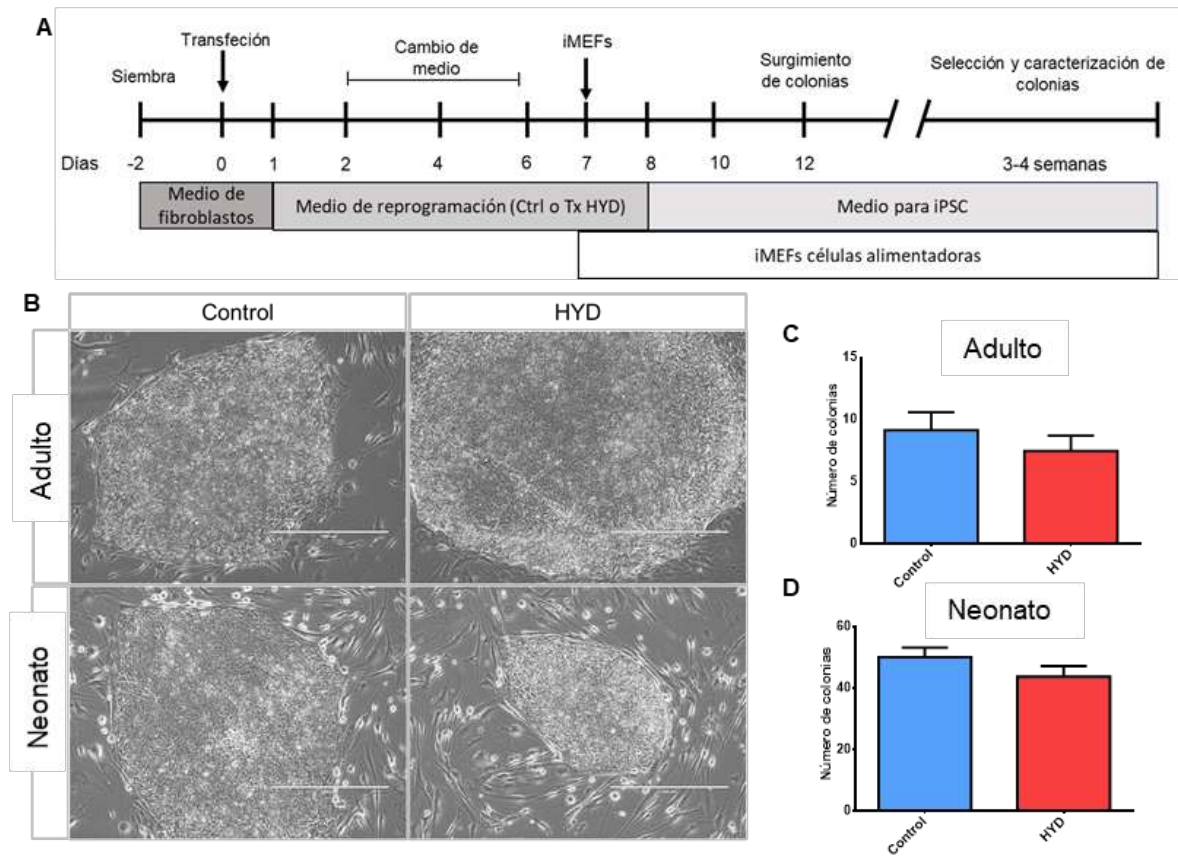


Figura 10. Evaluación de la eficiencia de reprogramación por efecto de la hidralazina (HYD) en fibroblastos adultos y neonato. Panel A, esquema de generación de *iPSC* con o sin HYD 30 μ M. Panel B, imágenes representativas de la morfología característica de las colonias de *iPSC* en fibroblasto de adultos y neonato. La escala representa 400 μ m. Número de colonias generadas con o sin tratamiento de HYD en fibroblastos adulto (panel C) y neonato (panel D). *iMEFs*, fibroblastos embrionarios de ratón inactivados mitóticamente. Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba *t* de *Student* para las comparaciones entre grupos.

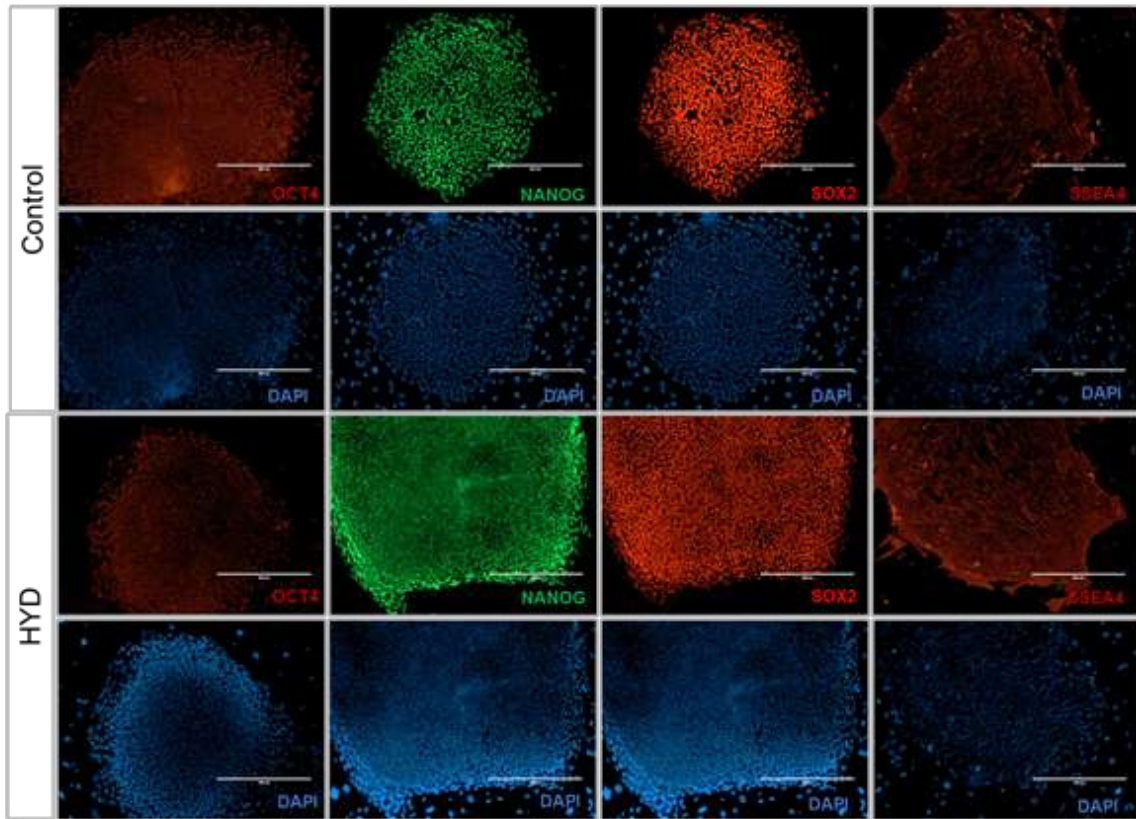
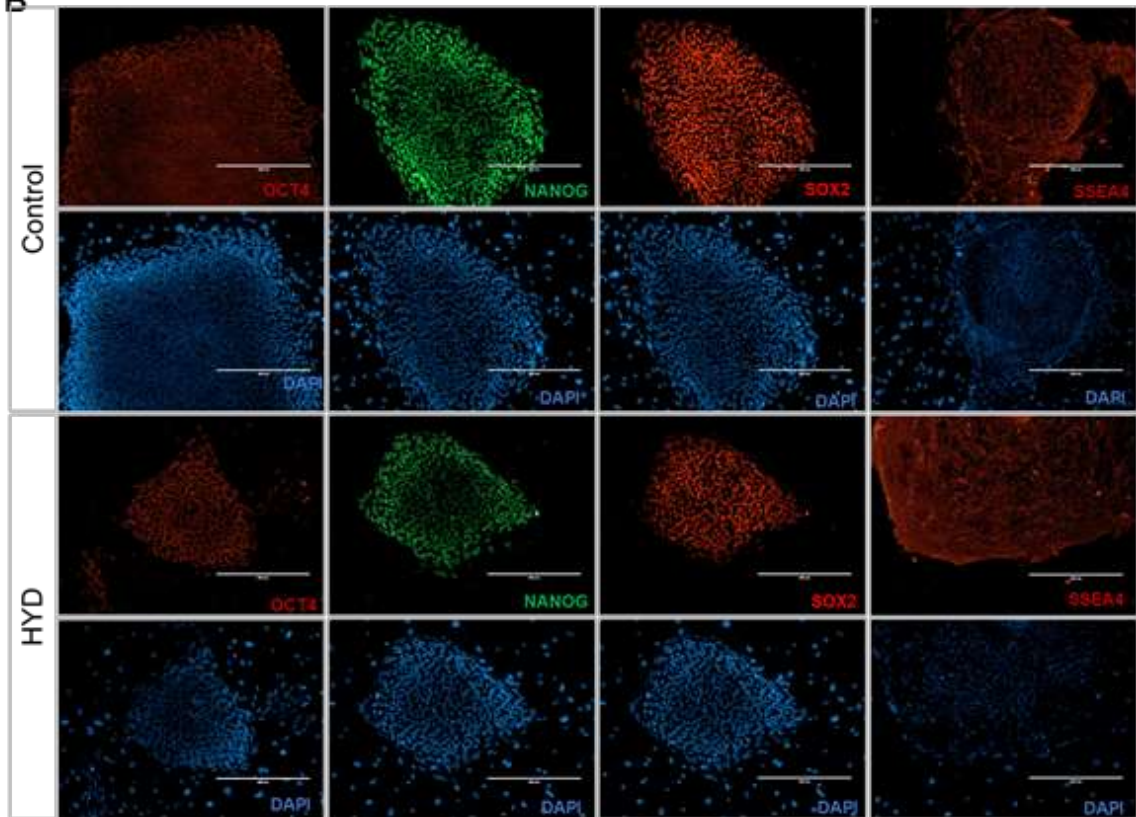
A**B**

Figura 11. Caracterización de colonias *iPSC* generadas a partir de fibroblastos de adulto y neonato. Detección de marcadores de pluripotencia *OCT4* (rojo), *NANOG* (verde), *SOX2* (rojo) y *SEE4* (rojo) por inmunofluorescencia en colonias *iPSC* generadas a partir de fibroblastos adultos (panel A) y neonato (panel B). Se realizó la contratinción con el colorante DAPI (azul). La escala representa 400 μm .

Con la intención de identificar el posible mecanismo por el cual la hidralazina modifica la expresión de *OCT4* y *NANOG*, se decidió evaluar los blancos moleculares de la hidralazina. Previamente, se ha reportado que la hidralazina ocasiona la translocación nuclear del factor NRF2, regulador de genes de enzimas antioxidantes [24] y la estabilización del factor inducible de hipoxia HIF1A [25]. Ambos factores regulan la expresión de los genes *OCT4* y *NANOG* [26,27]. Contrario a lo reportado, se observó que la hidralazina no modifica la localización del factor NRF2 (Figura 12A) en fibroblastos de neonato. Además, en ensayos preliminares, hemos observado que la hidralazina estabiliza al factor HIF1A lo que ocasiona su traslocación a núcleo (Figura 12A). Esto se corroboró con el aumento en los niveles de transcrito del factor *HIF1A* por efecto de la hidralazina (Figura 12B) en ambas líneas celulares. Nuestros datos podrían sugerir una relación entre la hidralazina, el factor HIF1A y el incremento en la expresión de *OCT4* y *NANOG* por efecto de la hidralazina. Sin embargo, es necesario determinar en nuestro estudio la interacción de HIF1A por efecto de la hidralazina con las regiones promotoras de ambos genes.

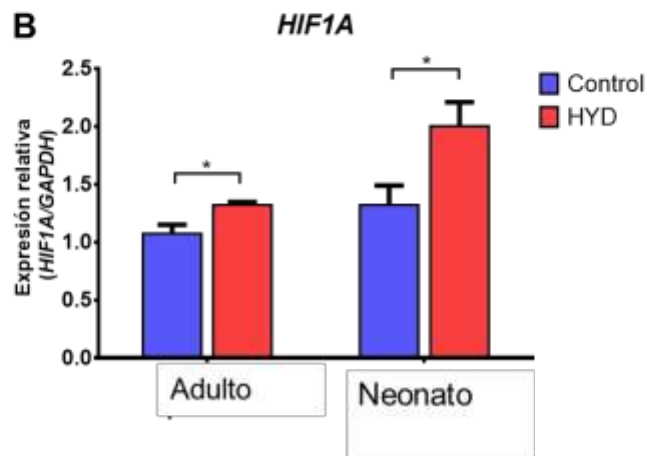
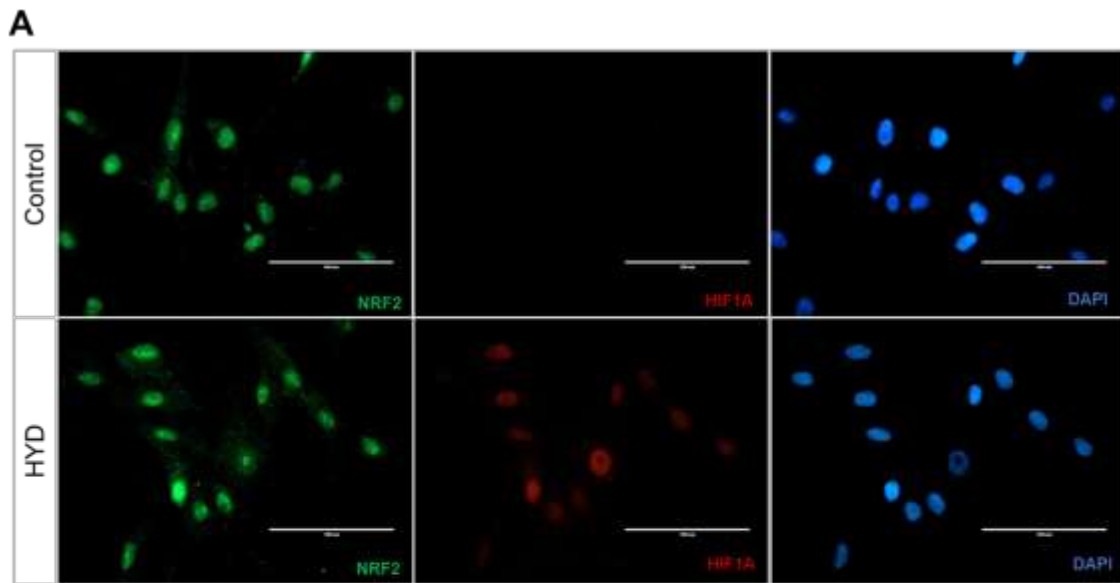


Figura 12. Evaluación de blancos moleculares modificados por la hidralazina. Panel A, localización subcelular de los factores NRF2 (verde) y HIF1A (rojo) en fibroblastos de neonato. Se realizó la contratinción con el colorante DAPI (azul). La escala representa 100 μm . Panel B, evaluación de la expresión del gen *HIF1A* en fibroblastos de adulto y neonato normalizados con la expresión del gen *GAPDH*. Los valores se expresan como media \pm SEM de tres experimentos independientes. Se utilizó la prueba t de *Student* para las comparaciones entre grupos. *, $P < 0.05$.

4. Discusión

En este estudio descubrimos que la hidralazina modifica la expresión de genes de pluripotencia regulados a través de la metilación del DNA y complejos remodeladores de la cromatina, pero no incrementa el número de colonias de fibroblastos de adulto y neonato reprogramadas.

La regulación transcripcional de los factores *OCT4* y *NANOG* se relaciona con el mantenimiento de la red de pluripotencia [28], oncogénesis [29] y reprogramación celular [30]. Los reportes relacionados con la regulación transcripcional de *OCT4* y *NANOG* en células normales diferenciadas son escasos. Nuestros hallazgos demuestran por primera vez que la hidralazina incrementa la expresión de *OCT4* y *NANOG* en fibroblastos humanos a las 72 h de tratamiento. Lo anterior contrasta con lo reportado por O'Driscoll y colaboradores, quienes señalan que la hidralazina disminuye los niveles de expresión de *OCT4* en células P19 [31]. La discrepancia entre resultados es atribuida principalmente a la metodología utilizada para la evaluación de los niveles de expresión de *OCT4*, el modelo celular utilizado para los ensayos, la concentración de hidralazina y el tiempo de exposición al fármaco. Primero, el análisis de expresión que se realizó en este trabajo fue de manera cuantitativa por PCR en tiempo real, a diferencia del ensayo cualitativo de O'Driscoll y colaboradores [31]. Segundo, nuestro esquema experimental está enfocado al tratamiento de células somáticas humanas normales, a diferencia de las células P19, derivadas de un teratocarcinoma de ratón. Lo anterior es de suma importancia debido a que la regulación transcripcional, epigenética y arquitectura del genoma será distinta en células P19 con características pluripotentes y en fibroblastos humanos normales. Finalmente, una diferencia más a considerar en ambos reportes

es la concentración y tiempos de exposición al fármaco, los cuales fueron en nuestro estudio más altos o bajos, y por menor tiempo, respectivamente.

La mayoría de los reportes que evalúan el efecto de la hidralazina sobre la regulación transcripcional de genes se enfocan, principalmente, en su reposicionamiento como tratamiento adyuvante en terapias contra el cáncer. La hidralazina se ha vinculado a la reactivación de genes supresores de tumores en regiones promotoras hipermetiladas en líneas celulares derivadas de cánceres [10,32–34]. Asimismo, en modelos *in vivo* e *in vitro* de fibrosis renal, el tratamiento con hidralazina demostró revertir la metilación aberrante en regiones regulatorias vinculadas con la patología [35]. La reactivación de la expresión génica por efecto de la hidralazina se realiza, en gran parte, por inhibición de las DNMTs [36,37]. Nuestros hallazgos validan el efecto inhibitorio de la hidralazina sobre la expresión del gen *DNMT1*. Sin embargo, nuestros análisis de las regiones promotoras de *OCT4* y *NANOG* no muestran correlación entre el incremento en la expresión de los genes de pluripotencia y disminución de los sitios CpG evaluados. Contrario a lo esperado, observamos una tendencia al incremento en la metilación del DNA. Es importante señalar que el ensayo realizado para la evaluación de sitios CpG en los promotores de *OCT4* y *NANOG* se limitan a la identificación de la secuencia 5'-CCGG-3' reconocida por las enzimas *MspI* y *HpaII*. Es recomendable complementar estos análisis con técnicas que permitan evaluar el total de la región promotora, como lo es el método de secuenciación por bisulfito [38]. Además, en células somáticas *OCT4* y *NANOG* se sitúan en zonas de heterocromatina, por lo cual aún no está definido si 72 h de tratamiento con hidralazina son suficientes para modificar la metilación en los sitios CpG de las regiones promotoras evaluadas.

Se han reportado otros mecanismos de regulación epigenética por efecto de la hidralazina independientes de la inhibición de las DNMTs. Dehghan y colaboradores reportaron la correlación entre la activación de las deacetilasas de histonas SIRT1 y SIRT5 por efecto de la hidralazina y la resistencia a estrés en *C. elegans* [39]. Asimismo, Tampe y colaboradores demostraron que la desmetilación inducida por la hidralazina está mediada por mecanismos de desmetilación activa, específicamente por la proteína TET3, y no dependientes de la inhibición de la DNMT1 [35]. Nuestros análisis de expresión del gen *TET3* muestran una tendencia al incremento por efecto de la hidralazina. Además, observamos que la hidralazina disminuye los niveles de expresión de los genes *ARID1A* y *ARID2*, ambos miembros de la familia del complejo remodelar de la cromatina SWI/SNF. Interesantemente, la disminución en la expresión de *ARID1A* y *ARID2* está relacionada con reprogramación epigenética y oncogénesis [40,41]. Lo anterior aporta un nuevo mecanismo de regulación epigenética mediado por hidralazina. Estudios complementarios son necesarios para determinar el efecto que tiene la disminución de la expresión de los genes *ARID1A* y *ARID2*, sobre la estructura de la cromatina.

La inhibición de la actividad de la DNMT1 está relacionada con un aumento en la eficiencia de reprogramación [42]. Nuestros análisis de expresión de los genes de pluripotencia *OCT4* y *NANOG* y los genes *DNMT1*, *TET3*, *ARID1A* y *ARID2* justifican el uso de la hidralazina como fármaco candidato para aumentar la eficiencia de reprogramación. Sin embargo, la hidralazina 30 μ M no generó cambios en el número de colonias de células pluripotentes reprogramadas. Esta discrepancia podría estar relacionada con el esquema de tratamiento utilizado durante la

reprogramación, la concentración del fármaco y el método de reprogramación utilizado.

Se ha reportado que el factor NRF2, involucrado en la regulación de genes de enzimas antioxidantes, y el factor HIF1A, regulador transcripcional de la respuesta celular a condiciones de hipoxia, son blancos de la hidralazina. El factor NRF2 es translocado al núcleo por efecto de la hidralazina en células SH-SY5Y [24]. No obstante, nuestros resultados muestran que el factor NRF2 se localiza mayoritariamente en los núcleos de los fibroblastos. Esta diferencia la atribuimos al modelo celular utilizado. Asimismo, la hidralazina inhibe la degradación del factor HIF1A al mimetizar condiciones de hipoxia [25]. Confirmamos que la hidralazina incrementó la expresión de HIF1A, lo estabiliza y promueve su translocación al núcleo en fibroblastos de neonato. Es necesario confirmar si existe una relación del factor de transcripción HIF1A con la región promotora de los genes *OCT4* y *NANOG*.

Es importante señalar que los genes de pluripotencia también están involucrados en procesos oncogénicos [43]. Los cuatro factores Yamanaka desempeñan roles en el mantenimiento y agresividad de diferentes tipos de cánceres [44,45]. Actualmente, el reposicionamiento de fármacos ha hecho que la combinación de los fármacos hidralazina y ácido valproico, bajo la marca comercial Transkrip®, esté indicado como tratamiento coadyuvante para algunos cánceres. Además, algunos reportes indican que la combinación hidralazina y ácido valproico tiene un efecto antiproliferativo y antimetastásico en líneas celulares derivadas de cáncer [12]. También, la combinación hidralazina y ácido valproico disminuye los niveles de transcritos de oncogenes y genes prometastásicos en células NIH 3T3-*Ras* [46]. Nuestros resultados indican que el ácido valproico anula el efecto inductor

de la hidralazina sobre la expresión de *OCT4* y *NANOG* y la combinación de ambos fármacos disminuyó la expresión de *cMYC*. Lo anterior sugiere que los cambios generados en la expresión de los genes de pluripotencia por la combinación hidralazina y ácido valproico podría estar relacionada con el efecto anticanceroso de la combinación de los fármacos.

Cabe mencionar que a pesar de que el cultivo celular, los tratamientos y ensayos de reprogramación se llevaron a cabo bajo las mismas condiciones para ambos modelos celulares, observamos diferencia en la respuesta a los fármacos evaluados. Esto lo podemos notar claramente en los ensayos de sensibilidad a los fármacos, los análisis de expresión y el número total de colonias *iPSCs* generadas entre fibroblastos de adulto y neonato. Algunos reportes indican que la actividad de las enzimas metabolizadoras de fármacos cambia significativamente de la edad fetal a la adulta [47,48]. Atribuimos estas diferencias observadas a patrones relacionados con la edad cronológica de las líneas celulares utilizadas en este trabajo, pues se obtuvo un mayor efecto en las células de neonato que en las de adulto.

Somos conscientes de las limitaciones en nuestra estrategia experimental con los ensayos de expresión al evaluar genes de pluripotencia en un modelo de células somáticas humanas. Es recomendable complementar nuestros análisis de expresión con las metodologías propuestas por Li y colaboradores [49] y Hou y colaboradores [50]. En la primera, los autores diseñaron un sistema de identificación de compuestos activadores de los genes *OCT4* y *NANOG* basados en el sistema de ensayo de luciferasa [49]. Hou y colaboradores generaron ratones transgénicos que expresan el gen reportero *GFP* bajo el control del promotor de *OCT4* [50]. La aplicación de ambas metodologías permitirá confirmar o no el efecto observado en

nuestros ensayos de expresión. Conjuntamente, el enfoque experimental planteado representa un primer abordaje en el estudio de fármacos epigenéticos sobre la expresión de genes de pluripotencia.

5. Conclusión

Los fibroblastos de adulto y neonato son un modelo celular ampliamente utilizado para la evaluación de fármacos epigenéticos como la hidralazina y el ácido valproico, que afectan la reprogramación de células somáticas.

En este trabajo demostramos que, en fibroblastos de adulto y neonato, la hidralazina modula la expresión de grupos de genes involucrados con la inducción de la pluripotencia y factores modificadores del epigenoma. El ácido valproico no resultó adecuado para continuar los ensayos de reprogramación celular en el esquema de tratamiento utilizado.

La hidralazina y el ácido valproico tienen efectos limitados sobre la regulación transcripcional de los genes de pluripotencia, que tienen niveles de expresión basal y diferencias funcionales. Por ello creemos que debe evaluarse el efecto de ambos fármacos en células troncales con características multipotentes y pluripotentes, para explorar si en ellas ocurren los efectos observados en los ensayos de expresión, reprogramación y análisis epigenético aquí descritos.

La perspectiva principal de este trabajo es que el tratamiento con hidralazina, aislada o en combinación con otros moduladores epigenéticos, es una opción prometedora para inducir la expresión de genes de pluripotencia y complejos remodeladores de la cromatina. Estos estudios permitirían además explorar el efecto de la hidralazina sobre firmas epigenéticas como la acetilación, la metilación de histonas y la evaluación global de regiones metiladas en el DNA.

6. Referencias

1. Inoue H, N Nagata, H Kurokawa and S Yamanaka (2014). iPS cells: a game changer for future medicine. *EMBO J* 33: 409–417.
2. Takahashi K and S Yamanaka (2006). Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126: 663–676.
3. Takahashi K, K Tanabe, M Ohnuki, M Narita, T Ichisaka, K Tomoda and S Yamanaka (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131: 861–872.
4. Pennarossa G, A Zenobi, CE Gandolfi, EFM Manzoni, F Gandolfi and TAL Brevini (2015). Erase and Rewind: Epigenetic Conversion of Cell Fate. *Stem Cell Rev Reports* 1–8.
5. Kim K, A Doi, B Wen, K Ng, R Zhao, P Cahan, J Kim, MJ Aryee, H Ji, LIR Ehrlich, A Yabuuchi, A Takeuchi, KC Cunniff, H Hongguang, O Naveiras, TJ Yoon, RA Irizarry and GQ Daley (2010). Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature* 467: 285–289.
6. Rim JS, KL Strickler, CW Barnes, LL Harkins, J Staszkievicz, JM Gimble, GH Leno and KJ Eilertsen (2012). Temporal epigenetic modifications differentially regulate ES cell-like colony formation and maturation. *Stem Cell Discov* 2: 45–57.
7. Soufi A, G Donahue and KS Zaret (2012). Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome. *Cell* 151: 994–1004.
8. Aguirre-Vazquez A, LA Salazar-Olivo, X Flores-Ponce, AL Arriaga-Guerrero, D Garza-Rodríguez, ME Camacho-Moll, F Castorena-Torres, I Velasco and M

- Bermúdez de Leon (2021). 5-Aza-2'-Deoxycytidine and Valproic Acid in Combination with CHIR99021 and A83-01 Induce Pluripotency Genes Expression in Human Adult Somatic Cells. *Molecules* 29: 1–12.
9. Ashburn TT and KB Thor (2004). Drug repositioning: Identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3: 673–683.
10. Csoka AB and M Szyf (2009). Epigenetic side-effects of common pharmaceuticals: A potential new field in medicine and pharmacology. *Med Hypotheses* 73: 770–780.
11. Reece PA (1981). Hydralazine and related compounds: Chemistry, metabolism, and mode of action. *Med Res Rev* 1: 73–96.
12. Duenas-Gonzalez A, J Coronel, L Cetina, A Gonzalez-Fierro, A Chavez-Blanco and L Taja-Chayeb (2014). Hydralazine-valproate: a repositioned drug combination for the epigenetic therapy of cancer. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 10: 1433–1444.
13. Kao Y-H, C-C Cheng, Y-C Chen, C-C Chung, T-I Lee, S-A Chen and Y-J Chen (2011). Hydralazine-induced promoter demethylation enhances sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase and calcium homeostasis in cardiac myocytes. *Lab Invest* 91: 1291–1297.
14. Bruni J and BJ Wilder (1979). Valproic Acid: Review of a New Antiepileptic Drug. *Arch Neurol* 36: 393–398.
15. Marchion DC, E Bicaku, Al Daud, DM Sullivan and PN Munster (2005). Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65: 3815–3822.
16. Phiel CJ, F Zhang, EY Huang, MG Guenther, MA Lazar and PS Klein (2001).

Histone Deacetylase is a Direct Target of Valproic Acid, a Potent Anticonvulsant, Mood Stabilizer, and Teratogen. *J Biol Chem* 276: 36734–36741.

17. Domingo-Reines J, A López-ornelas, R Montes, T Romero, JL Rodriguez-llamas, R Lara-rodarte, F González-pozas, V Ayllon, P Menendez, I Velasco and V Ramos-mejia (2017). Hoxa9 and EGFP reporter expression in human Embryonic Stem Cells (hESC) as useful tools for studying human development. *Stem Cell Res* 1–5.

18. De La Cruz-Hernandez E, JL Medina-Franco, J Trujillo, A Chavez-Blanco, G Dominguez-Gomez, E Perez-Cardenas, A Gonzalez-Fierro, L Taja-Chayeb and A Dueñas-Gonzalez (2015). Ribavirin as a tri-targeted antitumor repositioned drug. *Oncol Rep* 33: 2384–2392.

19. Livak KJ and TD Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408.

20. Okita K, Y Matsumura, Y Sato, A Okada, A Morizane, S Okamoto, H Hong, M Nakagawa, K Tanabe, K Tezuka, T Shibata, T Kunisada, M Takahashi, J Takahashi, H Saji and S Yamanaka (2011). A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods* 8: 409–412.

21. Schwartz PH, DJ Brick, HE Nethercott and AE Stover (2011). Traditional Human Embryonic Stem Cell Culture Philip. *Methods Mol Biol* 107–123.

22. Healy L and L Ruban (2015). Atlas of Human Pluripotent Stem Cells in Culture (Springer).

23. Li R, J Liang, S Ni, T Zhou, X Qing, H Li, W He, J Chen, F Li, Q Zhuang, B Qin, J Xu, W Li, J Yang, Y Gan, D Qin, S Feng, H Song, D Yang, B Zhang, L Zeng, L

Lai, MA Esteban and D Pei (2010). A mesenchymal-to-Epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell* 7: 51–63.

24. Guo X, C Han, K Ma, Y Xia, F Wan, S Yin, L Kou and T Wang (2019). Hydralazine Protects Nigrostriatal Dopaminergic Neurons From MPP + and MPTP Induced Neurotoxicity : Roles of Nrf2-ARE Signaling Pathway. *Front Neurol* 10: 1–13.

25. Chatard M, C Puech, N Perek and F Roche (2017). Hydralazine is a Suitable Mimetic Agent of Hypoxia to Study the Impact of Hypoxic Stress on in Vitro Blood-Brain Barrier Model. *Cell Physiol Biochem* 42: 1592–1602.

26. Jang J, Y Wang, MA Lalli, E Guzman, SE Godshalk, H Zhou and KS Kosik (2016). Primary Cilium-Autophagy-Nrf2 (PAN) Axis Activation Commits Human Embryonic Stem Cells to a Neuroectoderm Fate. *Cell* 165: 410–420.

27. Prigione A, N Rohwer, S Hoffmann, B Mlody, K Drews, R Bukowiecki, K Blümlein, EE Wanker, M Ralser, T Cramer and J Adjaye (2014). HIF1 α modulates cell fate reprogramming through early glycolytic shift and upregulation of PDK1-3 and PKM2. *Stem Cells* 32: 364–376.

28. Pan G and JA Thomson (2007). Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Rep* 17: 42–49.

29. Rasti A, M Mehrzma, Z Madjd and M Abolhasani (2018). Co-expression of Cancer Stem Cell Markers OCT4 and NANOG Predicts Poor Prognosis in Renal Cell Carcinomas. *Sci Rep* 8: 1–11.

30. Tonge PD, AJ Corso, C Monetti, SMI Hussein, MC Puri, IP Michael, M Li, D-S Lee, JC Mar, N Cloonan, DL Wood, ME Gauthier, O Korn, JL Clancy, T Preiss, SM

- Grimmond, J-Y Shin, J-S Seo, CA Wells, IM Rogers and A Nagy (2014). Divergent reprogramming routes lead to alternative stem-cell states. *Nature* 516: 192–197.
31. O’Driscoll CM, JB Coulter and JP Bressler (2013). Induction of a trophoblast-like phenotype by hydralazine in the p19 embryonic carcinoma cell line. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1833: 460–467.
32. Zeisberg EM and M Zeisberg (2016). A Rationale for Epigenetic Repurposing of Hydralazine in Chronic Heart and Kidney Failure. *J Clin Epigenetics* 2: 1–5.
33. Song Y and C Zhang (2009). Hydralazine inhibits human cervical cancer cell growth in vitro in association with APC demethylation and re-expression. *Cancer Chemother Pharmacol* 63: 605–613.
34. Candelaria M, E de la Cruz-Hernandez, L Taja-Chayeb, E Perez-Cardenas, C Trejo-Becerril, A Gonzalez-Fierro, A Chavez-Blanco, E Soto-Reyes, G Dominguez, JE Trujillo, J Diaz-Chavez and A Duenas-Gonzalez (2012). Dna methylation-independent reversion of gemcitabine resistance by hydralazine in cervical cancer cells. *PLoS One* 7:.
35. Tampe B, D Tampe, EM Zeisberg, GA Muller, W Bechtel-Walz, M Koziolk, R Kalluri and M Zeisberg (2015). Induction of Tet3-dependent Epigenetic Remodeling by Low-dose Hydralazine Attenuates Progression of Chronic Kidney Disease. *EBioMedicine* 2: 19–36.
36. Deng C, Q Lu, Z Zhang, T Rao, J Attwood, R Yung and B Richardsons (2003). Hydralazine may induce autoimmunity by inhibiting extracellular signal - Regulated kinase pathway signaling. *Arthritis Rheum* 48: 746–756.
37. Hedrich CM, K Mäbert, T Rauen and GC Tsokos (2017). DNA methylation in systemic lupus erythematosus. *Epigenomics* 9: 505–525.

38. Hajkova P, O El-maarri, S Engemann, J Oswald, A Olek and J Walter (2002). DNA-Methylation Analysis by the Bisulfite-Assisted Genomic Sequencing Method. In DNA Methylation Protocols, Mills, KI and BH Ramsahoye, eds. (Springer, Totowa, NJ), pp. 143–154.
39. Dehghan E, M Goodarzi, B Saremi, R Lin and H Mirzaei (2019). Hydralazine targets cAMP-dependent protein kinase leading to sirtuin1/5 activation and lifespan extension in *C. elegans*. *Nat Commun* 10: 1–16.
40. Lakshminarasimhan R, C Andreu-Vieyra, K Lawrenson, CE Duymich, SA Gayther, G Liang and PA Jones (2017). Down-regulation of ARID1A is sufficient to initiate neoplastic transformation along with epigenetic reprogramming in non-tumorigenic endometriotic cells. *Cancer Lett* 401: 11–19.
41. Moreno T, B Monterde, L González-Silva, I Betancor-Fernández, C Revilla, A Agraz-Doblas, J Freire, P Isidro, L Quevedo, R Blanco, S Montes-Moreno, L Cereceda, A Astudillo, B Casar, P Crespo, C Morales Torres, P Scaffidi, J Gómez-Román, E Salido and I Varela (2021). ARID2 deficiency promotes tumor progression and is associated with higher sensitivity to chemotherapy in lung cancer. *Oncogene* 40: 2923–2935.
42. Rodriguez-Madoz JR, ES Jose-Eneriz, O Rabal, N Zapata-Linares, E Miranda, S Rodriguez, A Porciuncula, A Vilas-Zornoza, L Garate, V Segura, E Guruceaga, X Agirre, J Oyarzabal and F Prosper (2017). Reversible dual inhibitor against G9a and DNMT1 improves human iPSC derivation enhancing MET and facilitating transcription factor engagement to the genome. *12*: 1–20.
43. Iglesias JM, J Gumuzio and AG Martin (2016). Linking Pluripotency Reprogramming and Cancer. *Stem Cell Transl Med* 5: 1–5.

44. Semi K, Y Matsuda, K Ohnishi and Y Yamada (2013). Cellular reprogramming and cancer development. *Int J Cancer* 132: 1240–1248.
45. Steele ACHRE, RVL Wilson, EEKA Barnard, JRMC Moad, AELGIG Mills and CNRR Heer (2018). The induction of core pluripotency master regulators in cancers de fi nes poor clinical outcomes and treatment resistance. *Oncogene* 38: 4412–4424.
46. Pérez-Cárdinas, L Taja-Chayeb, J Chanona-Vilchis, E Langley, A García-Carrancá and A Dueñas-González (2018). Antimetastatic effect of epigenetic drugs , hydralazine and valproic acid , in Ras-transformed NIH 3T3 cells. *Onco Targets Ther* 11: 8823–8833.
47. Mooij MG, UI Schwarz, BAE De Koning, JS Leeder, R Gaedigk, JN Samsom, E Spaans, JB Van Goudoever, D Tibboel, RB Kim, SN De Wildt, I Care and P Surgery (2014). Ontogeny of Human Hepatic and Intestinal Transporter Gene Expression during Childhood : Age Matters. *Drug Metab Dispos* 42: 1268–1274.
48. Zhu Q, W Hou, S Xu, Y Lu and J Liu (2017). Ontogeny , aging , and gender-related changes in hepatic multidrug resistant protein genes in rats. *Life Sci* 170: 108–114.
49. Li W, E Tian, ZX Chen, GQ Sun, P Ye, S Yang, D Lu, J Xie, TV Ho, WM Tsark, C Wang, DA Horne, AD Riggs, MLR Yip and Y Shi (2012). Identification of Oct4-activating compounds that enhance reprogramming efficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 20853–20858.
50. Hou P, Y Li, X Zhang, C Liu, J Guan, H Li, T Zhao, J Ye, W Yang, K Liu, J Ge, J Xu, Q Zhang, Y Zhao and H Deng (2013). Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Science* (80-) 341: 651–654.

7. Anexo

Artículo aceptado en la revista *Molecules*.

