Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Grado

Generación y caracterización de células pluripotentes inducidas equinas

Campetella, Carla Agustina

2017

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en bibliotecadigital.exactas.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in bibliotecadigital.exactas.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Campetella, Carla Agustina. (2017). Generación y caracterización de células pluripotentes inducidas equinas. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001604_Campetella

Cita tipo Chicago:
Campetella, Carla Agustina. "Generación y caracterización de células pluripotentes inducidas equinas". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017. https://hdl.handle.net/20.500.12110/seminario_nBIO001604_Campetella

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. **Contacto:** bibliotecadigital.exactas.uba.ar
Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas

Tesis de Licenciatura

'Generación y Caracterización de Células Pluripotentes Inducidas Equinas'

Alumna: Carla Agustina Campetella
Directora: Dra. Carolina Blüguermann
Director Asistente: Dr. Adrián Ángel Mutto

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones Biotecnológicas (IIB), Universidad Nacional de San Martín (UNSAM)

Noviembre, 2017

'Generación y Caracterización de Células Pluripotentes Inducidas Equinas'

Las células madre representan un modelo experimental único para numerosas áreas de investigación en veterinaria, biología y medicina debido a su capacidad de autorrenovación y a su naturaleza pluripotente. En los últimos años el campo de las células madre pluripotentes se vio revolucionado por una nueva forma de obtención de células muy similares a las células madre embrionarias (CME), las células madre pluripotentes inducidas (CPI). Estas células son obtenidas a partir de la reprogramación de células somáticas adultas. Las CPI presentan expresión génica y proteica muy similares a las de CME y evitan los problemas presentados por las CME, dado que su costo de obtención es menor, pueden ser expandidas en gran cantidad *in vitro* y diferenciadas a distintos tipos celulares, ya sean progenitores o células terminalmente diferenciadas. Debido a esto, las CPI resultan particularmente prometedoras en el campo de la medicina regenerativa.

Los caballos tienen gran valor como animales tanto deportivos como de compañía. En la salud equina las lesiones articulares y musculo-esqueléticas son las más frecuentes, y las opciones terapéuticas disponibles actualmente sólo logran proporcionar una solución a corto plazo. En este marco, las aplicaciones terapéuticas de las células madre proporcionarían una alternativa para alcanzar terapias regenerativas que permitan la completa restauración del tejido adulto.El estudio de CPI equinas es un campo emergente que actualmente sólo cuenta con 6 trabajos a escala mundial.Si bien en todos los casos se estudió la capacidad de pluripotencia y la expresión génica y proteica de cada línea, las características descriptas difieren entre líneas, por lo que no existe un consenso entre las líneas CPI existentes.

El objetivo del presente trabajo de Tesis fue establecer, caracterizar y validar una línea de CPI equinas según los criterios actuales de pluripotencia. Las CPI fueron inducidas a partir de fibroblastos equinos embrionarios que fueron transfectados con un plásmido conteniendo las secuencias codificantes para los genes Oct4, Sox2, Klf4 y C-Myc utilizando un vector lentiviral. Se seleccionó un clon CPI para analizar su cariotipo, perfil de expresión génico y proteico, actividad de fosfatasa alcalina y capacidad de diferenciación *in vitro*. Los resultados obtenidos indican que las células obtenidas presentan características asociadas a las células pluripotentes.

ÍNDICE

Introducción……4

Células Madre……..5

Reprogramación……..…8

Células Madre en Animales Domésticos……10

Células Madre en Equinos ……11

Hipótesis y Objetivos……12

Resultados……13

Reprogramación ……..…14

Validación…… 16

Discusión……24

Materiales y Métodos……30

Bibliografía ……39

Agradecimientos……43

INTRODUCCIÓN

I. Células madre

Conrad Waddington asemejó el desarrollo embrionario normal a una pelota rodando colina abajo, desde un estado inicial pluripotente hasta uno de muchos posibles estados diferenciados finales (1). El hecho que un embrión temprano deba contener células con la capacidad de generar y diferenciarse a todos los tipos celulares adultos, y que los linajes individuales pierden potencialidad gradualmente a medida que avanzan en su camino de diferenciación, ha sido el dogma establecido por mucho tiempo (2). De esta forma, se entiende por 'célula madre' aquella célula que al dividirse genera una copia de sí misma y una célula diferenciada. Según cuántos linajes celulares pueda generar una célula madre, se define su potencia. Las células 'Totipotentes' son capaces de generar todos los tipos celulares presentes en el embrión y el adulto, células germinales y estructuras extraembrionarias. Las células 'Pluripotentes' pueden dar origen a todos los tipos celulares del embrión y el adulto y células germinales, pero no son capaces de originar las estructuras extraembrionarias necesarias para el correcto desarrollo de un individuo. Colina abajo en la topografía de Waddington, se encuentran las células 'Multipotentes', que pueden generar los distintos tipos celulares dentro de un mismo tejido, y por último , las células 'Unipotentes' que sólo pueden originar un tipo celular. Una vez que una célula se encuentra completamente diferenciada, sólo puede dividirse unas pocas veces, generando células hijas iguales a sí mismas, y su diferenciación a otro tipo celular no es posible (3).

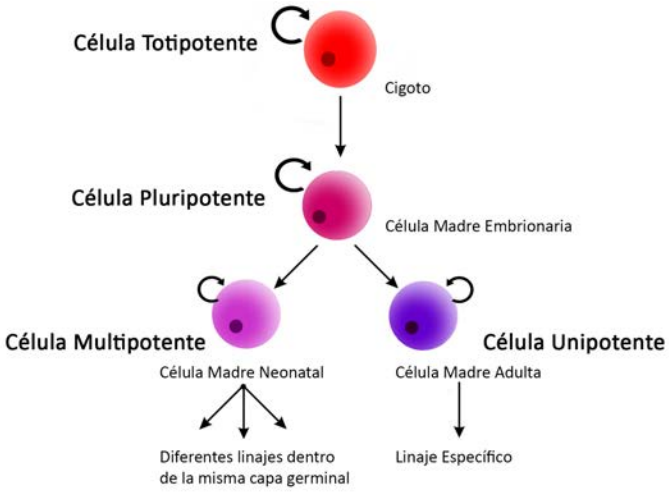

Figura 1: Esquema jerárquico de potencialidad.

El desarrollo embrionario comienza con la unión de las gametas masculina y femenina, evento denominado fecundación, resultando en la formación del cigoto. Luego de la fecundación comienza el clivaje, que comprende una serie de rápidas divisiones mitóticas en que el cigoto se divide en células más pequeñas denominadas blastómeros. Al finalizar el clivaje queda establecido el blastocisto, estadio en que sucede la

primer diferenciación estableciéndose dos tipos celulares: el macizo interno celular (MCI) y el trofoblasto (Figura 2) (4).

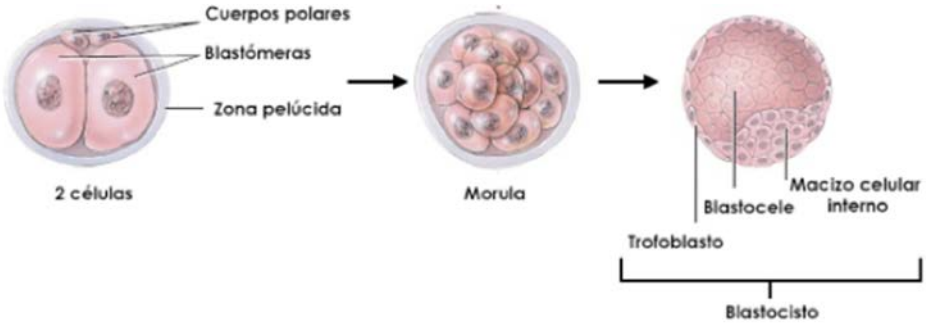

Figura 2: Esquema del desarrollo embrionario en mamíferos.

En los estadios pre-implantatorios, el embrión está compuesto por células capaces de generar todos los tipos celulares del organismo adulto. Esta amplia capacidad de desarrollo es conocida como 'Pluripotencia *Naïve'* (5). Poco antes de que ocurra la implantación, el MCI se segrega en un disco embrionario bilaminar compuesto por dos capas epiteliales, el epiblasto (dorsal) y el hipoblasto (ventral). Luego de la implantación, las células del epiblasto muestran un potencial más restringido, denominado '*Primed'* (del inglés 'preparar') (5). Durante la gastrulación se forma la banda primitiva a través de la cual migran células del epiblasto hacia el interior del embrión, mediante un proceso denominado 'Transición Epitelio Mesenquimal' (TEM). Como consecuencia de este proceso surgen tres capas embrionarias completamente comprometidas, endodermo, mesodermo y ectodermo, que junto con el trofoblasto generaran todos los tejidos embrionarios y extraembrionarios.

La derivación de Células Madre Embrionarias en murinos (6,7) y luego en humanos (8), permitió establecer un tipo celular con capacidad de autorrenovación casi ilimitada y de naturaleza pluripotente, capaz de diferenciarse y generar derivados de las tres capas embrionarias *in vitro* (8,9). Debido a esto, las CME se convirtieron en un modelo novedoso para el estudio del desarrollo embrionario y una herramienta tanto para análisis de drogas como para posibles terapias regenerativas. La derivación de CME implica el aislamiento del MCI de un blastocisto, que es luego cultivado *in vitro* en condiciones específicas. La pluripotencia de las líneas celulares así generadas dependerá del momento en el desarrollo embrionario en que se aísla las células del MCI. En ratones por ejemplo, es posible derivar líneas CME tanto en estadios pre como post-implantatorios (10-14). Actualmente se considera que las verdaderas CME murinas son obtenidas de la derivación de estadios pre-implantatorios, las cuales exhiben pluripotencia '*Naïve'in vitro*. Las líneas obtenidas a partir de estadios post-implantatorios muestran pluripotencia '*Primed'* y son conocidas como células EpiSC, que aunque son capaces de generar derivados de las tres capas no son capaces de contribuir a la formación de quimeras *in vivo* como las CME *Naïve* (5).

Las CME constituyen una herramienta única para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que definen la especificación tisular durante el desarrollo embrionario. Es posible estudiar numerosos aspectos de la embriogénesis mediante el modelo de cuerpos embrioides (CE). Los CE consisten en agregados celulares tridimensionales formados a partir de colonias de CME, y son capaces de diferenciarse a las tres capas germinales a través de un conjunto secuencial de eventos que imitan parcialmente la gastrulación. Durante los últimos 20 años las CME han demostrado ser un gran modelo *in vitro* que logra recapitular de manera fiel los eventos que ocurren durante la embriogénesis.

II. Reprogramación

En 1962 John Gurdon transfirió el núcleo de células del epitelio intestinal de rana a oocitos enucleados, obteniendo renacuajos normales (15). Esto no solo hirió el modelo reinante que consideraba la diferenciación como un hecho terminal e irreversible, sino que consistió en el primer ejemplo de reprogramación celular de células somáticas. Utilizando este método, conocido como 'Transferencia Nuclear de Células Somáticas' (SCNT por sus siglas en inglés), ha sido posible clonar distintas especies de mamíferos (por ejemplo ovinos (16), bovinos (17), caprinos (18),porcinos (19)) poniendo en evidencia que las células somáticas de mamíferos también pueden ser reprogramadas.

Los experimentos mencionados demostraron que en el citoplasma de los oocitos existen factores capaces de reprogramar células terminalmente diferenciadas. En el año 2006, Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka lograron identificar factores de transcripción capaces de reprogramar células somáticas en un método sencillo de reprogramación directa que no requiere embriones ni oocitos (20). En su trabajo seleccionaron 24 genes candidatos que codifican para factores inductores de pluripotencia en células somáticas. Estos factores fueron transfectados en fibroblastos embrionarios murinos (MEF) utilizando un sistema retroviral. Encontraron que si bien ningún factor era capaz de generar células pluripotentes por sí solo, la combinación de cuatro de ellos era suficiente. Mediante la inducción de la expresión exógena de Oct3/4 (*Octamer-binding transcription factor 3/4*), Klf4 (*Kruppel-like factor 4*), Sox2 (*Sex determining Region Y-box 2*) y C-Myc (set 'OSKM'), lograron generar células madre pluripotentes inducidas (CPI). Luego de la reprogramación, las células recuperan la capacidad para auto-renovarse y la pluripotencia, pudiendo así dar lugar a todos los tipos celulares de un organismo adulto (20). Las células reprogramadas son similares en múltiples aspectos a las CME, incluyendo la morfología, la tasa de proliferación, la expresión de antígenos de superficie, el estado epigenético y la actividad de la enzima telomerasa. Además, las CPI pueden diferenciarse a cada uno de los tipos celulares que conforman las tres capas germinales (21).De esta forma, los autores lograron demostrar que es posible inducir el estado pluripotente en células somáticas y generar un tipo celular muy similar a las CME, aunque no idéntico (20, 21).

Considerando el campo de la terapia regenerativa, resulta difícil pensar en la aplicación a gran escala de CME. Su obtención es muy dificultosa, limitando por lo tanto su disponibilidad. La utilización de estas células en terapias regenerativas se ve limitada debido a problemas de histocompatibilidad como sucede hoy en día con los trasplantes de órganos, sin mencionar los problemas éticos que representa la obtención de estas células en numerosos países en el mundo. Dado que la reprogramación de células somáticas no involucra la destrucción de embriones y que sólo se requiere de células adultas diferenciadas (como por ejemplo fibroblastos, queratinocitos, células de médula ósea o células del epitelio de la mucosa gástrica), esta

tecnología ha revolucionado el campo de estudio. Las CPI presentan expresión génica, proteica y modificaciones epigenéticas muy similares a las CME. Estas características las equiparan a las CME, y por ende son vistas como sustitutos accesibles (22).

La reprogramación de células es el resultado de la remodelación de la expresión transcripcional y epigenética de una célula somática hacia un estado tipo-CME. Esto incluye la reactivación del cromosoma X en células femeninas, la demetilación de regiones promotoras de genes encargados de inducir y mantener el estado pluripotente (por ejemplo Oct4 y Nanog), y el restablecimiento a nivel genómico de la trimetilación de las lisinas 4 y 27 de la histona 3 (H3K4me3 y H3K27me3), marcas epigenéticas características de regiones transcripcionalmente inactivas. Es entonces un proceso gradual que puede demorar varios días o semanas, y que depende de una cascada de activación de genes de autorrenovación y pluripotencia e inhibición del compromiso a un linaje determinado. En ratón, por ejemplo, se observó que este proceso requiere mantener los factores de reprogramación exógenos activos por aproximadamente diez días, momento en que el genoma se encuentra preparado para la conversión a un estado pluripotente. Esto incluye la reactivación de genes endógenos de pluripotencia (Oct4, Sox2, Nanog, etc). Cuando esto ocurre, las CPI se tornan independientes de los factores exógenos usados en la reprogramación para mantener el estado pluripotente (23).

III. Células Madre en Animales Domésticos

Con la introducción de la tecnología de reprogramación directa, se logró establecer líneas CPI en distintas especies domésticas (bovinos, equinos, porcinos, caprinos, ovinos) generalmente partiendo de fibroblastos fetales y utilizando vectores virales para la introducción de los factores necesarios para la reprogramación. Este método, entonces, permitió la derivación de células pluripotentes en especies en que la derivación de CME aún no ha sido posible. Actualmente se cuenta con gran cantidad y variedad de líneas CPI en estas especies, con propiedades de proliferación y diferenciación variables, pocas de las cuales cumplen con los requisitos de CME verdaderas (24).

Dado que las CPI son muy similares a las CME, representan una fuente potencialmente ilimitada de células pluripotentes individuo-específicas que podrían ser usadas en terapias de reemplazo celular con células autólogas, modelado de enfermedades, screening de drogas e investigación en temas relacionados a la biología del desarrollo. Actualmente existen 45 trabajos publicados describiendo generación de líneas CPI en animales de granja (17 en porcinos, 8 en bovinos, 6 en equinos, 6 en caprinos, 4 en ovinos, 4 en conejos), utilizando distintos métodos de transfección y *sets* de factores de transcripción. Estos estudios demuestran que es posible reprogramar células de animales domésticos empleando factores de transcripción ya sean especie-específico, humanos, murinos o una combinación de ellos. En la mayoría de los casos el set OSKM fue suficiente para inducir la reprogramación, en algunos casos utilizado en combinación con otros elementos para aumentar la eficiencia y la estabilidad de las líneas CPI.

En la mayoría de los casos las células reprogramadas son fibroblastos y se emplea métodos integrativos, basados en retro- o lentivirus o en transposones piggyback. La caracterización de la pluripotencia de las CPI obtenidas es generalmente determinada por la expresión de marcadores específicos de pluripotencia, capacidad de diferenciación *in vitro* y formación de teratomas en ratones inmunodeficientes.

IV. Células Madre en Equinos

Los caballos presentan un enorme valor como animales deportivos y de compañía. La salud equina es una de las principales preocupaciones para la industria, ya que el costo por lesiones y enfermedades en animales deportivos se estima en 6,5 mil millones de dólares por año a nivel mundial (25). Las lesiones articulares y musculo-esqueléticas son las más frecuentes y sólo entre el 25 y 50% de los animales lesionados logra volver a competir (26). Las opciones terapéuticas disponibles actualmente sólo logran proporcionar una solución a corto plazo y están asociadas a una elevada tasa de recurrencia de lesiones (27). Por lo tanto, la necesidad de desarrollar nuevas terapias para el tratamiento de lesiones músculo esqueléticas en caballos es evidente. En este marco, las aplicaciones terapéuticas de las células madre proporcionarían una alternativa para alcanzar terapias regenerativas que permitan la completa restauración del tejido adulto.

En comparación a otras especies, el campo de las CME equinas se encuentra actualmente poco estudiado. En 2002 Saito *et al* lograron aislar la primer línea de células equinas tipo-CME a partir de embriones criopreservados (28). Más recientemente, en 2006 y 2007 dos grupos establecieron líneas tipo-CME partiendo del MCI (29, 30). En ambos casos las células mostraron la morfología característica de CME y fueron capaces de generar derivados de las tres capas germinales. A pesar de esto no generaron teratomas al ser inyectados en ratones inmunodeficientes, y no se ha verificado su contribución a quimeras. Debido a diferencias en los métodos de marcación, falta de controles y la calidad de las imágenes, aún quedan preguntas por responder y no se ha logrado un consenso sobre qué caracteriza una verdadera línea CME equina (31). Esta incertidumbre, junto a la dificultad intrínseca de la derivación de CME y los costos asociados a la recuperación de los embriones necesarios, limita el uso de CME en terapias regenerativas. Más aún, su aplicación en estas terapias se ve impedida por problemas de histocompatibilidad.

En este contexto, el desarrollo de CPI equinas resulta particularmente atractivo. Las CPI eluden los problemas presentados por las CME, dado que su costo de obtención es menor, pueden ser expandidas en gran cantidad *in vitro* y diferenciadas a distintos tipos celulares, ya sean progenitores o células terminalmente diferenciadas. El estudio de CPI equinas es un campo emergente que actualmente sólo cuenta con 6 trabajos a escala mundial. En 2011 Nagy *et al* derivaron la primer línea CPI equina a partir de fibroblastos equinos fetales utilizando el set OKSM y un método de transfección basado en transposones (32). Seguidamente, en 2013 Breton*et al* y en 2014 Whitworth *et al* generaron CPI equinas a partir de fibroblastos adultos con el set OSKM y métodos de transfección virales (retro y lentiviral respectivamente) (33,34). Si bien en todos los casos se estudió la capacidad de pluripotencia y la expresión génica y proteica de cada línea, las características descriptas difieren entre líneas, por lo que no existe un consenso entre las líneas CPI existentes. Más aún, debido a la ausencia de verdaderas líneas CME equinas resulta muy dificultoso establecer marcadores confiables que permitan la correcta validación de las líneas CPI obtenidas.

Cabe destacar que no existe en Argentina ninguna línea equina de CPI. Por lo tanto consideramos que es de suma importancia el desarrollo de nuevas tecnologías que nos permitan explotar las ventajas de la medicina veterinaria regenerativa en nuestro país.

V. Hipótesis y Objetivos

Teniendo en cuenta lo previamente expuesto, se evidencia la necesidad de desarrollar fuentes celulares que permitan el avance de nuevos enfoques terapéuticos basados en tecnologías de medicina regenerativa. Por lo tanto, el objetivo principal de este trabajo de tesis fue establecer una línea CPI equina, caracterizarla y validarla.

RESULTADOS

Reprogramación

Para generar las CPI se comenzó por la producción de las partículas lentivirales. Para ello se utilizó células HEK293T, las cuales fueron transfectadas con el plásmido STEMCCA (portador de la región codificante de los genes humanos OCT4-Klf4-SOX2-cMyc) y los plásmidos empaquetadores PSPAX2 y VSVG utilizando el reactivo de transfección FUGENE. El virus fue recolectado a las 48 y 72hs post transfección y utilizado fresco sobre los fibroblastos equinos. Luego de tres días los fibroblastos infectados fueron pasados sobre una capa nutricia de fibroblastos murinos embrionarios inactivados mitóticamente por irradiación gamma (MEFi) y se comenzó a utilizar el medio KO-DMEM 20% KSR, específico para CPI, con el fin de generar una presión selectiva sobre aquellas células que habían sido transfectadas exitosamente. Durante los primeros días de cultivo en estas condiciones, las células aún conservaban la morfología característica de los fibroblastos, sin embargo se comenzó a observar algunos cambios morfológicos principalmente en el tamaño de los núcleos (Figura 3A). El surgimiento de las colonias se observó a partir del día 8 post-infección. Las colonias de células pluripotentes se caracterizan por crecer como un conjunto de células compactas de núcleos de gran tamaño, por lo que presentan una relación núcleo/citoplasma elevada, y con bordes definidos (Figura 3B). Aproximadamente al día 12 post-infección se seleccionó las colonias según su morfología (Figura 3C). Las colonias seleccionadas fueron aisladas mecánicamente y cultivadas individualmente en pocillos de una placa de 24 pocillos con el fin de cultivar cada clon por separado. De los 10^5 fibroblastos que fueron plaqueados para ser infectados se logró aislar en promedio diez colonias, por lo que la eficiencia estimada de la técnica fue del 0,01%. Es importante remarcar que muchas de estas colonias no progresan, es decir que no logran ser mantenidas en cultivo luego de varios pasajes ya sea porque pierden su morfología, su crecimiento se vuelve inestable (dejan de crecer o crecen descontroladamente) o mueren. Por lo tanto podemos decir que este valor refleja la eficiencia de reprogramación parcial. La eficiencia total de esta técnica se estima en 0,001% (20).

Las colonias de células pluripotentes normalmente presentan una tasa de diferenciación basal que suele ser baja y estar presente en los bordes de las colonias. Las CPI suelen ser más inestables durante los primeros pasajes (Figura 3D) (35). En muchos casos la morfología de las colonias cambia drásticamente, perdiendo las características de colonia CPI. En algunos casos las colonias perdieron sus bordes definidos (Figura 3E) y/o se observó que parte de la colonia se desprende (Figura 3F), lo cual reflejaría que en estos casos la reprogramación ocurrió de forma incompleta. Estos clones fueron descartados y sólo se utilizó para la validación aquellos clones que mantuvieran su morfología a lo largo de los pasajes en cultivo. También se tuvo en cuenta que la tasa de crecimiento fuera acorde a la que presentan las células pluripotentes (las células normalmente deben ser pasadas cada 5-7 días).

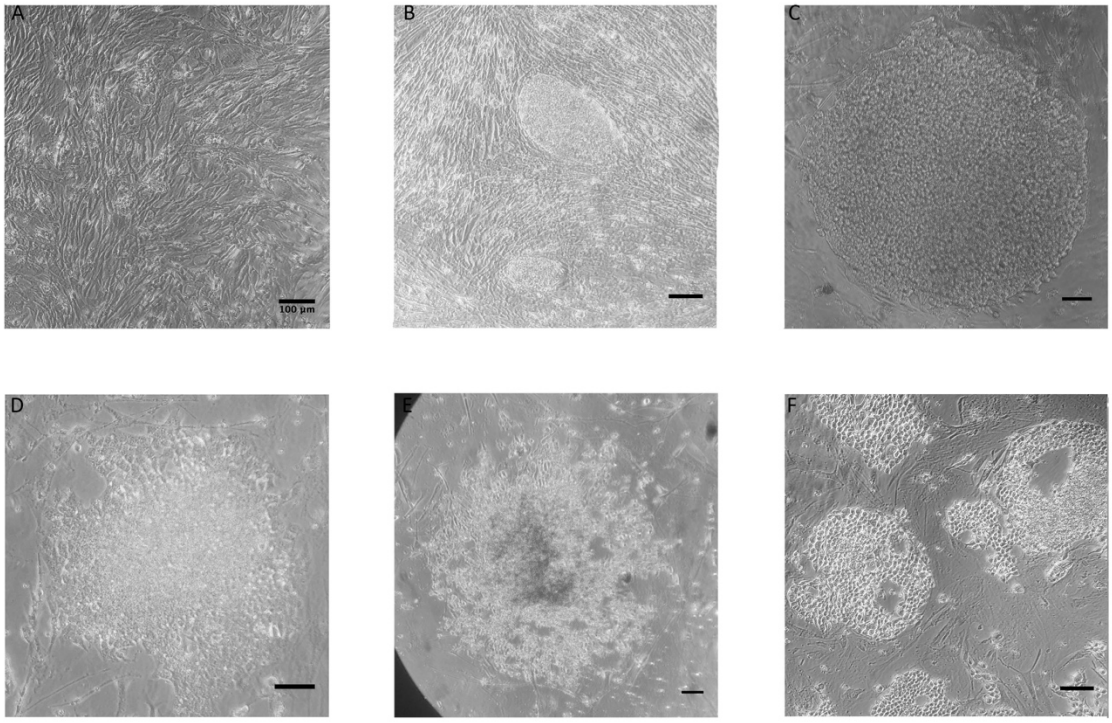

Figura 3: A. Fibroblastos infectados **B.** Colonias emergentes día 8 **C.** Colonia CPI putativa de morfología conservada **D.** Colonia CPI putativa con morfología de célula indiferenciada en el centro y bordes diferenciados **E.** Colonia CPI putativa de bordes no definidos **F.** Colonias CPI putativas que perdieron la morfología de célula indiferenciada y perdieron parte de la colonia.

Durante el desarrollo de este trabajo se realizó quince ensayos de reprogramación, de los cuales se logró aislar noventa clones, muchos de los cuales no prosperaron. Generalmente el 75% de las colonias aisladas en cada ensayo perdió su morfología 15 días post-infección. Para realizar los ensayos de validación, se seleccionó un clon, denominado A5, que mantuvo la morfología y tasa de crecimiento adecuada durante los sucesivos pasajes. Este clon fue denominado A5 .

Validación

I) Ensayo de actividad de Fosfatasa Alcalina

Las células madre indiferenciadas se caracterizan por exhibir una actividad elevada de fosfatasa alcalina, que disminuye marcadamente a medida que se diferencian. Se comparó la actividad de fosfatasa alcalina de colonias del clon A5 en pasaje 8 y de células de un clon (denominado clon 2) que perdió las características morfológicas de CPI (Figura 4). Al analizar la actividad de fosfatasa alcalina de las colonias del clon 2, se observó una marca muy tenue concentrada en parte de las colonias. En el caso de las colonias del clon A5, la tinción generó una coloración más intensa con una distribución más homogénea en las colonias. Esto sugiere que las células del clon A5 presentan mayor actividad de fosfatasa alcalina.

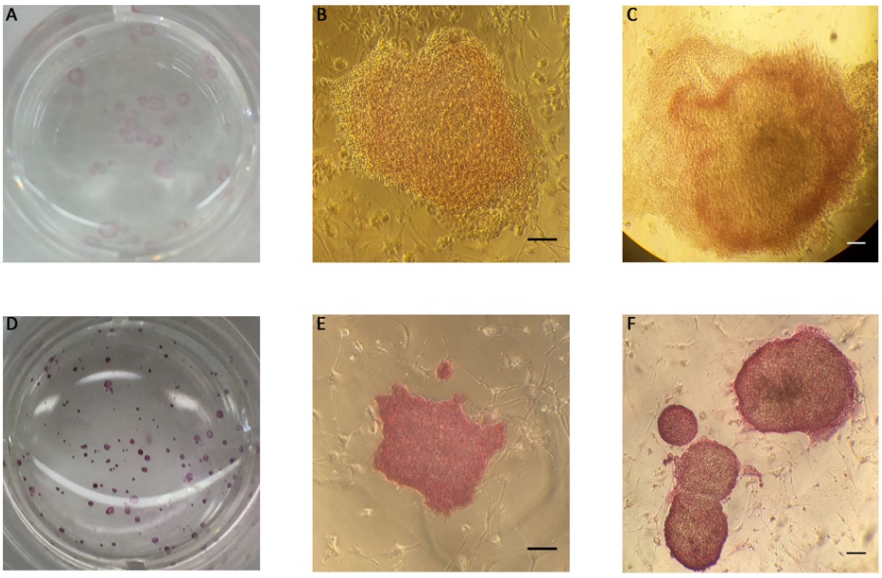

Figura 4: Ensayos de actividad de fosfatasa alcalina para el clon 2 en pasaje 3 (A,B,C) y el clon A5 en pasaje 8 (D,E,F). **A,D:** pocillo completo. **B,C,E, F:** colonias positivas. La barra representa 100 µm

II) Expresión de marcadores de pluripotencia

Se estudió la expresión de marcadores de pluripotencia Oct4 y Sox2 en las CPI generadas (Figura 5). Debido a que el plásmido utilizado para inducir la reprogramación incluye estos genes, se diseñó primers de manera tal que fuese posible distinguir entre el ARNm proveniente de la expresión del plásmido("ARN viral") y el endógeno. Como se puede observar en la Figura 5A, las células del clon A5 en pasaje cuatro han silenciado la expresión de Oct4 viral y han encendido la expresión de Oct4 equino. Sin embargo, no han silenciado Sox2 viral y tampoco expresan aún la versión equina. En pasaje once, se mantiene el patrón observado para Oct4 y además se observa la expresión de Sox2 equino, pero aún no han silenciado Sox2 viral. Como controles de la técnica se verificó la expresión de estos marcadores en los fibroblastos utilizados para reprogramar y

embriones equinos, en estadio de blastocisto temprano. Se observó que los fibroblastos no expresan ninguno de estos marcadores y que los embriones expresan Oct4 pero no Sox2, lo que podría deberse al estadio embrionario empleado. A su vez, al analizar la expresión de fibroblastos infectados, se observó expresión de Oct4 endógeno lo que sugiere que su activación sería un evento temprano en la reprogramación.

Los componentes del medio de cultivo CPI varían según la especie cultivada. La citoquina LIF (*Leukemia Inhibitory Factor)* es una citoquina de la familia de la Interleuquina-6 involucrada en la vía de señalización de JAK/STAT3, relacionada al mantenimiento de la pluripotencia y la proliferación (36). Esta citoquina es suficiente y necesaria para mantener el estado pluripotente en CPI murinas, pero no en CPI humanas. En el caso de animales domésticos, la mayoría de los protocolos emplean LIF en su medio de cultivo, por lo que se quiso estudiar el efecto de esta citoquina en CPI equinas. Para ello, las células del clon A5 fueron generadas y cultivadas en presencia de LIF, y al realizar el tercer pasaje se dividió el cultivo para cultivar las células en presencia y ausencia de LIF. Luego de dos pasajes en ausencia de LIF se observó que las células perdieron su morfología, muerte celular y que las células se desprendían de la placa. Al analizar la expresión de los marcadores Oct4 y Sox2 (Figura 5B) se observa expresión de Sox2 viral en presencia y ausencia de LIF, pero las células en ausencia de LIF tienen menor expresión de Oct4 equino.

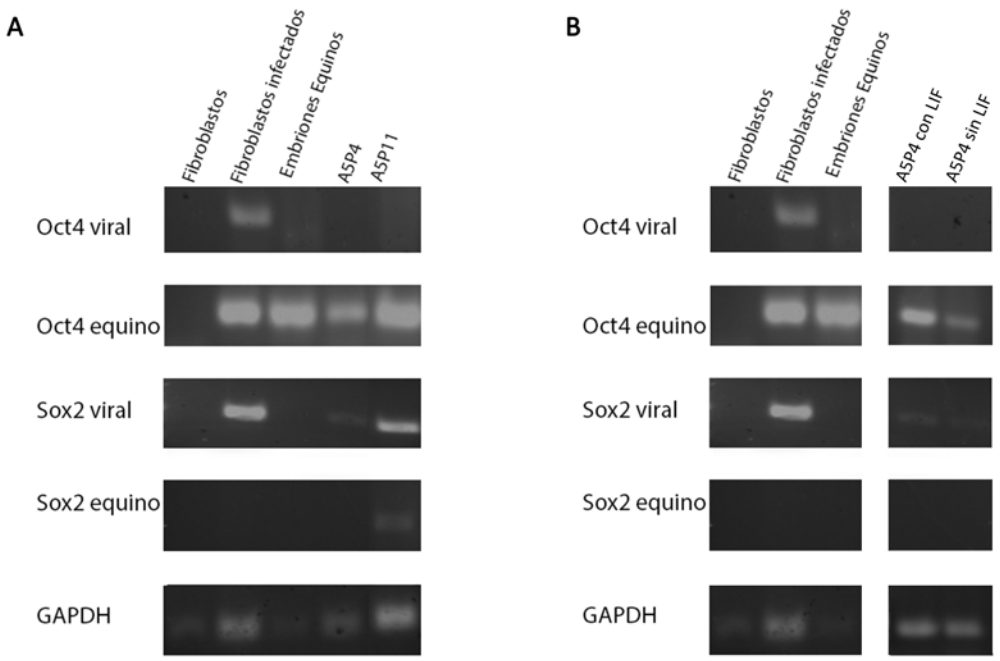

Figura 5: A. Análisis de expresión de marcadores de pluripotencia Oct4 y Sox2 endógenos y exógenos mediante RT-PCR y PCR a punto final, en fibroblastos fetales equinos pasaje 6, fibroblastos infectados con lentivirus conteniendo el plásmido STEMCCA, embriones equinos, y células del clon CPI A5 Pasaje 4 y pasaje 11. **B.** Análisis de expresión de marcadores de pluripotencia Oct4 y Sox2 endógenos y exógenos mediante RT-PCR y PCR a punto final, en el clon CPI A5 Pasaje 4 con LIF y A5 pasaje 4 sin LIF, fibroblastos fetales equinos pasaje 6, fibroblastos infectados con lentivirus conteniendo el plásmido STEMCCA y embriones equinos.

Adicionalmente, se analizó el perfil de expresión de marcadores de pluripotencia de siete clones que no progresaron, es decir que perdieron sus características morfológicas de células CPI (Figura 6). En este caso se observa que el perfil difiere en gran medida respecto a lo observado para el clon A5. A diferencia de las células del clon A5, todos estos clones ya han silenciado Oct4 y Sox2 exógenos en el segundo pasaje, y algunos (clones 1, 3, 6, 8 y 9) expresan Sox2 equino. A excepción del clon 7, todos los clones expresan Oct4 endógeno, como se observó para el clon A5. De esta forma, se observa que estos siete clones presentan un perfil de expresión distinto al de las células del clon A5. Considerando que ninguno de estos clones progresó, es posible que no se hayan sucedido los eventos necesarios en el orden correcto para una reprogramación exitosa, resultando en una reprogramación incompleta.

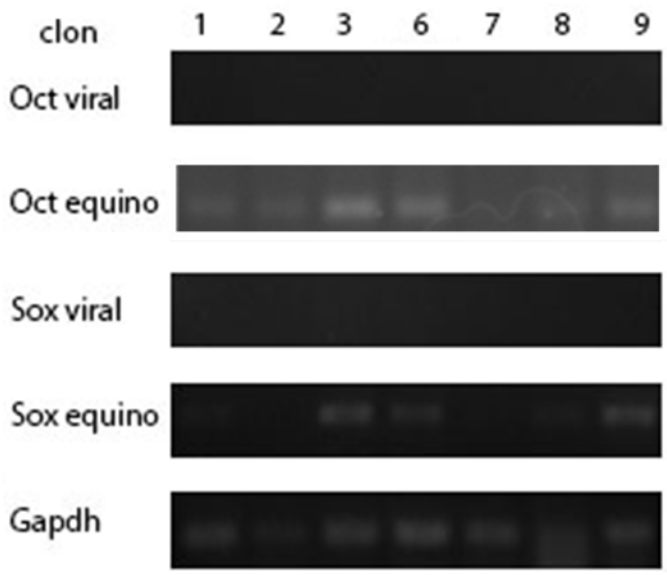

Figura 6: Análisis de expresión de marcadores de pluripotencia Oct4 y Sox2 endógenos y exógenos mediante RT-PCR, en siete clones en pasaje 2 que sufrieron una reprogramación incompleta.

Con el fin de evaluar la expresión de proteínas características de las células pluripotentes se realizó un ensayo de inmunofluorescencia en las células CPI generadas. Como se mencionó previamente, estas células crecen sobre una capa nutricia de fibroblastos murinos, los cuales al ser células terminalmente diferenciadas no expresan estos marcadores y, por lo tanto, actúan como control negativo dentro de la misma muestra.

Como se observa en la Figura 7A, las células del clon A5 expresan los marcadores Oct4, Sox2 y Nanog. En el caso de Oct4 y de Sox2 se observa que la marca del anticuerpo correspondiente se encuentra únicamente en las células de las colonias, mientras que las células murinas están marcadas sólo por la tinción de su ADN por DAPI. Considerando que se utilizó los genes de Oct4 y Sox2 para inducir la reprogramación (en ambos casos la homología de secuencia equina/humana es superior al 90%), los resultados de las PCR de marcadores de pluripotencia y que en este ensayo se utilizó células en pasaje 8, no es posible identificar si la expresión de Sox2 identificada corresponde a la inducida exógenamente. En el caso de Nanog, se observa claramente la marca concentrada en la colonia, pero también se observa unas células MEFi positivas. Sin embargo, también se observa células MEFi que son positivas para DAPI y negativas para Nanog, lo cual indica que se trata de una marca inespecífica, debida probablemente a la concentración utilizada de anticuerpo primario. Por otro lado, se realizó una marcación de OCT4 en embriones equinos en estadio de blastocisto temprano como control positivo (Figura 7B-C).

En conjunto estos resultados indican que las células del clon A5 expresan los marcadores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Nanog, y que han silenciado la expresión de los transgenes cuya actividad fue reemplazada por la expresión endógena.

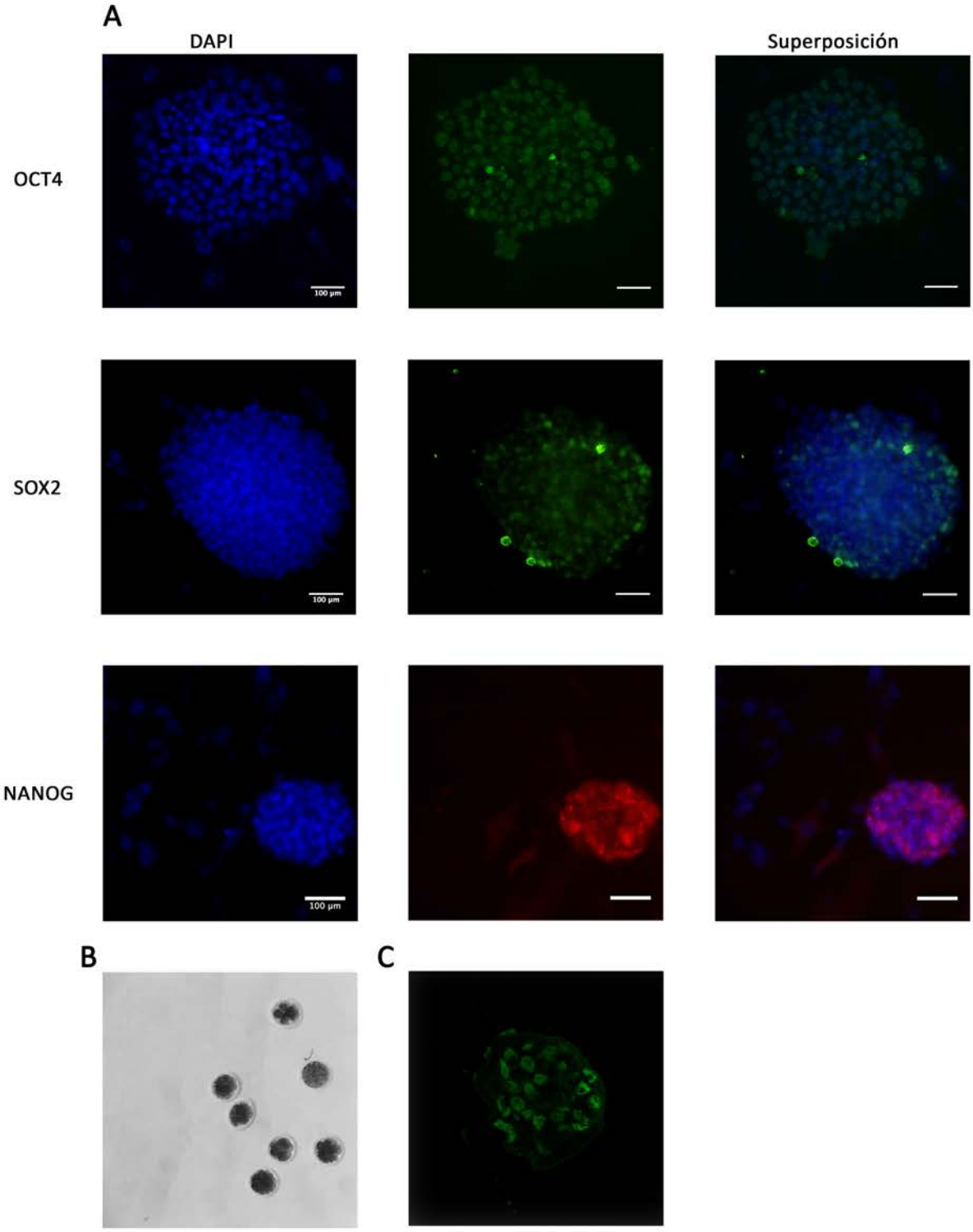

Figura 7: A. Análisis del inmunofenotipo indiferenciado de células del clon A5 en pasaje 8. Fotomicrografías representativas de inmunomarcaciones realizadas empleando anticuerpos primarios específicos contra los marcadores de estado embrionario Oct4, Sox2 y Nanog. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. **B.** Embriones equinos en estadio de blastocisto temprano (Lupa, aumento 6,3X) **C.**Inmunomarcación utilizando anticuerpos primario contra el marcador Oct4 en un embrión equino en estado de blastocisto temprano (Microscopía Confocal, aumento 20X)

III) Diferenciación *in vitro*

Como se menciono en la introducción, una de las características de las células pluripotentes es la capacidad de originar derivados de las tres capas embrionarias. Para evaluar esta capacidad se sometió las CPI del clon A5 a un protocolo de diferenciación *in vitro* en presencia de suero fetal bovino como agente diferenciante. Para ello las colonias fueron cultivadas por 5 días en suspensión, tiempo en el cual adquieren una conformación esférica denominada 'Cuerpo Embrioide' (CE) debido a su semejanza a los primeros estadios del desarrollo embrionario (Figura 8A). Los CE son luego adheridos en placas pre-tratadas con gelatina y cultivados por dos semanas más. Como se muestra en la Figura 8B, a día 6 se observa el CE adherido a la placa, caracterizado por células compactas, del cual se originan células de morfología muy distinta a las colonias de células indiferenciadas. En el día 9 no se distingue fácilmente el CE y se observa gran crecimiento de las células (Figura 8C). Durante la segunda semana de cultivo se puede distinguir células con distintas morfologías, características de diversos tipos celulares, principalmente células con morfología mesenquimal (Figura 8D-F).

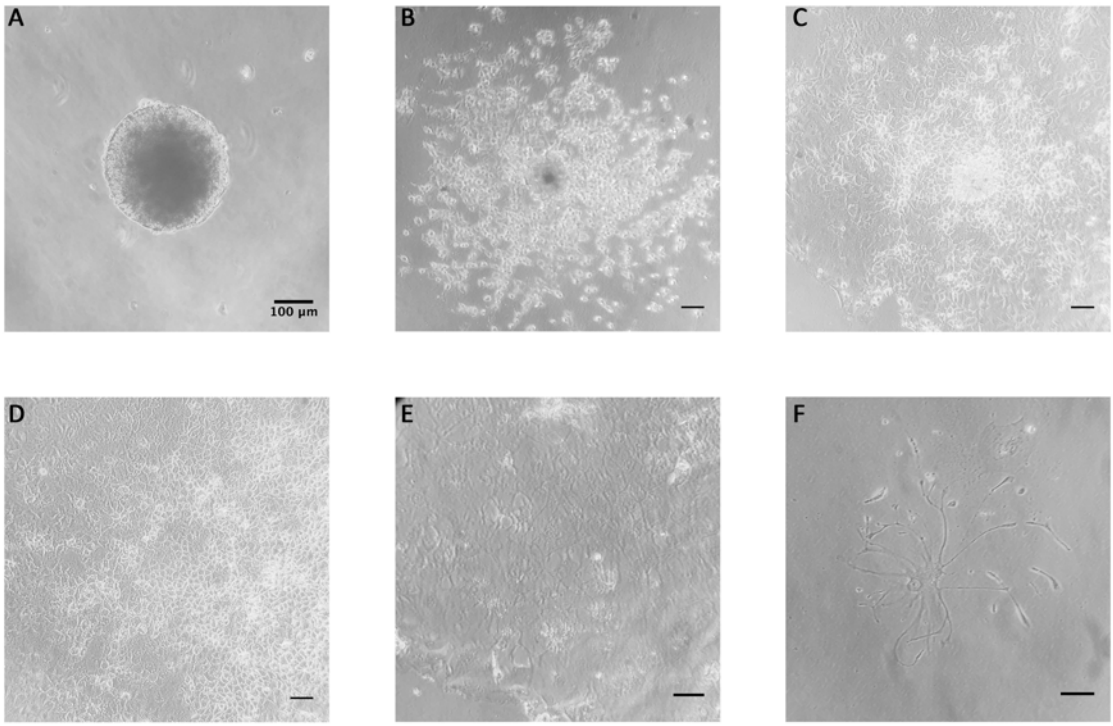

Figura 8: Cuerpos embrionarios de células del clon A5 expuestos al protocolo de diferenciación in vitro **A.** CE en suspensión en día 2 **B.** CE adherido día 6. **C.** CE adherido dia 9. **D.** Células con morfología mesenquimal **E.** Células con morfología neuro-ectodermal **F.** Célula con morfología neural.

Con el fin de analizar la capacidad de generar derivados de las tres capas germinales, se estudió el perfil de expresión del cultivo de CE al término de veinte días, a excepción de T/Brachyury. Dado que este es un marcador de mesodermo temprano, presenta máxima expresión entre los días cuatro y cinco de cultivo coincidente con la especificación del mesodermo, por lo que se evaluó su expresión al quinto día de iniciada la diferenciación. Como se observa en la Figura 9, se observó expresión de Sox17, marcador de endodermo (37) y T/Brachyury e Islet-1, marcadores de mesodermo (38,39). Sin embargo, no se pudo observar expresión de los marcadores de ectodermo Nestina (40) y Pax6 (41) pese a haber observado en el cultivo células con morfología tipo-neural. A pesar de esto, los resultados obtenidos indican que las células del clon A5 poseen capacidad de diferenciarse y generar distintos tipos celulares.

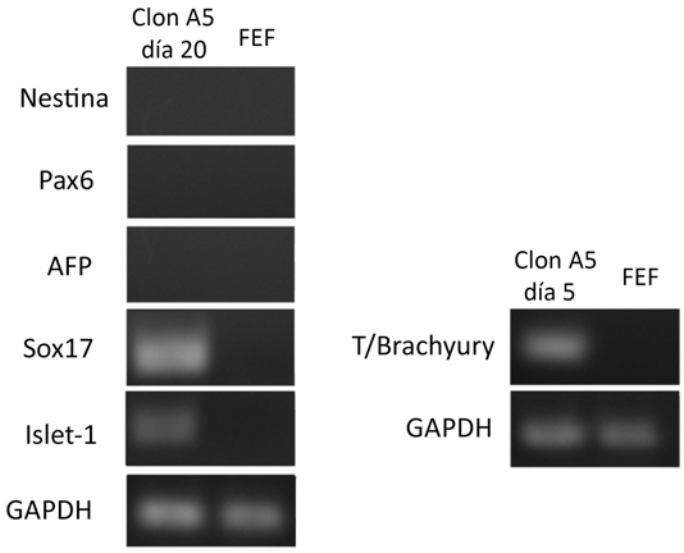

Figura 9: Análisis de expresión de marcadores de ectodermo, endodermo y mesodermo mediante RT-PCR, en CE del clon A5 en día 5 y 20 del protocolo de diferenciación y fibroblastos equinos fetales (FEF) pasaje 6.

IV) Cariotipo

Otro criterio de validación de CPI generalmente empleado es el análisis de su cariotipo. En estos ensayos se evalúa la aparición de posibles rearreglos cromosómicos causados por la inducción de la reprogramación. Para analizar el cariotipo de los fibroblastos utilizados en la reprogramación y de las células del clon A5, se contó con la colaboración del Laboratorio de Biotecnología del 'Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria Ambiente y Salud' de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Lomas de Zamora. Al analizar el cariotipo de los fibroblastos fetales empleados el mismo reveló que sólo el 28% de las células presentaba 64 cromosomas, el número cromosómico característico de equinos (Figura 10A). De las células restantes, el 64% presentó un número cromosómico inferior y el 8% presentó un número mayor. A su vez, se analizó el cariotipo de células equinas pertenecientes a una hembra en pie como control del método. En este caso el cariotipo resultó normal (Figura 10B). Si bien se intentó analizar el cariotipo de las células del clon A5, esto no fue posible debido a problemas técnicos. A pesar de esto, se considera que probablemente estas células también posean un cariotipo anormal. Esto explicaría las dificultades experimentadas tanto en la derivación de CPI como en la generación de CE y en la implementación del cultivo en suspensión.

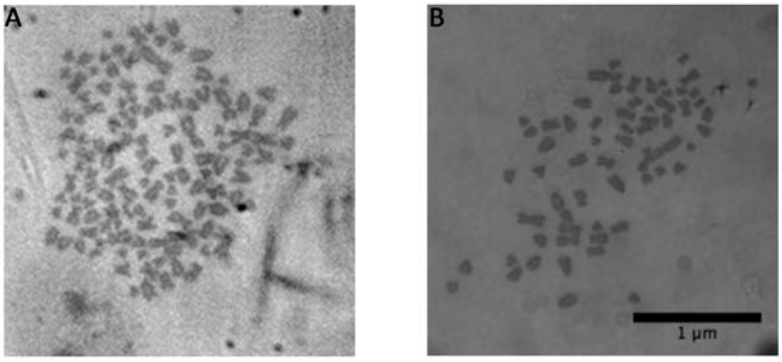

Figura 10: Análisis del cariotipo mediante bandeo G de **A.** Fibroblastos embrionarios equinos pasaje 6 **B.** CPI clon A5 pasaje **C.** Fibroblastos de equino en pie pasaje 3.

DISCUSIÓN

Durante los últimos años el interés en la medicina regenerativa ha crecido enormemente. Se ha empleado numerosas estrategias con el fin de hallar el tipo celular más adecuado para emplear en aplicaciones clínicas, entre ellas la identificación y diferenciación de progenitores tejido específico o la diferenciación a distintos tipos celulares a partir de CME. El surgimiento de las CPI abrió las puertas al desarrollo de células paciente-específicas, marcando un punto de inflexión en el campo de las terapias regenerativas. De esta forma, el tratamiento de enfermedades degenerativas mediante terapias de reemplazo celular dejó de ser una utopía, y comenzó a ser considerado como una posibilidad concreta.

En el presente trabajo de Tesis hemos generado CPI equinas en nuestro laboratorio a partir de fibroblastos dérmicos (Figura 3). La inducción de la expresión exógena de los genes OSKM en células somáticas equinas generó colonias de células con morfología característica de células madre. Sin embargo, luego de aislar estas colonias muchas de ellas sufrieron cambios morfológicos, principalmente la pérdida de compactación y de bordes definidos en las colonias, diferenciación y muerte celular**.** Considerando que sólo el 25% de las colonias seleccionadas fue capaz de mantener su morfología inicial, esto indica que el proceso de reprogramación no ha culminado al momento de la selección. Es importante remarcar que el criterio morfológico empleado se basó principalmente en la morfología de líneas CME humanas y murinas. Este criterio también fue empleado por otros autores para la selección de CPI equinas. Nagy *et al* (32), Breton *et al* (33) y Whitworth *et al* (34) describen sus colonias como compactas, con bordes definidos y elevada relación núcleo/citoplasma, lo cual concuerda con la morfología de las colonias descriptas en este trabajo. Hasta la fecha no se ha reportado el establecimiento de una línea de células madre equinas embrionarias y solo existen escasos reportes de líneas CPI por lo tanto existe la posibilidad que el criterio de selección basado en la morfología empleado en el trabajo no haya sido el óptimo.

La elevada actividad de la fosfatasa alcalina se asocia con tipos celulares pluripotentes. Se ha observado que a medida que se va restringiendo la pluripotencia su actividad decae (42). Los ensayos de actividad de fosfatasa alcalina realizados en este trabajo mostraron elevada actividad enzimática para las células del clon A5, evidenciado por la coloración intensa (Figura 4). Al ensayar las células de un clon que no progresó en el cultivo (clon 2), la coloración observada fue mucho más tenue y no uniforme dentro de las colonias, indicando menor actividad enzimática. Esto sugiere que las células del clon A5 se encuentran en un estado más indiferenciado que el clon 2. Análogamente, las líneas CPI equinas reportadas por otros grupos (32-34) también presentan actividad elevada de fosfatasa alcalina.

El modelo de cinética de reprogramación actual considera tres etapas en el proceso. La primera, '*Iniciación',* implica una transición mesénquimo-epitelial que se traduce en un cambio en el fenotipo y la firma

transcriptómica celular. La siguiente fase es denominada '*Maduración'*, caracterizada por la expresión de ciertos marcadores de pluripotencia como Oct4, Nanog y Sall4. Finalmente, en la '*Estabilización*' se induce la expresión de marcadores de pluripotencia silenciados anteriormente, como Sox2, Pecam y DppalV. Adicionalmente, se ha observado que el pasaje de la fase de maduración a estabilización requiere que las células adquieran la capacidad de sustentarse en ausencia de los factores exógenos. Esto se traduce en encender una red regulatoria específica que difiere de la necesaria para mantener el estado de pluripotencia. En conjunto, si bien se considera una adquisición secuencial de la pluripotencia, muchas células quedan bloqueadas en alguna de estas etapas (35). Esto se correlaciona con lo observado en los ensayos de validación del clon A5. En primer lugar, al analizar el perfil de expresión génica (Figura 5A), se observó expresión de Oct4 endógeno y silenciamiento de Oct4 exógeno en pasaje 4. A su vez, en pasaje 11 se observó expresión tanto de Sox2 endógeno como del exógeno. Sorprendentemente, se observó que la expresión de Oct4 endógeno pudo ser detectada en los fibroblastos 4 días post infección (previo a la aparición de cambios morfológicos), por lo que esto constituiría un evento muy temprano en la reprogramación. Por otro lado, al analizar la expresión de estos genes en células de siete clones que no progresaron en cultivo, se observó que todos presentan un perfil de expresión distinto al de las células del clon A5 (Figura 6). Más aún, todos los clones habían silenciado los genes exógenos y algunos ya expresaban Sox2 endógeno. Debido a que las colonias de estos clones no fueron capaces de mantener la morfología adecuada en el tiempo, es probable que los eventos de la reprogramación hayan ocurrido en un orden incorrecto, causando una reprogramación incompleta. Esto sugiere que los primeros eventos que ocurren en la reprogramación son la expresión de Oct4 endógeno y el silenciamiento de Oct4 exógeno, mientras que la expresión de Sox2 endógeno sería un evento tardío. A su vez, la expresión de ambos Sox2 sugiere que el clon A5 no ha finalizado el proceso de reprogramación por completo o bien se encuentra bloqueado. Similarmente, en los trabajos presentados por Whitwhorth *et al* y Breton *et al* se estudió la expresión de diversos genes, como Oct4, Sox2, Nanog, TERT, Rex1 y Lin 28, para caracterizar el estado pluripotente de sus líneas de CPI. En ambos casos también se observó expresión persistente de genes inducidos exógenamente. En el caso de Whitwhorth *et al* todos los clones seleccionados expresaban Oct4 exógeno en pasaje 25 y uno de ellos también presentaba expresión de Sox2 exógeno (34). Breton *et al*, por otro lado, seleccionaron cuatro clones de los cuales dos presentaban una expresión persistente de Oct4 exógeno y, los otros dos, de c-Myc exógeno (33). Estos resultados también sugieren que la reprogramación no se ha completado o bien que ha sido bloqueada. De esta forma, es posible que los métodos de reprogramación actuales deban ser modificados para lograr inducir el estado pluripotente en equinos exitosamente. Adicionalmente, al estudiar la influencia de la citoquina LIF en el cultivo del clon A5, se observó que en ausencia de LIF la expresión de Oct4 endógeno disminuyó. Esto, junto a los cambios morfológicos observados, sugiere que LIF estaría involucrada en el mantenimiento de la pluripotencia, y en la expresión sostenida de Oct4. La dependencia de

LIF para el mantenimiento de la pluripotencia en equinos también fue observada anteriormente. Existen trabajos que describen la pérdida de la morfología típica de célula madre al quitar esta citoquina del medio de cultivo (32-34).

Al analizar la expresión de marcadores de pluripotencia mediante ensayos de inmunofluorescencia, se observó expresión de Oct4, Sox2 y Nanog. Sin embargo, dado que se utilizó los genes de Oct4 y Sox2 para inducir la reprogramación no es posible identificar si la proteína detectada es la endógena o la exógena. Considerando los resultados de expresión génica, es probable que en el caso de Oct4 se trate de la proteína endógena, ya que se utilizó células en pasaje ocho y se observó silenciamiento de Oct4 exógeno en pasaje cuatro. En el caso de Sox2, sin embargo, es posible que se haya detectado ambas proteínas, dado que la expresión de ARN proveniente del plásmido aún es detectada en células de pasaje once. Para la tinción con Nanog se observó una marca claramente concentrada en la colonia CPI. Dado que Nanog no fue utilizado en la inducción de la reprogramación, esto indica que se logró inducir la expresión de marcadores endógenos de pluripotencia y, por ende, encender redes de señalización relacionadas al estado pluripotente. Es importante remarcar que en el caso de la marcación con Nanog se observó que algunas células pertenecientes a la capa nutricia presentaron una marca positiva. Dado que no se cuenta con anticuerpos primarios específicos que reconozcan las proteínas equinas que se desea marcar, se debió utilizar anticuerpos comerciales que detectan las proteínas humanas. Debido a esto, y a pesar de la homología de secuencias entre ambas especies, no se observó señal al utilizar concentraciones bajas de anticuerpo primario (1:400-1:100), por lo que fue necesario emplear la máxima concentración posible (1:50). Por lo tanto es probable que la marca observada para los fibroblastos murinos sea inespecífica y se deba a la alta concentración de anticuerpo primario que fue necesario emplear. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores que también han realizado inmunomarcaciones para validar sus CPI equinas (32, 34). En estos trabajos se pudo observar expresión de Oct4, Nanog y Sox2 junto a otras proteínas utilizadas como marcadores de pluripotencia en murinos, como SSEA1, SSEA4, TRA 1-60 y TRA1-80. Se considera que los marcadores de pluripotencia de CME deberían ser proteínas que sólo se expresen en aquellas células correspondientes al MCI, sin embargo la expresión de muchos de los marcadores empleados actualmente varía entre las distintas especies. Por ejemplo, SSEA1 (*stage-specific embryonic antigen 1*) se expresa en CME murinas pero no en humanas, Oct4 es específico del MCI en murinos pero se expresa en MCI y trofoectodermo en otras especies (humanos, bovinos, caprinos, porcinos). Nanog es específico del epiblasto pluripotente murino, pero define el MCI en embriones humanos y está ausente en la formación del epiblasto y MCI porcino. En equinos en particular se ha reportado expresión de OCT4, SSEA1, SSEA3, SSEA4, TRA-1-60 y TRA-1-81 en MCI y trofoectodermo, y expresión de Nanog en ventanas temporales que coinciden con la especificación del epiblasto (42).Estas diferencias probablemente se deban a que existen diferencias en el

desarrollo embrionario entre las especies, por lo que la expresión génica también difiere. De esta forma, no es posible analogar marcadores de pluripotencia entre especies, sino que deben ser definidos específicamente para cada una de ellas. Actualmente aún no existe consenso sobre cuál es el perfil de expresión que define una célula pluripotente equina.

Para realizar los ensayos de diferenciación *in vitro* se empleó un protocolo basado en la formación de CE y se los expuso a suero fetal bovino como agente diferenciante. Al término de veinte días se logró distinguir distintos tipos celulares, principalmente células con morfología mesenquimal o neural (Figura 8). Dado que la morfología de estos tipos celulares dista de aquella de las CPI y de los fibroblastos, esto indicaría que las células del clon A5 son capaces de generar distintos tipos celulares. Para validar este resultado, se evaluó la expresión de genes característicos de las tres capas germinales mediante ensayos de PCR. Se observó la expresión génica del marcador de endodermo Sox17 y de los marcadores de mesodermo Islet-1 y T/Brachyury. Sin embargo, a pesar de haber observado células con morfología neural no se observó expresión de los marcadores de neuroectodermo Pax6 y Nestina (Figura 9). Vale aclarar que se experimentó ciertas dificultades al querer implementar el protocolo de diferenciación en esta línea de células equinas. Los CE no siempre se formaban correctamente y en la mayoría de los casos sufrían gran perdida de células conforme avanzaba el cultivo en suspensión. Aún existe poca información sobre los requisitos nutricionales del medio de cultivos para CPI equinas lo que evidencia la necesidad de poner a punto los protocolos de diferenciación *in vitro*. Los reportes de otros grupos describen protocolos muy variables, con variantes en sus medios de cultivo (distintos tipos y proporción de suero) y tiempos de cultivo en suspensión (de cinco días (32) a seis semanas (34)), sin embargo en todos los casos lograron identificar derivados de las tres capas germinales. Las dificultades presentadas también pueden ser síntoma de una reprogramación incompleta lo que limitaría la capacidad de estas células de diferenciarse correctamente.

Para generar células CPI se partió de fibroblastos fetales equinos, obtenidos de una muestra de un feto que había sido generado por clonación y cuya gestación fue interrumpida por un aborto inducido, debido a que presentaba problemas relacionados con el cierre de la línea media ventral. Esta información fue de nuestro conocimiento una vez que ya se había obtenido las CPI. Por ello decidimos realizar un análisis de cariotipo de las células originantes. Éste análisis reveló que el 64% de las células analizadas presentó un número cromosómico menor a 64, el característico de equinos, el 8% presentó un número mayor y el 28% restante resultó normal (Figura 10). Si bien se intentó analizar el cariotipo de las células del clon A5, esto no fue posible por causas que exceden a nuestro laboratorio, por lo que estamos a la espera de un resultado definitivo. Sin embargo, consideramos que es altamente probable que estas células también posean un cariotipo anormal. Esto podría explicar en parte la gran dificultad que presentó la reprogramación de estas células y por qué, aunque el clon A5 fue el que mayores cualidades de CPI reunía en comparación al resto de

los clones generados, aún presenta deficiencias como la pobre diferenciación. Actualmente nos encontramos adaptando las CPI a un cultivo sin capa nutricia para facilitar el análisis del cariotipo y generando líneas de CPI a partir de fibroblastos adultos con cariotipo normal (Figura 10B).

Durante el transcurso de este trabajo, logramos inducir la formación de una línea de CPI en una especie para la cual el campo de estudio es aún muy reciente. Debido a la falta de protocolos establecidos experimentamos diversos inconvenientes al intentar adaptar protocolos empleados comúnmente en otras especies como humanos o murinos. Pese a esto logramos generar una línea de células CPI partiendo de fibroblastos fetales equinos mediante la transfección de un vector lentiviral con los genes OSKM. La línea celular aquí estudiada presenta características asociadas a las células pluripotentes, tales como su morfología, la expresión de marcadores de pluripotencia (tanto ARN como proteínas), elevada actividad de la enzima fosfatasa alcalina y capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares. De esta forma, y a pesar de las limitaciones mencionadas, hemos logrado establecer exitosamente líneas de CPI equinas con características similares a las descriptas en la bibliografía. Estas líneas podrán, en un futuro cercano, ser aplicadas en el desarrollo de terapias de medicina regenerativa o bien en investigación relacionada al desarrollo embrionario, resultando beneficiosas tanto para la medicina veterinaria como para la investigación básica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Células Utilizadas

I. Fibroblastos Equinos Fetales (FEF)

Los fibroblastos equinos fetales fueron derivados a partir de una biopsia de un embrión generado por clonación cuya gestación fue interrumpida por un aborto espontáneo. Para ello se colocó la biopsia en una placa de cultivo con medio DMEM 10% SFB (ver apartado 'Condiciones de Cultivo') de forma tal que se adhiriera. Se mantuvo el cultivo aproximadamente una semana. Los fibroblastos equinos fetales fueron gentilmente cedidos por Crestview Genetics.

II. HEK293T

Las células HEK293T fueron provistas generosamente por el laboratorio del Dr. Diego Álvarez.

III. Fibroblastos Embrionarios Murinos (MEF)

Se obtuvo ratones hembra de 12 a 13 días de preñez de la cepa CD1 del Bioterio del Instituto de Investigaciones Biotecnológicas de la Universidad Nacional de San Martín (IIB-UNSAM), los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical. En un flujo laminar vertical se limpió el abdomen con etanol 70%, se ingresó a la cavidad peritoneal y removió los cuernos uterinos, que fueron colocados en una placa de Petri y lavados con PBS. Luego se separó los fetos de la placenta y de las membranas fetales, se los colocó en una segunda placa de Petri y lavó con PBS. Seguidamente fueron decapitados y eviscerados bajo lupa estereoscópica, pasando el tejido remanente a una nueva placa de Petri donde fue lavado con PBS. El tejido se disgregó primero mecánicamente con hojas de bisturí y luego mediante el agregado de 10 mililitros de Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) y se incubó durante 40 minutos a 37°C en 5% CO_2 hasta que el tejido estuviera completamente disgregado. El tejido procesado fue transferido a un tubo cónico de 50 ml con medio DMEM 10% SFB y se dejó decantar para luego recuperar el sobrenadante. El sobrenadante obtenido fue dividido en X botellas de cultivo T75 (siendo X=Número de Embriones Obtenidos/3), llevando el volumen final a 20 ml con medio DMEM 10% SFB. Las células obtenidas fueron cultivadas a 37°C en 5% CO_2 durante 2 a 3 días hasta obtener confluencia, para luego ser amplificadas o criopreservadas. Para poder usarlas como capa nutricia, fue necesario inactivarlas mitóticamente, para lo cual los fibroblastos fetales fueron irradiados con 80 Gy de radiación gamma, servicio provisto por la empresa CEBIRSA S.A. (Centro de Irradiación, Fitz Roy 2455, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina). Finalmente, se contó las células irradiadas (MEFi) y se criopreservó de a $1,5x10^6$ células por criotubo.

Cultivo Celular

I. Condiciones de Cultivo

Los fibroblastos (tanto FEF como MEF) fueron cultivados en medio DMEM alta glucosa (GIBCO) suplementado con 10% v/v de suero fetal bovino (GIBCO), L-glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 2mM y penicilina-estreptomicina 50 U/ml (medio de cultivo 'DMEM 10% SFB'). Los mismos fueron mantenidos en cultivo hasta que se alcanzara un 80% de confluencia, luego de lo cual fueron amplificados y/o criopreservados.

Las células CPI y CPI putativas fueron cultivadas en medio KO-DMEM (Gibco) suplementado con 20% v/v de KSR (KnockOut Serum Replacement, Gibco), β-mercaptoetanol 55uM (Sigma), L-glutamina 2 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 2 mM (Gibco), penicilina-estreptomicina 50 U/ml (Gibco), 8 ng/ml de bFGF (Invitrogen) y 1,000 U/ml LIF (Invitrogen) (medio de cultivo 'KO-DMEM 20% KSR'). El medio de cultivo se cambió diariamente.

El cultivo de cuerpos embrioides (CE) fue realizado en placas bacteriológicas de Petri con medio DMEM alta glucosa (Gibco) suplementado con 20% v/v de suero fetal bovino HyClone(GE Healthcare Life Sciences), L-glutamina 2 mM (Gibco), aminoácidos no esenciales 2 mM (Gibco), penicilina-estreptomicina 50 U/ml (Gibco) (medio de cultivo 'DMEM 20% HyClone'). El medio de cultivo se cambió día por medio.

En todos los casos, las células fueron cultivadas a 37°C con 5% CO_2.

II. Criopreservación de células

Para la criopreservación de fibroblastos primero se removió el medio de cultivo, se lavó con PBS y se incubó con Tripsin-EDTA 0,25% (Gibco) por unos minutos a 37 °C en 5% CO_2 para desprender las células. Luego de inhibir la enzima con medio DMEM 10% SFB, la suspensión resultante fue transferida a un tubo cónico y se centrifugó 5 minutos a 1300 rpm. Las células fueron resuspendidas en medio DMEM suplementado 20% SFB y 10% DMSO (Sigma), que fue agregado lentamente mezclando suavemente, como criopreservante. Los criotubos (Corning) fueron colocados en un dispositivo Mr. Frosty (ThermoScientific) con isopropanol, el cual permite un descenso controlado de la temperatura a razón de 1°C por minuto, que estuvo 24hs a -80°C y luego fueron transferidos a un tanque de nitrógeno líquido.

Para descongelar las células, los viales fueron removidos del tanque de nitrógeno líquido y rápidamente calentados a 37°C en un baño térmico. Inmediatamente se transfirió el contenido a un tubo cónico con 10 ml

de DMEM 10% SFB. Se centrifugó la suspensión durante cinco minutos a 1300 rpm, se quitó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en DMEM 10% SFB y se sembró la células en una botella o placa correspondiente.

III. Cultivo de células reprogramadas

Las CPI fueron mantenidas en estado indiferenciado cultivándolas sobre una capa nutricia de MEFi.

La capa nutricia fue plaqueada sobre una placa de cultivo pre-tratada con gelatina bovina 0,1% (Sigma) durante una hora, al cabo de lo cual se descongeló un vial de MEFi, y se plaqueó las células repartiendo las mismas de manera equitativa entre pocillos. Luego se agitó la placa cinco minutos y se dejó 24 hs a 37°C en medio DMEM 10% SFB.

Para realizar el pasaje de células CPI, primero se removió el medio de cultivo y se realizó un lavado con PBS, luego se agregó colagenasa tipo IV 1 mg/ml (Gibco). Se dejó actuar entre cinco y diez minutos a 37°C, o hasta que los bordes de las colonias empezaran a separarse de la capa nutricia. Luego se agregó medio KO-DMEM 20% KSR para diluir la enzima, se desprendió por completo las colonias de la placa suavemente con una pipeta automática, y se transfirió el volumen total a un tubo cónico. Finalmente se centrifugó cinco minutos a 1300 rpm, se resuspendió el pellet suavemente en medio KO-DMEM 20% KSR y se plaqueó equitativamente sobre la capa nutricia de MEFi en medio KO-DMEM 20% KSR cuidando que queden fragmentos de tamaño regular. Las CPI normalmente fueron pasadas cada 5 a 7 días en una relación 1:3.

Preparación de plásmidos

I. Transformación de bacterias competentes

Se transformó bacterias *Escherichia coli* competentes mediante shock térmico a 42°C durante 90 segundos con 25 a 50 ng del plásmido a amplificar. Luego se incubó las bacterias en medio LB líquido (10 g/L de Peptona de Caseína, 5 g/L de extracto de Levadura, 10 g/L de cloruro de Sodio) sin antibiótico durante 30 minutos a 37°C en agitación. Se plaqueó las bacterias en placas de Petri conteniendo LB-agar (medio LB con 15 g/L de agar) ampicilina (0,1 ng/ml), y se las dejó a 37°C durante 16 hs. Finalmente se seleccionó algunas colonias, a partir de las que se realizó mini-cultivos (50 ml) en LB-ampicilina a 37°C por 16 hs en agitación.

II. Midi-Preparación de plásmidos

A partir de los mini-cultivos en LB-ampicilina se realizó una midi-preparación con el Midi Prep Kit (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo del cultivo, primero se precipitó las bacterias por centrifugación a 5000 g por 10 minutos, se las resuspendió y lisó, con las soluciones de resuspensión y lisis incluidas en el kit, mezclando por inversión y se incubó 3 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó

la solución neutralizante, mezcló por inversión y se esperó la formación de un floculado. A continuación se colocó una columna dentro de un tubo cónico de 50 ml, se agregó allí el lisado y se incubó dos minutos a temperatura ambiente, luego de lo cual se centrifugó por cinco minutos a 1500 g con el fin de clarificar la suspensión. En un nuevo tubo de 50 ml se colocó una 'Columna de Unión' (del inglés 'Binding Column') a la que se agregó el filtrado y se centrifugó nuevamente. Se agregó la solución de 'Remoción de Endotoxinas', se centrifugó nuevamente y se descartó el filtrado. Después se agregó a la columna la 'Solución Lavado de Columnas', se centrifugó dos veces descartando el filtrado en ambos casos y se dejó escurrir la columna en papel. Finalmente se realizó la elución, para lo cual se colocó la columna en un nuevo tubo, se agregó agua libre de nucleasas y se centrifugó cinco minutos a 2000 g.

El filtrado resultante fue colectado, se agregó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH= 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol 95 % y se dejó 15 minutos en hielo. Por último, se centrifugó 15 minutos a 14000 rpm, se lavó con 70 % etanol y se resuspendió el pellet en agua libre de nucleasas. Se determinó la concentración del ADN plasmídico aislado mediante un espectofotómetro NanoDrop One (Thermofisher).

Reprogramación de Fibroblastos Equinos Fetales (FEF)

I. Construcciones Virales

Se utilizó un vector lentiviral pHAGE-STEMCCA (gentilmente donado por el Dr. Gustavo Mostovlasky) en que se encuentran clonadas las secuencias de los genes humanos Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, que codifican para factores de transcripción cruciales para la determinación y mantenimiento del estado pluripotente. Para generar las partículas virales se realizó una co-transfección de este plásmido junto a los vectores empaquetadores PSPAX2 (Addgene Plásmido #12260) y el vector ENV (Addgene #12259) utilizando FUGENE (Roche) como agente de transfección. Esto fue realizado en células HEK293T plaqueadas sobre placas de cultivo pre-tratadas con poli-L-lisina (Sigma) durante 30 minutos en una densidad de $7x10^5$ células por pocillo de 9,5 cm^2. En una cabina de bioseguridad vertical, se recolectó el sobrenadante viral 48 y 72 hs post-transfección, este fue clarificado mediante centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el sobrenadante viral fue utilizado fresco sobre los fibroblastos a reprogramar.

II. Método de Reprogramación

Se plaqueó FEF (10^5 células por pocillo de 9,5 cm^2)en medio DMEM 10% SFB. Luego de 24hs fueron infectados con el sobrenadante viral clarificado. Para favorecer la infección, junto al sobrenadante viral se agregó Polybrene (8ng/µl, Sigma) y se centrifugó 40 minutos a 700g. Luego de tres días las células fueron transferidas a un co-cultivo sobre una capa nutricia MEFi utilizando TryPle (Gibco), y se cambió el medio por el de células pluripotentes inducidas (KO-DMEM 20% KSR). En este pasaje las células fueron diluídas 1:5.

Se estima la aparición de colonias CPI putativas aproximadamente al día 8 post infección. Las mismas fueron identificadas morfológicamente (8,9), aisladas mecánicamente con una aguja bajo microscopio óptico en una cabina de seguridad biológica, disociadas y amplificadas de manera clonogénica en pocillos de 1,9 cm^2 sobre una nueva capa nutricia MEFi en medio KO-DMEM 20% KSR. Luego de 3 o 4 pasajes mecánicos, las células fueron pasadas enzimáticamente utilizando Colagenasa IV (Sigma-Aldrich).

Validación de las líneas CPI.

I. Ensayo de Actividad de Fosfatasa Alcalina (FA)

Para evaluar la actividad de la enzima fosfatasa alcalina, se utilizó el Kit de Actividad de FA (Sigma). Primero se preparó una solución con *Fast Red Violet*, Naftol y H_2O (proporción 2:1:1), que vira a un color rojo-violáceo en presencia de FA activa. Se incubó esta solución sobre una placa con CPI por 15 minutos, luego de lo cual se lavó con PBS y se visualizó la reacción colorimétrica.

II. Expresión génica de marcadores de pluripotencia.

Preparación de ARN total

Se partió de células crecidas a confluencia, que fueron removidas de la placa de cultivo con colagenasa tipo IV (Gibco), pasadas a un tubo eppendorf y centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. Se realizó la extracción de ARN utilizando Trizol (Thermofisher), según las indicaciones del fabricante. Luego de resuspender las células en Trizol, se realizó una extracción con cloroformo (J.T.Baker), se precipitó el ARN con isopropanol (Sintorgan). Finalmente se lavó con etanol 75% y resuspendió en agua libre de ribonucleasas. Se determinó la concentración del ARN aislado mediante un espectofotómetro automático NanoDrop One (ThermoFisher).

Retrotranscripción

Para la transcripción reversa se utilizó 1 µg de ARN total, oligo dT 500 µg/ml y dNTPs 1 mM. Se utilizó la retrotranscriptasa SuperScript III (Thermofisher) siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Brevemente, la preparación (sin la enzima) fue llevada a 65°C durante 5 minutos en la termocicladora para lograr la desnaturalización del ARN. Luego, para evitar la renaturalización, las muestras fueron colocadas inmediatamente en hielo durante cinco minutos, seguidamente se agregó FS Buffer y DTT y se llevó 2 minutos a 42°C. Finalmente se agregó 0,5µl de la enzima SuperScript III y se colocó nuevamente en la termocicladora bajo el siguiente programa: 50 minutos a 42°C para que ocurra la retrotranscripción y 15 minutos a 70 °C para inactivar a la enzima. Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización.

PCR

La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25 µl. Se utilizó la enzima ADN polimerasa TaqPol (Thermofisher) siguiendo las instrucciones del fabricante. Por tubo de PCR se colocó 2,5 µl de Buffer de PCR, 1 µl de $MgCl_2$ 50 mM, 0,5 µl de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM (dATP, dGTP, dCTP y dTTP) (Thermofisher), 2,5 µl de primer forward 10 µM, 2,5 µl de primer reverse 10 µM, 0,2 µl de la ADN polimerasa Taq DNA Polimerasa 5 U/µl (Invitrogen) y 2 µl de ADN copia, completando el volumen a 25µl con agua libre de DNAsas.

Se utilizó el siguiente programa de PCR:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 5 minutos a 94°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
4. Extensión: 1 minuto a 72 °C
5. Extensión Final: 5 minutos a 72 °C

Los pasos 2 a 4 fueron repetidos en 35 ciclos

En los casos de las muestras de embriones equinos y de diferenciaciones *in vitro*, se utilizó la enzima ADN polimerasa HotStar (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para cada reacción se utilizó un volumen final de 25µl compuestos por 12,5µl de HotStarTaq Master Mix, 1 µl de primer forward 10µM, 1 µl de primer reverse 10 µM y 2µl de ADN copia para las muestras de embriones y 5µl para las de diferenciación in vitro, completando el volumen con agua libre de DNAsas.

Se utilizó el siguiente programa de PCR:

1. Desnaturalización inicial y activación de la polimerasa: 15 minutos a 95°C.
2. Desnaturalización del ADN molde: 30 segundos a 94 °C
3. Apareamiento: 30 segundos a 55 °C
4. Extensión: 1 minuto a 72 °C
5. Extensión Final: 10 minutos a 72 °C

Los pasos 2 a 4 fueron repetidos en 35 ciclos

Las secuencias de los primers utilizados se encuentran detalladas en la Tabla 1.

III. Caracterización del Inmunofenotipo

En los ensayos de inmunomarcación se fijó las células con paraformaldehído 4% m/v (Sigma) por 45 minutos y se realizó tres lavados de 5 minutos cada uno con una solución 0,1% de seroalbúmina bovina (BSA, Sigma) en PBS. Luego se permeabilizó y bloqueó las células con una solución de BSA 10% tritón X-100 0,1% (Sigma) en PBS durante 45 minutos. Se removió la solución y se realizó tres lavados con PBS con una solución 0,1% BSA en PBS. Para la inmunomarcación se incubó las células con el anticuerpo primario en una solución compuesta por BSA 10% en PBS durante dos horas a temperatura ambiente o 4°C durante una noche. Se lavó tres veces por cinco minutos con una solución de BSA 0,1% en PBS. Luego se incubó las células durante 45 minutos con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a fluoróforos en una dilución 1:400. Para teñir los núcleos se utilizó 4-6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI, Sigma) 200 ng/ml, por 15 minutos. Finalmente se realizó tres lavados con BSA 0,1% en PBS de cinco minutos y se agregó un volumen adecuado de PBS. Los anticuerpos utilizados se encuentran detallados en las Tablas 2 y 3.

El análisis de las muestras se realizó utilizando un microscopio invertido de fluorescencia Olympus FV1000 equipado con un laser He-Ne 543 nm, controlado por el software FV10-ASW.

IV. Diferenciación *in vitro.*

Para generar cuerpos embrioides (CE) se trató las colonias de CPI con Colagenasa tipo IV 1 mg/ml (Gibco) durante tres a cinco minutos para lograr separarlas de la capa nutricia de MEFi. Se colectó las colonias en un tubo cónico, se las dejó decantar y se las resuspendió suavemente en medio DMEM 20% HyClone. Luego se transfirió las colonias a una placa bacteriológica de petri no adherente y se las cultivó durante cuatro días en suspensión para permitir la formación de los CE. El medio de cultivo fue renovado cada 48 hs. En el quinto día se adhirió los CE en placas de cultivo pre-tratadas con gelatina bovina 0,1% (Sigma) y se cultivó quince días más.

V. Evaluación del Cariotipo.

Se evaluó el cariotipo de los fibroblastos empleados para reprogramar y de las CPI obtenidas, lo cual fue realizado por el Laboratorio de Biotecnología del Instituto de Investigación sobre Producción Agropecuaria Ambiente y Salud de la Universidad Nacional de Lomas de Zamora (IIPAAS, FCA-UNLZ).

Tabla 1: Secuencias de oligonucleótidos empleados como *primers* en las reacciones de PCR

Transcripto Blanco	**Primer Forward (sentido)**	**Primer Reverse (antisentido)**
OCT 4 Equino	ATTGAGACCCGAGTGAGAGG	CTGATCTGCTGCAGTGTGG
SOX 2 Equino	CACCCACAGCAAATGACAGC	TTTCTGCAAAGCTCCTACCG
GAPDH Equino	CATCATCCCTGCTTCTACTGG	TCCACGACTGACACGTTAGG
OCT4 Viral	TCAAGCCTCAGACAGTGGTTC	TGGAAGCTTAGCCAGGTTCG
SOX2 Viral	TGGCTCTCCTCAAGCGTATT	CAGCTCCGTCTCCATCATGTTA
Sox17 Equino	CATGGTGTGGGCTAAGGACG	TGTAGTTGGGATGGTCCTGC
T/Brachyury Equino	CGCCTTGGAAAGTCCTGAGT	TGCCAGTGGAATTAGAGCCG
Islet-1 Equino	CGCCTTGGAAAGTCCTGAGT	TGCCAGTGGAATTAGAGCCG
Nestina Equino	CCCGAAGCTGGAGCTACATT	GGGCTCAGGACAGAAAGCAA
Pax6 Equino	CCAGTATAAGCGGGAGTGCC	GTAACTGAGCGTGGGCTTCT

Tabla 2: Anticuerpos primarios utilizados en las inmunomarcaciones

Anticuerpo	**Especie-Tipo**	**Marca**	**Número de Catálogo**
Oct 3/4	ratón-monoclonal	Santa Cruz	Sc-5279
Sox 2	Cabra-policlonal	Santa Cruz	SC-17320
Nanog	Conejo-monoclonal	Cell Signaling	4903S

Tabla 3: Anticuerpos secundarios utilizados en las inmunomarcaciones

Anticuerpo	**Fluoróforo**	**Especie**	**Marca**	**Número de Catálogo**
Anti-IgG cabra	Alexa Fluor 488	Burro	Invitrogen	A11055
Anti-IgG ratón	Alexa Fluor 488	Cabra	Invitrogen	A11001
Anti-IgG conejo	Alexa Fluor 568	Cabra	Invitrogen	A11011

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía Consultada

1.Waddington C. H. (1957). *The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology.* London: George Allen & Unwin.

2. Kazutoshi T. & Shinya Y. (2015). *A developmental framework for induced pluripotency.* Development 142, 3274-3285

3. Mummery C., Van de Stolpe A., Roelen B. & Clevers H. (2010) *STEM CELLS Scientific Facts and Fiction.* Academic Press

4. Gilbert S. F. (2003*). Biología del Deasarrollo*. Editorial Panamericana.

5. Nichols J. & Smith A. (2009) *Naïve and primed pluripotent states*. Cell Stem Cell Jun 5;4(6):487-92.

6. Evans M.J. & Kaufman M.H.(1981). *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature. Jul 9;292(5819):154-6.

7. Martin G.R. 1981.*Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc Natl Acad Sci U S A. Dec;78(12):7634-8

8. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S. et al. (1998) *Embryonic stem cell lines derived from humanblastocysts*. Science.282:1145-1147.

9. Itskovitz-Eldor J., Schuldiner M., Karsenti D. et al. (2000) *Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers.* Molecular medicine*.* 6:88-95.

10. Evans, M. J. and Kaufman, M. H. (1981). *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.* Nature 292, 154-156.

11. Martin, G. R. (1981). *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 7634-7638.

12. Bradley A., Evans M., Kaufman M. H. and Robertson E. (1984). *Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines.* Nature 309, 255-256.

13. Brons, I. G. M., Smithers, L. E., Trotter, M. W. B., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S. M., Howlett, S. K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R. A. et al. (2007). *Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos*. Nature 448, 191-195.

14. Tesar, P. J., Chenoweth, J. G., Brook, F. A., Davies, T. J., Evans, E. P., Mack, D. L., Gardner, R. L. and McKay, R. D. G. (2007). *New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells*. Nature 448, 196-199.

15. Gurdon JB. (1962) *The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles.* J Embryol Exp Morphol. 10:622–40.

16. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. (1997*) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature. 385:810–3.

17.Kato Y, Tani T, Sotomaru Y, Kurokawa K, Kato J, Doguchi H, et al. (1998) *Eightcalves cloned from somatic cells of a single adult.* Science.282:2095–8.

18. Baguisi A., Behboodi E., Melican D.T., Pollock J.S., Destrempes M.M., Cammuso C., et al. (1999) *Production of goats by somatic cell nuclear transfer*. Nat Biotechnol. 17:456–61.

19. Polejaeva I.A., Chen S.H., Vaught T.D., Page R.L., Mullins J., Ball S., et al. (2000) *Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells.* Nature. 407:86–90.

20. Takahashi K. & Yamanaka S.(2006) *Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors*. Cell. 126(4):663-76.

21.Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M. et al. *Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.* Cell*.* 131:861-872.

22. Daley, G.Q. et al. (2008) *Prospects for Stem Cell-Based Therapy.*Cell 132, 544-548.

23. Soto D.A. & Ross P.J. (2016) *Pluripotent stem cells and livestock genetic engineering*. Transgenic Res 25:289–306

24.Koh S. & Piedrahita J.A. (2014) *From "ES-like" cells to induced pluripotent stem cells: A historical perspective in domestic animals.*Theriogenology. 2014 January 1; 81(1)

25. Tecirlioglu R.T., Trounson A.O. (2007) *Embryonic stem cells in companion animals (horses, dogs and cats): present status and future prospects.* Reproduction, fertility, and development*.* 19:740-747.

26. Perkins N.R., Reid S.W., Morris R.S.. (2005) *Risk factors for injury to the superficial digital flexor tendon and suspensory apparatus in Thoroughbred racehorses in New Zealand.* New Zealand veterinary journal.53:184-192.

27. Fortier L.A., Potter H.G., Rickey E.J. et al. (2010) *Concentrated bone marrow aspirate improves full-thickness cartilage repair compared with microfracture in the equine model.* The Journal of bone and joint surgery American volume*.* 92:1927-1937.

28. Saito S., Ugai H., Sawai K., Yamamoto Y., Minamihashi A., Kurosaka K. (2002). *Isolation of embryonic stem-like cells from equine blastocysts and their differentiation in vitro.* FEBS Lett 531, 389–396.

29. Li X., Zhou S.G., Imreh M.P., Ahrlund-Richter L., Allen W.R. (2006). *Horse embryonic stem cell lines from the*

proliferation of inner cell mass cells. Stem Cells Dev 15, 523–531.
30. Guest D.J. & Allen W.R. (2007) *Expression of cell-surface antigens and embryonic stem cell pluripotency genes in equine blastocysts*. Stem Cells Dev 16, 789–796.
31. Guest D.J., Smith M.R., Allen W.R., (2010). *Equine embryonic stem-like cells and mesenchymal stromal cells have different survival rates and migration patterns following their injection into damaged superficial digital flexor tendon*. Equine Vet J 42, 636–642.
32. Nagy, K. *et al*. (2011) *Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Equine Fibroblasts.* Stem Cell Rev and Rep 7:693–702
33. Breton A. *et al*. (2011)*Derivation and characterization of induced pluripotent stem cells from equine fibroblasts.* Stem Cells and Development 22: 611-621.
34. Whitworth, J.D. et al (2014). *Generation and Characterization of Leukemia Inhibitory Factor-Dependent Equine Induced Pluripotent Stem Cells from Adult Dermal Fibroblasts*. Stem cells and development 23: 1515-1523.
35.David J. & De Vos,J (2013). *La reprogrammation, un jeu de hasard?* m/s n° 4, vol. 29, avril 2013
36.Kento O.&Zandstra P.W. (2015)*LIF signaling in stem cells and development.*Development (2015) 142, 2230-2236.
37.Qu X.B., Pan J., Zhang C., Huang S.Y. (2008)*Sox17 facilitates the differentiation of mouse embryonic stem cells into primitive and definitive endoderm in vitro.*Dev Growth Differ. Sep;50(7):585-93.
38. Showell C., Binder O., Conlon F.L. (2004*) T-box Genes in Early Embryogenesi*s Dev Dyn. January ; 229(1): 201–218.
39. Laugwitz K.L., Moretti A., Caron L, Nakano A, Chien K.R. (2008) *Islet1 cardiovascular progenitors: a single source for heart lineages*Development 135: 193-205; doi: 10.1242/dev.001883.
40. Gilyarov A. V. (2008*) Nestin in Central Nervous System Cells*Neuroscience and Behavioral Physiology*, Vol. 38, No. 2*
41. Duan D., Fu Y., Paxinos G., Watson C. (2013) *Spatiotemporal expression patterns of Pax6 in the brain of embryonic, newborn, and adult mice*. Brain Struct Funct (2013) 218:353–372
42.Štefková K., Procházková J., and Pacherník J. (2015) *Alkaline Phosphatase in Stem Cells.* Stem Cells International, vol. 2015.
43.Paris D.B.B.P. & Stout T.A.E. (2010) *Equine embryos and embryonic stem cells: Defining reliable markers of pluripotency.* Theriogenology 74 516–524.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer al autodenominado 'Repro Team' del IIB-UNSAM. A Adrián por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de realizar este trabajo de tesis allí. A Caro en particular por guiarme con paciencia en este proceso, compartiendo su conocimiento e introduciéndome en este vasto mundo de células madre, inconscientemente despertando mi interés por un área que antes desconocía. También a las chicas del grupo, Clau, Mica, Maga, Clari, Bren, Vicky, Vivi y Mica (2), por siempre escucharme y aconsejarme, hacer que ir al laboratorio todos los días sea una experiencia linda y divertida, tener siempre un mate preparado y, principalmente, por encontrar todas las razones posibles para festejar con alguna torta (o bizcochitos en su defecto).

Quiero ahora agradecer a mis compañeros de cursada, a la llamada 'Lámpara de Arquímedes', Aldi, Ax, Celes, Fleer, Flor, Guada, Hora, Santi y Seba, por hacer que las interminables horas de cursada y estudio fueran tolerables, también por las fondue, paellas y otras excusas para juntarnos y engordar, y por intentar apasiguar mi pánico antes de cada examen (o peor aún: un seminario).

Por otro lado, quiero agradecer a Flo y Ojos, 'Las Normales', quienes comparten el resto de mi locura, que siempre tuvieron un gesto o palabra de apoyo, aunque muchas veces no entendieran mucho de qué les hablaba. A 'Rolling Chickens', Geor, Pac, Misu, Chibi, Curi y Fran, que aunque ya no nos juntemos tanto siempre es un buen momento.

Finalmente a mis padres, Oscar y Susana, que sin querer queriendo me acercaron a la biología y me empujaron para que pudiera cumplir mis metas.