



*FACULTAD DE  
BIOLOGÍA*

## GRADO EN BIOLOGÍA

Curso académico 2022-2023

**Trabajo de Fin  
de Grado:**

Analizando el impacto de la obesidad  
en la pluripotencia inducida

**Autor:**

Xoán Fernández Costas

Trabajo de Fin de Grado para la obtención del título del Grado en Biología en la Universidad de  
Santiago de Compostela

## Índice:

1. Resumen.....	1
2. Abreviaturas .....	2
3. Introducción .....	3
3.1. El estado celular pluripotente .....	3
3.2. Obtención de células pluripotentes mediante reprogramación celular somática.....	4
3.3. La tecnología iPSC y su relación con la obesidad.....	4
4. Objetivos .....	6
5. Metodología .....	6
5.1. Cultivo celular.....	7
5.2. Ensayo de proliferación celular.....	8
5.3. Determinación de viabilidad celular.....	8
5.4. Tinción con fosfatasa alcalina.....	9
5.5. Ensayo de formación de colonias .....	9
5.6. Inmunofluorescencia.....	10
5.7. Análisis estadísticos.....	11
5.8. Referencias bibliográficas .....	11
6. Resultados .....	12
6.1. La dieta no impacta de manera negativa en el mantenimiento de las iPSCs. ....	12
6.2. Las HFD-iPSCs retienen pluripotencia durante el proceso de diferenciación celular.....	14
7. Discusión.....	17
8. Conclusiones .....	18
9. Bibliografía .....	19



## 1. Resumen.

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), obtenidas mediante reprogramación celular somática, son capaces de autorrenovarse de manera ilimitada en cultivo y de dar lugar a cualquier tipo celular del organismo adulto. Debido a estas características únicas representan una de las más prometedoras herramientas en Medicina Regenerativa. Sin embargo, poco se sabe del efecto de las variables ambientales sobre las células somáticas a reprogramar y sus potenciales efectos negativos para la obtención de iPSCs eficientes y seguras para con fines terapéuticos. Con esto en mente, en este trabajo nos propusimos evaluar el impacto de la obesidad inducida por la dieta sobre las capacidades de autorrenovación y diferenciación de iPSCs generadas a partir de células somáticas obtenidas de ratones alimentados con dieta rica en grasa. De manera interesante se observó que las iPSCs generadas a partir de fibroblastos de ratones obesos presentaban alteraciones del proceso de diferenciación celular comparadas con las obtenidas de ratones alimentados en dieta estándar.

## 2. Abreviaturas.

**ADN:** ácido desoxirribonucleico.

**AP:** fosfatasa alcalina. Del inglés, *Alkaline Phosphatase*.

**CF:** contraste de Fases.

**CFA:** ensayo de formación de colonias.  
Del inglés, *Colony Formation Assay*.

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-fenilindol.

**DE:** desviación estándar.

**DIO:** obesidad inducida por dieta. Del inglés, *Diet-Induced Obesity*.

**ESCs:** células troncales embrionarias.  
Del inglés, *Embryonic Stem Cells*.

**iPSCs:** células troncales pluripotentes inducidas. Del inglés, *induced Pluripotent Stem Cells*.

**HFD:** dieta rica en grasa. Del inglés, *High Fat Diet*.

**LIF:** factor inhibidor de Leucemia. Del inglés, *Leukemia Inhibitory Factor*.

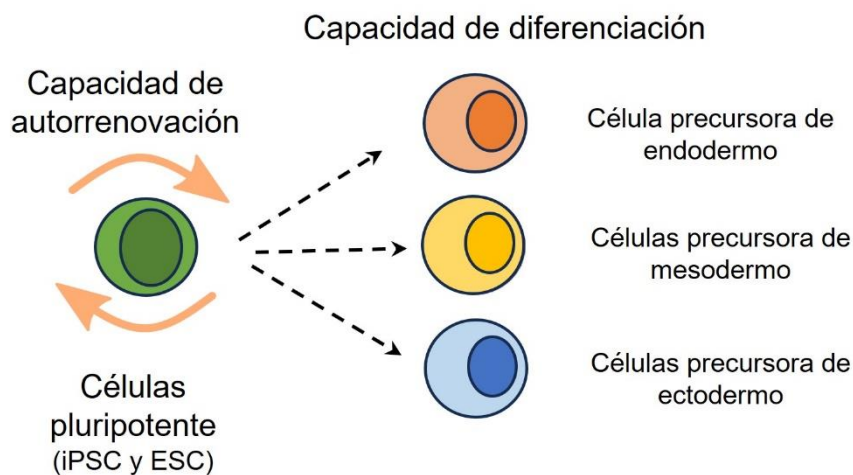
**RA:** ácido retinoico. Del inglés, *Retinoic Acid*.

**STD:** dieta estándar. Del inglés, *Standard Diet*.

### 3. Introducción.

#### 3.1. El estado celular pluripotente.

La pluripotencia se define como la capacidad de una célula para dar lugar a cada una de tres capas germinales primarias (es decir, ectodermo, mesodermo y endodermo) que dan lugar al embrión y, por lo tanto, a cada una de las células que contiene un organismo adulto (1) (**Figura 1**). Este estado celular único aparece transitoriamente durante el desarrollo embrionario temprano de los mamíferos (p. ej., ~E3.5 en el ratón tras fecundación), en las células del epiblasto dentro de la masa celular interna del blastocisto (1). Es importante destacar que las células del epiblasto se pueden derivar y mantener *in vitro* en condiciones de cultivo específicas y se denominan células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*) (2). En condiciones de cultivo apropiadas, las ESCs pueden proliferar indefinidamente sin diferenciarse, una propiedad que se conoce como autorrenovación, y al mismo tiempo conservar el potencial de desarrollo para dar lugar a cada tipo celular procedente de las tres capas germinales primarias (1, 2) (**Figura 1**). Debido a estas propiedades únicas, las ESCs *in vitro* albergan un gran potencial con fines clínicos entre los que se incluye la Medicina Regenerativa.



**Figura 1. Principales características de las células madre pluripotentes.** Representación simplificada que muestra que cada célula madre pluripotente (ej. iPSC o ESC) puede dar lugar a una célula hija idéntica (capacidad de autorrenovación) y también puede diferenciarse en células precursoras de cada una de las tres capas germinales primarias (capacidad de diferenciación).

Sin embargo, la obtención de ESCs supone la destrucción de embriones y por consiguiente cuestiones éticas asociadas al uso de estas células pluripotentes. No

obstante, existen otras células pluripotentes muy similares a las ESCs, conocidas como iPSCs (del inglés, *induced Pluripotent Stem Cells*) y de las que me centraré en la siguiente sección, que se pueden obtener directamente de células somáticas adultas evitando las consideraciones éticas y ofreciendo nuevas posibilidades en la clínica, entre las que se incluye la Medicina Personalizada (3).

### 3.2. Obtención de células pluripotentes mediante reprogramación celular somática.

En el 2006, el Dr. Kazutoshi Takahashi y el Dr. Shinya Yamanaka mostraron que las células somáticas maduras podían reprogramarse a células inmaduras capaces de convertirse en cada una de las células que componen un organismo adulto (4). En su trabajo pionero, demostraron que es posible reprogramar células somáticas adultas de ratón (es decir, fibroblastos) en células pluripotentes mediante la simple transfección de cuatro factores de transcripción (es decir, OCT4, SOX2, c-MYC y KLF4, también conocidos como OSKM o los cuatro factores de Yamanaka) (4). Un año después, los mismos autores también demostraron que, estas células que compartían las mismas características principales que las ESCs y que denominaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), también podían generarse a partir de células somáticas humanas utilizando la misma combinación de estos cuatro factores de transcripción (OSKM).

A pesar de que se ha llevado a cabo un intenso estudio durante casi dos décadas sobre la reprogramación celular somática, la tecnología iPSC todavía presenta numerosos retos (ej., baja eficiencia en su generación, retención de memoria epigenética, falta de protocolos optimizados de diferenciación y riesgo de transformación oncogénica, entre otros) lo que limita su gran potencial con fines terapéuticos (5).

### 3.3. La tecnología iPSC y su relación con la obesidad.

La obesidad es un trastorno metabólico que incrementa el riesgo de aparición de enfermedades cardiovasculares, diabetes tipo 2, cáncer y problemas de cicatrización, entre otras (6, 7). Esta patología es de especial relevancia en Europa y en particular en España, dado que está catalogado como el tercer país europeo con mayor prevalencia de sobrepeso y, por ende, donde las patologías asociadas a la obesidad pueden alcanzar proporciones alarmantes ([Organización Mundial de la Salud](#)). Este hecho tiene un

impacto significativo sobre la esperanza de vida y el estilo de vida de la mayoría de la población y supone un gran reto a nivel socioeconómico.

Aunque numerosas evidencias científicas, tanto en humanos como en modelos murinos con obesidad inducida por la dieta (DIO, del inglés *Diet-Induced Obesity*), indican que la DIO conlleva profundas alteraciones de la función celular que incluso pueden influenciar la salud de futuras generaciones (8-10). Las causas moleculares que participan en estos efectos relacionados con la obesidad y su heredabilidad siguen sin conocerse en detalle.

Aun teniendo en cuenta que la obesidad está alcanzando cuotas pandémicas en países occidentalizados ([Organización Mundial de la Salud](#)), la mayoría de los estudios sobre la reprogramación celular somática para generar iPSCs se han realizado a partir de fibroblastos derivados de ratones alimentados con una dieta estándar. Sin embargo, las personas que presentan obesidad se encuentran entre las más necesitadas del uso de la medicina regenerativa (11), por ello existe la necesidad creciente de mejorar tanto la eficiencia como la calidad de la tecnología iPSC a partir de células somáticas con DIO. A este respecto, algunos estudios recientes en humanos y ratones han mostrado que DIO puede afectar negativamente a la tecnología iPSC, tanto en términos de eficiencia como en la calidad de las iPSCs resultantes, como resultado de la herencia de "características obesogénicas" las cuales pueden comprometer el destino y función celular de las iPSCs al diferenciarse (12-14), lo que podría comprometer el destino y función celular de las células somáticas obtenidas durante el proceso de diferenciación celular a partir de iPSCs procedentes de individuos obesos.



#### 4. Objetivos.

El presente estudio tuvo como meta principal corroborar si la obesidad inducida por la dieta (DIO) afecta de manera negativa a la tecnología iPSC. En concreto se persiguieron dos objetivos específicos:

- Investigar el impacto de DIO sobre la capacidad de autorrenovación de las iPSCs.
- Elucidar si DIO afecta al proceso de salida del estado celular pluripotente tras la diferenciación celular.

#### 5. Metodología.

La metodología utilizada en este trabajo de investigación desempeña un papel fundamental en el estudio, pues proporciona un enfoque sistemático y estructurado para abordar las preguntas de investigación y obtener resultados fiables.

En este proyecto, se ha utilizado un enfoque mixto que combina tanto elementos cuantitativos como cualitativos. De esta forma, permite obtener una comprensión más completa y profunda del fenómeno a estudiar, al combinar el análisis estadístico de datos numéricos con la interpretación y el análisis cualitativo de datos descriptivos.

La muestra seleccionada para este estudio han sido dos líneas celulares de origen murino, concretamente células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), que habían sido generadas previamente por el grupo en donde he realizado mi investigación. En concreto, se han utilizado iPSCs obtenidas mediante reprogramación celular somática a través de un sistema inducible de control de la expresión de los cuatro factores de Yamanaka (es decir, OSKM) a partir de fibroblastos tal y como se ha reportado previamente (15). Los fibroblastos fueron obtenidos de ratones de 5 meses de edad de fondo genético C57/BL6J que habían sido alimentados con dieta estándar (STD; 10% de kcal de grasa) o dieta rica en grasas (HFD; 60% kcal de grasa) tras el destete, lo que es suficiente para observar muchos de los fenotipos asociados a la obesidad (16-18). A partir de aquí, las células pluripotentes generadas según su origen celular somático procedente de ratones alimentados en dieta estándar o dieta rica en grasas se designarán como STD-iPSCs y HFD-iPSCs de manera respectiva.

Las iPSCs han sido seleccionadas de manera aleatoria y representativa, para garantizar que los resultados sean generalizables y aplicables a los objetivos que se persiguen.

En cuanto a la recopilación de los datos, se han utilizado varias aproximaciones metodológicas, incluyendo imágenes obtenidas a través de microscopio estereoscópico o de fluorescencia, técnicas de análisis de proliferación celular y de viabilidad celular, entre otros. Cada una de las aproximaciones metodológicas empleadas se detalla en los siguientes apartados.

### 5.1. Cultivo celular.

El cultivo celular es una herramienta de gran utilidad en el ámbito científico y biomédico que nos permite estudiar las células de manera controlada y reproducible en el entorno del laboratorio. Con la utilización de esta técnica, podemos reproducir y mantener las células vivas en condiciones óptimas, brindando una plataforma ideal para investigar sus comportamientos y respuestas frente a una gran variedad de estímulos. En concreto, las muestras celulares que se han empleado en este estudio fueron las STD-iPSCs y las HFD-iPSCs comentadas anteriormente.

Los medios de cultivo de las iPSCs consistieron en:

- Medio de mantenimiento de la pluripotencia: compuesto por medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (Corning, #10-013-CVR), suplementado con 15% de suero bovino fetal (Gibco, #10270-106), 1% de mezcla de nucleósidos en agua ultrapura (adenosina, citidina, guanosina, timidina y uridina) (Sigma-Aldrich, #A4036, #C4654, #G6264, #T1895 y #U3003 de modo respectivo), 200 mM de L-Glutamina (Hyclone, #SH30034.01), 100 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco, #11140), 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, #15140-122), 0,1 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol (Gibco, #21985023) y 1.000 U/mL de factor inhibidor de la leucemia (LIF; producido y testado para su uso en células pluripotentes en el laboratorio). Este medio se utilizó para mantener las poblaciones de STD-iPSCs y HFD-iPSCs en condiciones de pluripotencia.
- Medio de diferenciación: este medio se utilizará para la diferenciación de las iPSCs y consiste en el medio de mantenimiento de pluripotencia indicado arriba

con la adición de ácido retinoico (RA, del inglés *Retinoic Acid*) (SantaCruz Biotechnology, #sc-200898) a una concentración final de 2 $\mu$ M RA.

Las células se cultivaron en placas de cultivo celular de 12 y 48 pocillos, las cuales fueron pretratadas durante al menos 20 minutos a 37°C con gelatina al 0,1%, que consiste en un derivado molecular del colágeno que comparte su estructura molecular y su función es muy parecida, gracias a la cual ofrece un sustrato de unión ideal para el cultivo celular pluripotente (19).

Además, la manipulación de las células, tales como preparación de medios, cambios de medio y pases celulares, se realizó siempre en condiciones de esterilidad en el interior de una cámara de flujo laminar vertical. Con respecto a la realización de los pases celulares se empleó para este fin tripsina-EDTA al 0,05% (Corning, #25-051-CI). De manera general los medios de cultivo se renovaron cada 24 horas.

Por otro lado, para el mantenimiento de los diversos cultivos celulares se empleó un incubador en un ambiente humificado con niveles controlados de CO<sub>2</sub> al 5% y una temperatura controlada de 37°C.

## 5.2. Ensayo de proliferación celular.

El ensayo de proliferación celular es una aproximación metodológica utilizada en cultivo celular con el fin de observar la respuesta, crecimiento y multiplicación de las células ante una condición deseada que se quiera estudiar. En este trabajo se utilizó para analizar posibles diferencias en la capacidad de autorrenovación de las HFD-iPSCs frente a las STD-iPSCs y durante el proceso de diferenciación celular. De manera resumida, se sembraron 20.000 células de cada tipo por pocillo de placa de 12 pocillos tratados con gelatina al 0,1% en triplicado para cada condición ensayada. El proceso de conteo celular se realizó cada 24 horas hasta los 9 días tras la siembra empleando un hemocitómetro o cámara de *Neubauer*.

## 5.3. Determinación de viabilidad celular.

El ensayo de viabilidad de las STD-iPSCs y HFD-iPSCs se realizó en condiciones de mantenimiento de pluripotencia y diferenciación celular. La determinación del porcentaje de células viables o no viables en las distintas condiciones analizadas se realizó mediante el método de exclusión por azul de tripano. Para llevar a cabo este

método, las células se tripsinizan y se recogen en medio completo en presencia de suero bovino fetal. A continuación, se hace una dilución 1:1 de la suspensión celular en azul de tripano 0,4% (p/v) (VWR Life Sciences, #K940). De la dilución se cargan 10  $\mu$ L en una cámara de *Neubauer* y se cuenta el número de células totales y número de células no viables (aparecen teñidas de azul y no refringentes), para de este modo determinar el porcentaje de cada tipo.

#### 5.4. Tinción con fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina o AP (del inglés, *Alkaline Phosphatase*) es una enzima que se encuentra en niveles elevados en células no diferenciadas (por ejemplo, ESCs y iPSCs) lo que ha conllevado a que se utilice su detección de manera rutinaria como marcador de pluripotencia (20). Para llevar a cabo su detección, tanto en condiciones de mantenimiento de pluripotencia como en los ensayos de diferenciación celular, se utilizó un kit comercial (Sigma-Aldrich, #86R-1KT) y se siguieron las instrucciones del fabricante. De manera resumida, se lavaron las células en cultivo con DPBS (del inglés, *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*) con  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$  (Sigma-Aldrich, #D8662) y se fijaron durante 30 segundos a temperatura ambiente con la solución de fijación del kit. Luego, se lavaron las células con agua ultrapura durante 45 segundos a temperatura ambiente y se incubaron con la solución de tinción del kit durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Por último, las células se lavaron nuevamente con agua ultrapura durante 15 minutos a temperatura ambiente. Las imágenes se obtuvieron empleando un microscopio invertido Olympus IX51 con una cámara de color Olympus DP72.

#### 5.5. Ensayo de formación de colonias.

El ensayo de formación de colonias o CFA (del inglés, *Colony Formation Assay*), es una técnica cuantitativa para medir la capacidad de expansión clonal de cada célula individual para dar lugar a una colonia (21). Este ensayo se utiliza de manera rutinaria en el campo de pluripotencia para valorar la capacidad de autorrenovación de las células pluripotentes (iPSCs y ESCs) en condiciones de mantenimiento de pluripotencia o durante la salida de este estado celular. Los CFAs realizados consistieron en la siembra de 300 células individualizadas por pocillo en una placa de 12 pocillos, y por triplicados para cada condición analizada. En concreto para HFD-iPSCs y STD-iPSCs en medio de

mantenimiento de pluripotencia y en medio de diferenciación que se renovó cada dos días. De esta manera, se pudo elucidar la existencia de diferencias significativas entre las células de ratón sometidas a las distintas dietas, evaluando tanto su capacidad de autorrenovación como su capacidad de diferenciación. Tras 6 días en cultivo se realizó una tinción contra la enzima AP tal como se indicó en el apartado anterior.

Tras esto, se procedió a contar las colonias y clasificarlas según su tinción, mediante un microscopio Olympus IX73, en: colonias no diferenciadas (morfología compacta y tinción positiva homogénea), colonias parcialmente diferenciadas (morfología irregular y tinción heterogénea) y colonias diferenciadas (morfología plana y pérdida completa de tinción).

## 5.6. Inmunofluorescencia.

La inmunofluorescencia es una técnica analítica que permite detectar la presencia de un antígeno concreto en una muestra biológica utilizando anticuerpos marcados con fluorocromos (22). De este modo se consigue detectar la cantidad, presencia, ubicación y distribución de proteínas de interés (22).

En este trabajo, las células fueron sembradas en baja confluencia en una placa de 48 pocillos recubierta con gelatina al 0,1%. Se utilizó el medio de mantenimiento de pluripotencia o el medio de diferenciación dependiendo de la condición a analizar. Tras 72h, las células fueron fijadas con paraformaldehído (Sigma-Aldrich, #P6148) al 4% (p/v) en DPBS (Corning, #21-031-CV) durante 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Luego se realizaron dos lavados con DPBS de 10 min cada uno a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se permeabilizaron con Triton X-100 (Sigma-Aldrich, #T8787) al 0,25% (p/v) en DPBS durante 30 minutos a 37°C. Para analizar posibles diferencias debido a la dieta en cuanto al mantenimiento de pluripotencia como durante el proceso de diferenciación se empleó un anticuerpo monoclonal de origen murino frente al marcador de pluripotencia NANOG (SantaCruz Biotechnology, # sc-134218). El anticuerpo contra NANOG fue diluido 1:1000 en 3% albúmina de suero bovino (Fisher BioReagents, #BP9700) e incubado toda la noche a 4°C. Luego se realizaron 3 lavados con DPBS de 15 minutos cada uno a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavaron las células 3 veces durante 15 minutos con DPBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con un anticuerpo secundario

contra ratón conjugado con el fluoróforo Alexa Fluor 488 (Jackson Immuno Research, #711-545-150hTM) diluido 1:500 en el mismo tampón y se añadió 1  $\mu$ M de DAPI (del inglés, *4',6-diamidino-2-phenylindole*) para la detección de los núcleos celulares. Finalmente, las células se lavaron 3 veces durante 15 minutos con DPBS. Las imágenes de inmunofluorescencia se tomaron utilizando un microscopio invertido Zeiss CellDiscoverer 7.

### 5.7. Análisis estadísticos.

Todos los datos fueron recogidos, analizados y representados con la ayuda de programas informáticos como Microsoft Excel (Microsoft) y GraphPad Prism (Dotmatics). Las diferencias con  $P < 0,05$  se consideraron estadísticamente significativas, evaluadas mediante la prueba t de Student's o ANOVA según se indique en los pies de figura. Del mismo modo los resultados se muestran como media  $\pm$  desviación estándar tal y como se representa en cada pie de figura.

### 5.8. Referencias bibliográficas.

Para el desarrollo de este trabajo se han realizado diversas búsquedas de información en la red utilizando buscadores como Google Scholar (<https://scholar.google.com/>), PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) y bases de datos como Science Direct (<https://www.sciencedirect.com/>) partiendo de palabras clave en inglés: “*pluripotency*”, “*iPSC*”, “*self-renewal*”, “*maintenance*”, “*differentiation*”, “*high fat diet*” y “*obesity*”. Para las citas de la bibliografía utilizada se utilizó el programa EndNote con el estilo *Vancouver*.

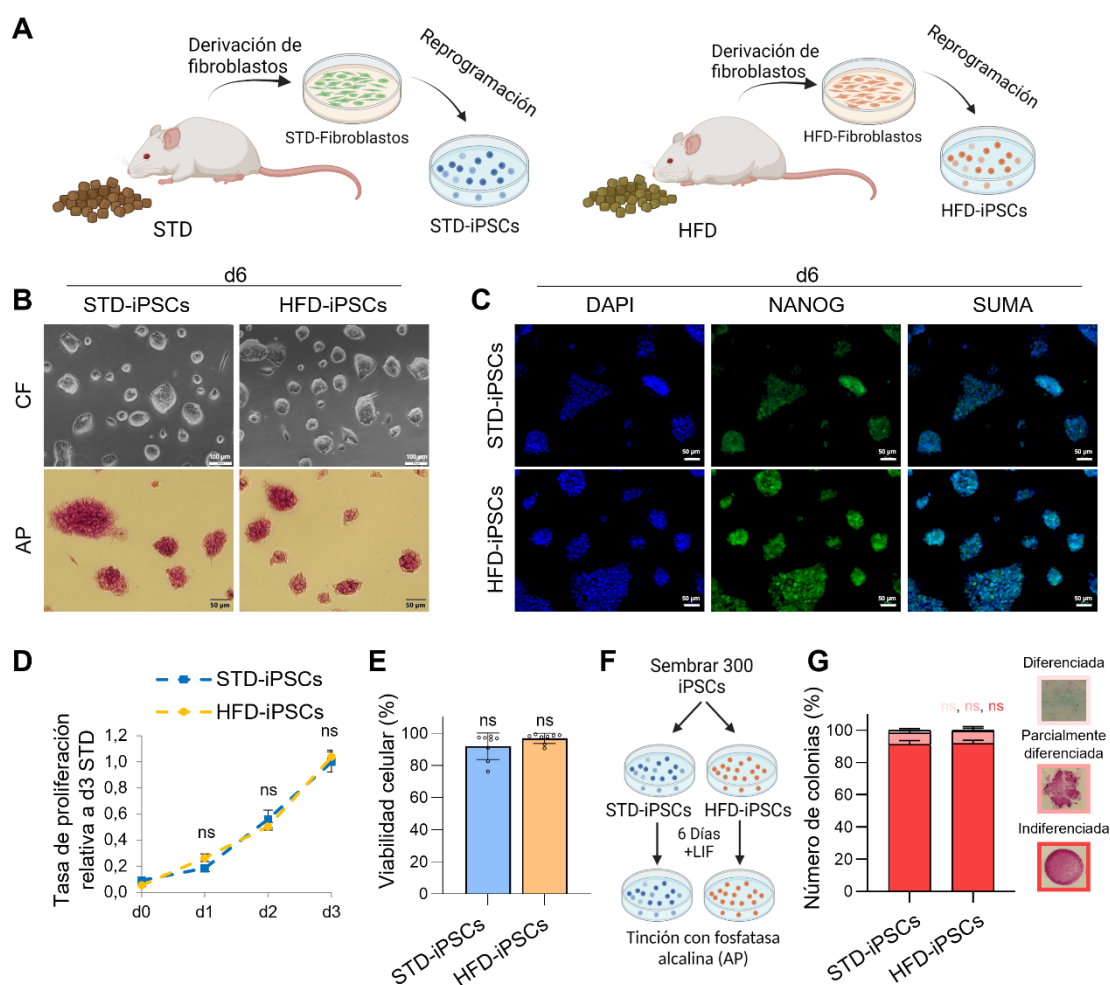
## 6. Resultados.

### 6.1. La dieta no impacta de manera negativa en el mantenimiento de las iPSCs.

Tal como se mencionó en la sección de introducción, las células pluripotentes que incluyen tanto a las iPSCs como ESCs poseen dos propiedades esenciales que las distinguen del resto de células somáticas: la capacidad de proliferación ilimitada en cultivo y la capacidad de diferenciación en cualquier tipo celular que contiene un organismo adulto (2). Por esto, en primer lugar, decidimos analizar el posible impacto de la dieta sobre la capacidad de mantenimiento de las iPSCs en condiciones estándar de cultivo de células pluripotentes que fueron obtenidas previamente mediante reprogramación con los cuatro factores de Yamanaka (OSKM) a partir de STD-fibroblastos y HFD-fibroblastos (**Figura 2A**). Primero, se realizó un análisis morfológico y cualitativo de las STD-iPSCs y HFD-iPSCs (**Figura 2B**). En las imágenes representativas, obtenidas por contraste de fases, se puede observar que las HFD-iPSCs tienen una morfología muy similar a las STD-iPSCs (**Figura 2B**, parte superior). En consonancia con estos resultados, la tinción contra el marcador de pluripotencia fosfatasa alcalina (AP) no evidenció diferencias apreciables entre los dos tipos de iPSCs analizados (**Figura 2B**, parte inferior). Para evaluar si pudieran verse afectados marcadores esenciales que intervienen en el mantenimiento del estado celular pluripotente se analizó mediante inmunofluorescencia los niveles del regulador maestro de pluripotencia NANOG (23). Los resultados obtenidos tampoco reflejaron diferencias aparentes entre las STD-iPSCs y las HFD-iPSCs en cuanto a la presencia de NANOG (**Figura 2C**).

Luego, para examinar la capacidad de autorrenovación de las HFD-iPSCs comparadas con las STD-iPSCs se analizó la proliferación celular de cada una de estas células a lo largo de un periodo de tres días tras su siembra (**Figura 2D**). Es de notar, que el ciclo celular de las células pluripotentes se suele completar en aproximadamente cada 11 horas, por lo que en la ilustración se observa una tendencia exponencial que resulta diferencial. No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre las STD-iPSCs y las HFD-iPSCs en los resultados obtenidos. Posteriormente, se evaluó la viabilidad celular obteniendo resultados muy positivos, ya que la viabilidad media supera el 90% en ambos casos tras su manipulación (**Figura 2E**). Finalmente, para

explorar con más detalle un potencial impacto de la dieta sobre la capacidad de autorrenovación del estado celular pluripotente de las iPSCs analizadas se realizó un ensayo de formación de colonias. Brevemente, se sembraron 300 células de cada condición (STD-iPSCs y HFD-iPSCs) en el medio de mantenimiento de pluripotencia en presencia de la citoquina LIF. Transcurridos 6 días se realizó una tinción contra la AP para poner a prueba la capacidad de autorrenovación de las HFD-iPSCs en comparación con las STD-iPSCs (**Figura 2F**). Nuevamente corroboramos que no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de colonias generados a partir de las iPSCs-HFD y iPSCs-STD (**Figura 2G**).



**Figura 2. Las STD-iPSCs y las HFD-iPSCs no son distinguibles en cuanto a su capacidad de autorrenovación en pluripotencia.** **A)** Se representa un esquema ilustrativo del procedimiento de generación de las iPSCs a partir de la derivación de fibroblastos y su posterior reprogramación mediante OSKM a partir de los ratones sometidos a STD y HFD, respectivamente. **B)** Imágenes en contraste de fases (CF) y tinción AP de las STD-iPSCs y HFD-iPSCs. La escala de la barra en CF representa 100 µm y la



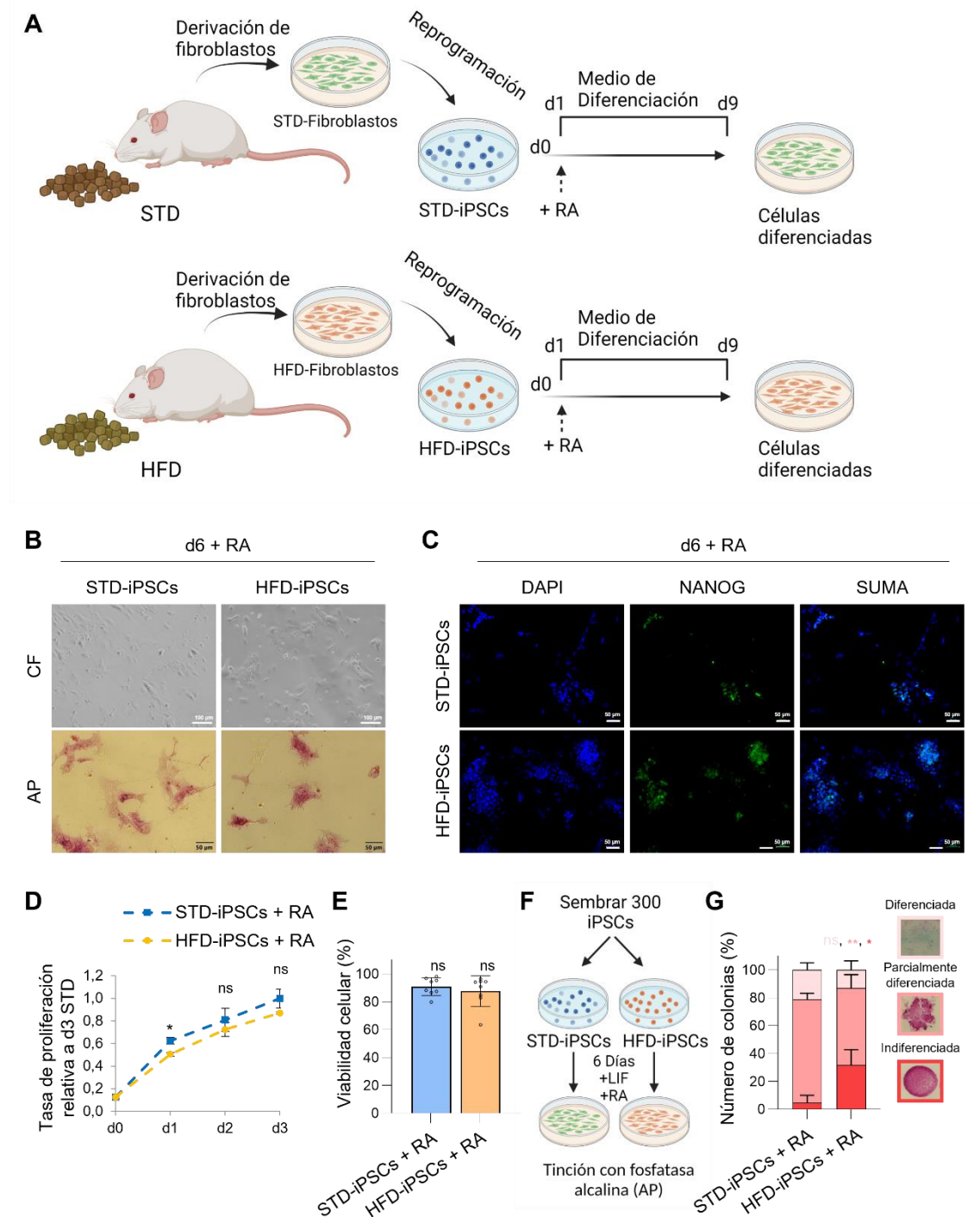
barra mostrada en la tinción AP representa 50µm. **C)** Inmunofluorescencia de NANOG en STD-iPSCs y HFD-iPSCs. Para visualizar los núcleos, se utilizó la tinción con DAPI. La barra de escala representa 50µm. **D)** Análisis de la proliferación celular de STD-iPSCs y HFD-iPSCs relativizado frente a la condición STD. (n = 3). **E)** Esquematización de la viabilidad celular media obtenida en el periodo en el que se desarrolló el experimento de las STD-iPSCs y HFD-iPSCs. (n = 9). **F)** Se muestra un esquema representativo del ensayo de formación de colonias. Las HFD-iPSCs y STD-iPSCs, utilizadas como control, se siembran en baja confluencia en medio estándar con LIF, luego las colonias se cuentan y se clasifican en las 3 categorías indicadas según su intensidad de tinción AP. **G)** Clasificación del porcentaje de cada tipo de colonias obtenidas en el ensayo a partir de las iPSCs sometidas a las dietas correspondientes. (n = 3). Las barras de error representan la desviación estándar. En D y E se realizaron una prueba *t* de Student's no pareado de dos colas y en G se utilizó el análisis ANOVA de dos factores. Ns, no significativo.

En conjunto, estos resultados sugieren que la dieta no ejerce de manera evidente un impacto a nivel fenotípico durante el mantenimiento del estado celular pluripotente de iPSCs obtenidas de células somáticas derivadas en condiciones de obesidad.

## 6.2. Las HFD-iPSCs retienen pluripotencia durante el proceso de diferenciación celular.

Teniendo en cuenta que varios trabajos han mostrado que las iPSCs obtenidas de células somáticas derivadas de ratones y humanos obesos mantenían ciertas características obesogénicas que podrían afectar a las propiedades de las células diferenciadas obtenidas de éstas (12-14), decidimos investigar si la obesidad pudiese repercutir negativamente durante el inicio de la salida del estado celular pluripotente. Para este fin, se procedió a diferenciar las STD-iPSCs y las HFD-iPSC en presencia de ácido retinoico (RA) (**Figura 3A**). En primer lugar, se estudiaron las diferencias morfológicas entre las colonias mediante microscopía de contraste de fases y tras una tinción contra la fosfatasa alcalina (AP) al sexto día del inicio del proceso de diferenciación (**Figura 3B**). En las imágenes representativas mostradas se aprecia que las células diferenciadas a partir de las HFD-iPSCs presentan agrupaciones celulares en forma de colonias con una mayor intensidad de tinción contra la enzima AP comparado con las células diferenciadas a partir de las STD-iPSCs (**Figura 3B**). Del mismo modo, el análisis de la presencia del marcador de pluripotencia NANOG mediante inmunofluorescencia apoya que el proceso de diferenciación de las iPSCs obtenidas de HFD-fibroblastos no es

completo ya que hay presencia de un mayor número de agrupaciones celulares con presencia elevada de este regulador maestro de pluripotencia (**Figura 3C**).



**Figura 3. El proceso de diferenciación células de las HFD-iPSCs se ve afectado en comparación con las STD-iPSCs. A)** Representación esquemática del proceso de obtención de las iPSCs y posterior diferenciación con la adición de RA en un periodo de 9 días. **B)** Imágenes en contraste de fases (CF) y tinción AP de las STD-iPSCs y HFD-iPSCs a día 6 del proceso de diferenciación. La escala de la barra en CF

representa 100  $\mu\text{m}$  y la barra mostrada en la tinción AP representa 50 $\mu\text{m}$ . **C)** Inmunofluorescencia de NANOG en STD-iPSCs y HFD-iPSCs a 6 día de comenzar la diferenciación con RA. Los núcleos se tiñeron con DAPI. La barra de escala representa 50 $\mu\text{m}$ . **D)** Análisis de la tasa de proliferación celular relativizada a STD en la diferenciación de STD-iPSCs + RA y HFD-iPSCs + RA. ( $n = 3$ ). **E)** Esquematzación de la viabilidad celular obtenida en el proceso de diferenciación de las STD-iPSCs + RA y HFD-iPSCs + RA durante todo el periodo de diferenciación. ( $n = 9$ ). **F)** Se muestra un esquema representativo del ensayo de formación de colonias. Las HFD-iPSCs y STD-iPSCs, utilizadas como control, se siembran en baja confluencia en medio estándar con LIF y con RA, luego las colonias se cuentan y se clasifican en las 3 categorías indicadas según su intensidad de tinción AP. **G)** Clasificación del porcentaje de cada tipo de colonias obtenidas en el ensayo a partir de las iPSCs sometidas a las dietas correspondientes. ( $n = 3$ ). Las barras de error representan la desviación estándar. En D y E se realizaron una prueba *t* de Student's no pareado de dos colas y en G se utilizó un análisis de ANOVA de dos factores. \*\* $P < 0,01$ ; \* $P < 0,05$ ; ns, no significativo.

Sin embargo, nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la proliferación celular, a excepción del día 1 (**Figura 3D**).

Con la intención de observar la supervivencia de las células durante todo el periodo de diferenciación se procedió a medir la viabilidad celular mediante el conteo con la tinción de azul de tripano (**Figura 3E**). A la vista de los resultados tampoco se encontraron diferencias significativas en la capacidad de supervivencia durante el proceso de diferenciación celular a partir de las STD-iPSCs y las HFD-iPSC.

Ya que los resultados anteriores sugerían que las HFD-iPSCs podrían tener afectada su capacidad de diferenciación celular comparada con las STD-iPSCs, decidimos realizar un ensayo de formación de colonias, pero esta vez en presencia de ácido retinoico (RA) (**Figura 3F**). De manera importante, se observó que las HFD-iPSCs retenían de un modo significativo la formación de colonias tanto no diferenciadas como parcialmente diferenciadas en comparación con las STD-iPSCs sometidas al proceso de diferenciación (**Figura 3G**).

En conjunto, nuestros resultados sugieren que la obesidad inducida por la dieta puede repercutir negativamente en el correcto proceso de diferenciación durante la salida del estado de pluripotencia de las HFD-iPSCs.

## 7. Discusión.

A la vista de los resultados obtenidos se podría inferir que la obesidad inducida por la dieta (DIO) no tiene un mayor efecto en la capacidad de autorrenovación de las iPSCs generadas a partir de los HFD-fibroblastos murinos, pero sí que compromete el proceso de diferenciación celular reteniendo características de pluripotencia en ciertas células. Este hecho resulta interesante, debido a que la dieta rica en grasas en este contexto parece que retrasa el proceso de diferenciación celular de las iPSCs. Bien es sabido que la dieta constituye uno de los fenómenos epigenéticos ambientales más estudiados y que repercute en el correcto control de la expresión génica (24). Como resultado de la reprogramación de células somáticas en condiciones de obesidad para generar iPSCs, se observaron retenciones de perfiles transcriptómicos tras los procesos de diferenciación celular que son característicos de individuos obesos (12-14). Esto conlleva a la recapitulación de ciertas firmas moleculares y vías relacionadas con la obesidad en las células diferenciadas a partir de iPSCs derivadas de ratones y pacientes con sobrepeso. Incluso tras someterse a los procesos de reprogramación y diferenciación, las células siguen manteniendo dichas características “obesogénicas” (13, 14). De manera similar, encontramos que las células endoteliales derivadas de iPSCs, obtenidas de ratones alimentados con una dieta rica en grasas, exhiben una disminución en su función vascular *in vitro* y una reducida capacidad para la incorporación en la vasculatura del huésped (12).

Con respecto a estos estudios, los hallazgos de nuestro trabajo se encuentran en sintonía mostrando por primera vez cómo se ve afectado el inicio del proceso de diferenciación celular a partir de HFD-iPSCs. En concreto, muestran que las iPSCs derivadas de HFD-fibroblastos, conservan parte de su pluripotencia durante su diferenciación, exhibiendo una menor eficiencia en la salida del estado celular pluripotente en comparación con las STD-iPSCs.

Sin embargo, ante la perspectiva del mantenimiento de la pluripotencia no existen diferencias entre las HFD-iPSCs y STD-iPSCs, sugiere que las características “obesogénicas” de las HFD-iPSCs puede que no ejerzan influencia sobre los genes relacionados con el mantenimiento de la pluripotencia y autorrenovación. Todo ello supone, que las colonias STD-iPSCs y HFD-iPSCs sean prácticamente indistinguibles fenotípicamente.

Por el contrario, en la diferenciación de las HFD-iPSCs existe un claro retraso en la diferenciación en comparación con nuestro grupo de control, las STD-iPSC en presencia de ácido retinoico. Como se muestra en la Figura 3, podemos observar colonias más agrupadas e indiferenciadas con una mayor intensidad en la tinción AP, lo que sugiere una mayor retención de la pluripotencia en las HFD-iPSCs en presencia de ácido retinoico. Del mismo modo, en el ensayo de formación de colonias hay diferencias significativas entre las colonias no diferenciadas que indican una menor diferenciación, que junto con la mayor presencia de NANOG nos sugiere, que las HFD-iPSCs en presencia de ácido retinoico son capaces de retrasar la salida del estado celular pluripotente. A pesar de ello, hay muchos aspectos que aún deben ser explorados en este campo, como los mecanismos moleculares involucrados y el análisis de la expresión génica, antes de validar completamente esta hipótesis. Además, se requiere aumentar el tamaño de la muestra para una comparativa más confiable y de mayor calidad. Estos resultados indican que existe un proceso intrínseco relacionado con la dieta en las HFD-iPSCs que ralentiza su diferenciación, pero se necesitan más investigaciones para comprenderlo en detalle. Por esto, futuros estudios serán necesarios para elucidar que programas moleculares se ven afectados de manera persistente en condiciones de obesidad y explorar nuevas aproximaciones de generación de iPSCs para contrarrestar posibles efectos negativos asociados a esta condición y enfermedades relacionadas.

## 8. Conclusiones.

Las conclusiones de este estudio permiten hondar y ampliar el limitado campo de conocimiento asociado a la obesidad en el contexto de la generación de iPSCs. La investigación y desarrollo en el campo de la nutrición continúa siendo prometedora, pero existen desafíos y obstáculos que deben abordarse. Pese a que se han logrado avances significativos, aún queda mucho por descubrir y perfeccionar. La síntesis final de este trabajo de investigación sobre el impacto de la obesidad en la pluripotencia inducida se puede resumir en:

- No se aprecia efecto evidente en la capacidad de autorrenovación del estado celular pluripotente de las HFD-iPSCs comparado con el de las STD-iPSCs.
- Las HFD-iPSCs tienen afectada su capacidad de diferenciación celular en comparación con las STD-iPSCs.

Nuestros hallazgos, junto con los de otros estudios mencionados (13, 24), sugieren la posibilidad de que, en la reprogramación celular, aunque las iPSCs no muestren diferencias aparentes, estas siguen manteniendo cierta memoria “obesogénica” al diferenciarse. Esto podría plantear un desafío para aquellos pacientes con obesidad, quienes presentan una mayor demanda de tratamientos asociados a la Medicina Regenerativa. Por lo que aún queda mucho por investigar en el campo de la reprogramación celular inducida para lograr una completa eliminación de la memoria “obesogénica” así como superar otros retos todavía pendientes, entre los que se incluyen la inestabilidad genómica y el alto riesgo de transformación tumoral, para la obtención de iPSCs de manera eficiente y segura con fines clínicos (25-28).

## 9. Bibliografía.

1. Rebuzzini P, Zuccotti M, Garagna S. Building Pluripotency Identity in the Early Embryo and Derived Stem Cells. *Cells*. 2021;10(8).
2. Liu G, David BT, Trawczynski M, Fessler RG. Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):3-32.
3. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(3):183-93.
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
5. Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27(4):523-31.
6. Pierpont YN, Dinh TP, Salas RE, Johnson EL, Wright TG, Robson MC, et al. Obesity and surgical wound healing: a current review. *ISRN Obes*. 2014;2014:638936.
7. Wlodarczyk M, Nowicka G. Obesity, DNA Damage, and Development of Obesity-Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2019;20(5).
8. Ogrodnik M, Zhu Y, Langhi LGP, Tchkonina T, Kruger P, Fielder E, et al. Obesity-Induced Cellular Senescence Drives Anxiety and Impairs Neurogenesis. *Cell Metab*. 2019;29(5):1061-77 e8.
9. Ling C, Ronn T. Epigenetics in Human Obesity and Type 2 Diabetes. *Cell Metab*. 2019;29(5):1028-44.
10. Labbe DP, Zadra G, Yang M, Reyes JM, Lin CY, Cacciatore S, et al. High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program. *Nat Commun*. 2019;10(1):4358.
11. Payab M, Goodarzi P, Foroughi Heravani N, Hadavandkhani M, Zarei Z, Falahzadeh K, et al. Stem Cell and Obesity: Current State and Future Perspective. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1089:1-22.
12. Gu M, Mordwinkin NM, Kooreman NG, Lee J, Wu H, Hu S, et al. Pravastatin reverses obesity-induced dysfunction of induced pluripotent stem cell-derived

- endothelial cells via a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur Heart J*. 2015;36(13):806-16.
13. Rajamani U, Gross AR, Hjelm BE, Sequeira A, Vawter MP, Tang J, et al. Super-Obese Patient-Derived iPSC Hypothalamic Neurons Exhibit Obesogenic Signatures and Hormone Responses. *Cell Stem Cell*. 2018;22(5):698-712 e9.
14. Varghese DS, Alawathugoda TT, Sheikh MA, Challagandla AK, Emerald BS, Ansari SA. Developmental modeling of hepatogenesis using obese iPSCs-hepatocyte differentiation uncovers pathological features. *Cell Death Dis*. 2022;13(8):670.
15. Guallar D, Fuentes-Iglesias A, Souto Y, Ameneiro C, Freire-Agulleiro O, Pardavila JA, et al. ADAR1-Dependent RNA Editing Promotes MET and iPSC Reprogramming by Alleviating ER Stress. *Cell Stem Cell*. 2020;27(2):300-14 e11.
16. Winzell MS, Ahren B. The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S215-9.
17. Eckel-Mahan KL, Patel VR, de Mateo S, Orozco-Solis R, Ceglia NJ, Sahar S, et al. Reprogramming of the circadian clock by nutritional challenge. *Cell*. 2013;155(7):1464-78.
18. Seoane-Collazo P, Roa J, Rial-Pensado E, Linares-Pose L, Beiroa D, Ruiz-Pino F, et al. SF1-Specific AMPK $\alpha$ 1 Deletion Protects Against Diet-Induced Obesity. *Diabetes*. 2018;67(11):2213-26.
19. Bello AB, Kim D, Kim D, Park H, Lee SH. Engineering and Functionalization of Gelatin Biomaterials: From Cell Culture to Medical Applications. *Tissue Eng Part B Rev*. 2020;26(2):164-80.
20. Stefkova K, Prochazkova J, Pachernik J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int*. 2015;2015:628368.
21. Rajendran V, Jain MV. In Vitro Tumorigenic Assay: Colony Forming Assay for Cancer Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2018;1692:89-95.
22. Im K, Mareninov S, Diaz MFP, Yong WH. An Introduction to Performing Immunofluorescence Staining. *Methods Mol Biol*. 2019;1897:299-311.
23. Allouba MH, ElGuindy AM, Krishnamoorthy N, Yacoub MH, Aguib YE. NaNog: A pluripotency homeobox (master) molecule. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2015;2015(3):36.
24. Tiffon C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11).
25. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells*. 2022;40(6):546-55.
26. Apostolou E, Stadtfeld M. Cellular trajectories and molecular mechanisms of iPSC reprogramming. *Curr Opin Genet Dev*. 2018;52:77-85.
27. Brumbaugh J, Di Stefano B, Hochedlinger K. Reprogramming: identifying the mechanisms that safeguard cell identity. *Development*. 2019;146(23).
28. Haridhasapavalan KK, Raina K, Dey C, Adhikari P, Thummer RP. An Insight into Reprogramming Barriers to iPSC Generation. *Stem Cell Rev Rep*. 2020;16(1):56-81.