



Universidad de Valladolid



MÁSTER EN INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS DE LA VISIÓN

TRABAJO FIN DE MÁSTER:

**EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE DIFERENCIACIÓN
A CUERPOS EMBRIONARIOS DE CÉLULAS MADRE
PLURIPOTENTES INDUCIDAS (iPSC)**

Presentada por Yenisey García Ferrer

Dirigida por:

Dr. Iván Fernández Bueno
Dra. Rosa María Coco Martín

Fecha:

13 de Julio de 2023

Dedicatoria

Quiero dedicar esta tesis primeramente a Dios por haberme permitido llegar hasta aquí hoy, por darme fuerzas y salud para llevar a cabo mis metas y objetivos. Quiero darle las gracias por su amor infinito.

Le dedico el resultado de este trabajo a toda mi familia. Principalmente, a mis padres que me apoyaron y me contuvieron en los momentos malos y en los menos malos. Gracias por enseñarme a afrontar las dificultades y por el apoyo para luchar por mis sueños.

Me han enseñado a ser la persona que soy hoy, mis principios, mis valores, mi perseverancia y mi empeño. Todo esto con una enorme dosis de amor y sin pedir nada a cambio.

Le dedico este logro alcanzado a todas aquellas personas que creyeron en mí, a todos los que siempre me apoyaron e incentivaron a seguir superándome. Gracias a toda la confianza brindada hoy puedo decir....

“Para comenzar un proyecto hace falta valentía y para culminar un proyecto hace falta perseverancia y amor”

Agradecimientos

En primer lugar, deseo expresar mi agradecimiento a los directores de este Trabajo Fin de Máster, Dr. Iván Fernández Bueno y Dra. Rosa María Coco Martín por la dedicación y apoyo que han brindado a este trabajo, por el respeto a mis sugerencias e ideas y por la dirección y el rigor que han facilitado a las mismas. Gracias por la confianza ofrecida desde que llegué a este instituto.

Asimismo, agradezco a mis compañeros del Grupo de Retina del IOBA por su apoyo personal y humano, especialmente a Leticia Adriana Hernández Rodríguez y Kevin Louis Puertas Neyra, con quienes he compartido investigaciones e ilusiones durante estos meses y me han brindado su ayuda incondicional para aumentar mis conocimientos. Gracias Lety por todo lo que me has enseñado.

Un trabajo de investigación es siempre fruto de ideas, proyectos y esfuerzos previos que corresponden a otras personas. En este caso mi más sincero agradecimiento a todos los docentes que han sido parte de mi camino profesional y a todos ellos les quiero agradecer por transmitirme los conocimientos necesarios para hoy poder estar aquí, sin ustedes los conceptos serían solo palabras y no hechos.

Gracias a mi familia por ser el motor que me impulsa a seguir. Agradecerle a todos mis compañeros los cuales muchos de ellos se han convertido en mis amigos, cómplices y hermanos. Gracias por las horas compartidas, los trabajos realizados en conjunto y las historias vividas.

Por último, agradecer a la universidad de Valladolid que me ha exigido tanto, pero al mismo tiempo me ha permitido obtener mi tan ansiado título. Agradezco a cada directivo por su trabajo y por su gestión, sin lo cual no estarían las bases ni las condiciones para aprender los conocimientos.

A todos, muchas gracias

Índice de capítulos

Capítulo	Página
Curriculum vitae	1
Resumen	2
Abstract	3
1.Introducción	4
1.1. Enfermedades hereditarias de la retina	4
1.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)	6
1.2.1. Generación de iPSC	7
1.2.2. Caracterización de las iPSC	7
1.2.3. Aplicaciones de las iPSC	8
1.2.4. Limitaciones de las iPSC	9
1.3. Cuerpos embrionarios (EB)	9
1.4. Justificación	11
2. Hipótesis y objetivos	12
2.1. Hipótesis	12
2.2. Objetivo general	12
2.2.1. Objetivos específicos	12
3. Materiales y métodos	13
3.1. Cultivo de iPSC	13
3.2. Formación de cuerpos embrionarios	13
3.3. Inmunocitoquímica	14
4. Resultados	17
4.1. Cultivo de iPSC	17
4.2. Formación de EB	17
4.2.1. Viabilidad de EB en cultivo de suspensión	18
4.2.1.1. Características de los EB mantenidos en los medios de diferenciación	18
4.2.2. Diferenciación a las capas germinales mediante análisis de inmunocitoquímica..	19
4.2.2.1. Características de la capa germinal ectodérmica	19
4.2.2.2. Características de la capa germinal mesodérmica	20
4.2.2.3. Características de la capa germinal endodérmica	21
5. Discusión	23
6. Conclusiones	26
7. Bibliografía	27
8. Anexos	30

Lista de abreviaturas

- %: porcentaje
- µl: microlitro
- µM: micromolar
- µm: micrómetro
- °C: grados celsius
- 10X: concentración diez veces mayor que la solución regular
- 1X: concentración completa o no diluida
- 2D: segunda dimensión
- 3D: tridimensional
- 4x: ampliación de una imagen u objeto en cuatro veces su tamaño original
- AD: autosómica dominante
- ADN: ácido desoxirribonucleico
- AFP: alfa-1-fetoproteína
- AR: autosómica recesiva
- ARN: ácido ribonucleico
- BEM: maculopatía en ojo de buey 16
- cm²: centímetro cuadrado
- CO₂: dióxido de carbono
- CORD: distrofias de conos y bastones
- DAPI: 2-4-amidinofenil-1H-indol-6-carboxamida
- DMAE: degeneración macular asociada a la edad
- EB: cuerpos embrionarios
- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
- ESC: células madre embrionarias
- FBS: suero fetal bovino
- g: aceleración gravitatoria
- IgG: inmunoglobulina G
- IOBA: Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada
- iPSC: células madre pluripotentes inducidas
- IRD: enfermedades hereditarias de la retina
- KDa: kilodalton
- MCDR2: distrofia macular retiniana tipo 2
- mg: miligramo
- ml: mililitro
- mm: milímetro
- mM: milimolar
- NEAA: aminoácidos no esenciales
- OCT: tomografía de coherencia óptica
- PBS: solución salina tamponada con fosfato
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- Pm: picómetro
- rd1: degeneración retiniana 1
- RP: retinitis pigmentosa
- RPE: epitelio pigmentario de la retina
- RT: temperatura ambiente
- STGD4: degeneración macular tipo Stargardt 4
- TBS: solución salina tamponada con tris
- TBS+: solución salina tamponada con tris plus
- TBS++: solución salina tamponada con tris plus plus
- Tuj1: beta-III tubulina
- U/ml: unidades por mililitro
- UVa: Universidad de Valladolid
- α-SMA: alfa actina de músculo liso

Resumen

Las enfermedades hereditarias de la retina (IRD) son un grupo de trastornos que conducen a la degeneración progresiva de los fotorreceptores y a la pérdida de la visión, siendo una de las causas fundamentales de ceguera a nivel global. Una de las estrategias para el estudio de estas enfermedades es la terapia celular, donde las células madre pluripotentes inducidas (iPSC) se utilizan para la generación de modelos de enfermedades, para comprender mejor los mecanismos subyacentes y para evaluar nuevos enfoques terapéuticos. En este estudio, se generaron cuerpos embrionarios (EB) a partir de iPSC de pacientes con IRD y se examinó su capacidad de diferenciación en células de las capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Para ello, se utilizaron líneas iPSC humanas derivadas de una paciente con retinitis pigmentosa (RP) causada por una mutación en el gen *PROM1*. Estas iPSC se cultivaron y se indujo la formación de EB, que se diferenciaron a los tres linajes celulares mencionados. Se realizó una evaluación morfológica y pruebas de inmunocitoquímica para identificar y confirmar la obtención de células de las tres capas germinales. Así, el ectodermo mostró células planas, alargadas, con prolongaciones ramificadas o con forma de epitelio, y expresión de Alfa-1-fetoproteína (AFP); el mesodermo presentó células alargadas y fusiformes, y expresión de Alfa-smooth muscle actin (α -SMA); y el endodermo exhibió células cúbicas, prismáticas o con forma de copa, y expresión de Beta-III Tubulin (Tuj1). Además, los EB generados a partir de iPSC demostraron capacidad de diferenciación, adoptando estructuras multicelulares organizadas. Estos resultados respaldan la utilidad de las iPSC y los EB como modelos para estudiar los mecanismos moleculares de las IRD y desarrollar potenciales terapias, lo que podría ayudar a generar nuevas oportunidades para avanzar en el conocimiento de las bases moleculares de estas enfermedades y el desarrollo de tratamientos para las IRD.

Abstract

Inherited Retinal Distrophies (IRD) is a group of disorders that leads to the progressive degeneration of photoreceptors and to a loss of vision, being one of the primary causes of blindness all over the world. Cell therapy is one of the strategies for the study of these diseases, where Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) are used for the generation of disease models, to better understand the underlying mechanisms and to evaluate new therapeutic approaches. In this study, Embryoid Bodies (EB) were generated from iPSC coming from IRD patients and their ability to differentiate into germ layer cells (ectoderm, mesoderm, and endoderm) was examined. For this study, human iPSC lines derived from one patient with retinitis pigmentosa (RP) caused by a mutation in the *PROM1* gene were used. These iPSC were cultured, and the formation of EB was induced, and they were differentiated into the three aforementioned cell lines. A morphological evaluation and immunocytochemical tests were performed to identify and confirm the obtention of cells from the three germ layers. Thus, the ectoderm showed flat, elongated cells, with branched extensions or shaped like epithelium, and Alfa-1-fetoprotein (AFP) expression; the mesoderm presented elongated and spindle cells, and Alfa-smooth muscle actin (α -SMA) expression; and the endoderm exhibited cuboidal, prismatic or crown shaped cells, and expression of Beta-III Tubulin (Tuj1). In addition, the EB generated from iPSC demonstrated differentiation capacity, adopting organized multicellular structures. These results support the utility of iPSC and EB as models to study the molecular mechanisms of IRD and to develop potential therapies, creating new opportunities to advance in IRD treatment.

1. Introducción

La visión desempeña un papel fundamental en el crecimiento y la supervivencia de muchos seres vivos. La discapacidad visual perjudica la vida diaria normal ya que afecta la movilidad y la independencia de las personas. Es una habilidad que depende de la estructura y funcionamiento de la retina (1). El estrés o lesiones oculares pueden alterar la arquitectura de la retina y provocar problemas de visión, pérdida o ceguera (2). El sistema inmunitario y la función de la respuesta inmunitaria mantienen la homeostasis en el microambiente. Los factores genéticos, metabólicos y ambientales alteran la homeostasis retiniana y si se prolongan en el tiempo, pueden contribuir al inicio y desarrollo de trastornos de la retina, provocando daños a la salud visual (3).

La discapacidad visual debida a la degeneración retiniana es un desafío para oftalmólogos y científicos. Durante la última década, se han propuesto enfoques terapéuticos para este subgrupo de enfermedades que se consideraban no tratables (4). Los mecanismos degenerativos en las enfermedades hereditarias pueden causar discapacidad visual grave en los pacientes a edades tempranas de la vida; por lo que, son necesarias estrategias de optimización que potencien la regeneración retiniana o detengan la progresión de las mismas (3, 4).

1.1. Enfermedades hereditarias de la retina

Las enfermedades hereditarias de la retina (IRD, de sus siglas en inglés *Inherited Retinal Distrophies*) son un grupo heterogéneo de trastornos que conducen a la degeneración progresiva de los fotorreceptores y a la pérdida de la visión (1). Los fenotipos graves pueden mostrar una disfunción similar generalizada de bastón-cono o cono-bastón en las que hay afectación preferencial de la retina central, con manifestaciones tempranas de síntomas impulsados por conos, que incluyen fotofobia, discromatopsia, agudeza visual reducida y escotomas centrales. A medida que la enfermedad progresa, hay una afectación variable de los bastones, afectando la visión periférica y nocturna (4, 5). La disfunción subyacente de los fotorreceptores tiene impacto en el entorno metabólico y podría estar asociada con la remodelación y la apoptosis que acontecen con la progresión de estas patologías (5).

Son un grupo de enfermedades neurodegenerativas mendelianas causadas por mutaciones en genes que codifican proteínas esenciales para el funcionamiento y mantenimiento de los fotorreceptores, el epitelio pigmentario de la retina (RPE, del inglés *Retinal Pigment Epithelium*) y otras neuronas de la retina, conduciendo a distrofias retinianas o neuropatías ópticas (6). Las tasas de prevalencia varían entre 1/750 y 1/5000, según la región y el nivel de consanguinidad o etnia. Las IRD son una de las principales causas de ceguera irreversible en pacientes jóvenes y tienen un impacto muy significativo en la calidad de vida y la economía sanitaria (4, 7).

Se han descrito más de 300 genes que causan degeneración retiniana sindrómica o no sindrómica. El diagnóstico molecular confirmado permite el manejo clínico, la evaluación pronóstica y las perspectivas de tratamiento, como los enfoques de terapia génica (8). Dentro de los genes asociados a las IRD se encuentra *PROM1* (*PROM1*; OMIM 604365) que se asocia con distrofias de conos y bastones. Las mutaciones en el gen *PROM1* han sido asociadas con todos los grupos que componen las IRD (4, 9).

Se han identificado más de 90 variantes de *PROM1* asociadas a la enfermedad en formas autosómica dominante (AD) y autosómica recesiva (AR). *PROM1* tiene 27 exones y está ubicado en el cromosoma 4p15.32. Es un gen donde la misma mutación puede causar distintos fenotipos de los previamente mencionados y además se ha visto que en unos casos se transmite con patrón de herencia AD y otras AR. El gen *PROM1* codifica la prominina-1, una glicoproteína de cinco dominios transmembrana identificada por primera vez como un antígeno de células madre hematopoyéticas, CD133/AC133 (9).

La prominina-1 se expresa en células fotorreceptoras, gliales y epiteliales en órganos en desarrollo y adultos. Participa en la formación de la membrana del disco en la base de los segmentos externos de los fotorreceptores en la retina. En tejido humano, se han identificado siete variantes de empalme alternativas diferentes; dos de estas son las isoformas más expresadas en la retina (4, 9). La correlación genotipo-fenotipo aún no se comprende bien, a pesar de que no faltan algunas publicaciones al respecto. Se sabe poco sobre las funciones moleculares de estas variantes de secuencia y cómo afectan el funcionamiento de las proteínas. Se desconoce cómo las variaciones en un mismo gen pueden tener un efecto recesivo o dominante, o si *PROM1* juega un papel más importante en los conos o en los bastones (4, 8, 9).

Entre los fenotipos citados la retinitis pigmentosa (RP) (ORPHA:791) es una enfermedad que afecta primariamente a los bastones y luego a los conos. Es la IRD más frecuente. Es una retinopatía hereditaria heterogénea o monogénica, provocada por mutaciones en más de 160 genes relacionados (2). Conduce a la pérdida de la visión o ceguera nocturna en los adolescentes, a visión periférica en los adultos y a visión concéntrica en la población de mayor edad. La prevalencia de la enfermedad es de aproximadamente 1:4000 (1). Se caracteriza por retinopatía pigmentaria, palidez del nervio óptico, degeneración progresiva, muerte de los fotorreceptores y nictalopía (Figura 1). La causa principal de la RP es una mutación genética y la secundaria es una inflamación crónica que produce alteraciones en la homeostasis retiniana (1, 6).

La RP inicialmente afecta a la visión periférica que progresa a la pérdida de la visión central en la etapa final. Muchas mutaciones genéticas pueden producir el fenotipo RP y esta etiología genotípica heterogénea conduce a dificultades significativas para estudiar la enfermedad y desarrollar un tratamiento eficaz (6, 7). Con mayor frecuencia las mutaciones en *PROM1* son la causa de distrofias de conos y bastones (CORD del inglés *Cone-Rod Dystrophy*) (10) y en concreto una de sus variantes, la CORD12. También produce distrofias maculares y este gen se ha descrito como causante de la distrofia macular retiniana tipo 2 (MCDR2 del inglés *Macular Dystrophy type 2*) (11), de maculopatías en ojo de buey 16 (BEM del inglés *Bull's eye maculopathy*) y degeneración macular tipo Stargardt 4 (STGD4) (12).

A pesar del impacto social y las consecuencias económicas que provoca esta enfermedad, los tratamientos actuales son muy escasos y las terapias celulares son las más prometedoras (6, 7). La investigación sobre la terapia con células madre para la neurodegeneración retiniana se basa en dos enfoques terapéuticos principales: el reemplazo de las células dañadas y la neuroprotección, a través de sus propiedades paracrinas (13, 14). Las células que más se han empleado en la terapia celular son las células madre mesenquimales. Estas terapias favorecen la preservación de la estructura y organización neurorretiniana, reducen la glicosis reactiva y preservan las neuronas de la retina, como los fotorreceptores (14).

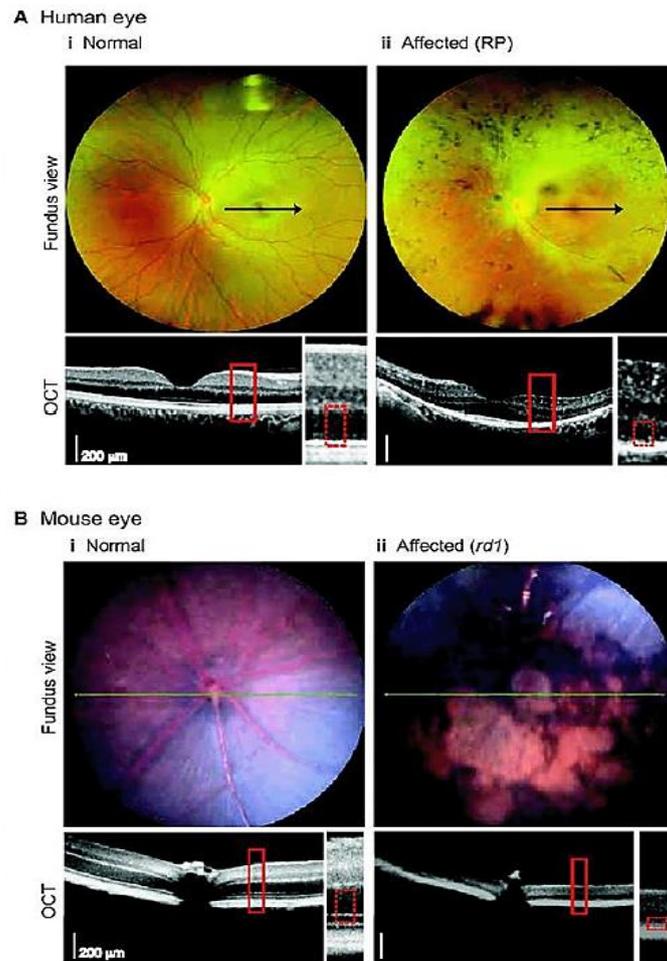


Figura 1. Degeneración de fotorreceptores de la retina en pacientes con RP y ratones rd1 (A, B) fondo de ojo humano y de ratón y OCT (tomografía de coherencia óptica) (i) fotografías del fondo de ojo y las imágenes OCT de un humano adulto y la retina de un ratón C57BL/6. (ii) fotografías del fondo de ojo y las imágenes OCT de un paciente adulto con RP y retina de ratón rd1 de 3 meses. Las flechas negras y las líneas verdes representan la ubicación de la exploración OCT en la mácula. Se observan cambios pigmentarios con áreas atróficas que indican degeneración de los fotorreceptores. Las imágenes de fondo de retina de ratón rd1 muestran atrofia, decoloración y pérdida de vasos sanguíneos. Figura tomada de: Kaur G, Singh NK. *Inflammation and retinal degenerative diseases* (p. 516); Neural Regeneration Research; (2023).

1.2. Células madre pluripotentes inducidas (iPSC)

En 1998 James Thomson cultivó por primera vez células madre embrionarias (ESC), consideradas una herramienta terapéutica alternativa, por su capacidad de autorrenovación y diferenciación en otros tipos celulares (Figura 2). Su aplicación terapéutica se ha propuesto para el tratamiento de varios trastornos, como la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, distrofias musculares, diabetes y las enfermedades degenerativas de la retina (15). En 2006, Yamanaka y Takahashi generaron células madre pluripotentes inducidas (iPSC) artificiales a partir de células somáticas de ratones adultos y embrionarios, usando factores de reprogramación, como Oct-3/4, Sox2, Klf4 y c-Myc, los denominados OSKM (16).

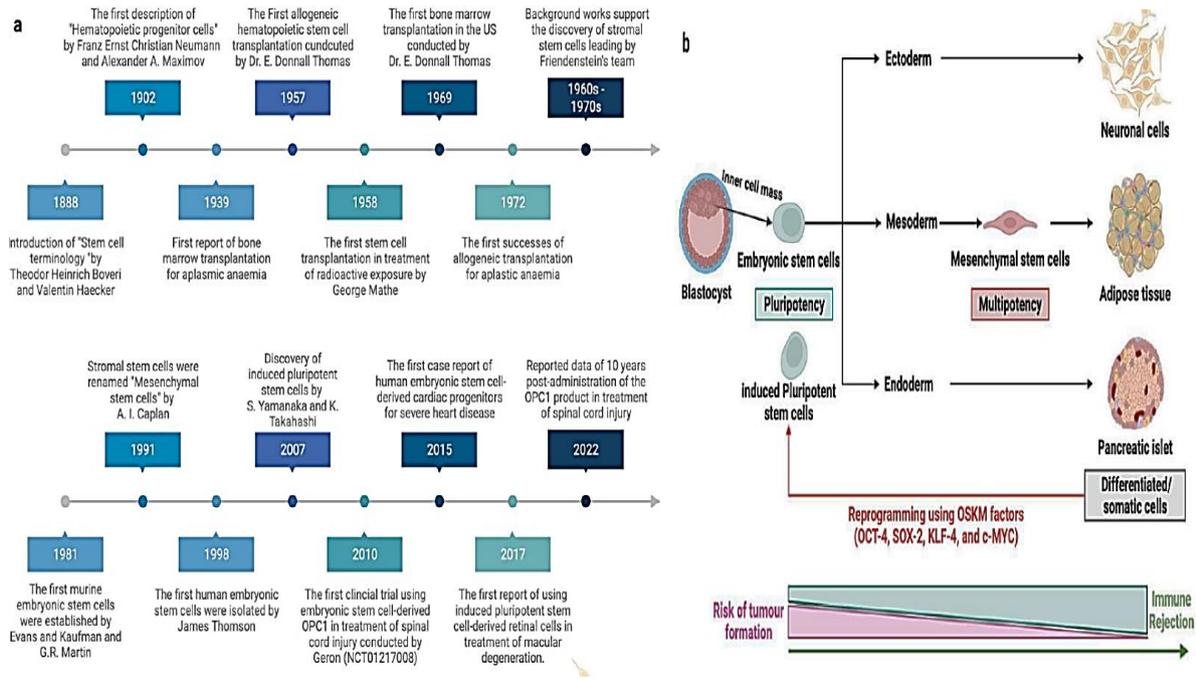


Figura 2. Terapia celular: (a) investigaciones realizadas desde el descubrimiento y aplicación de las células madre; (b) fuentes celulares. Figura tomada de: Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo ATL, Nguyen QT, Phan TTK, et al. *Stem cell-based therapy for human diseases* (p. 272); Signal Transduct Target Ther; (2022).

En cultivo, las iPSC pueden autorrenovarse y diferenciarse en células de las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). El desarrollo de la tecnología iPSC permite obtener células madre pluripotentes humanas sanas o específicas de la enfermedad. Por sus características son empleadas para su uso en investigación y desarrollo biomédico (16, 17, 18). En 2007, Takahashi y otros investigadores generaron las primeras iPSC que exhibían características moleculares y biológicas similares a las de las ESC utilizando los mismos factores OSKM. Se han estudiado para el conocimiento de la patogénesis de enfermedades, desarrollar nuevas terapias celulares y la medicina personalizada (15, 16).

1.2.1. Generación de iPSC

Las células utilizadas para la generación de iPSC son las aisladas de la sangre, orina, células beta de los islotes pancreáticos, células sinoviales, piel y células estromales mesenquimales de la pulpa dentaria (18, 19). Las células madre o células progenitoras en tejidos como músculo, sangre, hígado, piel y cerebro responden más a la reprogramación en comparación con otras células diferenciadas terminalmente (18, 19, 20).

1.2.2. Caracterización de las iPSC

Los métodos de caracterización comunes para establecer líneas celulares incluyen: observación de morfología de tipo embrionario; silenciamiento transgénico después de la reprogramación; evaluación de pluripotencia con ensayo de fosfatasa alcalina o detección de marcadores pluripotentes y de renovación, como TRA-1-60, TRA-1-81, Nanog, Oct4; potencial de diferenciación tanto *in vitro* (formación de cuerpos embrioides) como *in vivo* (formación de

teratomas); análisis de cariotipo para indicar anomalías cromosómicas; confirmación de identidad mediante huellas dactilares de ADN, repetición de PCR corta en tándem; y ensayo microbiológico para garantizar que el cultivo esté libre de posibles contaminantes biológicos (15, 17, 21).

1.2.3. Aplicaciones de las iPSC

Las células iPSC permiten la autorrenovación, pluripotencialidad (diferenciarse a las tres líneas germinales), fuente autóloga (pueden generarse a partir de células terminalmente diferenciadas, células extraídas de pacientes con un método no invasivo). Se diferencian *in vitro* en diversos linajes (Figura 3), incluidos cardiomiocitos, células endoteliales, células similares a hepatocitos, o células retinianas, entre otros (18, 19, 20).

El uso de iPSC humanas para la evaluación de fármacos evita las diferencias entre especies (animal y humano) antes de la fase de ensayo clínico, esto no solo reduce el número de animales utilizados en las investigaciones sobre fármacos (estudios de seguridad y toxicidad), sino que mejora las tasas de éxito en los ensayos clínicos (2, 17).

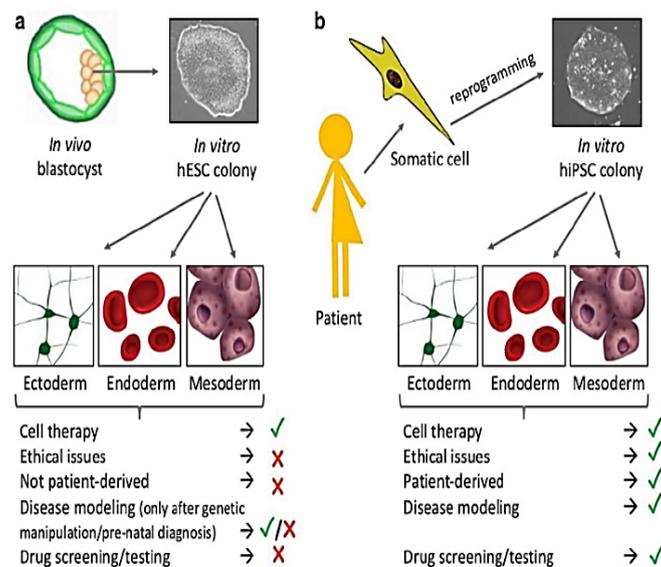


Figura 3. Células madre pluripotentes humanas y su potencial para el modelado de enfermedades, terapia de reemplazo celular y descubrimiento de fármacos (a) las ESC son derivadas de la masa celular interna del blastocisto y pueden ser cultivadas *in vitro*. Tienen la capacidad de diferenciarse en células de los tres linajes germinales (b) las iPSC se obtienen a partir de células somáticas adultas, como los fibroblastos, con reprogramación mediante la transducción de factores como SOX2, KLF-1, c-MYC, OCT4, que son los más comunes. Las iPSC y ESC tienen características similares y funcionan de manera comparable, pero tienen diferentes aplicaciones debido a ciertas limitaciones de las ESC en algunos estudios. Figura tomada de: Saito-Diaz K, Zeltner N. *Induced pluripotent stem cells for disease modeling, cell therapy and drug discovery in genetic autonomic disorders: a review* (p. 369); Clin Auton Res; (2019).

En 2013, investigadores en Japón iniciaron ensayos clínicos utilizando células del RPE derivadas de iPSC para tratar la degeneración macular asociada a la edad (DMAE). La aplicación de la tecnología con células madre, para generar células precursoras de fotorreceptores a partir de células somáticas de pacientes, se puede utilizar para estudios de ARN y proteínas (2, 22). Varias universidades japonesas desempeñan una importante función como centros de investigación de aplicaciones clínicas, para promover la terapia celular

basada en iPSC. En 2014 se llevó a cabo el primer ensayo clínico de trasplante de iPSC mediante el trasplante de células epiteliales del RPE derivadas de iPSC para tratar la degeneración macular (17, 22). Las iPSC también han sido empleadas en los trasplantes de córnea, insuficiencia cardíaca, diabetes y la inmunoterapia (3).

La genética molecular y la embriología experimental permiten el uso de iPSC en la medicina regenerativa, que combina tecnologías biológicas moleculares, farmacéuticas, celulares y tisulares para estimular procesos reparadores en patologías y lesiones retinianas. El uso de tecnologías celulares consiste en reprogramar experimentalmente células fuente (ESC, iPSC), obtener organoides a partir de ellas y desarrollar métodos de trasplante (2, 3, 17).

1.2.4. Limitaciones de las iPSC

La recolección de muestras de los pacientes, establecimiento de cultivos de iPSC e inducción de una diferenciación específica, requiere mucho tiempo (aproximadamente 30 días), esfuerzo laboral y condiciones experimentales (3, 22). La derivación de iPSC editadas genéticamente implica múltiples pasos que requieren largos periodos de cultivo y varios eventos clonales (22, 23).

Es necesario conservar la esterilidad microbiológica de estas células, para prevenir la contaminación por micoplasmas, bacterias, virus y hongos. Las iPSC se crean utilizando factores virales, por ello, los vectores de reprogramación restantes en las células deseadas deben verificarse para garantizar la seguridad de las células reprogramadas. El recuento de células viables antes del trasplante es otro factor de estudio, así como probar su tiempo de duplicación, ya que proporciona información sobre la estabilidad genética en el tiempo (3, 22, 23).

La diferenciación espontánea y dirigida de iPSC en linajes celulares con eficiencia de manera escalable, controlada y reproducible es importante para aplicaciones terapéuticas, que requieren cantidades de una o varias poblaciones celulares específicas. En la diferenciación de iPSC, la formación del cuerpo embrionario (EB) permite la diferenciación posterior para futuras aplicaciones (2, 17, 24).

1.3. Cuerpos embrionarios (EB del inglés *Embryoid Bodies*)

Los EB son agregados tridimensionales de células madre pluripotentes utilizados en el estudio de la diferenciación. Poseen la capacidad de diferenciarse en las tres capas germinales (19). El ectodermo es la capa germinal primaria más externa que da lugar al sistema nervioso, la epidermis y sus apéndices. El mesodermo es la capa germinal primaria situada entre el ectodermo y el endodermo que da origen al músculo, hueso, tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, glóbulos rojos y blancos y mesénquima de órganos como piel, riñón o gónadas. El endodermo es la capa germinal primaria más interna que da origen a las células epiteliales de los sistemas gastrointestinal, respiratorio, endocrino y urinario (18, 20, 25).

La diferenciación a los linajes celulares depende de la calidad de los EB obtenidos, que se puede afectar por las condiciones del medio, el número de células y el tamaño de los cuerpos. La viabilidad de EB y el rendimiento en la diferenciación terminal varían según el tamaño. Los EB pequeños poseen poca supervivencia durante los procedimientos de diferenciación y los cuerpos muy grandes presentan necrosis central (24, 26, 27). El tamaño de los EB individuales depende del número de células iniciales que influyen en la diferenciación de las capas germinales. Para comparar la variabilidad funcional entre líneas iPSC individuales se requiere de un protocolo estandarizado, que produzca cuerpos de proporciones similares, para evitar un sesgo de diferenciación inducido por el tamaño (26, 27).

Los EB generados a partir de iPSC y cultivados en una estructura tridimensional (3D) difieren de los cultivos en monocapa según el entorno microscópico que representan. A diferencia de los cultivos de segunda dimensión (2D), donde todas las células tienen acceso a los mismos estímulos, los cuerpos 3D presentan una disposición que se asemeja al entorno fisiológico y proporcionan un modelo más cercano a la biología *in vivo*. Estos modelos pueden ser utilizados para la medicina personalizada y el modelado de enfermedades (27, 28).

1.4. Justificación

El uso de iPSC para la formación de EB proporciona una herramienta valiosa para el estudio de las IRD. Estas células se generan a partir de células adultas y se reprograman para adquirir un estado similar al de las células madre embrionarias. Poseen la capacidad de diferenciarse a distintos tipos celulares, incluidos los fotorreceptores y otros tipos de células de la retina. Al diferenciar las iPSC en células de la retina, se pueden formar organoides que imitan la estructura y función de la retina humana. Los EB derivados de iPSC proporcionan un modelo *in vitro* que permite estudiar las IRD en un entorno controlado y reproducible.

Una de las ventajas de las iPSC es que se pueden generar a partir de pacientes que tienen una enfermedad hereditaria específica de la retina. Las células derivadas de ellas conservan el genotipo del paciente, lo que permite investigar la relación entre las variaciones genéticas y los fenotipos asociados en un entorno de laboratorio. Al comparar las células de la retina derivadas de iPSC de pacientes con células de individuos sanos, es posible identificar las alteraciones moleculares y celulares específicas que contribuyen al desarrollo de la enfermedad en estudio.

La formación de EB a partir de células iPSC contribuye al modelado de diversas enfermedades, el descubrimiento de fármacos, la medicina regenerativa y la terapia génica. Las aplicaciones favorecen la comprensión y estudio de las IRD, así como el desarrollo de nuevos medicamentos y de terapias personalizadas, ya que permiten el modelado *in vitro* de la enfermedad, con el estudio de la relación genotipo-fenotipo.

Por todo ello, los EB proporcionarán información sobre la fisiopatología de la RP por su capacidad de diferenciación en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo). Al estudiar las células de la retina afectadas por la enfermedad, se comprenden los mecanismos subyacentes que contribuyen a la degeneración y disfunción de los fotorreceptores y otras células de la retina. Esta información permite desarrollar terapias dirigidas y estrategias de tratamiento.

2. Hipótesis y objetivos

2.1. Hipótesis

La diferenciación a EB de iPSC derivadas de pacientes con RP, demuestra que estas células son capaces de reproducir la estructura y función de los tejidos embrionarios, lo que pone de manifiesto su potencial para la modelación de las IRD.

2.2. Objetivo general

- Analizar la capacidad de iPSC obtenidas de pacientes con RP para diferenciarse en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), a partir de la generación de EB.

2.2.1. Objetivos específicos

- Desarrollar EB a partir de iPSC de pacientes con RP.
- Caracterizar la capacidad de diferenciación de los EB en las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo).

3. Materiales y métodos

La presente investigación se realizó en los laboratorios del Área de Investigación del Instituto Universitario de Oftalmobiología Aplicada (IOBA) de la Universidad de Valladolid, en el periodo comprendido de enero a junio de 2023. Este estudio ha contado con el visto bueno de los tutores para la presentación del Trabajo Fin de Máster (Anexo 1), de la Comisión de Investigación del IOBA (Anexo 2) y el dictamen favorable del Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos del Hospital Clínico Universitario de Valladolid (Anexo 3).

3.1. Cultivo de iPSC

En este estudio se utilizaron líneas iPSC humanas, derivadas de una paciente con RP causada por la mutación (c.1354dupT) en el gen *PROM1* (OMIM: 604365) y generadas a partir de fibroblastos dérmicos obtenidos de muestras de piel de la zona de la espalda. Dichas células ya presentaban confirmación de características de iPSC a través del test de fosfatasa alcalina positivo y de la expresión de marcadores de pluripotencia (Oct4, Nanog, Sox2, SSEA3, SSEA4, Tra-1-60, Tra-1-81) mediante inmunocitoquímica (23).

Las células iPSC fueron sometidas al proceso de descongelación y sembradas en tres placas p60 (60 mm Ultra-Low Attachment Culture Dish, Corning: 153261), una para cada línea germinal, adaptadas a 3 ml de Geltrex (Gibco: A1413302) y suplementadas con 3 ml del medio de mantenimiento mTeSR1 PLUS (Stem Cell: 100-0276), penicilina-estreptomicina (5.000 U/ml, Similar: A15070063) e inhibidor de apoptosis ROCK (Y-27632) (Sigma-Aldrich: SCM075). Al día siguiente se realizó el cambio del medio mTeSR1 PLUS sin ROCK, se llevó a cabo este cambio diario durante siete días (5 ml por cada placa) y se mantuvieron en el incubador a 37°C y 5 % de CO₂ (29).

Cuando la densidad celular alcanzó el 70-80 % de confluencia, se lavó con 3 ml de PBS sin calcio ni magnesio (BioWhittaker: 17-516F) y se levantó con 3 ml de EDTA 0.5 mM (Invitrogen: AM9260G) diluido en PBS. Posteriormente se añadieron 12 ml de medio mTeSR1 PLUS a cada placa y se resuspendieron, para después pasar el contenido a un tubo falcón de 15 ml. Se añadieron 120 µl de la mezcla con las células a cada pocillo de la microplaca de fondo en forma de V con tratamiento para cultivo de 96 pocillos (Corning: 10462012). Luego se resuspendieron cada cierto tiempo, se rellenó toda la placa, se centrifugó 10 minutos a 900 g para finalmente dejarlo en el incubador durante dos días (29).

3.2. Formación de cuerpos embrionarios

Con una pipeta multicanal se recogieron 150 µl del medio de la placa y se liberaron con fuerza. Se realizó esta operación varias veces hasta traspasar todo el contenido, de todos los pocillos de la placa en V, a una placa p60 no tratada. Se puso el volumen de la mitad de la placa y se retiró un poco hasta observar que los EB no se moviesen libremente y se mantuvieran en el centro. Finalmente, se depositó el volumen del resto de la placa. Con cuidado, se retiró el medio, manteniendo los EB en el centro, se añadieron 6 ml de mTeSR1 PLUS y se dejaron dos días en el incubador (23, 29).

Para las tres capas germinales se prepararon 2 ml de medio de endodermo y 200 μ l de Geltrex (28) para una placa de inmunocitoquímica Ibidi de ocho pocillos (Fisher: NC0704855) (1 placa/linaje). Se echaron 200 μ l del medio de diferenciación correspondiente a cada placa. En la campana de flujo laminar y con el microscopio se fueron seleccionando los EB con una pipeta y se fueron depositando 3-4 en cada pocillo. Se guardaron en el incubador y se realizó el cambio de medio en días alternos durante tres semanas (Tabla 1). Para el medio mesodermo el ácido ascórbico se diluyó en DMEM y fue filtrado (29).

Tabla 1. Medios de cultivo EB para marcador de endodermo, ectodermo y mesodermo.

Capa germinal	Medio	Casa comercial	Cantidad empleada
Endodermo (50 ml)	DMEM	Gibco: A1286101	40 ml
	FBS 20 %	Gibco: A5256701	10 ml
	Glutamax	Gibco: 35050061	500 μ l
	β -mercapto 0,1 mM	Merck: 444203	50 μ l
	NEAA	Gibco: 11140050	500 μ l
	Pen-strep 1x	Gibco: 15070063	500 μ l
Ectodermo (40 ml)	Neurobasal 50 %	Gibco: 21103049	20 ml
	DMEM/F-12 50 %	Gibco: 21331020	20 ml
	Glutamax	Gibco: 35050061	400 μ l
	Pen-strep 1x	Gibco: 15070063	400 μ l
	B27	Gibco: A3653401	400 μ l
	N2	Gibco: 17502048	200 μ l
Mesodermo (40 ml)	Medio endodermo	-	20 ml
	100 μ M ácido ascórbico (Pm=176,12 KDa)	Thermo Scientific Chemicals: 11487487	35 mg
	DMEM	Gibco: A1286101	1 ml

3.3. Inmunocitoquímica

A partir del día 24 del experimento se realizaron pruebas de inmunodetección para marcadores de cada capa germinal (endodermo, mesodermo y ectodermo). Durante el protocolo se emplearon diversas soluciones: TBS 10X (Thermo Scientific Chemicals: J60764.K2), TBS 1X (900 ml agua destilada + 100 ml TBS 10X), TBS+ (TBS 1X + 0,1 % Tritón (Sigma-Aldrich: X100-100ML) y TBS++ (TBS 1X + 0,3 % Tritón + 3 % Donkey Serum (Sigma-Aldrich: S30-100ML)). Se preparó un falcón con 10 ml (5 ml) de TBS++ y luego se añadieron 300 μ l (150 μ l) de suero de burro (23, 28, 29).

En la cabina de flujo laminar se retiró el medio, se lavó dos veces con 200 μ l de PBS, se fijaron las células con 200 μ l de formalina (Merck: 47608-250ML-F) y se esperó 20-30 minutos a temperatura ambiente (RT). Posteriormente, en el laboratorio se lavaron las placas ibidi tres veces con 200 μ l de TBS 1X durante 5 minutos y 200 μ l de TBS+ durante otros 5 minutos más a RT. Después se realizó el bloqueo, donde se incubaron con 250 μ l de TBS++ de 30-60 minutos a RT. Se realizó la preparación de la combinación de anticuerpos (Tabla 2) en un eppendorf (100 μ l por pocillo) (28, 29).

Tabla 2. Anticuerpos primarios como marcadores de inmunocitoquímica.

Tejido	Anticuerpo	Casa comercial	μ l Anticuerpo	μ l TBS++
Endodermo	Alfa-1-fetoprotein (AFP) (1:400)	Invitrogen: 12829152	2	800
Mesodermo	Alfa-smooth muscle actin (α -SMA) (1:400)	Invitrogen: MA5-15871	2	800
Ectodermo	Beta-III Tubulin (Tuj1) (1:500)	Invitrogen: 480011	1,6	800

Se añadieron 100 μ l al pocillo que correspondía, incubándolos en frigorífico a 4°C durante 12 horas. Al día siguiente se dejaron las placas 2 horas a RT. Seguidamente se procedió a lavar tres veces con 200 μ l de TBS+ durante 5 minutos (23, 28, 29).

Se prepararon los anticuerpos secundarios (Tabla 3) y se añadieron 100 μ l al pocillo correspondiente (a partir de ese momento todo se hizo en oscuridad). Se incubaron 2 horas a 37°C en incubador, se dejaron a RT durante 30 minutos y se lavaron tres veces con 200 μ l de TBS 1X durante 5 minutos (28, 29).

Tabla 3. Anticuerpos secundarios como marcadores de inmunocitoquímica.

Tejido	Anticuerpo	Casa comercial	μ l Anticuerpo	μ l TBS++
Endodermo	Anti-rabbit 488 verde IgG (1:200)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC: sc-516248	4	800
Mesodermo	Anti-mouse 555 rojo IgG (1:200)	Invitrogen: A-21147	4	800
Ectodermo	Anti-mouse 555 rojo IgG (1:200)	Invitrogen: A-21147	4	800

Finalmente, se realizó la incubación con 100 μ l de DAPI (2-4-amidinofenil-1H-indol-6-carboxamida) (Merck: 10236276001) 1:10.000 (1 μ l en 10 ml de TBS++) 10 minutos a RT. Seguidamente se lavaron dos veces con 200 μ l de TBS 1X durante 5 minutos y se añadieron 100 μ l de TBS 1X (26, 28).

Posteriormente, se observaron y se tomaron las imágenes correspondientes (Tabla 4) con un microscopio confocal LEICA TCS SP5 MDI-6000B (Leica Microsystems), que se analizaron con el programa digital LEICA LAS AF (Leica Microsystems). El procesamiento final de las imágenes se realizó utilizando el programa digital Adobe Photoshop (Adobe Systems) (26, 29).

Tabla 4. Marcadores específicos de estructuras celulares.

Anticuerpo	Estructura celular
Alpha-1-fetoprotein	citoplásmica
Alfa-smooth muscle actin	citoplásmica, filamentosa
Beta-III Tubulin Tuj1	citoplásmica, filamentosa

4. Resultados

4.1. Cultivo de iPSC

Los cultivos de iPSC mostraron grados bajos de diferenciación espontánea antes de iniciar el protocolo de diferenciación, ya que estos cultivos a largo plazo deben analizarse regularmente para detectar anomalías cariotípicas y contaminación. Se presentaron como células redondeadas con núcleos grandes con una apariencia prominente y una relación núcleo-citoplasma alta (citoplasma escaso y nucléolo grande). No crecieron como células individuales, sino como agregados en colonias y exhibieron forma homogénea, bordes lisos y regulares (Figura 4).

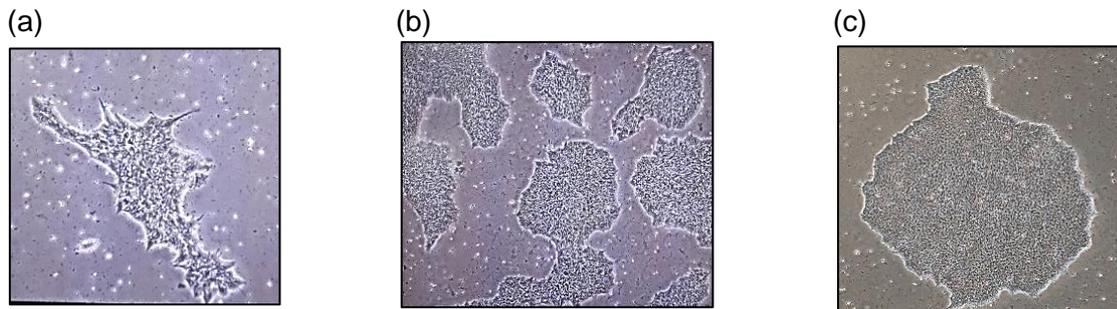


Figura 4. Morfología de las colonias iPSC mantenidas en cultivo con el medio mTeSR1 PLUS (a) células con dos días; (b) colonias celulares de cuatro días; y (c) colonias de células a los cinco días. Magnificación: 4x.

4.2. Formación de EB

Las iPSC formaron cuerpos por sedimentación cuando se colocaron en los pocillos de la microplaca con fondo en forma de V y fueron sometidas a la centrifugación. Después de 48 horas, se formaron grupos celulares de forma espontánea, que luego se transfirieron a un cultivo en suspensión para una mayor maduración. Los EB se formaron como agregados tridimensionales de células, que adoptaron una forma esférica y tamaño homogéneo, donde experimentaron crecimiento y estabilización durante su mantenimiento con el medio mTeSR1 PLUS. El análisis en diferentes momentos del experimento mostró un mayor nivel de organización estructural interna en función del tiempo (Figura 5).

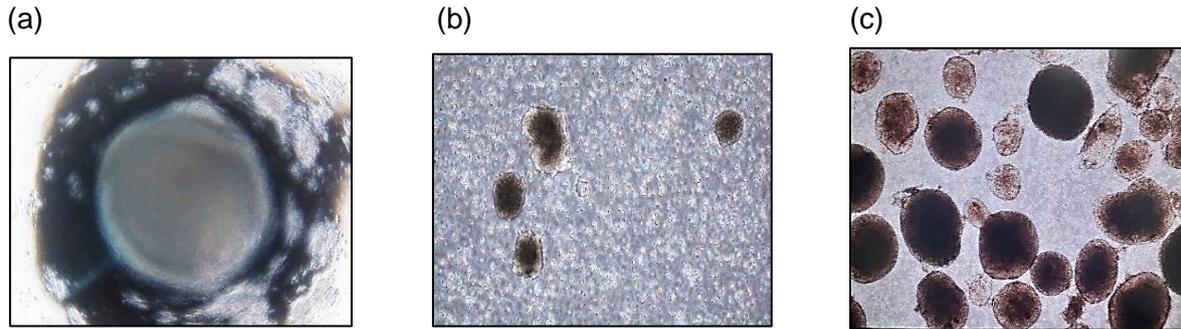


Figura 5. Optimización del protocolo de formación de EB. Agregados después de la formación de EB en medio de mantenimiento mTeSR1 PLUS (a) imágenes de pocillos de cultivo en forma de V después de la formación de EB por sedimentación; y (b) EB a los tres días de incubación. (c) EB de gran desarrollo y maduración a los seis días de incubación y mantenimiento en cultivo. Magnificación: 4x.

4.2.1. Viabilidad de EB en cultivo de suspensión

Se mantuvieron en cultivo en suspensión con los diferentes medios de diferenciación durante 21 días, el periodo requerido para la formación de las tres capas germinales durante la embriogénesis. Durante el tiempo de cultivo prolongado, los EB mantuvieron la viabilidad, sus estructuras y continuaron creciendo y desarrollándose.

4.2.1.1. Características de los EB mantenidos en los medios de diferenciación

Durante el periodo de mantenimiento de los EB en los diferentes medios de diferenciación (ectodermo, mesodermo y endodermo) se pudo apreciar que inicialmente los EB adoptaron la capacidad de expansión en la placa ibidi para posteriormente formar vacuolas o quistes. Cuando los cuerpos se enquistaron, se obtuvieron estructuras encapsuladas dentro de una matriz extracelular. Esto permitió una organización tridimensional más definida y una mejor interacción entre las células (Figura 6).

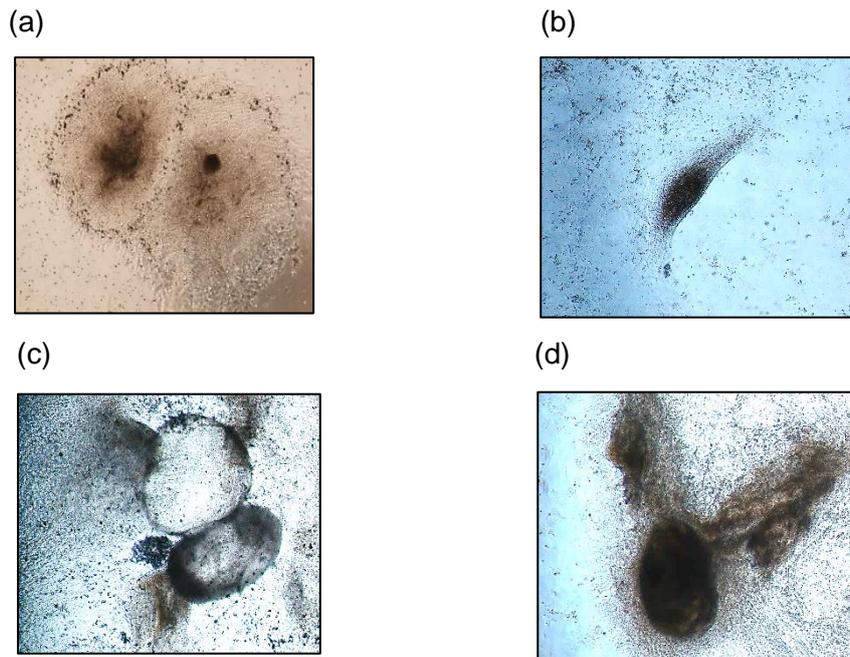


Figura 6. Formación de EB en los diferentes medios de diferenciación (a) células expandidas a los dos días de cultivo; (b, c, d) presencia de quistes/vacuolas a las tres semanas de cultivo en los diferentes linajes; (b) ectodermo; (c) mesodermo; y (d) endodermo. Magnificación: 4x.

4.2.2. Diferenciación a las capas germinales mediante análisis de inmunocitoquímica

Para confirmar la pluripotencialidad de los EB producidos, se demostró que los EB fueron capaces de generar representantes de las tres capas germinales del desarrollo (ectodermo, mesodermo y endodermo). Se reveló una regulación ascendente de genes asociados con los linajes, Tuj1 (para ectodermo), α -SMA (para mesodermo) y AFP (para endodermo). El potencial de diferenciación de las iPSC generadas se confirmó a través de la detección de positividad de inmunocitoquímica. Esta técnica permitió visualizar la expresión de los marcadores específicos en las células diferenciadas. La matriz extracelular en la que se enquistan los EB proporcionó una superficie tridimensional que permitió la adhesión y la interacción de las células. Esta interacción permitió el desarrollo y la diferenciación celular.

4.2.2.1. Características de la capa germinal ectodérmica

En la capa germinal ectodérmica se observaron células planas, alargadas, con prolongaciones ramificadas o células con forma de epitelio, similares a las células en desarrollo del ectodermo. Se organizaron formando estructuras epiteliales, como placas neurales. Se observaron contactos y conexiones celulares, lo que reflejó la organización y comunicación celular (Figura 7).

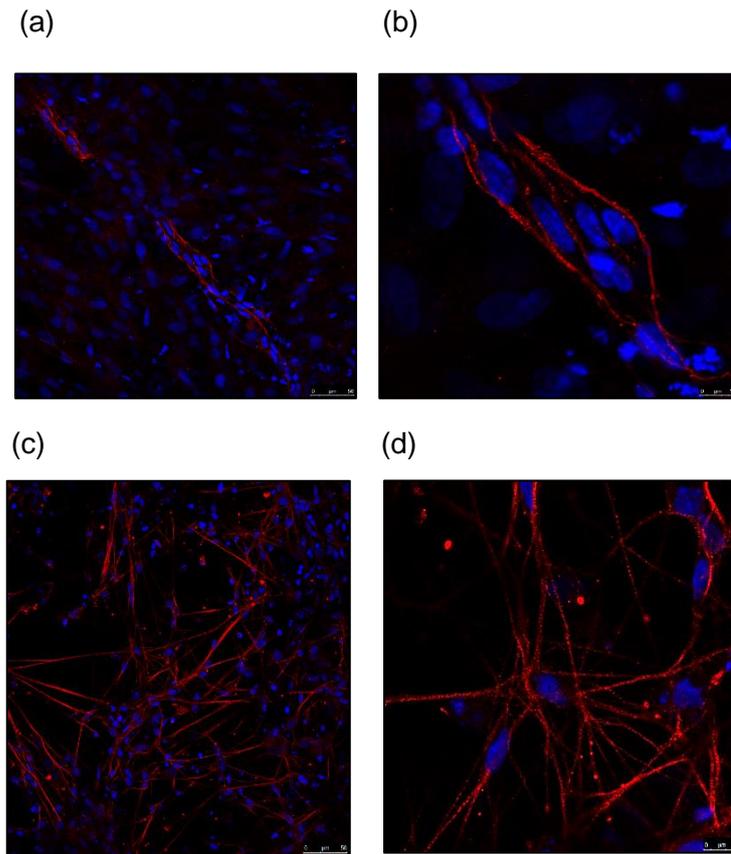


Figura 7. Diferenciación *in vitro* a la capa germinal ectodermo. Células positivas para Tuj1 (rojo) mostrando las estructuras citoplasmática y filamentosa. DAPI (azul) para tinción de los núcleos. Barras de escala: (a, c) 50 μm ; y (b, d) 10 μm .

4.2.2.2. Características de la capa germinal mesodérmica

En la capa germinal se observaron células alargadas y fusiformes. Las células diferenciadas expresaron los marcadores específicos. Se apreciaron contactos y conexiones celulares, lo que reflejó la organización y comunicación en el tejido mesodérmico en desarrollo (Figura 8).

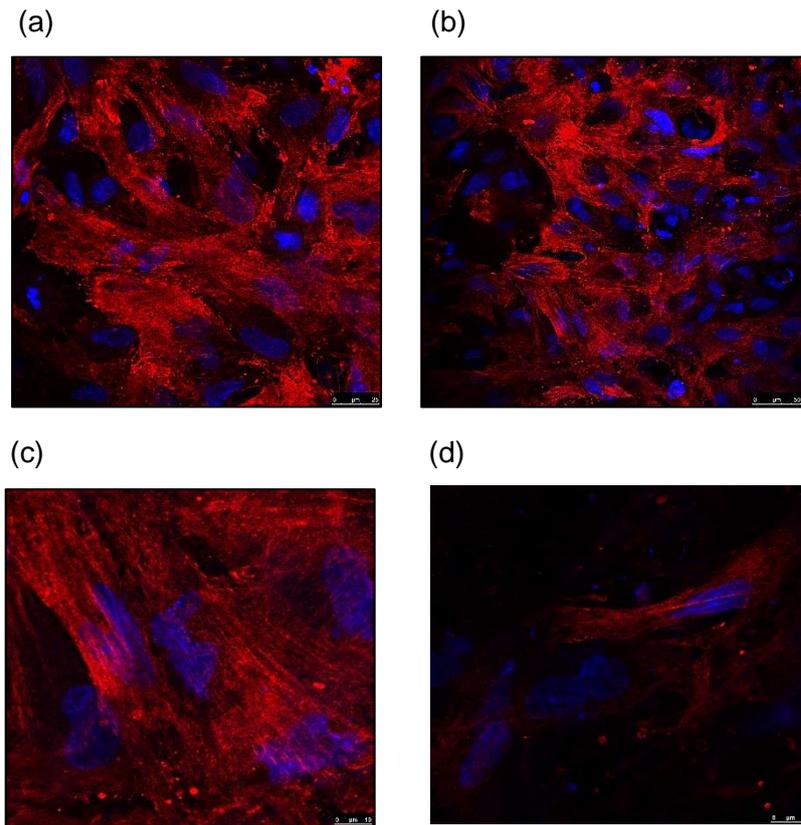


Figura 8. Diferenciación *in vitro* a la capa germinal mesodermo. Células positivas para SMA (rojo) mostrando las estructuras citoplasmática y filamentosa. DAPI (azul) para tinción de los núcleos. Barras de escala: (a) 25 μm ; (b) 50 μm ; y (c, d) 10 μm .

4.2.2.3. Características de la capa germinal endodérmica

En la capa germinal endodermo se observaron células cúbicas, prismáticas o células epiteliales con forma de copa. Se organizaron en patrones como placas o formación de estructuras tridimensionales similares a los brotes de órganos. Se apreciaron contactos y conexiones celulares, lo que reflejó la organización y comunicación celular en el tejido endodérmico en desarrollo (Figura 9).

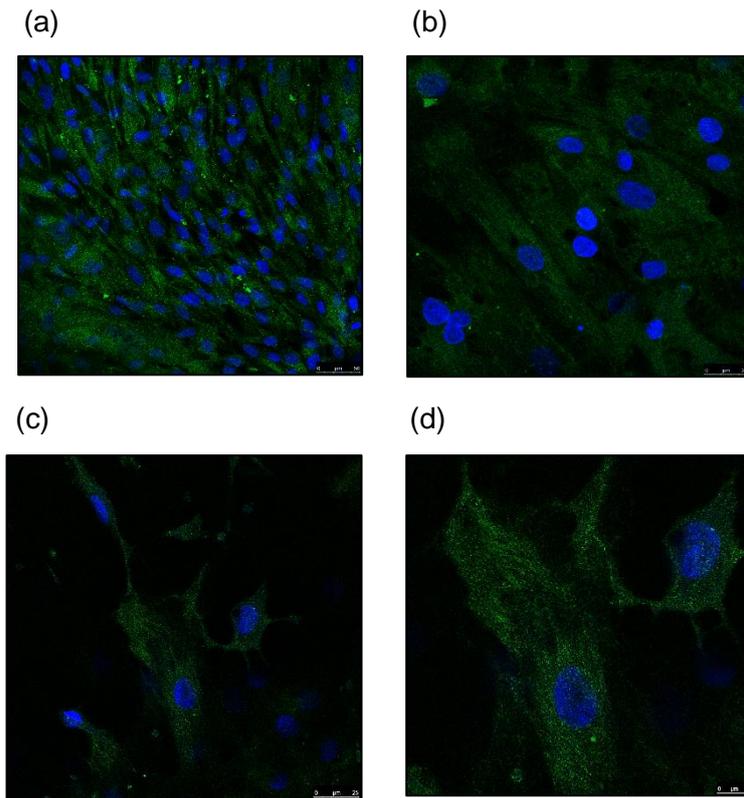


Figura 9. Diferenciación *in vitro* a la capa germinal endodermo. Células positivas para AFP (verde) mostrando las estructuras citoplasmáticas. DAPI (azul) para tinción de los núcleos. Barras de escala: (a) 50 μm ; (b, c) 25 μm ; y (d) 10 μm .

5. Discusión

Las investigaciones realizadas han demostrado que se utilizan diversas técnicas para obtener líneas de células iPSC a partir de células de la piel, sangre, riñón, tanto de donantes sanos como de pacientes con patologías. Estas células se han diferenciado a linajes retinianos, incluyendo organoides retinianos multicapa, RPE y fotorreceptores (20, 19). Los resultados de la presente investigación respaldan las afirmaciones hechas por los autores, al demostrar la viabilidad y calidad de las iPSC obtenidas de fibroblastos dérmicos de pacientes con IRD, sin embargo, Romanazzo et al. (2019) sugieren obtener iPSC de las células sanguíneas, por ser un método menos invasivo.

La heterogeneidad inherente de las iPSC, como el ciclo celular asincrónico y la asimetría espacial en la adhesión celular, puede afectar su capacidad para diferenciarse en múltiples linajes. Se están realizando esfuerzos para minimizar la heterogeneidad perjudicial mediante la mejora de las condiciones de cultivo y los métodos de selección, al tiempo que se utiliza la heterogeneidad intrínseca para controlar la proliferación y diferenciación (26). Los estudios realizados ratifican lo planteado, demostrando que las iPSC son empleadas en la investigación científica y médica, ya que permiten la generación de modelos de enfermedades y el estudio de su funcionamiento.

Las iPSC se deben mantener con vitalidad y evitar el crecimiento excesivo de las colonias, ya que esto puede provocar diferenciación espontánea (23); dichos estudios proporcionan información relevante para que los resultados obtenidos sean verídicos. El uso de placas p60 en el cultivo celular ha demostrado ser exitoso, ya que para obtener resultados relevantes es importante comenzar con iPSC indiferenciadas para garantizar que su desarrollo en EB sea sincrónico. Estos estudios concuerdan con lo planteado por Koehler et al. (2017), al referir que estas placas proporcionan un entorno propicio para el crecimiento y la multiplicación efectiva de las iPSC, lo que permite a los investigadores generar EB de manera exitosa.

Los resultados de la presente investigación están en concordancia con otros estudios que han utilizado la densidad de siembra de células iPSC para formar EB. Varios autores han evaluado el uso de placas con fondo en V y han obtenido cuerpos homogéneos y estables (24, 29). Dentro del rango de densidad celular utilizado, se observó la formación de EB esféricos de tamaño uniforme y compacto después de 48 horas de incubación, que posteriormente fueron transferidos a un cultivo en suspensión para un mayor desarrollo, coincidiendo con los hallazgos presentados.

Otros autores establecieron criterios de evaluación, como una mínima área de diferenciación espontánea antes de la formación de los EB, el aumento de tamaño a lo largo del tiempo y una baja mortalidad celular. En el día 6 de diferenciación, se esperaba que una fracción significativa de los EB se volviera quística, representando entre el 15 % y el 25 % de la población total, lo que indica una diferenciación eficiente (24). En otras investigaciones realizadas se determinó que un tamaño de aproximadamente 200 μm de diámetro para los EB y una densidad de recubrimiento de 2-3 cuerpos por cm^2 son apropiados para la diferenciación al tejido retiniano. Se confirmó que con el protocolo utilizado se obtienen cuerpos tridimensionales a partir de células iPSC. Se estimó que una placa de 6 pocillos con un pocillo de iPSC al 80 % de confluencia puede generar alrededor de 1000 EB, lo que sugiere que desarrollar protocolos eficientes es beneficioso para la producción a gran escala de

organoides retinianos (20). Estos estudios concuerdan con los resultados hallados en la presente investigación al obtener EB viables y realizar la diferenciación a los linajes celulares.

Inicialmente, la formación de EB a partir de células iPSC presentaba desafíos para obtener cuerpos de tamaño uniforme y evitar la alta tasa de muerte celular durante la disociación de las células individuales. Para superar estos obstáculos, se utiliza el inhibidor Y-27632 (ROCK), que bloquea la muerte celular inducida por la disociación. Esto permite mantener la viabilidad celular y promover la formación eficiente de EB a partir de células individuales en condiciones de cultivo (26). Los resultados obtenidos en la investigación respaldan la eficacia del uso del inhibidor mencionado, al obtener cultivos eficientes de EB sin una alta tasa de muerte celular.

Estudios anteriores han indicado que el inhibidor de ROCK no es esencial para el cultivo de células iPSC, la formación de EB y la diferenciación en sistemas basados en micropocillos de hidrogel de fondo redondo. En sus experimentos no encontraron diferencias significativas en la viabilidad y pluripotencia de los EB formados con y sin el inhibidor. Esto sugiere que la presencia del inhibidor de ROCK puede no ser necesaria en este sistema específico. Se ha demostrado que es posible obtener EB utilizando diferentes medios de diferenciación y formatos (24). Sin embargo, otros estudios realizados por Dziejzicka et al. (2016) desarrollan un protocolo de formación de EB a partir de iPSC cultivadas en un sistema libre de ROCK en laminin-521, donde obtuvieron que la tasa de proliferación celular afectó la eficiencia de la formación de agregados, planteando que la adición del inhibidor de ROCK era esencial para la formación reproducible de los EB. En el presente estudio se decidió utilizar el inhibidor ROCK durante el cultivo celular. No obstante, sería necesario realizar investigaciones en el futuro para comparar los resultados y determinar si el inhibidor de ROCK es realmente necesario o no en el cultivo de células iPSC para la formación de EB, empleando placas p60 y con fondo en V, respectivamente. Esto es relevante dado que los autores mencionados utilizaron placas de fondo redondo de 96 pocillos.

Un enfoque más controlado para la producción de EB implica el uso de micropocillos. En este método, las células iPSC se disocian y se siembran en pequeños micropocillos, donde se agregan y crecen hasta alcanzar el tamaño máximo. Al controlar el número de iPSC sembradas y utilizar la centrifugación para promover la agregación, se logra un control del tamaño de los EB y se obtienen cuerpos homogéneos. Este método requiere el uso de centrifugación y la manipulación individual de los EB formados, un paso adicional de cultivo para su crecimiento y maduración posteriores (24). Los estudios realizados en la presente investigación ratifican las afirmaciones hechas por estos autores sobre la aplicación de este método.

Los EB obtenidos en este experimento demostraron una alta viabilidad durante un cultivo prolongado de hasta 30 días y exhibieron una diferenciación a los diversos linajes celulares, coincidiendo con lo planteado por Pettinato et al. (2014), donde los EB que se mantuvieron en medio de diferenciación durante 20 días en cultivo en suspensión revelaron una regulación ascendente de genes asociados con cada una de las tres capas germinales. Las células diferenciadas adquirieron características distintivas del linaje deseado, lo que sugiere su potencial aplicación en estudios biológicos y clínicos.

Para comprobar la diferenciación celular en las tres capas germinales se emplearon los anticuerpos AFP, α -SMA y Tuj1, aunque otros autores, como Pettinato et al. (2014) utilizaron otros marcadores, como Sox-1 (para ectodermo) y Brachyury (para mesodermo) obteniendo resultados positivos. En el presente estudio, se observó que los EB generados a partir de las células iPSC mostraron una forma esférica consistente para todas las condiciones de diferenciación. Estos resultados respaldan lo planteado por Saito-Diaz y Zeltner (2019) sobre el uso de las células iPSC para la formación de EB como herramienta valiosa en la investigación biomédica, permitiendo el modelado de IRD, la diferenciación celular dirigida, la evaluación de fármacos y el estudio del desarrollo embrionario. El protocolo utilizado en la formación de EB fue satisfactorio y coinciden con las investigaciones realizadas por Koehler et al. (2017) que describen estrategias similares para obtener organoides retinianos a partir de iPSC cultivadas en placas p60.

6. Conclusiones

1. Los hallazgos presentados en este estudio han demostrado que los EB generados a partir de las iPSC de una paciente con RP causada por la mutación (c.1354dupT) en el gen *PROM1* son capaces de diferenciarse en las capas germinales ectodermo, mesodermo y endodermo, donde exhiben viabilidad y estructuras organizadas.
2. Los resultados obtenidos evidencian que, con el protocolo empleado, el uso de las iPSC para la formación de EB ofrece oportunidades significativas en el desarrollo de este campo de estudio.
3. Los experimentos realizados *in vitro*, constituyen precursores para su posterior aplicación *in vivo*, aunque existen desafíos, los avances en tecnología y la investigación continua permiten impulsar este campo de la medicina.

7. Bibliografía

1. Kaur G, Singh NK. Inflammation and retinal degenerative diseases. *Neural Regen Res* [Internet]. 2023 [cited 2023 May 12];18(3):513–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.350192>.
2. Markitantova Y, Simirskii V. Inherited eye diseases with retinal manifestations through the eyes of homeobox genes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 28];21(5):1602. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21051602>.
3. Dehghan S, Mirshahi R, Shoaee-Hassani A, Naseripour M. Human-induced pluripotent stem cells-derived retinal pigmented epithelium, a new horizon for cells-based therapies for age-related macular degeneration. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 11];13(1):217. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35619143/>.
4. Schneider N, Sundaresan Y, Gopalakrishnan P, Beryozkin A, Hanany M, Levanon EY, et al. Inherited retinal diseases: Linking genes, disease-causing variants, and relevant therapeutic modalities. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 12];89(101029):101029. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34839010/>.
5. Türksever C, López Torres LT, Valmaggia C, Todorova MG. Retinal oxygenation in inherited diseases of the retina. *Genes (Basel)* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 24];12(2):272. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/genes12020272>.
6. Na K-H, Kim HJ, Kim KH, Han S, Kim P, Hann HJ, et al. Prevalence, age at diagnosis, mortality, and cause of death in retinitis pigmentosa in Korea-A nationwide population-based study. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 24];176:157–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28130043/>.
7. Coco-Martin RM, Diego-Alonso M, Orduz-Montaña WA, Sanabria MR, Sanchez-Tocino H. Descriptive study of a cohort of 488 patients with inherited retinal dystrophies. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2021 [cited 2023 Jul 10];15:1075–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33727790/>.
8. Ganapathi M, Thomas-Wilson A, Buchovecky C, Dharmadhikari A, Barua S, Lee W, et al. Clinical exome sequencing for inherited retinal degenerations at a tertiary care center. *Sci Rep* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 12];12(1):9358. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35672425/>.
9. Liang J, She X, Chen J, Zhai Y, Liu Y, Zheng K, et al. Identification of novel PROM1 mutations responsible for autosomal recessive maculopathy with rod-cone dystrophy. *Arbeitsphysiologie* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 13];257(3):619–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30588538/>.
10. Pras E, Abu A, Rotenstreich Y, Avni I, Reish O, Morad Y, et al. Cone-rod dystrophy and a frameshift mutation in the PROM1 gene. *Mol Vis* [Internet]. 2009 [cited 2023 Feb 13];15:1709–16. Available from: <http://www.molvis.org/molvis/v15/a183>.
11. Michaelides M, Johnson S, Poulson A, Bradshaw K, Bellmann C, Hunt DM, et al. An autosomal dominant bull's-eye macular dystrophy (MCDR2) that maps to the short arm of chromosome 4. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2003 [cited 2023 Feb 25];44(4):1657–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12657606/>.

12. Imani S, Cheng J, Shasaltaneh MD, Wei C, Yang L, Fu S, et al. Genetic identification and molecular modeling characterization reveal a novel *PROM1* mutation in Stargardt4-like macular dystrophy. *Oncotarget* [Internet]. 2018 [cited 2023 May 18];9(1):122–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29416601/>.
13. Bhattacharya S, Gangaraju R, Chaum E. Recent advances in retinal stem cell therapy. *Curr Mol Biol Rep* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 23];3(3):172–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29152454/>.
14. Usategui-Martín R, Puertas-Neyra K, García-Gutiérrez M-T, Fuentes M, Pastor JC, Fernandez-Bueno I. Human mesenchymal stem cell secretome exhibits a neuroprotective effect over in vitro retinal photoreceptor degeneration. *Mol Ther Methods Clin Dev* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 23];17:1155–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32514411/>.
15. Aboul-Soud MAM, Alzahrani AJ, Mahmoud A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)-roles in regenerative therapies, disease modelling and drug screening. *Cells* [Internet]. 2021 [cited 2023 Feb 23];10(9):2319. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34571968/>.
16. Hoang DM, Pham PT, Bach TQ, Ngo ATL, Nguyen QT, Phan TTK, et al. Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther* [Internet]. 2022 [cited 2023 May 10];7(1):272. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35933430/>.
17. Huang C-Y, Liu C-L, Ting C-Y, Chiu Y-T, Cheng Y-C, Nicholson MW, et al. Human iPSC banking: barriers and opportunities. *J Biomed Sci* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 10];26(1):87. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31660969/>.
18. Romanazzo S, Nemeč S, Roohani I. iPSC bioprinting: Where are we at? *Materials (Basel)* [Internet]. 2019 [cited 2023 Feb 12];12(15):2453. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31374871/>.
19. De Masi C, Spitalieri P, Murdocca M, Novelli G, Sangiuolo F. Application of CRISPR/Cas9 to human-induced pluripotent stem cells: from gene editing to drug discovery. *Hum Genomics* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 28];14(1):25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32591003/>.
20. Poetsch MS, Strano A, Guan K. Human induced pluripotent stem cells: From cell origin, genomic stability, and epigenetic memory to translational medicine. *Stem Cells* [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 10];40(6):546–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35291013/>.
21. Saito-Diaz K, Zeltner N. Induced pluripotent stem cells for disease modeling, cell therapy and drug discovery in genetic autonomic disorders: a review. *Clin Auton Res* [Internet]. 2019 [cited 2023 May 28];29(4):367–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30631982/>.
22. Chang C-Y, Ting H-C, Liu C-A, Su H-L, Chiou T-W, Lin S-Z, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC)-based neurodegenerative disease models for phenotype recapitulation and drug screening. *Molecules* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 12];25(8):2000. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32344649/>.
23. Howden SE, Thomson JA, Little MH. Simultaneous reprogramming and gene editing of human fibroblasts. *Nat Protoc* [Internet]. 2018 [cited 2023 Feb 11];13(5):875–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29622803/>.

24. Pettinato G, Wen X, Zhang N. Formation of well-defined embryoid bodies from dissociated human induced pluripotent stem cells using microfabricated cell-repellent microwell arrays. *Sci Rep* [Internet]. 2014 [cited 2023 Jul 10];4(1):7402. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25492588/>.
25. Shahbazi MN. Mechanisms of human embryo development: from cell fate to tissue shape and back. *Development* [Internet]. 2020 [cited 2023 Feb 13];147(14):dev190629. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32680920/>.
26. Dziejzicka D, Markouli C, Barbé L, Spits C, Sermon K, Geens M. A high proliferation rate is critical for reproducible and standardized embryoid body formation from laminin-521-based human pluripotent stem cell cultures. *Stem Cell Rev* [Internet]. 2016 [cited 2023 Feb 15];12(6):721–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27544201/>.
27. Skopalová K, Radaszkiewicz KA, Kašpárková V, Stejskal J, Bober P, Junkar I, et al. Modulation of differentiation of embryonic stem cells by polypyrrole: The impact on neurogenesis. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 [cited 2023 May 23];22(2):501. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33419082/>.
28. Olgasi C, Cucci A, Follenzi A. iPSC-derived liver organoids: A journey from drug screening, to disease modeling, arriving to regenerative medicine. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 [cited 2023 May 26];21(17):6215. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32867371/>.
29. Barsby T, Ibrahim H, Lithovius V, Montaser H, Balboa D, Vähäkangas E, et al. Differentiating functional human islet-like aggregates from pluripotent stem cells. *STAR Protoc* [Internet]. 2022 [cited 2023 Feb 25];3(4):101711. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36136756/>.
30. Koehler KR, Nie J, Longworth-Mills E, Liu X-P, Lee J, Holt JR, et al. Generation of inner ear organoids containing functional hair cells from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2017 [cited 2023 May 12];35(6):583–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28459451/>.