

*Trabajo Fin de Máster*

# Nuevos modelos celulares para el estudio de las enfermedades mitocondriales a partir de células madre pluripotentes inducidas

*New cellular models for the study of mitochondrial diseases based on induced pluripotent stem cells*

---

Máster en Biología Molecular y Celular

**Autora:** Beatriz Gastón Gálvez

**Directora:** Ester López Gallardo

*Grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial*

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular*

*Facultad de Veterinaria*

Curso académico 2023/24

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>2</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>3</b>
1. 1. Sistema genético mitocondrial.....	3
1. 2. Enfermedades mitocondriales .....	4
1. 3. Modelos de estudio de enfermedades mitocondriales .....	6
1. 3. 1. Modelos animales .....	6
1. 3. 2. Modelos celulares .....	8
1. 3. 2. 1. Híbridos citoplásmicos o “cíbridos” .....	8
1. 3. 2. 2. Células primarias derivadas de pacientes .....	9
1. 3. 2. 3. Células madre pluripotentes inducidas derivadas de paciente .....	9
1. 4. Células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSCs) .....	10
1. 4. 1. Aplicaciones de iPSCs en modelos celulares .....	11
1. 4. 1. 1. Diferenciación a fibras musculares esqueléticas inervadas .....	12
<b>2. HIPÓTESIS</b> .....	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>13</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>14</b>
4. 1. Materiales y reactivos.....	14
4. 1. 1. Líneas celulares.....	14
4. 1. 2. Reactivos .....	14
4. 1. 2. 1. Reactivos generales .....	14
4. 1. 2. 2. Medios de cultivo y material estéril .....	14
4. 1. 2. 2. Reactivos para PCR .....	14
4. 1. 2. 3. Kits comerciales.....	15
4. 1. 2. 4. Anticuerpos para inmunocitoquímica .....	15
4. 1. 3. Equipos e instrumentos.....	15
4. 2. Métodos .....	16
4. 2. 1. Técnicas de cultivo celular .....	16
4. 2. 1. 1. Mantenimiento.....	16
4. 2. 1. 2. Tratamiento de células con BrEt y ddC - depleción de mtDNA.....	17
4. 2. 1. 3. Tripsinización.....	17
4. 2. 1. 4. Recuento celular.....	18
4. 2. 1. 5. Congelación y descongelación .....	18
4. 2. 1. 6. Recogida de pellets.....	19
4. 2. 2. Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs.....	19
4. 2. 2. 1. Enucleación de células donantes de mitocondrias - generación de citoplastos .....	19
4. 2. 2. 1. 1. Eficacia de la selección con medio HAT .....	19
4. 2. 2. 1. 2. Inmunocitoquímica de la placa de enucleación .....	19
4. 2. 2. 2. Fusión celular de donantes de núcleo y donantes de mitocondrias .....	20

4. 2. 2. 2. 1. Pasos preliminares a la fusión celular .....	20
4. 2. 2. 2. 2. Fusión con células enucleadas adherentes .....	20
4. 2. 2. 2. 3. Fusión con células enucleadas en suspensión .....	21
4. 2. 2. 2. 4. Optimización de la concentración de PEG para la fusión.....	22
4. 2. 2. 3. Aislamiento y fragmentación de clones.....	22
4. 2. 3. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos.....	23
4. 2. 3. 1. Extracción de DNA a partir de pellets celulares y cuantificación .....	23
4. 2. 3. 2. Cuantificación del número de copias de mtDNA .....	23
4. 2. 3. 3. PCR-RFLP .....	24
4. 2. 4. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares esqueléticas inervadas .....	27
4. 2. 4. 1. Diferenciación de células iFbCV .....	27
4. 2. 4. 2. Inmunocitoquímica.....	29
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
5. 1. Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs .....	30
5. 1. 1. Depleción mitocondrial de iPSCs para generar células $\rho^0$ .....	30
5. 1. 1. 1. Tratamiento con BrEt y ddC para la depleción de mtDNA.....	30
5. 1. 1. 2. Reducción en el número de copias de mtDNA.....	31
5. 1. 2. Eficacia de la enucleación de 2128 143B.....	32
5. 1. 3. Fusión celular en adherencia y suspensión .....	34
5. 1. 4. Identificación de los clones seleccionados por PCR-RFLP .....	41
5. 2. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares inervadas .....	44
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
6. 1. Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs .....	48
6. 1. 1. Depleción parcial del mtDNA en iPSCs.....	48
6. 1. 2. Eficacia de enucleación y selección con medio HAT .....	48
6. 1. 3. Fusión celular en adherencia y suspensión .....	48
6. 2. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares inervadas .....	50
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>51</b>
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>51</b>
<b>8. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>52</b>

## ABREVIATURAS

<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>BrEt</b>	Bromuro de Etidio
<b>CRISPR</b>	<i>Clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>ddC</b>	Dideoxicitidina
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DPBS</b>	Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco
<b>E8</b>	<i>Essential 8™ medium</i>
<b>ESCs</b>	Células madre embrionarias
<b>bFGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos básico ( <i>Basic fibroblast growth factor</i> )
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos ( <i>Hepatocyte growth factor</i> )
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento similar a la insulina ( <i>Insuline-like growth factor 1</i> )
<b>iPSCs</b>	Células madre pluripotentes inducidas
<b>LHON</b>	Neuropatía óptica hereditaria de Leber
<b>MELAS</b>	Síndrome de encefalomiopatía mitocondrial con acidosis láctica y episodios de accidentes cerebro-vasculares
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>nDNA</b>	DNA nuclear
<b>OXPPOS</b>	Sistema de fosforilación oxidativa
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PEO</b>	Oftalmoplejia progresiva externa
<b>RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
<b>rRNA</b>	Ácido ribonucleico ribosómico
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RT-q-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real
<b>SNP</b>	Polimorfismo de un solo nucleótido ( <i>Single nucleotide polymorphism</i> )

## RESUMEN

Las enfermedades mitocondriales son un grupo heterogéneo de patologías hereditarias caracterizadas por una disfunción en la respiración mitocondrial, pudiendo estar causadas tanto por mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA) como mutaciones en el DNA nuclear. Los modelos animales disponibles actualmente no son los más idóneos para el estudio de mutaciones concretas en el genoma mitocondrial humano, ya que los mtDNA de ambas especies no son idénticos. Por otra parte, como modelos celulares destacan las células primarias derivadas de paciente, los cíbridos transmitocondriales y las iPSCs derivadas de pacientes; que presentan ciertas limitaciones. Entre ellas, la capacidad de replicación limitada en el caso de células primarias, el fondo nuclear de origen tumoral que presentan los cíbridos transmitocondriales o el coste económico y temporal que supone la reprogramación de células de cada paciente para generar iPSCs con mutaciones concretas.

Este trabajo se ha enfocado en desarrollar un híbrido citoplasmático o “cíbrido” transmitocondrial a partir de células iPSC deplecionadas de mtDNA y citoplastos derivados de individuos portadores de mtDNA de interés. Se han ensayado diversas metodologías de fusión celular, empleando polietilenglicol como agente fusógeno, pero no se ha logrado obtener un cíbrido a partir de células iPSCs parentales.

El segundo objetivo propuesto en este trabajo ha sido la diferenciación de iPSCs humanas a fibras musculares inervadas, para obtener un modelo celular de tejido esquelético, el cual se suele ver gravemente afectado en pacientes con patologías mitocondriales. Tras analizar los resultados de la co-diferenciación mediante inmunofluorescencia, se pueden distinguir tanto células musculares como neuronas en las condiciones de cultivo. Sin embargo, no se logra observar una organización adecuada de las células musculares para formar fibras contráctiles.

## ABSTRACT

Mitochondrial diseases are a heterogeneous group of hereditary pathologies characterized by impairments in mitochondrial respiration, caused by mutations in the mitochondrial DNA (mtDNA) or in the nuclear DNA. Currently available animal models are not the most optimal for the study of particular mutations seen in the human mitochondrial genome, as the mtDNA of both species are not identical. On the other hand, some highlighted cellular models are patient-derived primary cells, transmitochondrial cybrids and patient-derived iPSCs, which also carry certain limitations. Among them: the limited replication rate of primary cells, the tumor-cell-like nuclear background of transmitochondrial cybrids, the economic and temporal cost of the reprogramming of cells extracted from each patient to generate iPSCs with particular mutations.

This work has focused on developing a transmitochondrial cytoplasmic hybrid or “cybrid” from iPSCs depleted of mtDNA and cytoplasts derived from interest mtDNA carriers. Several fusion methodologies have been assessed, using polyethylene glycol (PEG) as the fusogen agent. However, we have not managed to generate a cybrid from iPSCs parental cells.

The second aim of this work has been the differentiation of human iPSCs into innervated muscle fibers in order to obtain a skeletal muscle cell model, given that it is a tissue severely affected in patients with mitochondrial disorders. After analyzing the results of the co-differentiation process through immunofluorescence, muscle cells and neurons can be found in the culture conditions. However, no muscle cell organization is detected in order to form contractile fibers.

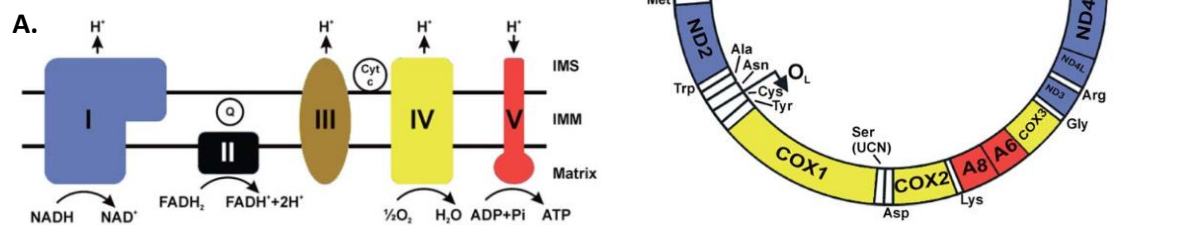
# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. 1. Sistema genético mitocondrial

La mitocondria es un orgánulo de doble membrana presente en células eucariotas y de origen endosimbiótico, cuya principal función es la producción de energía gracias a su metabolismo aeróbico. Además, está implicada en otros procesos celulares como la biosíntesis de intermediarios (grupo hemo, hormonas esteroideas), producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), homeostasis del calcio y la apoptosis<sup>1</sup>. Es un orgánulo capaz de dividirse, fusionarse con otras mitocondrias y moverse en el citoplasma formando redes dinámicas de mitocondrial<sup>2</sup>.

La membrana mitocondrial externa (OMM) es altamente impermeable, permitiendo solo el paso de pequeñas moléculas hidrofílicas a través de canales de porinas. El espacio intermembrana separa la membrana externa y la membrana interna, y aquí se produce una acumulación de protones debido al metabolismo mitocondrial, que genera una diferencia de potencial entre ambas membranas. La membrana mitocondrial interna (IMM) forma crestas en las cuales se ensamblan los cinco complejos multiproteicos que conforman el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS), encargado de la síntesis de adenosín trifosfato (ATP), el principal sustrato energético de la célula. En este proceso conocido como respiración celular, una serie de moléculas se importan a la mitocondria y se oxidan en presencia de oxígeno, dando lugar a un transporte de electrones a través de los componentes de la cadena respiratoria y a un gradiente electroquímico de protones a través de la IMM necesario para finalmente producir ATP a través de la ATP sintasa<sup>1</sup> (Figura 1A).

El genoma mitocondrial es una molécula de DNA de doble hebra circular, que en mamíferos tiene un tamaño aproximado de 16,5 kilobases. Codifica para 13 proteínas, todas subunidades de los complejos OXPHOS: 7 subunidades del complejo I, una subunidad del complejo III, 3 subunidades del complejo IV y 2 subunidades del complejo V (Figura 1B)<sup>0</sup>. Las proteínas codificadas por el DNA mitocondrial (mtDNA) solo constituyen el 1% del proteoma de la mitocondria, el resto de productos son codificados por genes nucleares e importados, como es el caso del complejo II del sistema OXPHOS.



**Figura 1. A)** Representación de los componentes del sistema OXPHOS ensamblados en la membrana mitocondrial interna (IMM). Cada complejo de un color, de izquierda a derecha: complejo I - NADH:ubiquinona oxidoreductasa, complejo II - succinato:Q oxidoreductasa, complejo III - ubiquinol: citocromo c oxidoreductasa, complejo IV - citocromo c oxidasa, complejo V - ATP sintasa. **B)** Representación esquemática del genoma mitocondrial humano. Los genes codificantes de las subunidades del sistema OXPHOS aparecen coloreadas del mismo color que el complejo proteico (A) al que pertenecen sus productos.

Además, el genoma mitocondrial codifica para 22 tRNAs y 2 rRNA (16S y 12S) que forman parte de la maquinaria de traducción mitocondrial (Figura 1B)<sup>0</sup>.

Cada célula somática puede contener hasta 1.000 mitocondrias, y cada orgánulo puede portar entre 2 y 10 copias de mtDNA<sup>3</sup>. Por tanto, se pueden encontrar entre 1.000 y 10.000 copias de mtDNA por célula.

La naturaleza multicopia del mtDNA permite la co-existencia de dos o más variantes de DNA mitocondrial en el citoplasma de una misma célula, un fenómeno denominado heteroplasmia. Sin embargo, existe una tendencia natural a la homoplasmia, es decir, a la presencia de una única variante de DNA mitocondrial en las células del organismo<sup>4</sup>. Esto se debe a la transmisión exclusivamente uniparental de las mitocondrias, concretamente a la herencia materna del DNA mitocondrial<sup>5</sup>. Tras la fecundación del ovocito por el espermatozoide, las mitocondrias paternas y su mtDNA son eliminados en el cigoto de forma que el contenido genético mitocondrial de la descendencia procederá de unas pocas moléculas de mtDNA de origen materno, que son seleccionadas y sufren expansión clonal para dar lugar a células homoplásmicas<sup>6</sup>. Por tanto, la presencia de mutaciones heteroplásmicas se deberá a una mutación *de novo* en una molécula de mtDNA que se ha dado en un momento determinado, se ha expandido y se ha distribuido entre las células hijas. Recordemos que esta distribución de las copias de mtDNA mutadas entre las células hijas será al azar y que, como consecuencia, estas podrán tener diferentes porcentajes de heteroplasmia.

El nivel de heteroplasmia, esto es el porcentaje de mtDNA mutado, y el número de copias de mtDNA son factores que correlacionan con la penetrancia de ciertas enfermedades mitocondriales y que podrían jugar un papel en la fisiopatología de enfermedades neurodegenerativas o procesos de envejecimiento<sup>7</sup>.

La acumulación de mutaciones en la secuencia del mtDNA a través de sucesivas generaciones acaba generando secuencias muy similares procedentes de un linaje materno que comparten una serie de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), unas colecciones de genomas denominadas haplogrupos<sup>8</sup>. Hay estudios que han asociado haplogrupos mitocondriales específicos con enfermedades complejas como es el caso del haplogrupo U con la enfermedad de Alzheimer<sup>9</sup> o el cluster de haplogrupos JTU con la degeneración macular relacionada con la edad<sup>10</sup>.

## 1. 2. Enfermedades mitocondriales

Las enfermedades mitocondriales son un conjunto heterogéneo de enfermedades hereditarias caracterizadas por defectos en el sistema OXPHOS que perjudican la función de respiración mitocondrial y provocan una reducción en la síntesis de ATP<sup>11</sup>. Son enfermedades que pueden estar causadas por mutaciones primarias en genes del mtDNA que afectan a la función o ensamblaje de los productos implicados en el sistema OXPHOS; o por mutaciones en genes nucleares, que como consecuencia afectan al mantenimiento o expresión del mtDNA. Las enfermedades mitocondriales pueden aparecer en la infancia o la edad adulta y afectar a cualquier órgano, siendo más sensibles aquellos tejidos con una alta demanda energética y un pronunciado metabolismo aerobio como el músculo, corazón, hígado, riñones, retina, médula ósea, nervios periféricos y páncreas<sup>12</sup>.

La mayoría de mutaciones patogénicas del mtDNA se dan en una situación de heteroplasmia. Por tanto, si el porcentaje de copias de mtDNA mutado es bajo, las copias de mtDNA *wild type*

pueden ejercer un efecto compensatorio y recuperar la actividad de la cadena respiratoria. Sin embargo, si el porcentaje de mtDNA mutado supera un valor umbral, dicha célula mostrará un fenotipo patológico debido a una disfunción OXPHOS. El umbral varía según el tipo celular y la mutación aunque normalmente se requiere más del 50% de mtDNA mutado para que el defecto genético se haga aparente<sup>13</sup>.

El síndrome de Leigh engloba más de 75 defectos monogénicos, tanto en genes mitocondriales como nucleares, y es el síndrome mitocondrial de inicio infantil más común con una prevalencia de 1 por cada 40.000 nacimientos<sup>14</sup>. Suele iniciarse a los dos años de edad y cursa con síntomas como retraso en el desarrollo, hipotonía, ataxia, distonía, y defectos oftalmológicos<sup>15</sup>. Por otra parte, en adultos la patología mitocondrial primaria de mayor prevalencia es la neuropatía óptica hereditaria de Leber (LHON), afectando a 1 de cada 30.000-40.000 adultos en Europa<sup>16</sup>. Esta provoca ceguera bilateral en adultos jóvenes por degeneración del nervio óptico y de las células ganglionares de la retina. El 90% de los casos de LHON se deben a tres mutaciones puntuales en el mtDNA, siendo la mutación m.11778G>A responsable del 70% de los casos<sup>17</sup>. El gen afectado en este caso es *ND1*, que codifica una subunidad de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa, el complejo I del sistema OXPHOS<sup>18</sup>.

Más allá de mutaciones en el DNA mitocondrial, la causa monogénica más común de enfermedades mitocondriales hereditarias son las mutaciones en el gen nuclear *POLG*, presentes en casi el 2% de la población. El gen *POLG* codifica una subunidad catalítica de la DNA polimerasa y mitocondrial, encargada de la replicación del mtDNA<sup>19</sup>. Se han descrito más de 300 mutaciones en este gen que impactan o bien en la capacidad de síntesis de mtDNA de la polimerasa o en su capacidad de corrección de errores<sup>20</sup>. Como resultado, en los pacientes se puede observar un número muy reducido de copias de mtDNA (depleción), o por otra parte, un número elevado de mutaciones o deleciones en el mtDNA sin un aparente efecto en los niveles de mtDNA. Ambas manifestaciones pueden coexistir en un mismo paciente y la correlación genotipo-fenotipo no está clara<sup>19</sup>. Las mutaciones en el gen *POLG* se traducen en un amplio espectro fenotípico con gran afectación neurológica y pueden estar detrás de enfermedades como el síndrome de Alpers-Hutternlocher<sup>21</sup>, de inicio infantil con encefalopatía severa y fallo hepático progresivo; la oftalmoplejía externa progresiva (PEO)<sup>22</sup>, el síndrome de ataxia mitocondrial<sup>23</sup>, etc.

Las enfermedades mitocondriales son enfermedades complejas, multisistémicas por lo general, con fenotipos solapantes y gran variabilidad en las correlaciones genotipo-fenotipo<sup>13</sup>. Un mismo síndrome puede estar causado por mutaciones en diferentes genes nucleares o mitocondriales, como es el caso del síndrome de Leigh. También, una misma mutación puede ser causante de diferentes síndromes, como es el caso de la mutación m.3243A>G en *MT-TL1* asociada a PEO, el síndrome de MELAS (encefalomiopatía mitocondrial, acidosis láctica y episodios tipo accidente cerebrovascular) o MIDD (diabetes y sordera de transmisión materna)<sup>24</sup>.

Los niveles de heteroplasmia de mtDNA mutado, así como el número total de copias de mtDNA también afectan a la severidad del fenotipo. Por ejemplo, se ha demostrado que un alto número de copias de mtDNA y bajos niveles de heteroplasmia para dos mutaciones concretas en pacientes de MELAS correlacionan con una enfermedad menos severa<sup>25, 26</sup>. Otro estudio con pacientes LHON, la mayoría portadores de mutaciones homoplásmicas, apunta a que el número de copias de mtDNA afecta a la penetrancia de la enfermedad, ya que portadores asintomáticos

de las mutaciones m.11778G>A o m.3460G>A presentaban un mayor número de copias de mtDNA que los pacientes con problemas de visión<sup>27, 28, 29</sup>. De estos estudios se puede inferir que un incremento en el número de copias de DNA mitocondrial podría actuar como un mecanismo compensatorio para sustentar la actividad OXPHOS y compensar los defectos bioenergéticos que provocan algunas mutaciones en el mtDNA.

### 1. 3. Modelos de estudio de enfermedades mitocondriales

Las complejidades clínicas mencionadas anteriormente dificultan el estudio de las enfermedades mitocondriales. A esto hay que sumarle una serie de limitaciones a la hora de aplicar herramientas de edición génica al mtDNA. En primer lugar, se desconocen mecanismos endógenos por los cuales se pueda importar DNA exógeno a las mitocondrias de células de mamíferos de forma eficaz<sup>30</sup>. Por tanto, no se podría introducir el RNA guía del sistema CRISPR-Cas9 necesario para llevar a cabo la edición génica, por ejemplo. Además, no se ha descrito una maquinaria de reparación de mtDNA tras las rotura de la doble hebra en la matriz mitocondrial<sup>31, 32</sup>, por lo que no se podrían aplicar herramientas basadas en recombinación homóloga del DNA. También, el número relativamente alto de copias de mtDNA en comparación con el DNA nuclear (nDNA) supone un problema a la hora de mantener las copias de mtDNA mutado en las sucesivas generaciones de células hijas, ya que el mtDNA *wild type* se puede acabar imponiendo si el número de copias mutadas no es demasiado elevado. Los métodos de transfección de electroporación y biobalística han resultado eficaces en levaduras<sup>33</sup> y *Chlamydomonas*<sup>34</sup>, pero no se podrían aplicar a células animales, ya que dichos procedimientos provocarían el escape del citocromo c fuera de la mitocondria hacia el citosol, donde induciría la muerte por apoptosis mitocondrial<sup>35</sup>.

A pesar de estas limitaciones se ha logrado disponer de modelos animales y celulares de algunas enfermedades mitocondriales. Se han generado ratones y cerdos *knock-out* para genes nucleares asociados a enfermedades mitocondriales. Respecto al mtDNA, se han empleado endonucleasas de restricción para modificar el mtDNA y generar modelos en *Drosophila melanogaster*. También se han empleado técnicas transmitocondriales para generar modelos celulares y animales, las cuales consisten en fusionar células donadoras de núcleo con células donadoras de mitocondrias para obtener así células con mitocondrias exógenas.

#### 1. 3. 1. Modelos animales

La estructura y contenido genético del mtDNA de *Drosophila melanogaster* y de humano está bastante conservado, por lo que los modelos animales basados en *Drosophila* pueden ayudar a comprender mecanismos patofisiológicos de determinadas mutaciones en el mtDNA<sup>36</sup>. Por ejemplo, utilizando endonucleasas de restricción dirigidas a la mitocondria (MitoREs) se ha logrado generar modelos en *Drosophila* que presentan mtDNA mutado en el gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa y en la subunidad II de la NADH deshidrogenasa<sup>37</sup>.

Para conseguirlos, han dirigido las endonucleasas de restricción *XhoI* y *BglII* a la mitocondria a través de secuencias señales, y una vez allí, dichas enzimas han cortado las moléculas de mtDNA *wild type* que contenían sus correspondientes sitios de restricción. Al realizar esta intervención en células germinales de moscas hembra, estas se volvían infértiles. Sin embargo, al aplicar esta fuerte presión selectiva, el 1% de las moscas hembras dieron lugar a descendencia con mtDNA resistente a la degradación por *XhoI*. La mutación eliminaba el sitio de restricción, permitiendo así la expansión de copias del mtDNA mutante hasta obtener organismos homoplásmicos. La

descendencia presentaba defectos como retraso en el crecimiento, neurodegeneración y miopatías asociadas a la edad y menor longevidad<sup>37</sup>. Dichos modelos, se podrían emplear para estudiar algunos mecanismos de enfermedades asociadas a defectos en la citocromo c oxidasa o en el complejo I de la cadena respiratoria, como ocurre en el síndrome de Leigh y MELAS<sup>38</sup>. Aun así, esta técnica de edición de mtDNA tiene varias limitaciones: una baja eficiencia para generar modelos transgénicos que además requiere una fuerte presión selectiva, y solo serían eficaces para genomas con abundantes sitios de restricción específicos de endonucleasas de restricción bacterianas. Pero sobre todo, el mtDNA de estos organismos no es igual al mtDNA humano y, por tanto, no se podrían emplear para estudiar mutaciones concretas aisladas en pacientes con enfermedades mitocondriales.

Aun con sus limitaciones, el modelo de ratón sigue siendo el modelo animal de preferencia para estudiar enfermedades mitocondriales y potenciales terapias, ya que presentan más similitudes genéticas y fisiológicas con el humano<sup>39</sup>. Se han generado numerosos modelos transgénicos de ratón en los que se han modificado genes nucleares codificantes de proteínas mitocondriales, además de modelos de ratón que portan mutaciones en el mtDNA<sup>40, 41, 42</sup>.

En el caso de alteraciones en genes nucleares, se han generado modelos de ratón y de cerdo mediante técnicas *knock-out* de genes codificantes de subunidades de complejos OXPHOS. Mediante recombinación homóloga de sitios *loxP* mediada por *Cre* se han obtenido ratones deficientes en la proteína *Ndufs4*, una de las subunidades de la NADH:ubiquinona oxidorreductasa, el complejo I de la cadena respiratoria<sup>43</sup>. También se ha creado un modelo de cerdo con *knock-out* del gen *SURF1* mediante tecnología CRISPR-Cas9 y TALENs, que como consecuencia provocaba una deficiencia parcial de citocromo c oxidasa<sup>44</sup>. Estos modelos manifestaban fenotipos similares al síndrome de Leigh como una encefalopatía neurodegenerativa temprana en el modelo de ratón<sup>43</sup>, y retraso en el crecimiento con muerte prematura en ambos modelos<sup>43, 44</sup>.

También se han obtenido modelos de ratón conocidos como “mito-mice”, que presentan mutaciones en el mtDNA y fenotipos similares a ciertas enfermedades mitocondriales<sup>45</sup>. Actualmente se tiende a emplear técnicas trans-mitocondriales para generar estos modelos<sup>46, 47, 48</sup>. En rasgos generales, consiste en fusionar células enucleadas portadoras de mtDNA mutado con células madre embrionarias (ESCs) de ratón de cariotipo femenino, en las cuales se ha deplecionado previamente el mtDNA mediante intervenciones farmacológicas. Después, se inyectan las ESCs quiméricas en un ovocito fertilizado de ratón que posteriormente se implanta en una hembra pseudo-gestante. Así se ha generado, por ejemplo, un modelo “mito-mice” que presenta una mutación puntual en *COI* (gen mitocondrial codificante de la subunidad I de la citocromo c oxidasa), y que muestra un fenotipo de acidosis láctica característico del síndrome de MELAS<sup>46</sup>.

Aun así, los modelos animales cuentan con una serie de limitaciones. A parte de la dificultad técnica que supone la generación de los animales transgénicos, también suelen recapitular fenotipos incompletos de la enfermedad en humanos. Por ejemplo, el modelo de cerdo con mutación en *SURF1* no presentaba una neurodegeneración significativa como aquella vista en el síndrome de Leigh asociada a dicho gen<sup>44</sup>. Como ya se ha comentado, los modelos animales no son un modelo adecuado para estudiar mutaciones concretas que se dan en pacientes humanos, ya que sus mtDNAs no son idénticos.

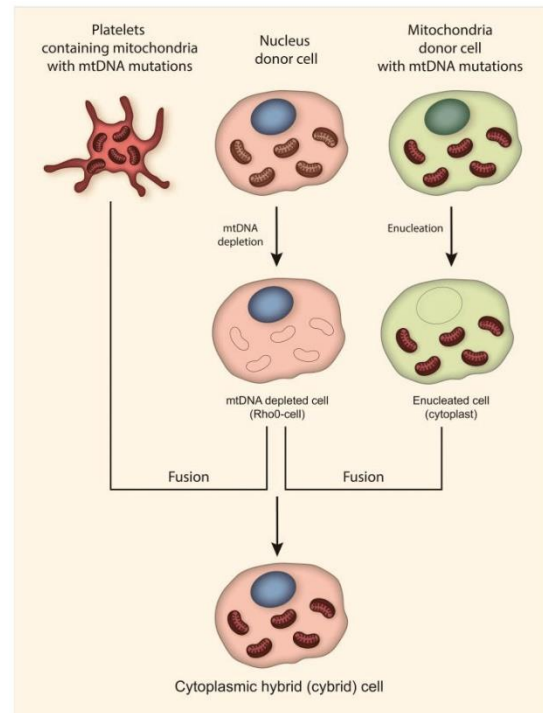
### 1. 3. 2. Modelos celulares

Los modelos celulares de enfermedades mitocondriales permiten analizar parámetros bioquímicos de una población celular que presentan mutaciones particulares. Son modelos mucho más fáciles de obtener que los modelos animales, e incluso más personalizados a nivel de paciente. Por otra parte, cuentan con la limitación de que se pierde la información aportada por la interacción entre varios tipos celulares que se da en un organismo completo. Además, los mecanismos patológicos de las enfermedades mitocondriales pueden ocurrir en varios órganos simultáneamente, hecho que no se puede representar con los modelos celulares.

#### 1. 3. 2. 1. Híbridos citoplásmicos o “cíbridos”

La eficacia de la respiración mitocondrial es el resultado de la interacción entre los genomas mitocondriales y el genoma nuclear, de forma que una misma variante patogénica de mtDNA puede manifestar distintos fenotipos según el contexto nuclear de la célula<sup>49</sup>. Los híbridos citoplasmáticos o “cíbridos” es un modelo celular que permite mantener el fondo genético nuclear de la célula relativamente constante a la vez que variar el contenido mitocondrial. Por ello, es un modelo que permite eliminar la contribución de la variación genética entre pacientes y aislar el efecto particular que tienen las mutaciones patogénicas en el mtDNA sobre el fenotipo celular<sup>50</sup>.

La construcción de un cíbrido se basa en la utilización de una línea celular tumoral, a la que se le denomina células  $\rho^0$ , que es sometida a una depleción de mtDNA y actúa como donante de núcleo. Sobre las células  $\rho^0$  se pueden microinyectar mitocondrias<sup>49</sup> o se pueden fusionar con otras líneas celulares que actúen como donantes de mitocondrias. Estas donantes de mitocondrias pueden ser células carentes de núcleo como las plaquetas<sup>51</sup> o células enucleadas denominadas citoplastos (Figura 2)<sup>52</sup>.



**Figura 2.** Esquema de la generación de cíbridos mediante fusión de plaquetas, o células enucleadas, con células deplecionadas de mtDNA.

Extraído de: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11020532>

A pesar de las ventajas que ofrecen los cíbridos, como la facilidad para expandir la línea celular y la capacidad de aislar el efecto patogénico que tiene una determinada variante de DNA, también presentan limitaciones. Por ejemplo, al carecer del DNA nuclear del paciente, los cíbridos resultan un modelo incompleto a la hora de entender el efecto que tiene la interacción núcleo-mitocondria sobre la patología específica. Por tanto, el modelo podría no mostrar los rasgos fenotípicos observados en los pacientes. Además, hasta el momento, las células  $\rho^0$  tienen fondo nuclear de célula tumoral, por lo que el cíbrido resultante puede presentar anomalías a nivel de estructura y número de cromosomas, por el origen tumoral del núcleo de la célula.

### *1. 3. 2. 2. Células primarias derivadas de pacientes*

Las células primarias derivadas de pacientes con enfermedades mitocondriales se han empleado para desentrañar mecanismos patológicos a nivel celular de determinados defectos en OXPHOS y para el descubrimiento de intervenciones metabólicas o tratamientos para restaurar la correcta función mitocondrial<sup>53</sup>. Algunas de las células más empleadas son plaquetas, linfocitos, fibroblastos o mioblastos<sup>54</sup>.

Entre las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC) se pueden obtener linfocitos y plaquetas. Los linfocitos se inmortalizan en células linfoblastoides transformándolas con el virus de Epstein-Barr; sin embargo, debido a su bajo contenido en mitocondrias, no son los mejores candidatos para el estudio bioquímico de la función OXPHOS. Las plaquetas, por otra parte, no se pueden expandir en cultivo, por tanto, los ensayos se deben realizar poco tiempo después de su extracción.

Los fibroblastos se pueden extraer con una biopsia de piel del paciente, y tienen cierta capacidad de propagación, al ser altamente replicativos. Además, poseen abundantes mitocondrias con morfología tubular, por lo que pueden ser de interés en el estudio de la dinámica de las redes mitocondriales<sup>55</sup>, además de estudios bioquímicos sobre la función OXPHOS.

Los mioblastos son células precursoras de fibras musculares y teóricamente, son un buen modelo porque dependen fuertemente a nivel energético del metabolismo mitocondrial. Sin embargo, se deben obtener a través de biopsias de músculo, que son bastante invasivas y dificultan la obtención de cultivos puros. Como alternativa, se pueden obtener mioblastos y miocitos mediante la transformación de fibroblastos primarios de la piel<sup>56</sup>.

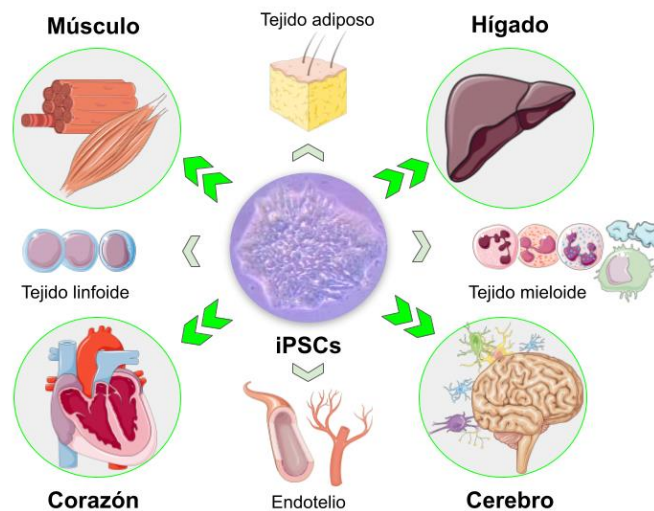
A pesar, de que dichas líneas celulares presentarían tanto el DNA nuclear como mitocondrial del paciente que sufre la patología, estos modelos también presentan una serie de limitaciones. Además de su forma de obtención invasiva mediante biopsias, se necesita disponer de un número significativo de muestras de pacientes con mutaciones similares para llevar a cabo estudios mecanísticos de la patofisiología de la enfermedad. Además, las células primarias derivadas de pacientes tienen una capacidad de replicación limitada, por lo que el modelo celular no se podría expandir y mantener. Finalmente, las mitocondrias desempeñan funciones específicas dentro de cada tipo celular, por lo que los resultados obtenidos con un tipo celular no se pueden extrapolar ni son universales para el resto de tejidos afectados. Por ejemplo, la demanda metabólica sobre la función OXPHOS en una célula muscular o una neurona es mucho mayor que en un fibroblasto o una célula linfoblastoide, por lo que los resultados obtenidos en estos últimos se deben interpretar como una mera aproximación al problema real.

### *1. 3. 2. 3. Células madre pluripotentes inducidas derivadas de paciente*

Las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son células que poseen la capacidad de autorrenovación y de pluripotencia, es decir, que son capaces de replicarse ilimitadamente y de diferenciarse en cualquier célula procedente de las tres capas germinales (endodermo, mesodermo y ectodermo). Se pueden obtener a partir de células somáticas mediante un proceso denominado reprogramación, que se basa en la transducción mediada por retrovirus de dichas células con cuatro factores de transcripción: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4e<sup>57, 58</sup>. Actualmente, existen métodos y protocolos para diferenciar iPSCs humanas a neuronas, cardiomiocitos, adipocitos, células endoteliales, y células hematopoyéticas<sup>59</sup> (Figura 3).

Las iPSCs se pueden obtener a partir de fibroblastos de la piel o de PBMC extraídas de pacientes con patologías mitocondriales<sup>60</sup>. Estas iPSCs derivadas de paciente se podrían expandir y diferenciar a cardiomiocitos o neuronas, por ejemplo, modelos celulares relevantes e inaccesibles mediante biopsias. Los tejidos altamente dependientes del metabolismo OXPHOS, como el corazón o el cerebro, suelen verse gravemente afectados cuando se producen defectos en el metabolismo mitocondrial (Figura 3) y no se pueden estudiar tomando células primarias del paciente. Por tanto, esta estrategia permitiría disponer de líneas celulares de cardiomiocitos o neuronas portadoras del mtDNA del paciente, permitiendo incluso generar organoides (tejidos ordenados en tres dimensiones) con varios tipos celulares que simulen el tejido afectado en su patología<sup>61</sup>.

Aun así, el modelo de iPSCs derivadas de pacientes sigue teniendo la limitación de no poder distinguir el efecto que tiene el genoma mitocondrial y el genoma nuclear independientemente sobre la patología observada en el paciente a nivel celular. Además, el proceso de diferenciación a otros tejidos conlleva un tiempo prolongado y es costoso económicamente, más aún si la mutación que se desea estudiar es única en esos pacientes. En ese caso habría que generar una línea de iPSCs propia para cada paciente que se estudiase. También, se ha visto que durante la reprogramación celular se producen cambios en el perfil del mtDNA, que afectan a la expresión de genes implicados en el metabolismo mitocondrial<sup>62, 63</sup>. Por tanto, habría que realizar controles rutinarios a la hora de caracterizar una línea de iPSCs para verificar que no se dan mutaciones patológicas adicionales en el mtDNA.



**Figura 3.** Esquema de algunas líneas de diferenciación de iPSCs. Los tejidos rodeados en verde son aquellos más dependientes del metabolismo aeróbico mitocondrial para la síntesis de ATP y, por tanto, los más afectados en patologías mitocondriales: corazón, músculo, hígado, cerebro, hígado.

#### 1. 4. Células madre pluripotentes inducidas humanas (iPSCs)

Las células madre pluripotentes inducidas comparten con las células madre embrionarias (ESCs) los rasgos de autorrenovación y pluripotencia, como ya se ha mencionado. Por tanto, se les suele englobar con el término células pluripotentes humanas (hPCs). La diferencia entre ambas radica en que las ESCs proceden de la masa celular interna de un blastocisto<sup>64</sup>, con sus consecuentes connotaciones éticas; mientras que las iPSCs se obtienen a partir de la reprogramación de células somáticas diferenciadas<sup>57, 58</sup>. Las iPSCs cumplen los criterios de pluripotencia que presentan las ESCs<sup>65</sup>: son capaces de formar teratomas, esto es tumores que contienen células

diferenciadas de las tres capas germinales embrionarias; y contribuyen a la formación de todos los tejidos cuando son inyectadas en blastocistos de ratón, incluida la línea germinal<sup>66</sup>.

En 1962, el biólogo John Gurdon realizó experimentos de transferencia nuclear de células somáticas (SCNT) en células de la rana *Xenopus laevis*. Estos consistían en transferir el núcleo de una célula somática diferenciada a un ovocito previamente enucleado. Dicha célula resultante era capaz de progresar en la embriogénesis y generar un renacuajo con capacidad reproductiva. Estos experimentos demostraron que el núcleo de la célula somática diferenciada contiene la información genética necesaria para generar un organismo competente<sup>67, 68</sup> y más tarde, se planteó que las diferencias fenotípicas de las células somáticas podrían deberse a mecanismos epigenéticos reversibles.

En 2006, los investigadores Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka generaron las primeras iPSCs a partir de fibroblastos de ratón<sup>57</sup>. Utilizaron un cóctel de cuatro factores de transcripción, acuñados como OSMK o factores Yamanaka: Oct3/4, Sox2, c-Myc y Klf4e. Inicialmente, los investigadores seleccionaron 24 factores candidatos e hicieron varios ensayos introduciendo distintas combinaciones en fibroblastos de ratón mediante transducción mediada por retrovirus. Los cuatro factores Yamanaka fueron suficientes para reprogramar los fibroblastos de ratón a un tipo celular con propiedades similares a las células madre embrionarias: capacidad de autorrenovación y expansión casi ilimitada; y pluripotencia o capacidad de diferenciación a casi cualquier tipo celular. De ahí que recibiesen el nombre de células madre pluripotentes inducidas.

El mecanismo por el cual tiene lugar la reprogramación celular, esto es la regresión de una célula diferenciada a un estado de célula pluripotente, está relacionado con una serie de cambios del perfil epigenético de la célula, que implica la eliminación de marcas de metilación propias de una célula somática y la inducción de la expresión de genes asociados a la pluripotencia<sup>69</sup>. La reprogramación ocurre en dos fases, temprana y tardía, con implicación de los factores OSKM en ambas. Durante este proceso, a parte de una remodelación de la cromatina y modificaciones del perfil de metilación del DNA, se producen cambios metabólicos a nivel celular importantes. Por ejemplo, la célula pasa a depender de un metabolismo glucolítico y a reducir el número de copias de mtDNA, en comparación con la célula somática diferenciada, que además depende del metabolismo OXPHOS<sup>61</sup>.

Aun así, se ha visto que, en algunos casos, tras el proceso de reprogramación hay iPSCs que retienen cierta “memoria epigenética” de su tejido de origen, es decir, que conservan ciertas marcas epigenéticas y transcripcionales propias de las células somáticas diferenciadas de las que proceden<sup>70</sup>. Estas marcas pueden limitar el potencial de diferenciación de las iPSCs<sup>71</sup>. Se ha visto además que la reprogramación a través de factores de transcripción hace que las células sean más propensas a retener esta memoria, a diferencia de las iPSCs obtenidas por SCNT, que presentan más similitudes en su perfil epigenético y a nivel celular con las ESCs<sup>72</sup>.

#### 1. 4. 1. Aplicaciones de iPSCs en modelos celulares

Su origen humano, su pluripotencia y alta capacidad de expansión, hacen de las iPSCs unas buenas candidatas para el desarrollo de modelos celulares de enfermedades humanas. Además, no presentan las implicaciones éticas de las células madre embrionarias humanas, que sólo se pueden obtener a partir de embriones humanos. Las iPSCs derivadas de pacientes con enfermedades mitocondriales se podrían diferenciar a casi cualquier tipo celular, incluso

pudiendo obtener plataformas de cultivo con múltiples tipos celulares organizados tridimensionalmente como organoides, una representación más próxima a la fisiológica<sup>73</sup>.

Actualmente hay numerosas investigaciones enfocadas en generar iPSCs humanas a partir de células de pacientes con enfermedades mitocondriales para posteriormente diferenciarlas a tejidos afectados por dichas patologías mitocondriales<sup>60</sup>. Algunas de estas líneas de iPSC humanas, reprogramadas a partir de fibroblastos o PBMCs de pacientes, presentan mutaciones en el mtDNA y otras en el nDNA. Por ejemplo, respecto a mutantes del mtDNA, se han establecido líneas de iPSC con mutaciones en el gen *MT-ATP6* asociadas al síndrome de Leigh<sup>74, 75</sup>; y otras líneas con mutaciones homoplásmicas en el gen *MT-ND1*<sup>76</sup> y en el gen *MT-ND4*<sup>77</sup>, ambas asociadas a la enfermedad de LHON. Respecto a líneas con mutaciones en el nDNA, encontramos modelos de iPSCs con diferentes mutaciones en el gen *POLG*, unas asociadas al síndrome de Alpers<sup>78</sup> y otras asociadas a PEO y a parkinsonismo<sup>79</sup>.

Aun así, por el momento solo dos publicaciones han conseguido elaborar modelos celulares de iPSC humanas, diferenciarlas a tipos celulares específicos y aplicarlos a cribados de fármacos a gran escala. Concretamente, se han diferenciado las líneas de iPSCs a células progenitoras neurales<sup>80</sup> y a hepatocitos<sup>81</sup>, modelos que se han empleado para encontrar compuestos capaces de rescatar la homeostasis del calcio alterada<sup>80</sup> y aumentar la producción de ATP mitocondrial<sup>81</sup>, respectivamente. También, actualmente se han generado organoides complejos a partir de iPSCs humanas, concretamente organoides de cerebro, intestino, hígado, vasos sanguíneos, riñón y retina<sup>61</sup>. El organoide de cerebro<sup>82</sup> es particularmente interesante en el caso de modelos de enfermedades mitocondriales, ya que en la mayoría de ellas hay afectación del sistema nervioso y neurodegeneración temprana.

#### *1. 4. 1. 1. Diferenciación a fibras musculares esqueléticas inervadas*

Otro tejido que se ve gravemente afectado en patologías mitocondriales, debido a su alta demanda de la función OXPHOS, es el músculo esquelético. A pesar de que existen protocolos para diferenciar iPSCs a diversos tejidos, no se han realizado tantos avances en la diferenciación de estas células a músculo esquelético inervado<sup>83</sup>.

En 2020, Mazaleyrat et al. desarrollaron un protocolo para co-diferenciar iPSCs humanas a neuronas motoras y a células musculares, demostrando la formación de fibras musculares multinucleadas con organización sarcomérica, inervadas y contráctiles<sup>84, 85</sup>. El protocolo se basa adicionar al medio de cultivo ciertos factores que dirigen las diferenciaciones simultáneas. En general, emplearon sustancias para recapitular el proceso de neurogénesis y miogénesis que ocurre *in vivo* durante el desarrollo embrionario. Para inducir el desarrollo paraxial utilizaron, tanto factores que activan la vía Wnt como factores que inhiben la vía BMP, ambos destinados a favorecer la especialización miogénica y hacia a neuronas motoras<sup>86, 87</sup>. También, añadieron un inhibidor de la vía Notch para acelerar la especialización miogénica<sup>88</sup> y promover la diferenciación de células progenitoras neurales a neuronas<sup>89</sup>. Los autores lograron observar contracciones de las fibras musculares, demostrando la organización de las células musculares en miotubos capaces de recibir señales de las neuronas adyacentes a través de la placa motora. Este modelo celular podría resultar de interés para el estudio de miopatías mitocondriales, como aquellas observadas en el síndrome de MELAS, en el síndrome de epilepsia mioclónica con fibras rojo-rasgadas (MERFF), en la oftalmoplejia progresiva externa crónica (CPEO), etc. Además, se podría aplicar a la búsqueda de fármacos o intervenciones terapéuticas en ensayos preclínicos.

## 2. HIPÓTESIS

Actualmente, se estima que una de cada 8.000 personas padece algún tipo de enfermedad mitocondrial. En concreto, una de cada 4.300 personas son portadoras de mutaciones patogénicas en el mtDNA o en el nDNA, y por tanto presentan, o están en riesgo de presentar, una enfermedad mitocondrial en el futuro<sup>90</sup>. Debido a las limitaciones que plantea la edición del mtDNA, por la propia naturaleza de la mitocondria, ha resultado difícil establecer buenos modelos de enfermedades mitocondriales. Actualmente, se dispone de algunos modelos animales en ratón, rata, cerdo, *Drosophila* y pez cebra; y modelos celulares basados en células primarias derivadas de paciente, cíbridos transmitocondriales e iPSCs derivadas de pacientes.

Una posible mejora de los modelos celulares existentes sería emplear la tecnología de los cíbridos transmitocondriales en células madre pluripotentes inducidas. Este nuevo modelo consistiría en fusionar iPSCs deplecionadas de mtDNA con citoplastos derivados de pacientes con enfermedades mitocondriales primarias. Así, se podría generar una línea celular que contenga mtDNA idéntico al de las células del paciente con capacidad de diferenciación a múltiples tipos celulares. Esto permitiría estudiar células control y mutantes bajo fondos genéticos nucleares idénticos, en los tipos celulares afectados en cada patología mitocondrial.

Dicha línea celular presentaría las características de autorrenovación y pluripotencia, debidas al núcleo de las iPSCs, que permitirían una propagación ilimitada del cultivo y reproducir el defecto del mtDNA del paciente en tipos celulares específicos. Con este hipotético modelo se podría personalizar el estudio de enfermedades mitocondriales aproximando el fenotipo celular al del tejido afectado en cada paciente. También, se podría emplear como modelo para testar posibles tratamientos que logren revertir el mecanismo patofisiológico observado en dichas células.

Otro modelo celular que resulta de interés para el estudio de enfermedades mitocondriales son las líneas celulares de músculo esquelético, un tejido altamente demandante de la función OXPHOS, que además se ve gravemente afectado en las patologías mitocondriales. Gracias a su pluripotencia, la diferenciación de iPSCs a células musculares y a neuronas motoras abre la posibilidad de generar modelos celulares representativos de este tejido.

## 3. OBJETIVOS

Con el fin de aproximarnos a ese modelo hipotético de iPSCs portadoras de mtDNA de pacientes, uno de los objetivos de este trabajo es la generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs. Para lograrlo, en primer lugar, se va a deplecionar las iPSCs de mtDNA utilizando bromuro de etidio (BrEt) y dideoxicitidina (ddC) y se van a enuclear células de osteosarcoma con Actinomicina D para generar los citoplastos donadores de mitocondrias. Se va a emplear el fusógeno polietilenglicol para fusionar las iPSCs deplecionadas de mtDNA con los citoplastos portadores del mtDNA de interés. Finalmente, se va a evaluar el contenido de mtDNA de los clones obtenidos para determinar el éxito de la fusión celular.

Por otra parte, los defectos OXPHOS propios de las enfermedades mitocondriales tienen un gran impacto en el tejido muscular. Por ello, este trabajo se ha enfocado en la generación de un modelo celular de fibras musculares esqueléticas inervadas con capacidad contráctil a partir de iPSCs humanas, basado otros protocolos de diferenciación previamente descritos<sup>84, 85</sup>. Finalmente, se va a analizar una serie de marcadores característicos de células musculares y neuronas mediante inmunocitoquímica para evaluar la eficacia de la co-diferenciación.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4. 1. Materiales y reactivos

#### 4. 1. 1. Líneas celulares

Las líneas celulares empleadas en este Trabajo de Fin de Master han sido desarrolladas previamente por el grupo de Biogénesis y Patología Mitocondrial de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza<sup>91</sup>. En concreto se han empleado dos líneas celulares, acuñadas:

- **iFbCV** - una línea celular de iPSCs obtenidas a partir de la reprogramación de fibroblastos de un individuo sin patología mitocondrial.
- **2128 143B** - una línea de híbridos transmitocondriales con fondo nuclear de célula de osteosarcoma humano (143B) y con mitocondrias procedentes de un individuo sin patología mitocondrial.

Para realizar el protocolo de fusión, las células de la línea iFbCV se han empleado como iPSCs donantes de núcleo y las células 2128 143B como donantes de mitocondrias.

#### 4. 1. 2. Reactivos

##### 4. 1. 2. 1. Reactivos generales

Los reactivos químicos utilizados son de grado analítico o aptos para biología molecular y cultivo celular. La mayoría de ellos proceden de las casas comerciales Sigma-Aldrich, Bio-Rad, ThermoFisher Scientific, Merck, Roche, Biological Industries, StemCell™ Technologies y Panreac®.

##### 4. 1. 2. 2. Medios de cultivo y material estéril

Los medios de cultivo celular empleados, así como sus suplementos, proceden de la casa comercial Gibco™, Invitrogen. Como medios de cultivo se han empleado: *Dulbecco's modified eagle medium* (DMEM) con 4,5 g/L de glucosa (25 mM), medio *Essential 8™* (E8), *NutriStem® hPSC XF* y medio Neurobasal®. Los suplementos utilizados son: suero fetal bovino (FBS), penicilina/estreptomicina (100x), inhibidor de ROCK Y27632 (5 mM), uridina (10 mg/mL), piruvato (50 mg/mL), suplemento E8, piruvato de insulina-transferrina-selenio-sodio (ITS-A), aminonúcleos no esenciales (NEAA), GlutaMAX, β-mercaptoetanol (55 mM), suplementos B-27 y N2, bFGF, HGF, IGF-1, LDN193189, CHIR99021 y DAPT.

El material estéril de plástico empleado procede de la casa TPP, Suiza. Aquí se incluyen placas de 6 y 12 pocillos, placas de 100 mm y 150 mm, filtros para jeringuilla de 0,22 μm de tamaño de poro, tubos de centrifuga (falcon), criotubos, pipetas serológicas, etc.

##### 4. 1. 2. 2. Reactivos para PCR

La polimerasa termoestable empleada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) está contenida en el tampón de reacción EmeraldAmp MAX PCR Master Mix de la casa Takara, que además presenta MgCl<sub>2</sub> y dinucleótidos trifosfato. Los oligonucleótidos empleados (Tabla 4) proceden de las casas IDT™ y Sigma-Aldrich.

Por otra parte, la polimerasa y demás reactivos empleados en la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR) proceden de TaqMan™ Gene Expression

Master Mix de casa Applied Biosystems™ (ThermoFisher Scientific). Los oligonucleótidos y sondas empleados en la qPCR para la determinación del número de copias de mtDNA (Tabla 2) han sido sintetizados por ThermoFisher Scientific.

#### 4. 1. 2. 3. Kits comerciales

La extracción de DNA se ha realizado empleando el kit Speedtools Tissue DNA Extraction Kit de la casa Biotoools™. La RT-q-PCR para la determinación del número de copias de mtDNA se ha realizado utilizando el kit TaqMan Gene Expression Master Mix de la casa comercial Applied Biosystems™.

#### 4. 1. 2. 4. Anticuerpos para inmunocitoquímica

	Anticuerpo	Especie	Dilución	Tiempo y temperatura incubación	Proveedor
Anticuerpos Primarios	Anti- $\alpha$ -tubulina	Ratón	1:200	Toda la noche, 4°C	Abcam
	Anti- $\beta$ III-tubulina	Conejo	1:1000	1 hora, 4°C	Abcam
	Anti-desmina	Conejo	1:1000	Toda la noche, 4°C	Abcam
	Anti-miogenina	Ratón	1:500-1000	Toda la noche, 4°C	Abcam
	Anti-miosina	Ratón	1:100	Toda la noche, 4°C	Invitrogen
Anticuerpos secundarios	Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente	Invitrogen
	Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente	Invitrogen
	Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente	Invitrogen
	Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG	Cabra	1:1000	1 hora, temperatura ambiente	Invitrogen

**Tabla 1.** Anticuerpos primarios y secundarios empleados en los ensayos de inmunocitoquímica, junto a sus correspondientes diluciones.

#### 4. 1. 3. Equipos e instrumentos

Para el manejo de cultivos celulares se han empleado dos modelos de campana de flujo laminar vertical: LaminAir y LabGard ES NU-437-400E, de las marcas Holten y Nuair, respectivamente. El incubador a 37°C, 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y en atmósfera húmeda es el modelo DHD Autoflow de la marca Nuair. Para esterilizar material de vidrio y plástico se emplea un autoclave de modelo 437 (160°C, 20 minutos, 1 atmósfera de presión) y una estufa S-201 (120°C, toda la noche) ambos de la marca P-selecta. Para el almacenamiento de disoluciones, reactivos y

material biológico se han empleado frigoríficos (4°C) y congeladores (-20°C) de diversas marcas, y ultracongeladores (-80°C) CFC Free de la marca Sanyo.

Respecto a centrifugas, se han empleado: microcentrifugas MiniSpin® plus y 5415R (refrigerada) de Eppendorf™; centrifuga Allegra X-22 de la marca Beckman Coulter; centrifuga RC 5B PLUS de la marca Sorvall con Rotores HS4 y SS34. El baño termostatzado (37°C) es el modelo Precistern de la marca Selecta. Para la manipulación de volúmenes se han empleado micropipetas (2, 20, 200, 1000 µL) de la casa Nichiryo, una micropipeta multicanal (300 µL) de ThermoFisher Scientific, y un pipeteador automático (1-50 mL) de Integra (Biosciences).

Para el recuento celular se ha empleado un contador automático Countess Automated Cell Counter de ThermoFisher Scientific. Para visualizar los cultivos celulares mediante microscopía se ha utilizado el microscopio óptico invertido modelo DMIL de la marca Leica. Para la visualización de cultivos marcados con inmunofluorescencia se ha empleado el equipo FLoid™ Cell Imaging Station de Life Biosciences (ThermoFisher Scientific).

En la preparación de reactivos se han empleado una balanza granataria FA-2000 de la marca AND (precisión 0,1 g) y la balanza analítica ML204 de Mettler Toledo, de mayor precisión (0,001 g). Todo el equipamiento para llevar a cabo electroforesis de ácidos nucleicos (cubetas y fuentes de alimentación) pertenecen a la casa Bio-Rad. El espectrofotómetro para medir la absorbancia de ácidos nucleicos es el Nano-drop ND-1000 de ThermoFisher Scientific. Para la realización de PCR se han empleado los termocicladores: T3 Thermocycler de Biometra® y Veriti™ Thermal Cycler (96-Well) de Applied Biosystems™. El termociclador empleado para RT-q-PCR ha sido el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™.

## 4. 2. Métodos

### 4. 2. 1. Técnicas de cultivo celular

#### 4. 2. 1. 1. *Mantenimiento*

Todas las líneas celulares se mantienen en el incubador a 37°C, al 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en atmósfera húmeda. Cualquier manipulación de los cultivos se realiza en campana de flujo laminar vertical para garantizar condiciones de esterilidad.

La línea celular 2128 143B se mantiene en el medio de cultivo DMEM con 4,5 g/L de glucosa (25 mM) y suplementado con FBS al 10%, renovando el medio cada 2-3 días según la confluencia celular.

Para sembrar las células de la línea iFbCV, primero se debe cubrir la superficie de la plataforma de cultivo con una capa de vitronectina. Para ello, se realiza una dilución 1:100 de vitronectina en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin calcio ni magnesio (DPBS), y se trata la placa de cultivo con dicha solución durante 1h para que gelifique a temperatura ambiente. Los cultivos de células iFbCV se mantienen tanto en medio Nutristem como en medio E8 completo (suplemento incluido), según los ensayos realizados. Las células iFbCV deplecionadas con BrEt y ddC se mantienen en medio de cultivo E8 suplementado con piruvato (1 mM) y uridina (50 µg/mL). La reducción del número de copias de mtDNA provoca una disminución de la función OXPHOS y disfunción de la cadena respiratoria. Se ha visto que, por esta razón, las células deplecionadas dependen del aporte exógeno de uridina y piruvato para sobrevivir<sup>49</sup>. En todos los casos, se realizan cambios de medios diarios, al tratarse de una línea celular de iPSCs.

Los clones obtenidos tras la fusión celular de iFbCV con 2128 143B se mantienen en medio de cultivo E8 suplementado con piruvato (1 mM), uridina (50 µg/mL), penicilina y estreptomicina (1X); con cambio de medio diario.

#### 4. 2. 1. 2. Tratamiento de células con BrEt y ddC - depleción de mtDNA

Se ha seguido el protocolo descrito por Khozhukhar et al. (2023) para la generación de células p<sup>0</sup> a partir de la línea 4B6 de fibroblastos embrionarios de ratón<sup>92</sup>; pero adaptado a nuestra línea celular de iPSCs.

En la prueba de optimización de concentraciones de BrEt y ddC se siembran 1·10<sup>5</sup> células iPSCs por pocillo en una placa de 6 pocillos. Tras 24h de incubación con medio E8 suplementado con piruvato (1 mM) y uridina (50 µg/mL), se tratan las células con dos condiciones diferentes durante 96h (placa 1) y 120h (placa 2), realizando cambios de medio diarios:

- Placa 1: Medio E8 con **BrEt 0,05 µg/mL** y **ddC 50 µM** + piruvato (1 mM), uridina (50 µg/mL)
- Placa 2: Medio E8 con **BrEt 0,05 µg/mL** y **ddC 100 µM** + piruvato (1 mM), uridina (50 µg/mL)

El día de la adición de los medios suplementados con BrEt y ddC se toma como día cero (t = 0h). Se recogen los pellets de células de los pocillos a diferentes tiempos: 0h, 15h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h (apartado 4. 2. 1. 6.). Se guardan en el congelador a -80°C para posteriormente extraer el DNA y cuantificar el número de copias de mtDNA por RT-q-PCR (véase el apartado 4 2. 3. 1.).

Para realizar los ensayos de fusión, se tratan placas de 100 mm de iPSCs al 50% de confluencia con 10 mL de E8 completo suplementado con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), BrEt (0,05 µg/mL), y ddC (50 µM) durante 48h, realizando cambios de medio diarios. En paralelo, se tratan placas de 100 mm de iPSCs con 10 mL de E8 completo suplementado con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), como control de células no deplecionadas de mtDNA.

#### 4. 2. 1. 3. Tripsinización

El protocolo para levantar células adherentes es ligeramente distinto según el tipo celular empleado. Para levantar células 2128 143B, se emplea tripsina *TrypLE<sup>TM</sup> Express* de Gibco<sup>TM</sup>, Invitrogen, previamente atemperada a 37°C. Se trata de una proteasa que actúa sobre proteínas implicadas en la adhesión celular. Primero, se retira el medio de cultivo y se realiza un lavado con tampón fosfato salino (PBS). A continuación, se incuban las células con el volumen adecuado de tripsina durante 3 minutos a 37°C. Finalmente, se neutraliza la tripsina con medio de cultivo con suero (DMEM 10% FBS) utilizando un volumen 2-3 veces superior al volumen de tripsina utilizado. Se recogen las células vertiendo la suspensión celular sobre las paredes de la plataforma de cultivo, para así terminar de arrastrar las células que permanezcan adheridas. La suspensión celular obtenida se puede centrifugar a 1400 rpm durante 5 minutos para precipitar las células, decantar el sobrenadante y resuspenderlas en un medio de cultivo libre de tripsina.

En el caso de la línea celular iFbCV no se emplea tripsina para levantar las células, sino EDTA 0,5 mM pH 8, un quelante de iones Ca<sup>2+</sup>. Su acción es menos agresiva que la tripsina y permite levantar las colonias de iPSCs sin romper las uniones intercelulares. Conviene atemperar el reactivo EDTA a 37°C en el baño termostático para que las células se despeguen más fácilmente. Para levantar las células iFbCV, primero se retira el medio de cultivo, se realiza un lavado con DPBS y otro con EDTA 0,5 mM. A continuación, se cubre la placa de cultivo con el volumen apropiado de EDTA 0,5 mM y se incuba durante 3-4 minutos a temperatura ambiente. Se aspira el volumen de EDTA y se levantan las células añadiendo medio de cultivo sobre la placa inclinada. Se recogen las células sin pipetear más de 4 veces, para evitar fragmentar las colonias.

#### 4. 2. 1. 4. Recuento celular

Se ha empleado un contador automático (*Countess Automated Cell Counter*, de ThermoFisher Scientific) con capacidad de recuento entre  $1 \cdot 10^4$  y  $1 \cdot 10^7$  células/mL. Se toman 10  $\mu$ L de suspensión celular y se resuspenden en 10  $\mu$ L de Azul Tripán, un colorante que tiñe de azul las células con la membrana dañada, es decir, las células no viables. La suspensión con el colorante se pipetea sobre una cámara desechable y es analizada por el contador automático para obtener el dato de densidad celular.

#### 4. 2. 1. 5. Congelación y descongelación

La congelación de células 2128 143B e iFbCV varía en la composición del medio de congelación. Las células 2128 143B tras ser levantadas y centrifugadas, se resuspenden en DMEM con 20% de FBS y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) como agente crioprotector. Se congela un volumen total de aproximadamente 1,5 mL por criotubo, con una densidad celular entre  $1 \cdot 10^6$  y  $2 \cdot 10^6$ . Las células iFbCV, tras ser levantadas con EDTA, se recogen directamente con un medio de cultivo de congelación que contiene un 10% de DMSO, sin suero.

Los criotubos se guardan en un Mr. Frosty previamente atemperado a temperatura ambiente. Este es un recipiente de congelación que contiene una cámara con alcohol isopropílico, que permite una bajada de temperatura gradual y progresiva, con una velocidad próxima a  $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ , óptima para mantener la viabilidad del cultivo celular. El contenedor Mr. Frosty se guarda en el congelador de  $-80^\circ\text{C}$ . Una vez se alcanza dicha temperatura, los criotubos se pueden pasar a almacenar en un tanque de nitrógeno líquido ( $\text{N}_2$ ).

Para la descongelación de células, se parte de criotubos del congelador de  $-80^\circ\text{C}$  o del tanque de  $\text{N}_2$  y se introducen hasta la mitad en el baño termostatzado a  $37^\circ\text{C}$ . En el caso de las células 2128 143B, cuando quede una pequeña fracción de hielo, se transfiere el volumen del criotubo a un falcon que contenga 10 mL de DMEM con 10% FBS. Así, se consigue diluir el DMSO que actúa como crioprotector a bajas temperaturas, pero presenta toxicidad celular a temperatura ambiente. Se centrifuga el falcon a 1400 rpm por 5 minutos, se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet de células en 1 mL de medio DMEM 10% FBS. Se siembra la suspensión celular sobre una placa de 100 mm con 9 mL de medio DMEM 10% FBS. Se agita la placa para distribuir homogéneamente las células y se lleva al incubador a  $37^\circ\text{C}$ .

Para la descongelación de células iFbCV, primero se debe preparar una placa de 6 pocillos cubiertos por una capa de vitronectina (véase apartado 4. 2. 1. 1.). Tras introducir el criotubo en el baño termostatzado, se transfiere la suspensión celular a un falcon que contenga 3 mL de medio de cultivo (E8 o Nutristem). Se centrifuga a 200 rcf durante 4 minutos, ya que las iPSCs son más sensibles que las células 2128 143B. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 2 mL de medio de cultivo (volumen que puede variar según el tamaño del pellet). Se aspira el exceso de DPBS de la placa de 6 pocillos y se siembran 500  $\mu$ L sobre 1,5 mL de medio de cultivo en cada pocillo, inclinando la placa  $45^\circ\text{C}$  y vertiendo la suspensión celular con cuidado sobre la pared.

En el caso de las iPSCs, se tratan los pocillos con ROCK *inhibitor* (Y27632) a una concentración de 5  $\mu$ M, añadiendo 2  $\mu$ L de una solución stock a 5 mM sobre los 2 mL de volumen de cada pocillo (dilución 1:1000). El inhibidor de ROCK favorece la adhesión de las células tras la

descongelación, ya que es un inhibidor de la apoptosis. Finalmente, se agita la placa para distribuir las células sobre los pocillos y se lleva al incubador a 37°C.

#### *4. 2. 1. 6. Recogida de pellets*

Se parte de la suspensión celular obtenida tras tripsinizar las células, o tras aspirar el EDTA y levantar las células con medio de cultivo. Una vez levantadas, se transfiere la suspensión a un tubo falcon y se centrifugan a 300 rcf por 4 minutos. Se decanta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 1 mL de PBS y se transfiere a un tubo eppendorf. Este es centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos y se retira todo el líquido posible pipeteando con cuidado para conservar el pellet. Finalmente, los pellets se almacenan en el congelador a -80°C.

### **4. 2. 2. Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs**

#### *4. 2. 2. 1. Enucleación de células donantes de mitocondrias - generación de citoplastos*

Las células donantes de mitocondrias se enuclean químicamente mediante un tratamiento con actinomicina D para obtener citoplastos para la fusión celular. Para preparar el stock de actinomicina D se disuelve un vial de 2 mg de actinomicina D (Sigma-Aldrich) en 1 mL de DMSO y se pasa la solución por una jeringuilla con un filtro de 0,22 µm de tamaño de poro. A continuación, se añade 1 mL de DMSO estéril para obtener la solución stock a 1 mg/mL.

Primero, se siembran  $3 \cdot 10^5$  células/pocillo en una placa de 6 pocillos y se dejan crecer durante 24h. A continuación, se tratan 3 pocillos de células con una concentración de actinomicina D de 0,5 µg/mL durante 15h, en un volumen de 3 mL de medio por pocillo. Se reservan 3 pocillos control, tratados únicamente con 3 mL de DMEM al 10% de FBS (Figura 4). Después de la incubación, se retira el medio de cultivo con la droga y se lava con DMEM al 20% de FBS durante 10 minutos. A continuación, se puede llevar a cabo los ensayos de fusión celular, de eficacia de selección del medio HAT o los ensayos de inmunocitoquímica.

#### *4. 2. 2. 1. 1. Eficacia de la selección con medio HAT*

Para evaluar la eficacia de la enucleación química, se tratan las células enucleadas con medio DMEM al 10% FBS suplementado con HAT - hipoxantina, aminopterina y timidina. Se diluye el suplemento HAT (50X) de Gibco™, Invitrogen en medio de cultivo DMEM 10% FBS y se añaden 2 mL de medio por pocillo, realizando cambios de medios diarios.

#### *4. 2. 2. 1. 2. Inmunocitoquímica de la placa de enucleación*

Para fijar las células de la placa de enucleación, primero se realiza un lavado con PBS y luego, se tratan con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realizan dos lavados con PBS y se permeabilizan las células con el detergente Triton-X-100 al 0,1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Secuidamente, se tratan las células con BSA al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, para lograr un bloqueo y evitar las uniones inespecíficas.

El anticuerpo primario se diluye a la concentración adecuada en PBS con Triton-X-100 al 0,1% y BSA al 1%. Se incuba al tiempo y temperatura adecuados. Se realizan dos lavados con Triton-X-100 al 0,1% y se incuba el anticuerpo secundario por 60 minutos en una dilución de PBS con 0,1% de Triton-X-100 y 0,1% BSA, protegido de la luz y a temperatura ambiente. Se realizan dos

lavados con Tritón-X-100 y se incuban en una solución de PBS con DAPI (1:1000) para la tinción de núcleos.

#### 4. 2. 2. 2. Fusión celular de donantes de núcleo y donantes de mitocondrias

Se ha empleado un stock de PEG de Sigma Aldrich (P7306) con peso molecular de 1450 g/mol al 50%, disuelto en DPBS sin calcio con 10% de DMSO. Se han realizado diluciones en medio E8 completo con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL) para obtener las distintas concentraciones de PEG para el ensayo de optimización de concentraciones.

##### 4. 2. 2. 2. 1. Pasos preliminares a la fusión celular

En los días previos a la fusión nuclear se realizan los pasos de enucleación de células donantes de mitocondrias (apartado 4. 2. 2. 1.) y el tratamiento con BrEt y ddC a las células iPSC donantes de núcleo (apartado 4. 2. 1. 2.). De forma resumida, en el día -2 (48h antes de la fusión celular) se siembran  $3 \cdot 10^5$  células donantes de mitocondrias en cada pocillo de una placa de 6. Ese mismo día se inicia la depleción de mtDNA tratando 2 placas de 100 mm de iPSCs con dos medios distintos:

- Células p<sup>0</sup>: se tratan con medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), BrEt (0,05 µg/mL), y ddC (50 µM).
- Control: se tratan con medio E8 completo con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL).

En el día -1 (24h antes de la fusión), se renuevan los medios de las placas de iPSC y se añade la Actinomicina D 0,5 µg/mL a las células donantes de mitocondrias.

En el día de la fusión, que se toma como día cero, tras 15h de incubación con Actinomicina D, se lavan los pocillos de células donantes de mitocondrias con DMEM 20% FBS durante 10 minutos. Después, se cambia el medio a E8 con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL) para que las células se vayan aclimatando a las condiciones del ensayo. Además, se realiza un pre-tratamiento de las iPSC con medio E8 con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL), suplementado con RevitaCell™ (Gibco™, Invitrogen). Se incuban las células en este medio a 37°C durante 1h. Se prepara además el reactivo *TrypLE™ Select 0,75X*, diluyendo el stock *TrypLE™ Select (1X)* en EDTA 0,5 mM hasta alcanzar la concentración deseada, y se aclimata el reactivo en el baño termostaticado a 37°C.

##### 4. 2. 2. 2. 2. Fusión con células enucleadas adherentes

Primero se levantan las iPSC (controles y tratadas con BrEt y ddC), incubándolas con 4 mL de *TrypLE™ Select 0,75X* durante 3 min a 37°C. Este reactivo permite levantar las células de forma individual, a diferencia de EDTA 0,5 mM, el cual se emplea para levantar colonias enteras de células. En vez de aspirar el *TrypLE™ Select 0,75X*, se terminan de levantar las células añadiendo medio de cultivo (3-4 mL) sobre la placa inclinada. Se centrifuga la suspensión celular a 200 rcf durante 2 minutos, se decanta el sobrenadante para eliminar el *TrypLE™ Select 0,75X* y se resuspende el pellet celular en E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y RevitaCell™ (1X).

Tras hacer un recuento celular (apartado 4. 2. 1. 4.) se siembran 500.000 células iPSC/pocillo en la placa de células enucleadas. Para individualizar las células para realizar la fusión, a la hora de sembrar las iPSC sobre los citoplastos adheridos, se hace pasar la suspensión celular a través de un colador celular estéril con un tamaño de poro de 100 µm. Se espera un tiempo mínimo de 6h para que las iPSC se adhieran sobre los citoplastos.

Se realizan tres lavados con medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL). Tras aspirar el último lavado, se coloca la placa en un ángulo de 45°C y se aspira todo el medio residual durante 40 segundos. Después, se añaden 2,5 mL de PEG (40 o 45%) en el pocillo, se remueve agitando la placa hacia los laterales durante 10 segundos y se deja inmóvil los siguientes 50 segundos. Se empieza a aspirar el PEG 5 segundos antes de que acabe el tiempo marcado, ya que cuesta retirarlo debido a su alta viscosidad. Este protocolo se realiza para cada pocillo de forma individual, para así ceñirse lo máximo posible a los tiempos establecidos.

Inmediatamente después de aspirar el PEG, se lava el pocillo 3 veces con E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y DMSO al 10%. Se realiza un último lavado con E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y RevitaCel™ (1X). Finalmente, se añade 2,5 mL de E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), RevitaCel™ (1X) y penicilina/estreptomicina (1X) a cada pocillo y se incuba la placa toda la noche a 37°C. Tras 24h, se retira el RevitaCell™ haciendo un cambio de medio a E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y penicilina/estreptomicina (1X). A partir de este punto del ensayo, se mantienen los antibióticos en el medio y se realizan cambios de medios diarios, tomando imágenes al microscopio invertido cada 24h.

El segundo protocolo de fusión con células adherentes se ha acuñado “fusión inversa”. Como pasos preliminares, 72h antes de iniciar el protocolo de fusión, se siembran 250.000 células iFbCV en cada pocillo de una placa de 6 pocillos recubierta con vitonectina, a través de un colador igualmente para individualizar las células. Después, 48h antes del protocolo de fusión, se siembra una placa de 6 pocillos con  $3 \cdot 10^5$  células donantes de mitocondrias por pocillo y, tras 24h, se someten al tratamiento con actinomicina D 0,5 µg/mL durante 15h (apartado 4. 2. 2. 1.). Por otra parte, 48h antes del ensayo de fusión, se tratan dos de los pocillos de la placa de iPSCs con BrEt (0,05 µg/mL), y ddC (50 µM) para realizar la depleción mitocondrial.

El día de la fusión, se retira la actinomicina D de la placa de enucleación, lavando con DMEM 20% FBS durante 10 minutos. Después, se levantan las células incubando con tripsina durante 3 minutos a 37°C. Se recogen las células, se centrifugan a 1400 rpm por 4 minutos y se resuspenden en 2 mL de medio E8 completo con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL). A continuación, se retira el medio de la placa de iPSCs, se realiza un lavado con E8 completo con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL) para retirar las células muertas no adheridas y se añade la suspensión celular de 2 mL de citoplastos.

Se cubre la placa con parafilm y se centrifuga a 150 rcf durante 10 minutos. Se comprueba al microscopio invertido que las células enucleadas permanecen pegadas sobre las iPSCs del fondo del pocillo. A partir de aquí, se retira el medio de cultivo de cada pocillo, aspirando durante 20-25 segundos y se añade un volumen de 2,5 mL de PEG 45% siguiendo el protocolo de fusión descrito anteriormente.

#### 4. 2. 2. 2. 3. Fusión con células enucleadas en suspensión

Antes de realizar la fusión con células en suspensión, se deben preparar las placas en las cuales se van a sembrar las células tras el tratamiento con PEG. Se recubren placas de 150 mm con Matrigel® de Corning® apto para ESCs humanas, con un factor de dilución de 350 µL en 30 mL de E8 completo con piruvato (1mM) y uridina (50 µg/mL). El Matrigel® se debe trabajar en frío, a una temperatura de 4°C para mantenerlo en estado líquido. Se cubre cada placa con 15 mL de Matrigel® y se incuban durante 1h a temperatura ambiente para dejar que gelifique el Matrigel®.

En paralelo, se realizan los pasos preliminares descritos en el apartado 4. 2. 2. 2. 1. y se levantan las iPSCs (controles y tratadas con BrEt y ddC) con *TrypLE™ Select* 0,75X como se describe en el apartado 4. 2. 2. 2. 2. Después, se levantan las células donantes de mitocondrias de la placa de enucleación, realizando un lavado con PBS e incubando tripsina a 37°C durante 3 minutos. Se neutraliza la tripsina y se transfiere las suspensiones de los pocillos a tubos falcon (dos pocillos en cada tubo). Se centrifugan las células a 200 rcf durante 2 minutos, se decanta el sobrenadante y sobre el pellet de células enucleadas se añade con cuidado la suspensión de iPSCs sin resuspender, para que estas queden apoyadas en la superficie del pellet. A continuación, se centrifugan a 200 rcf durante cinco minutos y sin freno de desaceleración, para evitar que las iPSCs se mezclen con el pellet de células enucleadas.

Se retira todo el sobrenadante, utilizando micropipeta para eliminar todo el líquido posible. Se añaden 100 µL de PEG (40% o 45%) sobre el pellet, pipeteando durante 15 segundos y dejando incubar inmóvil durante 45 segundos. Transcurrido este tiempo, se añade inmediatamente 4 mL de medio de cultivo para diluir y neutralizar el PEG y se centrifuga a 300 rcf durante 4 minutos. Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 2 mL de medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), RevitaCell™ (1X) y penicilina/estreptomicina (1X). Se retira el exceso de líquido de la placa con Matrigel® y se siembra la suspensión celular en un volumen total de 17 mL de medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL), RevitaCell™ (1X) y penicilina/estreptomicina (1X). Se incuban las placas toda la noche con RevitaCell™ (1X) y tras 24h, se realiza un cambio de medio para retirarlo. El cultivo se mantiene en medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y penicilina/estreptomicina (1X), realizando cambios diarios de medio y tomando imágenes al microscopio invertido cada 24h.

#### 4. 2. 2. 2. 4. Optimización de la concentración de PEG para la fusión

Para realizar el ensayo de optimización de la concentración de PEG se ha seguido el mismo procedimiento que para la fusión de células adherentes (apartado 4. 2. 2. 2. 2.): levantar las iPSCs con *TrypLE™ Select* 0,75X, neutralizar y centrifugar la solución, sembrar a través de un colador 500.000 células por cada pocillo en una placa cubierta con vitronectina (esta vez sin citoplastos adheridos), en medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y RevitaCell™ (1X). Se incuba la placa durante 6h para dejar que las células se adhieran y a continuación se lleva a cabo el ensayo de fusión (apartado 4. 2. 2. 2. 2.) con diferentes concentraciones de PEG: 0% (solo medio de cultivo), 30%, 40%, 45%, 50%. Se reserva un pocillo control el cual no se somete a la fusión y se mantiene con medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y RevitaCell™ (1X). Tras el protocolo de fusión, el cultivo se mantiene en medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50 µg/mL) y penicilina/estreptomicina (1X), realizando cambios de medio diarios y tomando imágenes al microscopio invertido cada 24h.

#### 4. 2. 2. 3. Aislamiento y fragmentación de clones

Los clones de células obtenidos tras el protocolo de fusión en adherencia se aíslan y fragmentan manualmente empleando una aguja esterilizada de 1½ pulgadas y calibre 25. Para ello, se introduce el microscopio óptico invertido en la campana de flujo laminar tras desinfectarlo con etanol al 70% y se esteriliza con radiación ultravioleta durante un tiempo mínimo de 15 minutos. Una cámara acoplada al microscopio permite visualizar las colonias que se van a fragmentar.

Con la aguja, se rodean las colonias y se cortan siguiendo un patrón de cuadrícula, obteniendo entre 2-4 fragmentos de cada colonia. A continuación, se emplea una micropipeta con puntas

de 200  $\mu\text{L}$  para aspirar los fragmentos y depositarlos en una placa de 12 pocillos ya preparada con vitronectina y medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), penicilina/estreptomicina (1X) y ROCK *inhibitor* (Y27632) 5  $\mu\text{M}$ . En cada pocillo se deben depositar los fragmentos de una misma colonia, para así asegurar que las células hijas sean clones de la colonia original. Tras 24h de incubación, se retira el medio con el inhibidor de ROCK y se mantiene el cultivo con medio E8 completo con piruvato (1mM), uridina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y penicilina/estreptomicina (1X), realizando cambios de medio diarios. Cuando las células de los pocillos alcanzan una confluencia elevada, se realiza un pase de todos los clones diluyendo a las densidades celulares adecuadas para que mantengan una confluencia similar en el tiempo.

#### 4. 2. 3. Técnicas de manipulación de ácidos nucleicos

##### 4. 2. 3. 1. Extracción de DNA a partir de pellets celulares y cuantificación

Se parte de pellets celulares almacenados a  $-80^{\circ}\text{C}$  (apartado 3. 2. 1. 6.), de los cuales se va a extraer el DNA utilizando el kit Speedtools Tissue DNA Extraction Kit de la casa Biotools™. Se siguen las instrucciones del fabricante recogidas en el protocolo estándar para cultivos celulares y, en el paso de elución del DNA, se emplea un volumen de 40  $\mu\text{L}$  de agua pura libre de nucleasas.

Para cuantificar el DNA eluido se ha empleado un espectrofotómetro Nanodrop, capaz de medir la absorbancia a 260 nm y 280 nm de las diferentes muestras en un volumen de 1-2  $\mu\text{L}$ , tomando como blanco el agua libre de nucleasas. El programa informático asociado al equipo calcula el valor de concentración de DNA en la muestra ( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) y los ratios de absorbancia a 260/280 nm y 260/230 nm para evaluar la pureza de los ácidos nucleicos. El valor óptimo del ratio 260/280 nm está entre 1,8-2 y valores menores son indicativos de contaminación por proteínas y compuestos fenólicos, que presentan un pico de absorbancia a 280 nm. El ratio de pureza 260/230 nm debe estar en el rango de 1,5-2,2: y valores menores son indicativos de contaminación por reactivos orgánicos del proceso de extracción, que absorben a 230 nm.

##### 4. 2. 3. 2. Cuantificación del número de copias de mtDNA

La cuantificación de los niveles de mtDNA tras la depleción se realizó mediante PCR a tiempo real (RT-q-PCR) utilizando la técnica de sondas TaqMan®, la cual permite cuantificar fragmentos del genoma mitocondrial y del genoma nuclear de forma simultánea. Se basa en la utilización de una sonda marcada con un fluoróforo FAM, que hibrida en una región muy conservada del mtDNA; y una sonda con un fluoróforo en VIC, que es complementaria a una región nuclear.

Concretamente, la sonda mitocondrial (FAM) hibrida en el gen *MT-RNR1* codificante del rRNA 12S mitocondrial. Los oligonucleótidos empleados para amplificar dicha región se muestran en la Tabla 2. La sonda nuclear (VIC) hibrida en el gen de la RNAsa P, que se encuentra en monocopia en el genoma nuclear. La sonda nuclear permite normalizar los niveles de mtDNA respecto al número de células que hay en la muestra.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)
12S-L ( <i>Forward</i> )	CCACGGGAAACAGCATGTATT	58,4
12S-H ( <i>Reverse</i> )	CTATTGACTTGGGTTAATCGTGTGA	58,2
Sonda Mt-FAM	FAM-TGCCAGCCACCGCG	69,3

**Tabla 2.** Oligonucleótidos y sonda empleados en la RT-q-PCR para la determinación de los niveles de mtDNA. L: cadena ligera, H: cadena pesada, Tm: temperatura de hibridación.

La detección del gen de la RNAsa P se realiza utilizando el kit PDARs RNAsa P y con el Universal PCR Master Mix, ambos de Applied Biosystems™.

Los oligonucleótidos se reconstituyen a 25  $\mu\text{M}$  y después se realiza una dilución 1:5 para obtener las soluciones de trabajo a 5  $\mu\text{M}$ . La sonda suministrada a 100  $\mu\text{M}$  se diluye hasta obtener una solución de trabajo de 5  $\mu\text{M}$ . Las condiciones de reacción de la PCR se muestran en la Tabla 3. Se parte de 10 ng de DNA para cada reacción, por lo que se realizan diluciones de las muestras con agua estéril para ajustar su concentración a aproximadamente 2 ng/ $\mu\text{L}$ . Se carga por duplicado un volumen de muestra de 5  $\mu\text{L}$  sobre un volumen de 15  $\mu\text{L}$  de mezcla de reacción con el resto de componentes (5  $\mu\text{L}$  de agua estéril sobre 15  $\mu\text{L}$  de mezcla en el caso del blanco).

Reactivo	Concentración inicial	Volumen/reacción
Master Mix	2x	10 $\mu\text{l}$
Oligonucleótido 12S-L	5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Oligonucleótido 12S-H	5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
Sonda Mt-FAM	5 $\mu\text{M}$	0,5 $\mu\text{l}$
RNAsaP	20x	1 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O		2,5 $\mu\text{l}$
DNA total	2 ng/ $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$

**Tabla 3.** Reactivos y sus correspondientes volúmenes para cada mezcla de reacción de la RT-q-PCR para la determinación de los niveles de mtDNA.

Para la cuantificación del número de copias de mtDNA se elabora una recta estándar a partir de diluciones seriadas de una solución con plásmidos que contienen el gen mitocondrial y nuclear en concentraciones conocidas ( $9 \times 10^6$  copias del gen mitocondrial y  $9 \times 10^4$  copias del gen nuclear). La solución original se diluye 1:200 en Tris/HCl 10 mM pH 8,5, y a partir de esta se realizan diluciones seriadas para obtener disoluciones a 1:3, 1:9, 1:27, 1:81, también en tampón Tris/HCl 10 mM pH 8,5. Se cargan 5  $\mu\text{L}$  de cada estándar por duplicado para construir la recta patrón donde interpolar después las señales de fluorescencia obtenidas para cada muestra.

La PCR se lleva a cabo en el termociclador StepOnePlus™ Real-Time PCR System de Applied Biosystems™, en las condiciones universales: calentamiento a 50 °C - 2 min, desnaturalización inicial a 95 °C - 10 min, y 40 ciclos de 95 °C - 15 segundos (desnaturalización) seguidos de 60 °C - 1 min (elongación). Los resultados se analizan con el software StepOne v2.3, el cual calcula el número de copias del gen mitocondrial y el número de copias del gen nuclear interpolando los valores de Ct (umbral de ciclos o *cycle threshold*) de las muestras en la recta estándar. Se expresan los valores como  $Q_{\text{mitocondrial}}$  y  $Q_{\text{nuclear}}$ , respectivamente y finalmente, el valor del número de copias de mtDNA normalizado se calcula mediante la razón:

$$\frac{Q_{\text{mitocondrial}}}{Q_{\text{nuclear}}}$$

#### 4. 2. 3. 3. PCR-RFLP

La técnica de RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* o Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción) se basa en la utilización de endonucleasas de restricción que realizan cortes específicos en una secuencia de DNA amplificada previamente por PCR. Para poder distinguir el mtDNA procedente de ambas células parentales (iPSCs y células donantes de

mitocondrias), se debe emplear una enzima de restricción capaz de cortar exclusivamente uno de los dos genomas mitocondriales y dar un patrón de bandas diferencial al analizar la digestión mediante electroforesis en geles de agarosa. Concretamente, la técnica de RFLP se ha aplicado para diferenciar los polimorfismos m.12771G>A y m.16129A>G; tomando la secuencia de la células iPSC como referencia y la de células donantes de mitocondrias como la secuencia mutada.

Para amplificar la región del SNP m.12771G>A se emplean los oligonucleótidos hmtL12640 y hmtH12862 (Tabla 4), que permiten obtener un amplicón de 262 bp. Para la amplificación de la región de m16129A>G se emplean los oligonucleótidos hmtL15591 y hmtH112, obteniendo un amplicón de mayor tamaño, 1130 bp (Tabla 4).

	Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')	Tm (°C)	Amplicón (pb)
Digestión con <i>MnlI</i>	hmtL12640	TCGTTACATGGTCCATCATAG	65,8	262 (G12771A)
	hmtH12862	AAACCGATATCGCCGATACG	65,8	
Digestión con <i>NlaIV</i>	hmtL15591	TTCGCCTACACAATTCTCCG	65,8	1130 (A16129G)
	hmtH112	ACAGATACTGCGACATAGGG	65,8	

**Tabla 4.** Oligonucleótidos empleados para amplificar por PCR los fragmentos a digerir con las enzimas de restricción *MnlI* y *NlaIV*, y tamaño de los amplicones resultantes (entre paréntesis aparece el SNP contenido en el amplicón) Tm: temperatura de hibridación teórica.

Los volúmenes adicionados de cada componente para realizar la PCR se muestran en la Tabla 5. Se diluyen las muestras de DNA en agua estéril para cargar aproximadamente 100-150 ng de DNA en cada volumen de reacción.

Reactivos	Concentración	Volumen/reacción
EmeraldAmp <sup>®</sup> MAX PCR Master Mix	2x	12,5 µl
Oligonucleótido L	25 µl	0,5 µl
Oligonucleótido H	25 µl	0,5 µl
DNA	≈ 100 ng/ µl	1 µl
H <sub>2</sub> O		10,5 µl

**Tabla 5.** Reactivos y sus correspondientes volúmenes para cada mezcla de reacción de PCR.

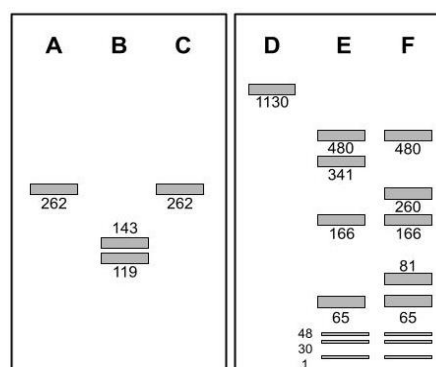
Para la amplificación de la región de m12771G>A se lleva a cabo un programa de PCR estándar. Los ciclos de temperatura pautados en el termociclador son los siguientes: un ciclo de 95°C – 5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos de 95°C – 45 s (desnaturalización) seguidos de la temperatura de hibridación – 45 s (hibridación de *primers*) y 72°C – 45 s (extensión); y un ciclo de 72°C – 5 min (elongación). Finalmente, el equipo mantiene una temperatura de 4°C indefinidamente para el enfriamiento de los productos de PCR.

Para la amplificación de la región de m.16129A>G, se emplea un programa de PCR de secuenciación, ya que el tamaño del amplicón es mayor que en el caso anterior. Los ciclos de temperatura son: 94° C – 5 min (desnaturalización inicial), 35 ciclos de 94°C – 45 s (desnaturalización) seguidos de 65°C – 30 s (hibridación primers) y 72°C – 3 min (extensión); y un ciclo de 72°C – 5 min (elongación). El producto amplificado se puede mantener a 4°C de forma indefinida.

Finalmente, se comprueba el tamaño del producto amplificado y la ausencia de bandas inespecíficas mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Además, se verifica que haya una ausencia de bandas en la muestra de DNA de células  $\rho^0$ , para descartar la presencia de pseudogenes mitocondriales en el núcleo de la célula.

Para ello, se preparan geles disolviendo 1 g de agarosa en 100 mL de tampón TBE 1X (Tris 50 mM, Ácido Bórico 50 mM, EDTA-Na 1 mM, pH 8,3), calentando en un horno microondas hasta fundir la agarosa, y añadiendo 6  $\mu$ L de SYBR™ Safe DNA Gel Stain tras dejar enfriar. Se vierte la solución sobre un molde cerrado con cinta por los laterales y se deja gelificar. Se monta el soporte sobre una cubeta de electroforesis que contiene tampón TBE (1X) y se cargan 5  $\mu$ L de producto amplificado en cada pocillo. Según el tamaño del producto de PCR, se han cargado también los marcadores: DNA Molecular Weight Marker VIII (19 a 1114 pb) y DNA Molecular Weight Marker VII (81 a 8570 pb), resuspendidos en 2  $\mu$ L de tampón de carga (0,21% (p/v) azul de bromofenol, EDTA 0,2M pH 8.0, 50% (v/v) glicerol en H<sub>2</sub>O libre pura). Se corre el gel a un voltaje de 100V el tiempo necesario para que las bandas de los amplicones se separen. Finalmente, el gel se visualiza irradiándolo con luz ultravioleta en el equipo ChemiDoc™ de Bio-Rad.

Las enzimas de restricción empleadas en la técnica de RFLP se muestran en la Tabla 6. En concreto, la guanina en la posición 12771 de la secuencia iFbCV es digerida por la enzima FastDigest *MnII* en tampón FastDigest (10X) de ThermoFisher Scientific™. La guanina en la posición 16129 de la secuencia de 2128 143B es digerida por *BspLI (NlaIV)* (10 U/ $\mu$ L) en tampón Tango (10X) de ThermoFisher Scientific™. Así, *MnII* corta la secuencia de mtDNA de la iFbCV y deja intacta la de 2128 143B; mientras que *NlaIV* da un patrón de bandas con un corte adicional en la secuencia de mtDNA de 2128 143B respecto a la de iFbCV (Tabla 6 y Figura 4).



**Figura 4.** Esquema de los patrones de bandas obtenidos tras la digestión de los amplicones con *MnII* (A, B, C) y con *NlaIV* (D, E, F) en gel de agarosa al 2%. Siendo: A y D los respectivos amplicones sin digerir; B y E la digestión del mtDNA de iFbCV; C y F, la digestión del mtDNA de 2128 143B.

Enzima de restricción	Sitio de corte	Condiciones digestión	Patrón de bandas	
			iFbCV	2128 143B
<i>MnII</i> <i>FastDigest MnII</i>	5' .. CCTC(7/6)^ .. 3'	37°C, 30 minutos	143 pb 119 pb	262 pb
<i>NlaIV</i> <i>BspLI (NlaIV)</i>	5'.. GGN^NCC .. 3'	37°C, toda la noche	480 pb 341 pb 166 pb 65 pb 48 pb 30 pb 1 pb	480 pb 260 pb 166 pb 81 pb 65 pb 48 pb 30 pb 1 pb

**Tabla 6.** Enzimas de restricción empleadas para la digestión de los productos de PCR, sus sitios de corte, condiciones de digestión, y el patrón de bandas resultante para las digestiones del mtDNA de iFbCV y 2128 143B (resaltadas las bandas diferenciales, en rojo los cortes adicionales).

Las digestiones enzimáticas se realizan de forma independiente para cada enzima. Se incuba una mezcla de digestión con 5  $\mu$ L de producto amplificado, 2  $\mu$ L de enzima *MnII*, 1  $\mu$ L de tampón FastDigest y 2  $\mu$ L de agua, durante 30 minutos a 37°C. Por otra parte, se incuba una mezcla de digestión con 5  $\mu$ L de producto amplificado, 1  $\mu$ L de enzima *NlaIV* (10 U/ $\mu$ L), 1  $\mu$ L de tampón Tango y 3  $\mu$ L de agua durante toda la noche a 37°C.

Tras la digestión, se cargan los 10  $\mu$ L de la mezcla (junto a 2  $\mu$ L de tampón de carga) en pocillos de un gel de agarosa al 2%, junto con los marcadores de pesos moleculares y dos controles: el DNA amplificado de iFbCV y el de 2128 143B, ambos sin digerir. Se visualizan los patrones de bandas utilizando radiación ultravioleta y se compara el tamaño de las bandas para determinar si las muestras de los clones contienen mtDNA de iFbCV o de 2128 143B, o ambos (Figura 4).

#### 4. 2. 4. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares esqueléticas innervadas

La diferenciación del cultivo de células pluripotentes inducidas a fibras musculares innervadas se ha realizado basándonos en el protocolo descrito por Kilian Mazaleyrat et al., con algunas variaciones<sup>84, 85</sup>.

##### 4. 2. 4. 1. Diferenciación de células iFbCV

El protocolo de diferenciación se basa en la adición secuencial de determinados factores al medio de cultivo en el que se mantienen las células. En concreto, se adicionan los factores: bFGF o factor de crecimiento de fibroblastos básico (Basic fibroblast growth factor), HGF o factor de crecimiento de hepatocitos (Hepatocyte growth factor), IGF-1 o factor de crecimiento similar a la insulina (Insuline-like growth factor 1), LDN193189, CHIR 99021 y DAPT al medio de diferenciación basal en distintas fases temporales. La composición de los diferentes medios empleados a lo largo de la diferenciación se muestran en la tabla 7.

Inicialmente, se preparan dos placas de 6 pocillos con Matrigel® de Corning® apto para ESCs humanas. Trabajando en frío, se diluyen 140  $\mu$  de Matrigel® en 12 mL de medio E8 completo y se vierte 1 mL de dicha disolución en cada pocillo. Se incuban las placas durante 1h para que el Matrigel® solidifique y a 37°C para favorecer la adhesión celular. A continuación, se siembran 150.000 iPSCs por pocillo en medio E8 completo y se dejan incubando toda la noche a 37°C para que las células se adhieran al fondo del pocillo. Tras 24h, se inicia el protocolo de diferenciación (día cero), realizando cambios de medio diarios y tomando imágenes del cultivo al microscopio invertido cada 24h.

En una primera fase de 6 días de duración, para promover la expansión celular y la diferenciación a progenitores neurales y musculares, se trata las células con medio 1 (DM+LDN+CHIR) que contiene: bFGF para favorecer el crecimiento de las iPSCs; LDN193189 que inhibe el receptores de BMP (Bone morphogenetic protein); y CHIR 99021 que inhibe la glucógeno sintasa kinasa 3 (GSK3) y permite la expresión de genes regulados por Wnt. Posteriormente, entre el día 6 y 8 se trata a las células con el medio 2 (DM+I+H+LDN), el cual contiene IGF-1 y HGF, factores que favorecen la diferenciación de los progenitores neurales y musculares.

A partir del día 8, se puede tratar el cultivo o bien con medio 3 (DM+I+H+F), que contiene HGF y bFGF para favorecer la expansión de células progenitoras neurales y musculares; o bien con medio 4 (DM+I), para favorecer la proliferación celular.

Medio de cultivo	Componentes	Volumen
<b>Medio diferenciación basal</b>	Antibiótico/antimicótico 100X	5 mL
	NEAA	5 mL
	GlutaMAX	5 mL
	Suplemento N2	5 mL
	Suplemento B-27	10 mL
	Medio neurobasal	470 mL
<b>Medio 1</b> (DM+LDN+CHIR)	Medio diferenciación basal	10 mL
	ITS-A (100X)	100 µL
	LDN193189 (5 mM)	1 µL
	CHIR99021 (4,3 mM)	7,08 µL
	bFGF (100 µg/mL)	2 µL
<b>Medio 2</b> (DM+I+H+LDN)	Medio diferenciación basal	10 mL
	IGF-1 (100 µg/mL)	0,4 µL
	HGF (100 µg/mL)	1 µL
	LDN193189 (5 mM)	1 µL
	bFGF (100 µg/mL)	2 µL
	β-mercaptoetanol (55 mM)	16,91 µL
<b>Medio 3</b> (DM+I+H+F)	Medio diferenciación basal	10 mL
	IGF-1 (100 µg/mL)	0,4 µL
	HGF (100 µg/mL)	1 µL
	bFGF (100 µg/mL)	2 µL
	β-mercaptoetanol (55 mM)	16,91 µL
<b>Medio 4</b> (DM+I)	Medio diferenciación basal	10 mL
	IGF-1 (100 µg/mL)	0,4 µL
	β-mercaptoetanol (55 mM)	16,91 µL
<b>Medio 5</b> (DM+I+DAPT)	Medio diferenciación basal	10 mL
	IGF-1 (100 µg/mL)	0,4 µL
	β-mercaptoetanol (55 mM)	16,91 µL
	DAPT (10 MM)	10 µL

**Tabla 7.** Composición de los medios de cultivo empleados en los sucesivos pasos del protocolo de diferenciación de iFbCV a fibras musculares innervadas.

En el día 12, se sustituye el medio de ambas placas por el medio 5 (DM+I+DAPT), que contiene el inhibidor de  $\gamma$ -secretasa DAPT. Este factor regula negativamente la vía de señalización de Notch y así favorece la diferenciación de progenitores neurales a neuronas. Se trata el cultivo con DAPT durante 5 días, tras los cuales se retira y se pasa a mantener el cultivo con medio 4 (DM+I). Si se aprecia un retraso en la diferenciación muscular o muy poco enriquecimiento de fibras musculares, se pueden añadir HGF y bFGF al medio de mantenimiento durante 7 días adicionales. Por tanto, a partir del día 22 se tratan dos pocillos de la placa 3 con HGF y bFGF (además de IGF-1) para promover la diferenciación a fibras musculares, es decir, se mantienen con medio 3 (DM+I+H+F). Los otros 3 pocillos se mantienen con medio 4 (DM+I). En el día 26, se realiza lo mismo con la placa 4: mantener dos pocillos con medio 3 (DM+I+H+F) y mantener 3 pocillos con medio 4 (DM+I). En el día 30, se fijan las células de todos los pocillos para realizar ensayos de inmunocitoquímica.

Se aconseja congelar el cultivo en expansión entre los días 10 y 12. Para ello, se retira el medio del pocillo y se realiza un lavado con PBS. Se incuban las células con 0,5-1 L de acetosa previamente atemperada durante 3-5 minutos a 37°C. Se levantan las células pipeteando contra

los pocillos con 2 mL medio de diferenciación basal y se centrifuga la suspensión a 900 rpm durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y se resuspende el pellet en medio de diferenciación basal con DMSO al 10%. Finalmente, se reparte 1 mL de suspensión por cada criotubo y se almacenan en un Mr. Frosty a -80°C.

#### 4. 2. 4. 2. *Inmunocitoquímica*

En primer lugar, se realiza un lavado con PBS y, para fijar las células, se tratan con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras dos lavados con PBS, se permeabilizan las células con el detergente Triton-X-100 al 0,1% durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se realiza un bloqueo tratando a las células con BSA al 5% durante 30 minutos a temperatura ambiente, para evitar las uniones inespecíficas.

El anticuerpo primario se diluye a la concentración adecuada (Tabla 1) en PBS con Triton-X-100 al 0,1% y BSA al 1%. Se incuba al tiempo y temperatura adecuados. Se realizan dos lavados con Triton-X-100 al 0,1% y se incuba el anticuerpo secundario por 60 minutos en una dilución 1:1000 en PBS con 0,1% de Triton-X-100 y 0,1% BSA, protegido de la luz y a temperatura ambiente. Se realizan dos lavados con Tritón-X-100 y se incuba en una solución de PBS con DAPI (1:1000) para la tinción de núcleos.

En los diferentes pocillos, se han utilizado cuatro anticuerpos primarios (Tabla 1), dirigidos contra proteínas marcadoras de células musculares y neuronas:

- $\beta$ III-tubulina (TUBB3): una proteína que forma parte de los microtúbulos del citoesqueleto de las neuronas.
- Desmina (DES): una proteína de tipo filamento intermedio situada en la periferia de los discos Z de los sarcómeros en células musculares.
- Miogenina (MYOG): un factor de transcripción implicado en el ensamblaje de la maquinaria de transcripción en genes musculares durante la diferenciación del músculo esquelético.
- Miosina (MYO): proteína que se dispone formando los filamentos gruesos en el sarcómero de las células musculares.

Los anticuerpos secundarios empleados (Tabla 1) han sido:

- Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG y Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG, ambos marcados con un fluoróforo que emite fluorescencia de color verde.
- Alexa Fluor 594 anti-rabbit IgG y Alexa Fluor 594 anti-mouse IgG, ambos marcados con un fluoróforo que emite fluorescencia de color rojo.

## 5. RESULTADOS

### 5. 1. Generación de híbridos transmitocondriales a partir de iPSCs

#### 5. 1. 1. Depleción mitocondrial de iPSCs para generar células $\rho^0$

##### 5. 1. 1. 1. Tratamiento con BrEt y ddC para la depleción de mtDNA

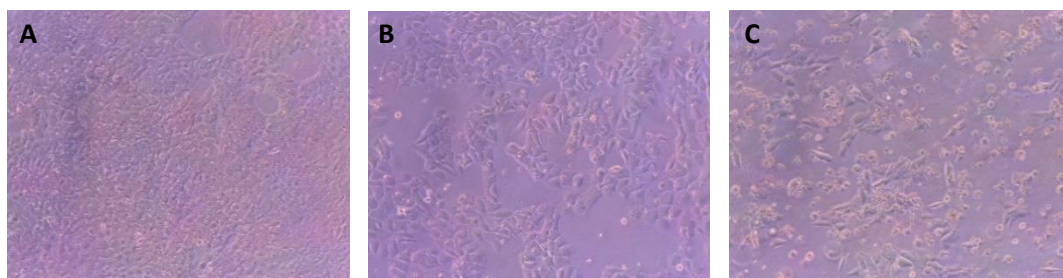
El bromuro de etidio (BrEt) como agente intercalante del DNA, empleado a concentraciones entre 0.1.-5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , se ha visto que tiene la capacidad de inhibir la replicación del mtDNA sin afectar demasiado el DNA nuclear en líneas celulares de ratón<sup>97</sup>. La dideoxicitidina (ddC) es un análogo de la deoxicitidina trifosfato (dCTP), que se incorpora a la hebra de DNA naciente e impide su elongación por la polimerasa. Se ha empleado como agente para generar células  $\rho^0$  (carentes de mtDNA) a partir de fibroblastos de ratón y células 143B humanas, viendo que además su eficacia aumentaba para reducir los niveles de mtDNA al combinarse con BrEt<sup>98</sup>.

Las células  $\rho^0$  son auxótrofas para piruvato y uridina, por lo que habrá que añadir estos compuestos al medio de cultivo de las células tratadas con BrEt y ddC. Al carecer de función respiratoria, las células  $\rho^0$  presentan una actividad reducida de la dihidroorotato deshidrogenasa, una enzima dependiente de la cadena respiratoria e implicada en la síntesis de pirimidinas. De ahí, la necesidad de suplementar el tratamiento de BrEt y ddC con uridina. Por otra parte, se ha visto que las células  $\rho^0$  dependen exclusivamente de la ruta glucolítica para la generación de energía y que, además, necesitan un aporte exógeno de piruvato para sobrevivir<sup>49</sup>. Una posible razón sería que el piruvato producido por la vía glucolítica es reducido a lactato por la lactato deshidrogenasa para oxidar el exceso de NADH citoplasmático producido durante la glucólisis. Así, la célula necesita un aporte de piruvato para poder ser importado a la mitocondria e intervenir en la síntesis de intermediarios del ciclo de Krebs. En nuestro caso, se han tratado células pluripotentes inducidas humanas con BrEt y ddC, a la vez que se les ha suplementado con piruvato y uridina para favorecer su supervivencia.

Las concentraciones de BrEt y ddC recomendadas para testar en el protocolo de Khozhukhar et al. son de 0,1-2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BrEt y 50-200  $\mu\text{M}$  de ddC<sup>92</sup>. Sin embargo, al realizar una prueba preliminar con 0,5 - 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de BrEt y 50 - 100  $\mu\text{M}$  de ddC, se ha visto que tras 24h, había una mayoría de células muertas en la condición de BrEt 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y colonias de iPSCs en proceso de diferenciación tras 48-72h en la condición de BrEt 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Por ello, se decidió reducir las concentraciones de BrEt para favorecer la supervivencia y crecimiento celular.

Para poder llevar a cabo el ensayo de depleción de mtDNA previo a la fusión celular, primero se ha realizado un ensayo para optimizar las concentraciones de BrEt y ddC, así como el tiempo de tratamiento. Se deben utilizar concentraciones que sean efectivas en reducir el número de copias de mtDNA pero que no comprometan demasiado ni la viabilidad, ni el estado de pluripotencia de las células iFbCV. Para ello, se han tratado células iFbCV con distintas concentraciones de BrEt y ddC y se ha analizado el número de copias de mtDNA por RT-q-PCR a diferentes tiempos. Se han testado dos tratamientos: BrEt 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y ddC 50  $\mu\text{M}$  en la placa 1, y BrEt 0,05  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y ddC 100  $\mu\text{M}$  en la placa 2; que se han prolongado durante un periodo de 96 y 120 horas respectivamente. En la figura 5 se muestran imágenes de las dos placas en el último día del tratamiento: a las 96h en la placa 1, a las 96h y 120h en la placa 2. Se aprecian menores densidades celulares en la condición de la placa 2 a las 96h respecto a la placa 1.

Además, presentan una morfología alterada, que se acentúa a las 120h con una forma hinchada e irregular, por lo que podrían estar en proceso de diferenciación



**Figura 5.** Tratamiento con BrEt y ddC para depleción de mtDNA en cultivos de iFbCV: **A)** BrEt 0,05 µg/mL y ddC 50 µM tras 96h de tratamiento; **B)** BrEt 0,05 µg/mL y ddC 100 µM tras 96h de tratamiento; **C)** BrEt 0,05 µg/mL y ddC 100 µM tras 120h de tratamiento. Imágenes tomadas al microscopio invertido con el objetivo de 10x.

#### 5. 1. 1. 2. Reducción en el número de copias de mtDNA

Se ha analizado el número de copias de mtDNA mediante RT-qPCR en las dos condiciones a tiempo cero, así como tras 15h, 24h, 48h, 72h, 96 h y, en el caso de la placa 2, tras 120h de tratamiento. En la Tabla 8 se muestra cómo, tras 96h de tratamiento, no se ha conseguido una depleción total del mtDNA, pero sí un descenso considerable.

Tiempo de tratamiento	Número de copias de mtDNA/célula	
	Placa 1 BrEt 0,05 µg/mL ddC 50 µM	Placa 2 BrEt 0,05 µg/mL ddC 100 µM
Tiempo cero (control)	195	
15h	133	132
24h	145	128
48h	77	93
72h	62	75
96h	49	41
120h	-	61

**Tabla 8.** Número de copias de mtDNA por célula durante el tratamiento de iFbCV con diferentes concentraciones de BrEt y ddC.

Aunque no haya habido una reducción completa de los niveles de mtDNA, hay que tener en cuenta que el número de copias de mtDNA en las células 2128 143B es aproximadamente seis veces superior al número de copias en células iFbCV. Por tanto, aunque estas últimas conserven parte de su contenido mitocondrial, al hacer la fusión, los clones resultantes portarían un número mucho más alto de copias de mtDNA de origen 2128 143B. Además, por el fenómeno de segregación mitótica, tras las sucesivas divisiones celulares, se obtendrían un número cada vez mayor de cíbridos homoplásmicos para el mtDNA de 2128 143B. Por tanto, aunque no se haya logrado una depleción completa del mtDNA en las células parentales iFbCV, se han reducido los niveles lo suficiente como para que su linaje mitocondrial se pierda en los cíbridos a favor del mtDNA de 2128 143B en las sucesivas generaciones de células hijas.

Después de analizar los resultados del número de copias de mtDNA y las imágenes adquiridas al microscopio invertido de los cultivos, se ha optado por descartar las condiciones de la placa 2

del ensayo (BrEt 0,05 µg/mL y ddC 100 µM), ya que a nivel de copias de mtDNA apenas se aprecia diferencia con las condiciones de la placa 1 (BrEt 0,05 µg/mL y ddC 50 µM). Además, las células de la placa 2 cambian su morfología, aparecen más hinchadas y se diferencian (Figura 5), por lo que se ha decidido utilizar la condición de BrEt 0,05 µg/mL y ddC 50 µM para realizar los posteriores ensayos de fusión celular.

### 5. 1. 2. Eficacia de la enucleación de 2128 143B

El agente empleado para enuclear las células 2128 143B es la Actinomicina D, un antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces antibioticus*, que actúa como un intercalante del DNA impidiendo el acceso de la maquinaria de replicación y transcripción celular a la doble hebra de DNA. Bayona, Bafaluy et al. (2003) desarrollaron un protocolo de enucleación química con Actinomicina D<sup>93</sup>, más eficaz que los métodos anteriores basados en un tratamiento con Citocalasina B y una posterior centrifugación para eliminar los núcleos mecánicamente<sup>49</sup>.

Suponiendo que la eficacia de la enucleación química no sea del 100%, tras el tratamiento con Actinomicina D quedarán tanto células 2128 143B enucleadas como células 2128 143B con núcleo funcional. Las células 2128 143B son timidin quinasa negativas (*tk-*) lo que quiere decir que carecen del gen codificante de la timidin quinasa, una enzima que es esencial para la vía de rescate de la síntesis de nucleótidos. El medio HAT (hipoxantina, aminopterina y timidina) contiene aminopterina, que inhibe la síntesis de DNA de novo; hipoxantina y timidina, que son los sustratos de la vía de rescate. De esta forma, las células en medio HAT dependerán exclusivamente de esta vía de rescate para la síntesis de nucleótidos, para la cual se necesita una timidin quinasa activa (células *tk+*). Si las células son *tk-*, como las 2128 143B, morirán en este medio. En cambio, si las células son *tk+*, como las iFbCV, sobrevivirán porque podrán sintetizar nucleótidos a través de la vía de rescate.

Las células 2128 143B que no hayan sido enucleadas tras el tratamiento con Actinomicina D serán capaces de sobrevivir en medio DMEM 10% FBS pero no en medio HAT. Por tanto, la diferencia entre viabilidad de ambos cultivos nos dará una idea de la eficacia de la enucleación con Actinomicina D. Por ello, se ha realizado un ensayo de enucleación de 2128 143B con Actinomicina D 0,5 µg/mL y se han mantenido las células posteriormente en medio DMEM 10% FBS y en medio HAT durante 7 días (168h).

<b>Actinomicina D</b> →	DMEM	HAT	DMEM
<b>Control</b> →	DMEM	HAT	-

**Figura 6.** Esquema de la placa de enucleación de células 2128 143B y su posterior tratamiento con medios HAT o DMEM para evaluar la eficacia de la enucleación. Cada cuadrado representa un pocillo de la placa de 6. En la fila superior aparecen los pocillos tratados con Actinomicina D 0,5 µg/mL durante 15h. La fila inferior hace referencia a los pocillos control, que no han sido tratados con Actinomicina D. Los pocillos resaltados en rosa se han mantenido en medio HAT.

La configuración de la placa de enucleación se muestra en la Figura 6. De los pocillos tratados con Actinomicina D, uno de ellos se deja crecer con medio HAT y los otros dos con medio DMEM. De los pocillos control (no tratados con Actinomicina D) uno de ellos se trata con medio HAT y el otro con medio DMEM 10% FBS. En todos los casos se dejan crecer con 2 mL de medio y realizando cambios diarios de medio. Se toman imágenes en el microscopio invertido cada 24h de todos los pocillos.

Se han comparado las imágenes tomadas con el microscopio durante el tratamiento con Actinomicina D (Figura 7A), así como del mantenimiento del cultivo en medio HAT y DMEM 10% FBS (Figura 7B). En la figura 7A, ya se observa cómo tras 15 h de tratamiento con Actinomicina D, las células 2128 143B reducen su tasa de división celular respecto a un control de células sin tratar. En la figura 7B, se observa cómo a las 48h del tratamiento con Actinomicina D se reduce la población celular respecto al inicio del tratamiento (Figura 7A), tanto en el cultivo mantenido en medio HAT como en el cultivo mantenido con medio DMEM 10% FBS, hasta que se observa una senescencia total del cultivo a las 120 h. Por tanto, tras el tratamiento con Actinomicina D se observa una disminución de la densidad celular porque no quedan células con capacidad de división celular, un indicio de que la enucleación química tiene una eficacia completa.

Además, se han tomado imágenes de inmunofluorescencia para observar los núcleos celulares del cultivo tras 15h de tratamiento con Actinomicina D respecto a un control sin tratamiento (Figura 8). En este caso, como anticuerpo primario se ha empleado un anticuerpo de ratón dirigido contra la  $\alpha$ -tubulina (proteína del citoesqueleto), con una dilución de 1:200 en PBS con Triton-X-100 al 0,1% y BSA al 1%. Se ha incubado toda la noche a 4°C en nevera (Tabla 1). Como anticuerpo secundario se ha utilizado el anticuerpo Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG con una dilución 1:1000, incubando durante 1h (Tabla 1).

En las imágenes de inmunofluorescencia del ensayo de enucleación (Figura 8) se pueden apreciar núcleos en proceso de división en el cultivo control de 2128 143B, como se espera que ocurra con una población celular en proliferación. En cambio, esto no se observa en los núcleos de las células tratadas con Actinomicina D, que incluso presentan una forma anómala. Los núcleos no desaparecen, ya que se trata de una enucleación química y no se elimina el núcleo mecánicamente mediante centrifugación como en otros protocolos<sup>49</sup>. La actinomicina D impide la división celular al actuar como un intercalante del DNA nuclear, por lo que las células enucleadas acabarán muriendo al no poder llevar a cabo la transcripción del genoma nuclear. En el cultivo tratado con Actinomicina D de la Figura 8 se observan núcleos grandes y amorfos (flecha 1), con gránulos de cromatina (flecha 2) en algunos núcleos. Además, se observan vacuolas (flecha 3) en el interior de las células, signo de estrés celular. En cambio, en el cultivo control se ven muchos núcleos en división, que aparecen como puntos azules más brillantes al presentar la cromatina condensada (flecha 4). Además, se pueden discernir núcleos en mitosis, concretamente al final de la metafase o comenzando la anafase, con los cromosomas separándose desde el plano ecuatorial (flecha 5).

Tras la fusión de los citoplastos de 2128 143B con las células iFbCV deplecionadas de mtDNA, se espera que los clones resultantes sean *tk+* y que por tanto, sean seleccionados positivamente en el medio HAT. También se espera que los citoplastos y las células 2128 143B con núcleo funcional que no se hayan fusionado mueran en medio HAT, unos a falta de un núcleo funcional y otras al carecer de una timidin quinasa activa, respectivamente. Por las características del protocolo de fusión en adherencia y suspensión, se espera que las únicas células iFbCV que hayan tenido la oportunidad de quedar adheridas sean aquellas que se hayan fusionado a los citoplastos. Gracias al núcleo *tk+* de las iFbCV, los clones resultantes sobrevivirían a la posterior selección con HAT.

Para garantizar la eficacia de la selección del medio HAT sobre las células parentales, tanto 2128 143B como iFbCV, se han mantenido ambos tipos celulares en medio suplementado con HAT y

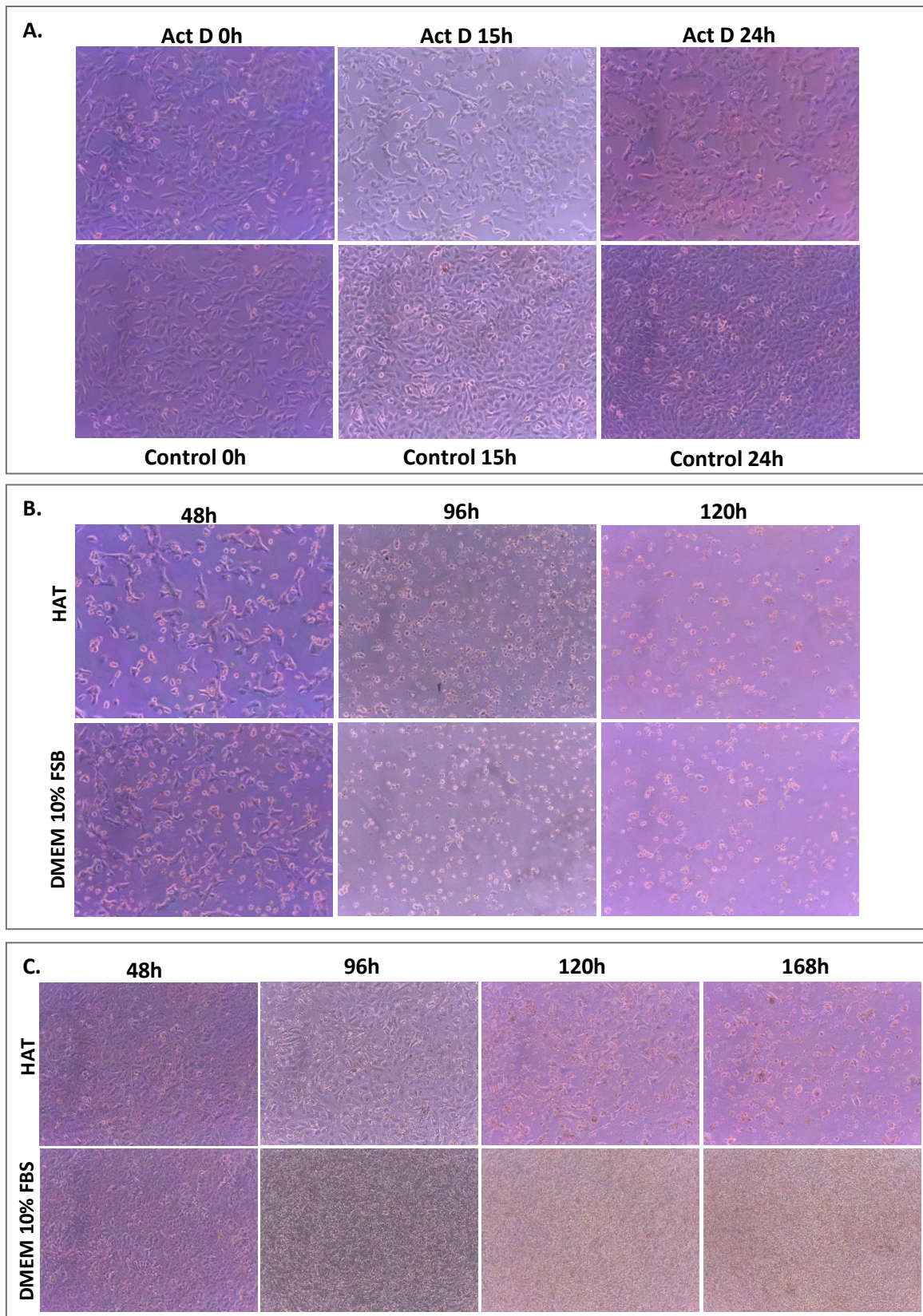
en sus respectivos medios controles. En la figura 7C se muestra la evolución de un cultivo de células 2128 143B en medio DMEM suplementado HAT y en medio DMEM 10% FBS hasta las 168h. Por otra parte, se han tratado células iFbCV con medio E8 suplementado con HAT y con medio Nutristem suplementado con HAT, para verificar que sobreviven en dicho medio de cultivo gracias a su condición de células timidin quinasa positivas. Se han sembrado  $1 \cdot 10^5$  células por pocillo en una placa de 6 pocillos y se han incubado 3 pocillos con medio Nutristem y otros 3 con medio E8. Tras 24h, se ha añadido el suplemento HAT de la misma forma que en el caso de las células 2128 143B y se han tomado imágenes al microscopio invertido de los pocillos cada 24h. En la Figura 9 se muestra la evolución de las células iFbCV hasta las 96h, mantenidas en medio suplementado con HAT, así como en medios Nutristem (9A) y E8 (9B) sin el suplemento.

Respecto a la eficacia de la selección con HAT, en la Figura 7C se aprecia cómo las células 2128 143B acaban muriendo en presencia de medio suplementado con HAT al cabo de 7 días (168h). Por tanto, tras realizar el ensayo de fusión celular, la selección de clones de híbridos se tendría que llevar a cabo mediante un tratamiento con medio HAT durante al menos 7 días. Además, en la Figura 9 se puede observar cómo las células iFbCV parentales crecen sin impedimentos tanto en presencia como en ausencia de HAT, en medio Nutristem (9A) y E8 (9B). También, se puede apreciar cómo a las 96h, las colonias en medio E8 adquieren una forma más redonda y compacta, con bordes regulares, respecto a las células en medio Nutristem. Esta característica morfológica es propia de las células pluripotentes, por lo que se ha optado por ensayar el protocolo de fusión celular en medio E8, intentando mantener la pluripotencia de la línea celular parental.

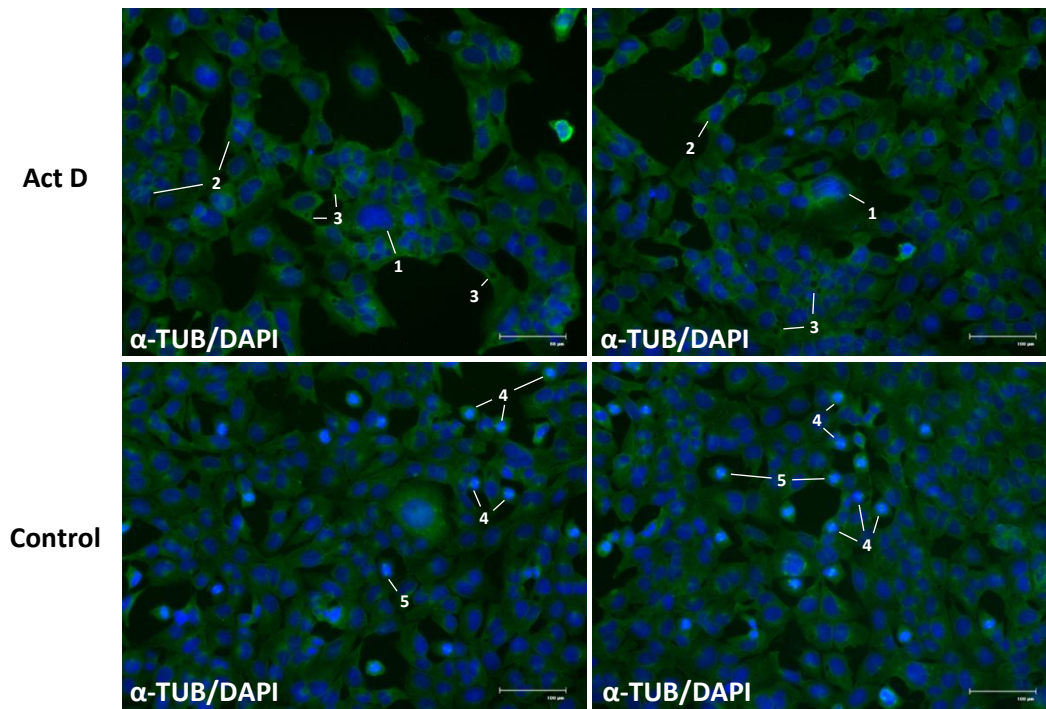
### 5. 1. 3. Fusión celular en adherencia y suspensión

Se han llevado a cabo tres protocolos distintos para realizar la fusión celular entre células iFbCV y citoplastos 2128 143B. En concreto, se han llevado a cabo dos protocolos de fusión con células adherentes y un protocolo de fusión con células en suspensión. En todos los casos, el agente empleado para fusionar las membranas celulares ha sido el polietilenglicol (PEG), un fusógeno celular comúnmente empleado para hibridar gran variedad de tipos celulares<sup>94, 95, 96</sup>.

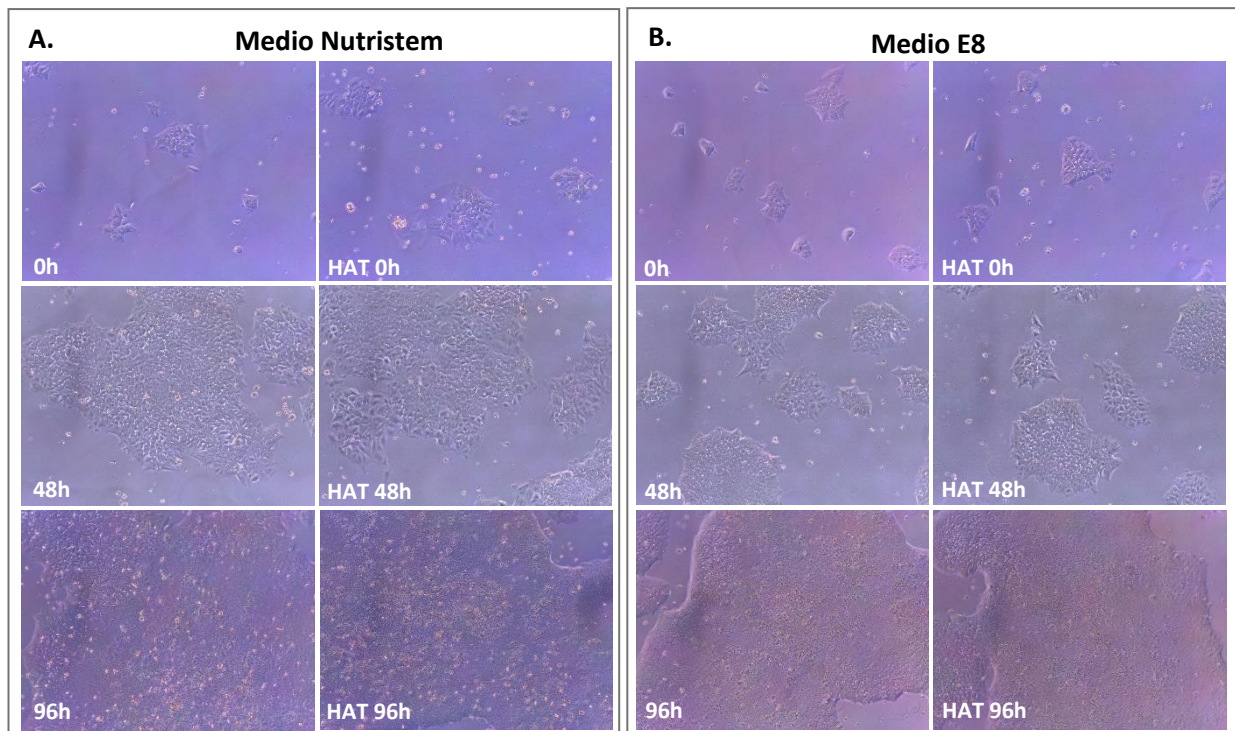
Antes de realizar los ensayos de fusión celular, se ha realizado un ensayo para evaluar qué concentración de PEG resulta óptima para realizar el protocolo de fusión con células adherentes, ya que se busca que el PEG no resulte tóxico para la línea celular iFbCV y sea lo más eficaz posible. Se ha evaluado la toxicidad del PEG en células iFbCV, tratando a estas con diferentes concentraciones de PEG: 0%, 30%, 40%, 45%, 50%. Se han sembrado 500.000 células individualizadas y, tras esperar un tiempo de 6h para dejar que las células se adhieran, se han sometido al protocolo de fusión con PEG en ausencia de citoplastos. Se han tomado imágenes al microscopio invertido de la evolución del cultivo tras el tratamiento con PEG, que se muestran en la Figura 10. Además, se ha mantenido la condición de cultivo tratada con PEG 50% un tiempo adicional, ya que hasta las 160h no se habían observado un tamaño de colonia considerable (Figura 11). Con una concentración de PEG 50%, la mayoría de células del cultivo mueren 19h después del tratamiento y sólo unas pocas células logran progresar en cultivo tras 88h (Figura 11). El resto de concentraciones de PEG testadas no resultan tan agresivas para las células; por ejemplo, para una concentración de 45% PEG a las 88h el cultivo ya ha alcanzado una confluencia mayor del 80%. Se optó por realizar los experimentos de fusión celular con una concentración de PEG del 40% y del 45%, viendo que estas condiciones eran aquellas más elevadas que a la vez preservaban la viabilidad celular del cultivo de iFbCV parentales.



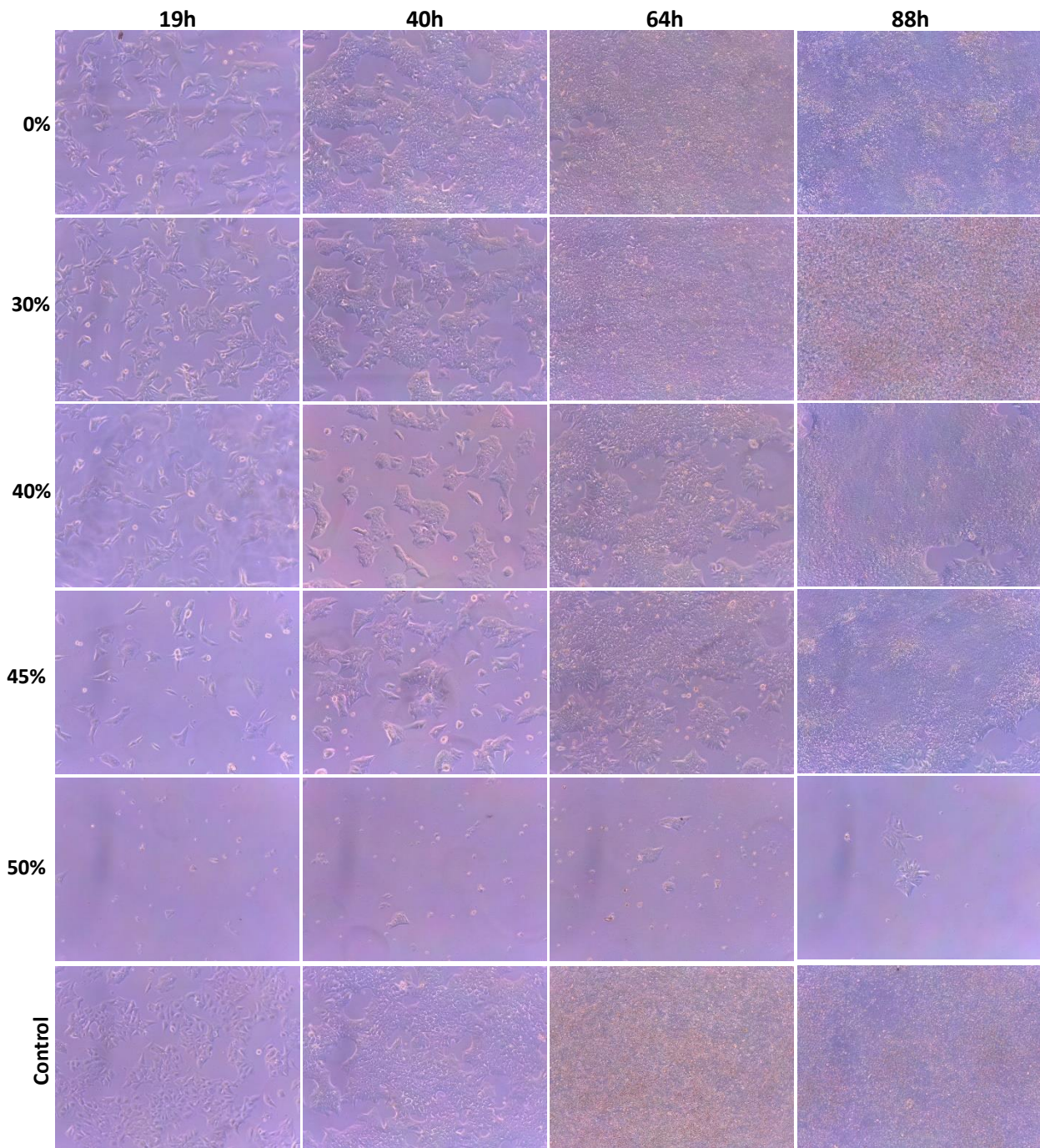
**Figura 7. A)** Tratamiento de células 2128 143B con Actinomicina D (Act D) 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 15h respecto a control sin tratar. **B)** Posterior tratamiento con medio HAT respecto a medio DMEM 10% FBS durante un periodo de 168h. **C)** Selección con medio HAT de células 2128 143B control sin tratar (fila superior) respecto a células 2128 143B control sin tratar en medio DMEM 10% FBS (fila inferior). Imágenes tomadas al microscopio con el objetivo de 10x.



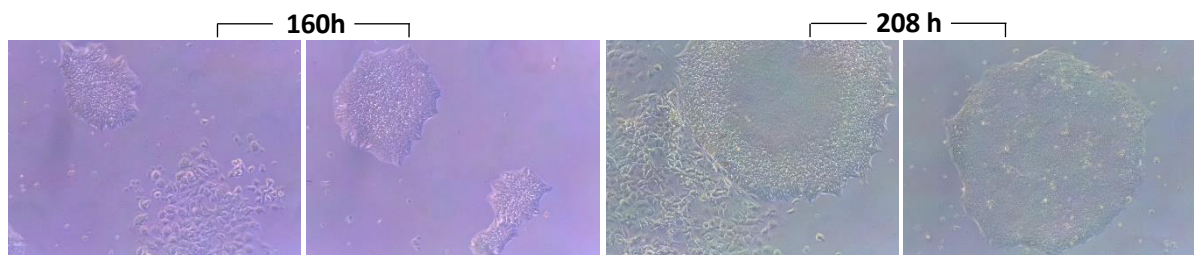
**Figura 8.** Inmunofluorescencia de células 2128 143B tratadas con Actinomicina D 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  durante 15h (fila superior) respecto a un control de células sin tratar (fila inferior). Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X.  $\alpha\text{-TUB}$ :  $\alpha$ -tubulina.



**Figura 9. A)** Mantenimiento de células iFbCV en medio Nutristem versus medio Nutristem suplementado con HAT. **B)** Mantenimiento de células iFbCV en medio E8 versus medio E8 suplementado con HAT. Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 10x.

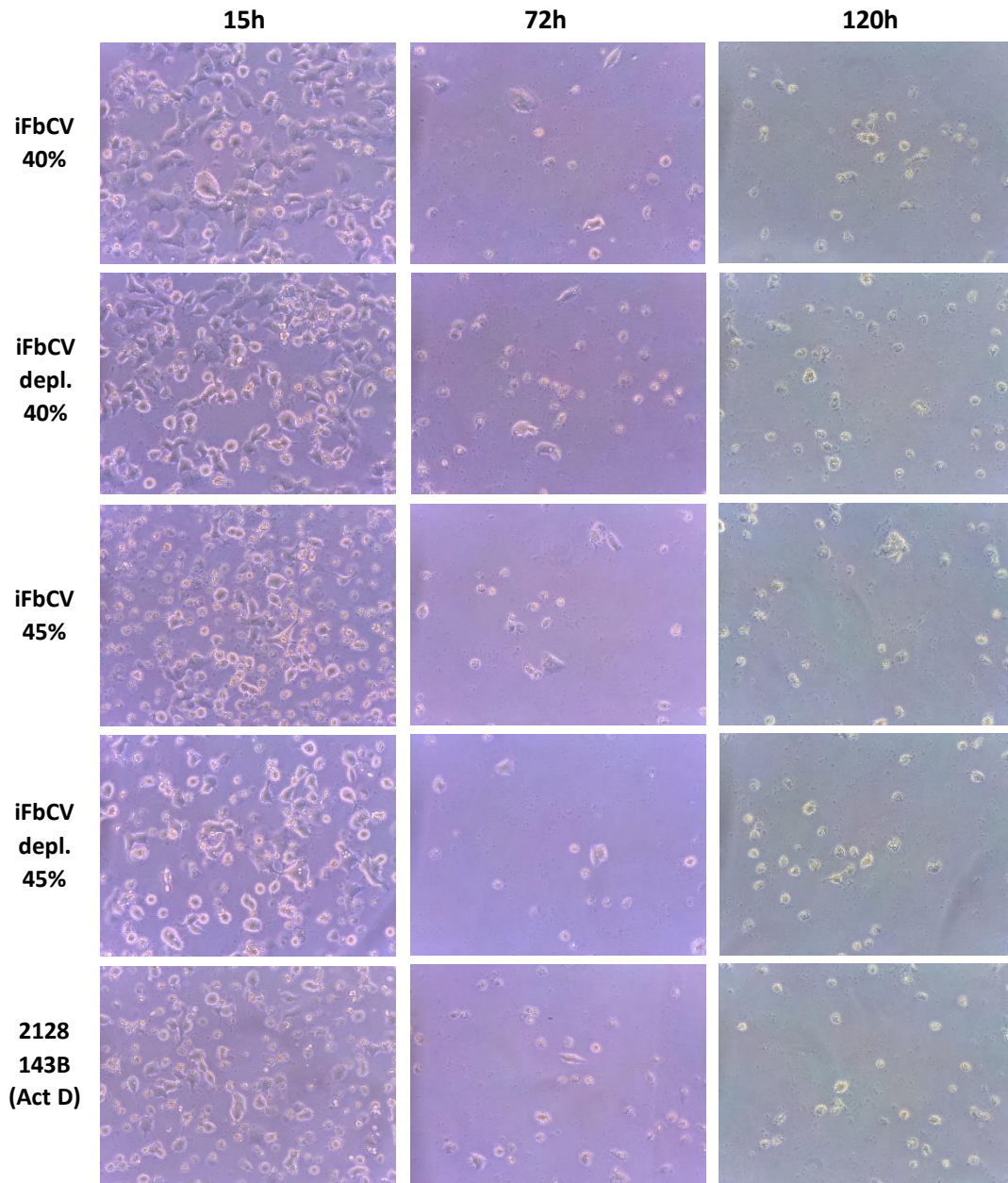


**Figura 10.** Fusión con PEG 0%, 30%, 40%, 45% y 50% sobre células iFbCV y la evolución del cultivo en medio E8 tras el tratamiento; junto a un control de iFbCV no sometido al protocolo de fusión. Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 10x.

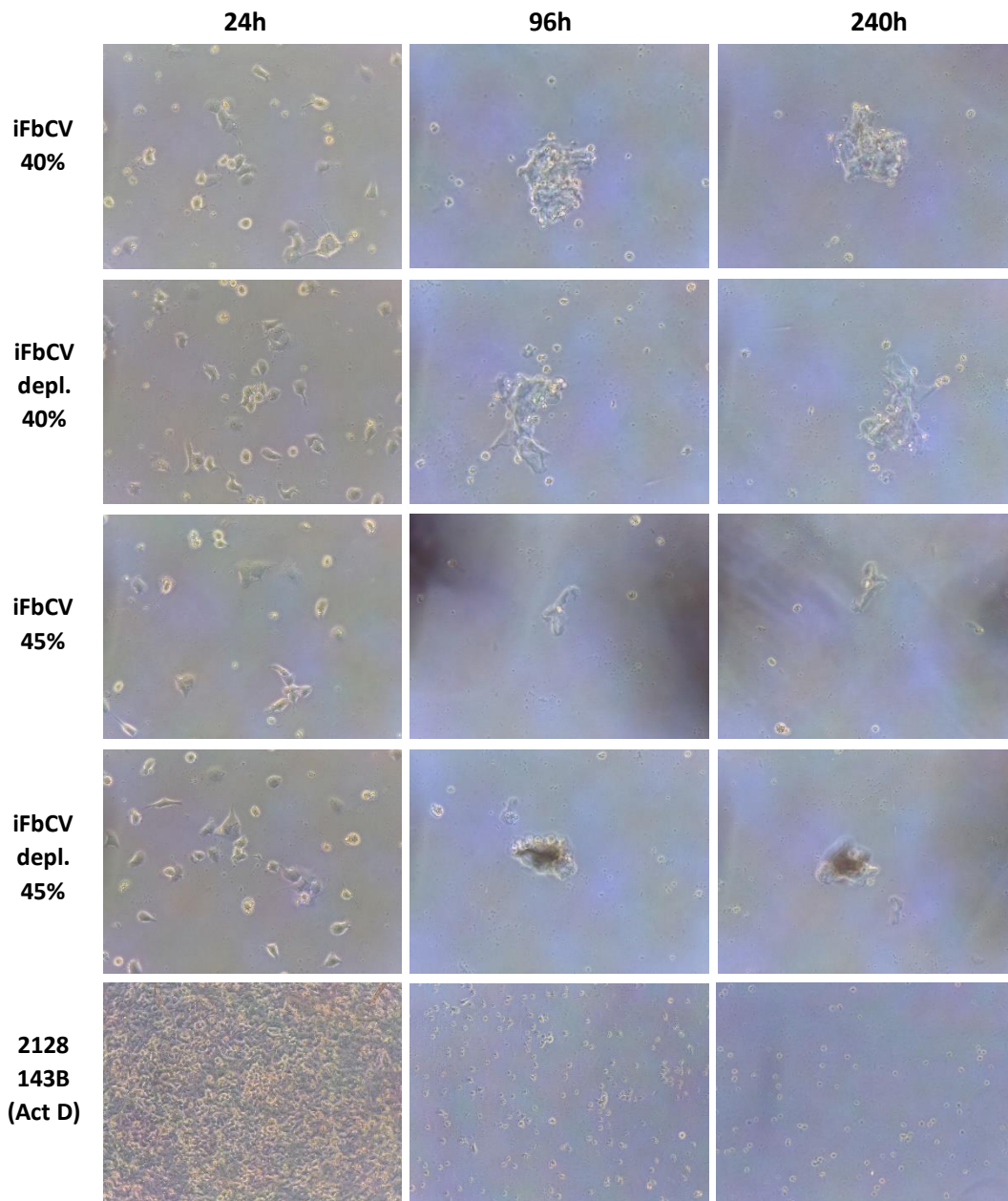


**Figura 11.** Evolución del cultivo de iFbCV en medio E8 tras el tratamiento con PEG 50%. Imágenes tomadas 160h y 208h después del tratamiento con PEG, en el microscopio con el objetivo 10x.

Los protocolos de fusión con células en adherencia y fusión con células en suspensión se describen en los apartados 4. 2. 2. 2. 2. y 4. 2. 2. 2. 3., respectivamente. Se ensayaron dos concentraciones de PEG (40% y 45%), utilizando para la fusión tanto células iFbCV deplecionadas de mtDNA como células iFbCV parentales control (sin deplecionar). En las figuras 12 y 13 se muestra como con ninguna condición se obtuvieron clones de células pluripotentes viables tras la fusión, incluso manteniendo los cultivos resultantes durante 11 días (264h).

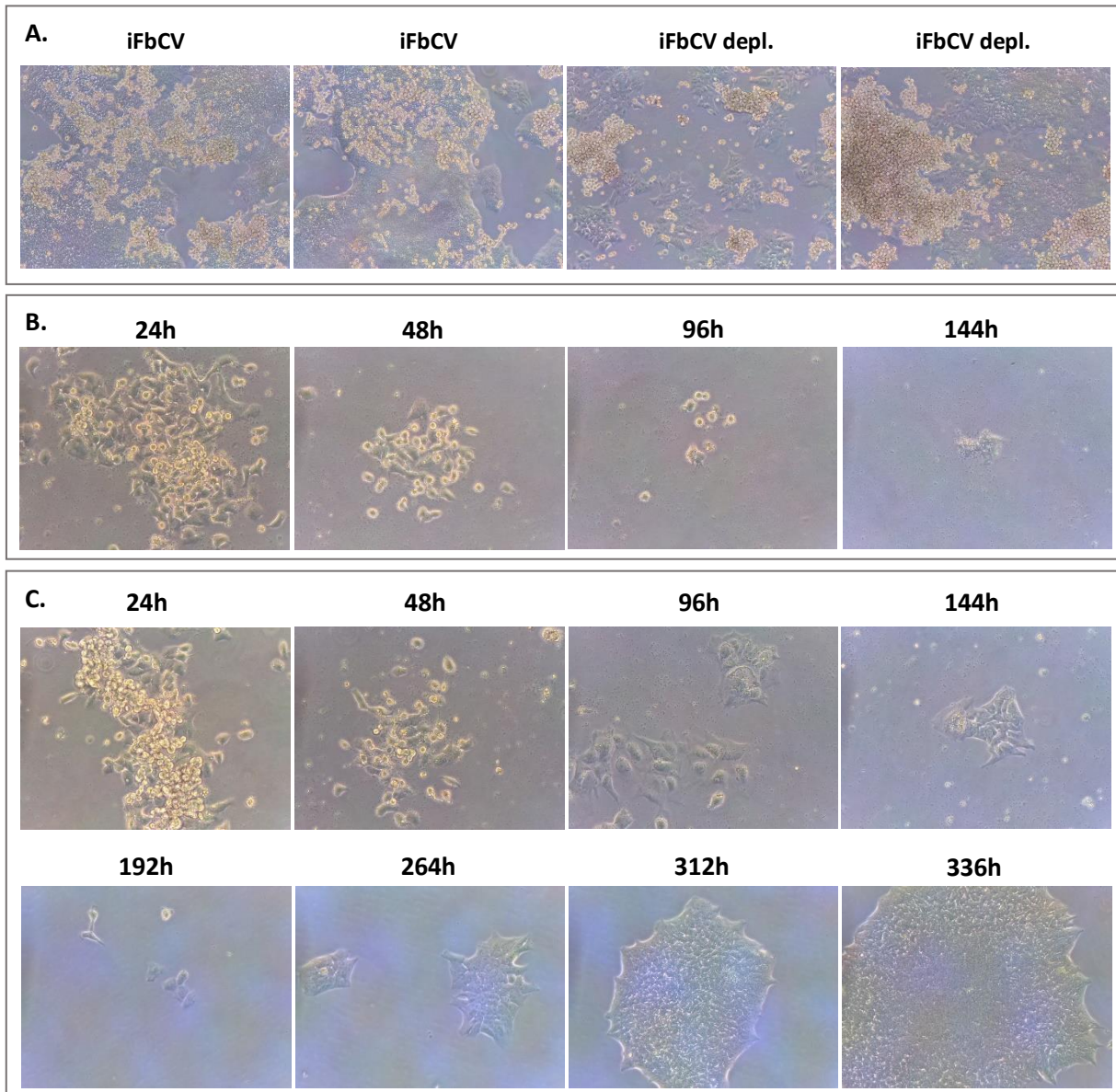


**Figura 12.** Evolución del cultivo tras la fusión celular en adherencia con PEG 40% y 45%, empleando células parentales iFbCV deplecionadas de mtDNA (iFbCV depl.) y células iFbCV control (sin deplecionar) añadidas sobre células 2128 143B enucleadas. En paralelo, se ha mantenido un control de células 2128 143B enucleadas con Actinomicina D. Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 20x.

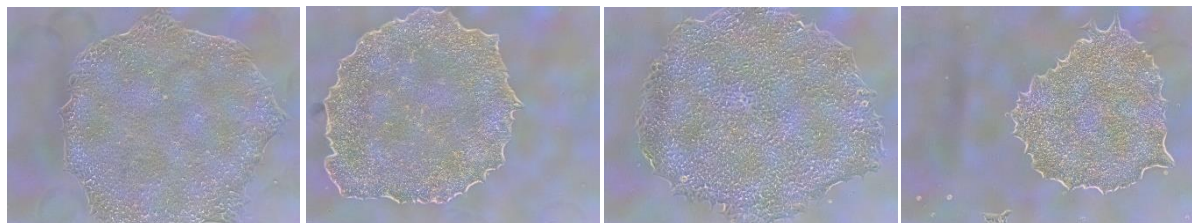


**Figura 13.** Evolución del cultivo tras la fusión celular en suspensión con PEG 40% y 45%, adicionando células parentales iFbCV deplecionadas de mtDNA (iFbCV depl.) o células iFbCV control (sin deplecionar) sobre un pellet de células 2128 143B enucleadas. En paralelo, se ha mantenido un control de células 2128 143B enucleadas con Actinomicina D. Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 20x (con el objetivo 10x para las células 2128 143B tratadas con Actinomicina D).

Dados estos resultados negativos, se planteó un nuevo protocolo de fusión, acuñado “fusión inversa”, descrito en el apartado 4. 2. 2. 2. En este protocolo se añadió una suspensión con citoplastos de 2128 143B sobre células iFbCV deplecionadas y sobre células iFbCV control. Tras centrifugar las células para posar los citoplastos sobre las células iFbCV, se realizó la fusión celular con una concentración de 45% PEG. En la figura 14A se muestran imágenes del cultivo tras la centrifugación de las células parentales, con los citoplastos adheridos sobre las células iFbCV justo antes de la fusión.



**Figura 14. A)** Imágenes de los citoplastos derivados de 2128 143B centrifugados sobre un cultivo de células parentales iFbCV deplecionadas (iFbCV depl.) y de células iFbCV control, configuración inmediatamente previa a la fusión inversa. **B)** Evolución de los cultivos derivados de células parentales iFbCV deplecionadas tras el protocolo de fusión inversa con PEG 45%. **C)** Evolución de los cultivos derivados de células iFbCV control tras el protocolo de fusión inversa con PEG 45%. Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 10x (A) y 20x (B y C).



**Figura 15.** Imágenes de algunos de los clones obtenidos 360h después de realizar la fusión inversa entre citoplastos derivados de 2128 143B y células iFbCV control. Imágenes tomadas en el microscopio invertido con el objetivo 10x.

Tras 24h del tratamiento con PEG 45% siguen apreciando estas formaciones, aunque ha disminuido el tamaño de las colonias de iFbCV parentales (Figura 14 B y C). Respecto a la evolución de los cultivos derivados de células parentales iFbCV deplecionadas (14B) y células iFbCV control (14C) tras la fusión, a las 144h se observa una muerte celular total para las células iFbCV deplecionadas. En cambio, el cultivo derivado de células iFbCV control sí que logra recuperarse tras la fusión y se aprecia un crecimiento de las colonias a partir de las 192h.

#### 5. 1. 4. Identificación de los clones seleccionados por PCR-RFLP

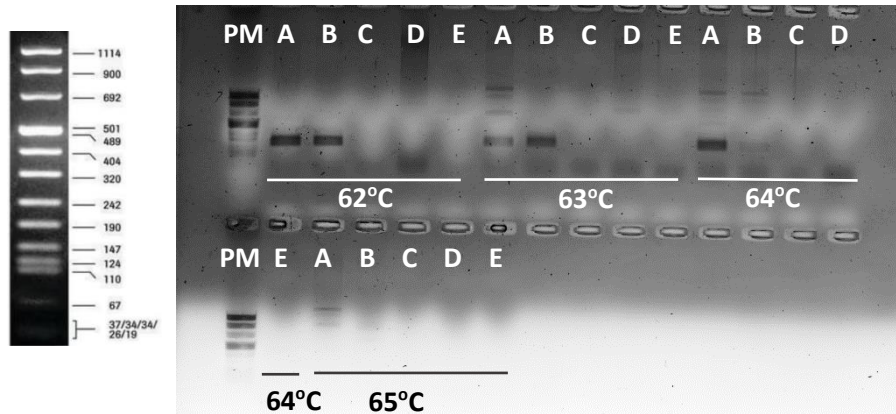
Los únicos clones que se han obtenido han sido a través del procedimiento de fusión inversa, en el cual se adicionan los citoplastos enucleados sobre las células iFbCV ya adheridas en el fondo del pocillo (Figura 15). En este caso, las colonias obtenidas no se pueden aislar mediante la selección con medio HAT, ya que las células iFbCV parentales son *tk+* y sobreviven en dicho medio al igual que los potenciales híbridos. Por tanto, no se ha empleado la selección con HAT, sino que se han fragmentado y aislado 20 colonias de forma manual y se ha analizado individualmente su contenido de mtDNA. Se ha extraído el DNA de cada clon, se han amplificado regiones específicas del mtDNA por PCR y se han analizado los patrones de bandas resultantes de dos digestiones enzimáticas mediante la técnica de RFLP.

Se han identificado los mtDNA procedentes de células iFbCV y de células 2128 143B a través de los polimorfismos que los diferencian, ya que ambas células parentales presentan el mismo haplogrupo mitocondrial H, subtipo 1. Para identificar mutaciones puntuales que actúen como SNPs de cada uno de los genomas, se han alineado los genomas mitocondriales de ambas líneas celulares (previamente secuenciadas por el grupo de investigación de Biogénesis y Patología Mitocondrial), respecto al genoma mitocondrial de referencia anotado (extraído de [MITOMAP](#) con código GenBank [NC\\_012920](#)). Después, se han analizado dichos SNPs y sus secuencias colindantes con la base de datos [REBSites](#) para encontrar enzimas de restricción capaces de cortar diferencialmente esas secuencias. Así, se han escogido las siguientes mutaciones puntuales en las cuales se va a basar el ensayo de RFLP: m.12771G>A, m.16129A>G; tomando la secuencia de la células iFbCV como referencia y la de 2128 143B como la secuencia mutada.

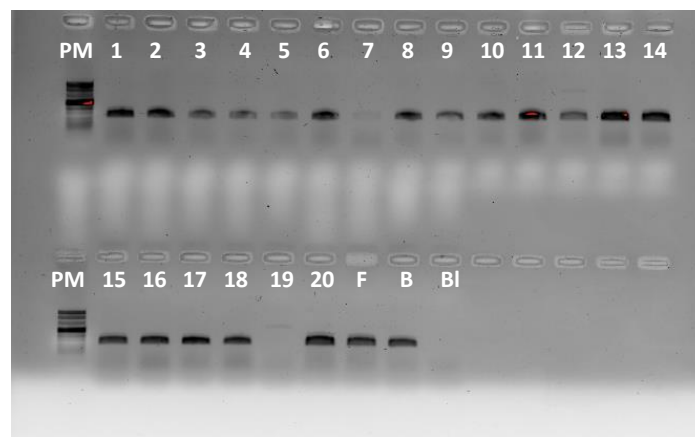
Para amplificar la región del SNP m.12771G>A, primero se ha realizado un ensayo de PCR con un barrido de temperaturas de hibridación (62°C, 63°C, 64°C y 65°C), para escoger aquella que resulte óptima para la hibridación de los *primers*. En la Figura 16 se muestran las bandas de los fragmentos amplificados procedentes de 4 muestras control: DNA de células iFbCV, DNA de células 2110 (célula con mtDNA de 2128 143B), DNA de células 3686 (célula con mtDNA de iFbCV), DNA de células  $\rho^0$  (carentes de mtDNA); y un blanco de agua estéril. De las cuatro condiciones, se ha escogido una temperatura de hibridación de 62°C, ya que se puede observar la banda de tamaño 262 bp correspondiente a la región que se desea amplificar y, a diferencia del resto de muestras, no se ven bandas inespecíficas en los carriles de las muestras de iFbCV o 2110, y tampoco se aprecian bandas correspondientes a pseudogenes mitocondriales en los carriles de células  $\rho^0$  (Figura 16).

A continuación, se ha amplificado la región que contiene el polimorfismo m.12771G>A, utilizando una temperatura de hibridación de 62°C, para las 20 muestras de DNA procedentes de los clones aislados. Los productos de PCR se han separado en un gel de agarosa del 1% para verificar la presencia de la banda correspondiente a dicha región, con un tamaño de 262 bp; así como la ausencia de bandas en el blanco para descartar contaminación (Figura 17). Después, se ha realizado la digestión de los productos amplificados con *MnII* y los fragmentos resultantes se

han separado en un gel de agarosa al 2% (Figura 18). En aproximadamente 10-11 clones se observan dos bandas tras la digestión: una de 143 bp, correspondiente al mtDNA digerido por la enzima (mtDNA de iFbCV); y otra banda de 262 bp, correspondiente a mtDNA sin digerir. Esta última banda podría ser producto o bien de una digestión incompleta del mtDNA de iFbCV, o bien podría tratarse de mtDNA de 2128 143B. Para discernir si se trata de mtDNA iFbCV o si hay una mezcla de mtDNA de ambas células parentales, se ha realizado una digestión paralela con *NlaIV*, que corta específicamente el polimorfismo del mtDNA de 2128 143B en m.12771G>A.

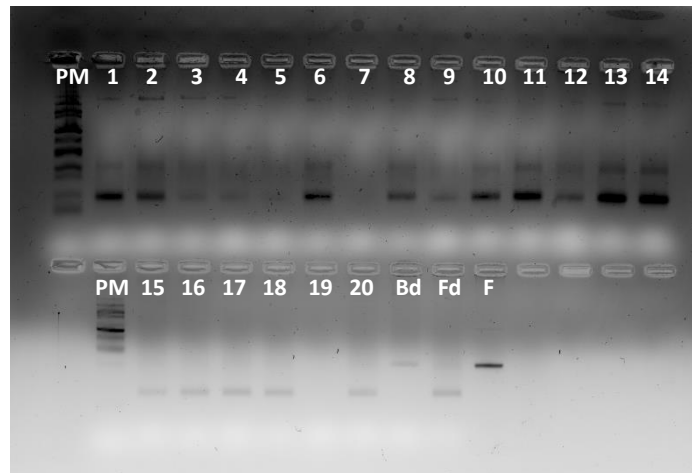


**Figura 16.** Amplificado de PCR en gel de agarosa 1% del ensayo de PCR con barrido de temperaturas de hibridación (62°C, 63°C, 64°C y 65°C). Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb), A: muestra de células iFbCV, B: muestra de células 2110, C: muestra de células 3686, D: muestra de células  $\rho^0$ , E: blanco. A la izquierda imagen del patrón de bandas del marcador de pesos molecular (1 kb).



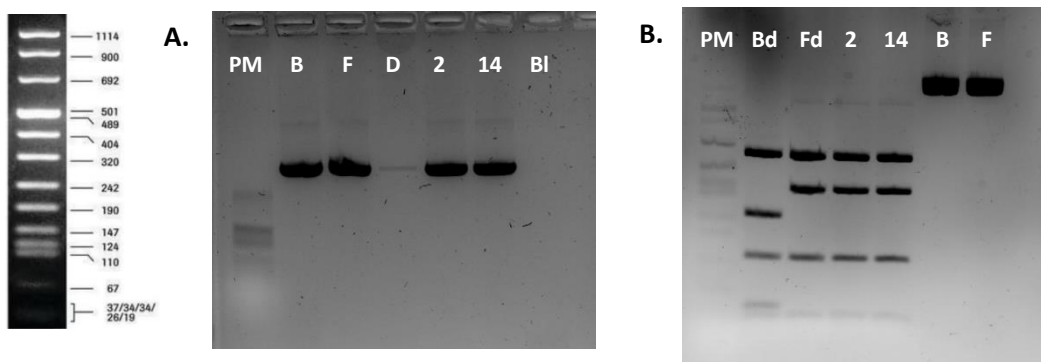
**Figura 17.** Amplificado de PCR en gel de agarosa 1% de la región m.12771G>A para las 20 colonias aisladas de la fusión. Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb), seguido de los 20 clones. F: muestra control iFbCV; B: muestra control 2128 143B; BI: blanco.

Se ha amplificado también la región que contiene el polimorfismo m.16129A>G para obtener amplicones de un tamaño de 1130 bp y posteriormente digerirlos con la enzima *NlaIV*, que realiza un corte en la guanina de la posición 16129 en el genoma mitocondrial de 2128 143B. Primero, se ha testado una temperatura de hibridación de *primers* de 65°C para realizar la PCR con los controles de muestras iFbCV y 2128 143B, células  $\rho^0$  y 2 clones obtenidos tra la fusión; y así comprobar si es una temperatura adecuada para llevar a cabo el ensayo en el resto de clones.



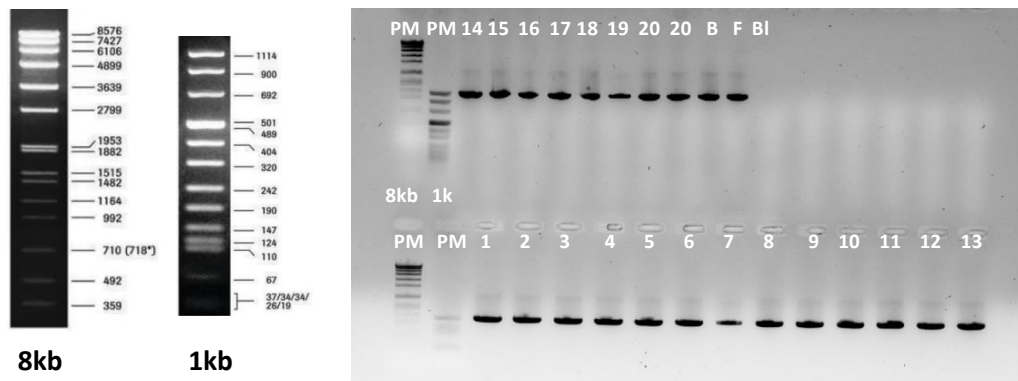
**Figura 18.** Digestión de amplicones m.12771G>A con *MnlI* para las 20 colonias aisladas de la fusión, en gel de agarosa 2%. Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb), seguido de los 20 clones. Bd: muestra control 2128 143B digerida; Fd: muestra control iFbCV digerida; F: muestra control iFbCV no tratada con digestión enzimática.

Primero, se ha testado una temperatura de hibridación de *primers* de 65°C para realizar la PCR con los controles de muestras iFbCV y 2128 143B, células  $\rho^0$  y 2 clones obtenidos tra la fusión; y así comprobar si es una temperatura adecuada para llevar a cabo el ensayo en el resto de clones. En la figura 19A se muestran los productos de PCR separados en un gel de agarosa al 1% y se aprecian las bandas de 1130 bp correspondientes a la región de m.16129A>G, tanto en los controles como los clones. Se observa también la ausencia de bandas en el blanco para descartar contaminación. En el carril de células  $\rho^0$ , carentes de mtDNA, se observa una banda de 1130 bp muy tenue en comparación con las bandas del resto de carriles. Por tanto, se ha optado por escoger 65°C como temperatura de hibridación de los *primers* para la amplificación del polimorfismo m.16129A>G. Después, se ha procedido a realizar la digestión de los amplicones con *NlaIV* y los fragmentos resultantes se han separado en un gel de agarosa al 2% (Figura 19B).

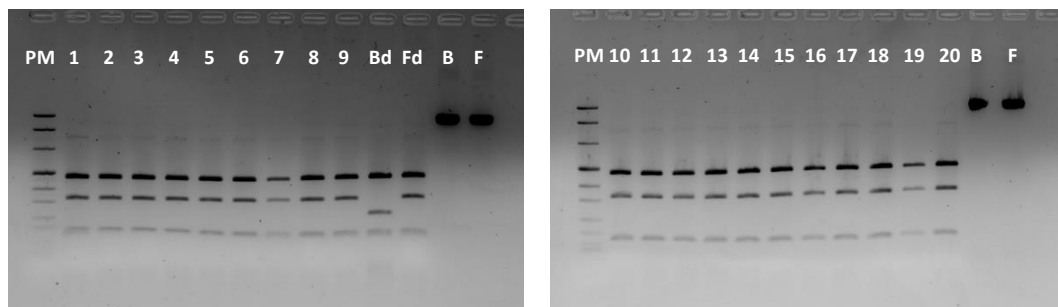


**Figura 19.** A) Amplificado de PCR en gel de agarosa 1% de la región m.16129A>G tras testar una temperatura de hibridación de *primers* de 65°C. Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb); B: muestra control 2128 143B; F: muestra control iFbCV; D: muestra de células  $\rho^0$ , 2 y 14: dos clones obtenidos tras la fusión; BI: blanco. B) Digestión de amplicones A16129G en gel de agarosa 2% con la enzima *NlaIV*. Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb); Bd: muestra control 2128 143B digerida; Fd: muestra control iFbCV digerida; 2 y 14: dos clones obtenidos tras la fusión; B: muestra control 2128 143B no tratada con digestión enzimática; F: muestra control iFbCV no tratada con digestión enzimática. A la izquierda se muestra la imagen del patrón de bandas del marcador de pesos molecular (1 kb).

Finalmente, se realizó la PCR con 65°C de temperatura de hibridación de *primers* para amplificar la región que contiene el polimorfismo m.16129A>G en los 20 clones obtenidos tras la fusión (Figura 20); y, posteriormente, se ha realizado la digestión de los productos con *NlaIV*.



**Figura 20.** Amplificado de PCR en gel de agarosa 1% de la región m.16129A>G para las 20 colonias aisladas de la fusión. Siendo PM: Marcador de peso molecular (8kb y 1 kb), seguido de los 20 clones. B: muestra control 2128 143B; F: muestra control iFbCV; BI: blanco. A la izquierda se muestran las imágenes del patrón de bandas de los marcadores de pesos moleculares 8kb y 1 kb, respectivamente.



**Figura 21.** Digestión de amplicones m.16129A>G con *NlaIV* para las 20 colonias aisladas de la fusión, en gel de agarosa 2%. Siendo PM: Marcador de peso molecular (1 kb), seguido de los 20 clones; Bd: muestra control 2128 143B digerida; Fd: muestra control iFbCV digerida; B: muestra control 2128 143B no tratada con digestión enzimática; F: muestra control iFbCV no tratada con digestión enzimática.

La figura 21, donde se muestra la digestión del mtDNA de los clones con *NlaIV*, nos permite confirmar que el patrón de bandas de los 20 clones es idéntico al patrón de bandas del mtDNA de la muestra iFbCV control. En ninguno de los clones se aprecia una banda de un tamaño de 260 bp, propia del mtDNA de las células 2128 143B, por lo que se verifica así que los clones obtenidos tras la fusión inversa con PEG 45% presentan únicamente mtDNA de células iFbCV parentales y no han incorporado el mtDNA de 2128 143B.

## 5. 2. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares innervadas

El protocolo de diferenciación de la línea de células pluripotentes inducidas iFbCV a fibras musculares y neuronas se basa en la adición secuencial de determinados factores al medio de cultivo en el que se mantienen las células. En la figura 22, se muestran las imágenes del cultivo a lo largo del protocolo de diferenciación, hasta el día 29. En el día 30 se han fijado las células para realizar ensayos de inmunocitoquímica y detectar por inmunofluorescencia determinados marcadores de células musculares y neuronas (Figura 23).

A partir del día 8, se ha tratado el cultivo con dos condiciones diferentes. Por un lado, la placa 4 se ha mantenido 4 días con medio 4 (DM+I), para favorecer la proliferación celular y, por otro,

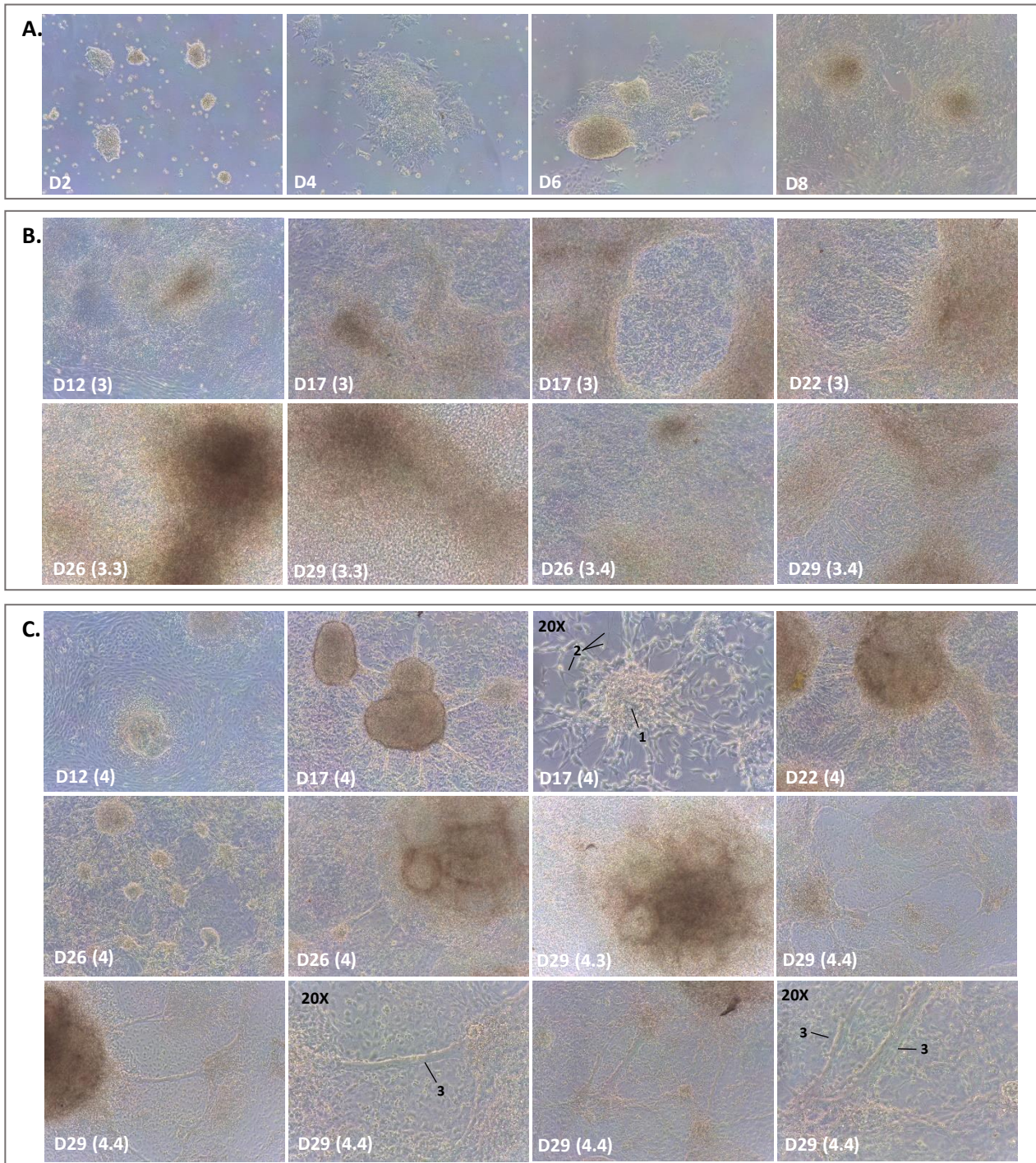
la placa 3 se ha mantenido 4 días con medio 3 (DM+I+H+F). En el día 12 no se aprecian grandes diferencias en el aspecto de los cultivos. Sin embargo, al añadir el DAPT al medio, que favorece la diferenciación de progenitores neurales a neuronas, y tras 5 días de tratamiento, en el día 17 ya se pueden observar diferencias en la composición del cultivo. En la Figura 22C se muestra como el cultivo tratado con medio 4 presenta gran cantidad de neuronas en el día 17 del protocolo en comparación con el cultivo tratado con medio 3, en el cual se ven abundantes grumos de células, cuya forma no se logra distinguir. En concreto, en la Figura 22C se muestra una imagen a 200X aumentos donde se señalan células progenitoras neurales (1) que se están diferenciando a neuronas (2).

Dado que en el día 22 no se apreciaba una abundancia de fibras musculares se ha optado por añadir HFG y bFGF al medio de mantenimiento en la placa 3 (Figura 22B). En el día 26, se realiza lo mismo con la placa 4 (Figura 22C). En la figura 22B, para las células tratadas con medio 3 a partir del día 22 (3.3), aparecen gran cantidad de células agrupándose unas encima de otras dando lugar a grumos amorfos tanto en los días 26 como 29. Para las células tratadas con medio 4 a partir del día 22 (3.4) no se observa tal expansión de células en los días 26 y 29.

Por otra parte, en la figura 22C donde se muestra la evolución del cultivo de la placa 4, se ve cómo las células tratadas con medio 3 a partir del día 26 (4.3) también se expanden como ocurre con los cultivos en la condición 3.3. En cambio, el cultivo tratado con medio 4 a partir del día 26 (4.4), presenta una densidad celular menor en el día 29 y se logran distinguir unas estructuras que podrían ser células musculares agrupándose de manera ordenada para formar un miotubo. Dichas estructuras aparecen señaladas (3) en las imágenes a 200X aumentos de la figura 22C.

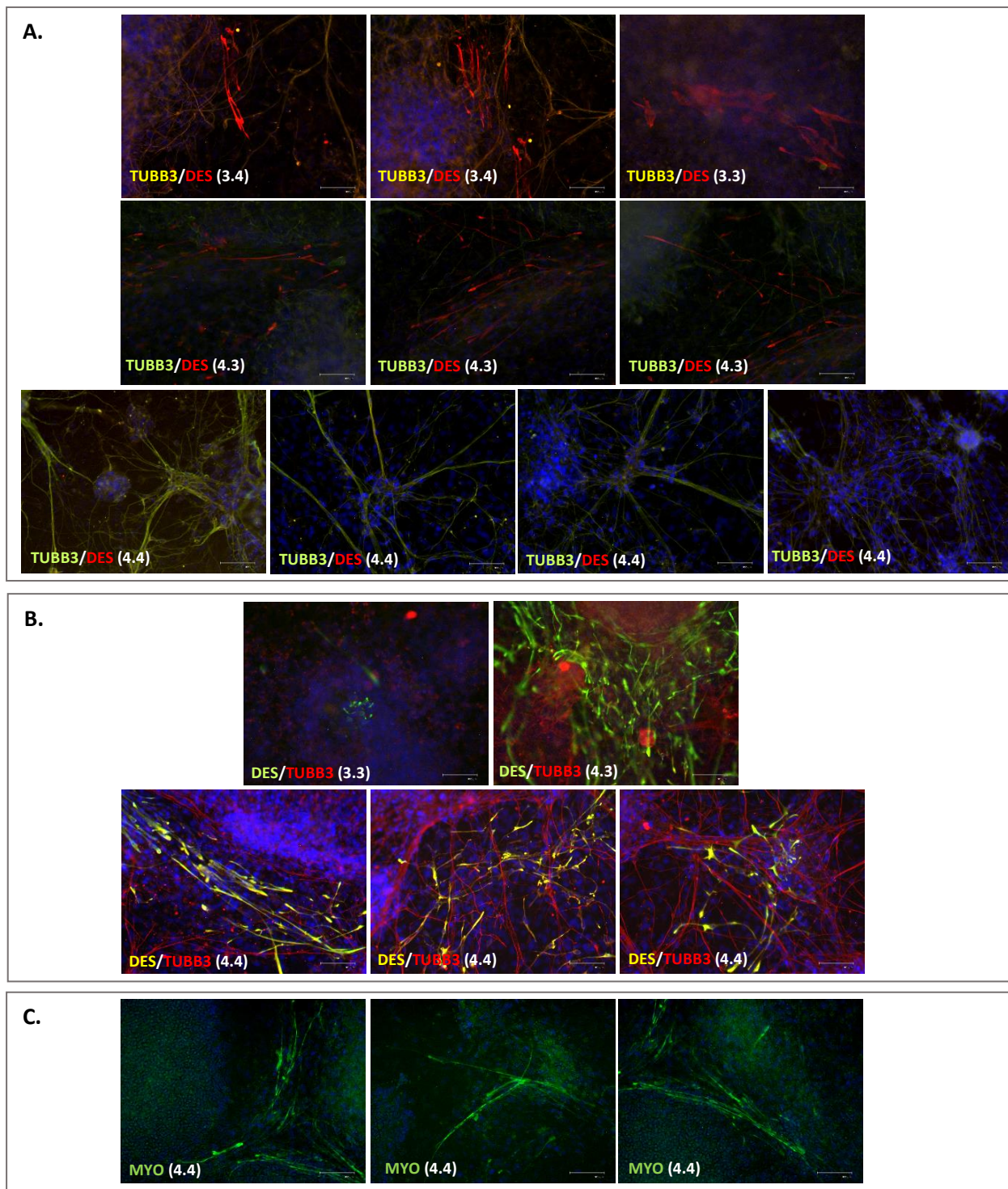
Para los ensayos de inmunofluorescencia, se han realizado tinciones dobles, utilizando un segundo anticuerpo primario con su respectivo anticuerpo secundario sobre pocillos que ya se habían marcado. Se han detectado proteínas específicas de las células musculares (desmina - DES, miosina - MYO) y proteínas de los axones de las neuronas ( $\beta$ III-tubulina - TUBB3). Los anticuerpos primarios anti-TUBB3 y anti-DES son ambos de conejo. Los anticuerpos secundarios Alexa Fluor 488 (fluoróforo verde) y Alexa Fluor 594 (fluoróforo rojo) están ambos dirigidos contra anticuerpos de conejo. Por tanto, al marcar primero TUBB3 con un fluoróforo verde, en el segundo marcaje tras añadir el anticuerpo anti-DES y el anticuerpo secundario marcado con un fluoróforo rojo, TUBB3 presentará inmunofluorescencia amarilla y DES únicamente fluorescencia roja (Figura 23A). En el caso contrario, si se marca primero DES con un fluoróforo verde y luego TUBB3 con fluorescencia roja, DES se detectará con fluorescencia amarilla y TUBB3 con fluorescencia roja (Figura 23B). A diferencia de la miosina (Figura 23 C), no se ha logrado detectar la miogenina (MYOG) con los anticuerpos utilizados. El anticuerpo secundario no era muy específico, ya que se observa una elevada señal de autofluorescencia en las células.

En los ensayos de inmunofluorescencia, la TUBB3 permite visualizar los axones de las neuronas de color amarillo-verdoso en la figura 23A y de color rojo en la figura 23B. En la condición de cultivo 4.4 de la figura 23A se observa un enriquecimiento de neuronas, que establecen sinapsis y forman redes en las tres dimensiones del espacio, resultado que concuerda con las visualizaciones del cultivo a partir del día 17. En cambio, hay ausencia del marcador desmina, por lo que las células musculares deben ser muy escasas en comparación con las células neurales. Sin embargo, al realizar el marcaje al revés, primero detectando DES (amarillo) y después TUBB3 (rojo), sí que se aprecian regiones con algunas células musculares, aunque escasamente organizadas para formar un miotubo (Figura 23B).



**Figura 22.** Evolución del cultivo de células iFbCV durante el protocolo de diferenciación. **A)** Células mantenidas en medio 1 (DM+LDN+CHIR) desde el día 2 al 6 y en medio 2 (DM+I+H+LDN) desde el día 6 al 8. **B)** Células mantenidas en medio 3 (DM+I+H+F) entre los días 8-12; entre los días 22-29 las células (3.3) se mantuvieron en medio 3 (DM+I+H+F) y las células (3.4) en medio 4 (DM+I). **C)** Células mantenidas en medio 4 (DM+I) entre los días 8-12; entre los días 26-29 las células (4.3) se mantuvieron en medio 3 (DM+I+H+F) y las células (4.4) en medio 4 (DM+I). Imágenes tomadas a diferentes tiempos en el microscopio invertido con el objetivo 10x (o 20x indicado según la imagen).

En la condición 4.3 de la Figura 23A, al sustituir el medio 4 por el medio 3, sí que se logran observar ciertas regiones del cultivo ricas en el marcador desmina (en rojo) y, por tanto, en células musculares. Esto también ocurre para las condiciones 3.3 y 3.4; aunque el mayor enriquecimiento se ve en la condición 4.3 de la figura 23B.



**Figura 23.** Inmunofluorescencia de los cultivos celulares en el día 30 del protocolo de diferenciación a fibras musculares inervadas. **A)** Marcaje de TUBB3 y DES para las condiciones 3.4, 3.3, 4.3, 4.4. **B)** Marcaje de DES y TUBB3 para las condiciones 3.3, 4.3 y 4.4. **C)** Marcaje de MYO para la condición 4.4. Todos los cultivos presentan los núcleos teñidos de azul con DAPI. TUBB3:  $\beta$ III-tubulina; DES: desmina; MYO: miosina. Imágenes de microscopía de fluorescencia, 200X.

Finalmente, en la Figura 23C se observa el marcaje de miosina para la condición 4.4, la única que se logró observar con nitidez. La miosina se dispone formando los filamentos gruesos en los sarcómeros de las células musculares, por lo que se pueden ver ciertas bandas de la célula sin teñir correspondientes a los discos Z carentes de miosina.

## 6. DISCUSIÓN

### 6. 1. Generación de cíbridos transmitocondriales a partir de iPSCs

#### 6. 1. 1. Depleción parcial del mtDNA en iPSCs

Como se muestra en la Tabla 8, sólo se ha logrado obtener una depleción parcial de los niveles de mtDNA. Si se hubiese conseguido una depleción total del mtDNA se podría haber aplicado directamente una selección eliminando el piruvato y uridina del medio para descartar las células iFbCV deplecionadas parentales tras realizar la fusión celular. Aun así, se ha considerado una reducción en el número de copias suficiente para que, tras realizar la fusión celular, el mtDNA de origen 2128 143B se imponga en las generaciones de células hijas de los potenciales cíbridos.

No se ha planteado la opción de aumentar la concentración de BrEt, ya que este podría actuar como un agente mutagénico, generando anomalías en el genoma nuclear que se desea evitar. Sí que sería interesante recoger pellets celulares a partir del día 4 del tratamiento (96h) con BrEt 0,05 µg/mL y ddC 50 µM, para ver se consigue reducir más los niveles de mtDNA y cómo afecta esto a la viabilidad del cultivo. Aunque, dadas las imágenes tomadas a las 120h del tratamiento con BrEt 0,05 µg/mL y ddC 100 µM, donde se aprecia abundante muerte celular y una morfología alterada de las iPSCs, se podría suponer que el tratamiento resultaría demasiado agresivo para las células. La cuantificación del número de copias de mtDNA se podría complementar con un análisis transcriptómico para evaluar la presencia de mRNAs asociados a la pluripotencia. Esto nos podría indicar si las células siguen manteniendo su pluripotencia a pesar de presentar una morfología alterada, no propia de células pluripotentes.

#### 6. 1. 2. Eficacia de enucleación y selección con medio HAT

Las células que mantienen un núcleo funcional tras el proceso de enucleación, debido a una eficacia incompleta del tratamiento, se espera que no sobrevivan al mantenimiento en medio de cultivo HAT. En la figura 7 se muestra cómo tras las 15h de tratamiento con Actinomicina D 0,5 µg/mL, las células mueren tanto en medio DMEM 10% FBS como en medio suplementado con HAT durante un periodo inferior a 7 días. Por tanto, podemos decir que la enucleación de células 2128 143B ha sido eficaz. Además, en las imágenes de inmunofluorescencia no se observan núcleos en proceso de división en las células enucleadas, a diferencia del control de células no tratadas con Actinomicina D (Figura 8).

La selección con HAT también resulta eficaz para eliminar las células 2128 143B parentales al cabo de 7 días (Figura 7C) y mantener viables las células iFbCV gracias a su núcleo *tk+* (Figura 9).

#### 6. 1. 3. Fusión celular en adherencia y suspensión

Para hallar un compromiso entre la eficacia y la toxicidad del PEG, se ha optado por emplear las concentraciones de 40% y 45% en las fusiones posteriores, viendo que eran las concentraciones más elevadas para las cuales se consigue preservar la viabilidad del cultivo de iFbCV parentales (Figura 10).

En las figuras 12 y 13 se muestran los resultados de la fusión en adherencia y la fusión en suspensión, respectivamente. En ambos ensayos se emplearon tanto células iFbCV parentales deplecionadas de mtDNA, como células iFbCV control; así como concentraciones de PEG de 40% y 45%. En ninguna de las condiciones de la fusión en adherencia se obtuvieron células viables tras 72h de mantenimiento del cultivo (figura 12). Respecto a la fusión en suspensión, tampoco

se han obtenido células viables proliferativas. En la figura 13, a las 96h se pueden observar formaciones que, en un principio, podrían parecer fragmentos de colonias de células, pero tras seguir su evolución en el tiempo (96h-240h), no se apreciaba crecimiento alguno. Por tanto, podría tratarse de células parentales, fusionadas o no, que se han diferenciado y han perdido la capacidad de división.

Se ha planteado que el problema podría radicar en la falta de adherencia de los citoplastos o de los potenciales híbridos después del tratamiento con PEG, y por ello, se decidió modificar el método de fusión en adherencia por el método de fusión inversa, en el cual se añaden los citoplastos sobre las colonias de iPSCs ya adheridas previamente a la superficie de cultivo. En la figura 14A se pueden ver los citoplastos derivados de 2128 143B depositados sobre las colonias de iFbCV que, tras centrifugar el cultivo, permanecen adheridos a estas para realizar la fusión con PEG al 45%. Sin embargo, a las 144h post-tratamiento se observa una muerte celular total para el cultivo parental de células iFbCV deplecionadas. En cambio, a partir de las 192h sí que se observa crecimiento de colonias en la condición de fusión con iFbCV control. Esto se puede deber a que las células iFbCV control son más resistentes al tratamiento con PEG, ya que, a diferencia de las células deplecionadas de mtDNA, no presentan disfunciones en la cadena respiratoria y tienen por tanto, mayor capacidad para adaptar su metabolismo frente a estreses.

Se aislaron en total 20 clones 360h después de realizar la fusión inversa, de los cuales se extrajo el DNA para realizar los ensayos de PCR-RFLP y detectar así qué tipo de mtDNA contenían. En el caso de ser híbridos transmitocondriales, serían portadores de mtDNA de ambas líneas parentales. Al analizar los polimorfismos m.12771G>A y m.16129A>G mediante las digestiones con *MnII* y *NlaIV*, se observarían los patrones de bandas propios de células iFbCV y de 2128 143B, respectivamente.

En la figura 18, donde se muestra la digestión de los 20 clones con la enzima *MnII*, se aprecia un patrón de bandas que podría ser característico de células portadoras de mtDNA de iFbCV y de 2128 143B, es decir de un híbrido transmitocondrial. Sin embargo, al sospechar que se podría tratarse de una digestión parcial del mtDNA de iFbCV, se optó por realizar una digestión enzimática adicional con *NlaIV*. En la figura 21, donde se muestra la digestión de los clones con *NlaIV*, se confirma que todos los clones tienen el patrón de bandas del mtDNA de iFbCV, por lo que no contienen mtDNA de la línea celular 2128 143B. Esto quiere decir que los clones aislados tras la fusión inversa no son híbridos transmitocondriales, sino células parentales iFbCV supervivientes al tratamiento de fusión con PEG 45%.

Se han descrito casos de células que se han vuelto resistentes a la fusión con PEG tras someterse a sucesivos tratamientos con PEG<sup>99</sup>, así como células resistentes a la fusión con PEG tras un único tratamiento<sup>100</sup>. Aun así, dichos estudios han empleado líneas celulares de adipocitos de ratón<sup>99</sup>, y células linfoblastoides de ratón<sup>100</sup>; en ningún caso se ensaya el tratamiento con PEG sobre células pluripotentes inducidas humanas, posiblemente más sensibles al efecto tóxico del PEG. Los principales componentes celulares implicados en la fusión entre células son las glicoproteínas de la superficie celular, la bicapa lipídica y sus proteínas transmembrana, así como el citoesqueleto<sup>101</sup>. Estudios de microscopía electrónica de barrido con criofractura concluyen que PEG induce la fusión de membranas mientras se cumplen una serie de requisitos: que las células se sitúen a una distancia menor a 5 nm, con la creación de zonas libres de partículas intramembranas para establecer el contacto célula-célula y finalmente con el

hinchamiento de las células por ósmosis<sup>102</sup>. Se ha podido dar el caso de que las células iFbCV en el método de fusión inversa no se hayan fusionado con los citoplastos ya que, por su configuración, mantenían más contactos y proximidad con células hermanas de sus colonias. Al fusionarse entre ellas, al cabo del tiempo una célula iFbCV con varios núcleos podría desarrollar un programa transcripcional alterado que conlleve a la diferenciación de la célula inducida pluripotente o a su muerte.

## 6. 2. Diferenciación de iPSCs a fibras musculares inervadas

En el protocolo de diferenciación descrito por Kilian Mazaleyrat et al<sup>84, 85</sup>, en el cual se basa nuestro ensayo, logran registrar contracciones de las fibras musculares a partir del día 19-21. En nuestro caso no se han detectado dichas contracciones. El motivo principal se podría deber a una organización inadecuada de las células musculares y neuronas. Por lo general, en las condiciones de cultivo tratadas con medio 4 se observaba un enriquecimiento de neuronas y progenitores neurales; mientras que en los cultivos tratados con medio 3 se apreciaba una mayor densidad progenitores, según parecen indicar las imágenes de inmunofluorescencia. Si bien es verdad que se han detectado células musculares alargadas (marcadas con desmina y miosina en la Figura 23) en las diferentes condiciones de cultivo, estas suponen una población celular bastante escasa que además no logra organizarse espacialmente para formar miotubos, esto es células multinucleadas con los núcleos alineados en una región central. Cuando los miotubos maduran a fibras musculares, los núcleos se colocan en la periferia de la célula, y esto tampoco se observa en las imágenes de inmunofluorescencia. La formación de esta estructura es necesaria para poder observar las contracciones propias del músculo esquelético en la plataforma de cultivo, así como también es necesaria la presencia de neuronas que establezcan conexiones con las fibras musculares a través de la placa motora.

En las imágenes de la Figura 23C, se muestran células musculares que presentan la miosina marcada y sus núcleos están alineados, pero de nuevo, no se consiguen ver células fusionadas formando fibras musculares ni miotubos. En rasgos generales, en la placa 3 se ve un exceso de células indiferenciadas, mientras que en la placa 4 hay un exceso de progenitores neurales y neuronas diferenciadas. La diferencia radica en que el medio 3 contiene HGF y bFGF, implicados en la expansión de células progenitoras. Sería interesante realizar análisis transcriptómicos de las poblaciones celulares, para averiguar qué poblaciones predominan para cada condición y a diferentes tiempos. También, interesaría repetir el ensayo tratando el cultivo entre los días 8-10 con medio 3 (añadiendo HGF y bFGF) para promover la expansión celular; y añadiendo medio 4 los dos días sucesivos para rebajar la expansión de progenitores. Así en el día 12 se añadiría DAPT para inducir la diferenciación a neuronas.

Si bien no se ha logrado observar contracciones de fibras musculares durante el protocolo de diferenciación, se han establecido los pasos preliminares para realizar posteriores variaciones en el protocolo. Alterando las densidades celulares a sembrar y la composición de los medios en las fases de mantenimiento de cultivos, se podría alcanzar un equilibrio entre poblaciones de células musculares y neuronas que permita una organización celular similar a la que adquieren las células del tejido muscular esquelético.

## 7. CONCLUSIONES

Pese a no haber cumplido el objetivo de generación de cíbridos a partir de iPSCs, se han adquirido conocimientos a tener en cuenta si se desea continuar con esta línea de trabajo. Principalmente que:

- Las iPSCs requieren un tratamiento con BrEt y ddC mucho más breve y con menores concentraciones que aquellas aplicadas a otras líneas celulares descritas en la literatura.
- Las células parentales empleadas no han permitido obtener cíbridos transmitocondriales tras realizar diferentes metodologías de fusión con PEG 40-45%. Se podrían probar otras técnicas de fusión descritas en la bibliografía. Además, quizás purificando un mayor número de clones de una nueva fusión se obtendrían cíbridos portadores del genotipo deseado.
- La técnica de RFLP puesta a punto en este trabajo permite diferenciar los genomas mitocondriales de las líneas celulares 2128 143B y iFbCV

Por otra parte, se ha ensayado un protocolo de 30 días de duración para diferenciar iPSCs a fibras musculares esqueléticas innervadas. A pesar de no haber logrado completar esta diferenciación en lo que respecta a la generación de miotubos o fibras musculares con capacidad contráctil, se han sentado las bases para aplicar posteriores modificaciones al tratamiento. Se espera que dichas variaciones permitan alterar la configuración de los diferentes tipos celulares en el cultivo para acercarnos al objetivo planteado inicialmente.

## CONCLUSIONS

Despite not having achieved the aim of generating cybrids from parental iPSCs, we have acquired knowledge to bear in mind if we wish to continue developing this line of work. Mainly that:

- iPSCs require a much shorter treatment with lower doses of EtBr and ddC than those applied to other cell lines described in the pre-existing literature.
- The selected parental cell lines have not allowed us to achieve transmitochondrial cybrids after performing several methodologies of 45-50% PEG-induced fusion. Other cell fusion techniques described in the literature could be tested. Furthermore, by purifying a greater number of clones from a new fusion assay, perhaps we could isolate some cybrids carriers of the desired genotype.
- The RFLP technique developed in this work has allowed us to discern the mitochondrial genomes of the 2128 143B and iFbCV cell lines.

Moreover, we have assayed a 30 day protocol in order to differentiate an iPSC cell line into innervated skeletal muscle fibers. Even though we haven't managed to complete the differentiation process regarding the formation of contractile myotubes or muscle fibers, we have laid the foundations for applying further culture treatment modifications. Such variations are expected to alter the cell type configuration of the cell culture in order to reach the initial aim of this work.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. Ylikallio E, Suomalainen A. Mechanisms of mitochondrial diseases. *Annals of Medicine*. 2011;44(1):41-59. doi:10.3109/07853890.2011.598547
2. Chan DC. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell*. 2006;125(7):1241-1252. doi:10.1016/j.cell.2006.06.010
3. Amorim A, Fernandes T, Taveira N. Mitochondrial DNA in human identification: a review. *PeerJ*. 2019;7:e7314. doi:10.7717/peerj.7314
4. Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, et al. Heteroplasmy of Mouse mtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition. *Cell*. 2012;151(2):333-343. doi:10.1016/j.cell.2012.09.004
5. Case JT, Wallace DC. Maternal inheritance of mitochondrial DNA polymorphisms in cultured human fibroblasts. *Somatic Cell Genetics*. 1981;7(1):103-108. doi:10.1007/bf01544751
6. Lee W, Zamudio-Ochoa A, Buchel G, et al. Molecular basis for maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Nature Genetics*. 2023;55(10):1632-1639. doi:10.1038/s41588-023-01505-9
7. Filograna R, Mennuni M, Alsina D, Larsson N. Mitochondrial DNA copy number in human disease: the more the better? *FEBS Letters*. 2020;595(8):976-1002. doi:10.1002/1873-3468.14021
8. Mitchell SL, Goodloe R, Brown-Gentry K, Pendergrass SA, Murdock DG, Crawford DC. Characterization of mitochondrial haplogroups in a large population-based sample from the United States. *Human Genetics*. 2014;133(7):861-868. doi:10.1007/s00439-014-1421-9
9. Van der Walt JM, Dementieva YA, Martin ER, et al. Analysis of European mitochondrial haplogroups with Alzheimer disease risk. *Neuroscience Letters*. 2004;365(1):28-32. doi:10.1016/j.neulet.2004.04.051
10. Kenney MC, Hertzog D, Chak G, et al. Mitochondrial DNA haplogroups confer differences in risk for age-related macular degeneration: a case control study. *BMC Medical Genetics*. 2013;14(1). doi:10.1186/1471-2350-14-4
11. Montoya J., López-Gallardo E., Emperador S., Ruiz-Pesini E. Capítulo VII: Enfermedades del ADN mitocondrial. Sistema Mitocondrial: un reto en la medicina humana. 2012, *Instituto de España. Real Academia de Farmacia (Monografía XXXVI)*. Madrid: 129-154.
12. Montoya J. Biogénesis y patología mitocondrial. *Rev. Real Academia de Ciencias*. 2005; 60: 7-28.
13. Gorman GS, Chinnery PF, DiMauro S, et al. Mitochondrial diseases. *Nature Reviews Disease Primers*. 2016;2(1). doi:10.1038/nrdp.2016.80
14. Rahman S, Blok RB, Dahl H -h. M, et al. Leigh syndrome: Clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Annals of Neurology*. 1996;39(3):343-351. doi:10.1002/ana.410390311
15. Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR. Leigh syndrome: One disorder, more than 75 monogenic causes. *Annals of Neurology*. 2015;79(2):190-203. doi:10.1002/ana.24551
16. Man PYW, Griffiths PG, Brown DT, Howell N, Turnbull DM, Chinnery PF. The Epidemiology of Leber Hereditary Optic Neuropathy in the North East of England. *The American Journal of Human Genetics*. 2003;72(2):333-339. doi:10.1086/346066
17. McClelland C, Meyerson C, Van Stavern G. Leber hereditary optic neuropathy: current perspectives. *Clinical Ophthalmology*. Published online June 2015:1165. doi:10.2147/opth.s62021

18. Howell N. Leber hereditary optic neuropathy: Mitochondrial mutations and degeneration of the optic nerve. *Vision Research*. 1997;37(24):3495-3507. doi:10.1016/s0042-6989(96)00167-8
19. Rahman S, Copeland WC. POLG-related disorders and their neurological manifestations. *Nature Reviews Neurology*. 2018;15(1):40-52. doi:10.1038/s41582-018-0101-0
20. Human DNA Polymerase Gamma Mutation Database. *National Institute of Environmental Health Sciences*. Accessed May 18, 2024. <https://tools.niehs.nih.gov/polg/>
21. Naviaux RK, Nguyen KV. POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Annals of Neurology*. 2004;55(5):706-712. doi:10.1002/ana.20079
22. Van Goethem G, Dermaut B, Löfgren A, Martin JJ, Van Broeckhoven C. Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions. *Nature Genetics*. 2001;28(3):211-212. doi:10.1038/90034
23. Winterthun S, Ferrari G, He L, et al. Autosomal recessive mitochondrial ataxic syndrome due to mitochondrial polymerase  $\gamma$  mutations. *Neurology*. 2005;64(7):1204-1208. doi:10.1212/01.wnl.0000156516.77696.5a
24. Nesbitt V, Pitceathly RDS, Turnbull DM, et al. The UK MRC Mitochondrial Disease Patient Cohort Study: clinical phenotypes associated with the m.3243A>G mutation - implications for diagnosis and management. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2013;84(8):936-938. doi:10.1136/jnnp-2012-303528
25. Grady JP, Pickett SJ, Ng YS, et al. mt DNA heteroplasmy level and copy number indicate disease burden in m.3243A>G mitochondrial disease. *EMBO Molecular Medicine*. 2018;10(6). doi:10.15252/emmm.201708262
26. Liu CS, Cheng WL, Lee CF, et al. Alteration in the copy number of mitochondrial DNA in leukocytes of patients with mitochondrial encephalomyopathies. *Acta Neurologica Scandinavica*. 2006;0(0):060321023242002. doi:10.1111/j.1600-0404.2006.00586.x
27. Giordano C, Iommarini L, Giordano L, et al. Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*. 2013;137(2):335-353. doi:10.1093/brain/awt343
28. Bianco A, Bisceglia L, Russo L, et al. High Mitochondrial DNA Copy Number Is a Protective Factor From Vision Loss in Heteroplasmic Leber's Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2017;58(4):2193. doi:10.1167/iovs.16-20389
29. Bianco A, Valletti A, Longo G, et al. Mitochondrial DNA copy number in affected and unaffected LHON mutation carriers. *BMC Research Notes*. 2018;11(1). doi:10.1186/s13104-018-4025-y
30. Gammage PA, Moraes CT, Minczuk M. Mitochondrial Genome Engineering: The Revolution May Not Be CRISPR-lzed. *Trends in Genetics*. 2018;34(2):101-110. doi:10.1016/j.tig.2017.11.001
31. Srivastava S, Moraes CT. Double-strand breaks of mouse muscle mtDNA promote large deletions similar to multiple mtDNA deletions in humans. *Human Molecular Genetics*. 2005;14(7):893-902. doi:10.1093/hmg/ddi082
32. Moretton A, Morel F, Macao B, et al. Selective mitochondrial DNA degradation following double-strand breaks. *PLOS ONE*. 2017;12(4):e0176795. doi:10.1371/journal.pone.0176795
33. Johnston SA, Anziano PQ, Shark K, Sanford JC, Butow RA. Mitochondrial Transformation in Yeast by Bombardment with Microprojectiles. *Science*. 1988;240(4858):1538-1541. doi:10.1126/science.2836954

34. Remacle C, Cardol P, Coosemans N, Gaisne M, Bonnefoy N. High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(12):4771-4776. doi:10.1073/pnas.0509501103
35. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death & Differentiation*. 2006;13(9):1423-1433. doi:10.1038/sj.cdd.4401950
36. Oliveira MT, Garesse R, Kaguni LS. Animal models of mitochondrial DNA transactions in disease and ageing. *Experimental Gerontology*. 2010;45(7-8):489-502. doi:10.1016/j.exger.2010.01.019
37. Xu H, DeLuca SZ, O'Farrell PH. Manipulating the Metazoan Mitochondrial Genome with Targeted Restriction Enzymes. *Science*. 2008;321(5888):575-577. doi:10.1126/science.1160226
38. Sato M, Sato K. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2013;1833(8):1979-1984. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.010
39. Ruzzenente B, Rötig A, Metodiev MD. Mouse models for mitochondrial diseases. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(R2):R115-R122. doi:10.1093/hmg/ddw176
40. Torraco A, Peralta S, Iommarini L, Diaz F. Mitochondrial Diseases Part I: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion*. 2015;21:76-91. doi:10.1016/j.mito.2015.01.009
41. Iommarini L, Peralta S, Torraco A, Diaz F. Mitochondrial Diseases Part II: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in regulatory factors and other components required for mitochondrial function. *Mitochondrion*. 2015;22:96-118. doi:10.1016/j.mito.2015.01.008
42. Peralta S, Torraco A, Iommarini L, Diaz F. Mitochondrial Diseases Part III: Therapeutic interventions in mouse models of OXPHOS deficiencies. *Mitochondrion*. 2015;23:71-80. doi:10.1016/j.mito.2015.01.007
43. Kruse SE, Watt WC, Marcinek DJ, Kapur RP, Schenkman KA, Palmiter RD. Mice with Mitochondrial Complex I Deficiency Develop a Fatal Encephalomyopathy. *Cell Metabolism*. 2008;7(4):312-320. doi:10.1016/j.cmet.2008.02.004
44. Quadalti C, Brunetti D, Lagutina I, et al. SURF1 knockout cloned pigs: Early onset of a severe lethal phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2018;1864(6):2131-2142. doi:10.1016/j.bbadis.2018.03.021
45. Nakada K, Inoue K, Hayashi JI. Mito-mice: animal models for mitochondrial DNA-based diseases. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2001;12(6):459-465. doi:10.1006/scdb.2001.0283
46. Inoue K, Nakada K, Ogura A, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature Genetics*. 2000;26(2):176-181. doi:10.1038/82826
47. Tani H, Ishikawa K, Tamashiro H, et al. Aberrant RNA processing contributes to the pathogenesis of mitochondrial diseases in trans-mitochondrial mouse model carrying mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) with a pathogenic A2748G mutation. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(16):9382-9396. doi:10.1093/nar/gkac699
48. Shimizu A, Mito T, Hayashi C, et al. Transmitochondrial mice as models for primary prevention of diseases caused by mutation in the tRNA<sup>Lys</sup> gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(8):3104-3109. doi:10.1073/pnas.1318109111

49. King MP, Attardi G. Human Cells Lacking mtDNA: Repopulation with Exogenous Mitochondria by Complementation. *Science*. 1989;246(4929):500-503. doi:10.1126/science.2814477
50. Wilkins HM, Carl SM, Swerdlow RH. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondrialopathies. *Redox Biology*. 2014;2:619-631. doi:10.1016/j.redox.2014.03.006
51. Chomyn A. [29] Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. In: *Methods in Enzymology*. Elsevier; 1996:334-339. Accessed May 25, 2024. [http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879\(96\)64031-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0076-6879(96)64031-2)
52. Khotina VA, Vinokurov AY, Bagheri Ekta M, Sukhorukov VN, Orekhov AN. Creation of Mitochondrial Disease Models Using Mitochondrial DNA Editing. *Biomedicines*. 2023;11(2):532. doi:10.3390/biomedicines11020532
53. Saada A. Mitochondria: Mitochondrial OXPHOS (dys) function ex vivo – The use of primary fibroblasts. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2014;48:60-65. doi:10.1016/j.biocel.2013.12.010
54. Kuszak AJ, Espey MG, Falk MJ, et al. Nutritional Interventions for Mitochondrial OXPHOS Deficiencies: Mechanisms and Model Systems. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2018;13(1):163-191. doi:10.1146/annurev-pathol-020117-043644
55. 67. Caporali L, Magri S, Legati A, et al. ATPase Domain AFG3L2 Mutations Alter OPA1 Processing and Cause Optic Neuropathy. *Annals of Neurology*. 2020;88(1):18-32. doi:10.1002/ana.25723
56. Lattanzi L, Salvatori G, Coletta M, et al. High efficiency myogenic conversion of human fibroblasts by adenoviral vector-mediated MyoD gene transfer. An alternative strategy for ex vivo gene therapy of primary myopathies. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(10):2119-2128. doi:10.1172/jci1505
57. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024
58. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019
59. Efthymiou AG, Chen G, Rao M, Chen G, Boehm M. Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2014;14(9):1333-1344. doi:10.1517/14712598.2014.922533
60. McKnight CL, Low YC, Elliott DA, Thorburn DR, Frazier AE. Modelling Mitochondrial Disease in Human Pluripotent Stem Cells: What Have We Learned? *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(14):7730. doi:10.3390/ijms22147730
61. Tolle I, Tiranti V, Prigione A. Modeling mitochondrial DNA diseases: from base editing to pluripotent stem-cell-derived organoids. *EMBO reports*. 2023;24(4). doi:10.15252/embr.202255678
62. Prigione A, Lichtner B, Kuhl H, et al. Human Induced Pluripotent Stem Cells Harbor Homoplasmic and Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations While Maintaining Human Embryonic Stem Cell-like Metabolic Reprogramming. *Stem Cells*. 2011;29(9):1338-1348. doi:10.1002/stem.683
63. Wei W, Gaffney DJ, Chinnery PF. Cell reprogramming shapes the mitochondrial DNA landscape. *Nature Communications*. 2021;12(1). doi:10.1038/s41467-021-25482-x

64. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science*. 1998;282(5391):1145-1147. doi:10.1126/science.282.5391.1145
65. Daley GQ, Lensch MW, Jaenisch R, Meissner A, Plath K, Yamanaka S. Broader Implications of Defining Standards for the Pluripotency of iPSCs. *Cell Stem Cell*. 2009;4(3):200-201. doi:10.1016/j.stem.2009.02.009
66. Zhao X yang, Li W, Lv Z, et al. iPSC cells produce viable mice through tetraploid complementation. *Nature*. 2009;461(7260):86-90. doi:10.1038/nature08267
67. Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*. 1962;4(2):256-273. doi:10.1016/0012-1606(62)90043-x
68. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature*. 1958;182(4627):64-65. doi:10.1038/182064a0
69. Cerneckis J, Cai H, Shi Y. Induced pluripotent stem cells (iPSCs): molecular mechanisms of induction and applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024;9(1). doi:10.1038/s41392-024-01809-0
70. Ohi Y, Qin H, Hong C, et al. Incomplete DNA methylation underlies a transcriptional memory of somatic cells in human iPSC cells. *Nature Cell Biology*. 2011;13(5):541-549. doi:10.1038/ncb2239
71. Kim K, Zhao R, Doi A, et al. Donor cell type can influence the epigenome and differentiation potential of human induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*. 2011;29(12):1117-1119. doi:10.1038/nbt.2052
72. Kim K, Doi A, Wen B, et al. Epigenetic memory in induced pluripotent stem cells. *Nature*. 2010;467(7313):285-290. doi:10.1038/nature09342
73. Shi Y, Inoue H, Wu JC, Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2016;16(2):115-130. doi:10.1038/nrd.2016.245
74. Ma H, Folmes CDL, Wu J, et al. Metabolic rescue in pluripotent cells from patients with mtDNA disease. *Nature*. 2015;524(7564):234-238. doi:10.1038/nature14546
75. Grace HE, Galdun P III, Lesnefsky EJ, West FD, Iyer S. mRNA Reprogramming of T8993G Leigh's Syndrome Fibroblast Cells to Create Induced Pluripotent Stem Cell Models for Mitochondrial Disorders. *Stem Cells and Development*. 2019;28(13):846-859. doi:10.1089/scd.2019.0045
76. Peron C, Mauceri R, Cabassi T, et al. Generation of a human iPSC line, FINCBi001-A, carrying a homoplasmic m.G3460A mutation in MT-ND1 associated with Leber's Hereditary optic Neuropathy (LHON). *Stem Cell Research*. 2020;48:101939. doi:10.1016/j.scr.2020.101939
77. Lu HE, Yang YP, Chen YT, et al. Generation of patient-specific induced pluripotent stem cells from Leber's hereditary optic neuropathy. *Stem Cell Research*. 2018;28:56-60. doi:10.1016/j.scr.2018.01.029
78. Li S, Guo J, Ying Z, et al. Valproic acid-induced hepatotoxicity in alpers syndrome is associated with mitochondrial permeability transition pore opening-dependent apoptotic sensitivity in an induced pluripotent stem cell model. *Hepatology*. 2015;61(5):1730-1739. doi:10.1002/hep.27712
79. Chumarina M, Russ K, Azevedo C, et al. Cellular alterations identified in pluripotent stem cell-derived midbrain spheroids generated from a female patient with progressive external ophthalmoplegia and parkinsonism who carries a novel variation (p.Q811R) in the POLG1 gene. *Acta Neuropathologica Communications*. 2019;7(1). doi:10.1186/s40478-019-0863-7

80. Lorenz C, Lesimple P, Bukowiecki R, et al. Human iPSC-Derived Neural Progenitors Are an Effective Drug Discovery Model for Neurological mtDNA Disorders. *Cell Stem Cell*. 2017;20(5):659-674.e9. doi:10.1016/j.stem.2016.12.013
81. Jing R, Corbett JL, Cai J, et al. A Screen Using iPSC-Derived Hepatocytes Reveals NAD<sup>+</sup> as a Potential Treatment for mtDNA Depletion Syndrome. *Cell Reports*. 2018;25(6):1469-1484.e5. doi:10.1016/j.celrep.2018.10.036
82. Le S, Petersilie L, Inak G, et al. Generation of Human Brain Organoids for Mitochondrial Disease Modeling. *Journal of Visualized Experiments*. 2021;(172). doi:10.3791/62756
83. Caron L, Testa S, Magdinier F. Induced Pluripotent Stem Cells for Modeling Physiological and Pathological Striated Muscle Complexity. *Journal of Neuromuscular Diseases*. 2023;10(5):761-776. doi:10.3233/jnd-230076
84. Mazaleyrat K, Badja C, Broucqsault N, Chevalier R, Laberthonnière C, Dion C, Baldasseroni L, El-Yazidi C, Thomas M, Bachelier R, et al. Multilineage Differentiation for Formation of Innervated Skeletal Muscle Fibers from Healthy and Diseased Human Pluripotent Stem Cells. *Cells*. 2020; 9(6):1531. <https://doi.org/10.3390/cells9061531>
85. Delourme M, Broucqsault N, Mazaleyrat K, Magdinier F. Production of Innervated Skeletal Muscle Fibers Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. In: *Methods in Molecular Biology*. Springer US; 2020:231-239. Accessed June 6, 2024. [http://dx.doi.org/10.1007/7651\\_2020\\_334](http://dx.doi.org/10.1007/7651_2020_334)
86. Chal J, Oginuma M, Tanoury ZA, et al. Differentiation of pluripotent stem cells to muscle fiber to model Duchenne muscular dystrophy. *Nature Biotechnology*. 2015;33(9):962-969. doi:10.1038/nbt.3297
87. Maury Y, Côme J, Piskorowski RA, et al. Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nature Biotechnology*. 2014;33(1):89-96. doi:10.1038/nbt.3049
88. Choi IY, Lim H, Estrellas K, et al. Concordant but Varied Phenotypes among Duchenne Muscular Dystrophy Patient-Specific Myoblasts Derived using a Human iPSC-Based Model. *Cell Reports*. 2016;15(10):2301-2312. doi:10.1016/j.celrep.2016.05.016
89. Borghese L, Dolezalova D, Opitz T, et al. Inhibition of Notch Signaling in Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Delays G1/S Phase Transition and Accelerates Neuronal Differentiation In Vitro and In Vivo. *Stem Cells*. 2010;28(5):955-964. doi:10.1002/stem.408
90. Schaefer A, Lim A, Gorman G. Epidemiology of Mitochondrial Disease. In: *Diagnosis and Management of Mitochondrial Disorders*. Springer International Publishing; 2019:63-79. Accessed June 10, 2024. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-05517-2_4)
91. Hernández Ainsa CJ. Deleciones en el DNA mitocondrial causantes del síndrome de Pearson: Modelos celulares y aproximaciones terapéuticas. *Universidad de Zaragoza*; 2021. <https://zagan.unizar.es/record/107358?ln=es#>
92. Khozhukhar N, Spadafora D, Rodriguez YAR, Fayzulin R, Alexeyev M. Generation of Mammalian Cells Devoid of Mitochondrial DNA (ρ0 cells). *Current Protocols*. 2023;3(2). doi:10.1002/cpz1.679
93. Bayona-Bafaluy MP. A chemical enucleation method for the transfer of mitochondrial DNA to cells. *Nucleic Acids Research*. 2003;31(16):98e-998. doi:10.1093/nar/gng100
94. Jones CW, Mastrangelo IA, Smith HH, Liu HZ, Meck RA. Interkingdom Fusion Between Human (HeLa) Cells and Tobacco Hybrid (GGLL) Protoplasts. *Science*. 1976;193(4251):401-403. doi:10.1126/science.935875
95. Davidson RL, Gerald PS. Chapter 18 Induction of Mammalian Somatic Cell Hybridization by Polyethylene Glycol. In: *Methods in Cell Biology*. Elsevier; 1977:325-338. Accessed June 18, 2024. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)60223-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)60223-x)

96. Knutton S. Studies of membrane fusion.: III. fusion of erythrocytes with polyethylene glycol. *Journal of Cell Science*. 1979;36(1):61-72. doi:10.1242/jcs.36.1.61
97. Nass MMK. Differential effects of ethidium bromide on mitochondrial and nuclear DNA synthesis in vivo in cultured mammalian cells. *Experimental Cell Research*. 1972;72(1):211-222. doi:10.1016/0014-4827(72)90583-6
98. Kozhukhar N, Alexeyev MF. Efficient Elimination of mtDNA from Mammalian Cells with 2',3'-Dideoxycytidine. *DNA*. 2024;4(3):201-211. doi:10.3390/dna4030013
99. Roos DS, Davidson RL. Isolation of mouse cell lines resistant to the fusion-inducing effect of polyethylene glycol. *Somatic Cell Genetics*. 1980;6(3):381-390. doi:10.1007/bf01542790
100. Stadler J, Vaughan V, Hanser J. Cell fusion-impaired variants of a mouse lymphocytic cell line obtained by single-step selection for polyethylene glycol resistance. *Somatic Cell Genetics*. 1980;6(1):127-137. doi:10.1007/bf01538701
101. Poste G, Allison AC. Membrane fusion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*. 1973;300(4):421-465. doi:10.1016/0304-4157(73)90015-4
102. Knutton S. Studies of membrane fusion.: III. fusion of erythrocytes with polyethylene glycol. *Journal of Cell Science*. 1979;36(1):61-72. doi:10.1242/jcs.36.1.61