

## MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES QUE DETERMINAN LA PLURIPOTENCIALIDAD DE iPSCs DERIVADAS DE FIBROBLASTOS EXTRAÍDOS DE UN PACIENTE SANO Y CON ALZHEIMER MEDIANTE UN RT-qPCR

Florencia Rojas Espejo<sup>a</sup>  
Javiera Aguilar Danon<sup>a</sup>  
Catalina Astorga Rocha<sup>a</sup>  
Begoña Del Río Fernández<sup>a</sup>  
Hiuyin Lin Aguilera<sup>a</sup>  
Javiera Soto Lizana<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Estudiante de Medicina, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 06 de abril, 2021. Aceptado en versión corregida el 15 de julio, 2021.

### RESUMEN

**Introducción:** El Alzheimer es un desorden neurodegenerativo progresivo que se presenta luego de los 65 años y su prevalencia mundial es de 14,4 millones de personas. Por lo anterior, se ha ahondado en tratamientos personalizados y pruebas in vitro de fármacos para el Alzheimer considerando a las iPSC como posibles candidatas. **Objetivo:** Este estudio cuantitativo, cuyo objetivo, no basado en una hipótesis, busca analizar y comparar el perfil de expresión de marcadores de pluripotencialidad de iPSCs derivadas de fibroblastos adultos humanos, tanto de un sujeto sano como de otro con Alzheimer, y determinar si efectivamente son pluripotentes. **Metodología.** Se reprograman fibroblastos de la piel mediante transfección de plásmidos por electroporación, obteniendo 9 clones de iPSCs. Se aísla el ARN total de los clones, se asegura pureza y calidad de la muestra, sumado a su digestión y retrotranscripción. Mediante RT-qPCR se selecciona el gen normalizador y se analiza la expresión de los genes Oct-4 endógeno y exógeno, Sox-2 endógeno y exógeno, NANOG y el gen normalizador seleccionado. Finalmente se comprueba si hay diferencia significativa entre los clones. **Resultado:** Se observa una menor variación en la expresión de RPL13a y se selecciona como gen normalizador. Las iPSCs derivadas del sujeto sano presentan una mayor expresión de Oct-4 endógeno ( $p < 0,05$ ) en comparación con el sujeto con Alzheimer. **Discusión y Conclusión:** No existen diferencias estadísticas en la expresión de Sox-2 entre ambos sujetos. A futuro, se sugiere el uso de RPL13a como gen normalizador en la determinación del nivel de expresión de genes de pluripotencia de iPSCs derivadas de fibroblastos. **Palabras clave:** Células IPS, Alzheimer, RT-qPCR.

### INTRODUCCIÓN

El Alzheimer (EA) es un desorden neurodegenerativo progresivo de causa incierta, caracterizado neuro patológicamente por la formación de nudos neurofibrilares intraneuronales y placas amiloides en la corteza cerebral<sup>1</sup>, se presenta típicamente después de los 65 años de vida. EA constituye la forma más frecuente de demencia, actualmente, 14.4 millones de personas a nivel mundial han sido clínicamente diagnosticadas<sup>2</sup>. Estudios indican que la incidencia del Alzheimer ha ido en aumento y no disminuirá debido al incremento de la expectativa de vida<sup>3</sup>. Cabe destacar que el cuidado de pacientes con Alzheimer, debido a que esta aún no tiene cura, tiene un enorme costo emocional y económico<sup>4</sup>. Por esto, es necesario ahondar en el conocimiento sobre posibles tratamientos para la enfermedad, con ayuda de un buen modelo celular<sup>5</sup>. Investigaciones ya se han puesto en marcha considerando a las células madres pluripotentes inducidas (iPSCs) como las grandes candidatas<sup>6,7</sup>, ya que su pluripotencialidad permite el desarrollo de tratamientos personalizados. Ya se han visto ensayos clínicos de terapia celular personalizada en otras patologías como lesiones de

médula espinal, Parkinson e, incluso, Diabetes Mellitus I<sup>8-10</sup>.

Las iPSCs, pueden ser obtenidas a partir de fibroblastos adultos humanos reprogramados, siendo este el tipo celular más utilizado por su fácil obtención y reprogramación<sup>9-11</sup>. Un nuevo método para generar iPSCs fue planteado por Okita et al. (2011), a través de la transfección de factores de transcripción, utilizando plásmidos episomales<sup>10</sup>.

Por lo tanto, las iPSCs se podrían convertir en una herramienta para desarrollar futuras estrategias terapéuticas personalizadas para el Alzheimer utilizando iPSCs derivadas y diferenciadas a partir de fibroblastos propios del paciente. Actualmente en estudios estas células derivadas de sujetos con Alzheimer se han logrado diferenciar en células neurales, realizando un avance en la observación de la patogénesis<sup>11</sup>. Sin embargo, es necesario para futuros estudios en esta área determinar la capacidad genotípica de estas células.

Ante los antecedentes expuestos, el siguiente trabajo busca responder la siguiente pregunta: ¿Existe diferencia en el patrón de expresión de genes que determinan la pluripotencialidad entre iPSCs derivadas de fibroblastos humanos adultos de un

\*Correspondencia: jasotol@udd.cl  
2021, Revista Confluencia, 4(1), 40-45



sujeto sano como de un sujeto con Alzheimer?

La investigación no se basa en una hipótesis, debido a que no existen estudios previos sobre el perfil de expresión de marcadores de pluripotencialidad, en las células de pacientes con Alzheimer.

El objetivo del estudio es analizar y comparar el perfil de expresión de marcadores de pluripotencialidad en iPSCs derivadas de fibroblastos adultos humanos tanto de sujetos sanos como de sujetos con Alzheimer. Esto se realiza partir de los siguientes objetivos específicos: determinar la expresión de genes de pluripotencia, mediante un RT-qPCR, demostrar si la expresión de estos marcadores varía entre los distintos clones de iPSCs, utilizar un gen normalizador (GAPDH, EEF1A1 y RPL13a) determinado a partir de la comparación de su expresión en todos los grupos celulares (fibroblastos, clones sanos y clones de Alzheimer) y analizar la expresión de marcadores de pluripotencia endógenos y exógenos.

## METODOLOGÍA

En este estudio preclínico observacional cuantitativo se determinó la diferencia en el patrón de expresión de genes, mediante el número de ciclos de RT-qPCR. A partir de la extracción de fibroblastos adultos humanos de un sujeto sano de sexo femenino de 78 años, y otro sujeto del mismo sexo de 84 años a la cual se le diagnosticó Alzheimer esporádico hace 10 años, obtenidos por la Dra. Behrens<sup>3</sup> mediante Skin punch Biopsy. A partir de estas muestras de piel se preparó un cultivo y se expandieron los fibroblastos obtenidos<sup>12</sup>. Posteriormente, los fibroblastos se reprogramaron<sup>13</sup> utilizando cuatro plásmidos episomales que contienen los 6 factores de transcripción de pluripotencia (Oct-4, Sox-2, Klf4 y L-Myc, LIN 28 y p53 knockdown), los cuales fueron introducidos mediante electroporación<sup>14</sup>. A los 3 meses, la reprogramación se completó. La tasa de éxito de la reprogramación es de 0,06%.

De las colonias de iPSCs obtenidas, se extraen 4 clones derivados de fibroblastos del sujeto sano y 5 clones derivados del sujeto con Alzheimer. Como control negativo del estudio, se utilizó un cultivo de fibroblastos no reprogramados del sujeto sano y como comparador se usó iPSCs derivadas de fibroblastos del sujeto sano. El criterio de inclusión que se utilizó fue que las colonias celulares deben presentar la morfología característica de las iPSCs. Los criterios de exclusión son contaminación por Mycoplasma, ARN degradado y diferenciación espontánea.

Luego se llevó a cabo la extracción del ARN total en tres etapas: I) Lisar muestras y separar fases utilizando Trizol<sup>15</sup> II) Aislar ARN III) Determinar la pureza y cantidad de ARN con NANODROP<sup>16,17</sup>.

**Tabla 1: Tratamiento de la muestra**

N°	Etapas	Especificación
1	Skin punch Biopsy	- Extracción de Fibroblastos (4 mm) - Cultivo y expansión - Prueba de Ausencia de Mycoplasma <b>Muestras:</b> 1. Paciente con Alzheimer 2. Sujeto Sano
2	Reprogramación	<b>4 Plásmidos:</b> 1. Oct-4; p53; ShRNA 2. Sox 2, KLF4 3. L-myc, LIN28 4. EBNA-1 <b>21 días:</b> 1°s iPSCs <b>3 meses:</b> Reprogramación completa y colonias <i>Tasa de éxito en reprogramación: 0,06%</i>
3	Colonias de iPSCs	
4	Aislamiento ARN	- Protocolo Trizol modificado - Medición de la cantidad de NANODROP
5	Calidad ARN	Electroforesis en gel de agarosa - Dilución de ARN - 2uL de loading buffer - X uL de ARN - 18-x uL de H2O libre nucleasa - Total volumen= 20 uL
6	Digestión con DNAsa I y purificación	
7	Retrotranscripción	ARN → cADN
8	qPCR	Preparación de muestras: Aplicación de Master Mix Preparación de placa 15 uL de Master Mix de cADN Termociclador 58° (temperatura óptima de genes en conjunto) 40 ciclos <b>Genes:</b> Oct 4 endógeno, Oct 4 exógeno, GAPDH 2 <b>Control (-):</b> Cada gen sin el templado (3)
9	Análisis de Datos	

Grupos: iPSCs Sano (4), iPSCs Alzheimer (5) y Fibroblasto sano (2 ml)

Para corroborar la calidad de éste, se hace una Electroforesis en Gel de Agarosa al 1%, se utilizó bromuro de etidio para la tinción y se evaluó la calidad del ARN total extraído observando las bandas con luz UV.

Después se ejecutó la digestión con ADNasa I y la purificación de las muestras.

En el paso siguiente se efectuó la retrotranscripción, agregando transcriptasa reversa a 9 muestras y se sumaron 3 controles negativos sin la enzima: ARN de fibroblastos sanos, iPSCs de clon sano y iPSCs de clon Alzheimer.

Finalmente, el ADN obtenido se analizó a través de dos RT-qPCR, el primero para determinar el gen normalizador a utilizar y el segundo para evaluar el nivel de expresión de los marcadores de pluripotencia. En primera instancia se comparó la expresión de tres genes: GAPDH, RPL13a y EEF1A,



para seleccionar el mejor gen normalizador. En segunda instancia, se obtuvo la expresión de los genes de pluripotencia: Oct-4 exógenos, Oct-4 endógenos, Sox-2 endógeno, Sox-2 exógenos y NANOG, además del gen normalizador previamente seleccionado. Los resultados fueron analizados utilizando un gen normalizador seleccionado previamente, comparando las iPSCs derivadas de fibroblastos del sujeto con Alzheimer con las iPSCs del sujeto sano, en busca de diferencias en la expresión de los genes de pluripotencia entre ambas muestras.

Para el análisis estadístico se usó prueba T student de dos colas para muestras independientes (p valor <0.05).

Este estudio se apega a las normativas nacionales e internacionales de materia ética de la investigación contando con consentimiento informado para la obtención de muestras de fibroblastos del sujeto sano y el paciente con Alzheimer, previamente solicitado por la Universidad de Chile. Adicionalmente, el estudio fue evaluado y aprobado por el Comité Ético Científico de la Universidad del Desarrollo y por el Comité de Bioseguridad de la misma institución.

## RESULTADO

La cantidad de ARN se determinó utilizando un espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop.

Respecto a la relación 260/280, podemos determinar que las muestras de ARN no presentan contaminación proteica, exceptuando el clon sano 3, considerado como el valor óptimo de pureza (2,03-2,06). En el caso de la relación 260/230, medida de pureza secundaria, gran parte de los resultados están dentro de los valores aceptados de pureza (1,8-2,2), variando entre 1,83 y 2,03, exceptuando nuevamente el clon sano 3 (Tabla 2).

Al evaluar la calidad del ARN, mediante una electroforesis en gel de agarosa, se busca que se

vean dos bandas delimitadas, lo que se observó en las muestras, exceptuando al clon sano 3, por lo tanto, este fue retirado del estudio.

Con respecto a los genes normalizadores, al medir la expresión de GAPDH y EEF1A1 se observó una gran fluctuación de los valores entre cada clon analizado, cuyas varianzas mostraron una dispersión para GAPDH ( $s^2 = 7,94$ ) y EEF1A1 ( $s^2 = 1,63$ ), mientras que para RPL13a el nivel de expresión en los clones sanos, Alzheimer y fibroblastos, fueron similares ( $s^2 = 0,239$ ). A partir de este resultado, se seleccionó RPL13a como gen normalizador (Figura 1)

Con respecto a la expresión de Oct-4 endógeno, los clones sanos presentan una expresión del marcador hasta 3 veces mayor que los clones con Alzheimer (expresión relativa promedio: 9,12 [sano] y 2,99 [Alzheimer]; p valor <0,05). Los fibroblastos, utilizados como control negativo, presentan mínima expresión de Oct-4 (expresión relativa promedio: 0,095). (Figura 2)

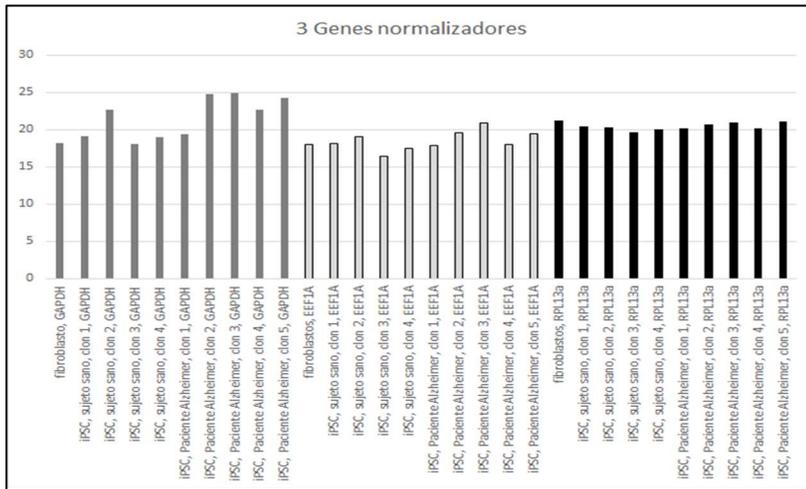
En el caso del marcador Sox-2 endógeno se observa su expresión tanto en clones Alzheimer como sanos sin diferencias significativas (p valor > 0,05) (expresión relativa promedio: 4,87 [sano] y 6,73 [Alzheimer]). Los fibroblastos sanos tienen mínimo nivel de expresión (expresión relativa promedio: 0,002) (Figura 2).

En la mayoría de los clones de iPSCs, se observa una expresión mínima del marcador de pluripotencia NANOG (expresión relativa promedio: 0,22 [sano] y 0,01 [Alzheimer]), sin diferencias significativas (p valor >0,05). La expresión de NANOG en los fibroblastos es cercana a 0 (expresión relativa promedio: 0,0005) (Figura 2).

En todos los clones de iPSCs, se observa una expresión de Oct-4 y Sox-2 exógeno cercana a 0.

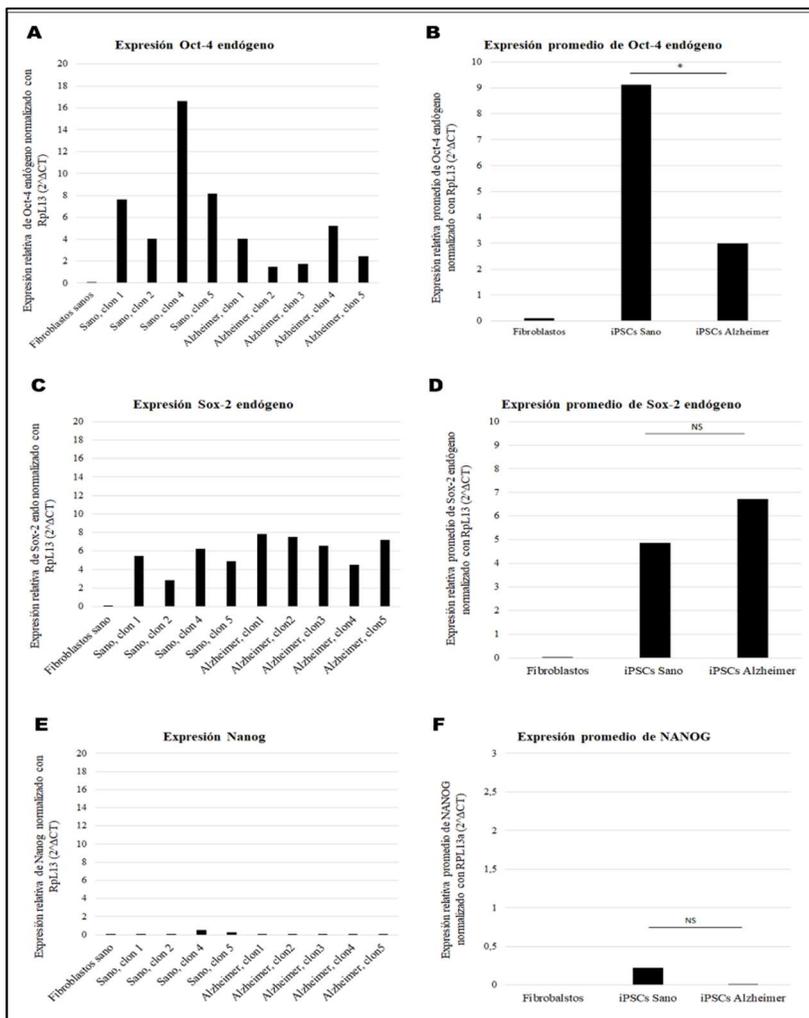
**Tabla 2: Resultados de la cantidad y pureza del ARN total extraído, mediante espectrofotometría (NANODROP).**

Número	Sample ID	User name	Nucleic Acid Conc.	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample type
1	Clon 1 sano	NANO-DROP	2,4861	ug/ul	62,152	30,619	<b>2,03</b>	1,95	RNA
2	Clon 2 sano	NANO-DROP	1,7451	ug/ul	43,628	21,363	<b>2,04</b>	1,76	RNA
3	Clon 3 sano**	NANO-DROP	0,4573	ug/ul	11,432	6,374	<b>1,79</b>	0,47	RNA
4	Clon 4 sano	NANO-DROP	1,6248	ug/ul	40,621	19,702	<b>2,06</b>	1,95	RNA
5	Clon 5 sano	NANO-DROP	1,7665	ug/ul	44,161	21,513	<b>2,05</b>	2,03	RNA
6	Clon 1 Alzheimer	NANO-DROP	3,3544	ug/ul	83,860	41,571	<b>2,02</b>	1,85	RNA
7	Clon 2 Alzheimer	NANO-DROP	2,1835	ug/ul	54,586	26,624	<b>2,06</b>	1,83	RNA
8	Clon 3 Alzheimer	NANO-DROP	3,8714	ug/ul	96,785	47,724	<b>2,03</b>	1,95	RNA
9	Clon 4 Alzheimer	NANO-DROP	3,2043	ug/ul	80,107	39,393	<b>2,03</b>	1,85	RNA
10	Clon 5 Alzheimer	NANO-DROP	3,4899	ug/ul	87,248	43,059	<b>2,03</b>	1,88	RNA



**Figura 1.**

RT-qPCR; Genes normalizadores. Niveles de expresión de GAPDH, EEF1A y RPL13a en iPSCs sanas (clones 1, 2, 4 y 5), iPSCs Alzheimer (clones 1-5) y fibroblastos sano (Control negativo). Análisis de varianza: GAPDH ( $s^2 = 7,94$ ), EEF1A1 ( $s^2 = 1,63$ ), RPL13a ( $s^2 = 0,239$ ). RPL13a presenta menor dispersión en los datos.



**Figura 2.** RT-qPCR 2.A. Niveles de expresión de Oct-4 endógeno en clones de iPSCs Sanas (clones 1, 2, 4 y 5), iPSCs Alzheimer (clones 1-5) y fibroblastos sano (control negativo). 2.B. Niveles de expresión promedio de Oct-4 endógeno en iPSCs sanas y Alzheimer; fibroblastos sano (control negativo). Se observan diferencias significativas entre las iPSCs Sanas y Alzheimer. Se utiliza la prueba t-student de dos colas para muestras independientes (\* $p$  valor $<0,05$ ). 2.C Niveles de expresión de Sox-2 endógeno en clones de iPSCs sanas (clones 1, 2, 4 y 5), iPSCs Alzheimer (clones 1-5) y fibroblastos sanos (control negativo). 2.D Niveles de expresión promedio de Sox-2 endógeno en iPSCs sanas y Alzheimer; fibroblastos sanos (control negativo). Se utiliza la prueba t-student de dos colas para muestras independientes (\* $p$  valor $<0,05$ ). NS: No hay diferencia significativa. 2.E Niveles de expresión de NANOG en clones de iPSCs sanas (clones 1, 2, 4 y 5), iPSCs Alzheimer (clones 1-5) y fibroblastos sanos (control negativo). 2.F Niveles de expresión promedio de NANOG en iPSCs sanas y Alzheimer; fibroblastos sanos (control negativo). Se utiliza la prueba t-student de dos colas para muestras independientes (\* $p$  valor $<0,05$ ). NS: No hay diferencia significativa.

**DISCUSIÓN**

Las mediciones de absorbancia permiten obtener información sobre la cantidad y pureza del ARN total extraído. La relación de absorbancia 260/280 obtenida en cada clon sugiere un alto nivel de pureza y la relación de absorbancia 260/230 sugiere que

existe una cantidad insignificante de fenol en el ARN, rectificando el nivel de pureza de las muestras.

Al verificar la calidad del ARN mediante una electroforesis en gel de agarosa, los resultados evidencian que en general el ARNm de los clones de iPSCs sanos y Alzheimer no se encuentra



degradado, lo que confirma la buena calidad del ARN. La ausencia de las bandas para el clon 3 sano lleva a creer que este se diferenció espontáneamente, lo que podría haber disminuido su proliferación, llevando a la escasa cantidad de ARN detectada, por lo tanto, fue eliminado del estudio.

La literatura describe que para normalizar los niveles de expresión de genes, GAPDH es uno de los más utilizados cuando el número de clones de iPSCs es pequeño<sup>18,19</sup>. Sin embargo, este gen normalizador no fue el más adecuado para la investigación debido a que existía una gran diferencia en su expresión entre los 9 clones de iPSCs. Siendo GAPDH expresado para glicosilación, la desviación podría llevar a creer que existe cierta variabilidad en la glicosilación de las iPSCs derivadas del sujeto con Alzheimer. En base a esto, se decide buscar otro gen normalizador que permita normalizar los resultados. Finalmente, se establece que para trabajar con varios clones de iPSCs [9], se debe utilizar el gen RPL13a debido a que es el que demuestra menor variación en su expresión entre los distintos clones.

La amplia gama de información disponible indica que Oct-4 es un gen imprescindible para reprogramar células somáticas, otorgándoles la característica de pluripotencia y manteniéndolas en ese estado<sup>10,20</sup>. En base a los resultados obtenidos, la mayor expresión de Oct-4 endógeno por parte de los clones sanos, en comparación a los de Alzheimer, permite inferir que las iPSCs derivadas del sujeto sano son más pluripotentes que aquellas derivadas del sujeto con Alzheimer.

Según la literatura Sox-2 actúa junto con Oct-4 y mediante una regulación de retroalimentación positiva que ayuda a reforzar el estado pluripotente de la célula<sup>14</sup>. Este gen, al ser altamente expresado por ambos tipos de clones permite deducir que las iPSCs obtenidas son pluripotentes y serían capaces de diferenciarse a distintos tipos celulares permitiendo realizar pruebas de fármacos, estudios celulares y terapias personalizadas.

La literatura describe que generalmente NANOG es pobremente expresado en las iPSCs, lo que es compatible con los resultados obtenidos en la investigación. Esto permite deducir que NANOG no corresponde a unos de los genes indispensables para generar y mantener la pluripotencia de las iPSCs<sup>21</sup>.

La reprogramación de los fibroblastos se realiza mediante la transfección de diferentes plásmidos que tienen incorporados las distintas secuencias de los genes de pluripotencia. Sin embargo, estos plásmidos son diluidos en las células al momento que estas se dividen<sup>10</sup>. Los resultados demuestran que Oct-4 y Sox-2 exógenos, están pobremente expresados en las iPSCs, lo que indica que las células utilizadas en la investigación fueron capaces de diluir los plásmidos. Adicionalmente, los resultados no nos permiten afirmar si el ADN del

plásmido se incorporó o no al ADN genómico de la iPSCs. Sin embargo, la literatura ha demostrado que la probabilidad de que esto ocurra es muy baja<sup>10</sup>.

Los fibroblastos sanos, al ser células ya diferenciadas, presentan una baja expresión de los genes marcadores de pluripotencia, lo que permite confirmar su utilidad como control negativo.

## CONCLUSIÓN

Se determinó que el gen RPL13a es una mejor opción que GAPDH y EEF1A para normalizar el nivel de expresión de los genes utilizados en iPSCs derivadas de fibroblastos de un sujeto sano (n=4) y otro con Alzheimer (n=5), a diferencia de lo que se esperaba según la literatura, en donde se utiliza GAPDH como gen normalizador.

A pesar de que la expresión de Oct-4 es a lo menos 3 veces menor en los clones de Alzheimer que en los sanos, la alta expresión de los factores de pluripotencia Oct-4 y Sox-2, demuestra que las iPSCs derivadas de fibroblastos, tanto de un sujeto con Alzheimer como de una mujer sana, son potencialmente pluripotentes. Esto da paso a diferenciarlas a neuronas que se comportan de forma similar a las de la paciente y así poder utilizarlas como modelo para testear fármacos (in vitro) y desarrollar terapias personalizadas para esta enfermedad (in vivo).

El siguiente estudio contribuye al desarrollo de la medicina personalizada que se encuentra actualmente en constante progreso, con especial énfasis en el Alzheimer que no presenta cura y podría incluso, teniendo este modelo de pruebas, hallarse la medicina específica para detener su avance en cada paciente, teniendo gran impacto a nivel mundial.

La principal limitación de este estudio es la extrapolabilidad, ya que sólo se estudió un tipo de Alzheimer (Esporádico), por lo que no se pueden incluir todas las variantes de esta enfermedad. Además, las muestras son sólo de un sujeto con Alzheimer y de otro sano, por lo que esto da un rango del cual no se puede generalizar.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Markus Uhrig del Centro de Medicina Regenerativa de la Universidad del Desarrollo por la ayuda brindada y por guiarnos durante la realización de esta investigación. También agradecemos a Daniela Ponce y María Isabel Behrens del Centro de Investigación Clínica Avanzada (CICA) Hospital Clínico/Facultad de Medicina, Universidad de Chile por aportar los fibroblastos a reprogramar con el consentimiento correspondiente de los sujetos.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Declaramos que los contenidos evidenciados en este estudio son de exclusiva responsabilidad de los



integrantes de este trabajo de investigación, tanto en el ámbito de la originalidad como académica.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Silva GR de M, Reis GK, Lopes KA, Rebelo LS, Alencar SRF de, Serra V da S, et al. Nursing: a study of the physiopathology of Alzheimer's and its alternative treatments with stem cells and cannabis. *Res Soc Dev*. 2020 Nov 17;9(11):e39891110094.
- Devineni A, Tohme S, Kody MT, Adams Cowley R, Harris BT. Stepping back to move forward: A current review of iPSCs in the fight against alzheimer's disease. Vol. 5, *American Journal of Stem Cells*. E-Century Publishing Corporation; 2016. p. 99–106.
- Niu H, Álvarez-Álvarez I, Guillén-Grima F, Aguinaga-Ontoso I. Prevalencia e incidencia de la enfermedad de Alzheimer en Europa: metaanálisis. *Neurología*. 2017 Oct 1;32(8):523–32.
- J. Larry J. Harrison. Principios de Medicina Interna. In: Harrison: Principios de Medicina Interna 20th Edición. 20th ed. McGraw-Hill Interamericana; 2019. p. 3108–11.
- Yang J, Li S, He XB, Cheng C, Le W. Induced pluripotent stem cells in Alzheimer's disease: Applications for disease modeling and cell-replacement therapy. *Mol Neurodegener*. 2016 May 17;11(1).
- Robbins JP, Price J. Human induced pluripotent stem cells as a research tool in Alzheimer's disease. *Psychol Med*. 2017 Nov 1;47(15):2587–92.
- Mostajo-Radji MA, Ferreira LMR. Cambiando la Identidad celular para crear una verdadera medicina personalizada. *Gac Médica Boliv*. 2012;
- Ilic D, Devito L, Miere C, Codognotto S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br Med Bull*. 2015 Nov 17;116(1):ldv045.
- Ritthaphai A, Wattanapanitch M, Pithukpakorn M, Heepchantree W, Soi-ampornkul R, Mahaisavariya P, et al. Derivation of an induced pluripotent stem cell line (MUSli004-A) from dermal fibroblasts of a 48-year-old spinocerebellar ataxia type 3 patient. *Stem Cell Res*. 2018 Jul 1;30:113–6.
- Okita K, Matsumura Y, Sato Y, Okada A, Morizane A, Okamoto S, et al. A more efficient method to generate integration-free human iPS cells. *Nat Methods*. 2011 May 3;8(5):409–12.
- Guini Song, Min Zhao, Hanmin Chen, Xiangyue Zhou, Cameron Lenahan, Yibo Ou, et al. The Application of Brain Organoid Technology in Stroke Research: Challenges and Prospects. *Front Cell Neurosci*. 2021 Jun 21;15.
- Vangipuram M, Ting D, Kim S, Diaz R, Schüle B. Skin punch biopsy explant culture for derivation of primary human fibroblasts. *J Vis Exp*. 2013;(77).
- Bang JS, Choi NY, Lee M, Ko K, Lee HJ, Park YS, et al. Optimization of episomal reprogramming for generation of human induced pluripotent stem cells from fibroblasts. *Animal Cells Syst (Seoul)*. 2018 Mar 4;22(2):132–9.
- Fernando L, Farfán T. La reprogramación en la obtención de células madre pluripotentes inducidas Reprogramming in obtaining induced pluripotent stem cells. Vol. 10, *ECIPeru: Revista del Encuentro Científico Internacional*, ISSN-e 1813-0194, Vol. 10, No. 1 (Octubre), 2013, págs. 9-13. ECI (Encuentro Científico Internacional); 2013.
- ThermoFisher. TRIzol RNA Isolation Reagents [Internet]. ThermoFisher Scientific. [cited 2021 Apr 5]. Available from: [www.thermoFisher.com/cl/es/home/brands/product-brand/trizol.html](http://www.thermoFisher.com/cl/es/home/brands/product-brand/trizol.html)
- Optosky. NanoBio 200 spectrophotometer [Internet]. Optosky spectroscopy solutions. [cited 2021 Apr 5]. Available from: [https://optosky.com/nanobio200.html?gclid=CjwKCAjwx6WDBhBQEiwA\\_dP8rVfZCW\\_GuC9vWUSU2NxLqr6PaUesakRCKv8xuOf9hEJPDOK7bsHMxoCesEQA\\_vD\\_BwE](https://optosky.com/nanobio200.html?gclid=CjwKCAjwx6WDBhBQEiwA_dP8rVfZCW_GuC9vWUSU2NxLqr6PaUesakRCKv8xuOf9hEJPDOK7bsHMxoCesEQA_vD_BwE)
- Desjardins PR, Conklin DS. Microvolume quantitation of nucleic acids. *Curr Protoc Mol Biol* [Internet]. 2011 Jan [cited 2021 Apr 5];Appendix 3(SUPPL.93). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21225636/>
- Foroutan T. Comparison of differentiation of induced pluripotent stem cells and bone-marrow mesenchymal stem cells to osteoblast: Osteogenesis versus pluripotency. *Int J Organ Transplant Med*. 2016;7(2):91–6.
- Artyukhov AS, Dashinimaev EB, Tsvetkov VO, Bolshakov AP, Konovalova E V., Kolbaev SN, et al. New genes for accurate normalization of qRT-PCR results in study of iPS and iPS-derived cells. *Gene*. 2017 Aug 30;626:234–40.
- Jerabek S, Merino F, Schöler HR, Cojocaru V. OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency. Vol. 1839, *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. Elsevier; 2014. p. 138–54.
- Festuccia N, Osorno R, Halbritter F, Karwacki-Neisius V, Navarro P, Colby D, et al. Esrrb is a direct Nanog target gene that can substitute for Nanog function in pluripotent cells. *Cell Stem Cell*. 2012 Oct 5;11(4):477–90.

