

29. Salud humana

Construcción de un adenovirus recombinante regulable portador de los genes de pluripotencia y de gen GFP para implementar en rejuvenecimiento celular mediante reprogramación celular parcial

Autor: Chiavellini, Priscila; priscilachiavellini@gmail.com

Co-autor(es): Lehmann, Marianne; marianne.lehmann@gmail.com; Canatelli Mallat, Martina;
martinacanatellimallat@gmail.com

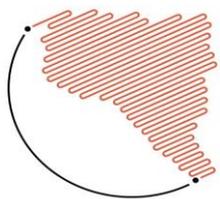
Orientador: Goya, Rodolfo Gustavo; goya@isis.unlp.edu.ar

Bioquímica del envejecimiento / Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata /
Facultad de Ciencias Médicas
Universidad Nacional de La Plata

Resumen

La reprogramación celular convencional involucra convertir un linaje celular somático a células madre pluripotentes inducidas (iPSC), las cuales pueden ser posteriormente re-diferenciadas a tipos celulares específicos. De manera alternativa, la reprogramación celular parcial convierte células somáticas en otros tipos celulares por expresión transitoria de genes de pluripotencia, procedimiento que genera intermediarios celulares pluripotentes que retienen la identidad celular original, pero que están rejuvenecidos y responden a cócteles apropiados de factores de diferenciación específicos. En este contexto, el rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial constituye un campo de investigación emergente. Para su implementación, los sistemas de expresión regulables policistrónicos, generalmente integrativos, son ampliamente utilizados. Con el mismo propósito, hemos construido un adenovirus recombinante (no integrativo) regulable de alta capacidad que contiene el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) y los genes oct4, sox2, klf4 y c-myc (OSKM, o genes de pluripotencia). Estos genes OSKM se encuentran ensamblados como un tándem bicistrónico (STEMCCA) bajo el control de un promotor bidireccional regulable por sistema Tet-Off que controla también la expresión de la GFP. Separadamente, un segundo cassette expresa constitutivamente la proteína regulatoria tTA. En este trabajo se describe la generación de dicho adenovector dependiente de virus auxiliar y la caracterización del mismo mediante diversas técnicas. Este adenovector constituye una herramienta promisoría para la implementación de reprogramación celular no integrativa.

Palabras claves: reprogramación celular, rejuvenecimiento, adenovirus.



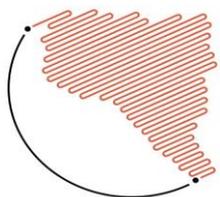
Introducción

En el siglo pasado, el desarrollo de la clonación animal y el subsecuente avance de la tecnología de la reprogramación celular dieron lugar a nuevas teorías sobre la biología del envejecimiento. Estos hallazgos iniciaron con el uso de la transferencia nuclear de célula somática (SCNT) inicialmente descrita en anfibios (Gurdon, 1962; GURDON, 1962) y luego en mamíferos (Grisham, 2002; Hochedlinger & Jaenisch, 2002; Wilmut, Schnieke, McWhir, Kind, & Campbell, 1997), los cuales demostraron que el genoma de las células adultas mantiene su integridad. Esta característica permite a las células readquirir el potencial de diferenciarse a todos los tipos de células embrionarias y, en condiciones apropiadas, desarrollar un organismo completo con esperanza de vida normal, revirtiendo las marcas asociadas al envejecimiento encontradas en células de organismos entrados en edad.

En 2006, Takahashi y Yamanaka (Takahashi & Yamanaka, 2006), demostraron que la transferencia de los genes de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM, o factores de reprogramación) a cultivos de células somáticas de ratones adultos es capaz de reprogramarlas, llevándolas a una etapa de pluripotencia en la que adquirirían el fenotipo de células madre

embrionarias. Estas células recibieron el nombre de células madre pluripotentes inducidas (iPSC, por las siglas en inglés de *induced pluripotent stem cells*) y marcaron el nacimiento del campo de la reprogramación celular y su posterior implementación en rejuvenecimiento celular (López-León, Outeiro, & Goya, 2017).

La tecnología de las iPSC fue, como se mencionó anteriormente, la primera estrategia de reprogramación celular desarrollada. La misma implica desdiferenciar una línea celular somática a iPSC, que posteriormente se puede volver a diferenciar en tipos de células somáticas específicas. Hoy en día, es la estrategia más utilizada para convertir un tipo de célula somática en otro y es prácticamente el único procedimiento empleado hasta ahora para rejuvenecer células (López-León & Goya, 2017). Por ejemplo, se ha demostrado que al reprogramar fibroblastos cutáneos de voluntarios sanos centenarios a iPSC y re-diferenciarlos nuevamente a fibroblastos, estas células adquieren el fenotipo de fibroblastos de individuos jóvenes: sus telómeros se elongan, sus perfiles de expresión génica se vuelven típicos de fibroblastos de personas jóvenes, los niveles de stress oxidativo y el metabolismo celular se restauran y resultan comparables a los de fibroblastos

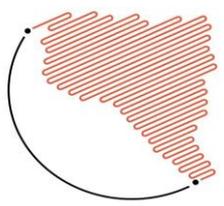


de donantes jóvenes (Lapasset et al., 2011).

A la luz de la evidencia reseñada más arriba, la hipótesis que está emergiendo es que el envejecimiento es al menos en parte, si no en gran medida, una manifestación de cambios epigenéticos reversibles donde el daño acumulativo en el ADN no parece jugar un rol radical, como durante mucho tiempo se pensó (Goya et al., 2018; Rando & Chang, 2012). Estudios en organismos modelo tales como levaduras, gusanos y moscas han demostrado que el envejecimiento está asociado a una progresiva desregulación de la cromatina. En las células jóvenes, el genoma se encuentra en un nivel relativamente alto de represión transcripcional que está en parte vinculado a una alta metilación del ADN y a niveles relativamente elevados de histona H3 trimetilada en la lisina 9 (H3K9me3) y lisina 27 (H3K27me3) e histona H4 trimetilada en la lisina 20 (H4K20me3) que son marcas epigenéticas represoras, así como a niveles relativamente bajos de histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3) y la histona H4 acetilada en la lisina 16 (H4K16ac), donde ambas modificaciones actúan como marcas epigenéticas activadoras de la transcripción. Durante el envejecimiento las marcas epigenéticas represoras se van perdiendo y las activadoras aumentan. Al mismo tiempo

los niveles de metilación del ADN disminuyen (Sen, Shah, Nativio, & Berger, 2016). Estas marcas epigenéticas son influenciadas por factores ambientales endógenos (ej. hormonas) o exógenos (ej. nutrición).

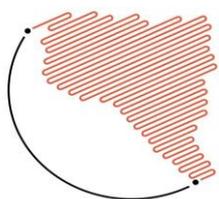
Retomando las iPSC, dado que los protocolos para su generación incluyen varios pasos, la eficiencia con la que se genera el tipo celular deseado puede ser baja. Además, existen una serie de preocupaciones sobre la seguridad de las células derivadas de iPSC que deben abordarse antes de poder ser utilizadas clínicamente (Okano et al., 2013). El potencial tumorigénico de las iPSCs contaminantes que fallan en la diferenciación al tipo celular deseado aumenta el riesgo en la aplicación clínica de células somáticas inducidas por este procedimiento (Miura et al., 2009). Estas limitaciones conllevaron a la búsqueda de nuevas estrategias de reprogramación que incluyeran la conversión directa entre dos tipos celulares. Una de esas estrategias fue inicialmente llamada Reprogramación Directa mediada por factores de pluripotencia (PDR por sus siglas en inglés, *pluripotency factor mediated direct reprogramming*), hoy en día más conocida como reprogramación parcial (Janghwan Kim, Ambasadhan, & Ding, 2012). Esta técnica utiliza células somáticas completamente diferenciadas y las convierte en otro tipo de células



somáticas por expresión transitoria de 2 a 5 días de los genes de pluripotencia, generando intermediarios epigenéticamente inestables, los cuales responden a factores de diferenciación apropiados (Efe et al., 2011; J. Kim et al., 2011; S. M. Kim et al., 2014).

La estrategia por PDR se originó por las primeras observaciones que indicaban que las iPSCs se generan de manera secuencial o estocástica (Artyomov, Meissner, & Chakraborty, 2010; Brambrink et al., 2008; Hanna et al., 2009; Ma, Xie, Laurent, & Ding, 2013; Stadtfeld, Maherali, Breault, & Hochedlinger, 2008). De ser así, las células se podrían manipular en un estado temprano de inestabilidad epigenética inducido por los factores de pluripotencia OSKM (Janghwan Kim et al., 2012). En presencia de determinados factores de diferenciación, esos intermediarios epigenéticamente inestables podrían ser posteriormente inducidos a diferenciarse a varios linajes celulares somáticos con perfiles epigenéticos más estables (J. Kim et al., 2011; Janghwan Kim et al., 2012; S. M. Kim et al., 2014). El hecho demostrado de que estos intermediarios pasan a través de un estado transitorio de pluripotencia, implica que la reprogramación parcial aplicada a células somáticas de donantes de edad avanzada podrían al menos borrar parte de las marcas epigenéticas asociadas al envejecimiento.

En 2016, se reportó por primera vez que la reprogramación parcial *in vivo* podía atenuar las marcas de envejecimiento tanto en células como en órganos (Ocampo et al., 2016). Este trabajo, realizado en un modelo de ratones de envejecimiento prematuro que a su vez eran transgénicos para los genes OSKM regulados por un sistema Tet-On, demostró que la activación cíclica *in vivo* de los genes (lograda por adición y remoción de doxiciclina en el agua de bebida de los animales) podía borrar las marcas epigenéticas asociadas al envejecimiento manteniendo las propias de identidad celular. De esta misma manera, la reprogramación parcial cíclica *in vivo* demostró no sólo revertir el envejecimiento celular sino también extender la esperanza de vida de los ratones progericos. En el mismo estudio, se utilizaron ratones transgénicos no progericos de 12 meses de edad. En ellos, la reprogramación parcial cíclica mejoró la capacidad de regeneración de su páncreas y músculo esquelético e hizo a estos tejidos más resistentes a un traumatismo subsecuente. Específicamente, después de la administración de estreptozotocina o de la aplicación de una lesión mecánica, la inducción transitoria cíclica de OSKM desencadenó la proliferación de células beta en el páncreas y de células satélite en el músculo esquelético. Las células



satélite son críticas para el mantenimiento de la homeostasis tisular, pero su número en el músculo generalmente disminuye con la edad. Por lo tanto, los beneficios de la reprogramación parcial cíclica pueden ir más allá del rejuvenecimiento de los animales viejos, siendo un potencial tratamiento regenerativo.

Se han realizado numerosos esfuerzos para construir vectores de transferencia de los genes OSKM virales y no virales para implementar la reprogramación celular no integrativa. Entre los vectores virales evaluados se encuentran los adenovirus recombinantes, que no integran sus genes en el genoma de la célula diana, evitando así el riesgo de mutagénesis de inserción (Zhou & Freed, 2009). Además de la seguridad ofrecida por los adenovectores, la alta capacidad de clonación de los llamados adenovectores dependientes de auxiliar (HD-Rad, por sus siglas en inglés Helper Dependent Recombinant Adenovirus.) les permite albergar cassettes de expresión policistronica con sus elementos reguladores asociados (Józkowicz & Dulak, 2005). Por lo tanto, hay un interés renovado en el uso de vectores adenovirales para la transferencia de genes de pluripotencia no integrativa a células somáticas.

Con el fin de realizar una reprogramación parcial no integrativa, informamos aquí la construcción de un adenovirus

recombinante policistronico regulable que expresa los genes OSKM y el gen reportero de la proteína fluorescente verde GFP, todos bajo el control de un promotor bidireccional Tet-Off.

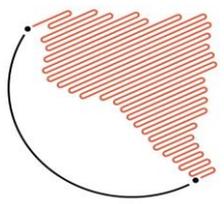
Objetivos

El objetivo de este trabajo se basa en generar, amplificar, purificar y caracterizar un adenovector dependiente de auxiliar (HD-Ad) regulable que expresa el gen de la GFP y los genes de pluripotencia OSKM. Estos últimos se encuentran organizados como un tándem bicistronico (tándem STEMCCA) colocado bajo el control de un promotor bidireccional Tet-Off que también controla la expresión del gen GFP, a cargo del gen de la proteína reguladora tTA. Este vector tiene como propósito la implementación de la reprogramación celular parcial no integrativa para la génesis de células somáticas inducidas de interés terapéutico, la implementación del rejuvenecimiento celular mediante reprogramación parcial manteniendo la identidad del tipo de célula y la implementación de la terapia génica regenerativa in vivo en algunas regiones específicas del cerebro, como el sistema neuroendocrino.

Materiales y métodos

Células

Células HEK293



Se cultivaron en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium alto en glucosa, 16.8 mM de buffer Hepes (pH 7.0), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 20 mg/l de penicilina/estreptomicina, 3.3 mg/l de anfotericina B, 2.2 mg/l de NaHCO₃, y 10% (v / v) de suero bovino fetal. Se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire - 5% de CO₂. Se les renovó el medio de cultivo cada 3-4 días y se repicaron cuando confluyeron.

Células HEK29 Cre

Esta línea celular fue proporcionada por Microbix junto con el kit de construcción HDAd. Dichas células tienen las mismas características que la línea estándar HEK293, pero además albergan el gen para la recombinasa Cre. Se cultivaron en medio esencial mínimo de Eagle, 16.8 mM de tampón Hepes (pH 7.0), glutamina 2 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, 20 mg/l de penicilina/estreptomicina, 3.3 mg/l de anfotericina B, 2.2 mg/l de NaHCO₃, geneticina (0,4 mg / ml) y 10% (v / v) de suero bovino fetal. Se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95% de aire - 5% de CO₂. Se les renovó el medio de cultivo cada 3-4 días y se repicaron cuando confluyeron.

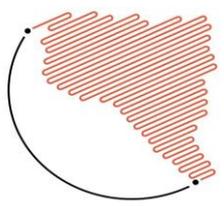
Fibroblastos

Se anestesiaron ratas intactas de dos meses de edad con isofluorano y fibroblastos obtenidos de la mitad distal de la cola del animal. Después de la

esterilización con etanol al 70%, se cortaron muestras de tejido de 2 cm de largo y se colocaron durante 5 minutos en etanol al 70%. Se dejaron secar y se transfirieron a un plato con medio completo (DMEM alto en glucosa + ATB / ATM + 10% SFB). Después de la eliminación del vello, se cortaron en trozos de tamaño <5 mm y se digirieron con colagenasa tipo I (SIGMA Chem. Co, St. Louis, MO) disuelto en medio de cultivo completo (0,01 mg de colagenasa tipo I por cola). Después de la digestión a 37 °C, la suspensión celular se centrifugó a 200 rpm durante 90 min. Luego, las muestras se filtraron a través de un filtro de 40 µm, se resuspendieron en medio completo y se centrifugaron durante 8 min a 1000 × g. Los sedimentos celulares se resuspendieron en 6 ml de medio completo fresco. La centrifugación y la resuspensión se realizaron dos veces más. Cada muestra se sembró en botellas de cultivo de 25 cm² (Greiner, Pleidelsheim, Alemania). El medio completo se reemplazó cada 3 días.

Construcción del adenovirus recombinante HD-RAAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off

El adenovector se construyó utilizando un kit comercial (Microbix Inc., Ontario, Canadá) que proporciona el plásmido transportador pC4HSU, el adenovirus auxiliar H14 y la línea celular HEK293 Cre4. Como punto de partida, utilizamos un derivado del plásmido pLPBL-1 (una

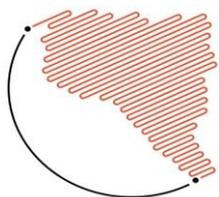


donación del Dr. KCL Oka) en el que clonamos un promotor bidireccional regulable Tet-Off corriente arriba del gen de la GFP. En un sitio de clonado múltiple del plásmido (MSC), se clonó un cassette constitutivo que expresa la proteína reguladora tTA. Dicho plásmido se nombró pLPBL-BD-tTA-GFP. En el otro MCS presente al otro lado del promotor bidireccional, se clonó el tándem bicistrónico Oct4-f2A-Klf4-ires-Sox2-p2A-cMyc (tomado del plásmido pHAGE2-hSTEMCCA-loxP, proporcionado generosamente por el Dr. Gustavo Mostoslavsky, Boston University) (Sommer et al., 2009), que alberga los cuatro genes de OSKM agrupados en pares colocados corriente abajo y corriente arriba de un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES). A su vez, cada par de genes están unidos mediante una secuencia corta de auto-procesamiento de tipo 2A CHYSEL (elemento hidrolasa que actúa en cis) que hace que el ribosoma omita el enlace Gly-Pro en el extremo C-terminal de la secuencia 2A, liberando así el péptido en sentido ascendente del elemento 2A, pero continúa con la traducción de la secuencia de ARNm en sentido descendente. Esto permite una co-expresión casi estequiométrica de los dos cistrones que flanquean una secuencia de tipo 2A (Wang, Wang, Wang, Zhao, & Xia, 2015). La construcción así generada recibió el

nombre de pLPBL-TRE-STEMCCA-tTA.

Luego, el cassette de expresión completo (cassette STEMCCA de 10.065 pb) se escindió del pLPBL-TRE-STEMCCA-tTA con las nucleasas BstZ171 y Ascl y posteriormente se clonó en el plásmido pC4HSU-HD, en los sitios Ascl y SwaI, dando lugar a pC4HSU-STEMCCA-GFP-Tet-Off. El pC4HSU-HD posee las repeticiones terminales invertidas (ITR) para el virus Ad 5, la señal de empaquetamiento y parte de la región adenoviral E4, sumado a un relleno de ADN no codificante de origen humano que mantiene al ADN viral en un tamaño adecuado para su empaquetamiento (28-31 kpb). Entre las dos ITR hay una secuencia bacteriana flanqueada por sitios PmeI. El plásmido pC4HSU-STEMCCA-GFP-Tet-Off fue digerido con PmeI para eliminar la secuencia bacteriana, generando así el genoma lineal del HD-RAAd deseado.

El ADN linealizado del nuevo HD-RAAd se transfectó en células HEK293 Cre, que a su vez se infectaron con virus auxiliar H14 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5. En el virus H14, la señal de empaquetamiento está flanqueada por sitios lox P reconocidos por la recombinasa Cre. La recombinasa Cre se expresa en las células HEK293 Cre, y escinde el segmento de ADN que contiene la señal de empaquetamiento, haciendo que el genoma del H14 no pueda



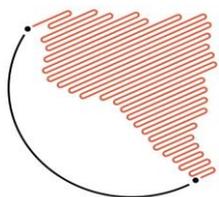
empaquetarse. Por lo tanto, el virus auxiliar proporciona las cápsidas virales necesarias para la generación del HD-RAd deseado, denominado finalmente HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off. Las células HEK293 Cre infectadas se dejaron durante 2-3 días hasta que fue evidente el efecto citopático (CPE). Las células y el medio se recogieron y se sometieron a tres ciclos de congelación y descongelación para lisarlos. Se obtuvieron lisados claros que fueron mezclados con el virus H14 y se agregaron a un cultivo fresco de células HEK293 Cre a una MOI 1. Cuando hubo CPE, se prepararon lisados celulares del pasaje o iteración 2 (P2). Este proceso de coinfección iterativa se llevó a cabo cinco veces más para generar suficientes partículas de HD-RAd como para proceder a la etapa de purificación. Las células se recolectaron y lisaron y el sedimento se sometió a dos etapas de ultracentrifugación en un rotor SW60Ti, primero durante 1 hora a $180.000 \times g$ en un gradiente de CsCl discontinuo a 18°C , seguido de una ultracentrifugación de 18 horas a la misma gravedad en 1.35 g/ml de gradiente isopícnico de CsCl. El stock final de virus se tituló lisando las partículas virales, extrayendo su ADN y determinando su concentración en un espectrofotómetro Nanodrop. Para la primera preparación, el título fue de 12×10^{11} pvp / ml.

Regulabilidad del vector plasmídico

Se sembraron células HEK293 en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 20×10^3 células por pocillo. Las células se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen, Argentina) a 37°C , 5% de CO_2 , y a los pocillos correspondientes se les adicionó doxiciclina 1000 ng/ml. El día +1 post siembra, se realizó la transfección de las células con el vector plasmídico HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off utilizando lipofectamina X-treme®. Las células se mantuvieron en cultivo durante 8 días post-siembra adicionando diariamente doxiciclina 1000 mg/ml en los respectivos pocillos. Cada día, las células fueron observadas en un microscopio invertido de fluorescencia (Olympus IX-71) y se captaron imágenes con una cámara digital para su posterior análisis.

Curva dosis-respuesta

Los fibroblastos primarios de cola de rata (pasaje 5) se sembraron a una densidad de 20×10^3 células por pocillo en una placa de 24 pocillos. Las células se cultivaron en medio DMEM (Invitrogen, Argentina) a 37°C , 5% de CO_2 , y se trataron con concentraciones de doxiciclina entre 0 y 500 ng / ml. Al día siguiente (día +1), se transdujeron con $2,4 \times 10^9$ pvp HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off por pozo durante 3 horas y se mantuvieron en cultivo. Tres días después de la infección (día +4), las células se lavaron dos veces con PBS durante 10



minutos y se trataron con buffer de lisis (TRITON X-100 0,1%, EDTA 1 mM, PBS) durante 30 minutos a 4°C. El lisado celular se centrifugó a 14000 x *g* durante un minuto. El sobrenadante se transfirió a una microplaca. La fluorescencia se midió en un Detector multimodo Beckman Coulter DTX 880, utilizando un filtro de excitación de 485/20 nm y un filtro de emisión de 535/25 nm.

Inmunocitoquímica de productos génicos OSKM

Se sembraron fibroblastos primarios de cola de rata en cubreobjetos de vidrio estériles, ubicados en una placa de 24 pocillos con una densidad de 20×10^3 células por pocillo. Las células se cultivaron en medio DMEM y 10% de suero bovino fetal a 37°C y 5% de CO₂. Los fibroblastos del día siguiente (día +1) se transdujeron con $2,4 \times 10^9$ pvp de HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off por pocillo durante 3 h y se mantuvieron en cultivo. La inmunocitoquímica se realizó el día +4. Las células se lavaron con PBS, se fijaron con formaldehído al 4% durante 30 minutos y se incubaron con anticuerpos primarios durante 45 minutos. Se usaron los siguientes anticuerpos, según corresponda, anti-hOct4 hecho en ratón (1:10, BD Pharmingen, San Jose, CA), anti-hSox2 hecho en ratón (1:40, BD Pharmingen, San Jose, CA), anti-hKlf4 hecho en ratón (1: 100, Ab Cam, Cambridge, MA) y anti-hc-Myc hecho en

ratón (1:50, BD Pharmingen, San José, CA). Luego, las células se incubaron con suero de caballo y anticuerpo anti-ratón biotilado (1: 300, Vector Labs, Burlingame, CA) durante 45 minutos y luego con complejo de avidina-biotina-peroxidasa durante 30 minutos. Las células se incubaron finalmente con 3, 3'-diaminobencidina-tetrahydrocloruro (DAB). Se lavaron con PBS, se montaron con Fluoromount TM (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), se cubrieron y se observaron con un microscopio Olympus BX51 equipado con una cámara de video DP70 CCD (Tokio, Japón). El procesamiento de imagen posterior se realizó con el software Image-Pro® Plus (Versión 5.1.2, Media Cybernetics, Inc)

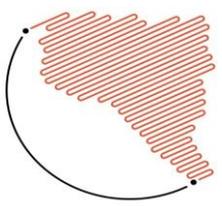
Análisis estadístico

El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó, según corresponda, para evaluar las diferencias de grupo.

El test de Tukey fue elegido como una prueba post hoc.

Resultados y discusión

Para la construcción del adenovirus recombinante dependiente de auxiliar, se partió de un vector plasmídico que posee los componentes básicos del genoma de un adenovirus HD. Este a su vez alberga la construcción principal del cassette STEM CELL (STEMCCA) compuesto por los genes OSKM en un sistema policistrónico bajo el promotor



bidireccional regulable CMVmin-TRE-CMVmin. Dicho promotor también regula la expresión de la proteína reportera fluorescente verde GFP, y se encuentra regulado por un sistema Tet-Off dependiente de doxiciclina, más

analizar cómo respondía el sistema de regulación Tet-Off.

En la primer condición se mantuvo el sistema activado constantemente los días que duró el experimento, sin agregados de doxiciclina. Como puede verse en la

Fig. 3 Amplificación y purificación del vector. El adenovector STEMCCA se amplificó mediante coinfecciones iterativas, al final de las cuales se generaron 48 botellas de cultivo de 175 cm² infectadas con el virus.

específicamente por la proteína transactivadora de tetraciclina (tTA) quimérica, creada mediante la fusión de una proteína, TetR (represor de tetraciclina), con el dominio de activación VP16, del Virus del Herpes Simple tipo 1

primera fila de la figura 2, el sistema se mantuvo activo durante todo el experimento, observable por la expresión del gen reportero GFP. En la segunda condición se suministró diariamente al medio de cultivo con doxiciclina 1000 ng/ml, con el fin de mantener el sistema reprimido de manera ininterrumpida. En la segunda fila de la fig. 2, la fluorescencia observable es prácticamente nula, no hay escapes significativos a la represión por doxiciclina. Por último, con el fin de evaluar la capacidad de reprimir el sistema una vez activo, se suministró diariamente doxiciclina 1000 ng/ml a partir del día +4 post siembra de células. Como se observa en la tercera fila de la fig. 2, la fluorescencia va disminuyendo a partir del día +4 conforme avanza el experimento, producto de la acción represora del antibiótico.



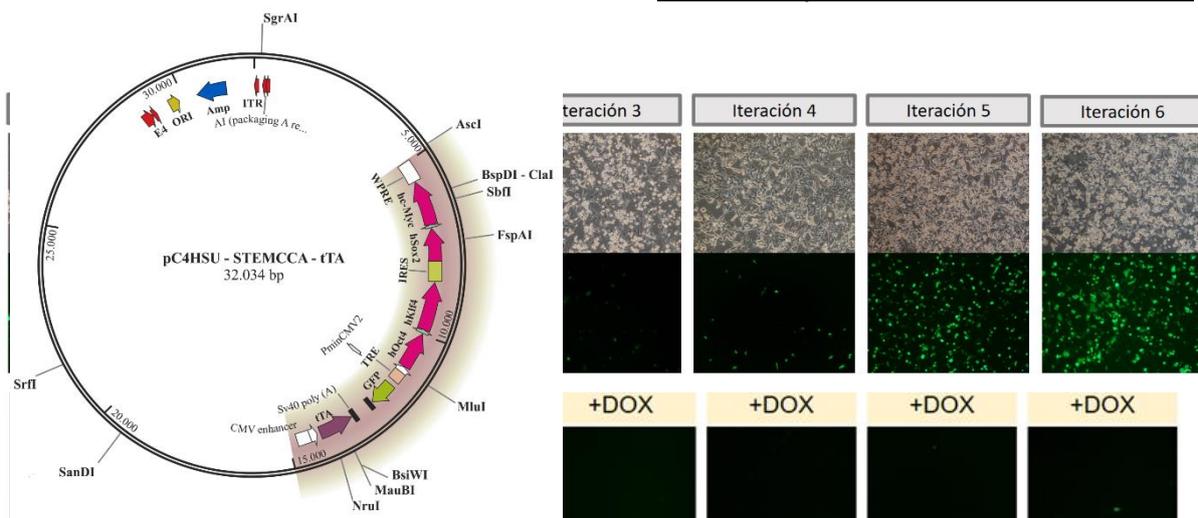
Fig. 1 Arriba, los componentes básicos del genoma de HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off después de eliminar la secuencia bacteriana de pC4HSU-tTA-STEMCCA-GFP. Proteína fluorescente verde GFP, elemento sensible a la tetraciclina TRE, proteína reguladora quimérica tTA, promotor mínimo del citomegalovirus PminCMV, señal de poliadenilación SV40pA, repeticiones terminales invertidas ITR, señal de empaquetamiento. Abajo, la construcción STEMCCA completa (incluyendo todos los componentes reguladores asociados) clonada en el plásmido genómico de HD que incluye una secuencia bacteriana entre sus ITR, flanqueados por sitios PmeI.

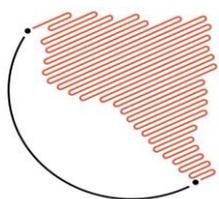
(Fig.1).

Regulabilidad del vector plasmídico

Se evaluaron tres condiciones de disponibilidad de doxiciclina con el fin de

Expansión y purificación del adenovector





Una vez que se generó el inóculo inicial del adenovector HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off, el virus se amplificó mediante seis coinfecciones con el virus H14 iterativas, al final de las cuales, en el pasaje 6, se utilizaron 48 botellas de cultivo de 175 cm² (Fig. 3). Se procedió a la purificación por gradientes de CsCl y se observó una banda principal del vector HD, y se recogió en una banda débil correspondiente al vector auxiliar H14. La incubación de 5 µl del vector HD purificado con células HEK 293 no indujo placas de lisis, lo que sugiere que los niveles de contaminación de H14 en la preparación de HD fueron despreciables.

Expresión del transgen

En cultivos primarios de fibroblastos de cola de rata, GFP muestra una expresión moderadamente alta (fluorescencia) que permanece en niveles constantes durante

al menos 5 días (Fig. 4).

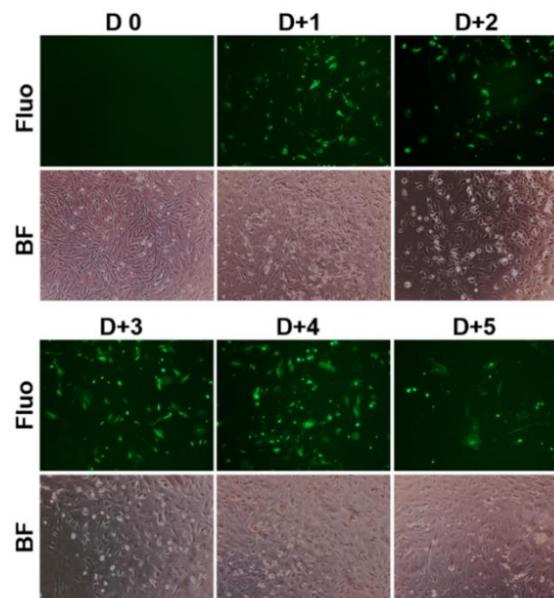


Fig. 4 Expresión en el transcurso del tiempo de GFP en fibroblastos transducidos: los fibroblastos cultivados en placas de 24 pocillos con una densidad de 20 x 10³ células por pocillo se transdujeron con HDRAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off purificado y se fotografiaron diariamente durante 5 días. La fila superior muestra imágenes de microscopía de fluorescencia, mientras que la fila inferior muestra micrografías de contraste de fase. Obj 10X.

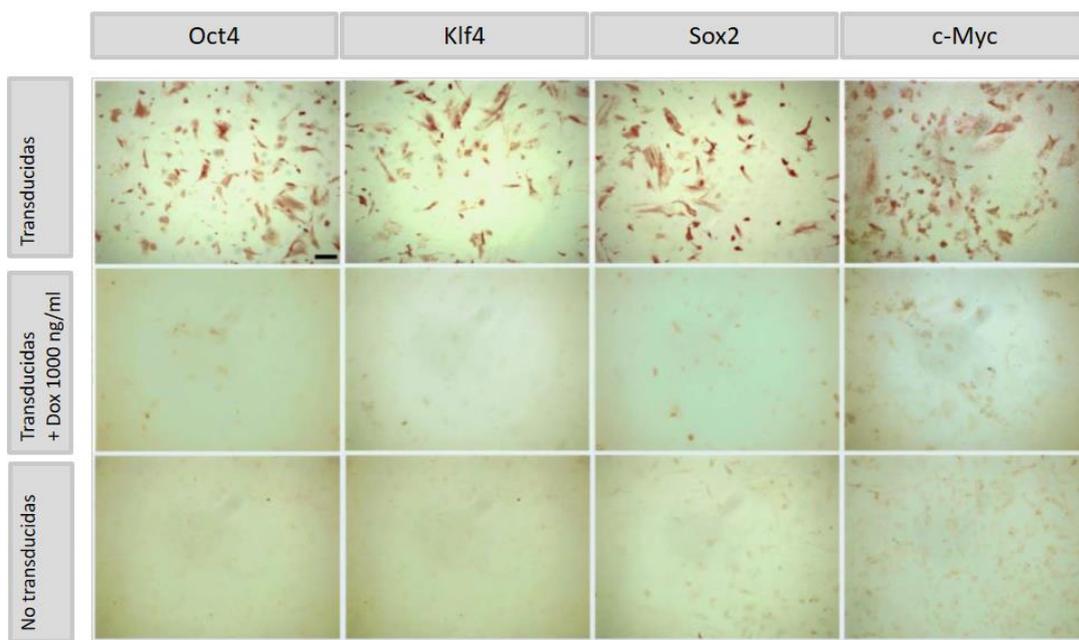


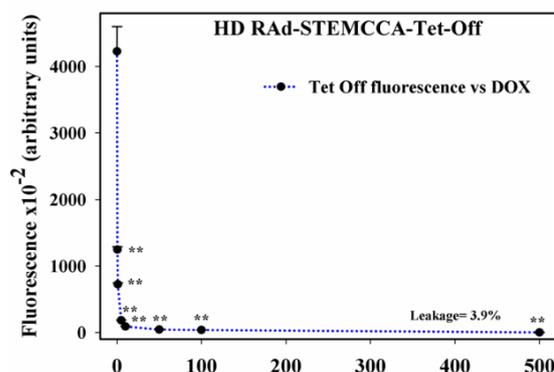
Fig. 5 Evaluación inmunocitoquímica de células transducidas con adenovector: los fibroblastos se cultivaron en cubreobjetos de vidrio en una placa de 24 pocillos con una densidad de 20×10^3 células por pocillo y se transdujeron con $2,4 \times 10^9$ pvp de HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off para bien. La inmunocitoquímica para OSKM se realizó en el día 3 posterior a la transducción. La fila superior muestra la expresión de cada uno de los genes OSKM en células transducidas por vector, la fila central muestra células transducidas de manera similar que crecen en presencia de DOX de 1.000 ng / ml, mientras que la fila inferior muestra expresión de los mismos genes en células no transducidas. Objetivo 10X.

La evaluación inmunocitoquímica de la expresión del gen OSKM en los fibroblastos transducidos con HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off (durante 3 días) reveló una expresión significativa de los genes OSKM, mientras que los fibroblastos control no transducidos no mostraron inmunoreactividad significativa para Oct4 Sox2 y Klf4. Se observó una inmunorreactividad débil para c-myc. La inmunocitoquímica de las células transducidas cultivadas en presencia de doxiciclina 1000 ng / ml mostró marcación basal comparable con los fibroblastos de control (Fig. 5).

Regulabilidad del adenovector

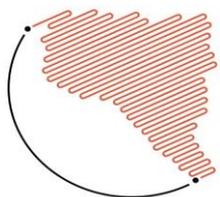
Los niveles de fluorescencia de los

fibroblastos de rata transducidos con HD-



RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off incubados por triplicado con doxiciclina en distintas concentraciones (de 0 a 500 ng/ml), mostraron una fuerte reducción dependiente de doxiciclina. A

Fig. 6 Expresión dependiente de doxiciclina (DOX) de la GFP de HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off en fibroblastos de rata - La expresión de fluorescencia en HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off-fibroblastos de rata se reduce a medida que la concentración de DOX aumenta en el medio de cultivo. Las células se lisaron 3 días después de la transducción. La meseta de fluorescencia se alcanzó a aproximadamente 10 ng / ml de DOX. En este punto, la intensidad de la fluorescencia fue del 3.9% de los niveles de DOX de 0 ng / ml (fugas).



aproximadamente 10 ng/ml, la curva alcanza una meseta, mostrando un 3.9% de fluorescencia residual (fuga) (Fig. 6).

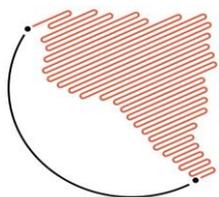
Conclusiones

Aunque nuestro adenovector es efectivo para transducir fibroblastos de ratas adultas, el hecho de que no integre sus cinco transgenes en el genoma de la célula huésped causará una dilución progresiva en el número de células transducidas a medida que proliferan. Esta limitación bien conocida de los adenovectores reduce significativamente su eficiencia para la reprogramación de células convencional (generación de iPSC), donde son necesarias 2–3 semanas de expresión continua de OSKM, no siendo el caso de la reprogramación parcial. Sin embargo, la expresión de transgenes en las estrategias de reprogramación parcial generalmente se requiere durante al menos 5 días. Como se muestra en Resultados, con nuestro vector, el número de fibroblastos que expresan GFP permanece bastante estable durante al menos 5 días después de la transducción, lo que permitirá su utilización como estrategia de reprogramación parcial.

Entre las aplicaciones de la reprogramación parcial, el rejuvenecimiento epigenético se encuentra como una de las que despiertan mayor interés en la actualidad. En este proceso de reprogramación, las células se

rejuvenecen epigenéticamente sin cambiar su identidad celular. Como se ha mencionado en la introducción, el rejuvenecimiento mediante la reprogramación parcial cíclica se ha logrado tanto *in vivo* como en cultivo celular, utilizando células y ratones transgénicos que expresan los genes OSKM controlados por un promotor regulable. Creemos que nuestro adenovector es adecuado para el rejuvenecimiento *in vitro* a pesar del hecho de que solo algunas de las células en cultivo serán transducidas. Aprovechando su fluorescencia, estas células transgénicas se podrán clasificar y separar físicamente por citometría de flujo y cell sorting, y, además, cada célula transgénica se podrá seguir y estudiar durante el proceso de rejuvenecimiento.

El logro efectivo de su aplicación en rejuvenecimiento así como en terapia génica probablemente enfrentará a los experimentadores con numerosos obstáculos técnicos, pero virtualmente cada avance en la medicina regenerativa (y la mayoría de los otros campos biomédicos) ha estado colmado de desafíos; sin embargo, en todos los casos, se encontraron formas ingeniosas para superarlos. Un obstáculo de este tipo es el hecho de que, si bien el sistema Tet-Off muestra una respuesta supresora rápida de la expresión del transgén en respuesta a doxiciclina, después de la eliminación



del antibiótico, el doxiciclina unido a la proteína tTA permanece parcialmente protegido del catabolismo normal, lo que causa una lenta reactivación de la transcripción de los transgenes silenciados. Una posible forma de evitar este problema es agregar doxiciclina por solo 1 día y luego eliminarlo. La expresión del transgén permanecerá relativamente baja durante 2 a 4 días, lo que parece razonable como un período de descanso. Aunque ya hemos construido el genoma de la versión Tet-On del vector STEMCCA HD, nuestras pruebas preliminares mostraron, como se esperaba, que si bien la adición de doxiciclina a los sistemas activa rápidamente la expresión transgénica, la eliminación del antibiótico no conduce a un rápido silenciamiento de los transgenes, por las razones dadas anteriormente. Ya que consideramos que la última limitación es más seria que la anterior para nuestros propósitos de rejuvenecimiento, optaremos por utilizar el sistema Tet-Off para nuestros estudios in vitro.

Referencias bibliográficas

Artyomov, M. N., Meissner, A., & Chakraborty, A. K. (2010). A model for genetic and epigenetic regulatory networks identifies rare pathways for transcription factor induced pluripotency. *PLoS Computational Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.100078>

5

Brambrink, T., Foreman, R., Welstead, G. G., Lengner, C. J., Wernig, M., Suh, H., & Jaenisch, R. (2008). Sequential Expression of Pluripotency Markers during Direct Reprogramming of Mouse Somatic Cells. *Cell Stem Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.01.004>

Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., ... Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb2164>

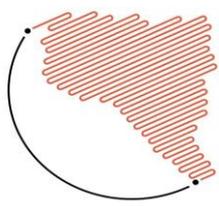
Goya, R. G., Lehmann, M., Chiavellini, P., Canatelli-Mallat, M., Hereñú, C. B., & Brown, O. A. (2018). Rejuvenation by cell reprogramming: A new horizon in gerontology. *Stem Cell Research and Therapy*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1075-y>

Grisham, J. (2002). Pigs cloned for first time. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/74335>

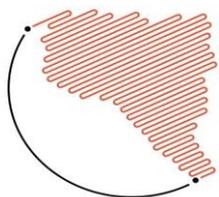
Gurdon, J. B. (1962). Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(62\)90043-X](https://doi.org/10.1016/0012-1606(62)90043-X)

GURDON, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*.

Hanna, J., Saha, K., Pando, B., Van Zon,



- J., Lengner, C. J., Creighton, M. P., ... Jaenisch, R. (2009). Direct cell reprogramming is a stochastic process amenable to acceleration. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature08592>
- Hochedlinger, K., & Jaenisch, R. (2002). Monoclonal mice generated by nuclear transfer from mature B and T donor cells. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature718>
- Józkowicz, A., & Dulak, J. (2005). Helper-dependent adenoviral vectors in experimental gene therapy. *Acta Biochimica Polonica*.
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., ... Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103113108>
- Kim, Janghwan, Ambasudhan, R., & Ding, S. (2012). Direct lineage reprogramming to neural cells. *Current Opinion in Neurobiology*. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.05.001>
- Kim, S. M., Flaßkamp, H., Hermann, A., Araúzo-Bravo, M. J., Lee, S. C., Lee, S. H., ... Han, D. W. (2014). Direct conversion of mouse fibroblasts into induced neural stem cells. *Nature Protocols*. <https://doi.org/10.1038/nprot.2014.056>
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ät-Hamou, N., ... Lemaitre, J. M. (2011). Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.173922.111>
- López-León, M., & Goya, R. G. (2017). The Emerging View of Aging as a Reversible Epigenetic Process. *Gerontology*. <https://doi.org/10.1159/000477209>
- López-León, M., Outeiro, T. F., & Goya, R. G. (2017). Cell reprogramming: Therapeutic potential and the promise of rejuvenation for the aging brain. *Ageing Research Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.09.002>
- Ma, T., Xie, M., Laurent, T., & Ding, S. (2013). Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circulation Research*. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.249235>
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., ... Yamanaka, S. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology*. <https://doi.org/10.1038/nbt.1554>
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.052>
- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., ... Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy



using induced pluripotent stem cells.
Circulation Research.

<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>

Rando, T. A., & Chang, H. Y. (2012). Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: Resetting the aging clock. *Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.01.003>

Sen, P., Shah, P. P., Nativio, R., & Berger, S. L. (2016). Epigenetic mechanisms regulating longevity and aging. *Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.06.014>. Chronic

Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *Stem Cells*.

<https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-1075>

Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., & Hochedlinger, K. (2008). Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.stem.2008.02.001>

Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*.

<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>

Wang, Y., Wang, F., Wang, R., Zhao, P., & Xia, Q. (2015). 2A self-cleaving peptide-

based multi-gene expression system in the silkworm *Bombyx mori*. *Scientific Reports*.

<https://doi.org/10.1038/srep16273>

Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., & Campbell, K. H. S. (1997). Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*.

<https://doi.org/10.1038/385810a0>

Zhou, W., & Freed, C. R. (2009). Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*.

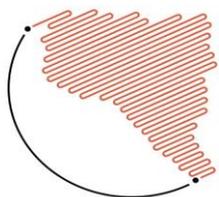
<https://doi.org/10.1002/stem.201>

Agradecimientos

Las autoras agradecemos al Dr. Gustavo Mostoslavsky, de la Universidad de Boston, por la generosa donación del plásmido STEMCCA y al Dr. Kazuhiro Oka, del Baylor College of Medicine por la donación de pLPBL-1. Estamos en deuda con el Sr. Mario R. Ramos por el diseño de las figuras y con la Sra. Yolanda E. Sosa por la asistencia editorial. RGG es investigador del Consejo Nacional de Investigación de Argentina (CONICET). PC, ML y MCM somos becarias doctorales de CONICET.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado en parte por la subvención PICT15-0817 de la Agencia Nacional para la Promoción de la Ciencia y la Tecnología, de la subvención de investigación MRCF 10-10-17 de la



**XXVII JORNADAS DE JOVENS
PESQUISADORES**
23 A 25 DE OUTUBRO DE 2019
A ciência e a tecnologia na produção
de inovação e transformação social



Asociación de Universidades
GRUPO MONTEVIDEO

Fundación de Investigación para la
Investigación Médica y la Sociedad para la
Investigación Gerontológica Experimental,
Nueva Zelanda a RGG.