



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas
Departamento de Química Biológica

Desarrollo de una herramienta para el estudio del proceso de reprogramación involucrado en la generación de células madre pluripotentes inducidas

Mora Reneé García

Trabajo de tesis para optar al título de
Licenciada en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Directora: Dra. Alejandra Sonia Guberman

Director Asistente: Dr. Marcos Gabriel Francia

Lugar de trabajo: Laboratorio de Regulación de la Expresión Génica en Células Madre,
Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad
de Buenos Aires. IQUIBICEN, CONICET.

Buenos Aires, Marzo 2024

Resumen

Las células madre pluripotentes (CMP) presentan dos características esenciales; en condiciones adecuadas de cultivo pueden auto-renovarse indefinidamente y diferenciarse a tipos celulares derivados de las tres capas germinales. Además de las CMP que existen naturalmente en diferentes estadios embrionarios y que pueden cultivarse *in vitro*, en la actualidad, es posible generar CMP a partir de células terminalmente diferenciadas, mediante un proceso de reprogramación, que involucra la expresión ectópica de factores de transcripción (FTs) específicos. Estas células son denominadas CMP inducidas (CMPI) y representan una gran promesa con importantes aplicaciones en modelos de enfermedades, estudios de desarrollo, evaluación de fármacos y potenciales tratamientos en el área de la medicina regenerativa.

Si bien el área ha experimentado enormes avances, la obtención de CMPI sigue siendo compleja y persisten incógnitas en torno a los mecanismos moleculares implicados, cuyo entendimiento es crucial para la optimización del proceso. Se han evaluado diversas variantes en los métodos de reprogramación; sin embargo, múltiples factores afectan la eficiencia y se consideran barreras o cuellos de botella del proceso. Entre los factores limitantes del proceso se encuentran la incorporación de los FTs de reprogramación en las células diferenciadas y su acceso a regiones compactas de la cromatina.

Este trabajo aborda esta limitación mediante el desarrollo de una herramienta que facilita el estudio de los mecanismos moleculares que favorecen la reprogramación celular. Para ello, generamos líneas celulares clonales de fibroblastos conteniendo una construcción inducible para la expresión de los FTs específicos para la reprogramación. Esta estrategia supera la limitación asociada a la introducción simultánea de todos los FTs necesarios en cada célula, mejorando así la eficiencia del proceso y facilitando su estudio y seguimiento en la población celular. En particular, una de las líneas generadas posee, además, otra construcción inducible que codifica para uno de los FT, OCT4, fusionado a la proteína fluorescente YPet, constituyendo una excelente herramienta para el estudio de la dinámica y distribución de este FT durante la reprogramación. Las líneas celulares fueron validadas mediante PCR y Western Blot. A su vez, mediante análisis de un marcador de pluripotencia, la aparición de actividad enzimática de fosfatasa alcalina, analizamos tanto la capacidad de estas células de adquirir este marcador, indicio del proceso de reprogramación, como el efecto de diversas moléculas pequeñas en la eficiencia del proceso. Se ha evidenciado que el agregado de estas moléculas durante la reprogramación tiene un impacto positivo en la eficiencia del proceso, debido a su influencia en la descompactación de la cromatina y en vías de señalización involucradas. De esta forma, logramos abordar dos obstáculos importantes del proceso de reprogramación.

La herramienta desarrollada en este trabajo representa un valioso recurso para el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación celular, ya que no solo mejora la eficiencia del proceso, sino que además simplifica su estudio y seguimiento. La línea celular conteniendo la construcción de YPet-OCT4 amplía aún más la utilidad de esta herramienta al permitir un análisis detallado en células vivas de la dinámica y distribución del FT durante el proceso de reprogramación. Una comprensión profunda de los mecanismos moleculares implicados contribuirá al conocimiento de procesos fundamentales y es esencial para futuras mejoras y avances en el campo de la reprogramación celular.

Abstract

Development of a tool for studying the reprogramming process involved in the generation of induced pluripotent stem cells

Pluripotent stem cells (PSCs) exhibit two essential characteristics; they can self-renewal indefinitely under specific culture conditions and differentiate into all cell types derived from the three germ layers. In addition to PSCs that naturally exist in different embryonic stages and can be cultured *in vitro*, nowadays it is possible to generate PSCs from terminally differentiated cells through a reprogramming process, which involves the ectopic expression of specific transcription factors (TFs). These cells, denominated induced PSCs (iPSCs), represent a great promise with important applications in disease modeling, development studies, drug evaluation and potential treatments in regenerative medicine.

Despite significant advances in the field, iPSCs generation is still complex, the molecular mechanisms involved are not fully understood, and their understanding is crucial for optimizing the process. Several reprogramming methods have been evaluated, but there are multiple factors that affect their efficiency and are considered barriers or bottlenecks of the process. These include the incorporation of the reprogramming TFs into the differentiated cells and their access to compact chromatin regions.

This project addresses this limitation by developing a tool that facilitates the study of the molecular mechanisms, favoring cell reprogramming. To do so, we generated clonal fibroblasts cell lines containing an inducible construct for the expression of the specific reprogramming TFs. This strategy overcomes the limitation associated with the simultaneous introduction of all the necessary TFs into each cell, thereby improving the efficiency of the process and facilitating the study of the reprogramming cell population. One of the generated cell lines has also another inducible construct of the TF OCT4 fused to the fluorescent protein YPet, providing an excellent tool for studying the dynamics and distribution of this TF during the reprogramming process. The cell lines were validated through PCR and Western Blot. Additionally, by analyzing a marker of pluripotency, the appearance of alkaline phosphatase enzymatic activity, we studied both the capacity of these cells to acquire this marker, an indication of the reprogramming process, and the effect of various small molecules on its efficiency. These molecules, included during the reprogramming process, have a positive impact on its efficiency, due to their influence on chromatin decompaction and on the implicated signaling pathways. Therefore, we address two important obstacles of the reprogramming process.

The tool developed in this work represents a valuable resource for studying the molecular mechanisms involved in cellular reprogramming, since it not only improves the efficiency of the process, but also simplifies its study and monitoring. The cell line that includes OCT4 fused to a fluorescent protein enhances the utility of this tool as it allows a detailed analysis of the dynamics and distribution of the TF during the reprogramming process. A deeper comprehension of the molecular mechanisms involved contributes to fundamental knowledge and it's essential for future improvements and advances in the field.

Agradecimientos

Qué locura estar finalizando esta etapa tan única de mi vida, la Morita de hace unos años pasaba mucho tiempo pensando e imaginando lo que se sentiría llegar a este punto. Sin dudas, fueron 6 años de mucho esfuerzo, estudio, dedicación, trabajo, disciplina, aprendizaje y formación. La calidad de educación que recibí fue excepcional y a conciencia de los desaciertos y aspectos a mejorar; aguante la UBA, aguante la educación pública, aguante formarse, recibirse y poder quedarse acá, donde las cosas están mal, aunque no tan mal, para mejorarlas. Gracias por otorgarme una enorme caja de herramientas, la que deseo profundamente poder usar para transformar un pedacito de la realidad y ayudar a que este mundo caótico e increíble sea un poquito más justo, empático y habitable para todos.

Y soy una enorme privilegiada; pude estudiar lo quise, en el tiempo que quise y pudiéndome dedicar exclusivamente a ello. Gracias a mi familia; mis tíos, mi prima, Juan, Mica y especialmente a mis papás, Moni y Hugo, por hacerlo posible y por estar ahí. No creo que haya forma de devolverles todo lo que me dieron, pero sean conscientes de que detrás de cada logro mío, hay algo suyo. Porque la del título se lleva todos los elogios, pero no hubiera sido posible sin su ayuda en las tareas menos aplaudidas, sin embargo, más fundamentales en el día a día. Gracias por todas las noches que me esperaron con un plato de comida caliente, por ocuparse de que nunca me falte nada, por cumplir prácticamente todos mis caprichos y ocurrencias, sepan que tengo claro lo afortunada que soy de tenerlos. Y gracias a mis gatitas hermosas, que me han visto estudiar horas y horas, que me acompañaron en tantas crisis y llantos, que se aguantaron mis llegadas a cualquier hora para recibirmee con sus mimos y ronroneos; acariciarlas mientras las miro a los ojos es, sin dudarlo, mi actividad favorita.

La idea de estudiar esta carrera surgió en mi adolescencia porque de alguna forma encontré en la biología un punto de encuentro entre mi necesidad de ayudar animales y mi interés por entender el mundo que nos rodea. La empecé con mucho entusiasmo y también, con muchas expectativas e ideas creadas de lo que iba a ser. Eso collevó a que el disfrute venga acompañado de muchas desilusiones; fueron muchos los llantos en el colectivo post-cursada. Era una niña desencantándose del sistema científico y, en parte, de la vida en general. Y está bien que haya ocurrido, nada es tan ideal como mi cabecita lo creía en ese tiempo. Por suerte, entre los muchos regalos que me dio esta carrera, estuvo una personita que me prestó su oído en cada descargo y su hombro en cada llanto. Gonzalo, gracias por tu apoyo y contención; eras un rayito de luz cuando a mis ojos todo se hacia gris. Gracias por sostenerme y alentarme, por tus besos y abrazos en cada rincón de Ciudad Universitaria, por hacerme reír a carcajadas y enseñarme a tomarme la vida un poco menos en serio.

Más allá de todo el conocimiento técnico, durante estos años aprendí en todos los aspectos y crecí muchísimo a nivel personal. Claramente no soy la misma persona que esa nena de 17 años empezando el CBC, hasta puedo decir que sobreviví a una pandemia en el medio, ja! Si algo me enseñaron todos esos meses de aislamiento es la importancia del

contacto humano y la alegría de compartir nuestra experiencia vital con otros. Gracias a todos mis amigos, los de la vida y los de la facu, por las charlas, las risas, los abrazos cálidos y el interés genuino por mi bienestar. En la vida me he cruzado con personas que me hicieron un poco reacia a establecer nuevos vínculos. Sepan que su compañía y cariño me recuerdan todos los días que soy merecedora de que me quieran, así como soy. Y que es posible generar grupos humanos donde el respeto y el compañerismo prevalezcan. Gracias por eso.

Es muy loco pensar en las horas que he pasado en la facultad y todo lo que estas paredes me vieron hacer; crecer, pensar, aprender, conocer, soñar, llorar, madurar, enamorarme, agradecer, y sobre todo.. correr porque llegaba tarde a cursar, jaja. Estos últimos años a la cursada se le sumó la elaboración de este trabajo y si bien conlleva un esfuerzo extra, la retribución es enorme. Hacer la Tesis fue para mí el primer acercamiento real a la labor de un científico y fue el cierre perfecto para esta etapa. Tener un proyecto propio me entusiasmó, me permitió aprender de mis errores, desarrollar pensamiento crítico y tolerancia a la frustración, fortalecer la perseverancia y saltar de alegría cuando las cosas por fin salían bien. Y todo esto fue por estar en un grupo que lo hizo posible. Gracias a todo el equipo de QB71 que se transformaron en mi primer grupo de trabajo y siempre estuvieron dispuestos a ayudarme y me hicieron sentir cómoda y querida. Gracias Mark por enseñarme todo con tanta paciencia, por tu escucha y tus consejos, por tu humor y tus chistes que me animaban en los días malos, tenés esa habilidad hermosa de hacer de la cotidaneidad algo muy divertido. Y gracias Ale por dejarme ser parte de su laboratorio, por ser una optimista empedernida, alegre y entusiasta. Por ser una jefa empática y totalmente humana, por guiarme en este proceso y escuchar mis inquietudes. Gracias por contribuir a que toda esta experiencia sea algo que voy a recordar siempre con mucho cariño.

Espero con ansias celebrar junto a todos ustedes el cierre de esta etapa.

Con gratitud,

Mora

Índice

Resumen	2
Abstract	3
Abreviaturas	7
Introducción	8
Células madre	8
El core de pluripotencia	9
Estructura de la cromatina	11
Células madre pluripotentes inducidas	12
Reprogramación celular	13
Hipótesis y objetivos	18
Materiales y Métodos	19
1. Cultivo celular	19
2. Generación de líneas estables	21
3. Análisis de modificaciones en el genoma	22
4. Viabilidad celular: Ensayo de Cristal Violeta	23
5. Análisis de proteínas	23
6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina	24
Resultados	25
1. Generación de líneas estables e inducibles para evaluar el proceso de reprogramación	25
1.1 Puesta a punto de las condiciones de selección	28
1.2 Transfección, selección y aislamiento	30
1.3 Ensayos preliminares	32
2. Validación de las líneas clonales	36
3. Evaluación del efecto de pequeñas moléculas en el proceso de reprogramación	40
Discusión y Conclusiones	45
Bibliografía	49
Anexo	53

Abreviaturas

CM	Células Madre
CME	Células Madre Embrionarias
CMP	Células Madre Pluripotentes
CMPI	Células Madre Pluripotentes Inducidas
FT	Factor de Transcripción
MEF	Fibroblastos Embrionario Murinos
MP	Medio de Propagación
SFB	Suero Fetal Bovino
Dox	Doxiciclina
VPA	Ácido Valproico
TSA	Tricostatina A
LIF	Factor Inhibidor de Leucemia
MEC	Matriz Extracelular

Introducción

Células madre

Una de las preguntas más fascinantes de la biología es cómo a partir de una única célula, el cigoto, es posible la formación de un organismo multicelular complejo, conteniendo una enorme diversidad de tipos celulares. Las células madre (CM) son protagonistas de dicho proceso y se caracterizan por su capacidad única de autorrenovarse y diferenciarse en una variedad de tipos celulares, desempeñando un papel central en el desarrollo embrionario y en la homeostasis de los organismos adultos [1]. La autorrenovación es la capacidad de propagarse mediante sucesivas divisiones celulares preservando una población de CM. En particular, puede ocurrir una división celular que origine dos células hijas iguales entre sí e iguales a la célula progenitora, o en el caso de CM con división asimétrica, una de las células comienza a diferenciarse, pero la otra célula hija conserva las características de la progenitora, permitiendo el mantenimiento de la población de CM en el tejido correspondiente. Por otro lado, la capacidad de diferenciación permite a las CM diferenciarse mediante una conversión fenotípica hacia un tipo celular determinado.

Existen distintos tipos de CM que pueden clasificarse según su potencial de diferenciación, una medida de a cuántos tipos celulares pueden diferenciarse. Esta clasificación clásica se encuentra esquematizada en la Figura 1.

Las CM totipotentes son capaces de dar origen a todos los tipos celulares de un organismo incluidos los anexos extraembrionarios. El cigoto, célula formada por la unión del oocito y el espermatozoide en el evento de la fecundación, es por excelencia ejemplo de totipotencia, ya que puede generar el organismo completo [2]. A medida que transcurre el desarrollo, las células del embrión continúan diferenciándose y se comprometen hacia un linaje particular, perdiendo su capacidad natural de diferenciarse a otros tipos celulares.

Las CM pluripotentes (CMP) pueden diferenciarse a todos los tipos celulares derivados de las tres capas germinales; ectodermo, endodermo y mesodermo, pero no son capaces de dar origen a todos los anexos extraembrionarios. Estas células tienen menor potencial de diferenciación, es decir, se encuentran en un grado mayor de compromiso celular en comparación con las totipotentes. Entre ellas se encuentran las CM embrionarias (CME), un tipo de CMP clásico desde su aislamiento original a partir del macizo celular interno de blastocistos y su establecimiento como líneas celulares estables en cultivo [3, 4]. Hay otros tipos de CMP embrionarias y en la actualidad existen además CMP que no provienen de un estadio embrionario, como las células madre pluripotentes inducidas (CMPI), sobre las que profundizaremos más adelante.

Las CM adultas son en general multipotentes, ya que presentan un menor potencial y se diferencian a un menor número de tipos celulares dependiendo de cuál sea su origen. Existen otras categorías de CM con un potencial más acotado como las CM oligopotentes y finalmente, las CM unipotentes, para el caso de diversos progenitores con capacidad de diferenciarse a un único tipo celular.

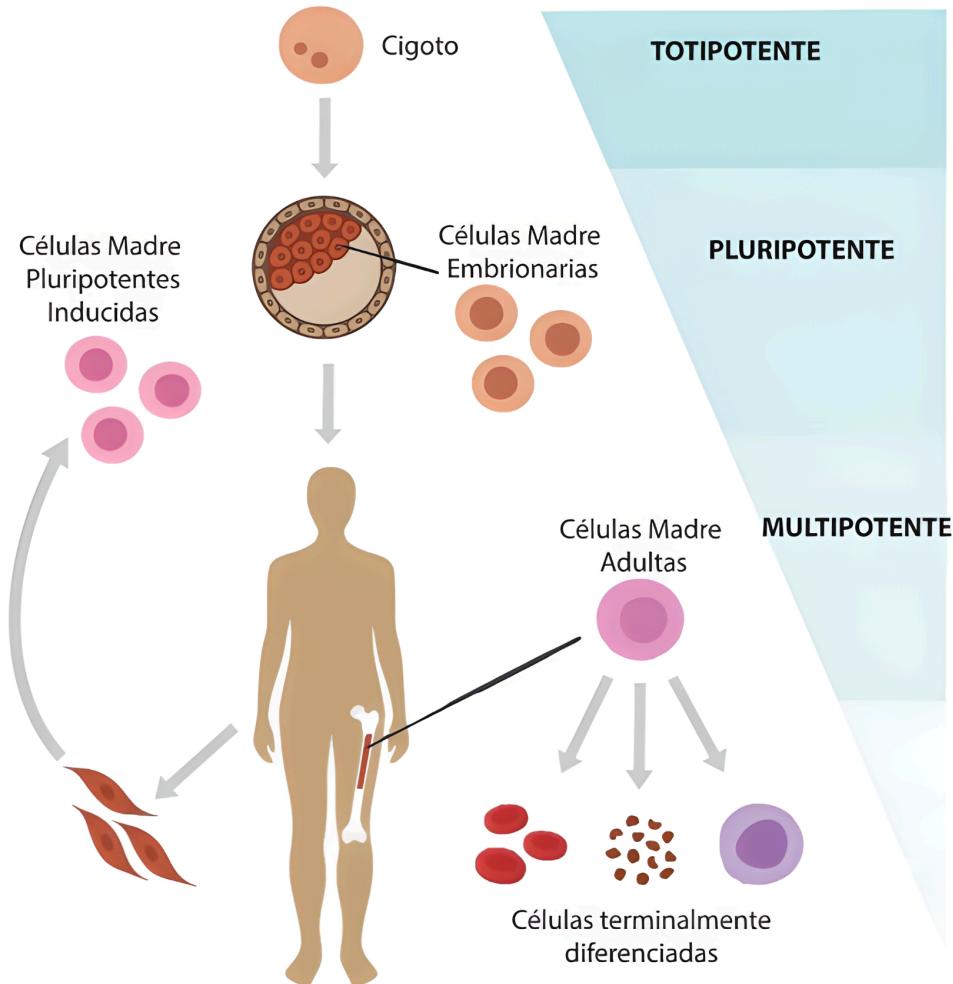


Figura 1. Tipos de células madre y su potencial de diferenciación. Extraído y adaptado de la Tesis doctoral de Camila Vázquez Echegaray [5].

El core de pluripotencia

Los factores de transcripción (FTs) OCT4, SOX2 y NANOG, conocidos como “el *core de pluripotencia*”, son cruciales para el mantenimiento de las propiedades fundamentales de las CMP y actúan como el núcleo de una red regulatoria induciendo la expresión de genes que preservan la pluripotencia y reprimiendo aquellos involucrados en la diferenciación celular [6, 7, 8].

OCT4 (*Octamer transcription factor 4*) es esencial en el mantenimiento del estado pluripotente [9]. Cambios en sus niveles de expresión, tanto un aumento como una disminución, promueven una diferenciación de las CME generando células con marcadores de endodermo y trofoectodermo, respectivamente. Esto demuestra el delicado y complejo balance que se requiere en la regulación de sus niveles para mantener el estado pluripotente [10].

Asimismo, OCT4 forma complejos multiméricos con distintos FTs, que activan o reprimen la expresión de sus genes blanco. El principal FT con el que interactúa OCT4 en

CME es SOX2 (*Sex determining Region Y-box 2*). SOX2 forma heterodímeros con OCT4, esta interacción favorece la estabilización de este último factor [11] y juntos regulan la expresión de gran cantidad de genes. En CME, la sobreexpresión de Sox2 induce la diferenciación hacia células del tejido neural, mientras que su disminución desencadena la diferenciación a trofoectodermo.

Recientemente, se demostró que pequeños cambios en los niveles de OCT4 y SOX2 afectan el destino celular, específicamente si ocurren durante la fase G1 del ciclo celular [12]. Se ha propuesto que este efecto puede estar relacionado con que ambos FTs tienen actividad de “pioneros”, es decir que tienen la capacidad de acceder a sus sitios blanco en el ADN en regiones de cromatina compacta y aumentar su grado de accesibilidad [13]. En este sentido, se encontró que con altos niveles de OCT4 aumenta la accesibilidad a la cromatina, particularmente en enhancers asociados a genes de diferenciación. Esto sugiere que las pequeñas fluctuaciones en los niveles de estos FTs pioneros pueden impactar en las decisiones del destino celular mediante el control en la accesibilidad a los elementos regulatorios de genes asociados a diferenciación [14].

La actividad más relevante de los FTs pioneros es que inician interacciones cooperativas con otras proteínas reguladoras conduciendo a cambios en la estructura local de la cromatina. Es decir, su actividad no está limitada a un aumento en la accesibilidad, sino que pueden además inducir otros cambios como compactarla y reprimir la expresión génica [14]. La regulación de la dinámica de la cromatina es clave en el control de la expresión génica en general, y particularmente en CMP, es fundamental en la definición del destino celular.

Otro gen fundamental del estado pluripotente es Nanog, que fue descubierto por los grupos de Austin Smith y Shinya Yamanaka en dos estudios publicados simultáneamente en 2003 [15], [16]. Estos trabajos pioneros revelaron que Nanog juega un papel clave como regulador maestro que define la identidad y la pluripotencia de las CME. Junto con Oct4 y Sox2, Nanog define la red transcripcional que controla la formación y el mantenimiento del macizo celular interno durante el desarrollo embrionario, y en conjunto mantienen la autorrenovación de las CME [8],[17]–[19].

Aproximadamente la mitad de los genes blanco de OCT4 son compartidos con SOX2, y el 70% de estos loci también están asociados con NANOG (Figura 2A) [20]. De esta manera, los FTs OCT4, SOX2 y NANOG forman el núcleo de una extensa y compleja red regulatoria de la transcripción en CMP que mantiene la estabilidad de estas células y en particular, el estado indiferenciado (Figura 2B).

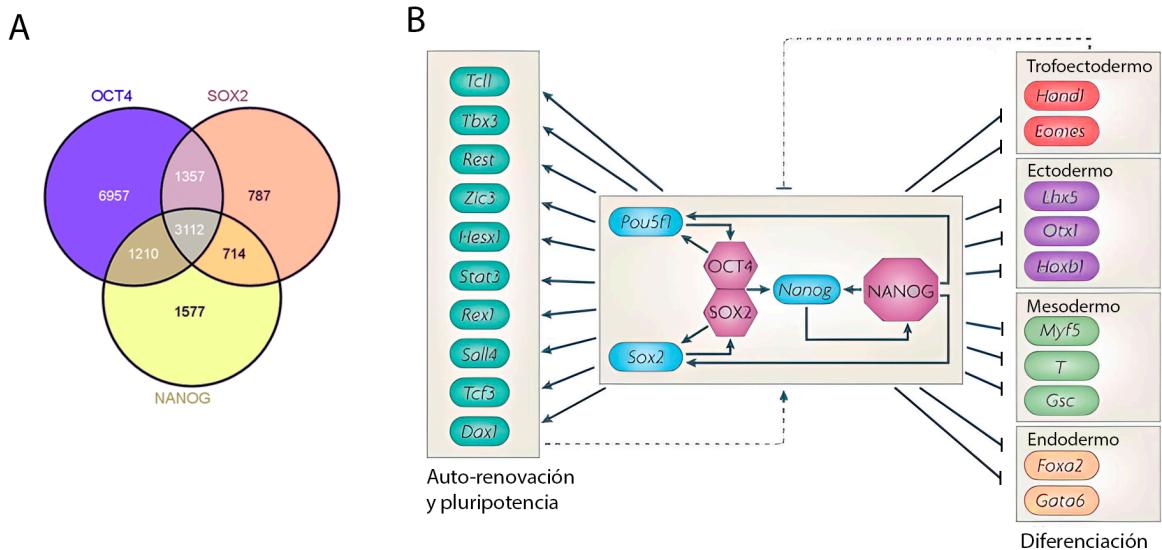


Figura 2. A: Diagrama de Venn representando el número de regiones promotoras de genes a los que son reclutados OCT4, SOX2 y NANOG. Las intersecciones de los diagramas representan los loci que son ocupados por dos o por los tres FTs simultáneamente. Extraído y adaptado de Li et al [20]. **B:** Los FTs OCT4, SOX2 y NANOG inducen la expresión de genes relevantes para el mantenimiento de la pluripotencia y reprimen genes involucrados en diferentes procesos de diferenciación celular. Los óvalos representan los genes y los polígonos, las proteínas. Extraído y adaptado de MacArthur et al [21].

Estructura de la cromatina

La regulación de la expresión génica ocurre a múltiples niveles dentro de los cuales, la estructura de la cromatina está directamente asociada con la capacidad de acción de los FTs. La cromatina es el complejo macromolecular núcleo-proteico mediante el cual se empaqueta y condensa el ADN en células eucariotas, ordenándose en el espacio nuclear y con una crucial función regulatoria. En cuanto a su organización, la unidad fundamental son los nucleosomas, compuestos por dos copias de las cuatro proteínas histonas clásicas, H2A, H2B, H3 y H4, rodeadas por 146 pares de bases de ADN. Múltiples parámetros epigenéticos modulan la expresión génica a diferentes niveles y mediante una gran variedad de mecanismos, que incluyen la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, el empaquetamiento y re-arreglo de los nucleosomas, las estructuras de cromatina de alto orden, la topología del genoma dentro del núcleo y la interacción dinámica entre la cromatina y la lámina nuclear [22], [23].

La organización de la cromatina dentro del espacio nuclear es un factor determinante en la regulación génica. Los niveles jerárquicos mediante los cuales se organiza la arquitectura genómica controlan la transcripción, modulando la accesibilidad y proximidad de los genes y elementos regulatorios. Por muchos años, se centró la atención en las proteínas asociadas a la regulación de la transcripción. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha logrado un giro en este enfoque que logró una nueva perspectiva respecto a la importancia que tiene la cromatina, contemplando su organización y su dinámica como pilares fundamentales en la regulación de la expresión génica.

Nuestro grupo, en colaboración con el grupo de la Dra. Valeria Levi, ha llevado a cabo investigaciones utilizando diferentes análisis de microscopía confocal que involucran la expresión de proteínas de interés fusionadas a proteínas fluorescentes, permitiendo el estudio de, por ejemplo, las propiedades dinámicas de los FTs y la cromatina en células vivas. En estos trabajos reportamos que los FTs de pluripotencia se distribuyen heterogéneamente en el núcleo de CME formando regiones de alta concentración o condensados [24]. Asimismo, encontramos que la perturbación de ciertas redes del citoesqueleto afecta la organización y dinámica de OCT4 en estas células [25]. Reportamos también que la organización y dinámica de los FTs de pluripotencia cambia durante las fases del ciclo celular y que las señales de diferenciación recibidas durante G1 promueven cambios en la distribución y la dinámica de los FTs durante la siguiente fase S temprana [26]. Por otro lado, estudiamos el paisaje global de la cromatina mediante el análisis de distribución de la proteína asociada a heterocromatina 1a y la histona H2B, ambas fusionadas a proteínas fluorescentes, y encontramos que tanto el paisaje global de la cromatina, como la distribución y dinámica de interacción de los FTs de pluripotencia con esta cambian al inicio de la diferenciación [24] y que son diferentes entre CME *wild type* y una línea de CME *knockout* para el gen de la enzima acetiltransferasa de histonas Kat6B [27].

En los últimos años, numerosos trabajos revelaron una interacción compleja y dinámica entre distintos mecanismos epigenéticos y el mantenimiento del estado indiferenciado y la diferenciación de CME. Estos estudios mostraron dos principios generales en la epigenética de estas células. Por un lado, la existencia de factores específicos que mantienen a la cromatina en un estado abierto y accesible para la activación transcripcional y, por otro, reguladores que contribuyen al silenciamiento de genes específicos de linaje hasta que se desencadena el proceso de diferenciación celular [28]–[30].

Durante el estado pluripotente la cromatina es globalmente más accesible que en células terminalmente diferenciadas; se ha propuesto que este estado es importante para que distintos programas transcripcionales se activen rápidamente luego de la inducción de la diferenciación [31]. Durante el proceso de diferenciación, ocurren cambios globales en la organización de la cromatina que incluyen eventos locales de remodelación y modificaciones epigenéticas. De esta forma, la cromatina, que, como mencionamos, en células indiferenciadas es a nivel global poco condensada y muy dinámica, durante la diferenciación se reestructura presentando regiones con un alto grado de organización tridimensional, condensación y actividad variable [32]. Es decir, la diferenciación involucra cambios no triviales en la dinámica espacio-temporal de la organización de la cromatina y la arquitectura nuclear, requeridos para los cambios en los programas transcripcionales que dirigen el proceso.

Células madre pluripotentes inducidas

En el año 2006, el área de las CM se revolucionó con el primer reporte de la generación de CMPI, que condujo al premio Nobel de fisiología y medicina en el año 2012 al investigador Shinya Yamanaka. Estas células, muy similares a las CME en cuanto a la expresión génica, perfil epigenético y potencial de desarrollo, fueron obtenidas a partir de células somáticas de ratón utilizando la expresión ectópica de una combinación de cuatro

FTs específicos [33]. Los factores fueron Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (denominados en conjunto OSKM), y en el área se los conoce como los “factores de Yamanaka”. Un año después de este descubrimiento, se logró la generación de CMPI a partir de fibroblastos humanos [34, 35].

Hoy en día, las CMPI pueden ser obtenidas a partir de un gran abanico de células terminalmente diferenciadas mediante un proceso denominado reprogramación celular. Estas células representan una gran promesa como posibles sustitutos de las CME para el desarrollo de terapias en el área de la medicina regenerativa, ya que permitirían el desarrollo de células específicas, que, si pudieran ser derivadas del mismo paciente o se generarán bancos de CMPI, se evitaría o disminuiría significativamente el rechazo por parte del sistema inmune luego del trasplante [36, 37]. Asimismo, en la actualidad se están desarrollando diversos modelos derivados de CMPI para el estudio de múltiples enfermedades y para la evaluación de fármacos [38], habiendo ya en curso algunos ensayos clínicos [39, 40].

Si bien el entendimiento del proceso de reprogramación y la generación de CMPI ha avanzado enormemente en los últimos años, aún se requiere un mayor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados en el inicio y la progresión de este proceso. Por otra parte, si bien desde la obtención de CMPI en el año 2006 hasta la fecha, se han evaluado diversas variantes en los métodos de reprogramación, la eficiencia de este proceso aún sigue siendo muy baja. Una mayor comprensión del proceso de reprogramación podría contribuir a una mejora en la calidad y eficiencia en la obtención de CMPI, impactando en la optimización de las condiciones de reprogramación, cultivo y protocolos de diferenciación, y en última instancia, aumentando la bioseguridad de su uso en la clínica [41].

Reprogramación celular

Los mecanismos dinámicos que regulan la homeostasis de una célula diferenciada son susceptibles a perturbaciones. Como mencionamos, en la actualidad, es posible modificar el patrón de expresión génica y como consecuencia, cambiar la identidad celular. Este fenómeno se conoce como reprogramación celular y es mediante el cual se pueden obtener CMP a partir de células diferenciadas, generando las CMPI descritas en la sección anterior. Este tipo de reprogramación implica la represión de los genes específicos del tipo celular diferenciado de origen y la reactivación de los genes de pluripotencia. Este proceso es desencadenado por la expresión ectópica de ciertos FTs de pluripotencia y se puede dividir en dos etapas (Figura 3). En la primera ocurre el silenciamiento de los genes específicos del linaje y es dependiente de los FTs exógenos y en la segunda, se establece la expresión de los FTs de pluripotencia endógenos. Aquellas células que no logran atravesar ambas etapas quedan en un estado intermedio y son denominadas células parcialmente reprogramadas [42].

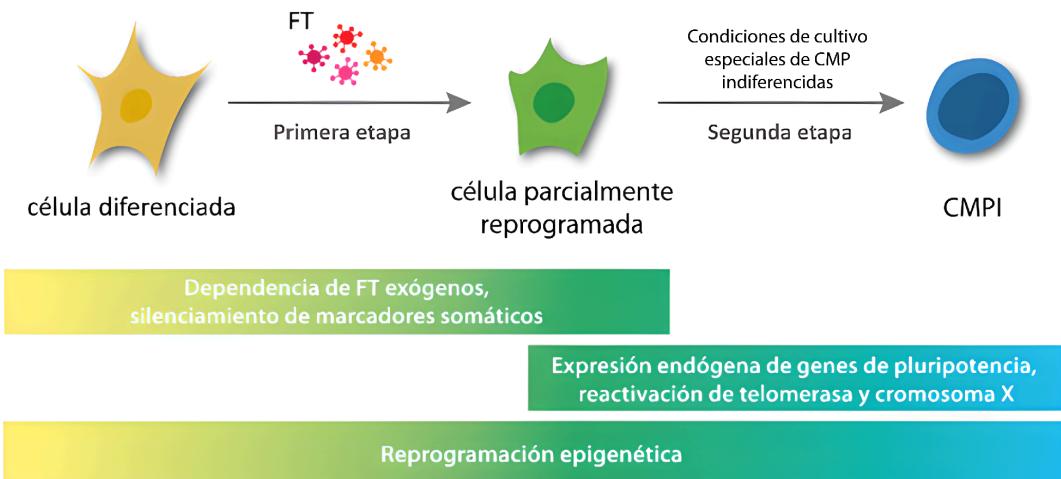


Figura 3. La reprogramación de células diferenciadas a CMPI involucra dos etapas principales, pasando por un estadio intermedio de células parcialmente reprogramadas. En el esquema se indican los procesos más importantes que ocurren en cada etapa. Extraído y adaptado del capítulo 11 del libro “Advances in Stem Cell Biology: Molecular Players in iPSC Technology” [43].

Durante el proceso de reprogramación celular se producen cambios morfológicos significativos, mediante los cuales se da la transición desde la morfología particular de la célula diferenciada de la cual se parte, hacia la morfología de CMP. En la Figura 4A, se muestra una imagen representativa de la morfología de un tipo de celular diferenciado, fibroblastos embrionarios de ratón (MEF). Como se aprecia en estas imágenes, este tipo celular presenta una forma ahusada y plana, con prolongaciones citoplasmáticas. En cambio, tanto las CME como las CMPI presentan la característica distintiva de crecer en colonias tridimensionales, con células muy compactadas, de forma globular y con una alta relación núcleo-citoplasma. En la Figura 4B se aprecia la morfología de las colonias de un tipo de CME, y en la Figura 4C una imagen de colonias de CMPI creciendo sobre una capa de MEF. En la Figura 4D se muestra a modo de ejemplo, la progresión morfológica que atraviesan células del tipo celular MEF durante la reprogramación, en donde se puede observar que durante los primeros días de reprogramación (d2 a d6) la cantidad de células con forma globular se incrementa, y a partir del día 7 se aprecia el crecimiento y evolución de una colonia característica de CMPI.

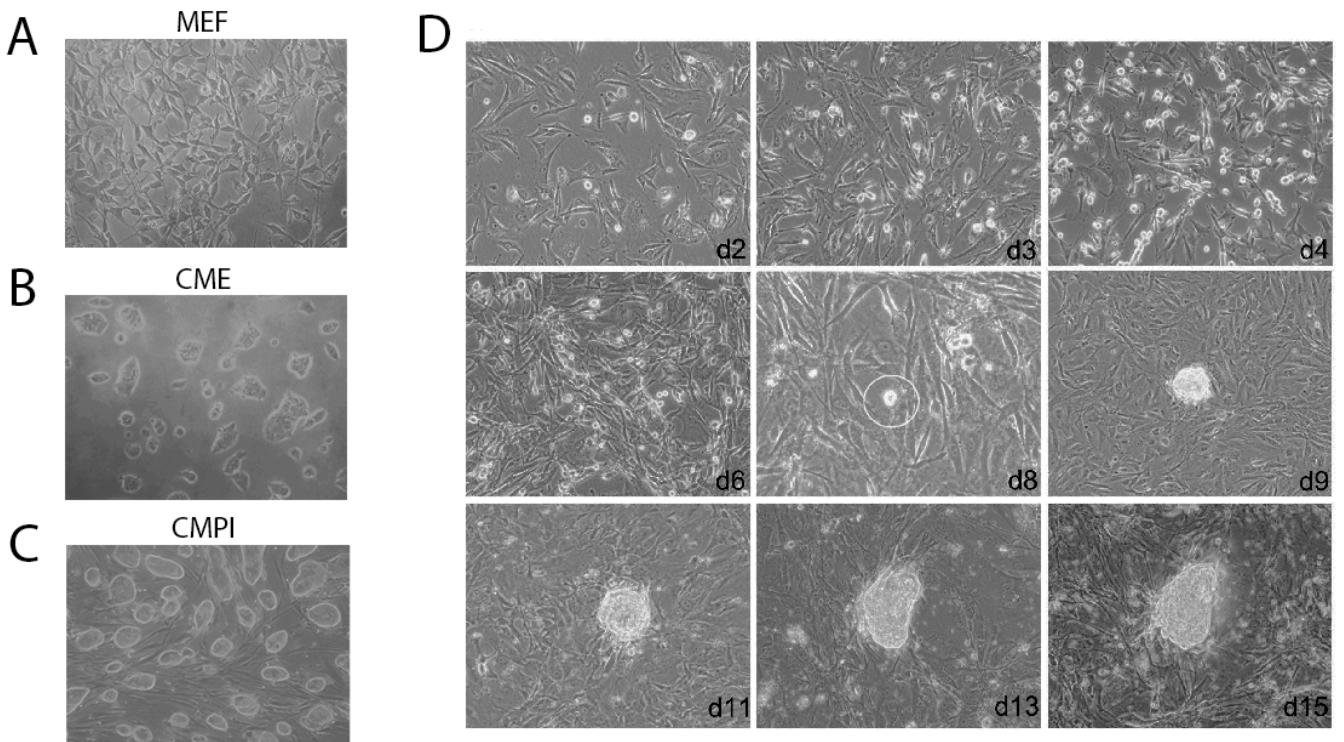


Figura 4. **A:** Imagen representativa de una línea celular de MEF. **B:** Imagen representativa de una línea celular de CME. **C:** Imagen de CMPI creciendo sobre una capa de MEF. Extraída y adaptada de Solari et al [44]. **D:** Progresión morfológica de MEF durante los primeros 15 días del proceso de reprogramación (indicados en cada panel; d: día desde el inicio del proceso de reprogramación). Extraída y adaptada de Elsayed et al [45].

Aunque persisten numerosos interrogantes acerca del mecanismo involucrado en el proceso de reprogramación celular, se ha logrado establecer puntos importantes sobre su funcionamiento. Por ejemplo, se conoce que la reprogramación es desencadenada por la expresión ectópica de los FTs de pluripotencia exógenos, los cuales son gradualmente sustituidos por los FTs endógenos y aquellos codificados por los genes blanco, como es el caso de Nanog. Este último, a pesar de ser prescindible en el cocktail de FTs exógenos, desempeña un papel esencial en el establecimiento de la pluripotencia [46]. Respecto a la función de los distintos factores de Yamanaka durante la reprogramación, como ya mencionamos, OCT4 y SOX2 juegan un papel crucial en la preservación del estado pluripotente en las CME. Junto con NANOG y otros FTs de pluripotencia, como KLF4, suprime genes vinculados a la diferenciación e inducen la expresión de genes específicos del estado indiferenciado. También se sugiere que KLF4 podría actuar como antagonista de ciertas funciones, particularmente aquellas relacionadas con la apoptosis mediada por p53 y p21, que ejerce una regulación negativa en la generación de CMPI. Por otro lado, c-MYC participaría en las etapas iniciales de la reprogramación al fomentar la proliferación celular, induciendo, por ejemplo, la expresión de ciclinas. Además, se ha propuesto que este FT contribuye al remodelado de la cromatina y activa diversos genes y ARN no codificantes, por ejemplo diversos miARNs comúnmente expresados en CME [47], [48], [49].

De manera análoga a lo que ocurre durante la diferenciación, la generación de CMPI requiere una reestructuración de los programas de expresión génica. Para esto deben ocurrir cambios en el epigenoma, implicando múltiples limitaciones que tienen como consecuencia la baja eficiencia y cinética de este proceso. Son varios los factores que afectan la eficiencia, por lo que se consideran barreras o cuellos de botella del proceso [50]. Entre estos se encuentra la introducción simultánea de todos los FTs necesarios en cada célula diferenciada. Esta limitación ha sido abordada con éxito introduciendo en el genoma un cassette codificante para los cuatro FTs de Yamanaka, originalmente mediante un vector lentiviral denominado STEMCCA [51], previamente utilizado en nuestro laboratorio [44] y posteriormente, mediante diferentes sistemas, entre ellos, el de transposición PiggyBac [52], que detallaremos en la sección Resultados.

Otra etapa fundamental del proceso es la reactivación de los genes endógenos de los FTs de pluripotencia en el genoma de las células terminalmente diferenciadas, requeridos para inducir genes necesarios para preservar el estado indiferenciado. Para esto es necesaria una reestructuración de la cromatina; de hecho, se demostró que el grado de compactación de la misma en células somáticas representa una importante barrera epigenética para dicho proceso [53]. En los últimos años se ha evidenciado que se puede favorecer la eficiencia de reprogramación con el uso de ciertas moléculas agregadas al medio celular, que son en general pequeñas moléculas que actúan como inhibidores de enzimas modificadoras de la cromatina. Las principales moléculas utilizadas son inhibidores de desacetilasas de histonas como el ácido valproico (VPA, de su sigla en inglés) o la Tricostatina A (TSA); estas moléculas modifican la estructura de la cromatina, haciéndola más accesible para los FTs [54]. También se utilizan activadores de vías de señalización relevantes para CMP, como el factor inhibidor de leucemia (LIF, de su sigla en inglés) [55], utilizado de rutina para el cultivo de CMP y requerido para el mantenimiento de la pluripotencia [56, 57, 58].

Como mencionamos anteriormente, además de los niveles de expresión de los FTs, otros parámetros impactan sobre la expresión génica, entre ellos, su distribución, tanto subcelular como dentro del núcleo, y su dinámica de interacción con sus sitios blanco en la cromatina [59]. Para llevar a cabo una reprogramación celular exitosa es necesario el acceso de los FTs de pluripotencia a sus sitios blanco en el ADN, siendo fundamental la acción de los FTs pioneros, entre los que se encuentran OCT4 y SOX2, que como mencionamos, tienen la capacidad de acceder a sus sitios blanco aún en regiones de cromatina compacta [14]. Esto requiere, y a su vez trae como consecuencia, una reestructuración global de la cromatina. En relación con esto, antecedentes de nuestro grupo mostraron que tanto la organización de la cromatina como la distribución de los FTs OCT4 y SOX2 y su interacción con la cromatina, se modifican al inicio del proceso de diferenciación en CME [24]. Asimismo, y de manera consistente con estos hallazgos, resultados aún no publicados de nuestro grupo mostraron que la distribución y dinámica de estos FTs es diferente en fibroblastos respecto a CMPI derivadas de éstos (Tesis doctoral Camila Vázquez Echegaray), sugiriendo que la reprogramación celular puede ser la causa, o incluso la consecuencia, de cambios significativos en estos parámetros.

En este contexto, el siguiente paso será abordar el estudio detallado de la distribución y dinámica de estos FTs durante distintas etapas de la reprogramación, a fin de esclarecer mecanismos moleculares involucrados en este proceso y sus implicaciones en la adquisición de la pluripotencia. En este trabajo desarrollamos una herramienta para llevar a

cabo tal fin, la cual supera la limitación asociada a la introducción simultánea de todos los FTs necesarios, permitiendo una alta eficiencia del proceso, lo que facilitará el estudio y seguimiento de la reprogramación en la población celular. Para esto nos propusimos generar líneas celulares de fibroblastos conteniendo una construcción inducible para la expresión de los FTs específicos para la reprogramación. En particular, una de las líneas posee además, otra construcción inducible del FT OCT4 fusionado a la proteína fluorescente YPet, lo que permitirá el estudio de la dinámica y distribución de este FT pionero durante la reprogramación. Como prueba de concepto, analizamos el efecto del agregado de moléculas pequeñas en la eficiencia de reprogramación de estas líneas, debido a su influencia en la descompactación de la cromatina y en vías de señalización involucradas.

Hipótesis y objetivos

Si bien se han logrado avances significativos en los protocolos de reprogramación celular, la eficiencia en la obtención de CMPI sigue siendo una limitante y aún quedan interrogantes sobre los mecanismos moleculares implicados, cuyo entendimiento es crucial para la futura optimización de este proceso. En función de esto, el proyecto en el que se encuentra enmarcada esta Tesis está guiado por la siguiente **hipótesis**:

La organización dinámica de los factores de transcripción impacta en la eficiencia del proceso de reprogramación y podrá ser utilizada como marcador para explorar diferentes condiciones y desarrollar nuevos protocolos que aumenten la calidad de las CMPI generadas.

En este marco, el **objetivo general** de esta Tesis es contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación celular, desarrollando una herramienta que elimine el cuello de botella de la incorporación de los factores de Yamanaka y que permita el estudio de la organización dinámica del FT OCT4 en células vivas durante el proceso de reprogramación y en diferentes contextos que favorecen el proceso.

En particular, planteamos los siguientes **objetivos específicos**:

- I. Generar líneas celulares de fibroblastos conteniendo una construcción inducible que codifica los FTs de Yamanaka (OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC) para su utilización como herramientas en el estudio del proceso de reprogramación; una de ellas derivada de la línea NIH y otra a partir de la línea NIH YPet-OCT4.
- II. Evaluar la capacidad de las líneas generadas de iniciar el proceso de reprogramación y, como prueba de concepto, el efecto sobre la eficiencia del proceso de moléculas pequeñas que afectan la estructura de la cromatina o vías de señalización involucradas.

Materiales y Métodos

1. Cultivo celular

1.1 Propagación y mantenimiento del stock celular

Fibroblastos

En este trabajo utilizamos principalmente células de la línea NIH/3T3, una línea celular de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), y la línea NIH/3T3 YPet-OCT4, derivada de la primera, establecida previamente en el laboratorio por la Dra. Camila Vázquez Echegaray y que expresa de manera inducible por doxiciclina el FT OCT4 fusionado a la proteína fluorescente YPet [60]. Sobre estas líneas parentales, generamos las líneas que expresan los factores de Yamanaka (OSKM), de manera inducible por Doxiciclina (Dox), cuyo sistema se encuentra detallado en la sección de Resultados.

Para la propagación y el mantenimiento del stock celular de las líneas NIH/3T3 y las derivadas de esta, las células se cultivaron en placas de plástico para cultivo celular. Se utilizó medio de propagación (MP) compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium alta glucosa (DMEM, Gibco) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Internegocios) y antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 mg/ml estreptomicina, Gibco).

Normalmente, las células fueron re-plaqueadas cada 72 h cuando llegaron a una confluencia de aproximadamente 80%, mediante un protocolo convencional de tripsinización. Brevemente, se aspira el medio de cultivo, se realiza un lavado con PBS pH 7.4 y se tratan las placas con el volumen adecuado de Tripsina (Gibco) según la superficie de las mismas, a 37 °C de 3 a 5 min, agitando ocasionalmente las placas para favorecer la disagregación de las células. Se completa la separación en forma mecánica con pipeta evitando que queden agregados de células, y se inactiva la tripsina agregando igual volumen de medio de propagación, conteniendo SFB. Se monitorea el proceso observando las células en un microscopio invertido. Finalmente, se siembra en una nueva placa de cultivo con la cantidad de células adecuadas y se agrega la cantidad de MP correspondiente que además de ser requerido para el crecimiento de las células, contribuye a la inactivación de la tripsina por la presencia de SFB. Las placas son incubadas en una estufa a 37 °C con 5 % de CO₂.

Células pluripotentes

En algunos controles experimentales empleamos una línea de CME, la W4/129S6 o simplemente "W4", establecida por Auerbach et al [61], y una línea de CMPI de ratón denominada "iPS20", la cual fue generada previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Claudia Solari [44].

Para mantener las células en un estado indiferenciado, las CMP fueron cultivadas en un medio de propagación compuesto por Dulbecco's Modified Eagle Medium alta glucosa (DMEM) suplementado con Glutamax 2 mM, MEM aminoácidos no esenciales 100 mM, 2-mercaptoetanol 0,1 mM y penicilina-estreptomicina (100 U/ml y 100 µg/ml, respectivamente) y 15% de SFB. Este medio además contiene la citoquina LIF y los inhibidores de MEK y GSK3, en conjunto conocidos como 2i, PD0325901 (Tocris) 0,5 µM y

CHIR99021 (Tocris) 3 μ M. El LIF es obtenido en nuestro laboratorio a partir de una línea de células CHO (Chinese Hamster Ovary) genéticamente modificadas para producir LIF (CHO-LIF). Todos los reactivos, excepto los indicados, son marca Gibco (Thermo Fisher).

La propagación y el pasaje de las células se llevaron a cabo según lo descrito previamente, con dos modificaciones importantes. En primer lugar, dado que las CMP no se adhieren al plástico por sí solas es necesario realizar un *coating* de las placas previo al plaqueo de las células. Para ello se las trata con gelatina de piel bovina (Sigma) 0,1% en PBS durante 15 minutos a 37°C. Por otro lado, las CMP presentan una sensibilidad mayor a la tripsina respecto de los fibroblastos, por lo que posteriormente a cada tripsinización, las células se centrifugan para remover la tripsina y luego se resuspenden en el MP correspondiente para ser plaqueadas.

1.2 Conteo de células en cámara de Neubauer

Para determinar la concentración de células en suspensión, se las contó considerando además la viabilidad utilizando el método de exclusión con Azul de Tripán. Este colorante tiñe el interior celular solo en aquellas células cuya membrana se encuentra dañada y no así en aquellas con su membrana íntegra, por lo que las células no coloreadas son consideradas células viables.

El recuento se realiza colocando 10 μ L de una mezcla 1:1 de suspensión celular, obtenida mediante tripsinización, con una solución 4% de azul tripán en una cámara de Neubauer y se cuentan las células en los cuatro campos de la cámara, procurando que el número se encuentre dentro del rango de 30 a 300 células. En caso de tener un número muy elevado de células para realizar el cálculo, se realizan diluciones con PBS de la suspensión de células. Se estima el número de células/mL de suspensión promediando los valores de los cuatro cuadrantes contados y considerando la capacidad de la cámara (0,1 μ L/cuadrante) y la dilución realizada con el colorante, utilizando la **Ecuación 1**.

$$\frac{n^{\circ} \text{ de células}}{ml} = N \times 10.000 \times d$$

Ecuación 1. Ecuación utilizada para estimar la concentración de células luego del recuento en cámara de Neubauer. N es el promedio de número de células contadas en los cuadrantes, d es el factor de dilución realizado y el dígito 10.000 surge de considerar la capacidad de la cámara (0,1 μ L) y su conversión de unidades a mL.

1.3 Congelamiento y descongelamiento de células

El stock de cada línea celular es conservado en N₂ líquido. Para ello, previamente las células tripsinizadas se resuspenden en medio de congelamiento, el cual consiste en MP con una concentración de SFB final de 25% y DMSO de 10%. La suspensión de células es colocada dentro de un criotubo y transportada a un freezer a -80°C, dentro de un recipiente adecuado para un enfriamiento gradual, el cual contiene isopropanol (Mr. Frosty Freezing Container, Nalgene). Al día siguiente, los criotubos se almacenan en un tanque que contiene N2 líquido (-196 °C), y se mantienen en estas condiciones hasta su próxima utilización.

Para el descongelamiento de las células, se retira el criotubo correspondiente del tanque de N₂ líquido y se lo lleva rápidamente a un baño termostático previamente estabilizado en 37°C hasta lograr el descongelamiento total de la suspensión de células. Para remover el DMSO, y evitar su posible efecto citotóxico, se trasvaza el contenido del criotubo a un tubo eppendorf de 5 mL con 3 mL de MP y es centrifugado a 200 xg por 5 minutos. Luego, el medio conteniendo DMSO es descartado y las células son resuspendidas en un volumen adecuado de MP y plaqueadas en la superficie correspondiente. Regularmente, durante este proceso, controlamos la viabilidad celular mediante tinción de una alícuota de la suspensión con azul de tripán.

2. Generación de líneas estables

2.1 Transfección y selección

Para la transfección de células se utiliza un protocolo que consiste en la incubación de las mismas en MP con la mezcla de transfección, compuesta por el agente de transfección elegido y el ADN de interés. Para este caso particular, se plaquearon células de las líneas NIH wt y NIH YPet-OCT4 en placas MW6 a una densidad de 1.5x10⁵ células/well. Al día siguiente, se realizó una mezcla de transfección de ADN plasmídico junto con el agente de transfección polietilenimina (PEI, Poliscience Inc) en medio OPTIMEM (Gibco) en una relación previamente puesta a punto en el laboratorio para este tipo celular, de 1 µg ADN : 5 µl PEI. Con respecto a la co-transfección de los plásmidos PB-iOSKM y ePBac-Transposasa, utilizamos dos relaciones diferentes entre ellos, 2:1 y 4:1, respectivamente. La mezcla del ADN-PEI-OPTIMEM se incubó 15 min a temperatura ambiente y luego, los complejos formados se agregaron en forma de gotas a las placas con células de ambas líneas parentales. Al día siguiente realizamos un cambio de medio por MP fresco y luego de 48 h de transfección, se comenzó la selección con 5 µg/mL de puromicina (Invivogen). Paralelamente a la selección de las células transfectadas incubamos células de ambas líneas parentales no transfectadas con la misma concentración de puromicina para utilizarlo como control de selección. Transcurridas las 48 h, se realizó un lavado con PBS y se cambió el medio por MP fresco sin agente de selección. Se amplificaron los cultivos celulares durante los siguientes 10 días, ya que un pequeño porcentaje de células resistieron la selección. Luego de la amplificación se volvió a tratar con 5 µg/mL de puromicina durante 4 días para asegurarnos de que todas las células del pool tuvieran inserto en su genoma el cassette de interés.

2.2 Aislamiento de clones a partir de célula única

Luego de la amplificación y con el objetivo de establecer líneas clonales, se realizó el aislamiento de célula única. A partir del pool de células con el inserto se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer y los cálculos para preparar la suspensión celular de forma tal de plaquear en promedio 1 célula/well en placas MW96. Se cultivaron las células y se fueron observando cada uno de los wells durante los días posteriores para detectar grupos de células provenientes de una única célula. Se descartaron aquellos wells sin células y los que presentaron más de un grupo. Luego de alcanzar una confluencia de al

menos el 50% de la placa, se replaquearon las células de los wells elegidos a placas de mayor superficie. Una vez amplificadas las líneas celulares se congelaron para su criopreservación y se utilizaron para los análisis descritos en la sección de Resultados.

3. Análisis de modificaciones en el genoma

3.1 Extracción de ADN genómico

Para la purificación de ADN genómico las células son cosechadas mediante tripsinización y centrifugadas. El pellet se resuspende en 100 µL de Buffer de Lisis (Tris-HCl 10 mM pH 8.3, KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, gelatina 0.001%, NP-40 0.5%, Tween-20 0.5%) suplementado con 1 µg/mL de proteinasa K (Fermentas). Las muestras se incuban durante 1 h a 65°C con agitación intermitente, luego se agregan 600 µL de isopropanol y se centrifuga a 13.000 xg durante 15 min. Se realiza un lavado con etanol 70% y se resuspende el ADN genómico obtenido en 30 µL de agua miliQ. Las muestras obtenidas se incuban a 65°C durante 1h para favorecer la resuspensión y luego son conservadas a -20°C. En esta Tesis, para la amplificación de la inserción OSKM, el protocolo requirió una extracción con solventes orgánicos (Fenol/Cloroformo) para obtener un mayor grado de pureza.

3.2 PCR punto final

Para realizar las reacciones de PCR a punto final se mezclan 2 µL de ADN molde con 23 µL de mezcla de reacción (Tabla 1). Se utilizó la enzima DreamTaq (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante, y una termocicladora Ivema T18 (Ivema). La temperatura de *annealing* se ajustó a 55° C para ambos pares de primers utilizados (Tabla 2). Analizamos el producto de amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa 1,8% con agregado de bromuro de etidio. Los geles se revelaron y fotografiaron utilizando un transiluminador UV (G-BOX, Syngene).

Reactivos	Volumen (µL)
H ₂ O Milli-Q	19,05
Buffer 10x	2,5
dNTPs 25 mM	0,25
Primer Forward 25 µM	0,5
Primer Reverse 25 µM	0,5
DreamTaq	0,2

Tabla 1. Mezcla estándar de reacción de PCR.

Nombre	Orientación	Secuencia (3'-5')	Tamaño amplicón
gGAPDH	Forward	AAGAAGGTGGTGAAGCAG	110 pb
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGAGG	
OSKM	Forward	CAACGAGAGGATTGAGGCTGC	1580 pb
	Reverse	ATCGTTGAACTCCTCGGTCTCT	

Tabla 2. Listado de los primers utilizados.

4. Viabilidad celular: Ensayo de Cristal Violeta

Brevemente, las células son lavadas con PBS y luego la fijación y tinción se lleva a cabo con Cristal Violeta 0,5% en metanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se realizan cuatro lavados de las células con agua destilada (H₂O) y se deja secando un mínimo de 2 h a TA protegidas de la luz. Se solubiliza el Cristal Violeta que incorporaron las células con una solución ácido acético 10% durante 15 minutos a TA. El blanco se obtiene realizando el mismo tratamiento a un pocillo vacío. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando el equipo Optima Fluostar (BGM Labtech). Se realizaron 3 réplicas técnicas de cada condición.

5. Análisis de proteínas

5.1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Las proteínas totales se obtienen mediante el scrapping de las células, utilizando el buffer RIPA (NaCl 150 nM, NP-40 1% v/v, Desoxicolato de Sodio 0,5 % m/v, SDS 0,1% m/v, Tris-HCl 50 mM pH 8) suplementado con inhibidores de proteasas Complete Mini EDTA-free (Roche). Las muestras se mantienen en frío durante 10 min y luego son congeladas y descongeladas para favorecer la lisis. Finalmente, se realiza una centrifugación a 14.000 g por 20 minutos y se recupera el sobrenadante contenido el lisado celular.

Para el preparado de las proteínas se agrega Buffer de Crackeo 5X (Buffer Laemmli) a cada muestra y se incuban a 100 °C durante 5 min. En este trabajo, las muestras fueron sometidas a electroforesis desnaturizante con SDS (SDS-PAGE) en un gel 12 % de poliacrilamida, a voltaje constante (100 V), en buffer de corrida para WB.

El gel de poliacrilamida para electroforesis de proteínas consta de dos secciones, inferior (separador 12%) y superior (concentrador 4,5%).

5.2 Ensayo de Western Blot

Luego de efectuada la electroforesis, se procede a realizar la electrotransferencia húmeda de las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham). La transferencia se realiza ubicando al gel y la membrana entre 2 papeles de filtro Whatmann 3MM de cada lado, sumergidos previamente en buffer de transferencia para WB. Esta preparación se monta en una cuba (BioRad) y se aplica voltaje constante de 120 V durante 1 hora en frío. A continuación, la membrana se bloquea con solución de bloqueo (BSA 0,1% m/v, Azida 0,02% v/v, Tween-20 0,4% v/v, NaCl 100 mM, Tris pH=7 10mM, EDTA 1 mM) durante 1 hora a TA. Posteriormente, la membrana se incuba con el anticuerpo primario en la dilución adecuada (Tabla 4) en solución de bloqueo fresca. Se deja toda la noche a 4 °C con agitación permanente. Finalizada la incubación, se realizan tres lavados a TA de 5 minutos cada uno con Tween-20 0,05% en PBS. Luego se incuba con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (HRP) en la dilución adecuada (Tabla 4) en solución de bloqueo fresca, durante 90 minutos, a TA y con agitación constante. Luego de tres lavados con PBS-Tween, se revela la reacción de peroxidasa en oscuridad con la solución ECL, de acuerdo a instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Visualizamos los complejos inmunes por quimioluminiscencia, mediante el uso del equipo Amersham Imager 600 (GE Healthcare).

Tipo de anticuerpo	Descripción	Dilución
Primario	Anti SOX2 (hecho en cabra). Santa Cruz Biotechnology, sc-17320.	1:500
	Anti GAPDH (hecho en ratón). Santa Cruz Biotechnology, sc-32233.	1:1000
Secundario	Anti IgG de cabra conjugado a HRP. Santa Cruz Biotechnology, sc-2020.	1:500
	Anti igG de ratón conjugado a HRP. Thermo Fisher Scientific, g-21040.	1:1500

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para Western Blot.

6. Ensayo de actividad de fosfatasa alcalina

Se retira la placa con células de la estufa y se descarta el MP. Se realiza un lavado con PBS y se agrega un volumen adecuado de la solución de sustrato NBT/BCIP 1-Step (Thermo Scientific) de manera tal que cubra toda la superficie del well. Se incuba durante 30 min a 37 °C. Pasado ese tiempo se descarta la solución y se registra el resultado mediante fotografías del well.

Resultados

Como detallamos previamente en la sección Introducción, la obtención de CMPI se logra mediante la expresión ectópica de FTs específicos que inician el proceso de reprogramación. Aunque se han logrado avances significativos que mejoran la eficiencia y calidad de este proceso, hay parámetros que aún siguen siendo una limitante y persisten incógnitas en torno a los mecanismos moleculares involucrados, cuyo entendimiento es crucial para la optimización del proceso. Esto no solo incrementaría su potencial y accesibilidad en diversas aplicaciones dentro del campo de la medicina regenerativa, en el desarrollo de modelos de enfermedades y para la evaluación de fármacos, sino que también abriría nuevas posibilidades en la investigación biomédica, por ejemplo, en el área de la medicina personalizada.

1. Generación de líneas estables e inducibles para evaluar el proceso de reprogramación

Un paso determinante del éxito en la obtención de CMPI es la incorporación de los FTs de reprogramación en las células diferenciadas y representa un cuello de botella del proceso. Para independizarnos del mismo y tener una herramienta que permita estudiar la dinámica del proceso de reprogramación, previamente en nuestro laboratorio en la última etapa de su tesis doctoral, Camila Vázquez Echegaray se propuso generar líneas estables de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) que expresen los FTs OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC, conocidos en su conjunto como factores de Yamanaka, de manera inducible por Doxiciclina (Dox). Esta característica permite modular la expresión de estos FTs, y por ende, tener control tanto sobre el momento de inicio del proceso de reprogramación, como una vez reprogramada, detener la expresión de los FTs exógenos, permitiendo una regulación normal de los FTs de pluripotencia endógenos. Poseer esta capacidad es relevante ya que una vez obtenidas las CMPI, si se desea diferenciarlas, es necesario que los FTs exógenos estén silenciados para que los endógenos se regulen mediante los mecanismos propios de la célula. La expresión inducible se consigue mediante el uso del sistema Tet-On, en este se encuentra una región regulatoria río arriba del gen de interés que puede unir al factor transactivador (rtTA) únicamente cuando este está unido a Dox, activando así la transcripción del gen de interés (Figura 5).

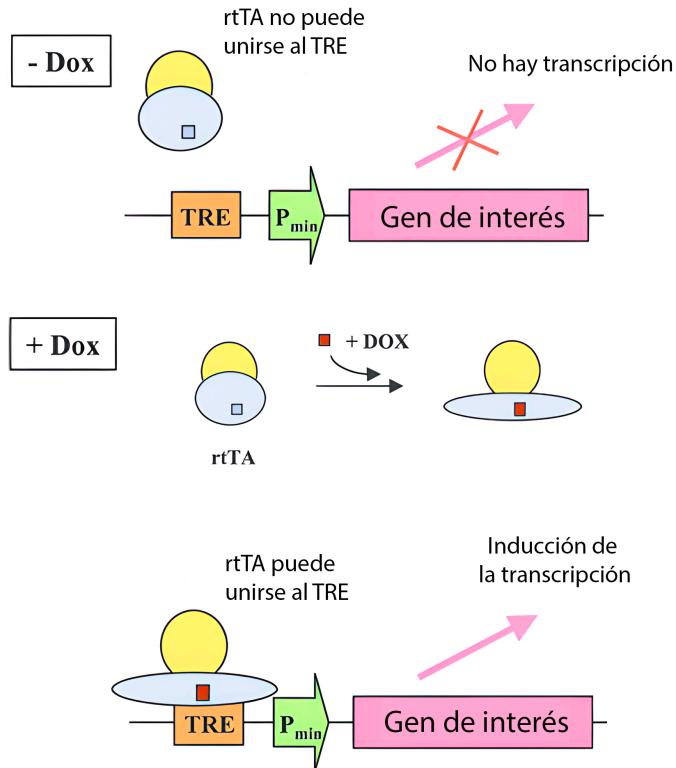


Figura 5. Sistema Tet-On. Este sistema puede ser utilizado para activar de forma condicional la expresión de un gen de interés. En ausencia de Dox, el rtTA (transactivador dependiente de tetraciclina) tiene una conformación que no le permite unirse al elemento regulatorio TRE (Tet-responsive element) y por lo tanto, la transcripción del gen de interés no se induce, ya que se encuentra río abajo de un promotor mínimo (P_{min}). Con el agregado de Dox, rtTA cambia su conformación y puede unirse al TRE, induciendo la transcripción del gen de interés. Extraído y adaptado de Palais et al [62].

En una primera etapa de este trabajo, decidimos continuar el proyecto que había comenzado la Dra. Vázquez Echegaray, quien logró aislar clones con dichas características y comenzó a estudiar mediante PCR la presencia de la construcción OSKM en el genoma de los mismos. Partiendo desde este punto, decidimos continuar con la validación, analizando la inducción por Dox del cassette. Para ello exploramos distintas concentraciones de Dox y diferentes tiempos de tratamiento, mediante RT-PCR y obtuvimos resultados positivos para los clones analizados. Posteriormente cuando intentamos analizar la expresión del cassette mediante Inmunofluorescencia y la capacidad de estas células de ser reprogramadas mediante análisis de la morfología ante el tratamiento con Dox, no pudimos obtener resultados favorables, incluso a tiempos muy largos de inducción. Dedicamos varios meses a probar distintos abordajes, condiciones y tiempos de inducción, lo que resultó sumamente formativo. Sin embargo, dado que los clones evaluados no cumplían con las características necesarias para la herramienta deseada y que en ese periodo se produjo la pérdida de los otros clones generados por la ruptura del tanque de nitrógeno donde criopreservamos las células, decidimos generar nuevamente las líneas celulares a partir de las líneas parentales originales.

En particular, nos propusimos generar dos líneas celulares con estas características que acabamos de mencionar: una a partir de la línea NIH wt y la otra a partir de la línea NIH YPet-OCT4 generada previamente en nuestro laboratorio por la Dra. Camila Vázquez

Echegaray y utilizada además en otro proyecto [60]. Esta línea posee insertada en su genoma una construcción también inducible por Dox, codificante para el FT OCT4 fusionado a la proteína fluorescente YPet, permitiendo el estudio de las interacciones dinámicas de este FT en células vivas, a escala de célula única. Estas líneas celulares clonales nos permitirán trabajar con cultivos homogéneos donde todas las células poseen el mismo *background* genético, y cuya reprogramación pueda ser inducida fácilmente con el agregado de Dox al medio de cultivo. Además, la línea que expresa YPet-OCT4 nos permitirá estudiar la distribución y dinámica de interacción de este FT con la cromatina durante el proceso de reprogramación.

Específicamente, para la generación de estas líneas celulares, utilizamos un vector PiggyBac que contiene el cassette de los factores de Yamanaka (PB-iOSKM): OCT4, SOX2, KLF4 y c-MYC humanos, cuya expresión es inducible por Dox (Figura 6A). Esta construcción puede ser incorporada de manera estable en el genoma mediante co-transfección con un vector que expresa la enzima transposasa específica (ePBac Transposasa), dado que se encuentra flanqueada por sitios de reconocimiento de esta enzima -repeticiones invertidas (ITR)- y la misma tiene la capacidad de cortar el genoma e insertar fragmentos flanqueados por estos sitios en el ADN [52] (Figura 6B). Además, el vector PB-iOSKM posee el gen de resistencia al antibiótico puromicina, también dentro de la región flanqueada por las ITRs, por lo que es integrado junto con los FTs de Yamanaka; esto permite realizar una selección de aquellas células en las que haya ocurrido su inserción en el genoma.

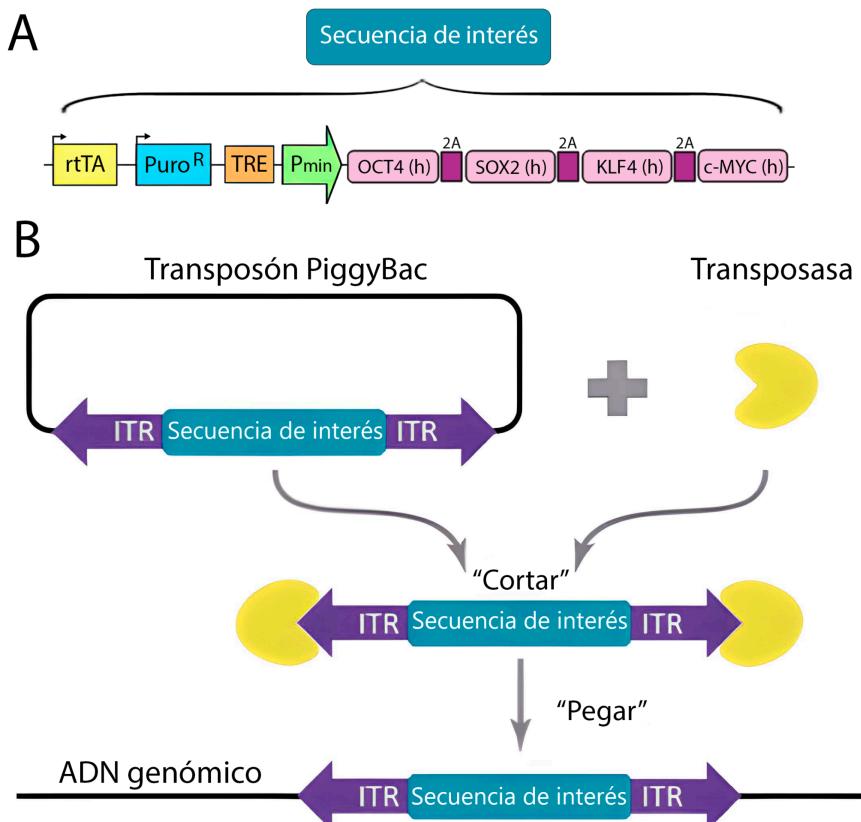


Figura 6. A: Diagrama esquemático de la secuencia de interés codificada en el vector PB-iOSKM. rtTA: gen del transactivador dependiente de Tetraciclina/Doxiciclina, Puro^R: gen de resistencia a puromicina, TRE:Tet-responsive element, P_{min}: promotor mínimo, 2A: péptidos 2A que permiten la

síntesis de las diferentes proteínas a partir de un único ARNm. **B:** Mecanismo de acción del sistema PiggyBac. Al co-transfectar el plásmido que contiene la secuencia de interés flanqueada por las secuencias ITR, junto con un plásmido de expresión para la transposasa, se logra el reconocimiento de las secuencias ITR por parte de la misma. Este proceso conduce a la inserción de la secuencia de interés en el genoma de la célula blanco. En este caso, la secuencia de interés contiene los cassettes OSKM y de resistencia a puromicina. Extraído y adaptado de Addgene Blog (Transposagen) [63].

1.1 Puesta a punto de las condiciones de selección

Con el objetivo de poner a punto las condiciones de selección de aquellas células con el cassette OSKM insertado en su genoma, evaluamos la supervivencia de nuestras células en una curva de concentración creciente de este antibiótico para encontrar la condición adecuada a utilizar durante la selección. Si bien en nuestro laboratorio ya se había utilizado este antibiótico previamente, fue utilizado en CHP y no en MEF. Por lo tanto, realizamos esta curva debido a que cada tipo celular puede tener una sensibilidad diferente. Para ello, expusimos a las dos líneas parentales (NIH wt y NIH YPet-OCT4) a distintas concentraciones de puromicina, en un rango que previamente había resultado efectivo en otras líneas celulares del laboratorio, durante 48 h. En la Figura 7A, se observa que el porcentaje de células vivas disminuye con el aumento en la concentración de puromicina. En particular, no logramos detectar mediante observación al microscopio células vivas a concentraciones de 4 µg/mL o mayores.

De manera complementaria a lo observado, realizamos un ensayo de viabilidad mediante la tinción con cristal violeta (CV). Este es un método simple comúnmente utilizado para cuantificar la viabilidad en células adherentes ya que la unión de estas a la placa se ve comprometida cuando las células mueren. El CV se une al ADN y las proteínas, por lo que tiñe a todas las células que permanecen adheridas a la placa. De esta manera, la disminución en la viabilidad se evidencia por una reducción en el valor de absorbancia obtenido en la cuantificación de la tinción, debido al desprendimiento de las células. En las fotos de las placas luego de la tinción con CV, presentadas en la Figura 7B, se aprecia una evidente disminución de los niveles de tinción en las dos concentraciones más altas, lo que se confirmó mediante la cuantificación de este producto solubilizado mediante determinación de la absorbancia a 595 nm (Figura 7C). Finalmente, con 5 µg/mL de puromicina la viabilidad de ambas líneas es casi indetectable, por lo que decidimos utilizar esta concentración para el proceso de selección.

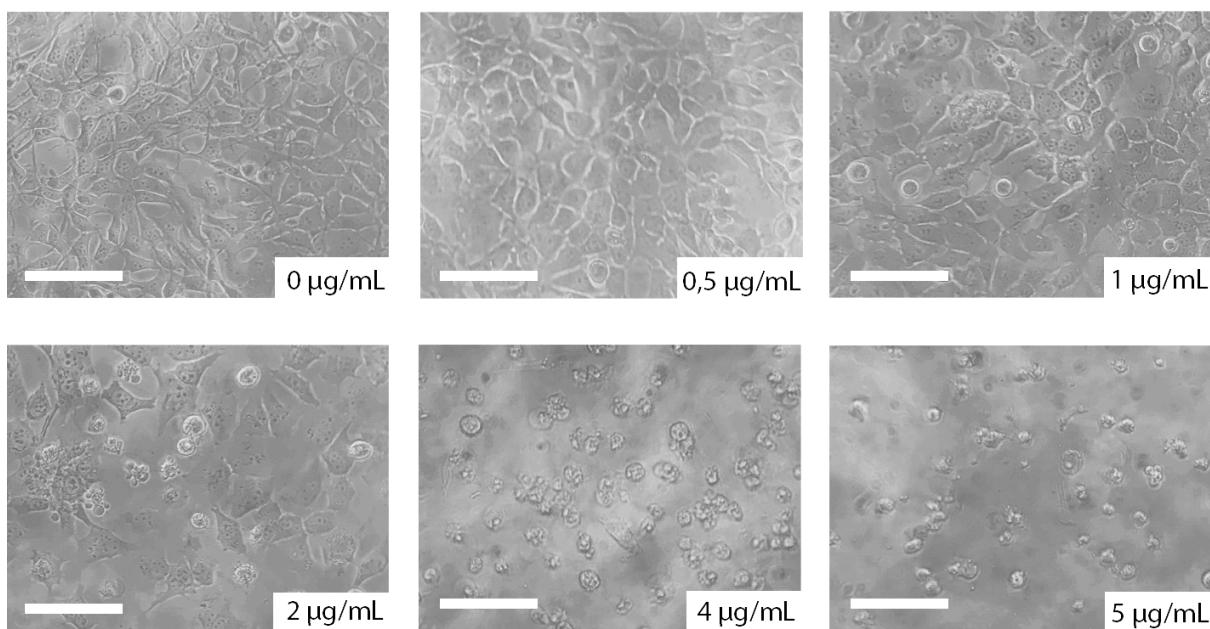
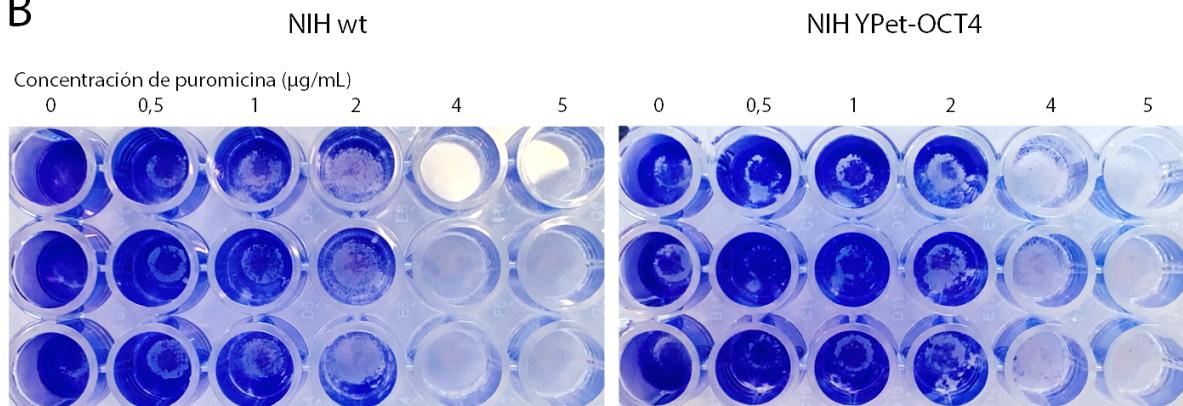
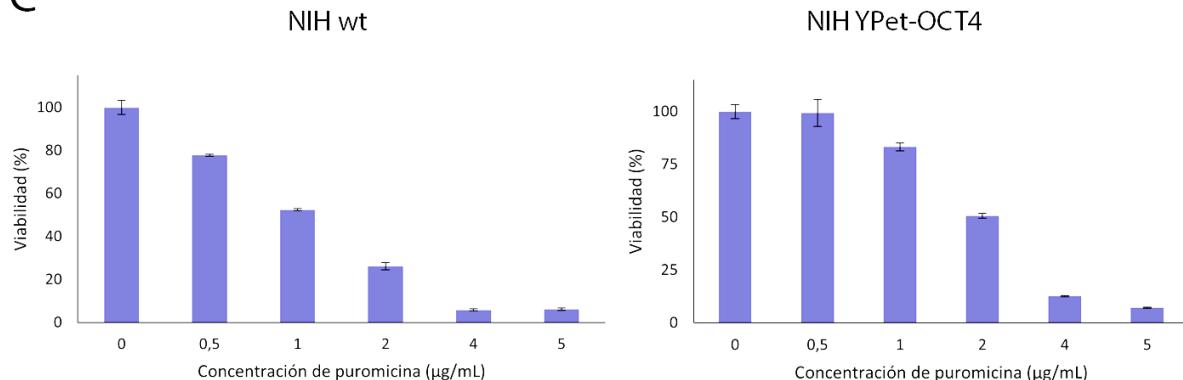
A**B****C**

Figura 7. Curva de sensibilidad al antibiótico puromicina de las líneas parentales NIH wt y NIH YPet-OCT4 (0 a 5 $\mu\text{g/mL}$). Las células fueron sometidas a diferentes concentraciones de puromicina durante 48 h. **A:** Imágenes de microscopía de contraste de fase representativas de la línea celular NIH wt obtenidas con objetivo de 400x. La barra de escala corresponde a 100 μm . **B:** Tinción con cristal violeta (CV). Imágenes de las placas luego de la tinción y antes de la solubilización del

colorante para su cuantificación. **C:** Cuantificación. Porcentaje de viabilidad celular calculado con el promedio del valor de Absorbancia a 595 nm de 3 réplicas técnicas, al que se le restó el valor del blanco y luego se lo relativizó a la condición control sin tratar con antibiótico (0 µg/mL, considerado 100% de viabilidad celular). Las barras de error representan el error estándar asociado.

1.2 Transfección, selección y aislamiento

Una vez determinadas las condiciones de selección realizamos la transfección para comenzar con el proceso de generación de las líneas. La metodología del procedimiento se encuentra descrita en forma detallada en Materiales y Métodos y esquematizada en la Figura 8.

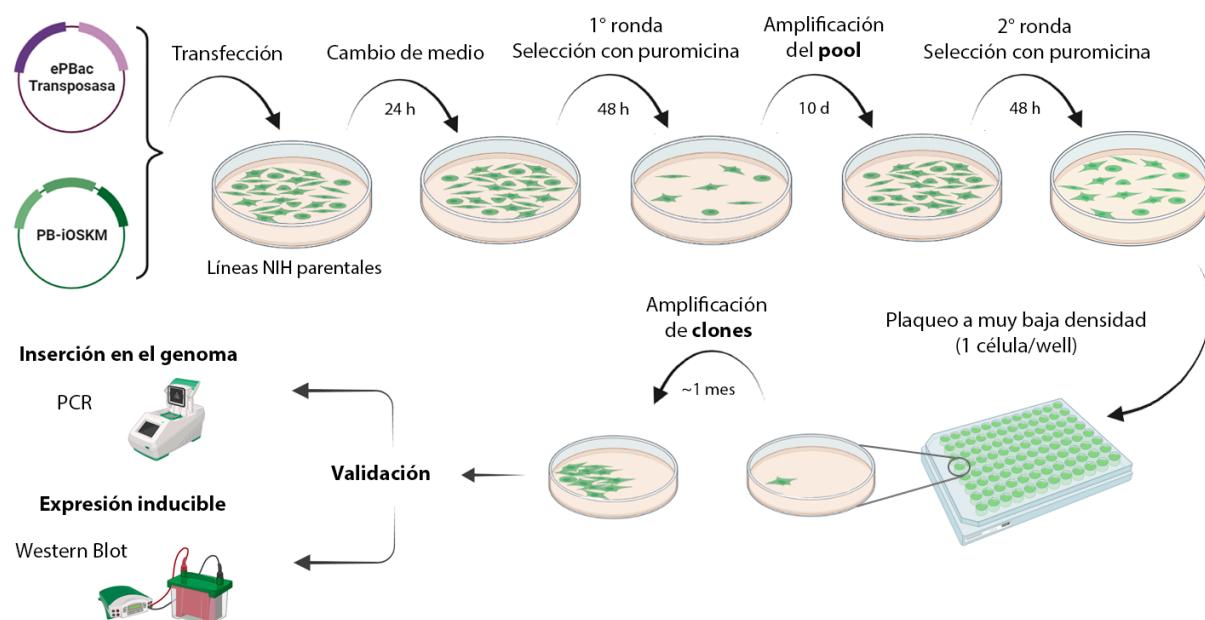


Figura 8. Representación esquemática del procedimiento para la obtención de las líneas celulares clonales.

En términos generales, consistió en plaquear un número determinado de células de las líneas parentales para obtener una confluencia adecuada. Al día siguiente se realizó la transfección transitoria de las células utilizando el agente polietilenimina (PEI), el cual genera complejos con el ADN plasmídico que son endocitados por las células [64].

Con respecto a la co-transfección de los plásmidos PB-iOSKM y ePBac-Transposasa, probamos dos relaciones diferentes entre ellos, 2:1 y 4:1, respectivamente. La transfección se realizó de manera transitoria ya que nuestro objetivo era ingresar ambos plásmidos a las células y lograr la expresión temporal de la transposasa. Este paso es crucial para integrar la secuencia de interés en el genoma celular, generando así una modificación genética estable mediante el sistema PiggyBac explicado anteriormente.

A las 24 h de la transfección se realizó un cambio de medio y a las 48 h se comenzó la selección con 5 µg/mL de puromicina. La selección se llevó a cabo con el objetivo de retener exclusivamente aquellas células que han integrado al menos una copia de la

secuencia de interés, dado que, como ya mencionamos dentro de la secuencia a ser integrada en el genoma se encuentra el gen de resistencia a puromicina. Por el contrario, las células que no han incorporado dicha secuencia son sensibles al antibiótico y, por ende, mueren al ser expuestas al mismo, ya que se éste afecta el proceso de traducción por ser estructuralmente similar a un tRNA y unirse a los péptidos nacientes. Debemos mencionar que células que contienen el plásmido sin integrar, también sobreviven a la selección, pero dado que el plásmido sin integrar se va perdiendo a lo largo de los pasajes, se suele realizar una segunda ronda de selección luego de un tiempo, como describimos más adelante.

Al cabo de 48 h, se retiró el medio de cultivo y se realizaron sucesivos lavados para descartar todas las células muertas que no sobrevivieron a la selección. En la Figura 9 se observan imágenes representativas de las células luego de ser sometidas a diferentes condiciones. Como se observa en la Figura 9, la gran cantidad de células muertas presentes en la placa de células transfectadas y seleccionadas dificultó la detección de células vivas y evidenció la alta eficiencia del proceso de selección. Luego de un cambio de medio, para retirar las células muertas, logramos detectar un muy bajo número de células que sobrevivieron a la selección. Es por esto que decidimos incubarlas en medio fresco sin selección durante al menos 10 días, permitiendo que aquellas pocas células sobrevivientes se recuperen del estrés al que fueron sometidas, no sólo por el antibiótico sino también por los compuestos provenientes de las células muertas en el well. De esta manera, permitimos que las células seleccionadas se puedan propagar, aumentando así la cantidad de células para poder continuar con el establecimiento de las líneas.

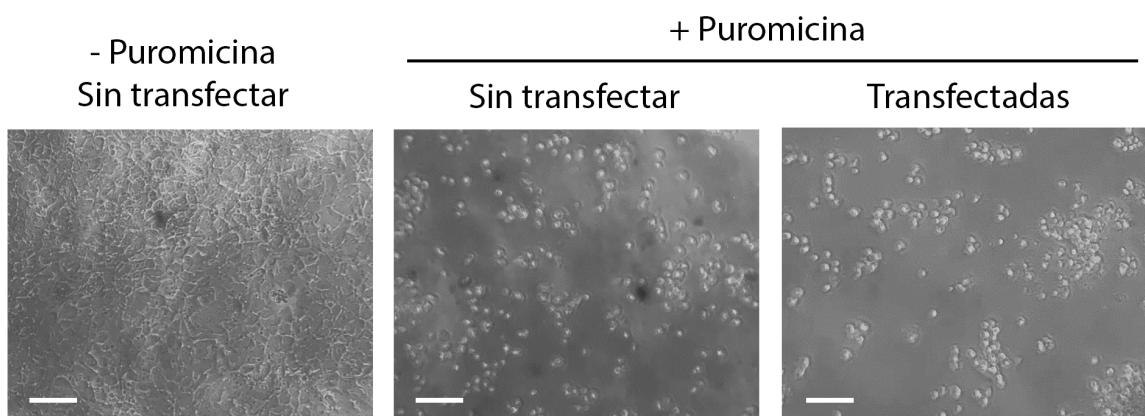


Figura 9. Imágenes representativas de células NIH wt y NIH YPet-OCT4, en ausencia o presencia de puromicina por 48 h. Como control positivo dejamos un *well* sin transfectar y sin seleccionar. El control de selección fueron las células sin transfectar tratadas con puromicina. Por último, realizamos la co-transfección del plásmido PB-iOSKM con la transposasa. La barra de escala corresponde a 100 μm .

Una vez amplificadas las células que sobrevivieron a la primer selección, realizamos una segunda ronda de selección con 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ puromicina previo al aislamiento de célula única para asegurarnos de que todas las células tuvieran inserto en su genoma el cassette de interés, dado que al haberlas amplificado tanto tiempo sin agente de selección, con que haya quedado una única célula sin el inserto de interés, luego de la amplificación representaría un porcentaje considerable de las células disponibles.

Finalmente, con el propósito de generar líneas celulares clonales, se realizó el aislamiento y propagación de célula única. Este proceso asegura la homogeneidad genética y funcional de todas las células del clon evaluado, proporcionando una base sólida para la realización de experimentos y la obtención de resultados fiables. Para ello se plaquearon las células extremadamente diluidas, haciendo el cálculo tal que quede en promedio una única célula por well. Se cultivaron y se fueron observando cada uno de los wells durante los días posteriores para detectar grupos de células provenientes de una única célula. Se descartaron aquellos wells sin células y los que presentaron más de un grupo. Luego de alcanzar una confluencia de al menos el 50% del well, se replaquearon las células de los wells elegidos a placas de mayor superficie para comenzar el proceso de propagación. El tipo celular utilizado es altamente sensible al cultivo a baja confluencia, ya que los contactos célula-célula juegan un rol fundamental en la proliferación normal, por lo que la amplificación de cultivos a partir de células individuales es un proceso lento. Sin embargo, luego de varias semanas logramos establecer clones de cada línea, los cuales se amplificaron y congelaron para su criopreservación.

1.3 Ensayos preliminares

Dado que el aislamiento y la amplificación de clones fueron procesos lentos que llevaron varias semanas de seguimiento, decidimos realizar en paralelo pruebas cualitativas sobre la población de células transfectadas y seleccionadas, a la que denominamos “pool”. Si bien se trata de una población heterogénea compuesta por células con diferente número de copias de la construcción integradas, y por supuesto, integrada en diferentes lugares del genoma, al tener una gran cantidad de células, nos permitió obtener resultados preliminares para planificar la validación posterior de las líneas clonales. Como mostraremos a continuación, estos ensayos preliminares se llevaron a cabo analizando la actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FA).

Brevemente, la actividad de FA se utiliza como reportero de reprogramación, ya que esta enzima se expresa en células pluripotentes pero su actividad no es detectable en ciertos tipos celulares ya diferenciados, como los fibroblastos [65]. En presencia de un sustrato adecuado que genera una reacción colorimétrica en presencia de la FA, puede detectarse fácilmente, lo que permite identificar de manera rápida y sencilla las células que se están reprogramando. Dado que en nuestro laboratorio esta técnica no se venía utilizando, adquirimos el reactivo específico, que actúa como sustrato de la enzima y el primer paso fue establecer las condiciones de detección. Esto incluyó un análisis de la cantidad de sustrato a utilizar y de los tiempos de incubación. Una vez establecidas las condiciones óptimas, pudimos implementar este ensayo simple, rápido y económico para identificar y monitorear la reprogramación celular en nuestros experimentos.

Puesta a punto del ensayo de actividad de fosfatasa alcalina

Realizamos el ensayo de actividad de FA utilizando una solución de sustrato comercial, compuesta por la combinación de NBT (cloruro de nitroazul de tetrazolio) y BCIP (sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato) que produce un precipitado de color azul-morado oscuro e insoluble al reaccionar con la enzima FA presente en tipos celulares

específicos, como las CMP. Para estas primeras pruebas, utilizamos dos líneas de CMP como controles positivos; W4 (CME de ratón) y una línea de CMPI de ratón generada previamente en el laboratorio [44]. Por otro lado, como referencia de una línea celular sin actividad de FA detectable, elegimos la línea celular parental que usamos para la generación de las líneas de estas Tesis; NIH wt (MEF). Realizamos el ensayo utilizando distintas concentraciones del sustrato, diluyendo al mismo en PBS y encontramos que la concentración óptima es sin diluir, ya que la intensidad del color del precipitado es mayor y esto permite visualizar e identificar mucho mejor las colonias de células pluripotentes. De manera consistente con lo esperado, al utilizar un porcentaje elevado de la solución de sustrato, en el caso de las células pluripotentes se evidencian precipitados oscuros que se corresponden con las colonias de CMP, mientras que para los fibroblastos no se observa precipitado en ninguna parte del well en ningún caso (Figura 10), indicando la ausencia de FA. Monitoreamos la aparición de precipitado a lo largo del tiempo y determinamos que el tiempo óptimo de incubación es de 30 minutos (no mostrado).

Debemos mencionar que un tiempo después encontramos en foros de discusión científica que el PBS podría inhibir la actividad de FA, por lo que queda pendiente para el futuro evaluar distintas concentraciones de sustrato en un buffer sin fosfato.

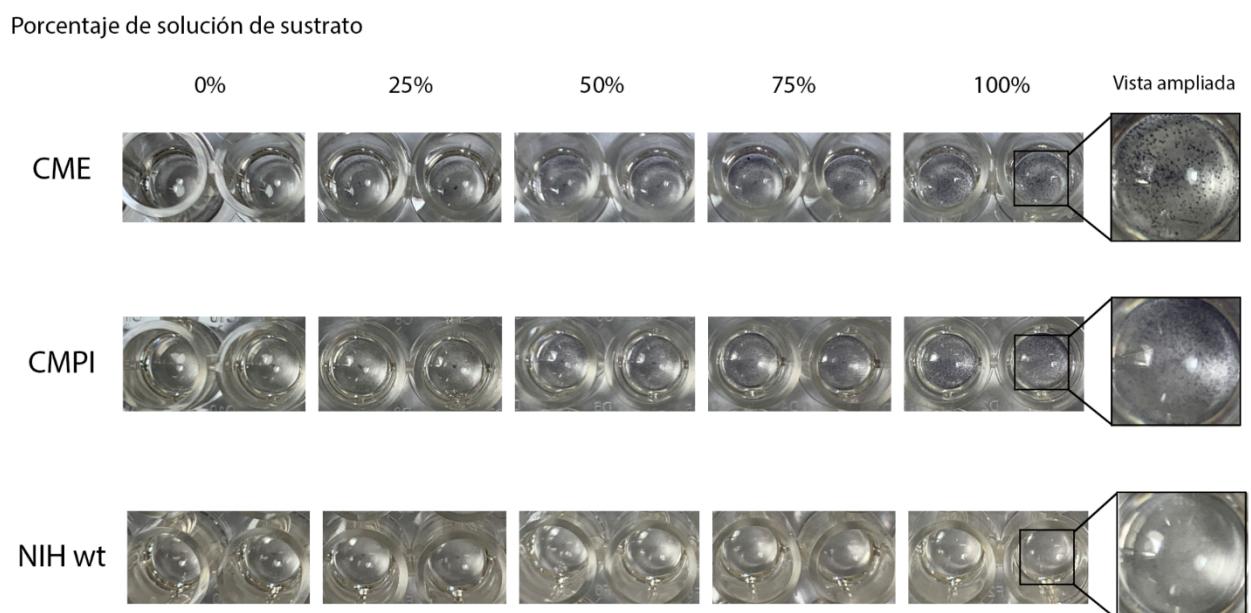


Figura 10. Imágenes de los wells con células de una línea de CME, CMPI y fibroblastos NIH wt (células no pluripotentes), posterior al ensayo de actividad de FA llevado a cabo con distintas diluciones de la solución de sustrato en PBS durante 30 minutos.

Puesta a punto del ensayo de capacidad de reprogramación sobre el pool

Luego de la puesta a punto de la determinación de FA, decidimos analizar la capacidad de reprogramarse del pool de ambas líneas al tratarlas con Dox. Dado que todavía no teníamos una referencia del tiempo en que las células de nuestro sistema podrían empezar a reprogramarse y adquirir este marcador de pluripotencia, para esta primera prueba elegimos un tiempo largo de incubación con Dox, en el que la actividad FA debería ser

detectable. Por otra parte, respecto a la concentración de Dox, decidimos utilizar 7 µg/mL, que previamente fue utilizada en nuestro laboratorio con una de las líneas parentales (NIH YPet-OCT4) para la inducción del YPet-OCT4 [60]. Dado que desconocemos la concentración de Dox necesaria para inducir la construcción OSKM, decidimos utilizar esta alta concentración con el fin de maximizar las posibilidades de detectar la reprogramación.

Como se observa en la Figura 11, los wells sin tratar con la droga no presentan actividad de FA como era esperado; sin embargo, los wells tratados con Dox no solo presentaron actividad FA, sino que sorprendentemente, detectamos que se encontraban casi totalmente cubiertos de precipitado azul. Por un lado, esto demuestra que el sistema inducible del OSKM funciona correctamente, respondiendo al agente inductor y promoviendo la reprogramación. Por otra parte, estos resultados son consistentes con que un gran porcentaje de las células del pool poseen la construcción integrada en su genoma, y con que esta sólo comienza a expresarse al tratar con Dox o que al menos los niveles basales no producen efectos detectables. Más aún, la expresión de la construcción desencadena el inicio del proceso de reprogramación celular que involucra el encendido de genes característicos de las CMP, como la FA. Finalmente, la alta cantidad de FA detectada sugiere que la mayoría de las células se encuentran transitando el proceso de reprogramación. Aclaramos que utilizaremos el término “reprogramación” para referirnos a cambios en el programa transcripcional, sin implicar que la célula se reprogramó completamente dando lugar a una CMPI. Por lo tanto, si bien la aparición de FA no demuestra que hayamos obtenido CMPI completamente reprogramadas, sí indica que los fibroblastos reprogramaron su genoma cambiando su expresión génica.

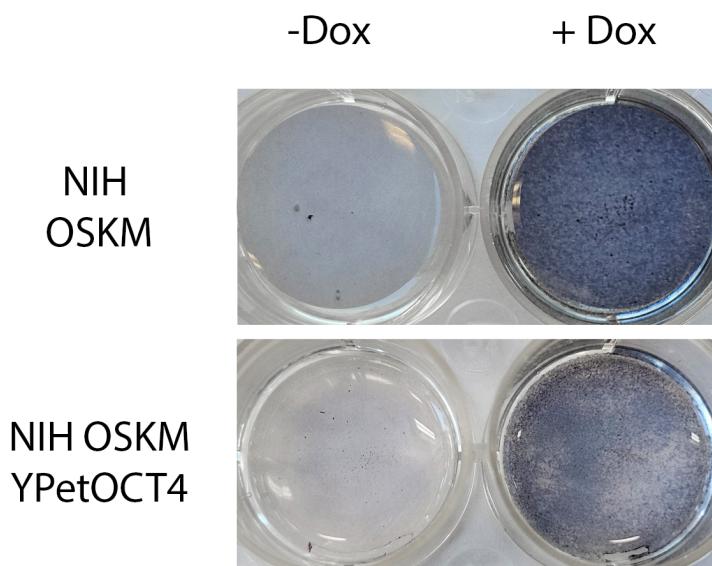


Figura 11. Fotografías de los wells luego del ensayo de actividad de FA sobre el pool de células transfectadas y seleccionadas de ambas líneas (NIH OSKM y NIH OSKM YPet-OCT4), sin tratar con Dox (izquierda) o tratadas con 7 µg/mL de Dox durante 12 días (derecha).

Durante la inspección de la morfología de las células al microscopio, en algunos de los wells en donde nos encontrábamos generando y amplificando las líneas clonales NIH

YPet-OCT4 OSKM, identificamos estructuras típicas de células reprogramándose (Figura 12A), como las mostradas en la Figura 4 de la sección Introducción. Esto nos llamó la atención ya que no estábamos tratando a las células con Dox, por lo que aparentemente se estaban reprogramando en forma espontánea. Para verificarlo, picamos esas estructuras que podían identificarse a simple vista en el *well* por su tridimensionalidad, las replaqueamos, seguimos su evolución morfológica durante los días subsiguientes y finalmente determinamos la actividad de FA. Observamos un precipitado oscuro correspondiente a la zona del *well* donde se encontraban las estructuras (Figura 12B), por lo que especulamos que estaban expresando el cassette OSKM aún en ausencia de Dox. Dado que la expresión inducible del cassette es un aspecto fundamental de la herramienta que queremos generar, al no cumplir con esta condición estas líneas fueron descartadas. Respecto a por qué pudo ocurrir esto, una posibilidad es que en estas células se hayan insertado múltiples copias del cassette en el genoma, generando una expresión basal que es suficiente para promover la reprogramación. Otra explicación posible es que durante el proceso de transfección y selección hayan sufrido alguna modificación en su genoma que tenga como consecuencia ese cambio morfológico y la aparición de actividad FA.

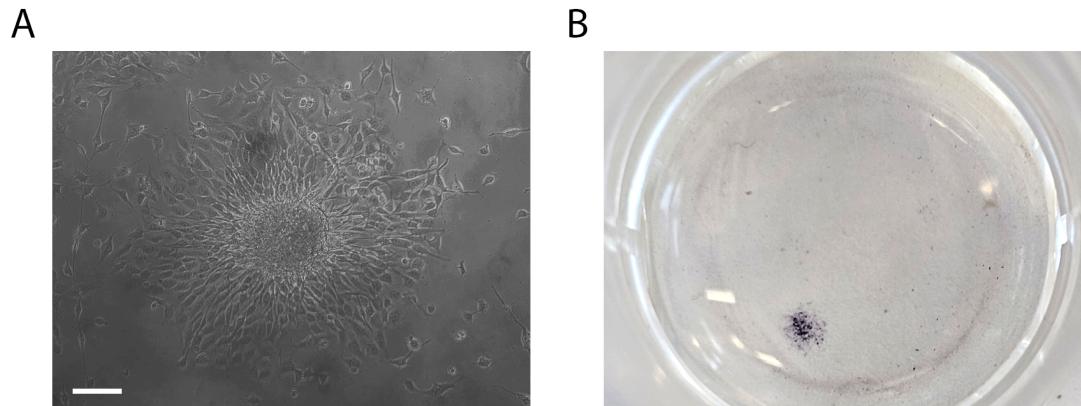


Figura 12. Formación de colonias espontáneas. **A:** Imagen representativa de las estructuras observadas al microscopio que adquirieron morfología de CMP de manera espontánea. La barra de escala corresponde a 100 µm. **B:** Imagen del *well* luego del ensayo de actividad de FA. La actividad FA corresponde a la región en la que se localiza la mencionada estructura.

Como comentamos anteriormente, el proceso de aislamiento de célula única implica la obtención de una suspensión celular con un número de células preciso de forma que, al plaquear un volumen determinado en una placa de *multiwell* de 96 (MW96), en promedio quede una única célula por *well*. La primera vez que llevamos a cabo esta estrategia de selección clonal, observamos que con el pasar de los días se evidenciaban varios grupos de células distanciados entre ellos, pero en un mismo *well*, por lo que determinamos que en esos casos debió haber sido plaqueada más de una célula por *well*. Por lo tanto, repetimos este proceso para poder tener wells con células provenientes de una única célula y a la placa resultante del primer intento fallido, en lugar de descartarla, la aprovechamos para realizar otro ensayo preliminar. Decimos utilizar estas células para analizar cuantos días de tratamiento con Dox son necesarios para detectar señal en el ensayo de actividad de FA, lo que nos resultó útil para decidir los tiempos de incubación con Dox a utilizar en la validación

posterior de los clones. Como se observa en la fotografía de la MW96 de la Figura 13, si bien algunas células se despegaron del *well* por los lavados que requiere el protocolo, sorprendentemente obtuvimos el precipitado característico de la actividad de FA al día 2 de incubación con Dox, siendo el menor tiempo que ensayamos en esta prueba, y luego una intensidad creciente hasta el día 7, máximo tiempo evaluado en este ensayo. Estos resultados preliminares indican que es posible detectar la actividad de FA en nuestro sistema en tiempos muy cortos luego del agregado de Dox, lo que sugiere una alta eficiencia y velocidad del proceso de reprogramación.

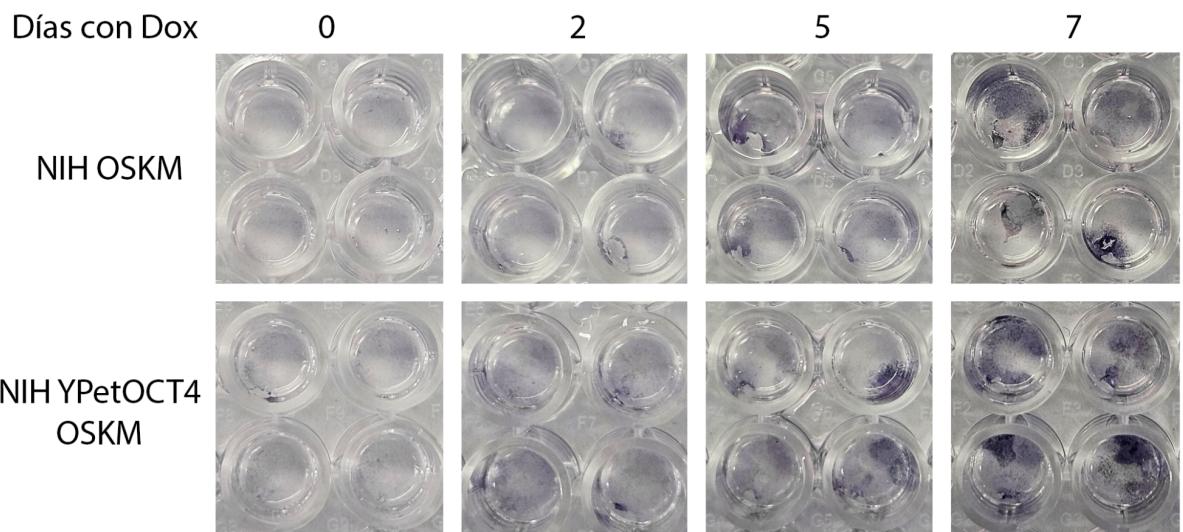


Figura 13. Imágenes de los *wells* conteniendo células del pool de ambas líneas tratados con Dox durante diferentes tiempos, luego de realizar el ensayo de actividad de FA.

2. Validación de las líneas clonales

Una vez terminado el proceso de aislamiento y amplificación de clones, que tomó varias semanas, contábamos con 6 clones de la línea NIH OSKM y 5 clones de la línea NIH YPet-OCT4 OSKM por lo que nos propusimos validarlos mediante abordajes complementarios. Dado que habíamos observado en nuestros análisis preliminares que las células del pool se reprogramaban con gran eficiencia mostrando actividad de FA, dada la facilidad y rapidez de este análisis, sumado a la poca cantidad de células que requiere, decidimos utilizarlo como primer ensayo de evaluación, mientras los clones se continuaban amplificando. De esta manera, en función del resultado obtenido con cada clon podríamos elegir con qué clones continuar la validación más exhaustiva. Para estudiar la capacidad de reprogramación de los clones, los tratamos a todos con Dox durante 7 días, manteniendo un control sin tratamiento en todos los casos y realizamos el ensayo de FA. Como se muestra en la Figura 14, las líneas parentales no presentaron actividad FA detectable en ninguno de los casos, como esperábamos, mientras que todos los clones analizados presentaron precipitados oscuros sólo al ser tratados con Dox. Sin embargo, se pueden apreciar grandes diferencias respecto a la cantidad de precipitado obtenido en cada caso, sugiriendo

que los diferentes clones tienen diferente capacidad de ser reprogramados. En función de esto, elegimos continuar la validación con los dos clones de cada línea que mostraron mayor actividad; en el caso de la línea NIH OSKM los clones elegidos fueron el clon 1 y el clon 3, mientras que para la línea NIH YPet-OCT4 OSKM fueron el clon 4 y el clon 5.

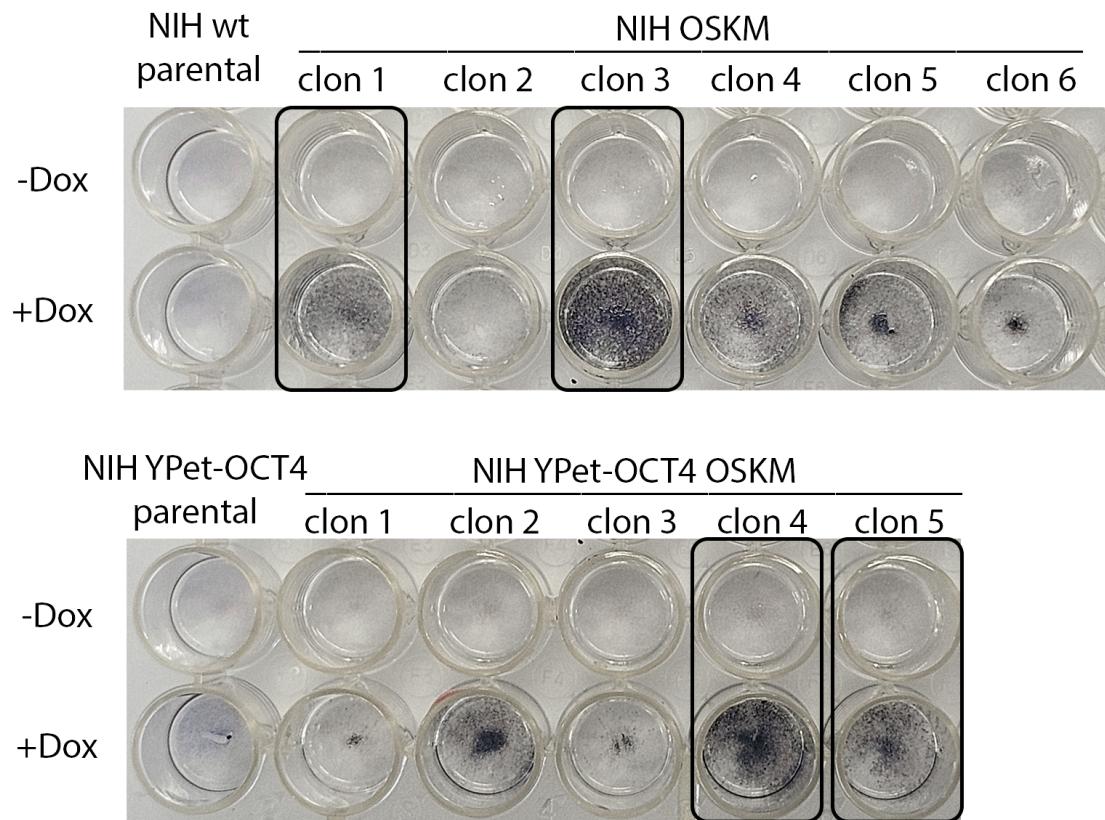


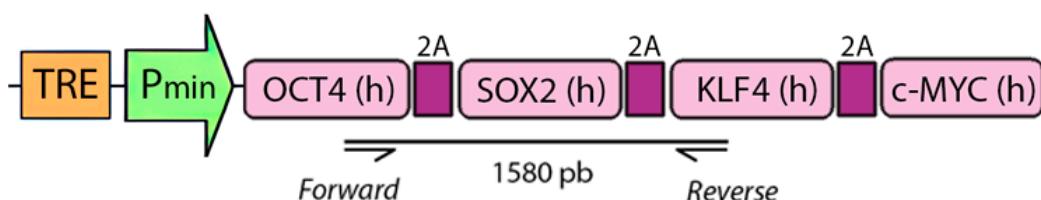
Figura 14. Imágenes de los wells luego del ensayo de actividad de FA conteniendo células de las líneas parentales o los clones obtenidos de cada línea, sin tratar (-) o tratados (+) con Dox durante 7 días. Los clones elegidos se encuentran remarcados en negro.

Análisis de presencia de la construcción en el genoma

Si bien el hecho de detectar la actividad de FA indica que los clones elegidos comienzan el proceso de reprogramación y por lo tanto poseen la secuencia de interés, corroboramos la inserción del cassette OSKM en el genoma de los clones elegidos, a través de la técnica de PCR a tiempo final utilizando como molde el DNA genómico de las células de cada clon elegido. Utilizamos primers específicamente diseñados para amplificar una región entre las secuencias de OCT4 y KLF4 que se encuentra dentro del cassette OSKM, y no en el genoma de las MEF parentales (Figura 15A). En la Figura 15B se muestran los resultados de la corrida electroforética de los productos de PCR. Asimismo, como control positivo de la PCR utilizamos el plásmido PB-iOSKM, un control negativo sin ADN molde y otro, con ADN de las líneas parentales y finalmente, como control de integridad del material genómico purificado, primers para detectar el gen endógeno de Gapdh, que está presente tanto en los clones como en las líneas parentales. Como se observa en esta Figura, 3 de los 4 clones

elegidos de las líneas OSKM dieron la banda esperada, lo que indicaría que sólo 3 clones de los evaluados poseen el inserto de interés en su genoma. En cambio, usando como molde el ADN genómico de las líneas NIH parentales no se obtiene producto de PCR, que era lo esperado ya que no poseen el inserto. Por lo tanto, solo con esta determinación aislada, podríamos concluir que 3 de los 4 clones elegidos poseen el inserto. Sin embargo, dado que el clon 3 respondió al tratamiento con Dox dando lugar a células con actividad FA, especulamos que la falta de detección de la construcción en el genoma se debe tratar de un problema técnico. Destacamos que la puesta a punto de las condiciones de esta PCR fue laboriosa, y recién logramos obtener resultados positivos cuando decidimos realizar un paso extra de purificación del ADN genómico, como mencionamos en la sección de Materiales y Métodos.

A



B

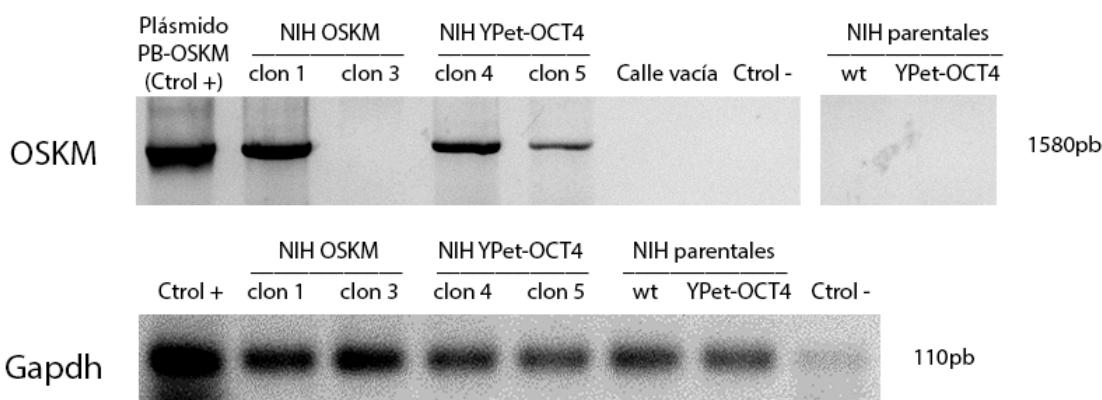


Figura 15. A: Esquema representativo de la secuencia codificada en el vector PB-iOSKM, y el amplicón esperado utilizando primers específicos (“PB-OSKM Forward” y “PB-OSKM Reverse”) que se unen a una región de la secuencia de OCT4 y una región en KLF4. **B:** Resultado de la corrida electroforética en gel de agarosa 1,8% de los productos de la PCR a tiempo final.

Análisis de inducción de la construcción

En paralelo a la validación a nivel genómico, para corroborar que la expresión del cassette OSKM se induce de forma dependiente de Dox y en ausencia de la misma se encuentra silenciado, realizamos un análisis de Western Blot para detectar SOX2, uno de los FTs incluidos en el cassette. Este fue realizado sobre las proteínas totales de células provenientes tanto de las líneas parentales como de los dos clones elegidos de las líneas NIH OSKM y NIH YPet-OCT4 OSKM. Como se observa en la Figura 16, en el caso de las

líneas parentales no se detecta expresión de SOX2 a ningún tiempo de tratamiento con Dox. Por otro lado, para los clones de las nuevas líneas OSKM generadas, en ningún caso se evidencia expresión de SOX2 en ausencia de Dox, mientras que todos presentan expresión de SOX2 a los 3 días de tratamiento con Dox. Con respecto al día 7, como se puede observar, solo pudimos detectar la expresión de SOX2 en la línea NIH OSKM y no así en la línea NIH YPet-OCT4. Creemos que esto se debió a un problema técnico y no de la línea celular en sí. Especulamos que hubo un problema con la Dox utilizada para los wells conteniendo los clones de la línea NIH Ypet-OCT4 OSKM. Este compuesto generalmente es renovado cada 48 h en cultivo y es sensible a los sucesivos descongelamientos, por lo que creemos que la Dox de la alícuota utilizada en esos wells puede haber estado degradada, por lo que no indujo la construcción en esas muestras en cantidad suficiente para ser detectada.

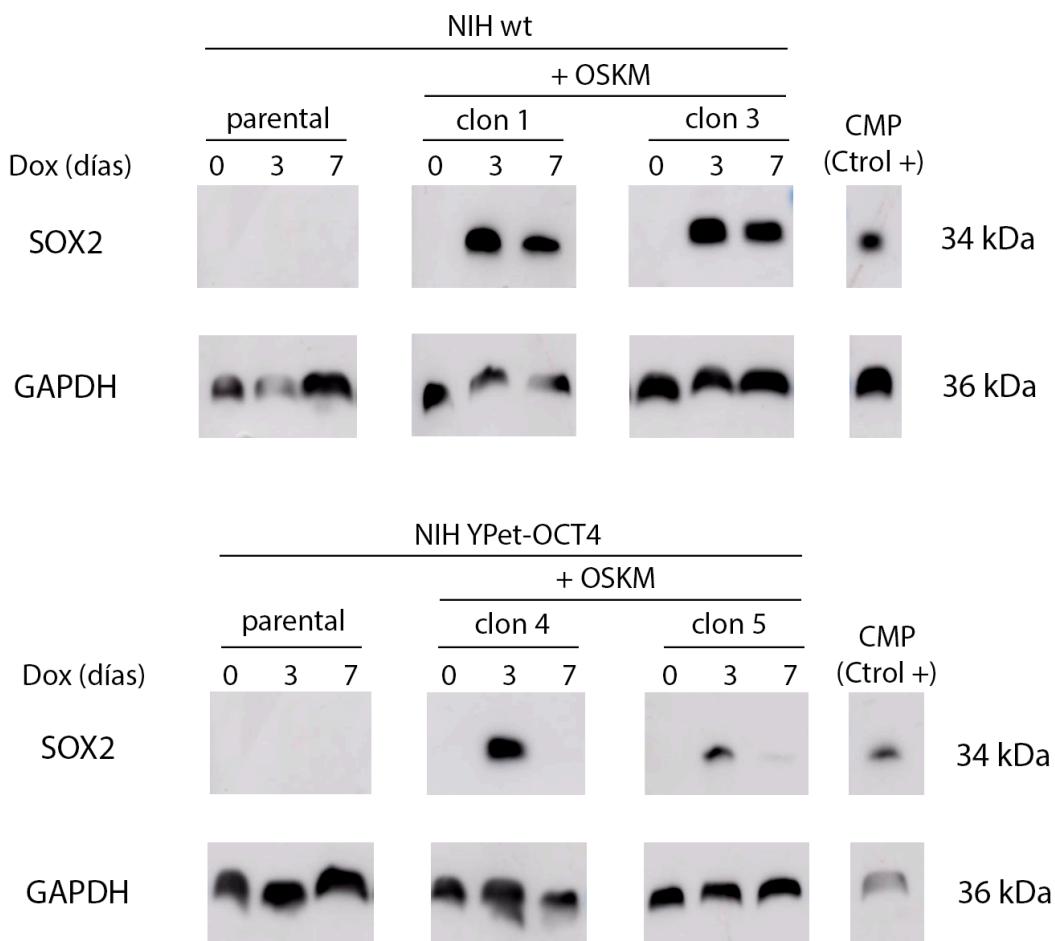


Figura 16. Western Blot para detectar el FT SOX2 correspondiente a extractos de proteínas totales de las líneas parentales, los dos clones elegidos de las líneas NIH OSKM y NIH YPet-OCT4 OSKM y una línea de CMP utilizada como control positivo. Se utilizó un anticuerpo contra GAPDH para detectar esta proteína como control de carga. Las fotos de las membranas completas se encuentran en el Anexo.

En conjunto, los resultados obtenidos confirman tanto la inserción en el genoma del cassette OSKM de los clones evaluados, como así también, su capacidad de expresar correctamente de forma inducible por Dox dicha construcción. Si bien en la validación a nivel genómico en la calle correspondiente al clon 3 de la línea NIH OSKM no se observa banda (Figura 15), creemos que se debe solo a una dificultad técnica, ya que tanto en la validación funcional (Figura 14) como en la validación a nivel proteína (Figura 16), los resultados indican que sí posee el cassette OSKM inserto en su genoma y responde a Dox. Luego de esta validación, avanzamos hacia la siguiente etapa de nuestro trabajo, donde utilizamos estas líneas como una herramienta para estudiar el proceso de reprogramación en diferentes condiciones.

3. Evaluación del efecto de pequeñas moléculas en el proceso de reprogramación

Como mencionamos en la sección Introducción, se ha evidenciado que se puede favorecer el proceso de reprogramación con el uso de inhibidores de modificadores de componentes de la cromatina. Las moléculas comúnmente utilizadas modifican la estructura de la cromatina, en general, haciéndola más accesible para los factores de transcripción [66]. En este experimento decidimos evaluar el efecto sobre la reprogramación de las líneas generadas de VPA y TSA, que son dos conocidos inhibidores de desacetilasas de histonas, y de LIF, un activador de vías de señalización relevantes para CMP. Dado que el efecto positivo en la eficiencia de reprogramación de estas moléculas ya había sido reportado [54] y que durante la validación observamos que en los clones, al ser tratados con Dox, se inducía la expresión y actividad de FA, indicando el inicio del proceso de reprogramación (Figura 14), este experimento constituye una prueba de concepto de la aplicabilidad y utilidad de la herramienta generada durante este trabajo, factible de poder ser realizada en el tiempo asignado para esta Tesis. Para el mismo utilizamos las líneas parentales a modo de control y un clon de cada línea OSKM, que fue elegido de entre los clones validados en la sección anterior.

En particular, nos propusimos evaluar el efecto de estas pequeñas moléculas en la reprogramación de las líneas generadas mediante el análisis de la evolución morfológica y el ensayo de actividad de FA, durante los primeros 7 días de tratamiento con Dox. Los tratamientos consistieron en el agregado de VPA 2 mM, TSA 20 nM y LIF 20 ng/mL durante todo el tratamiento en forma conjunta con la Dox. Asimismo, realizamos un control donde sólo se agregó Dox al medio de cultivo y otro donde además de la Dox se agregó DMSO, como control de vehículo del VPA. Por otra parte, realizamos un control sin agregado de Dox al medio (-Dox) en el que no esperamos detectar actividad de FA ya que al no agregar Dox no se induce la expresión del cassette OSKM. En paralelo, realizamos todos los tratamientos sobre las líneas parentales, en las que no esperamos efecto de la Dox, dado que no tienen la construcción inducible.

Como se observa en la Figura 17, en el caso de las líneas parentales, no detectamos actividad de FA con ninguno de los tratamientos a lo largo de los 7 días del experimento.

NIH wt parental

Día	+Dox					
	-Dox	Dox	DMSO	VPA	TSA	LIF
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						

NIH YPet-OCT4 parental

Día	+Dox					
	-Dox	Dox	DMSO	VPA	TSA	LIF
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						

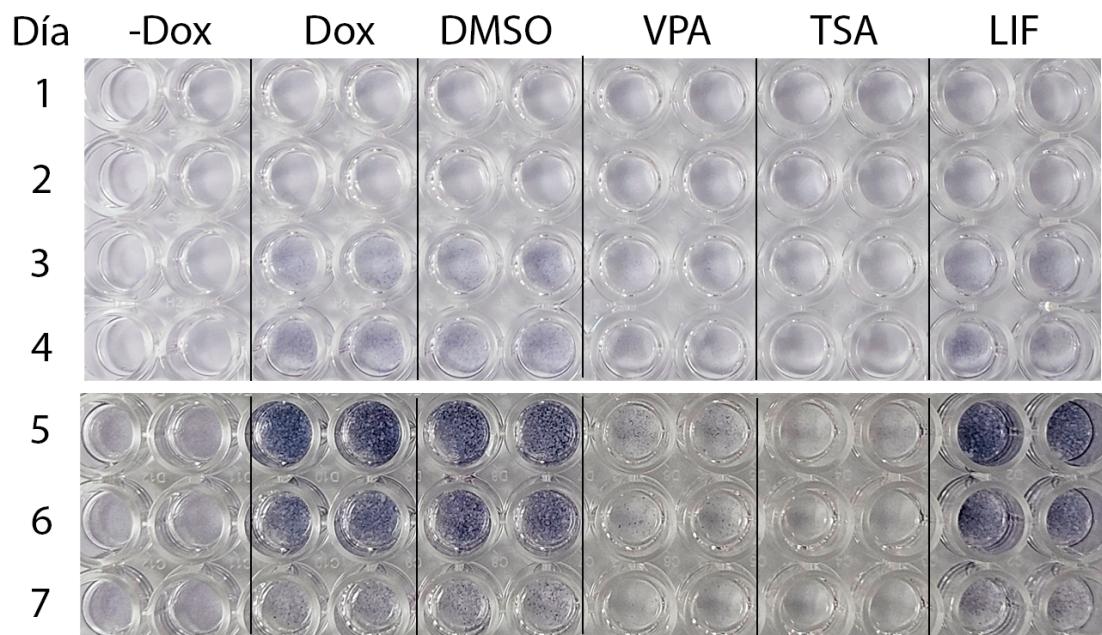
Figura 17. Imágenes de los wells luego del ensayo de actividad de FA conteniendo células de las líneas parentales sometidas a los diferentes tratamientos y tiempos de Dox.

Por otro lado, respecto a las líneas clonales OSKM bajo tratamiento con Dox (columna Dox), y por lo tanto, inducción de la expresión del cassette OSKM, tanto a día 0 como a 1 día de tratamiento, no se detectó actividad de FA, mientras que a partir del día 2 en adelante, se observó la presencia de precipitados de color azul, indicando la aparición de actividad de FA (Figura 18). Detectamos un aumento en la cantidad de estos precipitados, producto de la actividad de esta enzima, hacia el día 5 y a partir de este momento, se observó una leve disminución de los mismos. Estos resultados indican que los clones inician su proceso de reprogramación con el agregado de Dox y, aparentemente, que la cantidad de células reprogramadas aumenta con el tiempo. Sin embargo, como puede observarse en la Figura 18, la actividad FA es menor en los wells correspondientes a los días 6 y 7, respecto a los del día 5, donde observamos máxima intensidad. Esto podría interpretarse como una disminución de la actividad de esta enzima, indicio de un menor grado de pluripotencia, lo cual es improbable, o alternativamente, como un menor número de células presentando esta actividad, que podría ser consecuencia de algún otro factor actuando durante este proceso.

Por otro lado, con respecto a los demás tratamientos, en todos los casos, comparando de manera horizontal dentro de cada uno de los días de tratamiento, no se encontraron diferencias entre el control solo con Dox y el control de Dox con DMSO, por lo que dicho vehículo no parecería afectar la eficiencia de reprogramación. En el caso de los tratamientos con VPA y TSA, para nuestra sorpresa mostraron consistentemente una gran disminución en la actividad FA respecto al control con sólo Dox. Mientras que en el caso del tratamiento con LIF, no encontramos diferencias respecto al control.

NIH OSKM

+Dox



NIH YPet-OCT4 OSKM

+Dox

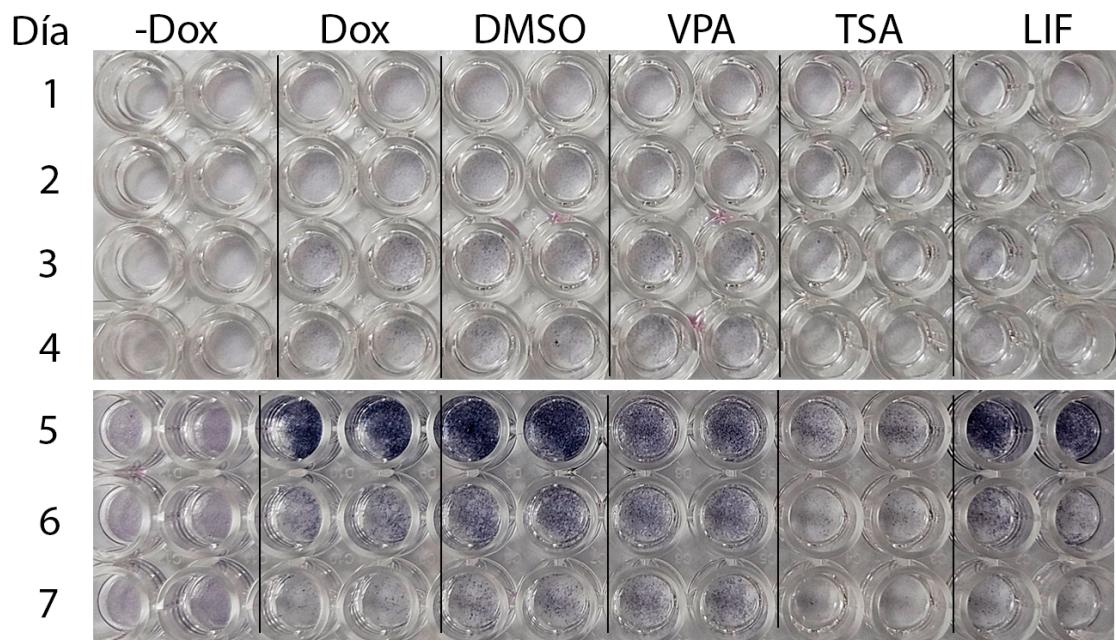


Figura 18. Imágenes de los wells luego del ensayo de actividad de FA contenido en células de las líneas clonales NIH OSKM y NIH YPet-OCT4 OSKM sometidas a distintos tratamientos y tiempos de Dox.

Debemos mencionar que en este ensayo, la cantidad de células inicial resulta un parámetro a tener en cuenta, ya que al partir de una mayor cantidad de fibroblastos es más probable obtener mayor cantidad de células reprogramadas y ver más precipitado azul. Por el diseño experimental utilizado en este ensayo, no es estrictamente correcto comparar la intensidad del precipitado entre wells de diferentes días con Dox, pero sí entre distintos tratamientos de un mismo día. En el futuro, planeamos estudiar además cómo impacta la densidad celular en el efecto de los diferentes tratamientos sobre el proceso de reprogramación.

En paralelo, complementario al ensayo de FA, fuimos analizando la morfología que las células adquirían en las diferentes condiciones. En la Figura 19 se muestran fotos representativas de las líneas OSKM sometidas a los distintos tratamientos durante 4 días. En el caso del control sin Dox, como esperábamos, la morfología observada fue la típica de fibroblastos. En los tratamientos con Dox, tanto en el control sin otros agregados, como en presencia de DMSO o LIF, observamos cambios respecto al control sin Dox, dado que se detecta que las células comienzan a adquirir morfología de *stem*; sin embargo, las células tratadas con VPA o TSA, se observan globulares, mucho más similar a la morfología típica de CMP.

Por otro lado, otro factor a tener en cuenta es la densidad de células, en todos los tratamientos con Dox la densidad de células resultó menor respecto al control sin Dox, y dentro de estos, la menor densidad se observó en los tratamientos con VPA y TSA. Estos resultados sugieren que los diferentes tratamientos pueden estar afectando tanto la viabilidad como la tasa de proliferación.

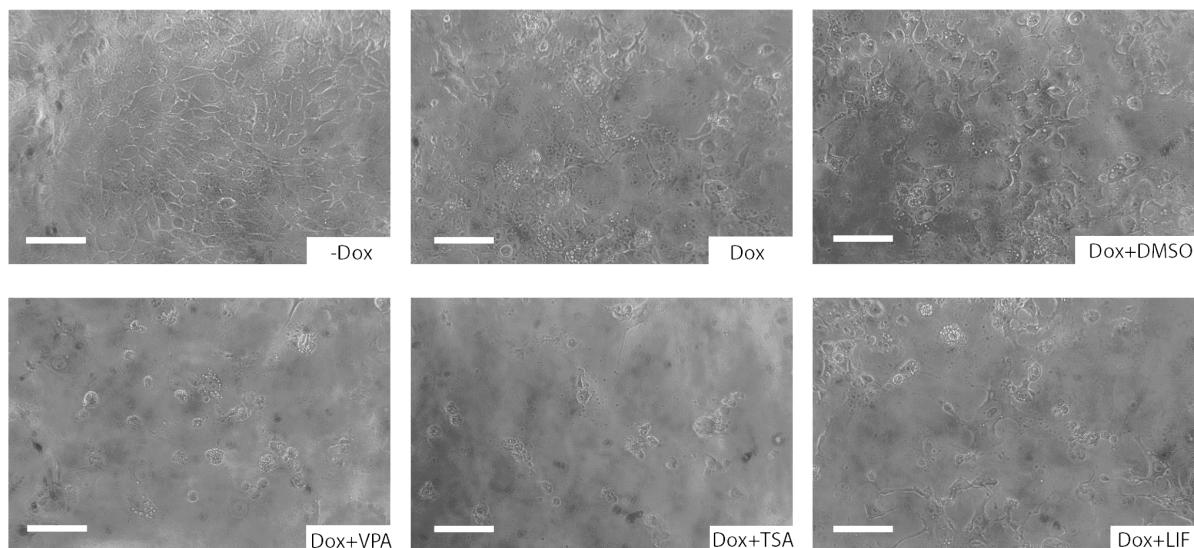


Figura 19. Imágenes representativas de las células de las líneas NIH OSKM y NIH YPet-OCT4 OSKM, sometidas a diferentes tratamientos durante 4 días. La barra de escala corresponde a 100 μm .

En cuanto a la morfología a los 7 días de tratamiento (Figura 20), nuevamente observamos que el control sin Dox mantiene la morfología típica de fibroblasto, confirmando que el cambio de morfología es consecuencia del proceso de reprogramación promovido

por la inducción de la construcción por la Dox. En cuanto a los tratamientos con Dox, observamos que todas las células adquieren morfología típica de CMP; a este tiempo ya no se aprecian grandes diferencias en morfología y densidad de células. En todos los casos encontramos células con una forma globular, por lo general agrupadas entre sí, atribuible al proceso de reprogramación. Por otro lado, la densidad es notoriamente menor al control sin Dox, lo que es esperable ya que durante el proceso de reprogramación una gran proporción de la población celular muere.

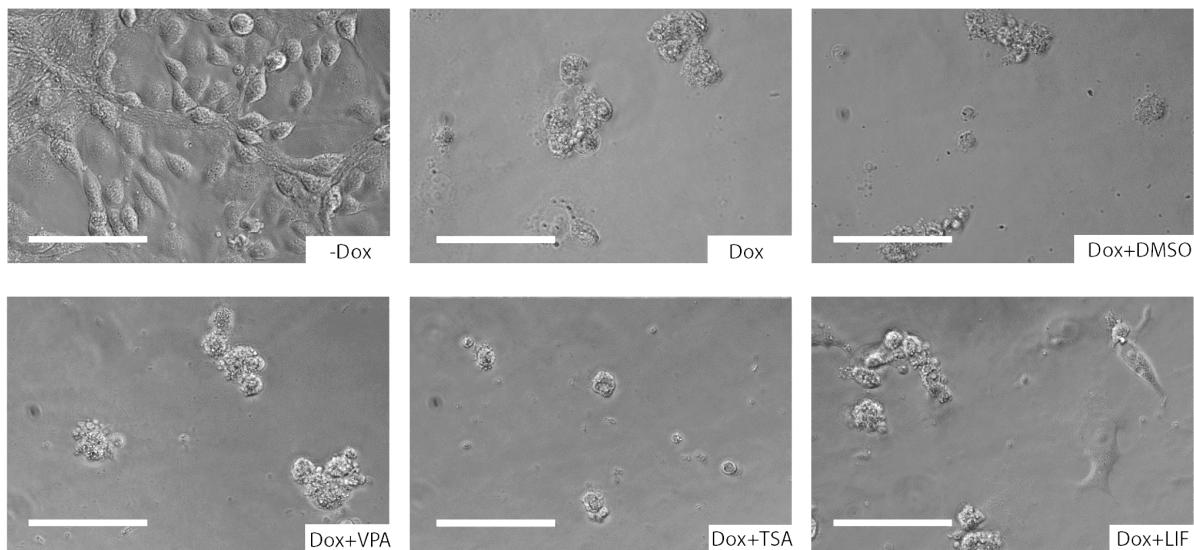


Figura 20. Imágenes representativas de las células de las líneas NIH OSKM y NIH YPet-OCT4 OSKM, sometidas a diferentes tratamientos durante 7 días. La barra de escala corresponde a 100 μm .

En síntesis, en esta sección, hemos demostrado que los clones elegidos son capaces de ser inducidos a reprogramarse mediante tratamiento con Dox y que presentan cambios detectables en su morfología y aparición de actividad FA en los primeros días de tratamiento. Por otra parte, encontramos que los tratamientos con VPA y TSA tienen un efecto en la morfología y actividad de FA aparentemente contrario al que esperábamos. En la siguiente sección discutiremos estas observaciones, así como también los siguientes pasos para la validación de estas líneas y los diferentes experimentos que estas herramientas generadas harán posible.

Discusión y Conclusiones

Las CMPI han emergido como una herramienta fundamental en la investigación y la medicina regenerativa debido a su capacidad para diferenciarse a una amplia variedad de tipos celulares [37]. A diferencia de otras CM, como las CME, las CMPI se pueden obtener sin provocar controversias éticas, ya que se derivan de células adultas, en general obtenidas por procedimientos poco invasivos, y que pueden ser reprogramadas mediante diferentes protocolos en el laboratorio. Esta característica no solo supera obstáculos éticos, sino que también ofrece una mayor compatibilidad inmunológica, reduciendo el riesgo de rechazo tras el trasplante. Asimismo, la posibilidad de generar células pluripotentes a partir de pacientes con diferentes patologías permite generar valiosos modelos de enfermedades en diferentes contextos genéticos. Sin embargo, para obtener el máximo potencial de las CMPI y que las promisorias terapias sean una realidad clínica, es fundamental comprender en profundidad los mecanismos moleculares involucrados en la generación y mantenimiento de estas células. De esta forma, la investigación dirigida a estos fines es esencial para aprovechar el potencial de las CMPI y garantizar que su transición del laboratorio a la práctica clínica sea segura y eficaz [41].

A lo largo de este trabajo desarrollamos dos líneas celulares con el objetivo de que la incorporación de los factores de Yamanaka no sean un impedimento para la obtención de CMPI y por lo tanto, generar una herramienta que facilite el estudio de los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de reprogramación celular. La generación de estas líneas implicó múltiples pasos; inicialmente pusimos a punto las condiciones de selección, realizamos la transfección, selección y un minucioso y prolongado proceso de aislamiento para garantizar que las líneas generadas cuenten con la característica de ser clonales, necesaria para la reproducibilidad de los resultados obtenidos al utilizarlas. Al eliminar la variabilidad genética, proporcionamos una plataforma experimental más estable y homogénea para llevar a cabo futuros estudios.

Una vez obtenidas las líneas celulares clonales, realizamos la validación de la incorporación al genoma mediante PCR y expresión de la construcción OSKM luego de la inducción por Dox, mediante Western Blot. Por otro lado, para evaluar su funcionalidad, estudiamos la capacidad de estas líneas de iniciar el proceso de reprogramación. Para este último fin, pusimos a punto el ensayo de actividad de FA en el laboratorio, que constituye un método de screening económico, simple y rápido para identificar células que se están reprogramando. Este ensayo nos permitió obtener resultados preliminares que nos ayudaron en la toma de decisiones durante el proceso de validación, en cuanto a qué clones elegir para realizar una validación exhaustiva e identificar el tiempo mínimo de tratamiento con Dox necesario para obtener un resultado positivo en el ensayo de FA. Mediante estas técnicas complementarias que evalúan diferentes parámetros verificamos de manera concluyente la capacidad de ambas líneas celulares clonales de expresar correctamente el cassette OSKM de forma inducible por Dox y de iniciar el proceso de reprogramación con el agregado de este inductor al medio de cultivo. Para completar la validación y estudiar en profundidad la capacidad de reprogramación de las líneas generadas, planeamos en el futuro realizar análisis de expresión de marcadores de pluripotencia endógenos a lo largo del proceso de reprogramación, por ejemplo de NANOG,

el tercer FT que conforma el core pluripotencia junto con SOX2 y OCT4, pero que, a diferencia de estos, no se encuentra incluido en la construcción OSKM. Esto podría realizarse detectando tanto el ARNm mediante RT-qPCR, como la proteína, mediante Inmunofluorescencia y/o Western Blot. Asimismo, para evaluar su pluripotencia, hay que someter a estas células a procesos de diferenciación no dirigidos y evaluar su capacidad de diferenciarse a derivados de las tres capas germinales, como se realizó previamente con otras líneas de CMPI generadas en el laboratorio [44] y en los otros trabajos del grupo donde se quiso evaluar pluripotencia [67, 68, 27]. Todo este análisis completará la caracterización de las líneas generadas, pero excede los tiempos y objetivos de este trabajo.

Como mencionamos anteriormente, hoy en día existe un gran esfuerzo de la comunidad por intentar mejorar la eficiencia de los protocolos de reprogramación. Uno de los abordajes más utilizados es el agregado de ciertos compuestos químicos, que en general son pequeñas moléculas orgánicas, principalmente inhibidores de modificadores de la cromatina o moléculas que afectan las vías de señalización involucradas. En general, estas moléculas afectan la estructura de la cromatina haciéndola menos compacta, por lo tanto, facilitan el acceso de los factores de reprogramación, impactando en el programa de expresión génica de las células diferenciadas y favoreciendo el proceso. Frente a esto, como prueba de concepto del potencial de las herramientas generadas, evaluamos en nuestro sistema el impacto de pequeñas moléculas, que ya poseen un efecto conocido sobre la eficiencia de reprogramación, consolidando así la aplicabilidad y relevancia de nuestro trabajo. En un trabajo pionero, Huangfu y colaboradores [54] demostraron que el agregado de VPA y TSA al medio de reprogramación tiene un gran impacto en la eficiencia de este proceso, siendo el tratamiento con VPA el de resultados más evidentes y generando una eficiencia más de 100 veces mayor a la del control. Frente a esto, esperábamos que la cantidad de precipitado azul en el ensayo de actividad de FA sea notoriamente mayor en aquellos wells inducidos y tratados con estas moléculas, respecto al control inducido sólo con Dox; sin embargo, obtuvimos lo contrario. Con respecto a estos resultados, si bien el ensayo de FA representa un valioso recurso que nos permitió, junto con el análisis morfológico, estudiar el efecto de estas pequeñas moléculas, reconocemos las limitaciones inherentes. Por ejemplo, la imposibilidad de solubilizar el precipitado en el ensayo de FA implica que los resultados son de naturaleza cualitativa. Además, es dependiente de la cantidad de células diferenciadas de las que se parte y de la capacidad de adhesión al plástico del *well* de las células reprogramadas, por lo que ambos factores representan aspectos importantes al interpretar los resultados y se vuelve fundamental combinar los resultados de diferentes abordajes para poder llegar a conclusiones confiables.

Teniendo esto en consideración, especulamos que la razón por la cual se observa menor cantidad de precipitado, sugiriendo menor actividad FA, en los tratamientos con VPA y TSA es la misma por la que la cantidad de precipitado comienza a disminuir luego del día 5 de inducción en los tratamientos restantes. Las células de las cuales partimos, los fibroblastos, tienen la capacidad de adherirse por sí solas al plástico del *well*, ya que sintetizan y secretan su propia matriz extracelular (MEC). Las CMP carecen de esta capacidad y por lo tanto, para adherirse al plástico de las placas dependen de una matriz que puede provenir de determinados tratamientos que se realizan sobre el plástico previo al plaqueo de las células, denominado “coating”, o de una capa de células que produzcan MEC, denominada *feeder layer*, para lo que habitualmente se utilizan MEF. Teniendo esto en cuenta, especulamos que una menor cantidad de actividad FA podría no ser

consecuencia de una menor eficiencia de reprogramación, si no que refleja una situación en la que todas las células vivas están completamente reprogramadas, pero que las células que quedaron parcialmente reprogramadas mueren, como parte del proceso de reprogramación [69]. En las condiciones en que el proceso de reprogramación resulta menos eficiente, es probable que estas células no mueran y puedan funcionar como *feeder layer*; sin embargo, en aquellas en que mueren, las CMPI que surgen tendrían menor cantidad de MEC a la cual adherirse. Esto traería como consecuencia que las células reprogramadas se suelten completamente del plástico y pasen a estar en suspensión, o se adhieran más débilmente. En ambos casos, con el lavado previo al ensayo de FA, las células que no están fuertemente adheridas a la superficie son retiradas de la placa junto con el PBS y no permanecen para ser detectadas. Creemos que en el caso de los controles +Dox y +Dox+DMSO, y en el tratamiento con +Dox+LIF, este punto es alcanzado alrededor del día 5 y es por ello que a partir del mismo la cantidad de precipitado comienza a disminuir. Por otro lado, especulamos que, en el caso de VPA y TSA, este punto se alcanza mucho más rápido y por lo tanto la cantidad de precipitado es menor desde los primeros días. Estas especulaciones están respaldadas con la evaluación al microscopio, ya que en el caso de los tratamientos con VPA y TSA ya en el día 4 de Dox se aprecia una menor cantidad de células adheridas en el *well*, y estas tienen una morfología similar a las CMP. Por otro lado, en el resto de los tratamientos, a día 4 se observa mayor cantidad de células en el *well* pero un gran porcentaje de las mismas conservan la morfología de fibroblasto. Contrariamente, en todos los tratamientos a día 7 se observa una menor cantidad de células, teniendo la mayoría de ellas una morfología similar a CMP, sugiriendo una reprogramación exitosa. De esta forma, especulamos que el efecto del tratamiento con VPA y TSA sería una aceleración en el proceso de reprogramación, de forma que las células que no pueden reprogramarse completamente mueren más rápido mientras que las que sí pueden hacerlo, se reprograman más rápido y muestran una morfología de célula pluripotente con menos días de tratamiento. Como perspectiva a futuro, planeamos continuar estudiando esta hipótesis, cambiando las condiciones del sustrato y del medio de cultivo y analizando además otros parámetros, como aparición de otros marcadores de pluripotencia, proliferación y apoptosis.

Como conclusión final, en este trabajo logramos generar una herramienta que representa un valioso recurso para estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la reprogramación celular. No solo mejora la eficiencia del proceso al superar el cuello de botella de la incorporación simultánea de todos los FTs de Yamanaka, sino que además simplifica su estudio a largo plazo. En especial, la línea celular con la construcción fluorescente YPet-OCT4 amplía aún más la utilidad de esta herramienta al permitir una observación detallada de la dinámica y distribución del FT durante el proceso de reprogramación en células vivas. En este punto, debemos destacar que estas líneas solo constituyen una herramienta para el estudio del proceso de reprogramación y no están diseñadas para su uso en pacientes. En primer lugar, son células de ratón, sin embargo, este modelo es muy usado porque tiene enormes similitudes con las células humanas y es mucho más simple [50]. Por otra parte, si bien el cassette OSKM no se expresa en ausencia de Dox, para poder ser utilizadas en la clínica, por seguridad, esta construcción debería poder eliminarse, ya que podría ser susceptible a rearreglos cromosómicos que pudieran independizar su expresión de la presencia de Dox. Hay abordajes que incluyen regiones loxP flanqueando la secuencia de interés tal que puede ser escindida mediante expresión transitoria de una recombinasa CRE [52].

Como perspectiva a futuro, planeamos utilizar esta herramienta para evaluar la eficiencia de generación de CMPI en diferentes condiciones con potencial de impactar sobre el proceso de reprogramación. Estas condiciones podrían incluir el tratamiento con nuevas moléculas pequeñas, la sobreexpresión de FTs pioneros, la modulación de componentes del citoesqueleto, entre otras. Asimismo, planeamos estudiar la organización y marcas de la cromatina tanto durante el proceso de reprogramación como al aplicar las condiciones mencionadas anteriormente. Por ejemplo, en nuestro laboratorio se han utilizado previamente tanto la Proteína asociada a heterocromatina 1 α (HP1 α), como la histona H2B [24, 26, 27], cuya distribución subnuclear proporciona información sobre el paisaje global y estructura de la cromatina en CMP. También proponemos comparar la distribución e interacción dinámica de OCT4 con la cromatina a lo largo del proceso de reprogramación, con estos parámetros en las MEF sin reprogramar, y en CMPI, estudiados previamente por nuestro grupo utilizando técnicas de microscopía avanzada, como la espectroscopía de correlación de fluorescencia (FCS) [5]. Este análisis nos permitirá comparar la evolución de los cambios en el paisaje de interacciones de estos factores a nivel de célula única.

Uno de los objetivos finales del proyecto en el que se enmarca esta Tesis, es que un futuro podamos realizar un seguimiento a largo plazo mediante microscopía de célula única, que nos permita reconocer aquellas células que efectivamente puedan completar el proceso de reprogramación, incluso antes de observar cambios morfológicos prominentes. De esta manera, integrando todos estos análisis, esperamos poder comprender con mayor profundidad qué es lo que le sucede en aquellas células que se reprograman exitosamente y que diferencias presentan respecto a las parcialmente reprogramadas. Esto contribuirá a la identificación de los mecanismos subyacentes, pudiendo generar nuevos abordajes que permitan mejorar aún más la eficiencia de este proceso.

La comprensión más profunda de los mecanismos moleculares implicados no solo contribuye al conocimiento fundamental, sino que también allana el camino para futuras mejoras y avances en el campo de la reprogramación celular, facilitando su aplicación en diversas áreas de la biología y la medicina, desde el desarrollo de modelos de enfermedades y la evaluación de fármacos hasta la posibilidad de regeneración de tejidos y órganos.

Bibliografía

- [1] Daley, G. Q. Stem cells and the evolving notion of cellular identity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 370, 20140376 (2015).
- [2] Condic, M. L. Totipotency: what it is and what it is not. *Stem Cells Dev.* 23, 796–812 (2014).
- [3] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (1979). 1998;282:1145–7.
- [4] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292:154–6.
- [5] Váquez Echegaray, C. Desafíos de la pluripotencia y la reprogramación celular: obstáculos en una especie refractaria y organización dinámica de los factores de transcripción Oct4 y Sox2. Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 2020.
- [6] Yeo J-C, Ng H-H. The transcriptional regulation of pluripotency. *Cell Res.* 2013;23:20–32.
- [7] Rizzino A. Concise review: The Sox2-Oct4 connection: Critical players in a much larger interdependent network integrated at multiple levels. *Stem Cells*. 2013;31:1033–9.
- [8] Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, et al. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2006;38:431–40.
- [9] S. Jerabek, F. Merino, H. R. Schöler, and V. Cojocaru, “OCT4: Dynamic DNA binding pioneers stem cell pluripotency,” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*. 2014, doi: 10.1016/j.bbagrm.2013.10.001.
- [10] S. Stefanovic and M. Pucéat, “Oct-3/4: Not just a gatekeeper of pluripotency for embryonic stem cell, a cell fate instructor through a gene dosage effect,” *Cell Cycle*. 2007, doi: 10.4161/cc.6.1.3633.
- [11] S. Masui et al., “Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 625–635, 2007, doi: 10.1038/ncb1589.
- [12] D. Strebinger, C. Deluz, E. T. Friman, S. Govindan, A. B. Alber, and D. M. Suter, “Endogenous fluctuations of OCT4 and SOX2 bias pluripotent cell fate decisions ,” *Mol. Syst. Biol.*, 2019, doi: 10.15252/msb.20199002.
- [13] A. Soufi, M. F. Garcia, A. Jaroszewicz, N. Osman, M. Pellegrini, and K. S. Zaret, “Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming,” *Cell*, vol. 161, no. 3, pp. 555–568, 2015, doi: 10.1016/j.cell.2015.03.017.
- [14] K. S. Zaret and S. E. Mango, “Pioneer transcription factors, chromatin dynamics, and cell fate control,” *Current Opinion in Genetics and Development*. 2016, doi: 10.1016/j.gde.2015.12.003.
- [15] K. Mitsui et al., “The homeoprotein nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells,” *Cell*, 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00393-3.
- [16] I. Chambers et al., “Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells,” *Cell*, 2003, doi: 10.1016/S0092-8674(03)00392-1.
- [17] L. A. Boyer et al., “Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells,” *Cell*, vol. 122, no. 6, pp. 947–956, 2005, doi: S0092-8674(05)00825-1 [pii]10.1016/j.cell.2005.08.020.
- [18] H. Wang and S. K. Dey, “Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models.,” *Nat. Rev. Genet.*, vol. 7, no. 3, pp. 185–199, 2006.
- [19] J. Silva et al., “Nanog Is the Gateway to the Pluripotent Ground State,” *Cell*, vol. 138, pp. 722–737, 2009, doi: 10.1016/j.cell.2009.07.039.
- [20] L. Li et al., “Synergistic transcriptional and post-transcriptional regulation of ESC characteristics by core pluripotency transcription factors in protein-protein interaction networks,” *PLoS One*, 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0105180.
- [21] B. D. MacArthur, A. Maayan, and I. R. Lemischka, “Systems biology of stem cell fate and cellular reprogramming,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2009, doi: 10.1038/nrm2766.

- [22] T. Yadav, J. P. Quivy, and G. Almouzni, "Chromatin plasticity: A versatile landscape that underlies cell fate and identity," *Science*. 2018, doi: 10.1126/science.aat8950.
- [23] M. Li, G. H. Liu, and J. C. I. Belmonte, "Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2012, doi: 10.1038/nrm3393.
- [24] Verner P, Vazquez Echegaray C, Oses C, Stortz M, Guberman A, Levi V, et al. Dynamical reorganization of the pluripotency transcription factors Oct4 and Sox2 during early differentiation of embryonic stem cells. *Sci Rep*. 2020;10:1–12.
- [25] Romero, J.J., De Rossi, M.C., Oses, C. et al. Nucleus-cytoskeleton communication impacts on OCT4-chromatin interactions in embryonic stem cells. *BMC Biol* 20, 6 (2022). <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01207-w>
- [26] Oses C, Francia MG, Verner P, Vazquez Echegaray C, Guberman AS, Levi V. The dynamical organization of the core pluripotency transcription factors responds to differentiation cues in early S-phase. *Front Cell Dev Biol*. 2023 May 4;11:1125015. doi: 10.3389/fcell.2023.1125015. PMID: 37215075; PMCID: PMC10192714.
- [27] Cosentino MS, Oses C, Vázquez Echegaray C, Solari C, Waisman A, Álvarez Y, Petrone MV, Francia M, Schultz M, Sevlever G, Miruika S, Levi V, Guberman A. Kat6b Modulates Oct4 and Nanog Binding to Chromatin in Embryonic Stem Cells and Is Required for Efficient Neural Differentiation. *J Mol Biol*. 2019 Mar 15;431(6):1148–1159. doi: 10.1016/j.jmb.2019.02.012. Epub 2019 Feb 18. PMID: 30790630.
- [28] A. Gaspar-Maia, A. Alajem, E. Meshorer, and M. Ramalho-Santos, "Open chromatin in pluripotency and reprogramming," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 12, no. 1, pp. 36–47, 2011, doi: 10.1038/nrm3036.
- [29] W.-W. Tee and D. Reinberg, "Chromatin features and the epigenetic regulation of pluripotency states in ESCs," *Development*, vol. 141, pp. 2376–90, 2014, doi: 10.1242/dev.096982.
- [30] M. Perino and G. J. C. Veenstra, "Chromatin Control of Developmental Dynamics and Plasticity," *Developmental Cell*. 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.08.004.
- [31] E. Meshorer and T. Misteli, "Chromatin in pluripotent embryonic stem cells and differentiation," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2006 7:7, vol. 7, no. 7, pp. 540–546, May 2006, doi: 10.1038/nrm1938.
- [32] S. Efroni et al., "Global Transcription in Pluripotent Embryonic Stem Cells," *Cell Stem Cell*, vol. 2, no. 5, pp. 437–447, May 2008, doi: 10.1016/J.STEM.2008.03.021.
- [33] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>.
- [34] J. Yu et al., "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells," *Science* (80-.), 2007, doi: 10.1126/science.1151526.
- [35] K. Takahashi et al., "Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors," *Cell*, 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.11.019.
- [36] Yamanaka S. A fresh look at iPS cells. *Cell*. 2009;137:13–7.
- [37] Yamanaka S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy—Promise and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2020;27:523–31.
- [38] R. G. Rowe and G. Q. Daley, "Induced pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery," *Nat Rev Genet*, vol. 20, no. 7, pp. 377–388, Jul. 2019, doi: 10.1038/S41576-019-0100-Z
- [39] Sugita S. [Retinal regeneration with iPS cells – Clinical trials for retinal degenerative disorders]. *Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2015;38:79–85.
- [40] Schwartz SD, Hubschman J-P, Heilwell G, Franco-Cardenas V, Pan CK, Ostrick RM, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet*. 2012;379:713–20.
- [41] Kim JY, Nam Y, Rim YA, Ju JH. Review of the Current Trends in Clinical Trials Involving Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Rep*. 2022 Jan;18(1):142–154. doi: 10.1007/s12015-021-10262-3. Epub 2021 Sep 16. PMID: 34532844; PMCID: PMC8445612.
- [42] J. M. Polo et al., "A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells," *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1617–1632, 2012, doi: 10.1016/j.cell.2012.11.039.
- [43] Guberman A, Vazquez Etchegaray C. (2021). Nanog in iPS cells and during reprogramming. Birbrair, A (Ed.), *Advances in Stem Cell Biology: Molecular Players in iPSC Technology* (Vol. 12). Elsevier.

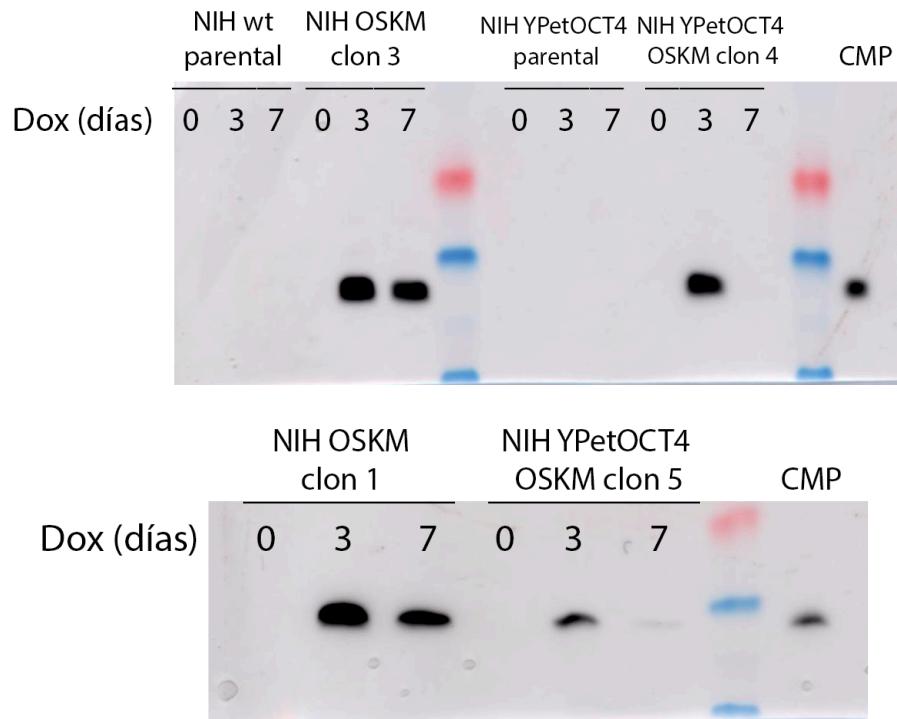
- [44] Solari C, Losino N, Luzzani C, Waisman A, Bluguermann C, Questa M, Sevlever G, Miriuka S, Barañao L, Guberman A. Induced pluripotent stem cells' self-renewal and pluripotency is maintained by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011 Jul 1;410(2):252-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.05.126. Epub 2011 May 30. PMID: 21651896.
- [45] Elsayed, Ahmed & Zhang, Zhentao & Zhang, Lei & Liu, Zhiyong & Abbott, Louise & Zhang, Yani & Li, Bichun. (2014). Pluripotent State Induction in Mouse Embryonic Fibroblast Using mRNAs of Reprogramming Factors. *International journal of molecular sciences.* 15. 21840-64. 10.3390/ijms151221840.
- [46] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2007 Jul 19;448(7151):313-7. doi: 10.1038/nature05934. Epub 2007 Jun 6. PMID: 17554338.
- [47] M. Stadtfeld and K. Hochedlinger, "Induced pluripotency : history , mechanisms , and applications," pp. 2239–2263, 2010, doi: 10.1101/gad.1963910.Freely.
- [48] K. Okita and S. Yamanaka, "Induced pluripotent stem cells: opportunities and challenges.," *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 366, pp. 2198–2207, 2011, doi: 10.1098/rstb.2011.0016.
- [49] D. Pei, *The cell biology of embryonic stem cells*, vol. 18. 2008.
- [50] Haridhasapavalan KK, Raina K, Dey C, Adhikari P, Thummer RP. An Insight into Reprogramming Barriers to iPSC Generation. *Stem Cell Rev Rep.* 2020;16:56–81.
- [51] C.A. Sommer, M. Stadtfeld, G.J. Murphy, K. Hochedlinger, D.N. Kotton, G. Mostoslavsky, Induced pluripotent stem cell generation using a single lentiviral stem cell cassette, *Stem Cells* 27 (2009) 543–549.
- [52] K. Woltjen et al., "PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells," *Nature*, 2009, doi: 10.1038/nature07863.
- [53] S. Melcer et al., "Histone modifications and lamin A regulate chromatin protein dynamics in early embryonic stem cell differentiation," *Nature Communications* 2012 3:1, vol. 3, no. 1, pp. 1–12, Jun. 2012, doi: 10.1038/ncomms1915.
- [54] D. Huangfu et al., "Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds," *Nat Biotechnol.*, vol. 26, no. 7, pp. 795–797, 2008, doi: nbt1418 [pii] 10.1038/nbt1418.
- [55] H. Hirai, P. Karian, and N. Kikyo, "Regulation of embryonic stem cell self-renewal and pluripotency by leukaemia inhibitory factor.," *Biochem. J.*, vol. 438, pp. 11–23, 2011, doi: 10.1042/BJ20102152
- [56] Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 1988; 336:684-7; PMID:3143916; http://dx.doi.org/ 10.1038/336684a0
- [57] Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 1988; 336:688-90; PMID:3143917; http://dx.doi.org/ 10.1038/336688a0
- [58] Ohtsuka S, Nakai-Futatsugi Y, Niwa H. LIF signal in mouse embryonic stem cells. *JAKSTAT.* 2015 Sep 11;4(2):e1086520. doi: 10.1080/21623996.2015.1086520. PMID: 27127728; PMCID: PMC4802755.
- [59] Oses C, Stortz M, Verner P, Guberman A, Levi V. Pluripotency transcription factors at the focus: the phase separation paradigm in stem cells. *Biochem Soc Trans.* 2021;49:2871–8.
- [60] Vazquez Echegaray C, Salvati B, Dulhoste Vivien S, Francia MG, Solari CM, Cosentino MS, Guberman A, Perullini M. Design of silica nanocarriers: Tuning the release to embryonic stem cells by simple strategies. *J Biotechnol.* 2022 Jul 20;353:19-27. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.05.008. Epub 2022 May 21. PMID: 35609734.
- [61] W. Auerbach et al., "Establishment and Chimera Analysis of 129/SvEv- and C57BL/6-Derived Mouse Embryonic Stem Cell Lines," <https://doi.org/10.2144/00295st04>, vol. 29, no. 5, pp. 1024–1032, Aug. 2018, doi: 10.2144/00295ST04.
- [62] Palais, Gael & Nguyen Dinh Cat, Aurelie & Friedman, Hana & Panek-Huet, N & Millet, A & Tronche, François & Gellen, Barnabas & Mercadier, Jean-Jacques & Peterson, Alan & Jaissler, F. (2009). Targeted transgenesis at the HPRT locus: an efficient strategy to achieve tightly controlled in vivo conditional expression with the tet system. *Physiological genomics.* 37. 140-6. 10.1152/physiolgenomics.90328.2008.

- [63] "PiggyBac-ing Through the Genome Editing Field" Accessed: Feb. 1, 2024. [Online]. Available: <https://blog.addgene.org/piggybac-ing-through-the-genome-editing-field>
- [64] Longo PA, Kavran JM, Kim MS, Leahy DJ. Transient mammalian cell transfection with polyethylenimine (PEI). *Methods Enzymol.* 2013;529:227-40. doi: 10.1016/B978-0-12-418687-3.00018-5. PMID: 24011049; PMCID: PMC4012321.
- [65] Štefková K, Procházková J, Pacherník J. Alkaline phosphatase in stem cells. *Stem Cells Int.* 2015;2015:628368. doi: 10.1155/2015/628368. Epub 2015 Feb 12. PMID: 25767512; PMCID: PMC4342173.
- [66] Felisbino MB, Gatti MS, Mello ML. Changes in chromatin structure in NIH 3T3 cells induced by valproic acid and trichostatin A. *J Cell Biochem.* 2014 Nov;115(11):1937-47. doi: 10.1002/jcb.24865. PMID: 24913611.
- [67] Losino N, Luzzani C, Solari C, Boffi J, Tisserand ML, Sevlever G, Barañoa L, Guberman A. Maintenance of murine embryonic stem cells' self-renewal and pluripotency with increase in proliferation rate by a bovine granulosa cell line-conditioned medium. *Stem Cells Dev.* 2011 Aug;20(8):1439-49. doi: 10.1089/scd.2010.0336. Epub 2011 Jan 12. PMID: 21126164.
- [68] Losino N, Waisman A, Solari C, Luzzani C, Espinosa DF, Sassone A, Muro AF, Miriuka S, Sevlever G, Barañoa L, Guberman A. EDA-containing fibronectin increases proliferation of embryonic stem cells. *PLoS One.* 2013 Nov 14;8(11):e80681. doi: 10.1371/journal.pone.0080681. PMID: 24244705; PMCID: PMC3828241.
- [69] Banito A, Rashid ST, Acosta JC, Li S, Pereira CF, Geti I, Pinho S, Silva JC, Azuara V, Walsh M, Vallier L, Gil J. Senescence impairs successful reprogramming to pluripotent stem cells. *Genes Dev.* 2009 Sep 15;23(18):2134-9. doi: 10.1101/gad.1811609. Epub 2009 Aug 20. PMID: 19696146; PMCID: PMC2751980.

Anexo

Análisis de inducción de la construcción: membranas completas

OSKM:



GAPDH:

