



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

DEPARTAMENTO de CIENCIAS BIOLÓGICAS

Trabajo de Tesis Doctoral:
**REPROGRAMACIÓN CELULAR PARA IMPLEMENTAR REJUVENECIMIENTO,
MANIPULAR EL RELOJ EPIGENÉTICO**

Tesista: Priscila Chiavellini

Director: Rodolfo Gustavo Goya

Director conjunto: Gustavo Ramón Morel

Año: 2023

Dedicada a Elba Elvira
Del Cid.

Reconocimientos

Mi mayor agradecimiento a las instituciones que sustentaron económicamente la realización de este trabajo y su difusión:

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.
- Universidad Nacional de La Plata.
- Ministerio de Ciencia y Técnica.
- Compañía de biólogos, Reino Unido.
- Sociedad Americana de Bioquímica y Biología molecular, Estados Unidos de América.
- Universidad de Stanford, Estados Unidos de América.
- *The Clock Foundation*, Estados Unidos de América.
- Asociación de Universidades Grupo Montevideo, Brasil - Argentina.

Y a las personas que me acompañaron en este proceso:

A los Dres. Rodolfo Goya y Gustavo Morel por su contribución al diseño y ejecución de esta tesis.

A mis amigas Marianne Lehmann y Martina Canatelli-Mallat, por haber trabajado en conjunto estos años, y por haber sido un pilar indispensable, profesional y sobre todo emocionalmente, para la realización de este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio, hoy en día grandes amigos, Eugenia Falomir Lockhart, Florencia Zappa Villar, Araceli Bigres, Natalia Scelsio, Juliette Lopez Hanotte, Franco JC. Dolcetti, Camila D. Pasquini.

A todos los integrantes del laboratorio, en especial a las Dras. Paula C. Reggiani y María José Bellini, por compartir su conocimiento conmigo y brindarme consejos y sugerencias.

Al Dr. Vittorio Sebastiano de la Universidad de Stanford, por haberme abierto las puertas de su laboratorio y mantenerlas abiertas.

A los integrantes del laboratorio Sebastiano, por haberme recibido cálidamente y haberme ayudado a completar los objetivos de mi estadía.

A mis hermanas Ornella y Stefanía, mamá Rosana y papá Alfredo por el apoyo incondicional y aliento a lograr mis metas desde siempre.

A mi amor Matias Bugnar, por ser mi compañero y darme tu energía, no cabe en una vida mi gratitud.

Publicaciones asociadas al presente trabajo de tesis:

Chiavellini P.*, Lehmann, M.*, Canatelli Mallat, M., Zoller, J. A., Herenu, C. B., Morel, G. R., Horvath, S., & Goya, R. G. (2022). Hippocampal DNA Methylation, Epigenetic Age, and Spatial Memory Performance in Young and Old Rats. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 77(12), 2387–2394. <https://doi.org/10.1093/gerona/glac153>

Chiavellini P., Canatelli-Mallat, M., Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Therapeutic potential of glial cell line-derived neurotrophic factor and cell reprogramming for hippocampal-related neurological disorders. *Neural regeneration research*, 17(3), 469–476. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320966>

Canatelli-Mallat, M., **Chiavellini, P.**, Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats. *Behavioural brain research*, 435, 114026. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2022.114026>

Chiavellini P., Canatelli-Mallat, M., Lehmann, M., Gallardo, M. D., Herenu, C. B., Cordeiro, J. L., Clement, J., & Goya, R. G. (2021). Aging and rejuvenation - a modular epigenome model. *Aging*, 13(4), 4734–4746. <https://doi.org/10.18632/aging.202712>. (Seleccionado para ilustrar la portada del volumen correspondiente)

Lehmann M, Canatelli-Mallat M, **Chiavellini P**, & Goya, R. G. (2020). A HIERARCHICAL MODEL FOR THE CONTROL OF EPIGENETIC AGING IN MAMMALS. *Ageing research reviews*, 62, 101134. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2020.101134>

Lehmann M, Canatelli-Mallat M, **Chiavellini P**, Cónsole, G. M., Gallardo, M. D., & Goya, R. G. (2019). Partial Reprogramming As An Emerging Strategy for Safe Induced Cell Generation and Rejuvenation. *Current gene therapy*, 19(4), 248–254. <https://doi.org/10.2174/1566523219666190902154511>

Lehmann M, Canatelli-Mallat M, **Chiavellini P**, Morel, G. R., Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2019). Regulatable adenovector harboring the GFP and Yamanaka genes for implementing regenerative medicine in the brain. *Gene therapy*, 26(10-11), 432–440. <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0063-x>

Goya RG, Lehmann M, **Chiavellini P**, Canatelli-Mallat, M., Hereñú, C. B., & Brown, O. A. (2018). Rejuvenation by cell reprogramming: a new horizon in gerontology. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 349. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-1075-y>

En revisión:

Chiavellini P., Canatelli Mallat M., Lehmann M., Zoller JA., Gordevicius G., Maria D. Gallardo MD., Diana C. Pasquini DC., Ezequiel Lacunza E, Claudia B. Herenu CB., Gustavo R. Morel GR., Steve Horvath S., Rodolfo G. Goya RG. (2022) Young plasma rejuvenates blood DNA

methylation profile, prolongs mean lifespan and improves health in old rats bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2022.12.01.518747> *Enviado a Aging Cell*.

Gallardo MD.*, **Chiavellini P.**^{1*}, Girard M., Lehmann M., Pasquini DC., Hereñú CB., Goya RG. (2023) Rejuvenation by cell reprogramming - a multi module epigenome model. *Enviado a Ageing Research Reviews*.

Lu AT., Fei Z., Haghani A., Robeck TR., Zoller JA., Li CZ., Zhang J., Ablaeva J., Adams DM., Almunia J., Ardehali R., Arneson A., ScottBaker C., Belov K., Black P., Blumstein DT., Bors EK., Breeze CE., Brooke RT., Brown JL., Caulton A., Cavin JM., Chatzistamou I., Chen H., **Chiavellini P.**, Choi O., ..., Ken Raj R., Steve Horvath S. (2021) Universal DNA methylation age across mammalian tissues. bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.18.426733> *Enviado a Nature Aging*.

Horvath S., Singh K., Raj K., Khairnar S., Sanghavi A., Shrivastava A., Zoller JA, Li CZ., Herenu C., Canatelli-Mallat M., Lehmann M., Solberg-Woods L., Garcia Martinez A., Wang T., **Chiavellini P.**, Levine AJ., Chen H., Goya RG., Katcher HL. (2020) Reversing age: dual species measurement of epigenetic age with a single clock. bioRxiv doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082917>

* Autores con contribución equivalente.

Contenido

Contenido.....	6
Nomenclatura.....	11
Resumen.....	12
Introducción.....	12
El envejecimiento.....	13
El envejecimiento del hipocampo.....	14
La neurogénesis en el hipocampo adulto.....	15
El envejecimiento del hipocampo de rata.....	16
El reloj epigenético.....	18
La reprogramación celular.....	19
La reprogramación celular para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad.....	21
Mecanismo de los genes OSKM en la reprogramación celular.....	23
Rejuvenecimiento por reprogramación celular.....	24
Rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial.....	25
Intervenciones del sistema nervioso central.....	30
El rejuvenecimiento epigenético por reprogramación celular.....	32
Terapia génica con adenovirus.....	34
Hipótesis y objetivos.....	38
Capítulo 1.....	40
Objetivos.....	40
Materiales y métodos.....	40
Plásmido del genoma HD-OSKM: pC4HSU-STEMCCA-tTA.....	40
Preparación del material plasmídico pC4HSU-STEMCCA-tTA.....	42
Preparación de bacterias químicamente competentes.....	42
Transformación por shock térmico.....	42
Preparación de material plasmídico.....	42
Precipitación de ácidos nucleicos.....	43
Electroforesis en gel de agarosa.....	43
Digestión con enzimas de restricción.....	44
Generación del virus HD-OSKM.....	44
Células HEK 293 Cre.....	44

Virus auxiliar H14	44
Transfección del genoma viral	44
Propagación del vector viral HD-OSKM.....	45
Purificación del vector viral HD-OSKM.....	46
Preparación del lisado celular	46
Ultracentrifugación en gradiente de CsCl	46
Diálisis.....	47
Titulación del adenovirus	47
Verificación de expresión de los genes OSKM en fibroblastos humanos y de rata.	47
Aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos	47
Cosechamiento de fibroblastos humanos.....	48
Congelamiento de fibroblastos humanos	48
Transducción de fibroblastos humanos	49
Western blot.....	49
Extracción de ARN	51
Retrotranscripción.....	51
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.....	51
Análisis estadístico de resultados de la qPCR	53
Citometría de flujo	53
Inmunofluorescencia en fibroblastos humanos.....	53
Generación de cultivos primario de fibroblastos de rata	54
Cosecha de fibroblastos de rata	55
Congelamiento de fibroblastos de rata.....	55
Transducción de fibroblastos de rata.....	55
Inmunofluorescencia en fibroblastos de rata	55
Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos.....	56
Resultados	57
Generación, propagación y purificación del HD-OSKM	57
Evaluación de la transducción del adenovirus OSKM en el tiempo	59
Eficiencia de la expresión en fibroblastos humanos	60
Expresión de los factores de transcripción OSKM en fibroblastos transducidos.....	61
Caracterización de la expresión de los genes OSKM bajo expresión continua del adenovirus HD-OSKM.....	62

Expresión de los genes de pluripotencia en fibroblastos de rata	68
Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos	69
Discusión	70
Conclusiones	73
Capítulo 2	74
Hipótesis.....	74
Objetivos	74
Materiales y métodos	74
Fibroblastos de rata.....	74
Transducción de los fibroblastos de rata	74
Tinción de la beta- galactosidasa asociada a senescencia celular	75
Inmunofluorescencia para HP1 y H3K9me3 en fibroblastos de rata	75
Fibroblastos de donantes humanos	75
Transducción de los fibroblastos de donantes humanos.....	75
Inmunofluorescencia en fibroblastos humanos.....	76
Medición de la edad epigenética y la metilación del ADN.....	76
Análisis estadístico de los marcadores de envejecimiento	77
Resultados	78
Discusión	88
Conclusiones	93
Capítulo 3	94
Hipótesis.....	94
Objetivos	94
Materiales y métodos	94
Animales	94
Laberinto de Barnes	94
Disección del hipocampo	96
Extracción de ADN del hipocampo.....	96
Análisis de purificación y metilación del ADN genómico	96
Análisis estadístico de posiciones CpG diferencialmente metiladas	96
Determinación de la edad epigenética	97
Resultados	97
Control de calidad de los datos de metilación de las CpGs provistas por el chip.....	97

Análisis de las CpGs diferencialmente metiladas con la edad	98
Evaluación de la memoria espacial de ratas jóvenes y viejas en la prueba del laberinto de Barnes.....	101
Predicción de la edad epigenética de los hipocampos	102
Correlación de la memoria con la edad epigenética del hipocampo y la metilación del ADN	103
Discusión	106
Conclusiones	109
Capítulo 4	110
Hipótesis.....	110
Objetivos	110
Materiales y métodos	110
Animales.....	110
Adenovirus	110
Cirugía estereotáxica.....	110
Diseño experimental	111
Laberinto de Barnes	112
Sacrificio de los animales	112
Dissección del hipocampo	112
Perfusión	112
Inmunohistoquímica	113
Para el factor de transcripción OCT4	113
Para el marcador de neuronas inmaduras Doblecortina	114
Tinción de contraste Violeta de Cresilo (Nissl).....	114
Obtención y análisis de las imágenes.....	115
Análisis estadístico	115
Resultados	115
Evaluación de la expresión del adenovirus HD-OSKM en el giro dentado.....	115
Evaluación del desempeño cognitivo de ratas sometidas a terapia génica con OSKM	116
Evaluación del desempeño cognitivo de ratas sometidas a terapia génica con OSKM	118
Análisis de la neurogénesis adulta en respuesta a la terapia génica con OSKM	120
Discusión	120
Conclusiones	123
Conclusiones generales.....	124

Bibliografía 128

Nomenclatura

ADN, Ácido desoxirribonucleico

AT, *Adquisition trial*

ATB, Antibiótico

CA, *Cornu ammonis*

c-Myc, Factor de transcripción del proto-oncogén MYC

CpG, Dinucleótidos Citosina-Guanina

DCX, Doblecortina

DG, Giro dentado

DOX, Doxiciclina

EA, Enfermedad de Alzheimer

EC, Corteza entorrinal

GFAP, Proteína ácida fibrilar glial

GFP, Proteína verde fluorescente

H2Ax, Miembro X de la familia de histonas 2

H3K9me3, Histona 3 trimetilada en la lisina 9

HD-OSKM, Adenovirus dependiente de auxiliar OSKM

HP1, Proteína de la heterocromatina 1

iPSC, Célula pluripotente inducida

Klf4, Factor 4 *Kruppel-like*

LAP2, Polipéptido 2 asociado a la lámina nuclear

mi-ARN, Micro ARN

mTOR, Proteína blanco de la rapamicina

NeuN, Antígeno nuclear neuronal

Oct4, Octamer-binding transcription factor 4

OSK, Oct4, Klf4 y Sox2

OSKM, Oct4, Sox2, Klf4 y Cmyc

PBS, Buffer fosfato salino

pen/strep, Penicilina - estreptomycin

PFA, para-Formaldehido

PT, *Probe trial*

RNS, Especies reactivas del nitrógeno

ROS, Especies reactivas del oxígeno

SFB, Suero fetal bovino

SGZ, Zona subgranular

SIRT1, Sirtuína-1 desacetilasa dependiente de NAD

Sox2, *Sex determining Region Y-box 2*

SVZ, Zona subventricular

TF, Factor de transcripción

Resumen

El envejecimiento es un proceso natural que conlleva al deterioro de la homeostasis metabólica. En los últimos años han surgido varias estrategias interventivas para atenuar los efectos fisiológicos del mismo. En este contexto, la reprogramación celular mediada por el uso de factores de pluripotencia ha demostrado ser capaz de revertir el fenotipo celular envejecido. Más aún, los protocolos de rejuvenecimiento por reprogramación parcial han logrado revertir la edad biológica, medible por biomarcadores de gran precisión conocidos como relojes epigenéticos.

Los alcances de la reprogramación parcial para revertir el deterioro cognitivo asociado al envejecimiento en humanos y roedores aún están siendo estudiados. Nuestro laboratorio cuenta con vasta experiencia en estudios de terapia génica mediante vectores adenovirales. Así, en este trabajo de tesis se propuso desarrollar y evaluar un sistema adenovectorial adecuado que permita implementar tanto rejuvenecimiento por reprogramación parcial de fibroblastos de ratas viejas y de voluntarios humanos sanos de edad avanzada como rejuvenecimiento *in vivo* en rata.

Para tal fin, se desarrolló un adenovirus dependiente de auxiliar que posee los genes de pluripotencia Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc, bajo el control de un promotor bidireccional que también controla la expresión de la GFP. Este vector fue caracterizado para su posterior uso en estudios de reprogramación parcial, demostrando su idoneidad para la realización de experimentos de rejuvenecimiento *ex vivo* e *in vivo*.

Posteriormente, se evaluó su efecto rejuvenecedor en fibroblastos humanos y de rata. La sobreexpresión de los genes de pluripotencia en fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley durante cinco días revirtió cambios epigenéticos asociados a la edad como la disminución de H3K9me3 y el aumento de beta-galactosidasa. Los fibroblastos humanos expuestos a los genes durante siete días aumentaron los niveles de organización de la heterocromatina y disminuyeron su inestabilidad genómica. Sin embargo, ni en los fibroblastos humanos ni en los murinos se lograron revertir todas las marcas de envejecimiento asociadas a factores epigenéticos.

En cuanto a los estudios *in vivo*, los efectos en la cognición de los animales debido a cambios epigenéticos asociados al envejecimiento eran desconocidos. En este trabajo se demostró que los cambios asociados a la edad en la metilación de ciertas CpGs se correlacionan con el deterioro en la memoria de los animales, no así su edad epigenética.

Finalmente, se evaluaron los efectos de la terapia génica con el adenovirus OSKM en el giro dentado de la rata hembra envejecida sobre el detrimento observado en la memoria espacial y aprendizaje de los animales. Observamos que los animales expuestos a los genes OSKM no sufrieron una mayor letalidad. Además, aumentaron su desempeño cognitivo, mostrando un aprendizaje acelerado. Sin embargo, el tratamiento no alcanzó a revertir su deterioro en la memoria.

Este trabajo de tesis es el primer estudio de rejuvenecimiento *in vivo* en hipocampo de rata envejecida y sus implicancias cognitivas. De igual manera, los hallazgos en envejecimiento epigenético asociados a la pérdida de la memoria espacial de la rata resultan de gran relevancia para este campo.

Introducción

El envejecimiento

Desde un punto de vista fisiológico, el envejecimiento se caracteriza por una disminución progresiva del potencial homeostático con el tiempo (Pomatto & Davies, 2017), así como por una desviación del ajuste de la homeostasis, un proceso conocido como homeorresis. El término homeorresis u homeostasis móvil fue utilizado por primera vez por Waddington en 1957 (Waddington, 1957). Se refiere al hecho de que el punto de ajuste de la homeostasis cambia durante las diferentes fases de la vida, al igual que otros parámetros fisiológicos. Lo que suele llamarse fisiología normal, es la de un organismo adulto joven funciona de manera óptima. Sin embargo, desde el punto de vista del desarrollo, existe una secuencia de fisiologías normales, que comienza en el óvulo y termina en el individuo senescente. La homeostasis que brinda el marco de referencia para definir la función "normal" es la homeostasis sobre un punto que varía en el desarrollo.

Aunque convencionalmente las diferentes etapas de la vida se dividen en desarrollo, adultez y envejecimiento, desde un punto de vista biológico todas las etapas de la vida constituyen un continuo y la edad biológica se mueve a lo largo de ese continuo. La naturaleza y el momento de la secuencia de eventos que comienza después de la fertilización y termina cuando se alcanza la madurez sexual (fase de desarrollo) deben ser genéticamente programados y epigenéticamente dirigidos. Este programa es muy complejo y requiere un alto grado de coordinación entre diferentes grupos de células, especialmente durante la etapa embrionaria del organismo en desarrollo (Wolfgang, 1992). Hay dos posibilidades una vez alcanzada la madurez sexual: que el proceso de envejecimiento también está programado o que el programa de desarrollo se agota poco después de que ocurre la maduración sexual. En el último escenario, la duración del período reproductivo estaría determinada por la solidez de la red homeostática del organismo adulto. Por su parte, la senescencia aparecería cuando la red comienza a sobrepasar la tolerancia (Goya, 1991).

La idea de que el envejecimiento es un proceso programado ha sido propuesta previamente con base en datos experimentales principalmente de levaduras (*Saccharomyces cerevisiae*), gusanos (*Caenorhabditis elegans*) y ratones (Longo et al., 2005). También se ha propuesto la hipótesis de que el envejecimiento es un proceso programado bajo el control de un reloj epigenético (Mitteldorf, 2016). Otro modelo de envejecimiento programado propone que el envejecimiento del organismo es el resultado de la acción combinada de muchos relojes, como daño en el ADN, desgaste de los telómeros, producción mitocondrial de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (ROS y RNS) a nivel celular/molecular, así como relojes de nivel superior ubicados en el sistema nervioso central (L. Katcher, 2015). Una fuente de evidencia que respalda el envejecimiento programado como hipótesis viable proviene de

las plantas. En efecto, las plantas son los únicos organismos en los que la muerte celular programada tiene un papel bastante bien establecido durante la senescencia (la palabra envejecimiento rara vez se usa para las plantas). Además, la senescencia en sí misma es un evento programado en algunas plantas (Goya, 1988; Noodén, 1984; Noodén & Leopold, 1988).

Sin embargo, hay puntos de vista que favorecen la hipótesis alternativa, es decir, que el envejecimiento no es un proceso programado sino una continuación del crecimiento del desarrollo, impulsado por vías genéticas como mTOR (Blagosklonny, 2013). También se ha propuesto que el envejecimiento biológico puede ser una consecuencia de los programas de desarrollo y mantenimiento, cuyas huellas moleculares dan lugar a los relojes epigenéticos, abordados más adelante (Horvath & Raj, 2018).

El envejecimiento del hipocampo

El hipocampo es una estructura cerebral que se encuentra embebida en el lóbulo temporal. Está bien estudiado que las lesiones en el hipocampo generan una disminución en el aprendizaje y la memoria espacial.

La formación hipocampal se puede dividir en el hipocampo propiamente dicho, formado por el Cornu Ammonis (CA), el giro dentado (DG, por sus siglas en inglés), subículo y el área entorrinal. El CA está dividido en cuatro partes CA1, CA2, CA3 y CA4. En oposición a CA1, se encuentra el subículo que conecta al hipocampo con la corteza entorrinal en el ventrículo.

El giro dentado juega un papel crucial en el procesamiento de la información desde la corteza entorrinal (EC, por sus siglas en inglés) a CA3, a través de la vía de las fibras musgosas. Las células del DG estimulan a CA3 con baja frecuencia e intensidad, lo que se cree que es un proceso de menor costo energético. El DG es importante en la separación de patrones y la memoria asociativa (Anand & Dhikav, 2012).

En la vía perforante, la información fluye desde la corteza, principalmente de axones de la capa II y III. Los axones de la capa II y IV se proyectan a las células granulares y piramidales de CA3, mientras que los axones de III y IV se proyectan a CA1 y el subículo. La recuperación de la información surge de la EC al CA3. Otra vía va desde EC a CA1, luego al subículo y allí los axones de las neuronas subiculares envían la información al EC.

En la vía colateral de Schaffer, hay axones colaterales de CA3 que se proyectan a CA1. Estas juegan un rol importante en la memoria y la red emocional. Por último, la vía de las recurrentes colaterales, llevan el input excitatorio a CA3, y son participes en la retención de la memoria.

Así, el procesamiento de información está configurado en un circuito trisináptico. La mayor fuente de estimulación surge en el cortex entorrinal por la vía perforante, para terminar principalmente en el giro dentado. Del giro dentado, los axones de las vías musgosas se

proyectan a la región CA3 y desde ahí la vía colateral de Shaffer transmiten la información a CA1. Las neuronas de CA1 envían sus axones al subículo y a la EC, donde se cierra el circuito (Lopez-Rojas & Kreutz, 2016)

Formando parte del ambiente hipocampal se encuentran las células gliales. Hay tres tipos principales de células gliales: astrocitos, oligodendrocitos y microglía. Las células gliales están involucradas en la mayoría de los aspectos de la función neuronal. La microglía son células inmunes y están involucradas en la neuroinflamación. Los oligodendrocitos mielinizan los axones, mientras que los astrocitos mantienen el funcionamiento de los circuitos del hipocampo al interactuar directamente con las sinapsis y comunicarse con otras células neurales, incluidas la microglía y las células endoteliales (Y. Wang et al., 2022).

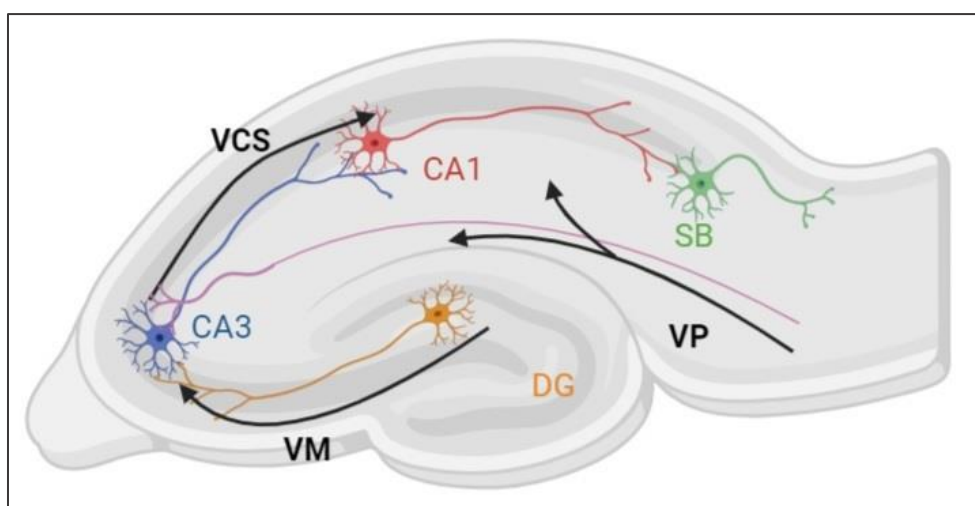


Figura 1 Esquema simplificado del circuito trisináptico en el hipocampo. VP= Vía perforante. DG= Giro Dentado. VM= Vía musgosa. CA3= Cornu Ammonis 3. VCS= Vía Colateral de Schaffer. CA1= Cornu Ammonis 1. SB= Subículo.

La neurogénesis en el hipocampo adulto

En el siglo pasado, se creía que en los mamíferos adultos el cerebro era incapaz de generar nuevas neuronas. Actualmente se sabe que en el cerebro de mamíferos adultos existen nichos de células madre capaces de producir neurogénesis: la zona subgranular (SGZ) en el giro dentado del hipocampo y la zona subventricular (SVZ) hacia el bulbo olfatorio (Shivraj Sohur et al., 2006).

La neurogénesis adulta comienza con la división de una célula precursora y termina con la presencia de una neurona madura integrada y funcional. En el hipocampo, la SGZ es una capa germinal entre el hilus y el giro dentado, y es responsable de la generación de las neuronas nuevas a partir de los progenitores neurales. El término progenitor hace referencia a una célula con autorrenovación limitada en el organismo adulto, capaz de dar origen solo a un tipo celular en ese caso a neuronas. Tanto en la SGZ como en el SVZ, las células endoteliales proveen adhesión a las células madre neurales. En la SGZ, los astrocitos,

que forman parte del nicho reciben señales de los vasos sanguíneos dirigiendo a las células madre neurales (NSC) a renovarse, proliferar y diferenciarse a células granulares neuronales.

Las células granulares formarán parte del entramado neuronal de la formación hipocampal, más aún, es probable que células granulares permitan la optimización de las conexiones de las fibras musgosas del giro dentado con la región CA3 (L. Li & Xie, 2005). Los progenitores neurales en división comienzan a expresar doblecortina, una proteína de migración neuronal. La expresión persiste en neuronas nuevas durante aproximadamente 30 días, hasta que las células maduran y se integran en la capa de células granulares (Kremer et al., 2013). Una vez maduras, las células expresan NeuN, un antígeno nuclear neuronal utilizado comúnmente para la detección de estas neuronas.

En la SGZ se han identificado dos tipos de progenitores neurales en función de su morfología y la expresión de marcadores moleculares específicos. Los progenitores tipo 1 tienen un proceso radial que abarca toda la capa granular y se ramifica en la capa molecular interna. Estas células expresan nestina, GFAP y Sox2. Si bien expresan el marcador de astrocitos GFAP, estas células son morfológica y funcionalmente diferentes de los astrocitos maduros. Los progenitores de tipo 2 tienen solo procesos cortos y no expresan GFAP (Ilaria Decimo et al., 2012).

[El envejecimiento del hipocampo de rata](#)

En humanos y roedores el desempeño en el aprendizaje y memoria disminuyen con la edad. Esto hace de los roedores modelos adecuados para el estudio del envejecimiento del hipocampo y de potenciales intervenciones terapéuticas para atenuar o revertir las deficiencias cognitivas. Nuestro grupo de laboratorio cuenta con vasta experiencia en el estudio de un modelo de rata Sprague Dawley hembra senil, y se han caracterizado en detalle los cambios asociados a la edad y sus implicancias en la memoria y aprendizaje de los animales.

En estudios previos de nuestro grupo, se observó que en el giro dentado de estas ratas hembra la reducción del número de neuronas maduras en el envejecimiento natural es insignificante (Morel et al., 2015). Sin embargo, se observa una disminución en la neurogénesis, por disminución del número de neuronas inmaduras medido por la cantidad de células DCX positivas. Esto es consistente con lo encontrado por otros autores y podría tener implicancias en la pérdida de memoria espacial y aprendizaje (Kase et al., 2020; Kuhn et al., 1996).

También se observó una reducción asociada a la edad en la longitud y complejidad de los astrocitos del hipocampo. Una ramificación reducida de los astrocitos envejecidos puede afectar la capacidad de estas células gliales para proporcionar apoyo trófico a las neuronas.

Otros autores han demostrado también que los astrocitos muestran una activación creciente con la edad, alterando la función neuronal (Rozovsky et al., 2005).

Por su parte, la microglía experimenta una disminución en su número total en las ratas Sprague Dawley de edad muy avanzada, mientras que la microglía reactiva permanece sin cambios (Canatelli-Mallat et al., 2022). En contraposición, en un trabajo publicado en ratas macho Fisher 344 de mediana edad y seniles, se encontró un aumento en el número de microglía, en contraste con una disminución en la microglía reactiva (McGuinness et al., 2017).

Todas estas deficiencias están asociadas una disminución en el aprendizaje y la memoria espacial evaluados por distintas pruebas cognitivas como el laberinto de Barnes, y pruebas de reconocimiento de ubicación de objetos (Barnes, 1979; Canatelli-Mallat et al., 2022; Pardo et al., 2017).

A nivel molecular, los estudios de expresión génica en roedores envejecidos han documentado cambios significativos en los genes del hipocampo relacionados con la síntesis de colesterol, la inflamación, los factores de transcripción, la neurogénesis y la plasticidad sináptica (Blalock et al., 2003; Burger et al., 2008a, 2008b; Rowe et al., 2007; Verbitsky et al., 2004). En el hipocampo de ratas hembra, se ha observado que 210 genes se expresan diferencialmente en seniles en comparación con el hipocampo de contrapartes jóvenes, la mayoría de ellos regulados a la baja. Por su parte, varios genes que están sobreexpresados en el hipocampo de animales de edad avanzada están involucrados en la respuesta inmune, incluidos TYROBP, CD11b, C3, CD18, CD4 y CD74 (Pardo et al., 2017).

Una variable molecular de gran relevancia que no ha sido evaluada sistemáticamente en el hipocampo de ratas jóvenes y viejas es la metilación del ADN (DNAm). Hasta el presente trabajo, no se conocían estudios sobre el impacto de los cambios de edad en el ADN del hipocampo en el rendimiento de la memoria. Los primeros estudios realizados en el cerebro de la rata mostraron una pérdida global de DNAm durante el envejecimiento (Vanyushin et al., 1973), pero hay poca información sobre la metilación del ADN en el hipocampo de la rata y aún menos sobre el impacto del envejecimiento y consecuente efecto en el desempeño cognitivo de los animales.

Para este fin, es necesario contar con metodologías y marcadores adecuados para el estudio del envejecimiento epigenético en mamíferos de menor complejidad como los roedores. Sin embargo, previo a la realización de esta tesis, no se contaba con un reloj epigenético de rata ni una plataforma que pudiera evaluar los cambios en la metilación específica para ese mamífero. En 2018, en colaboración con el Dr. Steve Horvath de UCLA y Altos Labs, EE.UU. y el Dr. Harold Katcher de Nugenics Research, India encaramos la puesta a punto del reloj epigenético en rata.

El reloj epigenético

La metilación en dinucleótidos CpG específicos del genoma de organismos eucarióticos es una marca epigenética importante de regulación de la expresión génica a nivel transcripcional. Esta metilación regula la expresión génica por reclutamiento de proteínas represoras de la cromatina o también por impedimento de la unión de factores de transcripción (Moore et al., 2012). Numerosos estudios han documentado la variación de la metilación de las CpGs con la edad en distintas especies y tejidos (Bell et al., 2012; Christensen et al., 2009; Hernandez et al., 2011; Jung & Pfeifer, 2015; Maegawa et al., 2010)

En 2011, Steve Horvath analizó los datos de metilación de distintas bases de datos públicas de 8000 microarreglos de muestras humanas. Por aprendizaje de máquinas automatizado, desarrolló un predictor de la edad en base al perfil epigenético, capaz de reconocer patrones de metilación asociados a la edad cronológica de los individuos. Este algoritmo calcula lo que se conoce hoy en día como la edad epigenética, y para ello tiene en cuenta el nivel de metilación de 353 dinucleótidos CpGs que se correlacionan con la edad en un 0.98. 193 de esos CpGs se relacionan positivamente, es decir que aumentan con la edad y los 160 restantes disminuyen (Horvath, 2013).

En humanos, la edad epigenética calculada por el algoritmo del reloj muestra una correlación de 0,98 con la edad cronológica y un margen de error de 3,6 años, una precisión sin precedentes para un biomarcador de la edad. Interesantemente, el reloj epigenético predice la edad biológica con una alta precisión y comparable cuando se aplica al ADN extraído de sangre entera, células mononucleares de sangre periférica, corteza occipital, epitelio bucal, colon, tejido adiposo, hígado, pulmón, saliva y cuello uterino (Horvath, 2013; Raj, 2018). La tasa de cambio en la metilación del ADN en CpG dependientes de la edad representa la velocidad o tasa de *tictac* del reloj epigenético. La tasa es muy alta en humanos desde el nacimiento hasta el año de edad, luego hasta los 20 años se desacelera progresivamente y a partir de los 20 años cambia a un ritmo mucho más lento (Horvath & Raj, 2018). También se puede decir que el *“tictac”* del reloj epigenético representa la tasa de cambio de la heterogeneidad de metilación del ADN entre las células de los tejidos (Raj, 2018). Existe evidencia convincente de que la velocidad de cambio del reloj está significativamente correlacionada con la tasa de envejecimiento biológico en la salud y la enfermedad. Por ejemplo, se sabe que la tasa de envejecimiento epigenético es más lenta en los supercentenarios y sus descendientes que en los no centenarios (Horvath et al., 2015). En circunstancias patológicas, la edad epigenética que muestra el reloj representa una edad biológica más alta que la cronológica. En humanos, hay un número creciente de patologías asociadas con el envejecimiento epigenético acelerado, donde la evidencia revela una correlación consistente y altamente significativa entre la tasa de envejecimiento epigenético y biológico. Una correlación tan constante entre la tasa de envejecimiento

epigenético y del organismo sugiere, aunque no prueba, que el reloj del ADNm puede ser el impulsor del envejecimiento del organismo. También se debe considerar que el marcapaso epigenético del envejecimiento puede ser un mecanismo modular del cual el reloj epigenético es un componente. Desafortunadamente, la posibilidad de pasar del ámbito de la especulación al campo de la experimentación parece irrealizable en la actualidad. Es probable que cualquier manipulación experimental que acelere o retrase la tasa de envejecimiento biológico en un modelo animal actúe en el mismo sentido sobre la tasa de envejecimiento epigenético. Sin embargo, no habría manera de determinar si el efecto principal de la manipulación fue sobre el epigenoma o sobre los componentes aguas abajo de la maquinaria del ADN. Las consideraciones anteriores se aplican a un reloj epigenético que avanza, es decir, en un organismo que envejece. Dado que ahora se cuenta con herramientas moleculares, como los factores de Yamanaka, que permiten hacer que el reloj retroceda, ha llegado el momento de abrir una nueva dimensión en la gerontología, pasando de la investigación sobre el envejecimiento a la investigación sobre el rejuvenecimiento epigenético, a desarrollarse más adelante.

La reprogramación celular

La reprogramación celular suele ser definida como la conversión de un tipo celular a otro, especialmente en el contexto donde una célula diferenciada es convertida a otra menormente comprometida (Brennan & Gage, 2013). La factibilidad de este proceso quedó demostrada cuando se generaron células madre pluripotentes inducidas (iPSCs), donde células somáticas de mamíferos de individuos adultos se reprogramaron a células indistinguibles de las células embrionarias (ES, por su sigla en inglés "*embryonic stem*") por sobreexpresión de un pequeño número de factores de transcripción (TF, por sus siglas en inglés) embrionarios (Takahashi & Yamanaka, 2006)

Entre los esfuerzos pioneros que allanaron el camino a la reprogramación celular, deben mencionarse los estudios de John Gurdon y colaboradores en los años sesenta. Sus estudios seminales en ranas demostraron que la clonación animal es posible (GURDON, 1962; Gurdon, 2006). Luego, siguió la clonación de mamíferos mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), lograda en 1996 con el nacimiento de la oveja Dolly (Campbell et al., 1996). Estos hallazgos sugirieron que el genoma de la célula somática es de una plasticidad notable.

En la década de 1980, se descubrió que un solo TF, el MYOD, puede convertir los fibroblastos en células de músculo esquelético. Esto demostró que el destino celular puede ser cambiado a través de la sobreexpresión de este TF específico (Choi et al., 1990; Davis et al., 1987; Weintraub et al., 1989).

Estos descubrimientos desafiaron la doctrina fundamental de que las células terminalmente diferenciadas están determinadas en su especialización de manera irreversible. También revelaron que en el citoplasma de un ovocito maduro hay biomoléculas capaces de

reprogramar un núcleo somático, poniendo así en marcha el programa de desarrollo de un nuevo individuo.

La identidad de estas moléculas comenzó a emerger en 2006, cuando Takahashi y Yamanaka demostraron que la transferencia de los cuatro genes de pluripotencia Oct4, Klf4, Sox2 y c-Myc (genes OKSM) a fibroblastos de ratón puede reprogramarlos, llevando a las células a un estado (estado iPSC) en el que se comportan como células madre embrionarias (Takahashi & Yamanaka, 2006). Estos descubrimientos han abierto un panorama de posibilidades inimaginables para el desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas (Bayart & Cohen-Haguener, 2013; Nedelec et al., 2013).

El método de conversión de células diferenciadas a iPSCs y posteriormente re-diferenciación a distintos tipos específicos de células somáticas de interés sigue siendo la estrategia más ampliamente utilizada para convertir un tipo de célula somática en otro. Desde su desarrollo en 2006, la tecnología iPSC ha sido ampliamente caracterizada; por ejemplo, se ha demostrado que el origen celular influye en el potencial de diferenciación de iPSCs *in vitro* a cuerpos embrioides y diferentes tipos de células.

A pesar de las ventajas de la tecnología iPSC, el procedimiento en su conjunto es arduo, largo y costoso. Dado que los protocolos para generar iPSCs comprenden numerosas etapas, la eficiencia con la que se genera el tipo de célula final puede ser baja. Además, existen cuestiones preocupantes en relación a la seguridad de las células derivadas de iPSC y las mismas necesitan ser testeadas antes de que puedan utilizarse clínicamente (Okano et al., 2013). Es importante notar que los ensayos comúnmente usados para demostrar pluripotencia incluyen la verificación de la capacidad de las iPSC para generar teratomas (Patel & Yang, 2010). Por lo tanto, el potencial tumorigénico de las iPSCs contaminantes que no lleguen a diferenciarse aumenta el riesgo en cualquier aplicación clínica de células somáticas generadas por este procedimiento (Miura et al., 2009). Estos obstáculos han llevado a la necesidad de encontrar otras formas de reprogramación celular que impliquen la conversión directa entre distintos tipos de células. Estos nuevos métodos se conocen como tecnologías independientes de iPSC y entre ellos se encuentran como la reprogramación de linaje o transdiferenciación y la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia.

La reprogramación de linaje consiste en la conversión directa de un tipo de célula somática en otro por expresión ectópica de múltiples factores de transcripción linaje específicos (TF) o microARN (miARN), sin que la célula pase por el estado de célula madre pluripotente (Ieda, 2013; Sancho-Martinez et al., 2012). Esta estrategia utiliza factores que muestran expresión específica en las células diana.

Por su parte, la reprogramación directa o reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia (PDR) utiliza células somáticas totalmente diferenciadas y las convierte en otros tipos de células somáticas a partir de la expresión transitoria de genes de

pluripotencia, usualmente durante 3-5 días, generando intermediarios epigenéticamente inestables (EU) que responden a cócteles apropiados de factores de diferenciación específicos (Efe et al., 2011; Kim et al., 2011, 2012; Ma et al., 2013).

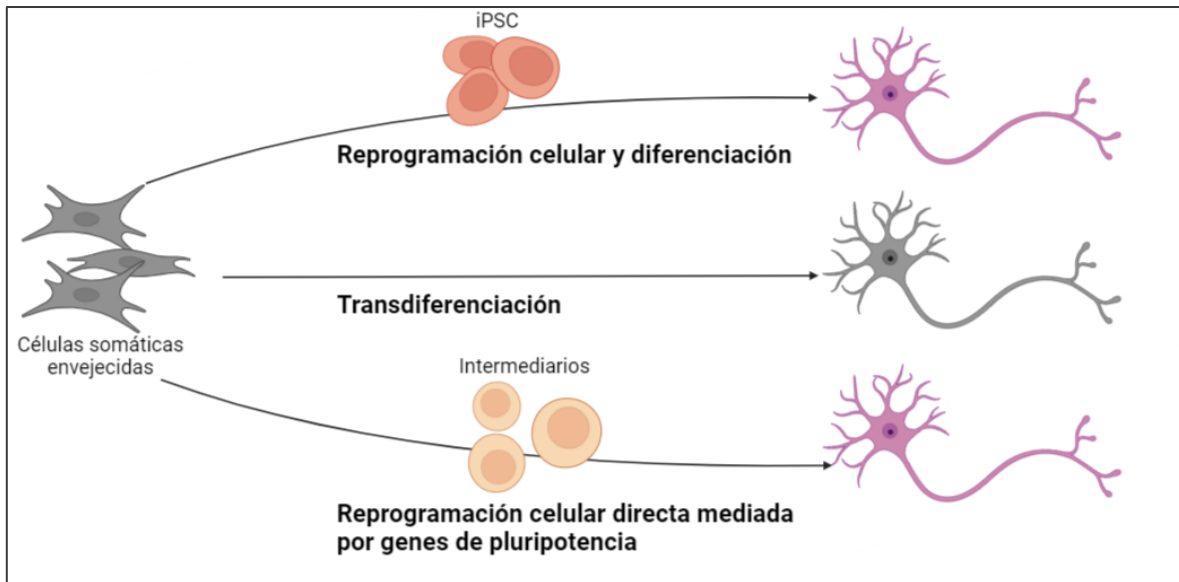


Figura 2 Métodos de reprogramación celular. La flecha superior ilustra el protocolo de reprogramación celular convencional mediado por iPSC en el que las células somáticas se desdiferencian por primera vez a iPSC, y luego se diferencian en la célula somática diana inducida elegida. En el centro se representa los procedimientos de reprogramación denominados reprogramación de linaje también llamado transdiferenciación. Estos procedimientos se basan en la sobreexpresión de genes específicos del tipo celular, evitando la etapa de pluripotencia. A diferencia de las estrategias mediadas por iPSC, la transdiferenciación no parece borrar las marcas epigenéticas del envejecimiento. La flecha inferior describe estrategias de reprogramación directa llamadas reprogramación directa mediada por pluripotencia (PDR) que se basan en la sobreexpresión transitoria de los cuatro genes Yamanaka en células somáticas que se convierten en intermediarios pluripotentes (PI) que responden a cócteles de diferenciación específicos que pueden llevarlos al tipo de célula somática inducida deseada. Las células rejuvenecidas se representan en color lila, las células no rejuvenecidas en color gris.

La reprogramación celular para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas asociadas a la edad

En 2009, se demostró que el trasplante de precursores neuronales en un modelo de rata con enfermedad de Alzheimer (EA) promovía mejoras en el comportamiento del animal. Con el advenimiento de la tecnología iPSC, surgió la posibilidad de utilizar células madre neurales derivadas de iPSC como terapia celular en enfermedades relacionadas con el cerebro (Moghadam et al., 2009; Tincer et al., 2016). Desde entonces, se han desarrollado diversos enfoques para obtener células madre neurales inducidas, que son células prometedoras ya que dan lugar a diferentes tipos de células neuronales y gliales, además de ser expandibles in vitro por varios pasajes.

Una estrategia utilizada para obtener precursores neuronales fue la ya mencionada reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia. En este caso, los genes se expresaron de forma transitoria, manipulando el estado epigenéticamente inestable de las

células y llevándolo hacia el fenotipo de precursores neurales (Capetian et al., 2016; Connor et al., 2018; Kim et al., 2012; Winięcka-Klimek et al., 2015). Otras estrategias emergentes pueden englobarse dentro de la transdiferenciación, en la que los precursores neurales se obtienen por diferenciación directa de fibroblastos a través de factores de transcripción específicos o miRNAs (Lujan et al., 2012; H. Yang et al., 2017).

La reprogramación celular a células de interés específicas de paciente permite el estudio del fenotipo celular de enfermedades que de otro modo serían inaccesibles. A través del modelado in vitro se espera lograr el desarrollo de fármacos específicos para su tratamiento (Mertens et al., 2016). Por ejemplo, se han obtenido células neuronales inducidas a partir de la transdiferenciación de fibroblastos humanos con los factores de transcripción Brn2, Ascl1 y Myt1 en combinación con el factor NEUROD1. Estas células poseían la morfología de células neuronales maduras (Pang et al., 2011).

Más específicamente en el modelado de Alzheimer, fibroblastos de piel de pacientes con EA familiar fueron convertidos en células neuronales inducidas a través de un cóctel de siete productos químicos, obteniendo la misma morfología, electrofisiología y expresión génica como células neuronales inducidas derivadas de iPSC. Curiosamente, estas células mostraron aumentos en el nivel extracelular de A β 42 y la relación A β 42/A β 40 (Hu et al., 2015).

Los fibroblastos de pacientes con EA familiar y esporádica también se transdujeron con factores de Yamanaka, se reprogramaron a iPSC, luego se diferenciaron a NPC de células progenitoras neurales y posteriormente a neuronas con medios específicos. Estas neuronas exhibieron niveles más altos de A β , fosfo-tau y aGSK-3b que los controles humanos sanos (Israel et al., 2012).

Estos y otros estudios de modelado de EA a partir de iPSC han sido reportados recientemente, lo que demuestra la utilidad de la reprogramación celular y abre nuevas posibilidades para la investigación de descubrimiento de fármacos (Hawkins & Duchon, 2019; Raman et al., 2020; Rowland et al., 2018).

En cuanto a la medicina curativa, en un modelo animal murino que expresa 5xFAD para aumentar el número de astrocitos, se reprogramaron células gliales reactivas a neuronas utilizando el factor de transcripción NEUROD1, como estrategia prospectiva para la recuperación de la pérdida neuronal (Guo et al., 2014). Además, la inducción de neuronas derivadas de células gliales reactivas mediante la reprogramación directa utilizando miARN demostró mejoras en la memoria espacial y la alternancia de un modelo de ratón de Alzheimer con estreptozotocina (Ghasemi-Kasman et al., 2018).

Mecanismo de los genes OSKM en la reprogramación celular

En el proceso del desarrollo de la reprogramación celular, Takahashi and Yamanaka identificaron 24 factores de pluripotencia candidatos a generar iPSC. De ese total, descubrieron que para la conversión de fibroblastos embrionarios de ratón a células madre pluripotente inducida se necesitaban los factores Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc (Takahashi & Yamanaka, 2006). Hasta ese entonces, se sabía que Oct4 y Sox2 eran factores de transcripción principales en las vías de pluripotencia ya que regulaban la expresión de otros genes asociados a la misma (Okumura-Nakanishi et al., 2005; Tokuzawa et al., 2003; Tomioka et al., 2002). Por su parte, Klf4 había demostrado inducir la autorenovación de las células ES, independientemente de la vía LIF-STAT3 (Niwa et al., 2009). En cuanto a cMyc, factor de transcripción que promueve la proliferación y la supervivencia celulares, se había identificado como factor necesario para el mantenimiento de la proliferación y otras características de las estas células ES (Chappell & Dalton, 2013; Takahashi & Yamanaka, 2016).

Los eventos sucedidos en la reprogramación con los factores OSKM suelen depender de la metodología de sobreexpresión y de la célula de origen. Sin embargo, ocurren ciertos eventos generales en las células reprogramadas independientemente del método de reprogramación utilizado.

La reprogramación empieza con su fase de iniciación donde se realiza una transición de fenotipo mesenquimal a epitelial (MET, por sus siglas en inglés) (R. Li et al., 2010). Esta primera etapa se caracteriza por la activación de genes de pluripotencia tempranos y la represión de algunos genes de desarrollo y específicos de fenotipo celular. En la segunda fase, de maduración y estabilización, se expresan genes asociados al desarrollo embrionario y al mantenimiento de las células madre (Polo et al., 2012).

En la fase temprana, cada célula asume estocásticamente un destino según los genes que se activen. Se desencadenarán procesos como apoptosis, desdiferenciación, senescencia y transdiferenciación. En esta etapa los genes Klf4 y cMyc se unen a promotores de genes específicos del tipo celular de origen, y a su vez incrementa la expresión de genes de células somáticas (no propios de fibroblastos, pero que tampoco se expresan en células ES). Por otra parte, los genes OSK se unen a los genes de pluripotencia tempranos, como Fbxo15 y Sall4.

Posteriormente ocurre una fase intermedia de latencia variable que retrasa la conversión de las células a iPSC. En esta fase hay activación estocástica de genes de pluripotencia, de la glicolisis y de genes de desarrollo (Hansson et al., 2012; Polo et al., 2012).

Por último, en la fase tardía las células estabilizan su estado de pluripotencia, en donde se silencian los genes exógenos y se remodela el epigenoma activando el core de pluripotencia. En esta fase, el ADN de los genes específicos de la célula de origen adopta

conformación de heterocromatina, los genes de pluripotencia tempranos se expresan en altos niveles y se inicia la expresión de los genes de pluripotencia tardíos (Buganim et al., 2013).

Rejuvenecimiento por reprogramación celular

El rejuvenecimiento ha sido definido recientemente como la disminución robusta, sostenida y sistémica de la edad biológica. La mayoría de las estrategias de rejuvenecimiento se pueden agrupar en el trasplante heterocrónico, la reprogramación celular y la dinámica de embriones temprana (B. Zhang et al., 2022).

Las células madre embrionarias tienen la edad cronológica y epigenética más baja posible que puede tener un organismo. En términos biológicos, las células ES pueden permanecer indefinidamente jóvenes, aunque sigan proliferando. En estas células ES, el reloj epigenético no funciona (Horvath, 2013) ni el reloj circadiano oscila (Yagita et al., 2010). Solo cuando las células ES se diferencian, ambos relojes se activan y las células comienzan a envejecer.

Existe evidencia clara de que la reprogramación celular rejuvenece las células. Por lo tanto, se ha demostrado que cuando las células somáticas se reprograman a células madre pluripotentes inducidas (iPS), que son células de tipo embrionario, su reloj epigenético deja de funcionar y los relojes circadianos dejan de oscilar (Horvath, 2013; Yagita et al., 2010). Además, la edad epigenética en células iPS derivadas de humanos y ratones se reduce a cero o casi a cero, lo que es consistente con sus características similares a las de los blastocistos (Horvath, 2013; Petkovich et al., 2017). En algunos casos, la reprogramación de células de personas mayores requiere enfoques específicos. Por lo tanto, los fibroblastos de la piel de ratones viejos (18 meses) se rejuvenecieron en células ES mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), seguida de la recolección de la masa celular interna de las blástulas embrionarias resultantes (Wu et al., 2019). Si los blastocistos se diferenciaban de nuevo en fibroblastos, las células recién generadas se rejuvenecerían. El rejuvenecimiento celular también se ha logrado en fibroblastos de piel de personas centenarias sanas (Lapasset et al., 2011). Cuando se colocan en cultivo, los fibroblastos de piel de personas centenarias muestran una serie de déficits morfológicos, moleculares y funcionales como consecuencia de la edad muy avanzada del donante. En 2011, un grupo francés dirigido por JM Lemaitre pudo reprogramar fibroblastos de piel de personas centenarias sanas utilizando un cóctel de seis genes de reprogramación, Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc, Nanog y Lin28 (Lapasset et al., 2011). Esta combinación de 6 factores reprogramó fibroblastos de donantes muy antiguos en células iPS típicas. Las células iPS así generadas se incubaron con un cóctel de diferenciación que las indujo a diferenciarse nuevamente en fibroblastos cuyo perfil transcripcional, metabolismo mitocondrial, niveles de estrés oxidativo, longitud de los telómeros y potencial de duplicación de la población eran

indistinguibles de los de los fibroblastos de la piel de contrapartes jóvenes (Figura 3). Después de juntar los datos, los autores concluyeron que los fibroblastos de los centenarios se habían rejuvenecido. Las implicaciones de este y otros trabajos son de gran alcance y colocan la visión del envejecimiento bajo una nueva perspectiva, que en un campo tan novedoso conduce a vías que en la actualidad son necesariamente hipotéticas, esencialmente nuevas ideas para probar. (Hashizume et al., 2015; Mertens et al., 2015; Mistriotis et al., 2017; Nishimura et al., 2013; Wahlestedt et al., 2017)

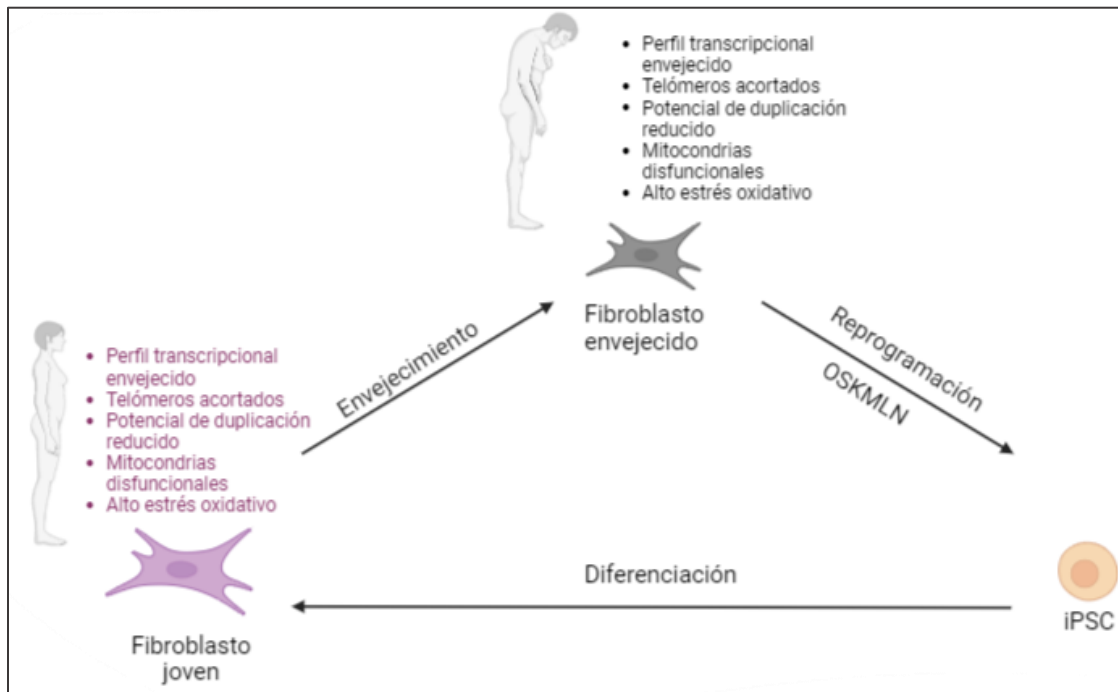


Figura 3 Rejuvenecimiento por reprogramación celular de fibroblastos de individuos centenarios sanos. En cultivo, los fibroblastos de personas mayores muestran una firma transcripcional típica, diferente de la de sus contrapartes jóvenes, así como telómeros acortados, potencial de duplicación de población (DP) reducido, mitocondrias disfuncionales y niveles más altos de estrés oxidativo. Cuando las células se reprogramaron a iPSC con una combinación de 6 factores, las alteraciones anteriores se revirtieron por completo. Luego, las células iPSC se diferenciaron nuevamente a fibroblastos mediante cultivo en presencia de un conjunto apropiado de factores de diferenciación. En las células resultantes, todas las variables anteriores tenían niveles típicos de fibroblastos tomados de individuos jóvenes.

Rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial

Aunque la reprogramación celular completa con los genes OSKM se han utilizado con éxito y repetidamente para rejuvenecer las células somáticas, el mismo protocolo no puede ser utilizado in vivo, ya que el proceso de desdiferenciación asociado con el rejuvenecimiento durante la reprogramación celular induciría múltiples teratomas in vivo (Abad et al., 2013; Ohnishi et al., 2014). Para superar esta dificultad, se generaron nuevas estrategias de rejuvenecimiento por reprogramación en las que el proceso de inducción de células madre no llega a ser completado. Este proceso se denomina reprogramación celular parcial. En ella, las células son sometidas a la sobreexpresión de los genes OSKM de manera de

desencadenar la fase inicial de reprogramación, logrando revertir marcas de envejecimiento, pero sin perder las marcas de identidad propias de la célula de origen.

En un estudio realizado por Olova y colaboradores, analizaron la dinámica de la reprogramación celular de fibroblastos para su posterior utilización en terapias de rejuvenecimiento por reprogramación parcial (Olova et al., 2019). Los autores observaron que, al iniciar la inducción de los genes OSKM, comienza la activación del grupo de genes de pluripotencia temprano, entre ellos Nanog, SALL4 y TRA-1-60. Su expresión aumenta durante los primeros 10 días y se establece para el día 20. En contraste, el grupo de genes de pluripotencia tardía se elevan más lentamente y su transcripción se establece al día 28.

Por su parte, los genes característicos de la célula de origen sufren una regulación a la baja. En el caso de los fibroblastos, los genes específicos se pueden agrupar en tres clusters. El cluster 1 permanece estable los primeros 15 días. Los cluster 2 y 3, disminuyen su expresión hasta el séptimo día y luego se sostienen en un plateau hasta el día 15. Por ejemplo, el gen vimentina disminuye al 60% su expresión y se mantiene constante hasta el día 15 de reprogramación.

Así, está bien establecido que la reprogramación parcial ocurre durante una fase temprana y reversible durante el curso de reprogramación de iPSC, que implica la activación estocástica de genes de pluripotencia y que puede ser utilizada para intervenciones terapéuticas de rejuvenecimiento.

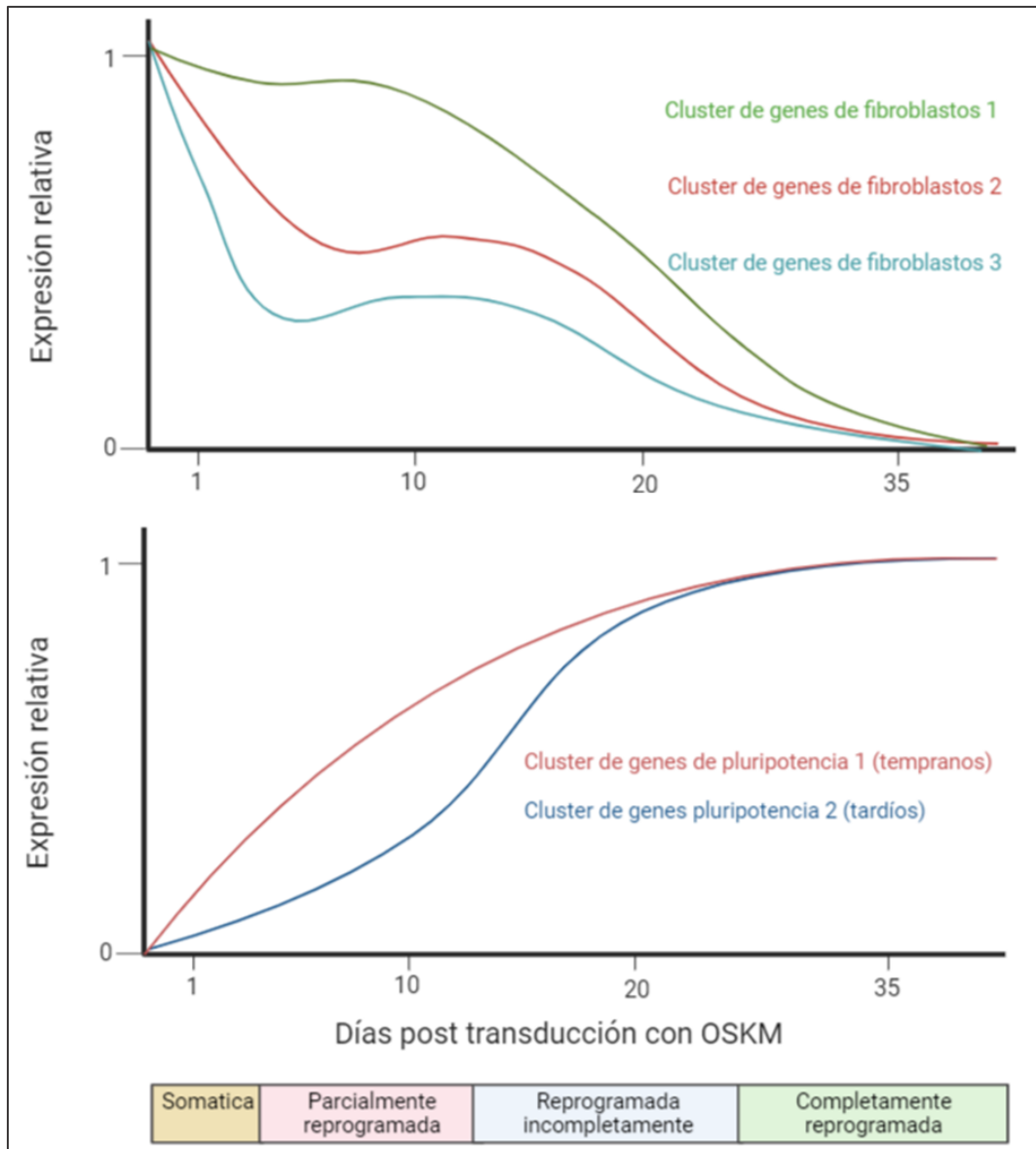


Figura 4 Cambios en la expresión génica durante el proceso de reprogramación de fibroblastos. Imagen adaptada de estudio de Olova et. al, 2018.

En 2016, Ocampo y colaboradores desarrollaron por primera vez una estrategia de reprogramación celular parcial cíclica, basada en el uso de múltiples ciclos de reprogramación interrumpida. En estos ciclos, la transcripción de los genes OSKM se activa brevemente y luego se desactiva mediante un sistema Tet On regulable por doxiciclina (DOX). Para ello utilizaron un modelo de ratón transgénico progénico que poseía una sola copia de los genes OSKM en su genoma, a fin de evitar la tumorigénesis. Desde las 8 semanas de edad, los ratones se sometieron a ciclos de dos días de inducción de la expresión por suministro de DOX en el agua de bebida y cinco días de descanso. El tratamiento prolongó significativamente su supervivencia en ratones progénicos, mientras

que en ratones naturalmente envejecidos mostraron una regeneración en el tejido pancreático luego de una lesión con estreptozotocina, aunque no se rejuveneció el organismo a nivel sistémico (Ocampo et al., 2016).

Los autores también estudiaron el rejuvenecimiento ex vivo por reprogramación parcial cíclica en fibroblastos de ratones progéricos transgénicos y en fibroblastos de humano diferenciados a partir de iPSC que contenían los factores OSKM. Observaron una mejora en el daño al ADN, medido por la histona H2Ax presente en rupturas de ADN de doble cadena, una disminución en la senescencia celular, medida por la actividad de beta galactosidasa, una mejora en la desregulación epigenética medible por la trimetilación en la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me3) y un aumento en la presencia de la proteína de unión a p53 (53BP1).

Posteriormente fueron desarrolladas otras estrategias para la reprogramación celular parcial in vitro. En el caso de Sarkar y colaboradores, transfectaron fibroblastos y condrocitos con mARNs de los factores OSKMLN durante cinco días, manteniéndose aún en la fase de iniciación. Observaron una reversión en la edad epigenética de 3 años, y mejora en marcas moleculares como H3K9me3, H2Ax, HP1y y en el perfil transcriptómico. Este fue el primer estudio en medir el efecto de la reprogramación parcial en el rejuvenecimiento por el reloj epigenético (Sarkar et al., 2020).

En esa misma línea, se demostró también que el sometimiento de las células a la reprogramación hasta la fase de maduración por transducción con lentivirus y posterior recuperación del fenotipo original revertía en mayor medida la edad epigenética de los fibroblastos (hasta 30 años menos), y también revertía el perfil transcriptómico y metabolómico. Además, en ese estudio se analizaron las diferencias en el metiloma y se encontró que sitios CpG asociados con la edad que se metilan diferencialmente durante la fase de maduración, mientras que las regiones de genes de identidad celular permanecen sin cambios hasta la fase de estabilización (Gill et al., 2022). En conclusión, la reversión en las marcas de edad, especialmente las epigenéticas, es mayor cuanto más largo es el tratamiento. De esta manera se compromete a las terapias interventivas por reprogramación celular parcial a lograr un compromiso entre someter a las células a la mayor inducción posible para lograr los efectos máximos, y a su vez evitar la pérdida de las marcas de identidad.

En otro experimento, realizaron reprogramación parcial cíclica dirigido específicamente a fibras musculares utilizando un ratón transgénico cuyas miofibras expresaban los genes OSKM. En ellos observaron que luego de una lesión con cardiotoxina se producía proliferación de las células madre, acelerando la regeneración del músculo de ratones jóvenes y viejos. Dicha proliferación se produjo por remodelamiento del nicho y no por inducción propia de las células madre. Sin embargo, cuando realizaron la intervención de

modo curativo, es decir, primero la lesión y posteriormente la intervención con los genes OSKM no encontraron una regeneración muscular mayor que en los animales no tratados (C. Wang et al., 2021).

De manera similar, en estudios de corazón se demostró la expresión de OSKM a corto plazo (doce días), antes y durante el infarto de miocardio, mejora el daño miocárdico en ratones adultos transgénicos y mejora la función cardíaca. Esto ocurre porque la desdiferenciación controlada temporalmente y la reprogramación permiten la reentrada en el ciclo celular de los cardiomiocitos, induciendo un perfil de expresión que se parece al de los cardiomiocitos fetales. Adicionalmente, los autores concluyeron que el tiempo necesario de inducción de los genes OSKM para perder la identidad de las células cardíacas respondía al sistema de expresión utilizado. Por ejemplo, en ratones transgénicos OSKM de expresión específica en los cardiomiocitos, las neoplasias aparecían a los 21 días de expresión continua por suministro de DOX. En cambio, en ratones que también eran transgénicos para la proteína fluorescente Cherry la expresión de los genes de pluripotencia era mucho menor, por lo que la desdiferenciación de las células se inducía solo moderadamente, y a partir de la séptima semana se lograba observar neoplasmas cardíacos (Y. Chen et al., 2021).

Estos reportes y otros demostraron entonces que la capacidad regenerativa de los genes de pluripotencia OSKM en tejidos como musculo, corazón, hígado, páncreas, piel y riñón. (Browder et al., 2022; Hishida et al., 2022)

En modelos de degeneración por envejecimiento natural y no por lesiones, se observó que la exposición de ratones transgénicos envejecidos a una semana de inducción de los genes OSKM provocó una reversión en los cambios relacionados a la edad del metiloma y transcriptoma en páncreas y en menor medida en hígado y riñón (Chondronasiou et al., 2022).

En un estudio de modelo similar, se probaron diferentes plazos de reprogramación parcial cíclica. La realización de ciclos a largo plazo (de hasta diez meses) mostró rejuvenecer no sólo el metiloma y el transcriptoma si no también la metabolómica y lipidómica en tejidos como piel y riñón (Browder et al., 2022). Estos estudios sugieren que la duración del tratamiento determina la extensión de los cambios en tejidos específicos y órganos, así como el nivel de reversión a nivel sistémico.

La reprogramación parcial tanto cíclica como transitoria y a corto plazo ha demostrado extender la vida de animales progericos (Browder et al., 2022; Ocampo et al., 2016; Q et al., 2021). Por su parte, en animales *wild type* se demostró que la terapia génica intravenosa con un sistema de dos vectores AAV9 que, en uno de los componentes del vector, expresa el casete hEf1a-rtTA4 (proteína reguladora rtTA4 bajo el control del promotor hEf1a) mientras que el segundo componente del vector expresa el casete TRE3-OSK (elemento de

respuesta a la tetraciclina TRE3 vinculado al tándem de los genes OSK), implementado en ratones seniles (29,2 meses), prolongó la supervivencia de los animales en dos meses en comparación con los controles. Este es el primer informe que muestra que la terapia génica de Yamanaka en ratones WT puede prolongar su supervivencia. Los autores implementaron una reprogramación parcial activando los genes OSK durante una semana y desactivándolos durante la semana siguiente (Macip et al., 2023).

En 2021, se reportó el primer uso de un vector adenoviral para la reprogramación parcial de tejido *in vivo*. El adenovirus OSKM fue inyectado en células cardíacas murinas y se observó una reprogramación transitoria marcada por la activación transitoria de Oct4 y Sox 2, a los días 6 y 20 respectivamente. Las marcas de identidad no se perdieron y los ratones no mostraron teratomas aun 4 meses después de la inyección (Kisby et al., 2021). Este es el reporte de expresión continua más larga sin producir tumores. Esto se condice con el hecho de que los sistemas "secundarios" para la reprogramación directa, es decir, células modificadas genéticamente que ya tienen insertos los genes OSKM en su genoma, tienen una eficiencia y una cinética acelerada hasta 50 veces mayores en comparación con los sistemas *in vitro* transducidos viralmente (Wernig et al., 2008). De esta manera, los vectores adenovirales representan una estrategia promisoriosa para la medicina regenerativa y el rejuvenecimiento, disminuyendo el riesgo de oncogenicidad.

Por su parte, Ocampo y colaboradores demostraron que la mortalidad prematura debida a la expresión continua de los genes OSKM en ratones transgénicos depende, en primera instancia, de la generación de tumores en intestino e hígado, tejidos muy susceptibles a la división celular (Parras et al., 2022). Así, este estudio y los arriba mencionados demuestran que diferentes tipos celulares requieren diferentes niveles de inducción.

Intervenciones del sistema nervioso central

Como se mencionó anteriormente, la neurodegeneración asociada a la edad puede ser tratada por el remplazo de las células dañadas. Sin embargo, la reprogramación celular parcial o transitoria mostró una nueva alternativa promisoriosa en la que expresión de los genes OSKM podría facilitar la regeneración del tejido *in vivo*, ya sea por aumento de la proliferación de precursores neurales o por reversión del fenotipo celular a un perfil similar al de células jóvenes.

En un modelo de encefalopatía hipóxico-isquémica murino se demostró que cuatro factores de reprogramación pueden influir en los progenitores endógenos en el hipocampo para diferenciarse en neuronas maduras y mejorar la funcionalidad hipocampal. Los progenitores neurales pueden migrar a zonas dañadas y diferenciarse y se encuentran normalmente en la zona subventricular (SVZ). Cuando hay isquemia, hay neurogénesis tanto en SVZ como en la zona subgranular (SGZ), incluso en adultos, aunque de manera

limitada e insuficiente. En el estudio, a ratones de 1 semana de edad se les realizó una ligación en la carótida sometidos a hipoxia. A las 6 semanas de edad, se inyectó OSKM-GFP en el ventrículo lateral utilizando un virus Sendai. El tratamiento duró ocho semanas, en las que no se generaron teratomas y lograron ver un aumento en la densidad sináptica y de la memoria a largo plazo de los animales, así como una disminución en la ansiedad en comparación con los animales no sometidos a los factores (Wi et al., 2016). Este estudio demuestra que el efecto de los genes OSKM al utilizar vectores virales no es lo suficientemente potente como para desdiferenciar las células ganglionares, ni para generar teratomas, pero sí poseen un efecto claramente regenerativo.

En un estudio más reciente, la reprogramación parcial cíclica por cuatro meses en ratones transgénicos de mediana edad revirtió parcialmente en el hipocampo la reducción dependiente de la edad de la trimetilación de la histona 3 en la lisina 9 (H3K9me3). Además, el tratamiento mostró niveles de migración mayores de células granulares en el giro dentado y también mejoró el rendimiento del ratón en la prueba de reconocimiento de objetos (Rodríguez-Matellán et al., 2020).

Una estrategia alternativa fue la utilizada por Lu y colaboradores, en la que se evaluó el aumento de función y la capacidad regenerativa de los genes OSK sin el cMyc. Un virus adeno-asociado (AAV2) se inyectó en el cuerpo vítreo de células ganglionares en la retina de ratón. En un modelo de ratón de glaucoma, sobreexpresaron por cuatro semanas los genes OSK, y a mitad de tratamiento realizaron una lesión en el nervio óptico para evaluar la regeneración. Los investigadores observaron un aumento en la regeneración de axones sin generar un aumento en la proliferación de las células retinales ganglionares. También se revirtieron los patrones de metiloma y transcriptoma asociados al envejecimiento. Mas importante, aumentó la recuperación de la visión a la mitad de lo que se había perdido (Y. Lu et al., 2020).

En el mismo estudio, estudiaron ratones *wildtype* envejecidos naturalmente. Se evaluaron ratones de 11 y 17 meses con cuatro semanas de inducción de OSK. Se restauró la visión de los ratones de doce semanas, pero no así de los de 18 meses de edad. En los de 12 meses, tampoco hubo aumento en el número células ganglionares de la retina ni en la regeneración de los axones. En cambio, si observaron cambios en el perfil transcriptómico que podría ser el causante de la restauración de la visión.

De los tres estudios mencionados anteriormente, en ninguno de los tres aumentó la población de precursores. Estos hallazgos sugieren que la mejora funcional obtenida en el sistema nervioso es resultado de una mejora funcional o una mayor inducción de las células ya presentes.

Los resultados de Wi y Lu refuerzan la hipótesis de que la expresión brindada por los vectores virales no es suficiente para desencadenar eventos de reprogramación celular completa. De este modo, los vectores virales son una estrategia de rejuvenecimiento y medicina regenerativa del sistema nervioso biológicamente segura, evitando la formación de tumores.

El rejuvenecimiento epigenético por reprogramación celular

En una revisión que publicamos recientemente, propusimos un modelo bimodular de epigenoma de mamíferos para explicar la observación de que cuando el reloj epigenético se ve fuertemente forzado a retroceder in vivo, lo que lleva a una edad epigenética notablemente baja, el proceso solo puede arrastrar el fenotipo a un estado moderadamente rejuvenecido (Chiavellini et al., 2021). La nueva hipótesis, modificada por los recientes hallazgos, intenta delinear un diseño de epigenoma formal cuyas características organizacionales sean consistentes con los principios de diseño de la evolución en los organismos superiores, en general, y en los mamíferos en particular. La versión actualizada del modelo tiene en cuenta la evidencia acumulada sobre el rejuvenecimiento celular inducido por los genes Yamanaka y otros genes de reprogramación, así como los resultados recientes relacionados con los efectos de los genes Yamanaka en modelos animales de envejecimiento natural o inducido experimentalmente que se han revisado anteriormente.

Para construir la nueva hipótesis, se consideraron los siguientes hechos experimentales:

- 1- Disminución relacionada a la edad en la capacidad de respuesta del epigenoma a los genes de reprogramación:

El hecho de que las células viejas se vuelvan progresivamente más resistentes a la reprogramación sugiere que existe una disminución de la respuesta del epigenoma con la edad. Sin embargo, incluso las células centenarias pueden ser inducidas a responder a cócteles de genes de reprogramación formulados adecuadamente (Lapasset et al., 2011).

- 2- La disrupción del epigenoma induce síntomas similares al envejecimiento en ratones:

En el modelo animal transgénico conocido como ratones ICE (por sus siglas en inglés para cambios inducibles en el epigenoma), la administración de tamoxifeno puede inducir la expresión de I-PpoI, una endonucleasa de *Physarum polycephalum*, que corta en unos 20 sitios canónicos en el ADN nuclear.

En ratones ICE, se pueden lograr varias características de envejecimiento al inducir transitoriamente la expresión de I-PpoI que genera roturas de doble cadena (DSB) no mutagénicas en el ADN, lo que altera la información epigenética alrededor de los sitios de

corte de I-Ppol. Los resultados llevaron a los autores a pensar que el envejecimiento no se debe a mutaciones en el ADN, sino a la desorganización progresiva del epigenoma y la consiguiente pérdida de información epigenética (Hayano et al., 2019; J.-H. Yang et al., 2019, 2023).

Para explicar la capacidad de las células de personas mayores para ser reprogramadas en iPSC, se ha planteado en bibliografía la hipótesis de que, en los primeros años de vida, una copia de seguridad de la información epigenética intacta se almacena en algún lugar dentro de las células y puede ser recuperada en respuesta a factores de reprogramación (Sinclair DA, LaPlante MD, 2019)(Sinclair DA, LaPlante MD, 2019). Una de las debilidades de la hipótesis es la implicación de que en los mamíferos evolucionó un mecanismo molecular complejo para mantener una copia de seguridad de la información epigenética en las células somáticas. Es difícil imaginar qué propósito evolutivo puede tener tal mecanismo de almacenamiento, ya que el rejuvenecimiento no ocurre naturalmente en los mamíferos.

En el modelo propuesto aquí, el epigenoma es un conjunto de módulos funcionales. Cada módulo controla un conjunto de funciones celulares relacionadas y está conectado entre sí por una red de señales moleculares. Hay módulos reguladores específicos, incluidos módulos reguladores del desarrollo que responden a los genes reprogramadores. El modelo no intenta explicar cómo se organiza todo el conjunto modular; solo se enfoca en los elementos que responden a los genes reprogramadores. Una característica clave del modelo es la redundancia. Al igual que los genes (Nowak et al., 1997), se supone que los módulos del epigenoma redundantes se han replicado durante la evolución, dando lugar a múltiples copias (que difieren solo ligeramente entre sí) de aquellos módulos que son más críticos para la supervivencia. Se supone que los módulos de respuesta a genes de reprogramación (RGR) son redundantes.

En consecuencia, a medida que los eventos aleatorios erosionan progresivamente los módulos RGR, la capacidad de respuesta general del epigenoma a la reprogramación disminuye, pero sigue siendo viable incluso en edades muy avanzadas. En sistemas biológicos como el genoma (Nowak et al., 1997) y el cerebro (Glassman, 1987), la redundancia protege al sistema de ataques aleatorios únicos que provocan el cierre de procesos vitales. Dado que cada proceso está controlado por la acción combinada de componentes redundantes, el daño de un solo componente provocará una ligera pérdida de robustez en la eficiencia funcional del proceso.

Se ha informado que una función de tasa de mortalidad derivada de un sistema redundante que se deteriora aleatoriamente se aproxima más a las tasas de mortalidad observadas que la función de Gompertz (Johnson, 1963). Así, la redundancia modular puede contribuir a estabilizar el epigenoma y prolongar su funcionalidad durante el envejecimiento.

Terapia génica con adenovirus

La terapia génica busca modificar o manipular la expresión de un gen o alterar las propiedades biológicas de células vivas con fines terapéuticos. Los virus suelen utilizarse para terapias génicas por su habilidad natural para transferir material genético al interior de las células. En el sistema nervioso central, se han estudiado varios candidatos, principalmente factores neurotróficos, como por ejemplo el factor neurotrófico derivado de células gliales GDNF que mejora considerablemente la activación de neuronas motoras y dopaminérgicas (Chiavellini et al., 2022).

Históricamente, como vectores virales para terapia génica se han utilizado retrovirus, adenovirus y virus adeno-asociados (AAV). En particular para el uso en el sistema nervioso, los adenovirus poseen varias ventajas, entre ellas la capacidad de infectar células postmitóticas y su baja patogenicidad (Barkats et al., 1998).

Los Adenovirus

Los adenovirus son virus de ADN doble cadena de 36 kb, icosaédricos y sin envoltura. Su ADN es lineal y está flanqueado por dos secuencias invertidas repetidas (ITRs). También posee una señal de empaquetamiento. Ambos elementos son los únicos necesarios in cis para completar el ciclo de su replicación. El resto del genoma puede ser provisto in trans y se clasifica en unidades de transcripción. Los genes tempranos E1A, E1B, E2, E3, y E4, se expresan previo a la replicación del ADN. La unidad de transcripción E1A es la primera expresada durante la infección viral y codifica dos proteínas involucradas en la regulación transcripcional del virus y la estimulación del inicio de la fase de replicación S en la célula huésped. Las proteínas E1B principales bloquean el transporte de ARNm de la célula hospedadora y estimulan el transporte del ARN mensajero viral. La región E2 codifica las proteínas necesarias para la replicación del ADN viral, codificando la ADN polimerasa viral y el precursor de la proteína terminal. La región E3 codifica proteínas relacionadas a la evasión del sistema inmune, y es prescindible para el crecimiento del virus en cultivo celular. La región E4 codifica varias proteínas que favorecen a la replicación del ADN viral, y preparan a la célula para la expresión de los genes de expresión tardía. Estos últimos, se expresan después de la replicación del ADN y codifican distintas proteínas virales, productos de diferentes cortes y empalmes de la secuencia transcripta (L1-L5) (Palmer & Ng, 2004).

La infección por virus comienza con la unión de la proteína de fibra del adenovirus a receptores primarios específicos en la superficie celular. Estas fibras emergen de cada vértice de la superficie icosaédrica. El extremo distal posee una estructura globular denominada “knob”, encargada de interactuar con los receptores de coxsakievirus y adenovirus (CAR) (Y. Zhang & Bergelson, 2005). Una vez unida la fibra a su receptor, la base pentón interactúa con integrinas de la célula huésped desencadenando la endocitosis, donde escapa del endosoma temprano al citosol antes de la formación del lisosoma. El

virión se desensambla secuencialmente durante la translocación hacia el núcleo a lo largo de la red de microtúbulos, donde se libera el ADN. Allí comienza la replicación del ADN viral, y ensamblaje de los nuevos viriones (Kajon et al., 2019).

Los adenovirus como vectores virales

Los adenovirus son excelentes vectores virales debido a su gran tropismo y sus altos niveles de expresión del transgén. Los primeros adenovirus utilizados como vectores fueron los hoy conocidos como adenovirus de primera generación. En estos adenovirus, se había deletado el gen E1 de su genoma, permitiendo ocupar ese espacio con el transgén de interés. La línea celular HEK293, fue modificada genéticamente incorporándose el gen E1, permitiendo ser utilizadas para la propagación del virus (Brunetti-Pierri & Ng, 2010).

Si bien los adenovirus de primera generación tienen varias aplicaciones, para su uso in vivo la expresión del transgén resultaba transitoria. Esto se debía a que aún en ausencia del gen E1, la expresión de los genes tempranos desencadenaba una respuesta inmune aguda y crónica; y se clonaban linfocitos T citotóxicos que respondían a la expresión génica viral y a al procesamiento de nuevas partículas virales.

Como consecuencia, para atenuar la respuesta inflamatoria frente al adenovirus, se desarrollaron los adenovirus de segunda generación. Estos combinan deletaciones de E1 y E3 con deletaciones en las regiones E2 o E4. La reducción en el número de genes virales disminuyó la expresión basal de proteínas virales y permitió insertar casetes de expresión de mayor tamaño (Capasso et al., 2014).

Adenovirus dependientes de virus auxiliar

Como respuesta a las limitaciones en la capacidad de los adenovirus de primera y segunda generación, surgieron los adenovirus dependientes de virus auxiliar (adenovirus HD, por las siglas en inglés de *helper dependent*). El genoma de estos adenovirus posee únicamente los elementos que actúan en cis. Esto es, la secuencia de empaquetamiento y las secuencias de repetición invertidas izquierda y derecha, sumando un total de apenas 600 pb. El remanente del genoma fue completado con ADN “de relleno”, reemplazable por construcciones de interés, permitiéndole a este sistema alcanzar una capacidad de clonado de hasta 37 kb (Parks & Graham, 1997).

Para el empaquetamiento del virus, el gen temprano 1 (E1) es provisto por las células HEK293, al igual que para los adenovirus de primera y segunda generación. El resto de los elementos necesarios son proporcionados en trans por un adenovirus auxiliar. Por este motivo, se desarrollaron distintas estrategias para favorecer el empaquetamiento del vector de interés. En este trabajo se utilizó el sistema Cre-loxP (L. Chen et al., 1996). Este consta de dos componentes, uno es la inclusión de dos sitios loxP flanqueando la secuencia del empaquetamiento del virus auxiliar. El otro, es la incorporación del gen de la

recombinasa en la línea HEK293, en adelante 293Cre. El sistema completo permite la utilización de los elementos provistos en trans por el virus auxiliar para empaquetarse en las cápsidas preformadas. Este evento se ve favorecido ya que se impide el empaquetado del auxiliar por escisión de su señal de empaquetamiento, mediado por recombinasa Cre. Así, se pueden obtener títulos altos del virus recombinante, mediante la coinfección iterativa del virus HD y el virus auxiliar (Parks & Graham, 1997).

El adenovirus HD-RAd-STEMCCA-GFP-tTA

Nuestro laboratorio posee gran experiencia en la construcción de vectores adenovirales con fines terapéuticos para la reversión de la neurodegeneración observada en el envejecimiento y en enfermedades neurodegenerativas (Brown et al., 2018; Coll et al., 2020; Lehmann, Canatelli-Mallat, et al., 2019).

En el contexto de la presente tesis, la generación de un adenovirus dependiente de auxiliar que poseyera los genes de pluripotencia OSKM abre nuevas posibilidades en el campo del rejuvenecimiento. Entre ellas, para la implementación de rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial no integrativa tanto ex vivo como in vivo, siendo en este último caso de gran relevancia para la aplicación de terapia génica regenerativa en ciertas regiones del cerebro, particularmente del hipocampo.

Así, en un esfuerzo que llevó más de cuatro años, la Lic. Marianne Lehmann logró construir un adenovirus dependiente de auxiliar HD-RAd-STEMCCA-GFP-Tet-Off, en adelante HD-OSKM.

El genoma viral porta el “*STEM CELL CASSETTE*” (o casete de células madre, STEMCCA) bajo en control del promotor bidireccional regulable CMVmin-TRE-CMVmin. El STEMCCA fue donado amablemente a nuestro grupo por el Dr. Motosvlasky de Boston University en EEUU, quien desarrolló la generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de la expresión de este cassette en MEF transducidos con lentivirus. El STEMCCA está compuesto por los cuatro genes OSKM y los mismos se encuentran bajo el control del promotor mínimo de citomegalovirus (CMV).

El STEMCCA es un sistema de expresión de multigenes (MGES), da lugar a un solo ARN mensajero policistrónico formado por dos fusiones de cistrones unidas por un Sitio de Entrada al Ribosoma (IRES). Dicho sitio es una secuencia reconocida por el complejo de pre-iniciación 43S permitiendo el inicio de la traducción independientemente de la presencia de la estructura CAP en el extremo 5' (Sommer et al., 2009).

Las fusiones corresponden a los genes Oct4 y Sox 2 unidos respectivamente a Klf4 y cMyc a través de sendas secuencias que codifican los péptidos de autoprosesamiento F2A y E2A. Cuando son traducidos, estos oligopéptidos producen un auto-clivaje en su secuencia de aminoácidos.

Para la construcción del genoma del HD-OSKM, en primera instancia se clonó el cassette STEMCCA en un plásmido dejándolo bajo el control de un promotor bidireccional regulable, que a su vez controla la expresión de la proteína verde fluorescente GFP. Dicho promotor posee dos promotores mínimos de citomegalovirus flanqueando a una región de respuesta a tetraciclina (PminCMV-TRE-PminCMV). En un sitio separado del mismo plásmido, se clonó un constructo que expresara de manera constitutiva la proteína reguladora tTA, brindándole a los genes OSKM un sistema de regulación Tet Off. Finalmente, se escindió el constructo GFP-STEMCCA junto con su sistema de regulación Tet Off, y se clonó en el plásmido de transporte para adenovirus dependiente de auxiliar pC4HSU HD (Lehmann, Canatelli-Mallat, et al., 2019). El pC4HSU HD consta de repeticiones terminales invertidas (ITR) para el virus Ad 5, la señal de empaquetado y parte de la región adenoviral E4 más un ADN no codificante de relleno de origen humano que mantiene un tamaño adecuado (28-31 Kbp) del ADN viral. Entre las dos ITR hay una secuencia bacteriana flanqueada por sitios PmeI, sitios de restricción utilizados para linealizar el plásmido a la hora de generar el genoma viral.

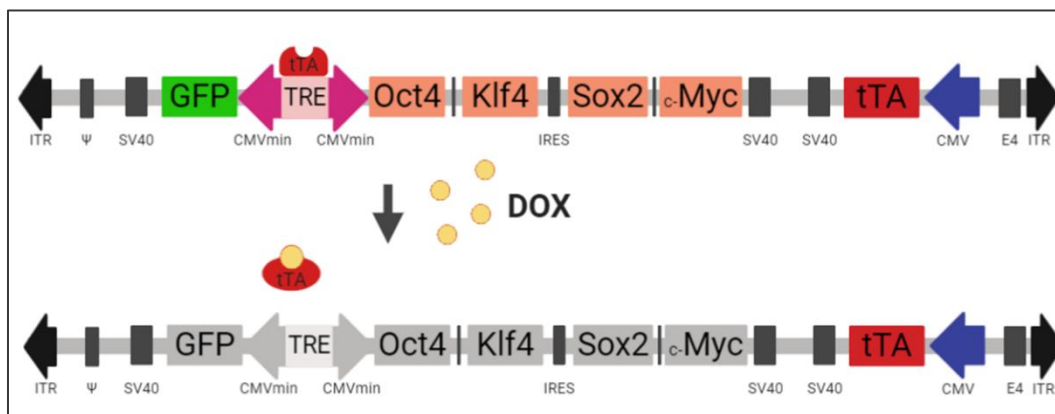


Figura 5 El genoma del adenovirus dependiente de auxiliar OSKM (HD-OSKM) y su regulación. El mismo posee los genes OSKM en tándem. Separando los genes Oct4 y Klf4 de Sox2 y cMyc se encuentra el sitio de entrada del ribosoma (IRES). Ambos pares de genes se encuentran separados por una secuencia de autoclivaje peptídico. Los OSKM se encuentran bajo regulación de un promotor bidireccional regulable por tetraciclina. Asimismo, este promotor controla la transcripción de la proteína GFP.

Hipótesis y objetivos

En la introducción, se ha descrito en detalle cómo la reprogramación celular parcial se posiciona como una estrategia promisoriosa para la reversión del envejecimiento a nivel celular y sistémico. Más específicamente, la sobreexpresión de los genes de pluripotencia OSKM se perfila como una terapia de gran potencial para regeneración del sistema nervioso senil, revirtiendo así la declinación funcional en las capacidades cognitivas.

El objetivo general de esta tesis es *desarrollar y evaluar un sistema adenovectorial adecuado que permita implementar rejuvenecimiento de fibroblastos de ratas viejas y de voluntarios humanos sanos de edad avanzada, así como implementar rejuvenecimiento in vivo en rata.*

Para ello, se propone la utilización de un adenovirus dependiente de auxiliar. Este adenovirus HD-OSKM fue el primer adenovector en ser descrito a nivel global para su utilización en terapias de rejuvenecimiento por reprogramación parcial y se desconocen sus capacidades para la misma.

En ese contexto, este trabajo de tesis se propone caracterizar a la expresión del adenovirus con el fin de estudiar su utilidad en los experimentos de rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial.

Posteriormente, se plantea evaluar el rejuvenecimiento provocado por la reprogramación parcial con el adenovirus HD-OSKM ex vivo en fibroblastos humanos y de rata, basándose en las características de expresión estudiadas en la caracterización.

En cuanto al rejuvenecimiento in vivo en hipocampo de rata y sus implicancias cognitivas, resultó de gran relevancia estudiar en primer lugar el envejecimiento epigenético acontecido en la metilación del DNA y los relojes epigenéticos, así como su relación con la pérdida de la memoria espacial en ratas hembra Sprague Dawley. Este es el primer estudio de variaciones epigenéticas asociadas a la edad en el hipocampo en *rattus norvegicus* y brindará un marco de referencia para investigaciones de envejecimiento epigenético y cognición, así como para el descubrimiento de marcas epigenéticas blanco para intervenciones terapéuticas.

Por último, la rata es un modelo inexplorado en el estudio de la terapia génica regenerativa con los genes OSKM. Así, en este trabajo se plantea analizar el rejuvenecimiento por terapia génica con el adenovirus HD-OSKM en el hipocampo de ratas seniles Sprague Dawley hembras, con el fin de lograr la reversión del deterioro cognitivo de las mismas.

En base a lo descrito anteriormente, surgen en este trabajo las siguientes hipótesis principales:

1. La reprogramación celular parcial mediante sobreexpresión de los genes OSKM en fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley y humano utilizando el adenovirus HD-OSKM como vector viral rejuvenece el fenotipo celular envejecido.
2. La memoria espacial de las ratas hembra Sprague Dawley responde a los cambios relacionados a la edad de la metilación del ADN y a la edad epigenética de los animales.
3. La terapia génica con OSKM mediante transducción del adenovirus HD-OSKM en el giro dentado de la rata hembra envejecida revierte el detrimento observado en la memoria espacial y aprendizaje de los animales.

De las hipótesis presentadas, se plantearon los objetivos mencionados a continuación:

1. Caracterizar el adenovirus HD-Ad OSKM para corroborar y optimizar su utilidad como herramienta biotecnológica en los experimentos de rejuvenecimiento *ex vivo* e *in vivo*.
2. Rejuvenecer fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley y de pacientes humanos de edad avanzada por sobreexpresión de los genes OSKM utilizando el adenovirus HD-OSKM.
3. Caracterizar los cambios en la metilación del ADN relacionados con la edad y en la edad epigenética del hipocampo para evaluar sus implicancias la memoria espacial de la rata hembra Sprague Dawley.
4. Estudiar los cambios en la memoria espacial y el aprendizaje de la rata Sprague Dawley hembra envejecida sometida a terapia génica con el adenovirus HD-OSKM.

Capítulo 1

Objetivos

Caracterizar el adenovirus HD-Ad OSKM para corroborar y optimizar su utilidad como herramienta biotecnológica en los experimentos de rejuvenecimiento *ex vivo* e *in vivo*.

- Propagar y purificar el HD-Ad OSKM.
- Corroborar la expresión de sus transgenes en fibroblastos humanos y de rata por inmunofluorescencia y western blot.
- Caracterizar los cambios en la expresión asociados a los marcadores de identidad y de pluripotencia de las células transducidas por inmunofluorescencia.
- Caracterizar la expresión de los transgenes en fibroblastos humanos en el transcurso del tiempo por retrotranscripción y PCR en tiempo real.
- Generar células madre pluripotentes inducidas a partir de la desdiferenciación de fibroblastos humanos utilizando el adenovirus HD-Ad OSKM.

Materiales y métodos

Plásmido del genoma HD-OSKM: pC4HSU-STEMCCA-tTA

El genoma del adenovector fue construido en nuestro laboratorio previo a este trabajo, utilizando un kit comercial (Microbix Inc., Ontario, Canadá) que proporciona el plásmido de transporte pC4HSU. Como punto de partida, se utilizó un derivado del plásmido pLPBL-1, obsequiado por el Dr. KCL Oka. En él se clonó una construcción bidireccional Tet-Off regulable en la que ya se había insertado el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) en uno de los dos sitios de clonado múltiple, flanqueando al promotor bidireccional PminCMV-TRE-PminCMV. En un sitio separado del plásmido, se clonó un constructo que expresaba constitutivamente la proteína reguladora tTA. El plásmido así diseñado se denominó pLPBL-BD-tTA-GFP.

En el segundo MCS, se clonó el tándem bicistrónico Oct4-f2A-Klf4-ires-Sox2-p2A-cMyc del cassette STEMCCA, tomado del plásmido pHAGE2-hSTEMCCA-loxP, cedido generosamente por el Dr. G. Mostoslavsky. La construcción así generada se denominó pLPBL-TRE-STEMCCA-tTA.

Por último, se escindió la construcción completa del pLPBL-TRE-STEMCCA-tTA y se clonó en el pC4HSU dando lugar a pC4HSU-STEMCCA-tTA.

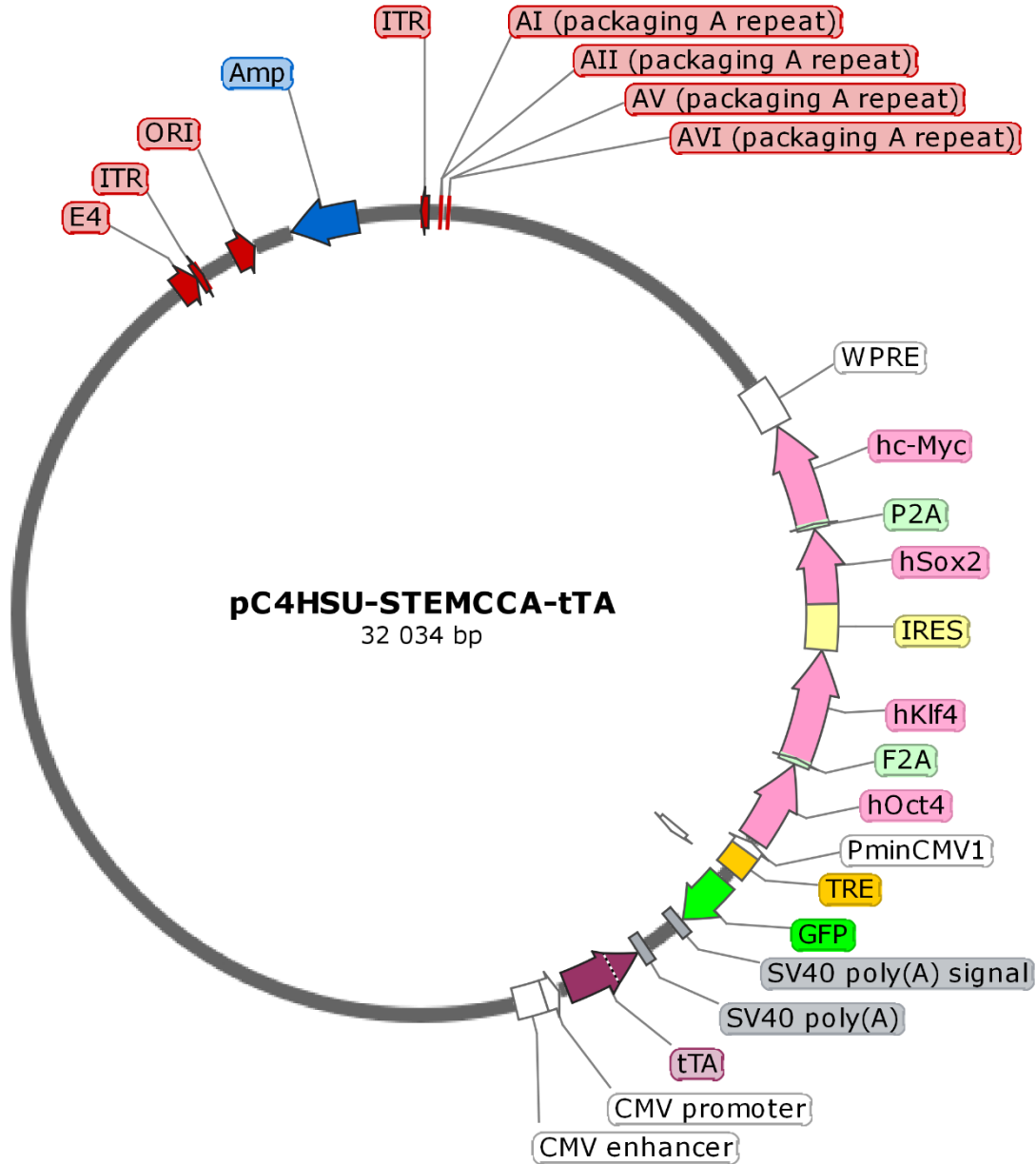


Figura 6 Mapa del plásmido pC4HSU STEMCCA- tTA. El mismo contiene los genes OSKM en tándem, bajo el promotor bidireccional TRE. Los genes Oct4 y Klf4 están separados de Sox2 y cMyc por una secuencia IRES. Además, separando los genes del primer y del segundo par se encuentran dos secuencias de autoclivaje, F2A y P2A, respectivamente. El promotor bidireccional regula también la transcripción de la GFP. Además, el plásmido posee el cassette de regulación de la proteína tTA, que reprime la transcripción de los genes controlados por el promotor bidireccional por unión de doxiciclina. El plásmido también contiene las secuencias ITR y la señal de empaquetamiento necesarias para la generación del adenovirus dependiente de auxiliar HD-OSKM.

Preparación del material plasmídico pC4HSU-STEMCCA-tTA

Preparación de bacterias químicamente competentes

A partir de un cultivo de bacterias *E. coli* DH5 α , se realizó un aislamiento en agar- Luria Bertani (LB) con ampicilina y se incubó 16 h a 37 °C. Se repicó una de las colonias aisladas en 50 ml de medio LB con ampicilina y se incubó 16 h a 160 rpm en un agitador termostatzado a 37 °C. Se inocularon 5 ml del cultivo en 100 ml de LB con ampicilina. Se incubó a 37 °C y 160 rpm durante 2-2,5 h, hasta obtener una DO600 \approx 0,5. Se mantuvo 5-10 min a 4°C y luego se centrifugó a 2000 \times g a 4 °C durante 15 min en tubos de 50 ml. Manteniendo los tubos en hielo, se descartó el sobrenadante y se agregaron 30 ml de Buffer de transformación 1 (TFB1) por cada 100 ml de cultivo. Previa resuspensión del pellet por agitación en vórtex, se incubó 90 min en hielo. Luego se centrifugó 15 min a 2100 \times g y 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el sedimento se resuspendió en 4 ml de Buffer de transformación 2 (TBF2) por cada 100 ml de cultivo. Por último, se realizan alícuotas de 200 μ l y se conservan a -80°C.

TFB1: RbCl 100 mM, MnCl₂·4H₂O 50 mM, KAc 30 mM, CaCl₂·2H₂O 10 mM, Glicerol 15%, pH=5,8.

TBF2: MOPS 10 mM, RbCl 10 mM, CaCl₂·2H₂O 75 mM, Glicerol 1,62 M, pH=8.

Medio LB: Extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %, Peptona 1 %.

Medio agar-LB: Extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %, Peptona 1 %, Agar 1,5%, pH=7,2.

Transformación por shock térmico

De una dilución de DNA plasmídico de 7.695 ng/ μ l, se tomaron 10 μ l y se añadieron a 100 μ l de bacterias DH5 α por inversión y posterior agitación en vórtex. Luego se conservó 30 min en hielo a 4°C. Se procedió al shock térmico por 1 min a 42°C seguido de 2 min en hielo. Inmediatamente después, se agregaron 400 μ l de medio Caldo Super Óptimo (SOC). Se incubó en estufa 1 h a 37°C, realizando inversiones cada 10-15 min o con agitación suave a 60 rpm. Se centrifugó 2 min a velocidad baja. Se descartó el sobrenadante. El pellet bacteriano se resuspendió en el volumen remanente, y se sembró en placas de agar-LB con ampicilina (Concentración final: 2,81·10⁻⁵ mM). Las placas se incuban a 37 °C durante 16-18 h.

Medio SOC: Triptona 2 %, Extracto de levadura 0,5 %, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, Glucosa 20 mM.

Preparación de material plasmídico

Se realizó utilizando el kit comercial de aislamiento de plásmido de alta pureza Roche. Brevemente, se centrifugaron 4 ml de un cultivo de bacterias con el plásmido de interés, 30 s a 6000 \times g y se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 250 μ l de Buffer de

suspensión/RNAsa. Luego se añadieron 250 µl de Buffer de lisis y se mezcló por inversión 6 veces. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 350 µl de Buffer de unión enfriado y se mezcló por inversión 8 veces. Previa incubación de 5 min en hielo, se centrifugó 10 min a 14000 x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo con filtro "High Pure" y se centrifugó 30-60 s a 14000 x g. Se descartó el sobrenadante y se añadió 500 µl de Buffer de lavado 1. Se centrifugó 1 min a 14000 x g y se descartó el sobrenadante. Luego se añadieron 700 µl de Buffer de lavado 2 y se centrifugó 1 min a 14000 x g, y 1 min adicional después de descartar el sobrenadante. Se añadieron 100 µl de Buffer de Elución y se dejó 5 min a 60 °C. Por último, se centrifugó 1 min a 14000 x g para eluir el plásmido purificado.

Precipitación de ácidos nucleicos

Los productos de la preparación de material plasmídico se trataron con 2.5 veces de etanol 96° y 10 % NaAc 3 M. Se conservaron 17 h a -20 °C y luego se centrifugaron a 13000 rpm 25 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se agregó etanol 70 % frío en igual volumen que se agregó de etanol 96° en el paso previo. Se centrifugó a 13000 rpm 5 min, se descartó el etanol y se repitió dos veces más. Luego, para evaporar cualquier remanente de alcohol, se colocó el tubo cerca de un mechero. Finalmente, se resuspendió el ADN en 15 µl de agua a 60°C y enfriándolo hasta 25 °C.

Electroforesis en gel de agarosa

La separación de moléculas de DNA se llevó a cabo en gel de agarosa de 0,6 %. La preparación de los geles se inició en un Erlenmeyer en el cual se añadió la cantidad correspondiente de agarosa en 35 ml de Buffer TBE 1 X. La mezcla se calentó en un horno de microondas hasta la disolución completa de la agarosa. Se dejó reposar hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se agregó colorante de DNA SYBR Safe en concentración final 1X. El líquido se volcó en el molde de ocho calles deseado. Protegiéndolo de la luz, se dejó solidificar. Luego, se colocó el gel en la cuba de electroforesis (HE 33 Mini Submarine Unit, GE Healthcare) y se cubrió con Buffer TBE 1X.

Previo a la electroforesis, las muestras se prepararon en Buffer de Siembra concentración final 1X y se cargaron en las respectivas calles. También se sembró en paralelo el patrón de peso molecular. La corrida se realizó en frío y oscuridad a 90-110 V. El revelado del gel se realizó en un transiluminador (UltraBright LED transilluminator, LB-16, MaestroGen).

Buffer TBE 5X: Tris-Base 0,44 M, Ac. Bórico 0,44 M, EDTA-Na₂·2H₂O 0,01 mM.

Buffer de Siembra 6X: Azul de bromofenol 0,25%, Xileno cianol 0,25%, Glicerol 30%.

Patrón utilizado: 1 kb Extension DNA Ladder

Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones de digestión con enzimas de restricción consistieron en una mezcla de reacción que incluye agua libre de nucleasas, el buffer de reacción óptimo para cada enzima utilizada, la cantidad correspondiente de ADN plasmídico y unidades de la enzima de restricción. La mezcla de reacción se incubó durante 1-2 h a la temperatura óptima de la enzima de restricción utilizada en caso de ser una enzima de digestión rápida o 12-16 h en caso de no serlo. Finalizada la incubación se verificó la digestión por electroforesis en gel de agarosa.

Generación del virus HD-OSKM

Células HEK 293 Cre

Las células HEK 293 Cre fueron mantenidas en cultivo con medio DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), y 100 unidades/ml de penicilina y estreptomicina (pen/strep) a 37 °C y en una atmósfera de 5% CO₂. Para asegurar niveles adecuados de expresión de la recombinasa Cre, el medio de cultivo se suplementó con 0.4 mg/ml Geneticin (G418) cada 10 pasajes celulares.

Virus auxiliar H14

Como virus auxiliar se utilizó el virus H14, provisto por Microbix y amplificado en nuestro laboratorio, con un título de $2,75 \times 10^{10}$ ufp/ml. El H14 es un adenovirus de primera generación, con el gen E1 deletado, y su señal de empaquetamiento flanqueada por sitios loxP. Para evitar la formación de adenovirus competentes para la replicación, posee una secuencia de relleno en la región E3 para hacer que los recombinantes E1+ sean demasiado grandes para ser empaquetados.

Transfección del genoma viral

Se utilizó una botella de 25 cm² con células 293Cre, al 70 - 90% de confluencia. Dos horas previo a la transfección, se retiró el volumen total de medio y las células se lavaron una vez con PBS. Se agregaron 3 ml de medio DMEM sin pen/strep ni ciprofloxacina ni SFB, ya que algunas de sus proteínas interfieren la formación del complejo.

La dilución de lipofectamina y DNA en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) se prepararon de manera que la relación DNA: lipofectamina fuera de 1:2. Se utilizaron 13.5 µg de ADN en 500 µl finales de DMEM y 33.75 µl de lipofectamina en 500 µl de DMEM. Luego de 5 min, se mezclaron de ambas soluciones. Esta mezcla se incubó 20 min a 25 °C y se adicionó por goteo a la botella. Luego se dejó en estufa de cultivo 4 h a 37 °C. Pasado ese tiempo se descartó el medio anterior y se agregaron 6 ml de DMEM 10 % SFB. Al día siguiente se procedió a la infección con 1.22 µl de virus H14.

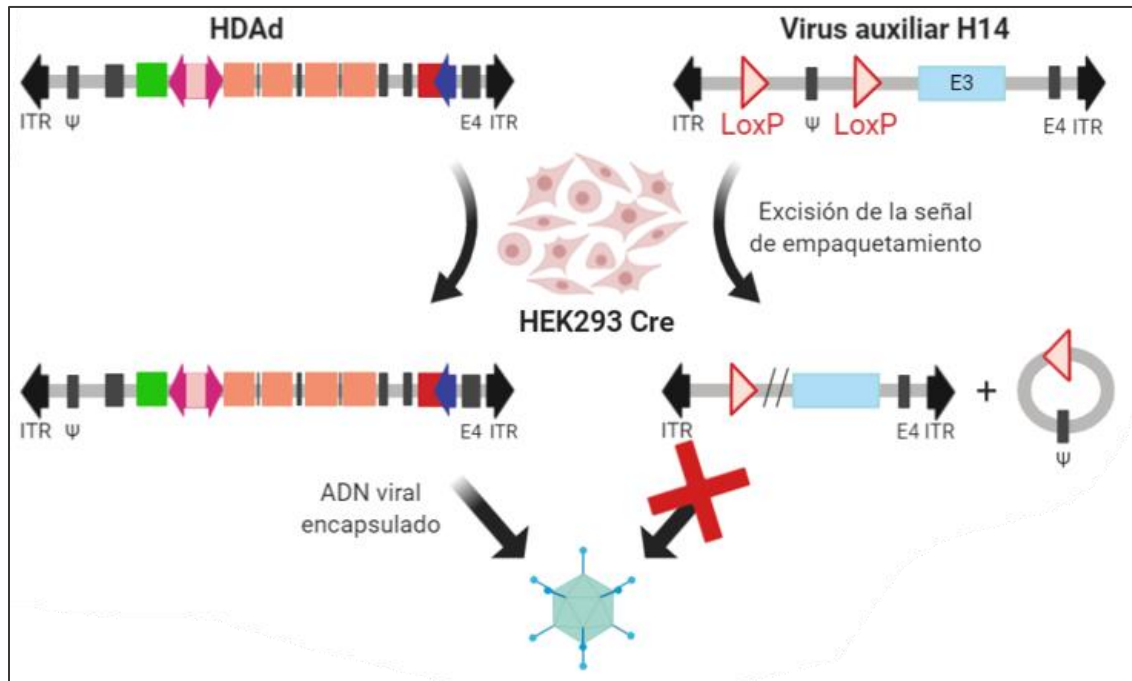


Figura 7 Esquema de la generación del adenovirus dependiente de auxiliar OSKM. Células HEK293 son transfectadas con el plásmido genómico de interés y transducidas con el virus auxiliar H14. El virus H14 provee en trans todos los elementos necesarios para la encapsulación del virus de interés. El genoma del virus auxiliar, al poseer la secuencia de empaquetamiento flanqueada por sitios LoxP, es escindido por la recombinasa Cre presente en la línea celular utilizada. De esta manera, se impide su empaquetamiento, favoreciendo así la generación del adenovirus HD-OSKM.

Propagación del vector viral HD-OSKM

Para la amplificación se utilizó el virus HD-OSKM de la generación y propagación original. Se coinfectaron células HEK 293 Cre al 70-80% de confluencia cultivadas en una botella de 175 cm² con 5 µl de una alícuota de la generación inicial almacenada en N₂ líquido y 1,2 µl de virus auxiliar H14. Para favorecer el ingreso de los virus a las células, la infección se realizó en 11 ml de DMEM sin pen/strep. Al cabo de 3 h, se reemplazó con 18 ml de medio completo.

A los 3 días post coinfección, el efecto citopático fue evidente, por lo que se cosecharon las células utilizando un rastrillo para células adherentes. La suspensión celular fue sometida a tres ciclos de congelado -80 °C y subsecuente descongelado a 37 °C para favorecer la lisis celular. El lisado fue centrifugado a 1000 rpm 9 min para separar los restos celulares del sobrenadante, donde se encuentran las partículas virales. La suspensión viral fue almacenada a -80 °C.

Células HEK293 Cre cultivadas al 70-80% de confluencia en 4 botellas de 175 cm², fueron coinfectadas con la suspensión viral y 1,22 µl de virus H14. Se prosiguió como se describió anteriormente, utilizando la suspensión viral obtenida para infectar células de 48 botellas de 175 cm², en cuatro tandas de 12 botellas. Las células fueron cosechadas a las 40 h post coinfección, en presencia de efecto citopático, pero aún adheridas a la superficie. Esto se

realizó primero dando un golpe seco para despegar la mayoría de las células y luego suavemente con rastrillo, de manera de evitar lisarlas. La suspensión celular se transvasó a dos tubos de 50 ml, donde fueron centrifugadas a 1000 rpm 7 min. Los sedimentos celulares fueron almacenados a -80 °C hasta completar las cuatro tandas, momento en el que se unificaron en un solo tubo. Luego se sometió a tres ciclos de congelado a -80 °C y descongelado a 37 °C.

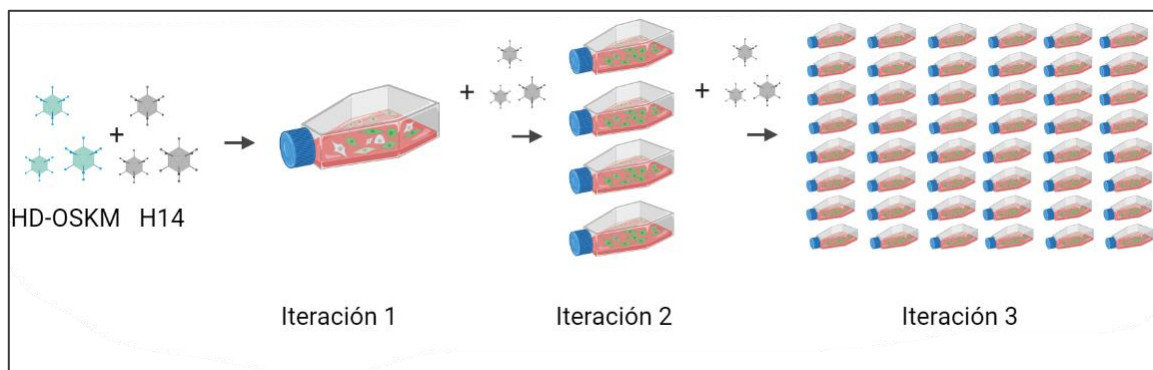


Figura 8 Propagación del adenovirus HD-OSKM. Se co-transducen células HEK293 Cre con el purificado original de HD-OSKM y virus auxiliar H14. Al momento de observar efecto citopático, se procede a recolectar las células e infectar con su lisado cuatro botellas, adicionando virus auxiliar. El proceso se repite en una tercera iteración, infectando, con el lisado de la iteración anterior, 48 botellas. Finalmente, las células se recolectan para su posterior purificación.

Purificación del vector viral HD-OSKM

Preparación del lisado celular

Luego de lisar las células de la propagación, se procedió a centrifugarlas a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido, denominado lisado crudo, se colectó en un tubo Falcon estéril de 15 mL y se reservó en hielo. Se obtuvieron 10 ml. El sedimento remanente de dicha centrifugación se resuspendió en 2 ml de DMEM y se repitió el proceso de centrifugado a fin de rescatar más partículas virales. Para evitar la dilución del lisado crudo original, el sobrenadante así obtenido se manipuló como una alícuota separada.

Ultracentrifugación en gradiente de CsCl

En esterilidad se llenaron 6 tubos de polipropileno de ultracentrífuga muy lentamente formando capas de CsCl de distintas densidades. Para ello se agregó 0, 2 ml de CsCl densidad de 1,5 g/ml, 1,1 ml de CsCl densidad de 1,35 g/ml y 1,1 ml de CsCl densidad 1,25g/ml. Previo al agregado del volumen correspondiente al CsCl densidad 1,1 g/mL, se realizó una marca en la pared del tubo para facilitar la posterior identificación de la banda viral de interés. Luego se adicionaron 2 ml del lisado viral crudo en cada tubo.

Se procedió a la centrifugación a 45000 rpm 1 h a 4 °C. Se recolectaron las bandas de virus obtenidas, siendo un total de 1,6 ml. Esto fue purificado por ultracentrifugación en gradiente isopícnico de densidad 1.35 g/mL de solución de CsCl. Para ello se llenaron 2 tubos de polipropileno con 3,3 mL de solución, y se completó el volumen con 0,8 mL de virus. Se

realizó la segunda ultracentrifugación a 45.000 rpm a 4 °C. En cada tubo se obtuvo una banda bien definida a la altura correspondiente y otra banda más fina sobre la superficie, correspondiente a cápsidas virales vacías. Las bandas de interés fueron recolectadas en un tubo de 1 mL.

Diálisis

Se utilizó una membrana de diálisis de 13000kDa. Para su acondicionamiento, el día previo se colocó en 200 mL de Bicarbonato de Sodio al 2% y 400 µl de EDTA 0.5 M, pH=8. Se llevó a ebullición durante 10 minutos. Luego se hirvió otros 10 minutos en 200 ml de una solución con 400 µl de EDTA 0.5 M, pH 8. Finalmente se lavó varias veces con agua destilada estéril.

Se colocó el virus purificado en el interior de la membrana. Ésta última fue sumergida en 1 L buffer de diálisis (Tris-HCl 10mM, NaCl 135 mM, MgCl₂ 1 mM, pH=7.5). Se dializó 1 h con agitación leve a 4 °C, luego se renovó el buffer y se prosiguió con la diálisis 5 h.

Una vez finalizada la diálisis, el contenido de la membrana se recolectó en un tubo de 1 mL mantenido en hielo. Al virus purificado, se le agregó glicerol a una concentración final de 10%. El volumen total se dividió en alícuotas de 5 µL, 10 µL y 20 µL y se almacenaron a -80 °C.

Titulación del adenovirus

Se procedió a titular por diluciones seriadas en células HEK293. Para la preparación de las diluciones, se tomó 1 µl de virus puro y se diluyó en 9 µl de DMEM sin SFB, (dilución 10⁻¹). Se mezcló en vórtex y se tomó 1 µl de esa dilución para llevar nuevamente a 9 µl de DMEM sin SFB (dilución 10⁻²). Así sucesivamente hasta llegar a la dilución 10⁻¹⁵.

El día previo a la infección, en una placa de 24 pocillos se sembraron células HEK293 para que alcanzaran un 80% de confluencia. Se infectó por duplicado con 2 µl de la dilución correspondiente en 250 µl finales de DMEM sin pen/strep ni SFB. A dos pocillos se les agregaron 250 µl de medio a modo de control negativo. Al cabo de tres horas, se reemplazó el medio por 500 µl de DMEM pen/strep 10% SFB. Parte de este lote de virus se envió a la universidad de Stanford a fin de ser utilizados por la tesista en los experimentos con fibroblastos humanos que se describen a continuación.

Verificación de expresión de los genes OSKM en fibroblastos humanos y de rata.

Aislamiento y cultivo de fibroblastos humanos

El aislamiento se realizó por el Instituto Coriell en pacientes sanos en el Hospital de Stanford, de acuerdo con los métodos y protocolos aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Stanford, se realizó una biopsia de la piel del aspecto mesial de la parte media superior del brazo tomando 2 mm de tejido de pacientes masculinos y femeninos de 87 a 92 años (n=3). Las células se cultivaron a partir de estos

explantes y se mantuvieron en medio esencial DMEM SFB 10 % y pen/strep al 1 %. El cultivo se realizó a 37 °C con una atmósfera 5 % de CO₂.

Fibroblastos de pacientes jóvenes	Donor 1	Donor 2	Donor 3
ID	GM00498	GM05381	GM05400
Edad	3	5	6
Sexo	M	M	M
Tipo de tejido	Piel	Piel	Piel
Fuente	No disponible	Área umbilical	Área inguinal
Repositorio	NIGMS Human Genetic Cell Repository		
Subcolección	Apparently Healthy Collection		

Tabla 1 Datos de los fibroblastos humanos donantes jóvenes.

Fibroblastos de pacientes ancianos	Donor 1	Donor 2	Donor 3
ID	AG05247	AG07725	AG09602
Edad	87	91	92
Sexo	F	M	F
Tipo de tejido	Piel	Piel	Piel
Fuente	Brazo	Brazo	Brazo
Repositorio	NIA Aging Cell Culture Repository		
Subcolección	Gerontology Research Center (GRC), Cell culture collection. Baltimore longitudinal study on aging (BLSA)		

Tabla 2 Datos de los fibroblastos humanos de donantes ancianos.

Cosechamiento de fibroblastos humanos

Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo en placas de 10 cm, en DMEM 15% SFB sin pen/strep. Previo a alcanzar 100% de confluencia, se procedió a cosechar las células. Para ello se lavaron una vez con 2 ml de PBS y se agregaron 3 ml de tripsina 0.25% + EDTA. Se incubaron a 37 °C 5 min para dejar actuar la tripsina. Una vez despegadas las células, se detuvo la reacción con 9 ml de DMEM 15 % SFB sin pen/strep. La suspensión celular se sembró 1 en 3.

Congelamiento de fibroblastos humanos

Los fibroblastos se cultivaron en placas de 10 ml. Se realizaron dos lavados con 2 ml de PBS. Se descartó el PBS y se agregaron 3 ml de tripsina 0,25%. Las células se incubaron 5 min a 37°C hasta total desadherencia de las mismas. Se detuvo la reacción con 9 ml de DMEM 15% SFB. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm 5 min. Se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 2 ml de Bambanker.

Se realizó el recuento celular tomando una alícuota de 10 μ l, la cual se mezcló con 10 μ l de Azul de Tripán. 10 μ l se sembraron entre los vidrios en un portaobjetos de cámara Countess. Se procedió a obtener la viabilidad y el recuento celular en el equipo Countess Automated Cell Counter 3. Se diluyeron a 500000 células/ml en Bambanker y se congelaron a -80 °C.

Transducción de fibroblastos humanos

El protocolo de transducción de fibroblastos varió en los volúmenes utilizados según la placa de cultivo correspondiente. En el caso de fibroblastos sembrados en placa de 6 pocillos, cuando las células estuvieron a un 80 % de confluencia, se las infectó con 5 μ l de virus HD HD-OSKM en 1 ml de DMEM sin SFB ni pen/strep. Al cabo de 3 h, se agregó 1 ml de DMEM SFB 10% con pen/strep.

Para placas de 24 wells se utilizaron diferentes volúmenes de virus purificado (0,5-3 μ l) en 250 μ l de DMEM sin SFB ni pen/strep.

Western blot

Se cosecharon las células utilizando un rastrillo de cultivo celular y con 100 μ l de buffer de lisis RIPA suplementado con inhibidor de proteasas PIC. Para cosechar las células remanentes, se lavó el pocillo con 100 μ l más de buffer. Una vez obtenida la suspensión celular, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min y a 4 °C.

Se midió la concentración de las proteínas utilizando el equipo Qubit.

Para la corrida electroforética se utilizó el gel de 15 pocillos prefabricado Bis -Tris NuPAGE 4-12 % Invitrogen. Primeramente, se lavó el gel con agua destilada y luego con buffer MOPS SDS. Luego, se colocó el gel en la celda XCell SureLock™ Mini-Cell, sostenidos firmemente por la cuña de la cámara. Se utilizó un soporte plástico en la posición del segundo gel como reemplazo de este. Se llenó la cámara superior con buffer de corrida MOPS SDS hasta cubrir las calles del gel.

Para la preparación de las muestras, se utilizaron 25 μ g de proteína en 20 μ l de buffer LDS, conteniendo 4 μ l de Blue y antioxidante DTT 1X. Se mantuvieron a 75°C 10 min a 350 rpm. Como patrón de peso molecular se utilizó Page Ruler Marker.

Las muestras se sembraron y la electroforesis se realizó a voltaje constante de 150 V durante 50 min.

Para la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se embebió en 50 ml de buffer de transferencia Nupage 1X con metanol 10%. Las almohadillas de goma espuma se sumergieron en 700 μ l del mismo buffer hasta su saturación, y se comprimieron de manera de asegurar la eliminación de las burbujas de aire. Los papeles de filtro se embebieron rápidamente también en el mismo buffer.

En hielo, en un recipiente se ubicaron desde su base tres almohadillas, 3 papeles de filtro, el gel, la membrana de nitrocelulosa, 3 papeles de filtro y por último tres almohadillas. Luego con ayuda de un elemento cilíndrico se eliminaron los restos de aire. Finalmente se colocó el conjunto en la cuba electroforética, con el lado que poseía la membrana de nitrocelulosa hacia el ánodo del equipo.

La transferencia se realizó a 30 V durante 3 h. Al finalizarla, la membrana de nitrocelulosa se lavó con TBS-T. Luego, se sumergió en tinción de Ponceau por 15 minutos y se realizó un lavado en TBS-T para eliminar la coloración del fondo. Se cortaron los fragmentos de interés y se lavó la membrana con agua corriente.

Para el bloqueo, se sumergieron los fragmentos en TBST con 10% de leche, durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación.

Se incubaron los fragmentos con las diluciones respectivas de los anticuerpos en TBS-T 5% de leche en cámara fría a 4 °C en agitación. Se realizó un lavado rápido y luego 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T.

Se procedió a la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a HRP, en TBS-T por 1 hora a temperatura ambiente. Se realizó un lavado rápido y luego 3 lavados de 5 min cada uno con TBS-T.

Para el revelado de la muestra se utilizó el método de quimioluminiscencia aumentada. Para ello, se mezclaron en volúmenes iguales los reactivos luminol y su potenciador, ambos componentes del kit ECL Western Blotting Substrates. El líquido se goteó directamente sobre la membrana y se reveló utilizando el equipo ChemiDoc xrs+.

Anticuerpo	Huésped	Distribuidor	Características	Dilución
Oct4	Conejo	Cell Signalling Cat. #C30A3C1	Primario	1/500
Sox2	Cabra	R&D Systems Cat. #AF2018	Primario	1/1000
Klf4	Cabra	R&D Systems Cat. #AF3640	Primario	1/1000
cMyc	Cabra	R&D Systems Cat. #AF3696	Primario	1/1000
α -actinina	Conejo	ThermoFisher Scientific Cat. # PA5-17308	Primario	1/1000
Cabra Anti-conejo IgG H&L	Cabra	Abcam Cat. #ab205718	Secundario HRP	1/5000
Burro Anti-cabra IgG H&L	Cabra	Abcam Cat. #ab205723	Secundario HRP	1/5000

Tabla 3 Anticuerpos utilizados en el western blot.

Extracción de ARN

Los fibroblastos se sembraron en placas de 6 pocillos. El día correspondiente, se lavaron con PBS y se trataron con 1 ml de tripsina 0,25%. La reacción se detuvo con 3 ml de DMEM 15% SFB y las células fueron recolectadas en un tubo de 15 mL. El pocillo vacío se lavó con 500 μ l más de DMEM 15% SFB para recolectar las células remanentes. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min, y el sedimento celular se resuspendió en 500 μ l de PBS con el fin de poder trasvasarlo a un tubo de 1,5 ml.

Se procedió a una segunda centrifugación a 1000 rpm durante 5 min. Se utilizó el kit comercial Direct-zol RNA Miniprep. Brevemente, se descartó el sobrenadante y se agregó 300 μ l de TriReagent. Se dejó actuar durante 5 min. Luego se agregó igual volumen de etanol 96°, se mezcló varias veces con tip. La mezcla se transfirió a una columna de extracción y se centrifugó a 11000 rcf durante 30 s. Se agregó 400 μ l del buffer de lavado y se centrifugó a 11000 rcf 30 s. Sobre la matriz de la columna, se añadieron 5 μ l de DNase I (6 U/ μ l) en 75 μ l de Buffer de Digestión de DNasa. Se incubó a 25 °C por 15 min. Luego se añadieron 400 μ l de buffer de pre-lavado de ARN Direct-Zol, se centrifugó a 11000 rcf 30 s, y se descartó el líquido del tubo colector. Se añadieron 700 μ l de buffer de lavado y se centrifugó a 11000 rcf 2 min. Se transfirió la columna a un tubo de 1,5 ml. Por último, se eluyó el RNA en 20 μ l de agua libre de DNasas y RNasas, por centrifugación a 11000 rcf durante 30 s. La concentración de ARN obtenida se midió en Nanodrop.

Retrotranscripción

La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando la mezcla de reacción comercial 5X PrimeScript RT Master Mix. Este producto es un kit de reactivos de transcripción inversa diseñado para realizar una transcripción inversa optimizada para RT-PCR en tiempo real de 2 pasos (RT-qPCR). La misma contiene todos los componentes necesarios para la retrotranscripción, es decir, retrotranscriptasa, inhibidor de RNasa, mezcla de dNTPs y buffer. En cuanto a los cebadores, contiene oligosdT que se hibridan a las colas polyA de los ARN mensajeros y cebadores random 6 mers.

Para la retrotranscripción, se utilizaron 500 ng de ARN, y 2 μ l de la mezcla de reacción 5X, llevándolos a un volumen final de 10 μ l. Luego en termociclador, se sometió a la mezcla a 37 °C durante 15 min para la retrotranscripción, 85 °C 5 s para inactivar las enzimas y luego se llevó a 4 °C. El cDNA se diluyó a 2 ng/ μ l y se almacenó a -80 °C.

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

Para la qPCR se utilizó la premezcla de reacción PowerUp™ SYBR® Green Master Mix, la cual contiene en 2X SYBR green, DNA polimerasa, Uracil DNA glicosilasa termolábil, la sonda pasiva ROX, dNTPs conteniendo dUTP/dTTP, y buffer.

La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10 µl por muestra, donde se agregaron 10 ng de cDNA, 5 µl de Master Mix, 0,5 µl de cada cebador en concentraciones 10 uM y se completó el volumen con agua libre de DNAsas y ARNAsas.

Las muestras se cargaron en una placa de reacción óptica de 384 pocillos MicroAmp™ con código de barras y se realizó la amplificación en el equipo de PCR en tiempo real Applied Biosystems™ QuantStudio™ 5.

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes:

- Etapa de preparación: 50 °C, 2 min; 95 °C, 2 min.
- Etapa de amplificación: 40 ciclos de: 95 °C 1 s (con un ascenso de la temperatura en 2 °C/s); 60 °C 30 s.
- Etapa de la curva de melting: 95 °C 1 s; 60 °C 20 s; 95 °C 1 s.

Cebador	Secuencia
cds_OCT4_FW	GCAGCCTCAAATCCTCTCG
cds_OCT4_RV	GGTCCGAGTGTGGTTCTGTA
cds_SOX2_FW	TGGACAGTTACGCGCACAT
cds_SOX2_RV	CGAGTAGGACATGCTGTAGGT
cds_KLF4_FW	CCCAATTCCCATCCTTCCT
cds_KLF4_RV	ACGATCGTCTTCCCCTCTTT
cds_cMYC_FW	AGCGACTCTGAGGAGGAACA
cds_cMYC_RV	CTCTGACCTTTTGCCAGGAG
end_OCT4_FW	CACCTTCCCTCCAACCAGTT
end_OCT4_RV	ATTCAAACTGAGGTGCCTGC
end_SOX2_FW	AACTGCCCCTCTCACACAT
end_SOX2_RV	CCCATTTCCCTCGTTTTTCT
end_KLF4_FW	CCTCGCCTTACACATGAAGAG
end_KLF4_RV	CATCGGGAAGACAGTGTGAA
end_cMYC_FW	CGGAACTCTTGTGCGTAAGG
end_cMYC_RV	GGTTGTGAGGTTGCATTTGA
nanog_FW	ACCTTCCAATGTGGAGCAAC
nanog_RV	TGCACCAGGTCTGAGTGTTT
vimentin_FW	CAGGACTCGGTGGACTTCTC
vimentin_RV	GTCGATGTAGTTGGCGAAGC
PDGB_FW	GGAGCCATGTCTGGTAACGG
PDGB_RV	CCACGCGAATCACTCTCATCT

Tabla 4 Lista de cebadores utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.

Análisis estadístico de resultados de la qPCR

Los datos se exportaron a QuantumStudio Design and Analysis software. A través del método de evaluación visual, se comprobó que las curvas poseyeran una eficiencia geométrica constante, es decir, todas las pendientes geométricas eran paralelas dentro del ensayo. Esto permite hacer comparaciones entre los distintos pares de cebadores ya que tienen eficiencias similares. Los valores del umbral del ciclo (Ct) se ajustaron automáticamente mediante el software y se normalizaron a ROX como referencia interna. Los datos de expresión génica fueron normalizados al gen de referencia PDGB. Las réplicas técnicas se promediaron y se mostraron como cambio de veces de gen de interés/PDGB \pm error estándar de la media (SEM).

La diferencia en la expresión de los factores de pluripotencia endógenos en el tiempo se estudió mediante el análisis estadístico no paramétrico de Kruskal Wallis.

Citometría de flujo

Las células en placa de 6 pocillos se cosecharon con tripsina 0,25% como descrito anteriormente. Una vez obtenida la suspensión celular, se centrifugaron durante 5 min a 1000 rpm. Luego se resuspendieron en 2 ml de buffer de FACS (PBS, 0.1% BSA fraction V, 1 mM EDTA, 1% pen/strep) y se filtraron con filtro de 35 μ m. La citometría de flujo y la clasificación se realizaron en un BD FACS Aria Fusion.

Inmunofluorescencia en fibroblastos humanos

Los fibroblastos AG09602 se sembraron sobre cubreobjetos de vidrio circulares en placa de 24 pocillos. Previo a la siembra, los cubreobjetos fueron tratados con etanol al 70% y mantenidos bajo luz UV durante 20 min para su esterilización.

Al día siguiente fueron transducidos con 2 μ l de adenovirus por pocillo como se describió previamente. Al noveno día post infección, se procedió a la realización de la inmunofluorescencia.

Los pocillos se lavaron con PBS. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min y rehidrataron con PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Se procedió a la permeabilización con 0,2 % de tritón X durante 15 min. El bloqueo se realizó con PBS-BT durante 30 min a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo primario correspondiente se realizó en PBS-BT en la dilución descrita en la tabla. Se incubó 16 h a 4°C en una cámara con paños de papel humedecidos de manera de no secar las células. Se realizaron tres lavados durante un total de 5 min.

Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario disuelto en PBS-BT, durante 45 min a temperatura ambiente. El cubreobjeto se lavó una vez con PBS-BT y se montó con

Prolong Diamond Antifade Mountant con DAPI. Se mantuvo en oscuridad una noche y se observaron al microscopio de fluorescencia EVOS.

Anticuerpo	Hospedador	Distribuidor	Características	Dilución
Oct3/4	Ratón	BD Transduction laboratories Cat. #611203	Primario	1/100
Sox2	Cabra	R&D Systems Cat. # AF2018	Primario	1/1000
Nanog	Conejo	Abcam Cat. # ab109250	Primario	1/1000
CD44	Ratón	BioLegend Cat. # 338802	Primario	1/50
Alexa Fluor 647 anti-conejo	Burro	Invitrogen Cat. # A31573	Secundario	1/1000
Alexa Fluor 647 Anti-ratón	Burro	Invitrogen Cat. # A31571	Secundario	1/1000
Alexa Fluor 647 Anti-cabra	Burro	Invitrogen Cat. # A21447	Secundario	1/1000

Tabla 5 Anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia en fibroblastos humanos.

Generación de cultivos primario de fibroblastos de rata

El animal elegido para la generación de cultivos primarios de fibroblastos fue una rata hembra de la cepa Sprague-Dawley de 28 meses de edad siguiendo el protocolo de CICUAL # T09-01-2013. El animal se anestesió totalmente con isoflurano y se procedió a la cirugía. Con tijeras estériles, se realizó un corte de un segmento de aproximadamente 4 cm de largo desde la punta de la cola. Una vez ubicados los fragmentos en los tubos de 50 ml, se descontaminaron dejándolos sumergidos con etanol 70 %. Luego se secaron en placas de Petri cerca del mechero 5 min y se añadió 10 ml de medio DMEM alta glucosa + ATB. Con bisturí se raspó el tejido para eliminar los vellos. Además, se cortaron en porciones más pequeñas. Se transfirieron a tubos de 2 ml y se adicionó colagenasa tipo 1, 10 mg (31600 UE) en un volumen final de 4 ml.

Las muestras se agitaron 20 min a 200 x g y 37 °C. Luego de la incubación, en flujo laminar se añadieron 6 ml de DMEM en tubo de 50 ml y se filtró utilizando una membrana de 40 µm. La suspensión de fragmentos se agitó con un tip para evitar obstrucciones y facilitando el descenso del líquido. Se hicieron pasar 6 ml más de DMEM + ATB a través del filtro y al volumen filtrado total se le agregaron 5 ml de DMEM. Para el lavado se realizó una centrifugación de 7 min a 580 x g y 4 °C. Se descartó el sobrenadante, se añadieron 6 ml de DMEM + ATB al sedimento celular en un tubo de 15 ml y se resuspendieron las células. Se repitió el lavado y se descartó el sobrenadante asegurándose que el sedimento permanezca sin perturbaciones. Las células fueron resuspendidas en 10 ml de DMEM conteniendo 10 µl de solución de anfotericina B y añadidas a una botella de cultivo T25. Se incubaron a 37 °C

en un incubador humidificado con CO₂ 5%. Al tercer día, se reemplazó el medio por 6 ml de medio DMEM + ATB/ATM + 5% SFB fresco conteniendo 10 µl de anfotericina B.

Cosecha de fibroblastos de rata

Los fibroblastos se mantuvieron en cultivo en botellas de 25 cm² y posteriormente de 175 cm², en DMEM 10% SFB sin pen/strep. Previo a alcanzar 100% de confluencia, las células se lavaron una vez con PBS y se agregó tripsina 0.12% + EDTA. Se incubaron a 37 °C 5 min para dejar actuar la tripsina. Una vez despegadas las células, se detuvo la reacción con tres veces el volumen usado de tripsina según la botella, de DMEM 10 % SFB pen/strep.

Congelamiento de fibroblastos de rata

Las células sembradas en botellas de 175 cm² al 90% de confluencia se lavaron con 6 ml de PBS. Se agregaron 5,5 ml de tripsina 0,12%. Se incubaron hasta el despegue de la monocapa y se añadió medio DMEM 10% SFB en volumen igual al triple del usado de tripsina, deshaciendo los cúmulos de células mezclando por succión con pipeta. Las suspensiones celulares se transfirieron a dos tubos de 50 ml y se efectuó una centrifugación de 7 min a 900 rpm. A cada sedimento se le añadieron 10 ml de medio de congelación (DMEM 50% SFB 10% DMSO) preparado previamente. Se centrifugó una segunda vez 7 min a 900 rpm. Las células se resuspendieron en el mismo medio. Se realizó el recuento con azul de tripán en cámara de Neubauer, la suspensión celular se llevó a 5×10^5 células/ml y se almacenaron crioviales con 1 ml en nitrógeno líquido.

Transducción de fibroblastos de rata

Los fibroblastos fueron sembrados en placas de 24 pocillos, aprox. 10000 cel/pocillo. Cuando las células estuvieron a un 80 % de confluencia, se las infectó con 2 µl de virus HD HD-OSKM en 250 µl de DMEM sin SFB ni pen/strep. Al cabo de 3 h, se reemplazó el medio y se agregaron 500 µl de DMEM 10% SFB pen/strep.

Inmunofluorescencia en fibroblastos de rata

Las células sembradas y trasducidas en placa de 24 wells se lavaron con PBS. Luego se fijaron con 0,3 µl de PFA 4% durante 15 min a temperatura ambiente. Se rehidrataron con PBS durante 10 min. Posteriormente, se permeabilizaron con PBST (PBS, Tritón 0,1%) durante 15 min. El bloqueo se realizó con PBS-BT (PBST, BSA 3%, Azida sódica 0,02%) durante 30 min a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo primario correspondiente se realizó en PBS-BT en la dilución descrita en la tabla, con 250 µl/pocillo. Se incubó 16 h a 4°C. Se realizaron tres lavados con PBS durante un total de 5 min. Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario Cy3 disuelto en PBS-BT, durante 45 min a temperatura ambiente. Se realizó un lavado con PBS durante 5 min. Finalmente, las células se observaron en el microscopio invertido de fluorescencia Olympus IX-71.

Anticuerpo	Hospedador	Distribuidor	Características	Dilución
Oct4	Ratón	Invitrogen Cat. #MA-1-104	Primario	1/500
Klf4	Ratón	Abcam Cat. #ab75486	Primario	1/500
Sox2	Ratón	Invitrogen Cat. #MA-1-014	Primario	1/500
c-Myc	Ratón	BD Pharmingen Cat. 551102	Primario	1/500
Cy3 anti-ratón	Burro	Jackson Cat. #715-165-150	Secundario	1/500

Tabla 6 Lista de anticuerpos utilizados en la inmunofluorescencia en fibroblastos de rata.

Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos

Variante de protocolo 1: Durante el día -2, fibroblastos cultivados en una placa de 10 cm, se lavaron con 5 ml de PBS para remover el suero adicional. Se añadieron 3 ml de tripsina 0,12% EDTA. Se esparció el líquido completamente por la placa y se descartó dejando aproximadamente 500 µl. Se incubaron durante 5 min a 37 °C. Durante la incubación, se añadieron 10 ml de DMEM 15% SFB a una placa de 10 cm nueva.

Pasados los 5 min, se golpeó suavemente por el lateral de la placa para despegar las células. Para neutralizar la tripsina, se añadieron 5 ml de DMEM 15% SFB. La suspensión celular se transfirió a un tubo cónico y se contaron las células por recuento con azul de tripán en cámara de Neubauer. Luego del conteo, se sembraron $2,5 \times 10^5$ células. Al día siguiente se reemplazó el medio.

Preparación de la superficie de la placa: El día 0, se preparó la superficie de la placa de 6 pocillos para la reprogramación. La dilución de 200 µl de matrigel se colocó en el baño termostático para descongelarla. Cuando aún todavía quedaba pellet se agregaron 50 ml de medio DMEM y una vez completamente disuelta se agregaron 2 ml/pocillo. Se incubó durante dos horas a 37° C.

Paralelamente, se procedió al lavado con PBS de las células en la placa de 10 cm. Se levantaron con Tripsina 0,12% EDTA como se describió anteriormente. Se sembraron 20000 células por pocillo en DMEM 15% SFB.

Al día +1 se procedió a la transducción de los fibroblastos con 5 µl de adenovirus como se describió en materiales y métodos. A las 3 h, se reemplazó el medio con medio TeSR E7-ReproTeSR suplementado y B18R.

Las células se mantuvieron en un incubador trigas 5% O₂, en una atmosfera de bajo oxígeno y a 37 °C. Se realizó cambio de medio todos los días por 1 ml de medio ReproTeSR suplementado.

Variaciones al protocolo implementadas:

Variante de protocolo 2: Previo a la siembra en un pocillo cubierto con matrigel, se separaron las células por cell sorting obteniendo una población pura de fibroblastos transducidos. Se prosiguió con el protocolo.

Variante de protocolo 3: El día de la transducción el medio se reemplazó con medio DMEM 15% SFB. A los 5 días post- transducción, se reemplazó el medio con medio ReproTeSr diariamente.

Resultados

Generación, propagación y purificación del HD-OSKM

Se partió del plásmido pC4HSU-STEMCCA-tTA, el cual fue amplificado en bacterias DH5 α y purificado por aislamiento de material plasmídico con el kit de Roche, dando la colonia 1 una concentración de 161,1 ng/ μ l ($Abs_{260}=3,2$; $Abs_{260/280}=1,91$) y la colonia 2 de 211,1 ng/ μ l, ($Abs_{260}=4,22$; $Abs_{260/280}=2.05$).

Una vez purificado, se chequeó la identidad digiriendo 500 ng con las enzimas de restricción EcoRV y PmeI. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa a 110 V 1h. También se sembró el patrón de peso molecular Invitrogen™ 1kb DNA Extension Ladder.

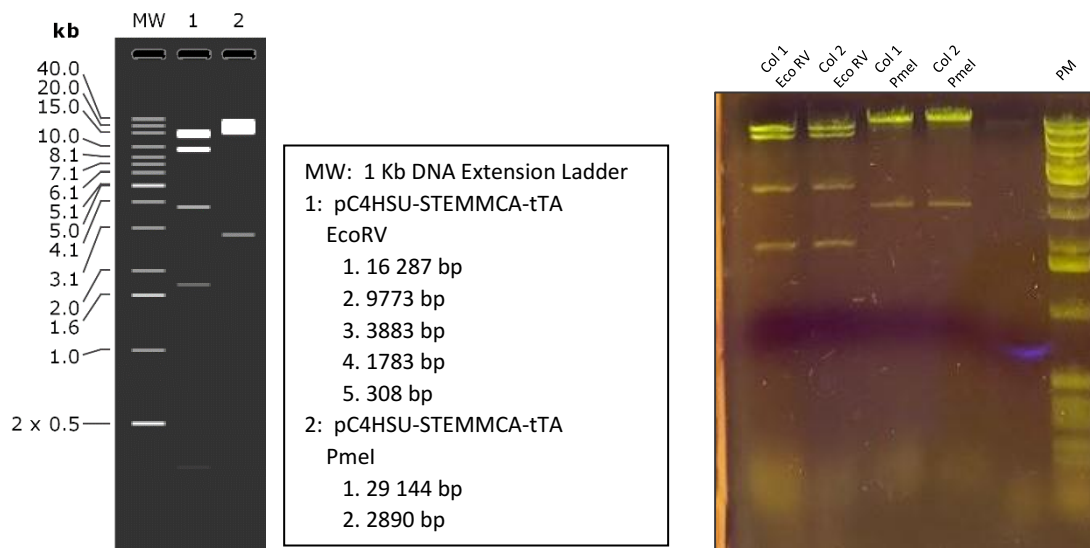


Figura 9 Chequeo enzimático del plásmido HD-OSKM obtenido por aislamiento de material plasmídico. A la izquierda patrón simulado con el programa Snapgene, con sus respectivas referencias. A la derecha, imagen del gel obtenido de la digestión del plásmido de las colonias 1 y 2, con las enzimas EcoRV y PmeI.

Como la concentración final obtenida fue relativamente baja para su posterior utilización, se procedió a concentrar el ADN por precipitación con etanol. Así, se obtuvo una concentración de 1050,3 ng/ μ l ($Abs_{260}=21,1$; $Abs_{260/280}=1,80$) del plásmido proveniente de la colonia 1 para la generación del virus.

Como material de partida para la generación, se digirieron 14 μg de ADN con enzima de restricción PmeI. Esto permitió obtener el ADN linealizado y eliminar la resistencia a ampicilina y los otros elementos requeridos para la amplificación del plásmido en bacterias. El producto de la digestión se verificó en un gel 0,6% de agarosa.

Una vez chequeado que la enzima digirió correctamente, se procedió a la transfección con lipofectamina en células 293Cre y a la infección con el virus H14.

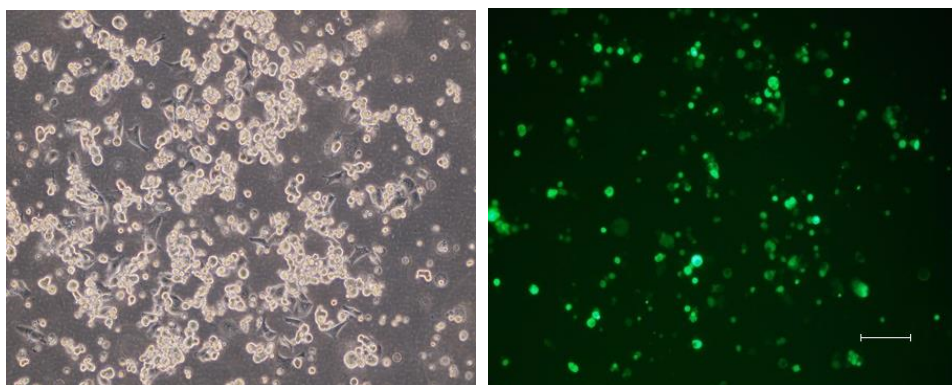


Figura 10 Células transfectadas con el plásmido linealizado pC4HSU-STEMCCA-tTA e infectadas con el virus auxiliar H14. Imágenes en aumento 10X, tomadas a las 48 h post-transfección. La barra de escala 1000 μm .

A las 48 h, las células se observaban como se puede ver en la figura 10. Las mismas se cosecharon utilizando un rastrillo de cultivo celular. Se procedió a la propagación y purificación del virus como se describió en materiales y métodos. Del lote original, se realizó la propagación (Fig. 11) y purificación para los trabajos de la presente tesis. De este nuevo lote, se obtuvieron 700 μl de adenovirus purificado HD-OSKM.

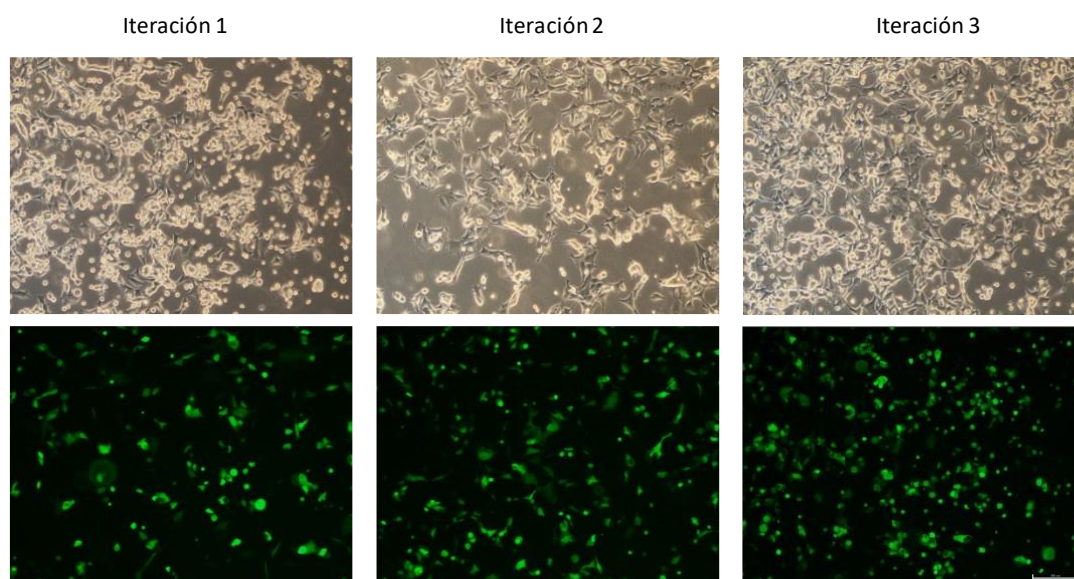


Figura 11 Células de las iteraciones correspondientes a la propagación del adenovirus OSKM coinfectadas con virus H14, 48 h post-infección. Barra de escala 1000 μm .

Por último, se midió el título del virus purificado HD-OSKM obtenido. A las 48 h se observó un decrecimiento en el número de células transducidas, observables por el color verde de la proteína GFP, hasta observar sólo una célula fluorescente en la dilución 10^{-14} . Por lo tanto, el título obtenido fue de 1×10^{14} partículas fluorescentes/ μl .

Evaluación de la transducción del adenovirus OSKM en el tiempo

En primera instancia, se estudió la transducción de los fibroblastos humanos con el fin de conocer cuál era la mejor multiplicidad de infección para los experimentos de rejuvenecimiento. Para ello, se sembraron 20000 fibroblastos GM05400 por pocillo en placas de 24 pocillos. Por duplicado, se transdujeron con 0,5 μl , 1 μl , 2 μl y 3 μl de adenovirus HD-OSKM en medio DMEM. Se evaluó la presencia de fluorescencia verde, indicador de la transducción, en el transcurso del tiempo.

Como se observa en la grilla de imágenes, el número de células infectadas aumentó con el aumento del volumen de virus purificado utilizado para la infección. La fluorescencia se mantuvo presente hasta finalizar el experimento el día 15 posterior a la transducción.

Para los volúmenes de 2 μl y 3 μl , se observaron más del 60% de células infectadas. También se pudo observar que en algunos pocillos como lo es el de 0,5 μl y el de 3 μl (mostrado en la figura 12 y 13) presentaron un cambio en la disposición celular.

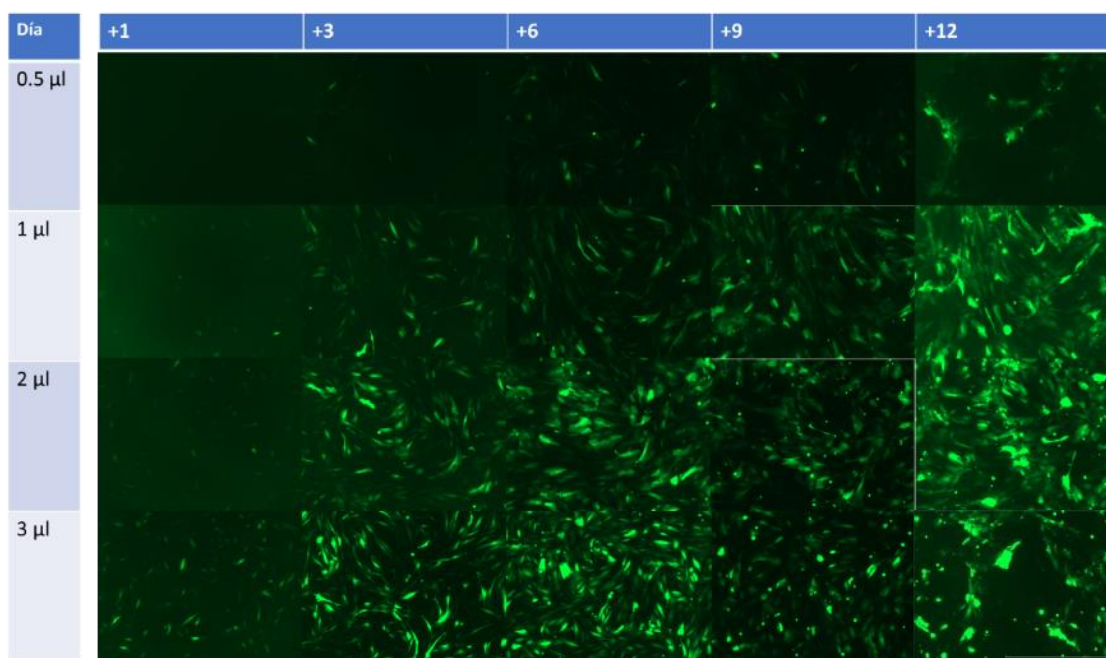


Figura 12 Seguimiento de la infección con el adenovirus HD-OSKM en fibroblastos humanos a distintos tiempos y volúmenes virales. Barra de escala 1000 μm .

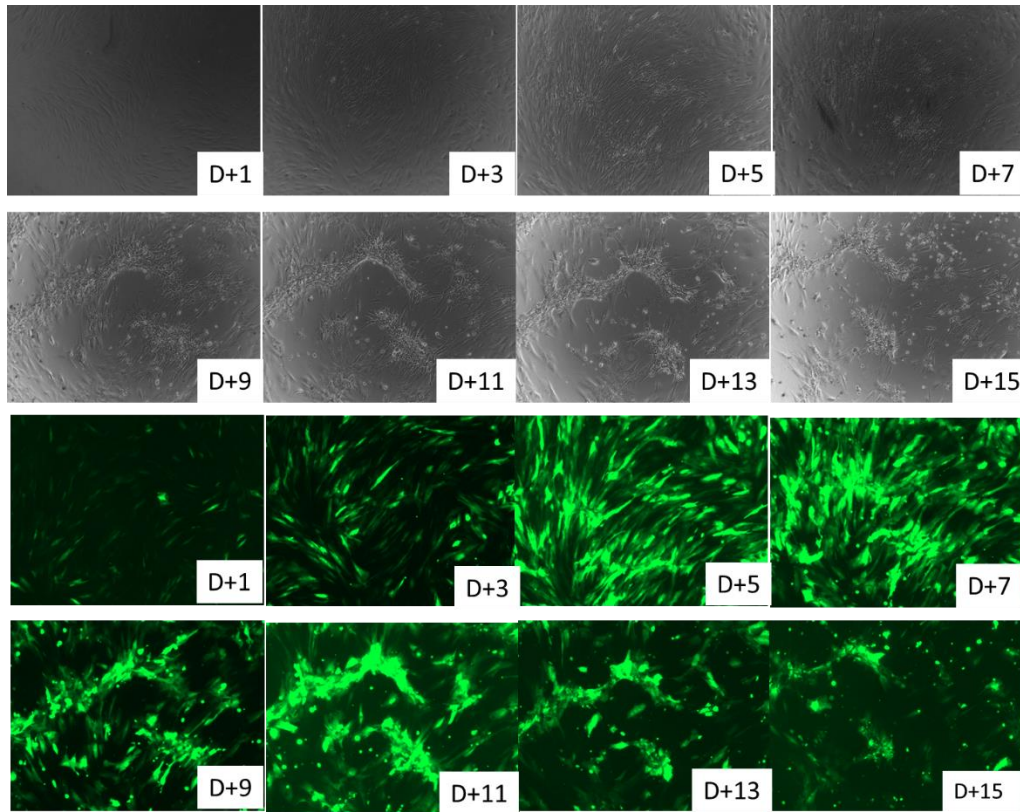


Figura 13 Ejemplo de reacomodamientos observados en los fibroblastos al mantener la expresión de los OSKM de manera continua. En este caso, el reordenamiento se observó en un pocillo infectado con 3 μ l de adenovirus.

Eficiencia de la expresión en fibroblastos humanos

Se procedió a medir la eficiencia de transducción del virus. Para ello se sembraron fibroblastos GM05400 en una placa de 6 pocillos, a $2,3 \times 10^5$ células/pocillo. Al día siguiente, se infectaron 2 pocillos con 10 μ l de virus como se describió en la sección de métodos. Al cuarto día se colectaron las células y se procedió a su análisis por citometría de flujo. Se obtuvo valor de células transducidas del $85,95 \pm 2,65$ %. (Fig. 14)

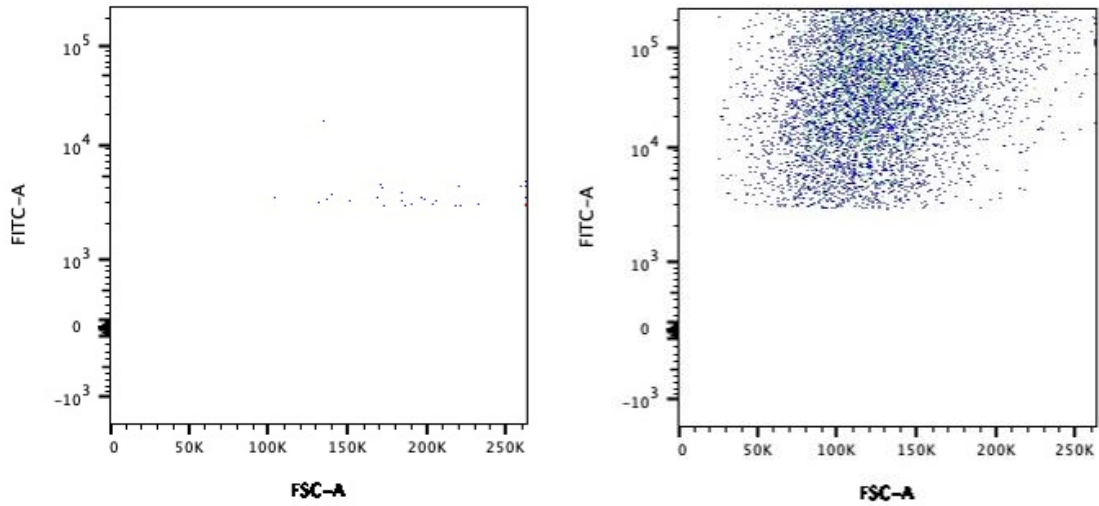


Figura 14 Dot plot del forward scatter (FSC-A) versus fluorescencia verde (FITC-A) de células controles no transducidas (izquierda) y células transducidas con el adenovirus HD-OSKM (derecha).

Expresión de los factores de transcripción OSKM en fibroblastos transducidos

Se verificó la expresión de los cuatro factores de pluripotencia en fibroblastos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Para ello, se infectaron fibroblastos GM00498 con 5 μ l de virus como se menciona en materiales y métodos. Las células se mantuvieron en cultivo por siete días y se procedió a la extracción de proteínas y realización de western blot para los cuatro genes de pluripotencia.

Como se puede ver en la figura 15, para Oct4, Sox2 y Klf4 se obtuvieron las bandas correspondientes a los cuatro genes en los fibroblastos transducidos, no así en los fibroblastos controles.

En el caso de cMyc, también se puede apreciar una leve banda en el control, propio de la expresión endógena de este factor de transcripción. Por su parte, Klf4 posee dos bandas características del anticuerpo utilizado.

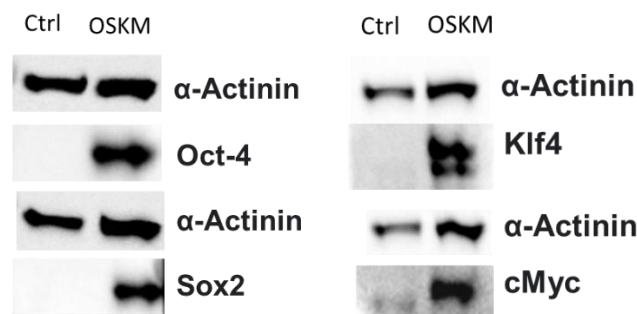


Figura 15 Western blot de los genes Oct4, Klf4, Sox2, y cMyc proveniente del lisado celular de fibroblastos transducidos con el adenovirus HD-OSKM (columna OSKM) o sin transducir (columna Ctrl, por control).

Caracterización de la expresión de los genes OSKM bajo expresión continua del adenovirus HD-OSKM

Cada sistema utilizado como transportador de los genes de pluripotencia para los protocolos de rejuvenecimiento posee características específicas de expresión. Para los protocolos de rejuvenecimiento, estas características son de gran interés, ya que su estudio permite lograr la expresión de los factores de pluripotencia durante un periodo de tiempo óptimo en que ocurran cambios epigenéticos y transcripcionales sin alcanzar la pérdida de la identidad celular ni la adquisición de características fenotípicas propias de células madre. En primera instancia se realizó un seguimiento temporal de los niveles de ARN mensajero de los genes OSKM en fibroblastos humanos infectados por única vez. Para ello, se transdujeron fibroblastos al 80 % de confluencia en una placa de seis pocillos con 5 μ l de virus. A los días +1, +3, +5, +7, +9 post-infección, se realizaron las extracciones de ARN correspondientes y se retrotranscribió el material obtenido. Luego se procedió a su cuantificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

Para cada gen de pluripotencia, se utilizaron dos pares de cebadores. Uno de ellos amplifica una región del transcrito en el extremo 3'UTR, por lo que el producto de su amplificación concernía a la expresión endógena del gen blanco. El otro par de cebadores amplifica una porción de la secuencia codificante, indistinguible entre la expresión endógena de la correspondiente al adenovirus.

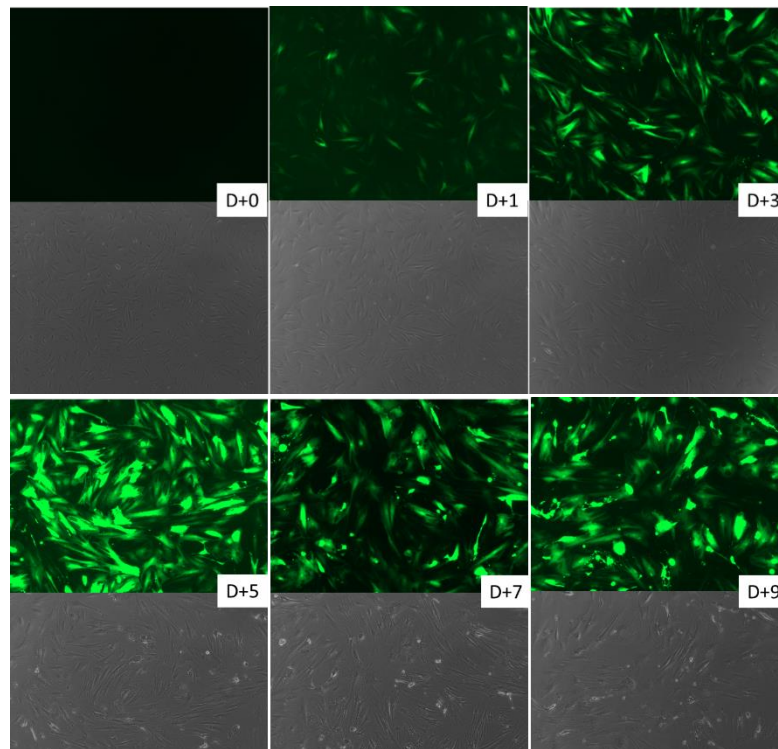


Figura 16 Seguimiento de la expresión de la proteína fluorescente verde en los fibroblastos transducidos con el adenovirus HD-OSKM para la posterior realización de rt-qPCR

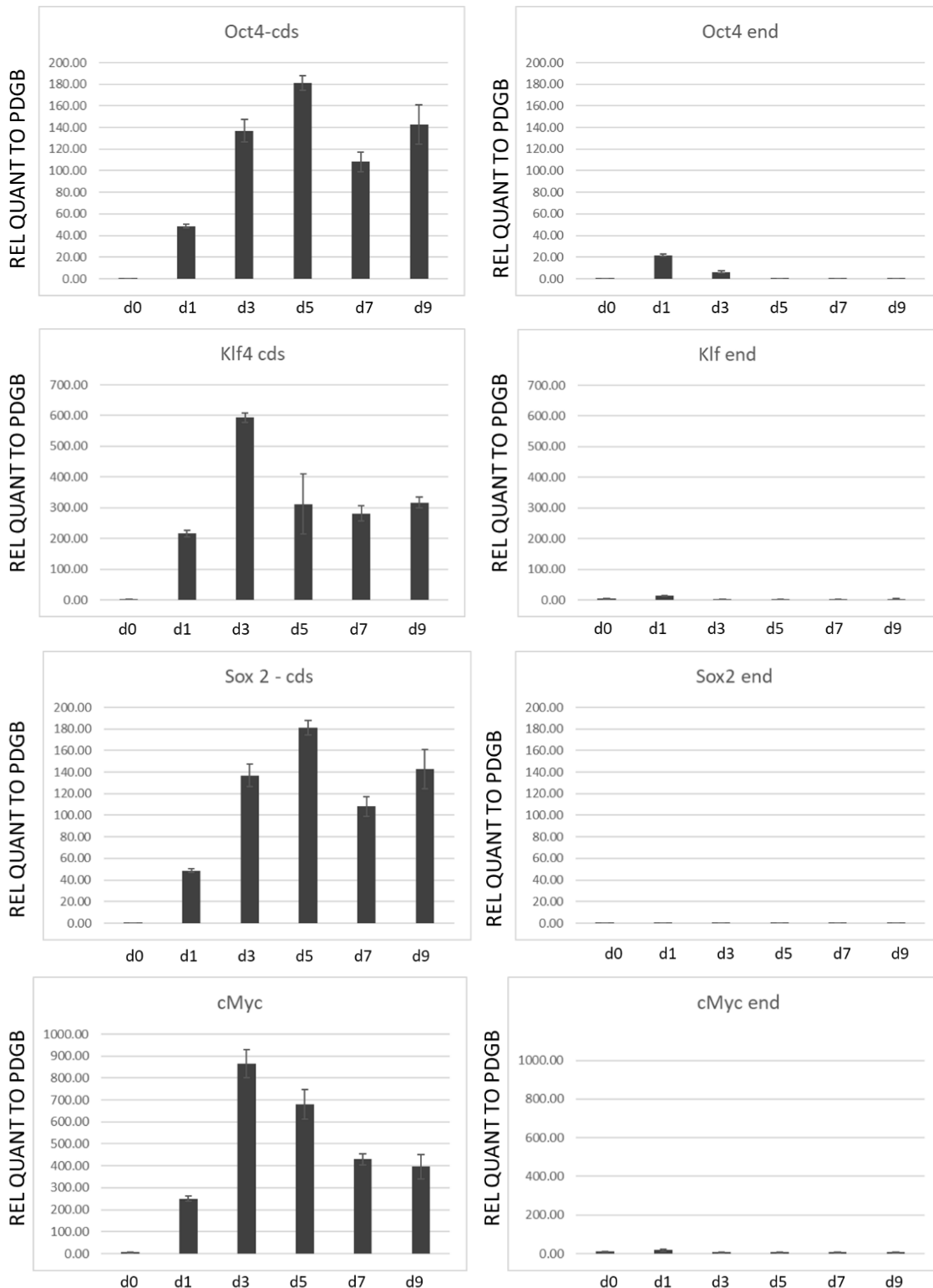


Figura 17 Cantidad relativa del amplicón estudiado referido al del transcripto del gen PDGB ($2^{-\Delta Ct}$), a los distintos días post-transducción. A la izquierda, amplicones correspondientes a la secuencia codificante del ARNm de Oct4, Klf4, Sox2 y cMyc. A la derecha, los amplicones correspondientes a los transcritos provenientes sólo de los genes “endógenos”, propios de la célula y no provistos por el adenovirus.

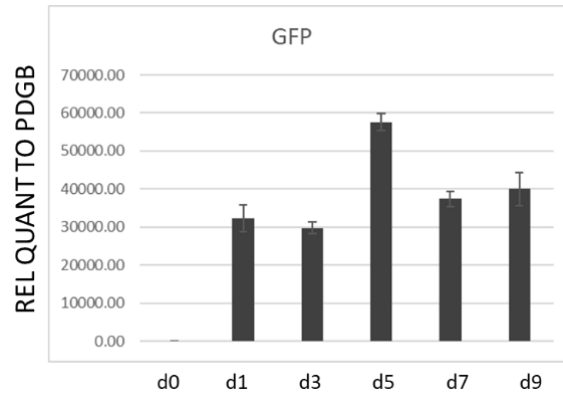


Figura 18 Cantidad relativa del amplicón de GFP referido al del transcripto del gen PDGB ($2^{-\Delta Ct}$), a los distintos días post-transducción.

En los gráficos para los amplicones de las secuencias codificantes, se puede observar que los niveles relativos de ARN mensajero correspondientes a Oct4, Sox2, Klf4, cMyc y GFP tienen un máximo de expresión entre los días 3 y 5, variando según el gen. Luego se observa una disminución y estabilización de los niveles relativos de cada uno. (Fig. 17 y 18)

En el caso de la GFP (Fig. 18), los niveles de ARN mensajero relativo al PDGB son hasta dos órdenes de magnitud mayor que los de los genes de pluripotencia. Su pico es consistente con el máximo de intensidad de fluorescencia observada en el día 5 post-transducción.

Este experimento fue repetido en dos replicas biológicas. La tendencia de expresión fue la misma que la mostrada, exhibiendo un pico entre los tres y cinco días post-transducción. De igual manera, la expresión de la GFP fue de dos órdenes de magnitud más.

Los niveles de ARN mensajero endógeno para los genes de pluripotencia Oct4, Sox2 y Klf4 se mantienen estables. Ninguno de ellos mostró en algún día una mediana significativamente mayor al de los fibroblastos al inicio del experimento, es decir sin transducir ($p > 0,05$, test de Kruskal Wallis). Así, todos los niveles de ARN relativos observables con los cebadores que amplifican en la secuencia codificante corresponden a la expresión de los transgenes.

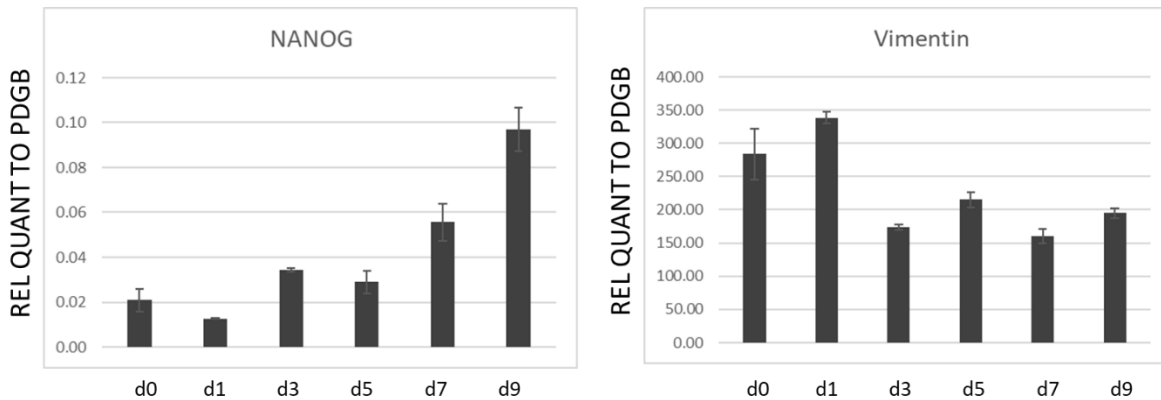


Figura 19 Cantidad relativa del amplicón de NANOG (izquierda) y Vimentina (derecha) referidos al del transcripto del gen PDGB ($2^{-\Delta Ct}$), a los distintos días post-transducción.

El factor de transcripción Nanog pertenece al grupo de los genes tempranos de activación en el proceso de desdiferenciación. Durante la expresión continua del adenovirus en fibroblastos, hasta el día nueve post-transducción hubo un incremento leve en los niveles relativos de ARN mensajero de su gen. (Fig. 19, izquierda)

Con respecto a la transcripción de vimentina, proteínas de los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular y marcadora de identidad de los fibroblastos, se puede observar una disminución al tercer día, coincidente con el máximo de expresión de los genes y una posterior estabilización de los niveles relativos. (Fig. 19, derecha)

Por otra parte, se evaluó por inmunofluorescencia la expresión de las proteínas al noveno día post-transducción, para los factores de transcripción Oct4 y Sox2, el factor de transcripción Nanog como marcador de inducción de pluripotencia en etapa temprana y la glicoproteína CD44 como marcador de identidad celular de los fibroblastos. Con respecto a la expresión de Oct4 y Sox2, ambos dieron células positivas en los fibroblastos transducidos con el adenovirus, y no así en los controles. Como control positivo se utilizaron células madre embrionarias. Si bien hay marcaje, no todas las células verde fluorescentes poseen una marcación roja propia de los factores de transcripción. Esto podría deberse a que por inmunofluorescencia no se llegan a apreciar todas las células marcadas, o bien que exista un desbalance en la transcripción hacia ambos lados del promotor.

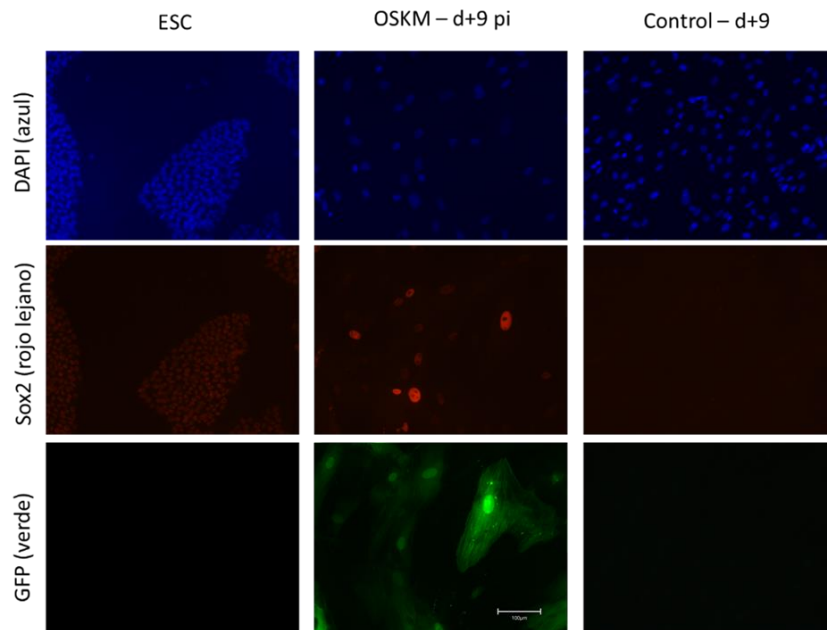


Figura 21 Inmunofluorescencia al noveno día del factor de transcripción Sox2 en fibroblastos humanos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Como control positivo se utilizaron células embrionarias y como control negativo fibroblastos no transducidos. Barra de escala 100 µm.

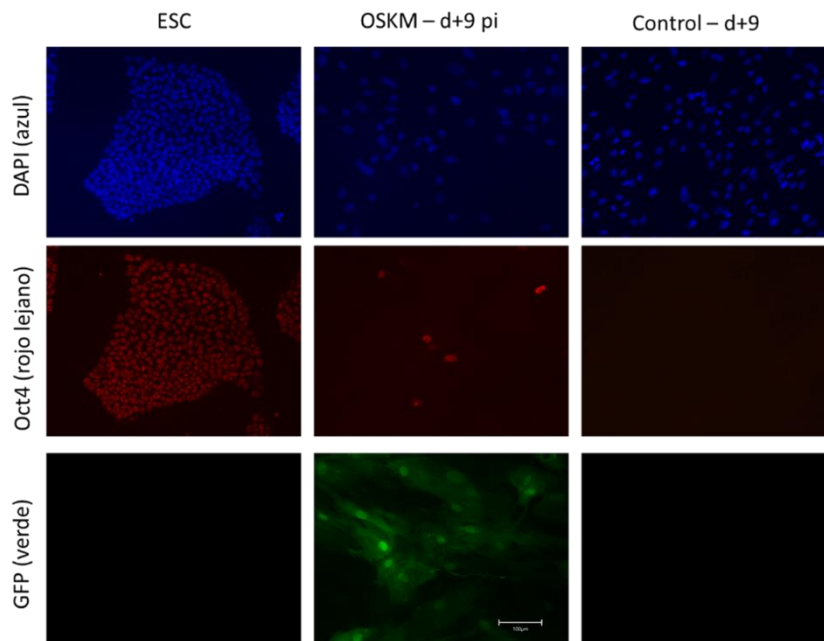


Figura 20 Inmunofluorescencia al noveno día del factor de transcripción Oct4 en fibroblastos humanos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Como control positivo se utilizaron células embrionarias y como control negativo fibroblastos no transducidos. Imágenes en 10X.

En cuanto a Nanog, no se encontraron células marcadas en los fibroblastos transducidos con el virus. Por tanto, si bien se puede apreciar un aumento en los niveles relativos de su ARN estos no llegan a ser suficientes para que la proteína esté presente.

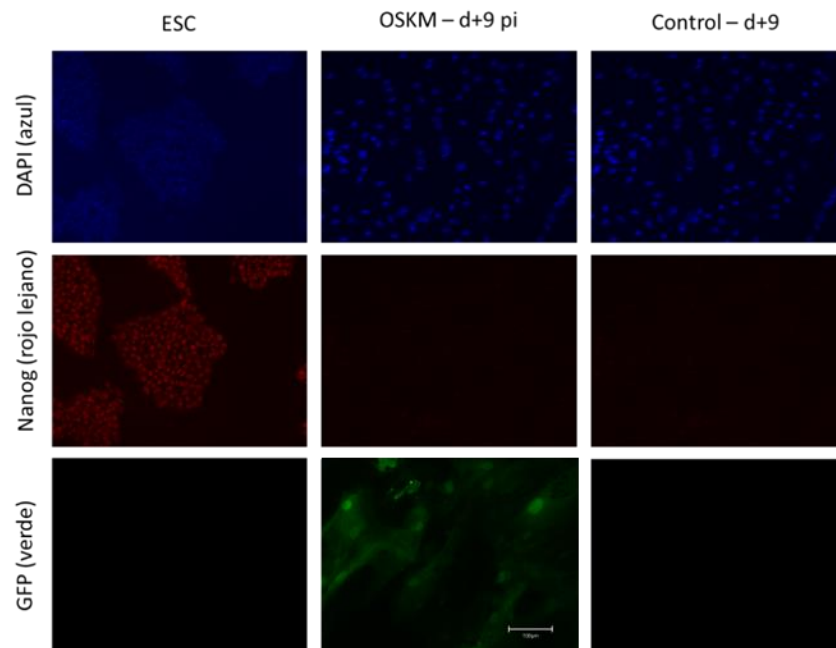


Figura 22 Inmunofluorescencia al noveno día del factor de transcripción Nanog en fibroblastos humanos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Como control positivo se utilizaron células embrionarias y como control negativo fibroblastos no transducidos. Barra de escala 100 μ m.

Para CD44, proteína utilizada como marcador de identidad, se puede observar que las células transducidas a los nueve días siguen siendo positivas para este marcador. Sin embargo, se puede apreciar una diferencia en el marcaje el cual no sigue la forma ahusada característica y apreciable en los fibroblastos controles, probablemente debido a los

cambios en la morfología observable en los fibroblastos con expresión continua del adenovirus.

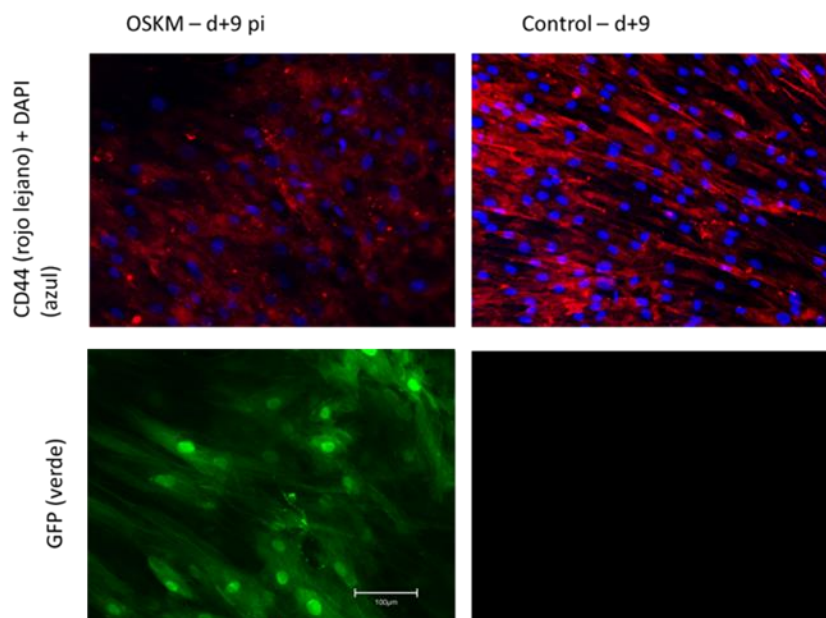


Figura 23 Inmunofluorescencia al noveno día de la proteína Vimentina en fibroblastos humanos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Como control negativo se utilizaron fibroblastos no transducidos. Barra de escala 100 µm.

Expresión de los genes de pluripotencia en fibroblastos de rata

Los fibroblastos de rata se sembraron y transdujeron con el adenovirus como se describió en materiales y métodos. Al tercer día post transducción se procedió a la marcación de los factores de transcripción Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc por inmunofluorescencia. Se puede observar que, si bien hay marcación, la cantidad de células positivas para los factores de transcripción es mucho menor a las células GFP positivas. Este hecho podría ser indicativo de que la cantidad de proteína expresada para los factores de transcripción no llega a ser detectable en todas las células por inmunofluorescencia.

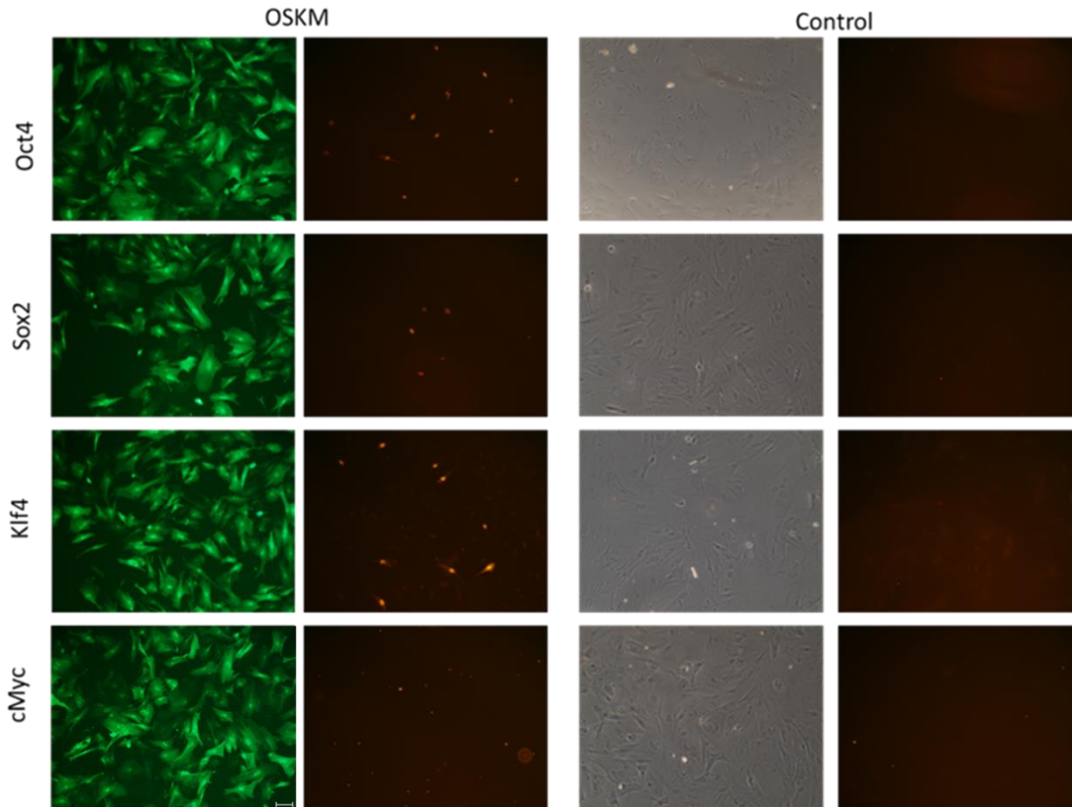


Figura 24 Inmunofluorescencia al quinto día para los factores Oct4, Sox2, Klf4 y cMyc en fibroblastos de rata transducidos con el adenovirus HD-OSKM. Barra de escala 250 μ m.

Generación de células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos humanos

Se probaron tres variaciones de protocolo de generación de células madre pluripotentes inducidas para evaluar el tiempo de reprogramación total. Como se puede ver en las imágenes, en ninguna de las tres variantes se observaron células de morfología similar a células embrionarias.

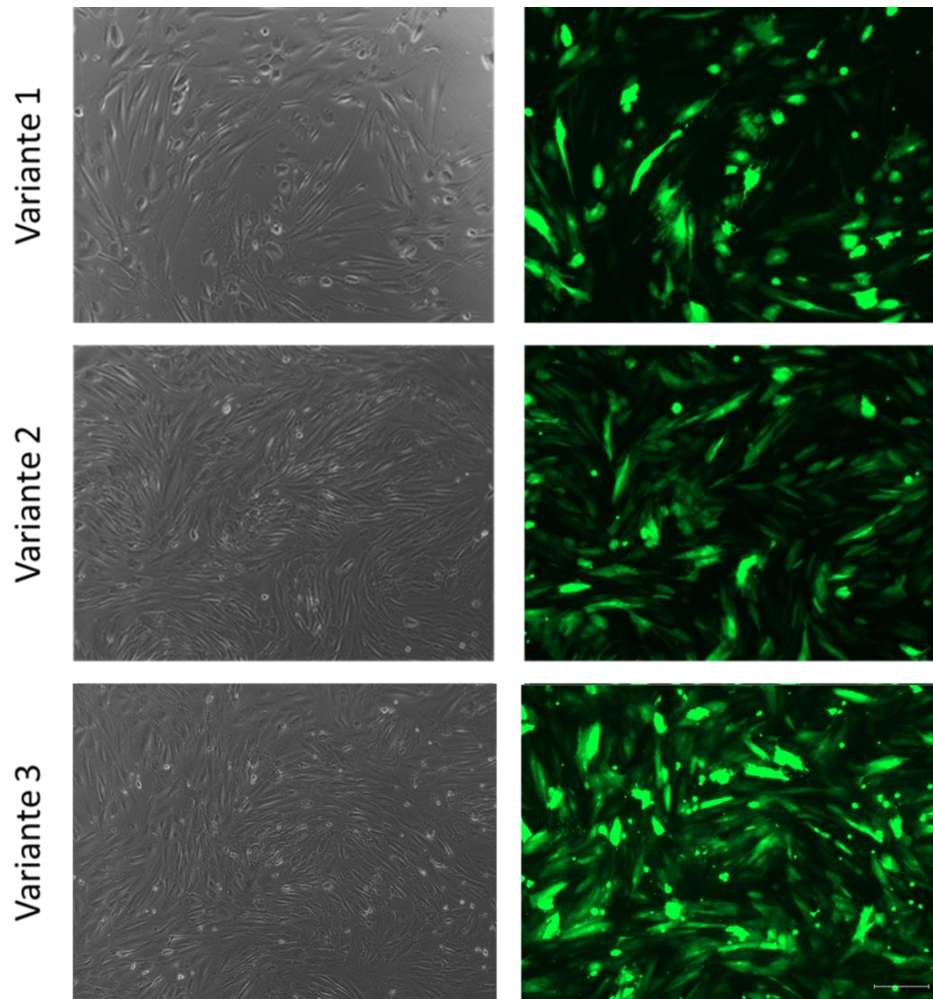


Figura 25 Fibroblastos transducidos siguiendo las distintas variantes de protocolo para la generación de células madre. En ningún caso se observaron células con morfología similar a la de células embrionarias. Imágenes tomadas a los 17 días. Barra de escala 250 μ m.

Discusión

Los adenovirus dependientes de auxiliar se perfilan como una alternativa de gran utilidad en terapia génica. Esto se debe a sus características tales como la incapacidad de replicación y la expresión elevada y duradera de sus transgenes (Palmer & Ng, 2004; Ross et al., 2009). En ese contexto, el adenovirus dependiente de auxiliar HD-OSKM propagado y purificado en la presente tesis representa una herramienta con gran potencial para su empleo en protocolos de reprogramación celular y rejuvenecimiento *ex vivo* e *in vivo*.

Los adenovirus dependientes de auxiliar no pueden ser titulados por el método tradicional de última dilución debido a su imposibilidad de generar placas de lisis. Para la misma, se han propuesto diversos métodos que requieren desde el uso diversas técnicas como qPCR y comparaciones con adenovirus de referencia (Gallaher & Berk, 2013; Palmer & Ng, 2004; Sandig et al., 2000). Por otra parte, para vectores virales que poseen el gen de la GFP u otros genes reporteros, se han desarrollado métodos alternativos de titulación (Asada et al.,

2018; Hitt et al., 2000). En este trabajo se tituló el HD-Ad OSKM propagado y purificado por combinación del método de dilución a punto final con la observación de fluorescencia verde de la GFP como reportador de la transducción. El título del adenovirus del lote utilizado para estos experimentos fue de 1×10^{14} partículas fluorescentes/ μl . Tal número representa a las partículas virales con efecto biológico, ya que infectan a la célula y transcriben activamente el constructo provisto, corroborable por la fluorescencia de la GFP. Este método representa una nueva alternativa sencilla y directa para adenovirus dependientes de auxiliar que poseen un gen reportero.

Una vez titulado el virus, se procedió en primera instancia a evaluar el desempeño en fibroblastos humanos transfectados con el transcurso del tiempo utilizando distintos volúmenes de virus. Como se mencionó en la sección de resultados de la figura 12, la cantidad de células fluorescentes observadas aumentó con el volumen, y se mantuvo constante hasta el día 15. En condiciones de volúmenes aleatorias se observaron reordenamientos que podrían ser debido al efecto propio de los genes OSKM o a un efecto citotóxico.

Con respecto a la evaluación de la eficiencia de transducción de fibroblastos con el adenovirus, se encontró que el $85,95 \pm 2,65$ % de las células habían incorporado al menos un virión y expresaban la GFP. Esta elevada eficiencia es comparable a la de otros vectores virales y se presenta como una ventaja frente a aquellos vectores en los que la eficiencia es menor y debe complementarse con pasos adicionales de transfección (Sarkar et al., 2020a; Sommer et al., 2009).

La confirmación de la expresión de las proteínas de los factores de pluripotencia OSKM producida por el adenovirus en fibroblastos humanos al día 7 post- transducción permitió validar su utilidad para protocolos de reprogramación celular parcial o terapia génica.

En la reprogramación celular se desencadenan una serie de eventos que finalizan en la desdiferenciación a célula madre en paralelo con el rejuvenecimiento celular (Cevallos et al., 2020; Olova et al., 2019). En la primera etapa, comienza el descenso de la expresión de los marcadores de identidad de la célula. Este periodo culmina con el punto de no retorno, momento en el cual la célula deja de ser capaz de revertir sus cambios fenotípicos y volver a su identidad original (Nagy & Nagy, 2010). Con el paso del tiempo, los genes endógenos de reprogramación son desreprimidos hasta llegar a un punto en el cual los niveles de expresión son tales que no requieren ser suplementados por los genes exógenos. En esa instancia, la célula se compromete a alcanzar el estado de célula madre inducida.

En el proceso de reprogramación celular, se ha observado que los tiempos de cada etapa dependen de la identidad de la célula de partida, la edad del organismo donador y el sistema de reprogramación utilizado. Por este motivo, se realizó un seguimiento de la expresión de

los genes de pluripotencia OSKM y de marcadores de identidad y pluripotencia en fibroblastos infectados con el adenovirus, a fin de poder encontrar los tiempos óptimos de rejuvenecimiento sin pérdida de identidad celular.

En cuanto a la transcripción de los genes OSKM, sus niveles alcanzan un máximo entre el día 3 y 5 y luego descienden levemente para mantenerse estables (Fig. 17), coincidente con lo observable en la intensidad de fluorescencia (Fig. 16). Sin embargo, los niveles son dos órdenes de magnitud menores a la expresión relativa de la GFP (Fig. 18). Esto podría deberse a que el ARN de la GFP sea más estable que el del policistrón.

Al menos hasta el día 9 post-transducción, hay transcripción de los genes exógenos OSKM y no hay un aumento significativo de los genes de pluripotencia endógenos. Otros autores, sin embargo, han informado que en la reprogramación parcial hay una desrepresión momentánea de los genes de pluripotencia (Kisby et al., 2021). Aquí, la expresión del adenovirus HD-OSKM podría no estar siendo suficiente para alcanzar ese punto de reprogramación celular parcial.

En cuanto a los niveles de transcripto del gen vimentina, característico de los fibroblastos, se vió una disminución al día tres post-infección y una posterior estabilización. Por otro lado, el transcripto del gen de NANOG como marcador de pluripotencia, aumentó levemente, pero permaneciendo en niveles muy bajos (cerca de cero) respecto genes fuertemente expresados como la vimentina.

La expresión de los genes del adenovirus en fibroblastos se confirmó por inmunofluorescencia al día 9, observándose células positivas para Oct4 y Sox2. En las imágenes se puede ver que no todas las células positivas para GFP dan marcación para los genes Oct4 y Sox2. Esto puede deberse a que, coincidente con lo observado en los niveles de transcripción, la cantidad de GFP expresada es mucho mayor y podría ser que los niveles de OSKM en algunas células sean indistinguibles por inmunofluorescencia. Consistentemente, la marcación positiva para los genes OSKM no está presente en todas las células GFP positivas de fibroblastos de rata.

Para ese mismo día se confirmó la ausencia observable de proteína Nanog a pesar de su aumento en la transcripción. Con respecto a la identidad, distinguible por CD44, si bien no se pierde, se empiezan a ver cambios conformacionales.

Finalmente, se pretendió generar células madre pluripotentes inducidas a partir de la sobreexpresión de los genes OSKM por el adenovirus en fibroblastos humanos con el fin de identificar el punto de no retorno. Se probaron varios protocolos sin éxito de generación. Esto es coincidente a lo reportado por otros autores, que han utilizado arreglos policistronicos en adenovirus y otros sistemas cuya expresión de los genes es menor a la de

otros sistemas de expresión duradera como los transgénicos (Y. Chen et al., 2021; Ocampo et al., 2016; Stadtfeld et al., 2008). En tales casos y en el del adenovirus, la expresión de los genes de pluripotencia podría estar siendo baja en comparación con la de los transgénicos como para producir la reprogramación celular completa. Esto daría una ventaja para su utilización en medicina regenerativa y así como en rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial.

Conclusiones

El adenovirus dependiente de auxiliar OSKM propagado y purificado expresa los genes de pluripotencia OSKM, así como la GFP. Se pueden implementar protocolos de rejuvenecimiento celular por sobreexpresión consecutiva al menos hasta el día +9, ya que las células no pierden su identidad.

Los estudios a nivel transcripcional muestran que los factores de pluripotencia Oct4, Sox2 y Klf4 continúan reprimidos hasta el noveno día. Este fenómeno y el hecho de no haber obtenido células madre parecen indicar que el adenovirus HD-OSKM no es capaz de producir una reprogramación completa hacia la desdiferenciación. Dicha característica puede deberse a que la expresión de los genes OSKM no sea lo suficientemente alta y prolongada en el tiempo comparada con otros sistemas de expresión exógena.

Tales resultados favorecen la utilización del adenovirus HD-OSKM para implementar rejuvenecimiento *ex vivo* e *in vivo* por reprogramación celular parcial.

Capítulo 2

Hipótesis

La reprogramación celular parcial mediante sobreexpresión de los genes OSKM en fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley y humano, utilizando el adenovirus HD-OSKM como vector viral, rejuvenece el fenotipo celular envejecido.

Objetivos

Rejuvenecer fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley y de pacientes humanos de edad avanzada por sobreexpresión de los genes OSKM utilizando el adenovirus HD-OSKM.

- Sobreexpresar los genes OSKM por transducción con el adenovirus HD-OSKM en fibroblastos de rata envejecidos y evaluar los niveles de los marcadores de edad celulares beta-galactosidasa por enzimocitoquímica, y HP1 y H3K9me3 por inmunofluorescencia.
- Sobreexpresar los genes OSKM en fibroblastos donantes de pacientes humanos de edad avanzada durante siete días. Evaluar el efecto sobre los marcadores de envejecimiento LAP2, H2Ax, SIRT1, HP1, H3K9me3 por inmunofluorescencia.
- Estudiar la predicción de varios relojes epigenéticos y los efectos de la sobreexpresión durante siete días sobre la edad epigenética. Analizar los cambios ocurridos en el metiloma de los fibroblastos de pacientes envejecidos.

Materiales y métodos

Fibroblastos de rata

Los cultivos primarios de los fibroblastos de rata utilizados en este Capítulo se generaron como se describió en el Capítulo 1 de la presente tesis. Se trabajó con fibroblastos de rata Sprague Dawley de dos grupos etarios: 2 meses (n=3) y 27 meses (n=3).

Transducción de los fibroblastos de rata

Los fibroblastos se sembraron por duplicado en placas de 24 pocillos que poseían un vidrio con el fin de permitir la observación en el microscopio confocal. Se sembraron 20000 células por well, con medio DMEM 10 % SFB. Al día siguiente, los fibroblastos de rata vieja se transdujeron por duplicado con 2 μ l de virus en 248 μ l de DMEM sin SFB, duplicado por réplica biológica. Al cabo de 3 h, se les cambió el medio por DMEM 10% SFB. A los fibroblastos de rata joven, se les realizó el mismo procedimiento experimental sin el agregado de inóculo viral, sólo 250 μ l de DMEM sin SFB. A los tres días se realizó un cambio de medio a los fibroblastos. En el quinto día se inició la inmunofluorescencia correspondiente.

Los fibroblastos de rata joven no transducidos se sometieron al mismo protocolo experimental que los de rata vieja, exceptuando la transducción con el virus.

Tinción de la beta- galactosidasa asociada a senescencia celular

Las células se lavaron con PBS durante 5 min. Se descartó el PBS y se añadió solución de fijación por 15 min a temperatura ambiente. Las células se enjuagaron dos veces con PBS, 5 min por lavado. Se agregó la solución de tinción beta-galactosidasa provista por Cell Signaling. La placa se selló para evitar su evaporación y consecuente formación de cristales, y se incubó a 37 °C por 16 h sin CO₂.

Luego de la incubación, las células se lavaron con PBS durante 30 s, y una vez con metanol. Se dejó secar al aire. Las células se observaron por microscopia de campo claro y contraste de fase.

Inmunofluorescencia para HP1 y H3K9me3 en fibroblastos de rata

Las células se lavaron con PBS durante 5 min dos veces. El PBS se descartó y se añadió la solución de fijación Formol 4% en PBS. Se dejó actuar 20 min. Luego, se aspiró el formol y se realizaron 3 lavados con PBS, de 10 min cada uno. Las células se permeabilizaron con Perm/Wash buffer 1X en agua destilada. Se realizaron 3 lavados de 10 min con PBS. Se procedió a incubar con la dilución correspondiente del anticuerpo primario, en un volumen final de 50 µl por pocillo. La incubación se realizó a 4 °C y durante 16 h.

Anticuerpo	Hospedador	Distribuidor	Características	Dilución
HP1	Conejo	Abcam Cat. # ab217999	Primario	1/1000
H3K9me3	Conejo	Abcam Cat. #ab8898	Primario	1/500
Alexa 555 anti-conejo	Cabra	Invitrogen Cat. #A21428	Secundario	1/300

Tabla 7 Anticuerpos utilizados para la evaluación del rejuvenecimiento celular en fibroblastos de rata.

Se realizaron 3 lavados con PBS de 10 min cada uno. Se descartó el PBS y se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario Alexa 555 durante 2 h a 25 °C. Se extrajeron los vidros de los pocillos y se montaron sobre portaobjetos utilizando líquido de montaje Fluoromont. Las células se observaron al microscopio confocal Nikon Eclipse E400.

Fibroblastos de donantes humanos

Los cultivos de fibroblastos de donantes humanos utilizaron fueron los mismos descritos en el Capítulo 1. Para los experimentos siguientes se trabajó con tres muestras de fibroblastos de pacientes de edad avanzada (GM00498, GM05381 y GM05400, ver tabla 1) y tres de pacientes jóvenes (AG05247, AG07725 y AG09602, ver tabla 2).

Transducción de los fibroblastos de donantes humanos

Se sembraron 20000 fibroblastos en vidrios sobre placas de 24 pocillos. Se los cultivó con DMEM 15% SFB sin pen/strep. Al día siguiente, los fibroblastos de donantes de edad avanzada se transdujeron con 2 µl de HD HD-OSKM por pocillo como se describió

anteriormente. Cada tres días se reemplazó el medio con DMEM 5% SFB sin pen/strep. Al séptimo día, se procedió a la inmunofluorescencia.

En el caso de los fibroblastos para la evaluación de la edad epigenética, se sembraron 40000 fibroblastos en placas de 6 pocillos. Los fibroblastos del grupo etario viejo se transdujeron con 5 µl de HD-AdOSKM en 1 ml de DMEM sin SFB ni pen/strep. A las 3 h se añadió 1 ml de DMEM 15% SFB sin pen/strep. Cada tres días se reemplazó el medio con DMEM 5% SFB sin pen/strep.

Inmunofluorescencia en fibroblastos humanos

Los pocillos se lavaron con PBS. Luego, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min y rehidrataron con PBS durante 10 min a temperatura ambiente. Se procedió a la permeabilización con 0,2 % de tritón X. El bloqueo se realizó con PBS-BT durante 30 min a temperatura ambiente.

La incubación con el anticuerpo primario correspondiente se realizó a en PBS-BT en la dilución descrita en la tabla. Se incubó 16 h a 4°C en una cámara con paños de papel humedecidos de manera de no secar las células. Se realizaron tres lavados durante un total de 5 min.

Se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario disuelto en PBS-BT, durante 45 min a temperatura ambiente. El cubreobjeto se lavó una vez con PBS-BT y se montó con Prolong Diamond Antifade Mountant con DAPI. Se mantuvo en oscuridad una noche y se observaron al microscopio de fluorescencia EVOS.

Anticuerpo	Hospedador	Distribuidor	Características	Dilución
HP1	Ratón	Merck Millipore Cat. # MABE656	Primario	1/100
LAP2	Conejo	Abcam Cat.# ab5162	Primario	1/1000
H3K9me3	Conejo	Abcam Cat.# ab8898	Primario	1/1000
H2AX	Ratón	Sigma Aldrich Cat.# JBW301	Primario	1/50
SIRT1	Conejo	Abcam Cat.# ab32441	Primario	1:1000
Alexa 647 anti-conejo	Burro	Invitrogen Cat. # A31573	Secundario	1/1000
Alexa 647 anti-ratón	Burro	Invitrogen Cat. # A31571	Secundario	1/1000

Tabla 8 Anticuerpos utilizados para la evaluación del rejuvenecimiento celular en fibroblastos humanos.

Medición de la edad epigenética y la metilación del ADN

Al séptimo día post-transducción, se procedió a la preparación de las células para la medición de la metilación del ADN. Las células se lavaron una vez con 1 ml de PBS. Luego se añadió 500 µl de tripsina 0,12% + EDTA y se incubó a 37 °C durante 5 min. Se frenó la

reacción con 1,5 ml de DMEM 15% SFB. La suspensión celular se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min. El sedimento celular se lavó con 500 μ l de PBS y se centrifugó nuevamente en iguales condiciones. El sobrenadante se descartó y los sedimentos celulares se almacenaron a -20 °C hasta su envío a la Universidad de California Los Angeles. Allí se procedió a la extracción de ADN, tratamiento con bisulfito y medición de la metilación del ADN en el chip Illumina EPIC.

La predicción de la edad epigenética mediante relojes epigenéticos fue realizada por el Dr. Steve Horvath la Universidad de California Los Ángeles.

Análisis estadístico de los marcadores de envejecimiento

Para los marcadores celulares de envejecimiento, inicialmente se procedió a realizar un análisis monofactorial completamente aleatorizado ANOVA con un diseño por bloques donde cada bloque representaba una réplica biológica. La distribución de los datos estudiados no correspondía a una distribución normal, incluso luego de transformarlos. Por esta razón, se utilizó la prueba de Friedmann para datos no paramétricos utilizando como bloque cada réplica biológica.

En cuanto al análisis los perfiles de metilación de las CpG, el control de calidad (QC), preprocesamiento y análisis estadístico de se realizaron con los paquetes "minfi" R y Bioconductor (Aryee et al., 2014).

El análisis de control de calidad se realizó con la función getQC y se procesó previamente con el método Noob/ssNoob. Además, se evaluó la distribución de la metilación de cada muestra. Para probar los niveles de metilación diferencial asociada a la edad, se realizaron pruebas de hipótesis múltiples a través de un modelo lineal utilizando el paquete "limma"(Ritchie et al., 2015). Para la evaluación del efecto del tratamiento con los genes OSKM, se utilizó un modelo lineal para muestras apareadas. El valor p fue ajustado por el método de Benjamini y Hochberg, estableciendo como corte el valor p de 0,05 (Benjamini & Hochberg, 1995).

La prueba de enriquecimiento de ontología génica (GO) para CpGs diferencialmente metiladas se realizó con la función gsmeth del paquete "missMethyl" (Phipson et al., 2016). Se evaluaron conjuntos de genes de ontología génica, estableciendo como categorías significativas las de $FDR < 0.05$.

Los relojes epigenéticos se evaluaron por un análisis de regresión lineal simple, y comparando sus coeficientes para evaluar su precisión. En cuanto a la edad epigenética, las diferencias en la edad epigenética se analizaron por prueba t de Student utilizando como variable respuesta la diferencia entre las muestras controles y las tratadas, utilizando como par hipótesis $H_0 \geq 0$; $H_1: \mu < 0$.

Resultados

EL objetivo de este Capítulo fue rejuvenecer fibroblastos de rata hembra y humanos por sobreexpresión de los genes OSKM utilizando el adenovirus HD-OSKM.

Con tal fin, los fibroblastos de rata hembra de 27 meses de edad fueron transducidos con el adenovirus HD-OSKM. A los cinco días, se procedió a la evaluación de los marcadores de edad.

En primera instancia, se evaluaron los efectos de la sobreexpresión de los genes OSKM en la senescencia, marca característica del envejecimiento a nivel celular. Para evaluar los niveles de senescencia celular se utilizó como marcador la expresión de β -galactosidasa mediante enzimocitoquímica. Los fibroblastos viejos no tratados mostraron un mayor porcentaje de células beta gal positivas que los fibroblastos jóvenes. En los fibroblastos de ratas envejecidas, en los que se sobreexpresaron los genes OSKM, se encontró un porcentaje de células de β -gal positivas significativamente menor que en su contraparte control, con un valor $p < 0,01$. (Figura 26)

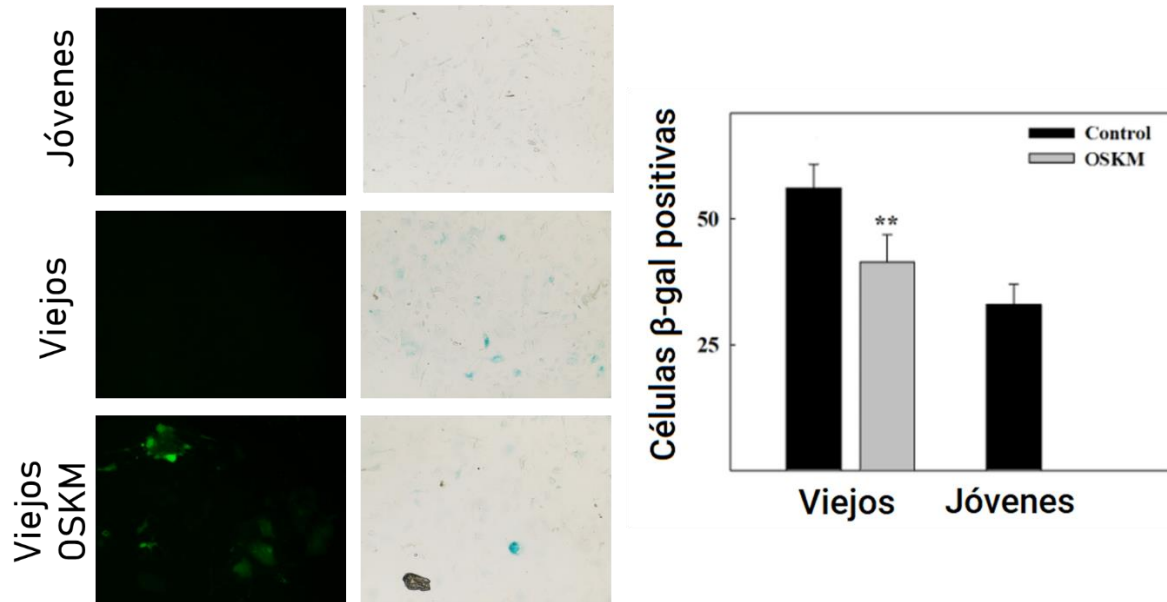


Figura 26 La reprogramación parcial con el adenovector OSKM reduce la expresión de la enzima β -galactosidasa asociada a la senescencia en fibroblastos de piel de rata vieja. Las células tratadas se incubaron durante 5 días con el vector y se determinó la expresión de β -gal mediante enzimocitoquímica. A la izquierda y de arriba hacia abajo, imágenes de fibroblastos jóvenes, fibroblastos envejecidos y fibroblastos envejecidos transducidos con el adenovirus HD-OSKM. A la derecha, gráfico de barras representando el porcentaje de células β -galactosidasa positivas. Las contrapartes jóvenes y viejas no tratadas muestran el aumento esperado relacionado con la edad en la expresión de β -gal. La reprogramación parcial redujo significativamente la expresión de β -gal en células viejas. ** indica una diferencia altamente significativa ($P < 0,01$) con los fibroblastos controles.

En el contexto epigenético, se evaluaron los niveles de expresión de HP1 y H3K9me3, por inmunofluorescencia y posterior análisis de la intensidad de la fluorescencia celular.

En el caso de H3K9me3, se observó una mayor intensidad de fluorescencia en los fibroblastos de rata vieja que en los fibroblastos de rata joven. Los fibroblastos viejos transducidos con el adenovirus HD-OSKM mostraron una mediana de intensidad de fluorescencia significativamente menor (p -valor $<0,05$) que los fibroblastos viejos controles. (Figura 27)

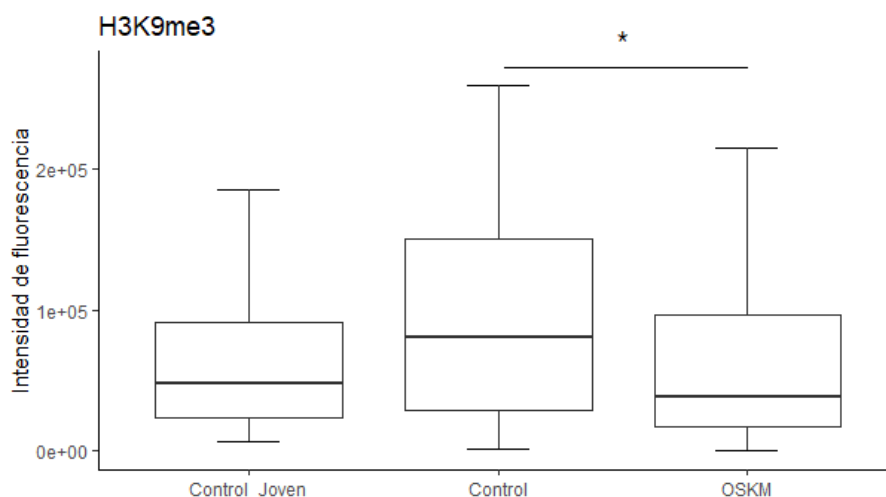


Figura 27 El tratamiento con el adenovirus OSKM redujo la expresión de H3K9me3 medido por la intensidad de fluorescencia en fibroblastos de rata. Los fibroblastos control joven de rata muestran valores menores de intensidad de fluorescencia que la de los fibroblastos envejecidos. La sobreexpresión por cinco días de los genes OSKM provista por el adenovirus redujo significativamente la cantidad de H3K9me3. * indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) con los fibroblastos controles.

En cuanto a HP1 γ , los fibroblastos jóvenes mostraron una mayor intensidad de fluorescencia media que sus contrapartes envejecidas. Mientras que los fibroblastos expuestos a la sobreexpresión de los genes OSKM no mostraron diferencias significativas en comparación a los fibroblastos viejos controles (p -valor=0,68). (Figura 28)

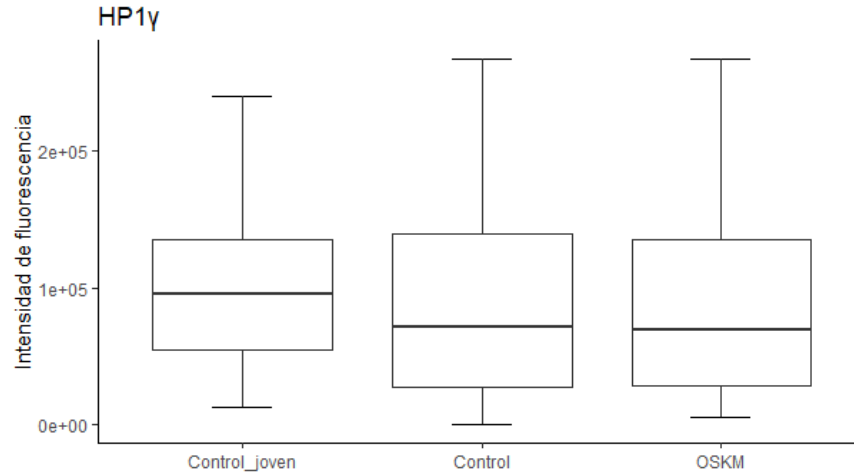


Figura 28 El tratamiento con el adenovirus OSKM no revirtió la disminución de los niveles de HP1 γ en fibroblastos de rata. Los fibroblastos control joven de rata mostraron mayores niveles de intensidad de fluorescencia que los fibroblastos envejecidos. La sobreexpresión por cinco días de los genes OSKM provista por el adenovirus no modificó significativamente la cantidad de HP1 γ celular.

Con respecto a los fibroblastos humanos, se propuso extender la sobreexpresión de los fibroblastos, consecuentemente con los estudios realizados del curso de la expresión de los genes OSKM en el Capítulo 1 (Grupo joven: $4,7 \pm 0,9$ años, $n=3$ y Grupo viejo: $90,0 \pm 1,5$ años, $n=3$). Los genes se mantuvieron expresándose durante siete días, periodo en el que los genes de pluripotencia se encuentran en niveles altos sin producir aún pérdidas de marcadores de identidad.

De manera similar a los fibroblastos de rata, se evaluaron los marcadores H3k9me3 y HP1 γ por inmunofluorescencia en fibroblastos humanos. La intensidad de fluorescencia correspondiente a H3K9me3 en los fibroblastos jóvenes fue mayor que la de los fibroblastos de donantes envejecidos. Por su parte, los fibroblastos expuestos a los genes OSKM no presentaron una diferencia significativa en comparación a los fibroblastos controles (valor $p = 0,62$). (Figura 29)

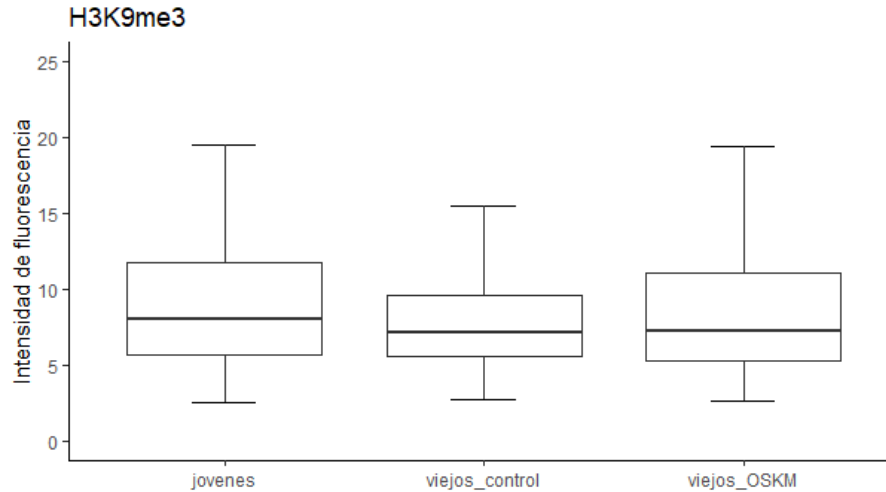


Figura 29 El tratamiento con el adenovirus OSKM no revirtió la disminución de los niveles de H3K9me3 en fibroblastos humanos. Los fibroblastos control de donantes jóvenes mostraron mayores niveles de intensidad de fluorescencia que los fibroblastos envejecidos. La sobreexpresión por siete días de los genes OSKM provista por el adenovirus no aumentó significativamente los niveles de H3K9me3 en fibroblastos humanos.

Al estudiar HP1 γ , se observó una mayor variación e intensidad de fluorescencia en los fibroblastos de donantes ancianos en contraposición a los fibroblastos de pacientes jóvenes. Por su parte, los fibroblastos transducidos con el adenovirus mostraron una mediana de intensidad de fluorescencia significativamente mayor que los fibroblastos viejos controles (p-valor<0,01). (Figura 30)

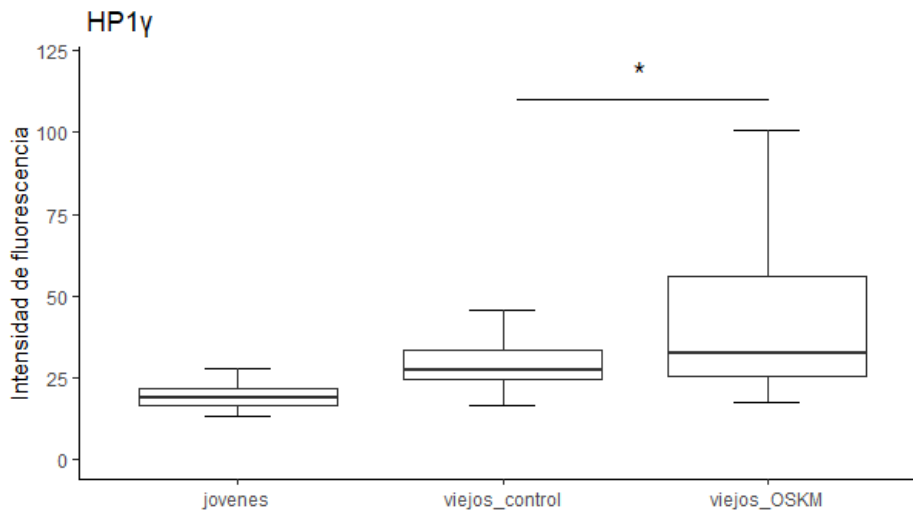


Figura 30 El tratamiento con el adenovirus OSKM aumentó la expresión de HP1 γ medido por la intensidad de fluorescencia en fibroblastos humanos. Los fibroblastos control joven de rata muestran valores menores de intensidad de fluorescencia que la de los fibroblastos envejecidos. La sobreexpresión de los genes OSKM provista por el adenovirus aumentó la cantidad de HP1 γ . * indica una diferencia significativa en la mediana de intensidad de fluorescencia (P<0,05) con los fibroblastos controles.

Se evaluaron también los niveles de expresión de la proteína H2Ax como marcador de rupturas de doble cadena asociadas al envejecimiento. Los fibroblastos jóvenes mostraron una mediana de intensidad de fluorescencia menor a la de los fibroblastos envejecidos. En tanto el grupo de los fibroblastos tratados con el adenovirus HD-OSKM mostraron una mayor variación en la fluorescencia medida por célula pero una mediana significativamente menor que los fibroblastos envejecidos no tratados (valor $p < 0,01$). (Figura 31)

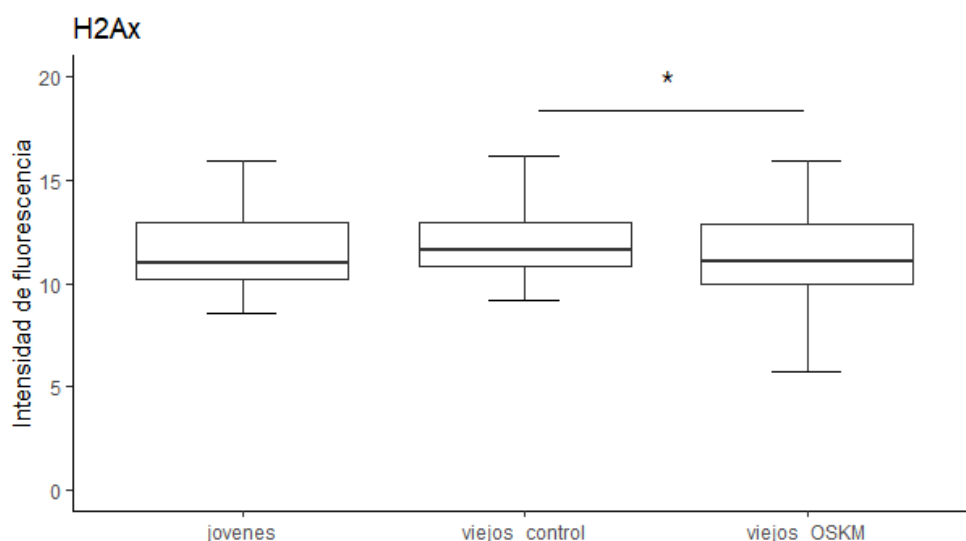


Figura 31 El tratamiento con el adenovirus OSKM redujo la expresión de H2Ax medida por la intensidad de fluorescencia en fibroblastos humanos. Los fibroblastos control joven muestran una mediana de intensidad de fluorescencia menor que la de los fibroblastos envejecidos. La sobreexpresión de los genes OSKM durante siete días por el adenovirus redujo significativamente la cantidad de H2Ax. * indica una diferencia significativa ($P < 0,01$) con los fibroblastos controles envejecidos.

Otro marcador evaluado fue el regulador transcripcional SIRT1. La mediana de intensidad de fluorescencia observada para los fibroblastos controles de pacientes donantes envejecidos fue menor que la de los pacientes jóvenes. Los fibroblastos sometidos a la sobreexpresión de los factores OSKM no mostraron una diferencia significativa con respecto a los fibroblastos viejos controles (valor $p = 0,62$). (Figura 32)

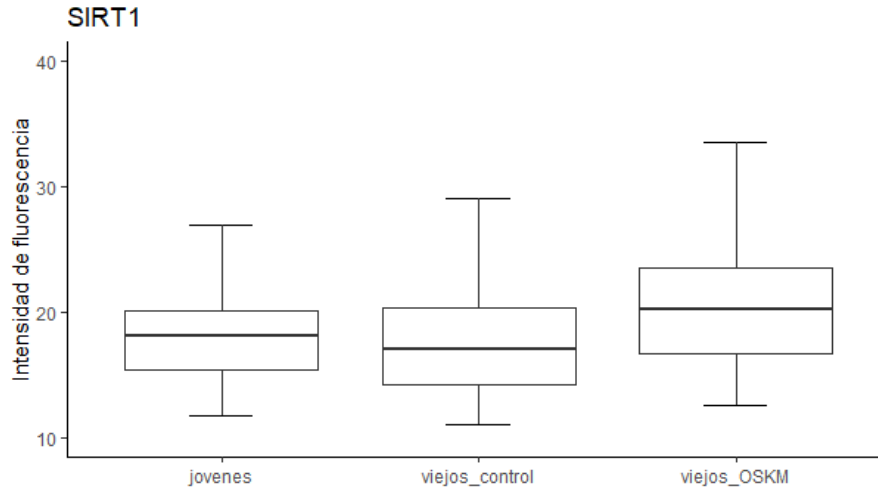


Figura 32 La sobreexpresión por siete días de los genes OSKM en fibroblastos humanos de pacientes envejecidos no aumentó significativamente los niveles de SIRT1 en fibroblastos humanos, medidos por la intensidad de fluorescencia.

Por último, se analizaron los niveles del polipéptido asociado a lamina nuclear 2 LAP2. En este caso, la mediana de intensidad de fluorescencia de los fibroblastos viejos fue mayor que la de los fibroblastos jóvenes, mientras que no se observaron diferencias significativas en los fibroblastos transducidos con el adenovirus OSKM (p-valor=0,62). (Figura 33)

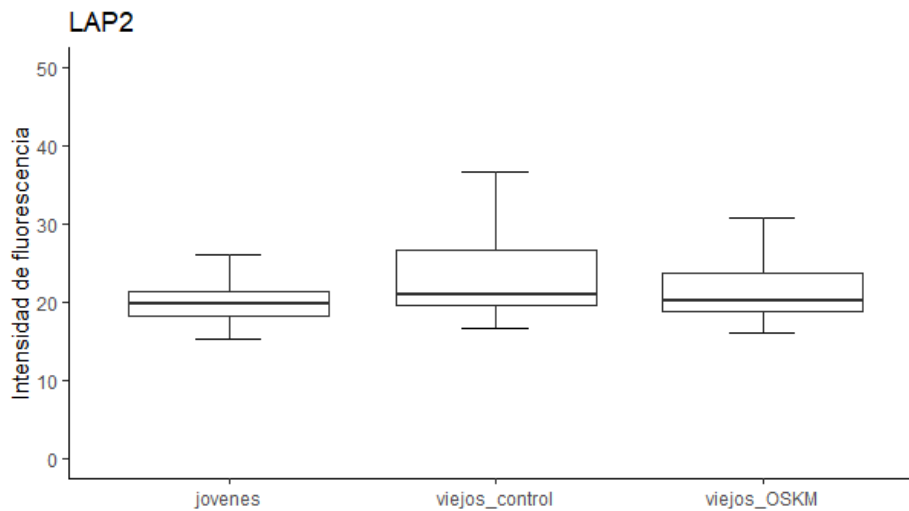


Figura 33 La sobreexpresión por siete días de los genes OSKM en fibroblastos humanos de pacientes envejecidos no disminuyó de manera significativa los niveles de LAP2 en fibroblastos humanos, medidos por la intensidad de fluorescencia y referidos a los fibroblastos envejecidos no tratados.

Para concluir los estudios a nivel celular, se decidió evaluar los efectos del adenovirus sobre la metilación del ADN y la edad epigenética, uno de los marcadores de envejecimiento más precisos existentes en la actualidad. Para ello se utilizó el chip Illumina's MethylationEPIC '850K' BeadChip.

A fin de estudiar la calidad de las muestras, se evaluó la distribución de las medidas de metilación en cada muestra. Como se puede observar en la figura 34, de densidades vs valores beta (beta-value) las mismas seguían el mismo patrón y no presentaban valores atípicos.

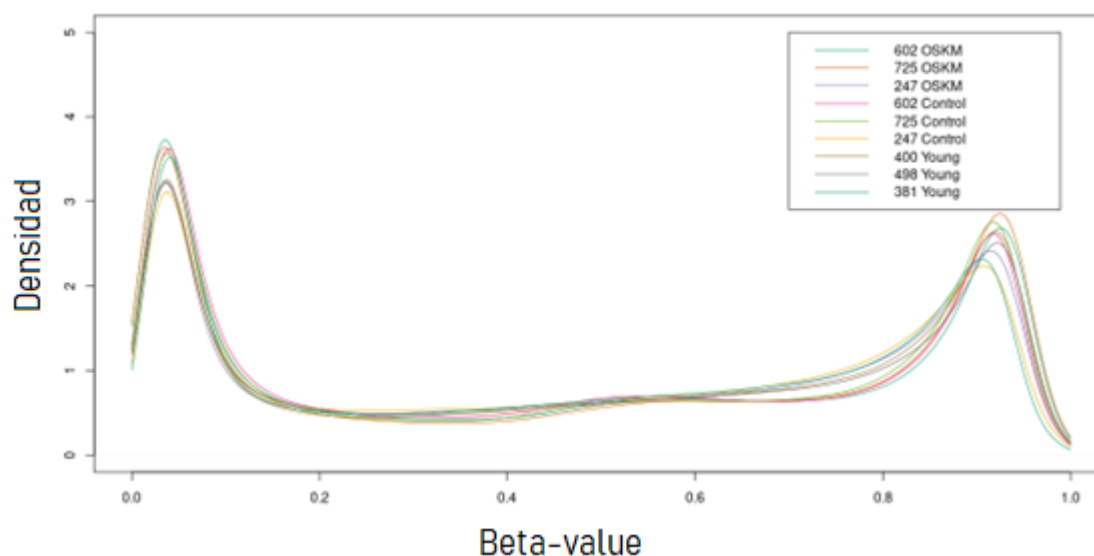


Figura 34 Gráfico de densidad mostrando la distribución de los valores beta para cada una de las muestras estudiadas. Ninguna muestra manifestó valores atípicos. Las muestras 400, 498 y 381 son las muestras de fibroblastos jóvenes, mientras que la 602, 725 y 247 pertenecen al grupo de fibroblastos de pacientes envejecidos.

En primera instancia, se evaluaron las diferencias de metilación en CpGs entre dos grupos etarios de fibroblastos humanos. Los grupos joven y viejo poseían una edad de $4,7 \pm 0,9$ años y $90,0 \pm 1,5$ años, respectivamente. En el análisis de las CpGs diferencialmente metiladas con la edad, se encontró que sólo 303 CpGs de las 866238 CpGs evaluadas son estadísticamente diferentes entre los grupos de fibroblastos humanos jóvenes y viejos (p valor $<0,05$, ajustado por BH). De estas, 178 CpGs exhibieron una mayor metilación (valores beta más altos) con la edad, mientras que 125 CpGs mostraron niveles de metilación disminuidos.

A través de la función gsmeth, se evaluaron los sets de genes significativamente diferentes en cuanto a su metilación. No se observaron sets de genes enriquecidos en CpGs diferencialmente metiladas con la edad (FDR $<0,05$).

GO	N	DE	P.DE	FDR
GO:0044271	4749	60	0.0002040779	1
GO:0061732	5	2	0.0003038567	1
GO:0009954	34	4	0.0003363503	1
GO:0004738	6	2	0.0004655888	1
GO:0034603	6	2	0.0004655888	1

GO:0034604	6	2	0.0004655888	1
GO:0090330	30	4	0.0004960456	1
GO:0001228	460	13	0.0006017598	1
GO:0001216	464	13	0.0006444260	1
GO:0000981	1350	23	0.0006563352	1
GO:0110024	4	2	0.0007981741	1
GO:0019438	4002	52	0.0008251008	1
GO:1901362	4154	53	0.0009859591	1
GO:0003700	1396	23	0.0010132621	1
GO:0034654	3918	51	0.0010149599	1
GO:0034110	37	4	0.0010853312	1
GO:0000978	1188	21	0.0010871240	1
GO:0110021	7	2	0.0010909317	1
GO:0110022	7	2	0.0010909317	1
GO:0046661	170	7	0.0011610542	1

Tabla 9 Resultados de los sets de genes mejor clasificados para el análisis de enriquecimiento génico en CpGs diferencialmente metiladas con la edad. Referencias: N, número de genes en el conjunto de genes; DE, número de genes que están metilados diferencialmente; P. DE, valor p para sobrerrepresentación del conjunto de genes; FDR, Tasa de descubrimiento falso, ajustada por BH.

Posteriormente, se estudió el efecto de los genes OSKM sobre la metilación de las CpGs en fibroblastos. Fibroblastos de humanos de edad avanzada fueron transducidos con el adenovirus HD-OSKM y expuestos a sobreexpresión de los genes durante siete días. Se evaluó el efecto de la sobreexpresión de los genes OSKM en los niveles de metilación de 866 mil CpGs. No se encontraron diferencias significativas entre los fibroblastos tratados y el grupo control, considerando como significativo un p-valor < 0,05 ajustado por BH.

Se evaluaron diferentes relojes a fin de encontrar el que mejor correlacionara su predicción de edad con la edad cronológica de los pacientes donantes de los fibroblastos. En colaboración con el Dr. Steve Horvath, se evaluaron 7 relojes, a observarse en la figura 35.

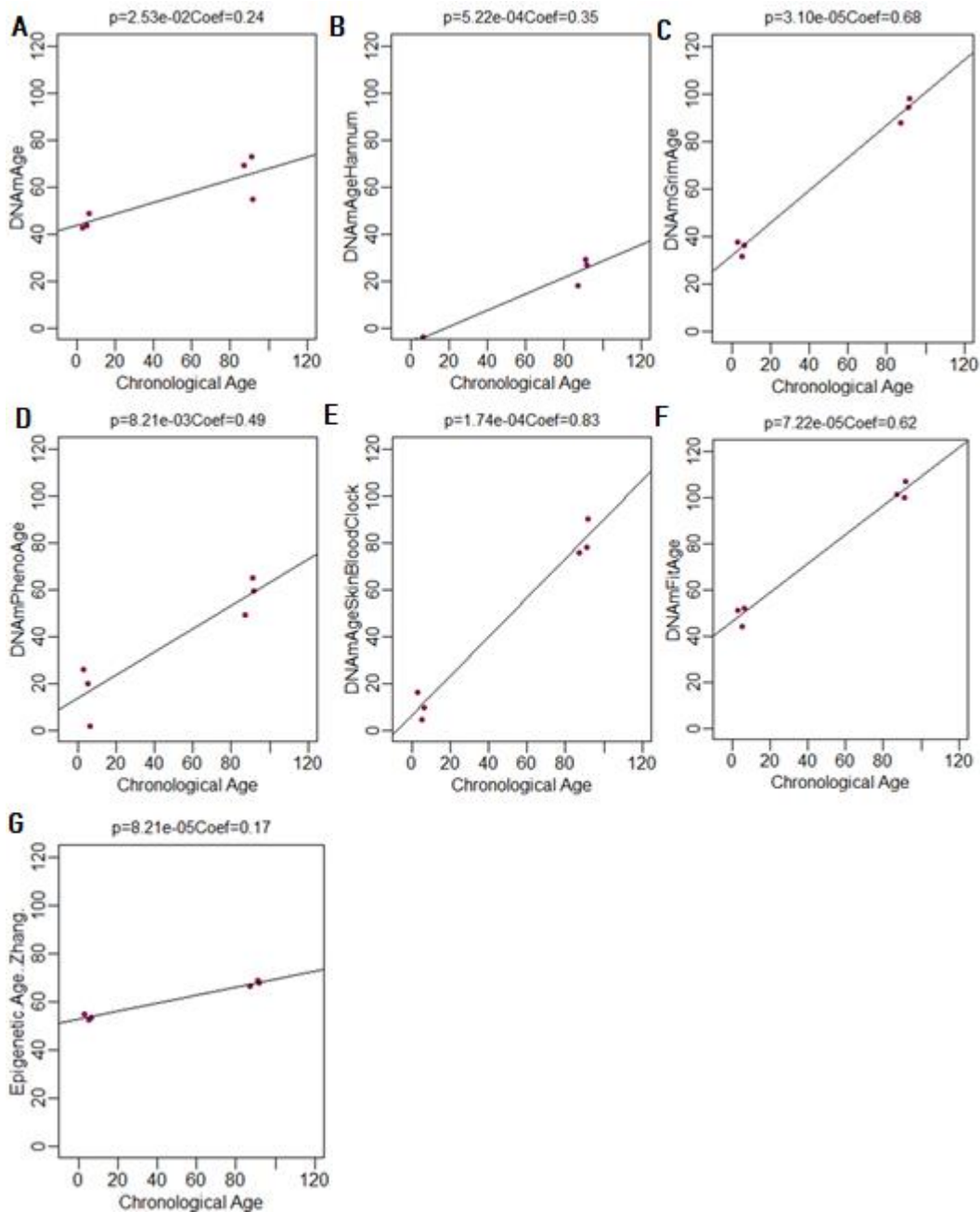


Figura 35 Comparación de 7 predictores de edad, a saber: A) Horvath (Horvath, 2013), B) Hannum (Hannum et al., 2013), C) GrimAgeclock (A. T. Lu et al., 2019), D) Pheno Age clock (Levine et al., 2018), E) Skin and Blood clock ((Horvath et al., 2018), f) FitAge clock ((McGreevy et al., 2023) y G) Zhang epigenetic clock (Q. Zhang et al., 2019). El eje x representa la edad cronológica en años, mientras que el eje y muestra la edad predicha. La línea negra sólida corresponde a la ecuación de la recta predicha. La correlación de Pearson del predictor SkinandBlood clock es la más alta, siendo de 0,83. Estos resultados se generaron en un conjunto de datos de metilación de fibroblastos humanos.

Como puede apreciarse en el panel, los relojes epigenéticos evaluados varían en los valores de correlación entre su predicción y la edad epigenética. Entre ellos, el que mejor correlaciona los valores de edad cronológica con la edad epigenética es el reloj epigenético de sangre y piel “SkinBloodClock” mostrando un coeficiente de correlación del 0,83. El

segundo reloj de mejor correlación fue el reloj predictor de la mortalidad GrimAge, arrojando un coeficiente de 0,68. Sorprendentemente, el reloj general utilizado para muestras humanas mostró un coeficiente de 0,24, valor muy bajo para realizar predicciones precisas.

Finalmente, se evaluó el efecto del tratamiento con los genes OSKM sobre la edad epigenética de fibroblastos de adultos de edad avanzada medido por los diferentes relojes. Las diferencias entre ambos grupos (tratados con OSKM y controles) fueron evaluadas mediante la prueba t de Student. El tratamiento no produjo una disminución en la edad epigenética de los fibroblastos, evaluada por Lo y no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$). (Figura 36) Los efectos de la sobreexpresión de los genes OSKM en la edad epigenética predicha por los relojes GrimAge y FitAge no pudieron ser evaluados debido a ausencia de datos para las mismas.

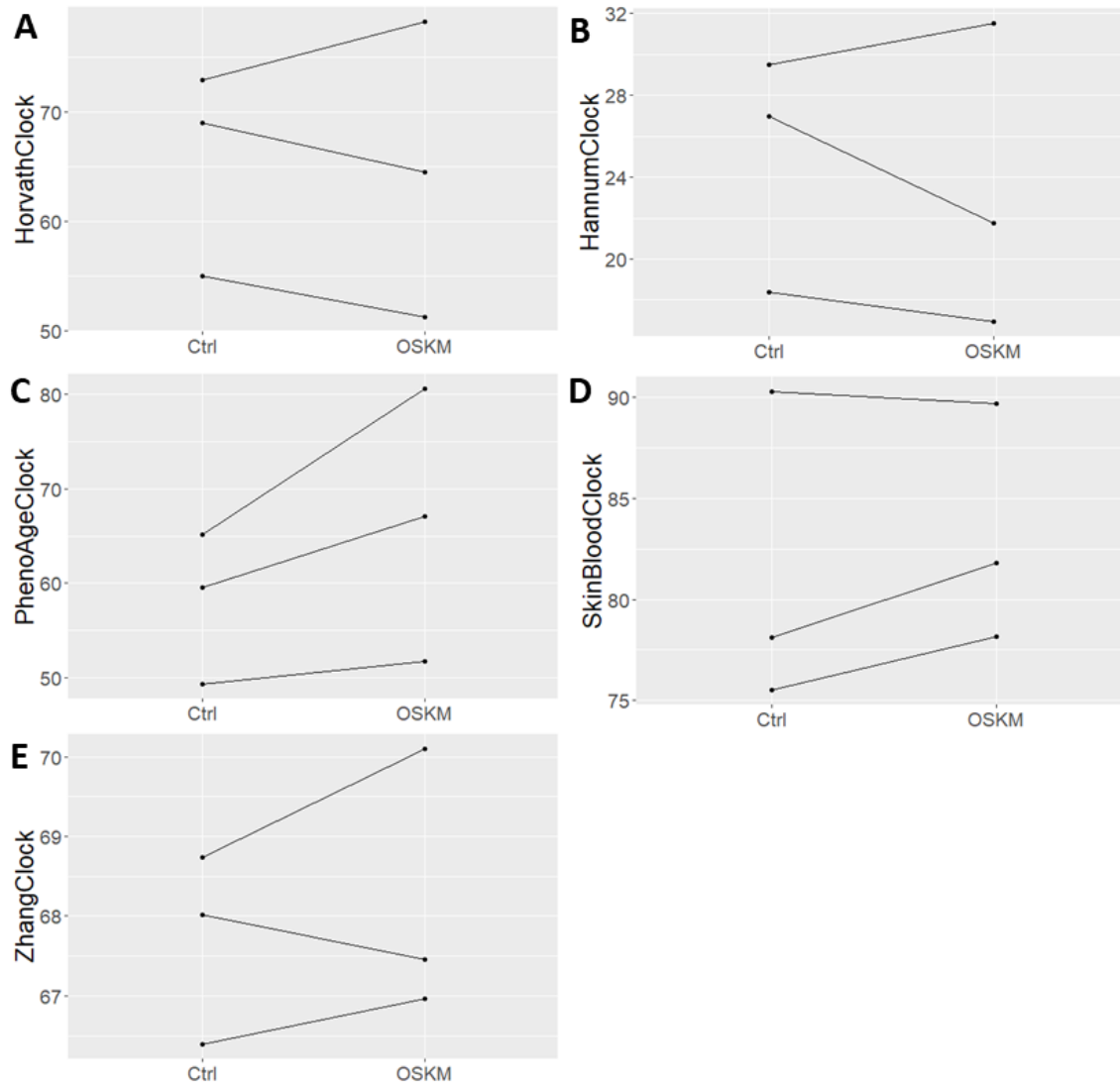


Figura 36 Efecto de la sobreexpresión de los genes OSKM sobre la edad epigenética de los fibroblastos humanos. Las líneas unen a las muestras control y tratadas pertenecientes al mismo paciente donador. La edad epigenética fue analizada utilizando cinco relojes : A) Horvath (Horvath, 2013), B) Hannum (Hannum et al., 2013), C) Pheno Age clock (Levine et al., 2018), D) Skin and Blood clock ((Horvath et al., 2018), E) Zhang epigenetic clock (Q. Zhang et al., 2019). El tratamiento no redujo significativamente la edad epigenética estimada con ninguno de los relojes.

Discusión

Como se profundizó en la introducción, en el envejecimiento ocurren desregulaciones a nivel epigenético. La reprogramación celular a células madre pluripotentes inducidas conlleva a la reversión de esas desregulaciones y a las marcas de envejecimiento en general (Lapasset et al., 2011).

Desde la primera obtención de células madre pluripotentes inducidas por Yamanaka hasta la actualidad, han surgido diferentes estrategias de reprogramación celular. Una de ellas, la reprogramación celular mediada por factores de pluripotencia, convierte un tipo de células somáticas a otro por expresión transitoria de los genes de pluripotencia (PDR), pasando por

un estadio intermedio epigenéticamente inestable que responde a factores de diferenciación sin haber alcanzado la reprogramación completa (Efe et al., 2011; Kim et al., 2012). Como una modificación a esta estrategia, surgió la reprogramación celular parcial para implementar rejuvenecimiento celular. Esta se basa en la sobreexpresión de los factores OSKM durante un periodo de tiempo más acotado en el que no se complete la reprogramación, conservando su identidad celular y revirtiendo el fenotipo de células envejecidas a uno más juvenil (Simpson et al., 2021).

Así, se han propuesto diferentes metodologías de reprogramación celular parcial para implementar rejuvenecimiento. Estas van desde la utilización de cultivos primarios provenientes de ratones transgénicos, hasta vectores virales y no virales (Gill et al., 2022; Ocampo et al., 2016; Sarkar et al., 2020b). En ese contexto, la generación del adenovirus dependiente de auxiliar producido por nuestro grupo de investigación (Lehmann, Canatelli-Mallat, et al., 2019) se posicionó como una nueva herramienta de reprogramación celular parcial para el rejuvenecimiento que asegura la no integración del transgén en combinación con un plazo mayor de expresión, en comparación con las metodologías no integrativas existentes.

En este Capítulo, se propuso evaluar los efectos de la utilización del adenovirus HD-OSKM como estrategia de rejuvenecimiento *ex vivo* mediante reprogramación parcial. En primera instancia, se utilizó como modelo de envejecimiento fibroblastos de rata Sprague Dawley provenientes de cultivo primario de nuestro laboratorio. El tiempo de sobreexpresión de los genes OSKM de cinco días fue establecido en base a otros sistemas de reprogramación celular parcial con el mismo fin de implementar rejuvenecimiento (Ocampo et al., 2016; Sarkar et al., 2020a).

Existen varios procesos biológicos asociados al envejecimiento. Uno de ellos es la senescencia celular, fenómeno que regula el ciclo celular arretándolo e impidiendo la división celular incluso luego de su sometimiento a señales de crecimiento. Las células ingresan en senescencia en respuesta a varios estímulos asociados al envejecimiento, por lo que aumentan su número con la vejez (di Micco et al., 2021; Kumari & Jat, 2021). Aquí, se estudió el efecto de la sobreexpresión de los genes OSKM en la senescencia celular asociada al envejecimiento por análisis del aumento en la actividad de la beta galactosidasa, cambio metabólico producido por el aumento en el contenido y la actividad lisosomal de las células senescentes (Lee et al., 2006). En los fibroblastos de rata envejecida, observamos un aumento en el porcentaje de células beta-galactosidasa positivas en comparación con los fibroblastos de rata joven. En los fibroblastos expuestos a la expresión continua del adenovirus HD-OSKM por cinco días, se observó un porcentaje de células significativamente menor que su contraparte control. Esto coincide con lo encontrado por otros autores en fibroblastos de ratón y de humano (Ocampo et al., 2016; Sarkar et al., 2020a). Por tanto, la

terapia génica con los OSKM revierte los cambios metabólicos evidenciados por un aumento de b-gal en fibroblastos derivados de ratas viejas.

También se evaluó la desregulación epigenética asociada al envejecimiento y su respuesta a nuestro tratamiento. Entre las desregulaciones ocurridas con la edad, diversos marcadores moduladores de la formación y el mantenimiento de la cromatina se ven alterados. Entre ellos, se estudió los niveles de H3K9me3, marca represora de la transcripción, la cual ha sido estudiada tanto *ex vivo* como *in vivo* en diversas especies (Kushwaha & Thakur, 2020; Wood et al., 2010). En este trabajo, al analizar la expresión en fibroblastos de rata, se observó que los niveles de H3K9me3 son mayores en los fibroblastos de piel envejecidos, de manera similar a los estudios realizados en la especie *Drosophila* (Wood et al., 2010) y en contraposición a lo observado en el tejido hipocampal de ratas macho (Kushwaha & Thakur, 2020). En los fibroblastos envejecidos tratados con el virus HD-OSKM, se observó una expresión significativamente menor que en los fibroblastos controles. La sobreexpresión de los genes OSKM redujo la trimetilación de la histona 3 en la lisina 9 a niveles comparables con los de los fibroblastos de ratas jóvenes, por lo que los fibroblastos transducidos están transitando un fenómeno de rejuvenecimiento a nivel epigenético.

Adicionalmente, se evaluaron los efectos de los genes OSKM en la expresión de la isoforma HP1 γ , proteína asociada a genes activos transcripcionalmente (Watanabe et al., 2018). Esta isoforma mostró niveles de expresión más altos en los fibroblastos jóvenes que en los envejecidos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas al sobreexpresar los genes OSKM en fibroblastos viejos. Esto difiere de lo reportado por otros autores que han utilizado otros sistemas de transporte de los OSKM, los cuales si demostraron una reversión en los niveles comparable a la de los fibroblastos jóvenes (Sarkar et al., 2020a). Esta diferencia puede deberse a que el tiempo de expresión de los genes OSKM no haya sido suficiente como para revertir otras marcas epigenéticas que sí son reversibles por reprogramación celular parcial utilizando otros sistemas de transferencia genes.

Por otra parte, se estudió el rejuvenecimiento *ex vivo* por expresión del adenovirus HD-OSKM en fibroblastos humanos envejecidos. El tiempo de expresión fue de 7 días, tiempo en el que aún no se han perdido las marcas de identidad celular ni han aparecido marcas de desdiferenciación, según los resultados obtenidos en el Capítulo 1.

El marcador de envejecimiento epigenético H3K9me3, no mostró diferencias significativas de expresión entre fibroblastos envejecidos tratados y fibroblastos controles. En tanto para el marcador HP1 γ , los fibroblastos de pacientes ancianos expuestos a siete días de expresión de OSKM, mostraron una expresión significativamente mayor a la de sus contrapartes controles. Es interesante destacar que la variación de HP1 γ asociada a la edad observada

en nuestros estudios, es opuesta a la reportada por otros autores en fibroblastos humanos (Sarkar et al., 2020a) indicando que quizás no es un marcador de edad suficientemente reproducible.

Como último marcador de envejecimiento de la cromatina se evaluó la expresión de LAP2 α , proteína de unión a la lámina A en el núcleo, cuyos niveles disminuyen con la edad en la piel y su deficiencia hereditaria causa envejecimiento prematuro (Gesson et al., 2014; Golubtsova et al., 2017). En contraposición a lo reportado, aquí hemos encontrado un aumento en los niveles de expresión de LAP2 con la edad. Por su parte, en los fibroblastos de pacientes ancianos tratados con el virus HD-OSKM no hubo diferencias significativas de su contraparte controles.

Con respecto a la integridad genómica pérdida en el envejecimiento, se propuso analizar los cambios producidos por la sobreexpresión de OSKM por el adenovirus en la expresión de la de la proteína H2Ax en su versión fosforilada. Esta proteína es una variante de la histona H2Ax que se presenta en respuesta al daño en el ADN, el cual aumenta con la edad (Mah et al., 2010). Como era de esperarse, los niveles de expresión de H2Ax fosforilada fueron mayores en los fibroblastos envejecidos que en los jóvenes. La sobreexpresión por siete días de los fibroblastos tratados con el adenovirus HD-OSKM mostraron una expresión de H2Ax fosforilada significativamente menor que los fibroblastos controles. Estos resultados se condicen con los logrados por sobreexpresión de los genes OSKM en ratones transgénicos y con ARN mensajeros. (Ocampo et al., 2016; Sarkar et al., 2020a)

En cuanto a la senescencia asociada al envejecimiento, se analizó SIRT1, deacetilasa represora de vías metabólicas asociadas a retrasar la senescencia celular (C. Chen et al., 2020). Los niveles de esta deacetilasa disminuyen con la edad, aumentando el número de células senescentes. Los fibroblastos envejecidos no mostraron diferencia significativa en los niveles de expresión de SIRT1.

Los marcadores de envejecimiento a nivel epigenético mostraron variabilidad dependiendo de la especie en cuanto a los efectos provocados por el virus. En el caso de H3K9me3, se observaron patrones opuestos en la expresión de la misma asociada a la edad, en rata y en humano. Se han realizado estudios en diferentes especies que demuestran esta diferencia de patrón (Kushwaha & Thakur, 2020; Ocampo et al., 2016; Wood et al., 2010), aunque su descripción en fibroblastos de rata no había sido reportada. Si bien se observó un efecto rejuvenecedor en la trimetilación de H3 en los fibroblastos de rata, en humanos el efecto no alcanza a ser significativo aún con tres días más de expresión de los genes. Esto implica una diferencia de tiempo de acción necesario de los genes OSKM para llevar a cabo la reprogramación celular parcial, probablemente asociado al nivel de represión epigenético presente en cada especie y a su patrón epigenético asociado a la edad.

En esa misma línea, los niveles de HP1 y asociados a la edad variaron de rata a humano. Si bien los resultados de fibroblastos humanos mostraron un aumento en su expresión dependiente de la expresión de los genes OSKM, para los fibroblastos de rata la diferencia no fue significativa. Además, los fibroblastos jóvenes y envejecido no mostraron concordancia con lo establecido estudiado ya en fibroblastos humanos (Sarkar et al., 2020b). En el mismo sentido, el marcador LAP2, mostró niveles asociados a la edad contrarios a los reportados en los estudios previos.

Los resultados obtenidos sugieren que los marcadores utilizados para evaluar el envejecimiento epigenético, y consecuente rejuvenecimiento, a nivel proteína muestran gran variabilidad, no solo interespecie sino también intraespecie, convirtiéndose en marcadores poco precisos y robustos.

Por ese motivo, se decidió estudiar el efecto de rejuvenecimiento epigenético producido por el adenovirus OSKM a nivel de metilación del ADN en fibroblastos humanos. Al evaluar los diversos relojes epigenéticos, se encontró que el reloj con correlación más alta entre la edad cronológica de los fibroblastos empleados en esta tesis y la edad predicha fue el reloj de piel y sangre (Skin and Blood clock). Esto era esperable ya que fue desarrollado para medir precisamente la edad de fibroblastos humanos (Horvath et al., 2018).

Al estudiar cómo afectaba la sobreexpresión de los genes OSKM por el adenovirus en la edad epigenética, en ninguno de los relojes se observó una disminución significativa de los fibroblastos tratados en contraposición a los controles. Por ejemplo, al estudiar la edad epigenética con el reloj general de Horvath, se observó que en dos de tres individuos se produce una reversión de la edad epigenética, mientras que con el reloj de piel y sangre esta edad aumenta en dos muestras de donantes de las tres estudiadas. Es posible que los cambios epigenéticos en la metilación no alcancen a ser completados al día 7 de reprogramación parcial y que avancen de manera estocástica. En esa misma línea, al estudiar el metiloma de las muestras, si bien se encontraron diferencias significativas en 303 CpGs asociadas a la edad, no se encontraron cambios en la metilación de las CpGs por efecto del adenovirus HD-OSKM.

En los últimos meses se ha reportado que luego de la reprogramación parcial es conveniente realizar una etapa de recuperación, en donde las células se dirigen a su estado fenotípico rejuvenecido y se sobreponen del estrés producido por la sobreexpresión de los genes OSKM (Gill et al., 2022). En estudios con el adenovirus HD-OSKM, una alternativa para alcanzar efectos de rejuvenecimiento más marcados, especialmente a nivel metilación de ADN y edad epigenética, será permitir la recuperación de dichos fibroblastos, por ejemplo, por adición DOX al medio de cultivo con el fin de reprimir a los genes OSKM.

Conclusiones

El adenovirus dependiente de auxiliar OSKM generado en nuestro laboratorio fue el primer adenovector documentado en poseer los cuatro genes de pluripotencia en un cassette regulados por un promotor bidireccional que también controlara la GFP. Esta herramienta biotecnológica abrió nuevas posibilidades dentro del estudio del rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial.

Los primeros estudios de rejuvenecimiento por reprogramación parcial *ex vivo* con el adenovirus HD-OSKM se presentan en este Capítulo de la presente tesis. En ellos se demostró que la sobreexpresión de los genes de pluripotencia en fibroblastos de rata hembra Sprague Dawley durante cinco días revirtió cambios epigenéticos asociados a la edad como H3K9me3 y fenotipo senescente asociado a la edad, evaluando el marcador beta-galactosidasa. Si bien los experimentos de rejuvenecimiento de fibroblastos de rata por reprogramación parcial no mostraron efecto en el otro marcador utilizado HP1 γ , esto podría deberse a una necesidad de prolongar la fase de iniciación de la reprogramación.

Por otro lado, la sobreexpresión de los genes OSKM utilizando el adenovirus HD-OSKM en fibroblastos de humano aumentó los niveles de organización de la heterocromatina, evaluados por la expresión de HP1 γ y disminuyó los niveles de H2Ax. Sin embargo, el tratamiento de siete días que no revirtió el envejecimiento asociado a otros factores epigenéticos como la H3K9me3, la edad epigenética y la metilación del ADN. El tratamiento por siete días tampoco revirtió marcas asociadas a la senescencia como la expresión de la proteína SIRT1.

Algunos los marcadores de envejecimiento presentaron diferencias a lo reportado en la bibliografía, siendo el caso de HP1 γ y LAP2 al comparar entre grupos de fibroblastos humanos jóvenes y viejos. Estas observaciones ponen en evidencia el desafío que representa estudiar el envejecimiento y su reversión en modelos celulares en cultivo, en el cual las células no se encuentran en su ambiente correspondiente y presentan además el envejecimiento “en placa”, el cual es variable e indistinguible del natural.

Por este motivo, en el cuarto Capítulo se abordan los estudios de envejecimiento del sistema nervioso *in vivo*, en el modelo de rata Sprague Dawley envejecida.

Capítulo 3

Hipótesis

La memoria espacial de las ratas hembra Sprague Dawley responde a los cambios relacionados a la edad de la metilación del ADN y a la edad epigenética de los animales.

Objetivos

Caracterizar los cambios en la metilación del ADN relacionados con la edad y en la edad epigenética del hipocampo para evaluar sus implicancias la memoria espacial de la rata hembra Sprague Dawley.

- Evaluar la memoria espacial de los animales por el laberinto de Barnes.
- Predecir la edad epigenética de los hipocampos de los animales y su relación con la memoria espacial de los mismos.
- Estudiar parte del metiloma de los hipocampos de los animales y su relación con la memoria espacial de los mismos.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron trece ratas hembra Sprague-Dawley (SD) jóvenes (edad promedio 2,6 meses; rango ± 2 días) y 11 viejas (26,6 meses; rango ± 5 días) con un peso ($X \pm SEM$) de 165 ± 5 y 250 ± 9 g, respectivamente. Los animales se alojaban en una habitación con temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ C$) en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h. Comida y agua estaban disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las Pautas de Bienestar Animal de NIH (Garantía de Bienestar Animal de INIBIOLP No A5647-01). La aceptabilidad ética de los protocolos con animales aquí utilizados ha sido aprobada por nuestra CICUAL institucional (Protocolo # T09-01-2013).

Laberinto de Barnes

El protocolo del laberinto de Barnes modificado utilizado en este estudio se basó en un procedimiento descrito previamente (Morel et al., 2015). La mesa de comportamiento consiste en una plataforma circular elevada (108 cm hasta el suelo) de acrílico negro, de 122 cm de diámetro, que contiene veinte agujeros alrededor en la periferia. Los orificios tienen un diámetro de 10 cm y apariencia uniforme, pero solo uno de ellos está conectado a una caja de escape negra. La caja de escape mide 38,7 cm de largo x 12,1 cm de ancho x 14,2 cm de profundidad y es extraíble. Se usó un receptáculo circular blanco (de 30 cm de diámetro y 15 cm de alto, sin fondo) para colocar las ratas en la plataforma. Se colocaron cuatro señales visuales proximales en la habitación, a 50 cm de la plataforma circular, cada una con una forma geométrica distinta. El orificio de escape se numeró como orificio 0 para fines de representación gráfica normalizada, los orificios restantes se numeraron del 1 al 10 en el sentido de las agujas del reloj y del -1 al -9 en el sentido contrario a las agujas del reloj.

El agujero 0 permanece en una posición fija en relación con las señales para evitar la aleatorización de la posición relativa de la caja de escape.

Durante las pruebas, la plataforma se rotó diariamente. Un generador de ruido blanco de 90 dB y una bombilla de luz blanca de 500 W proporcionaron el estímulo aversivo de escape de la plataforma. Utilizamos un protocolo abreviado basado en tres días de dos pruebas de adquisición (AT) cada uno, seguidas de una prueba de evaluación (PT) (un día después del entrenamiento) para evaluar la retención de la memoria espacial. Un AT consiste en colocar una rata en el receptáculo de inicio durante 30 s, luego quita el receptáculo y se encienden los estímulos aversivos (luz brillante y ruido de tono alto) y se permite que la rata explore libremente el laberinto durante 120 s. Una prueba de evaluación se define como una prueba en la que se ha retirado la caja de escape, y su propósito es evaluar la frecuencia de exploración y tiempo de permanencia en el orificio de escape vacío y los orificios cercanos. Después de quitar el receptáculo de inicio, se le da a la rata 120 s para explorar y se registra el número de exploraciones y tiempo por hoyo.

El día anterior a la primera prueba (día experimental 0), las ratas se sometieron a una rutina de habituación para que se familiarizaran con la plataforma y la caja de escape. En cada AT, las ratas fueron probadas (120 s por ensayo) con la caja de escape colocada, dos veces al día durante 3 días consecutivos (día experimental 1 a 3). El día 4, las ratas se sometieron a una prueba de evaluación (PT) durante 120 s sin caja de escape. Para eliminar pistas olfativas del laberinto y de las cajas, las superficies se limpiaron con solución de alcohol etílico al 10%, después de cada ensayo. Las actuaciones conductuales se registraron utilizando una cámara de video conectada a una computadora montada a 110 cm por encima de la plataforma. Las actuaciones grabadas en video de los sujetos se midieron utilizando el software Kinovea v0.7.6 (<http://www.kinovea.org>) e Image Pro Plus v5.1 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD). Los parámetros conductuales evaluados fueron los siguientes.

Latencia de la caja de escape: tiempo (en s) que pasa un animal desde que sale de la cámara de inicio hasta que ingresa a la caja de escape.

La frecuencia de exploración de agujeros durante el PT está representada por un gráfico de barras típicamente en forma de campana alrededor del agujero de escape. El gráfico muestra 20 barras, cada una correspondiente a un agujero específico. Para un agujero dado, la frecuencia exploratoria es el número promedio de exploraciones de ese agujero por todas las ratas.

Permanencia en el sector de meta (GS): Es el área de la plataforma correspondiente a un número determinado de hoyos. Así GS1 es el área correspondiente al hoyo 0; GS3, es el área correspondiente a los agujeros -1, 0, +1. El tiempo de permanencia en GS3 se calcula

tomando el tiempo de permanencia de las ratas en el área cubierta por los 3 huecos durante el PT.

Frecuencia exploratoria total del agujero meta: número de exploraciones totales al agujero 0.

Disección del hipocampo

Las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro con cuidado, seccionando los nervios ópticos y el tallo pituitario y se colocó en una placa fría. El hipocampo se diseccionó de la corteza en ambos hemisferios usando fórceps. Este procedimiento de disección también se realizó en los bloques anterior y posterior, colocando alternativamente el lado caudal del cerebro hacia arriba y el lado rostral hacia arriba. Después de la disección, cada hipocampo se dividió por la mitad sagitalmente. La mitad se fijó en formalina al 4% tamponada con PBS y la segunda se colocó inmediatamente en un tubo de 1,5 ml y se sumergió momentáneamente en nitrógeno líquido, luego se almacenó a -80 °C para la extracción de ADN.

Extracción de ADN del hipocampo

El ADN del hipocampo se extrajo utilizando una plataforma de extracción de ácido nucleico automatizada llamada QIAcube HT (Qiagen) con un kit de extracción basado en columna, QIAamp 96 DNA QIAcube HT Kit (Qiagen).

Análisis de purificación y metilación del ADN genómico

El ADN de los hemihipocampos se purificó utilizando el kit de sangre y tejido DNeasy (Qiagen). Sólo las muestras de ADN con proporciones de 260/280 superiores a 2,0 se procesaron para el análisis de metilación. La conversión de bisulfito de ADN genómico se realizó utilizando el kit de metilación EZ (Zymo Research, D5002), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico convertido fue analizado por Illumina Infinium HorvathMammalMethylChip40 en las instalaciones centrales del UNGC (UCLA Neuroscience Genomics Core). El Horvath Mammal40 Methyl Chip proporciona mediciones cuantitativas de la metilación del ADN para 22528 dinucleótidos CpG que se asignan al genoma de *Rattus norvegicus* UCSC 6.0 (y otras secuencias de mamíferos) (Arneson et al., 2021).

Análisis estadístico de posiciones CpG diferencialmente metiladas

El control de calidad (QC), el preprocesamiento y el análisis estadístico de los perfiles de metilación se realizaron con el paquete "minfi" R/Bioconductor (Aryee et al., 2014).

El análisis de control de calidad se realizó con la función getQC y se procesó previamente con el método Noob/ssNoob. El análisis exploratorio de datos se realizó a través de un análisis de agrupamiento jerárquico no supervisado basado en la distancia euclidiana de los perfiles de metilación. Además, se evaluó la distribución de las medidas de metilación en

cada muestra. Para probar los niveles de metilación diferencial en cada CpG, se realizaron pruebas de hipótesis múltiples a través de un modelo lineal utilizando el paquete "limma" (Ritchie et al., 2015). La tasa de descubrimiento de falsos positivos se controló con un umbral de valor q de 0,05 (Benjamini & Hochberg, 1995).

La prueba de enriquecimiento de ontología génica (GO) para CpGs metiladas positivamente diferencialmente de la matriz HorvathMammal40 se realizó con la función GOMeth del paquete "missMethyl" (Phipson et al., 2016). Se evaluaron conjuntos de genes de Gene Ontology y se informaron las categorías significativas en $FDR < 0.05$.

Para establecer una relación lineal potencial entre la metilación de las CpGs presentes en los términos GO estadísticamente significativos y el parámetro de tiempo de permanencia GS3 de la prueba del laberinto de Barnes, se realizó una regresión lineal.

Determinación de la edad epigenética

La predicción de la edad epigenética se realizó en colaboración con el Dr. Steve Horvath de la Universidad de California Los Angeles.

Para ello, se utilizó el reloj epigenético de *pan-tissue* de rata, que fue uno de los seis relojes de rata puestos a punto con nuestra colaboración en estudios previos (Horvath et al., 2020). El reloj epigenético de *pan-tissue* de rata se desarrolló mediante la regresión de la edad cronológica en CpG de múltiples tejidos de rata que se sabe que se asignan al genoma de *Rattus norvegicus*. La edad no se transformó. Los modelos de regresión penalizados se crearon con la función de R "glmnet" (Simon et al., 2011). Se investigaron los modelos producidos por regresión tipo "red elástica" de Ridge y Lasso ($\alpha = 0.5$). Los parámetros de penalización óptimos en todos los casos se determinaron automáticamente mediante el uso de una validación cruzada interna de 10 veces (cv.glmnet) en el conjunto de entrenamiento. Por definición, el valor α para la regresión neta elástica se estableció en 0,5 (punto medio entre la regresión de tipo Ridge y Lasso) y no se optimizó para el rendimiento del modelo. Se realizó un esquema de validación cruzada para llegar a estimaciones imparciales (o al menos menos sesgadas) de la precisión de los estimadores de edad de *pan-tissue* basados en la metilación del ADN. Un tipo consistía en omitir una sola muestra (LOOCV) de la regresión, predecir una edad para esa muestra e iterar sobre todas las muestras.

Resultados

Control de calidad de los datos de metilación de las CpGs provistas por el chip.

Para evaluar la calidad de las muestras, se evaluó la distribución de los valores de metilación en cada muestra. Las mismas seguían el mismo patrón y no presentaban valores atípicos. (Figura 37)

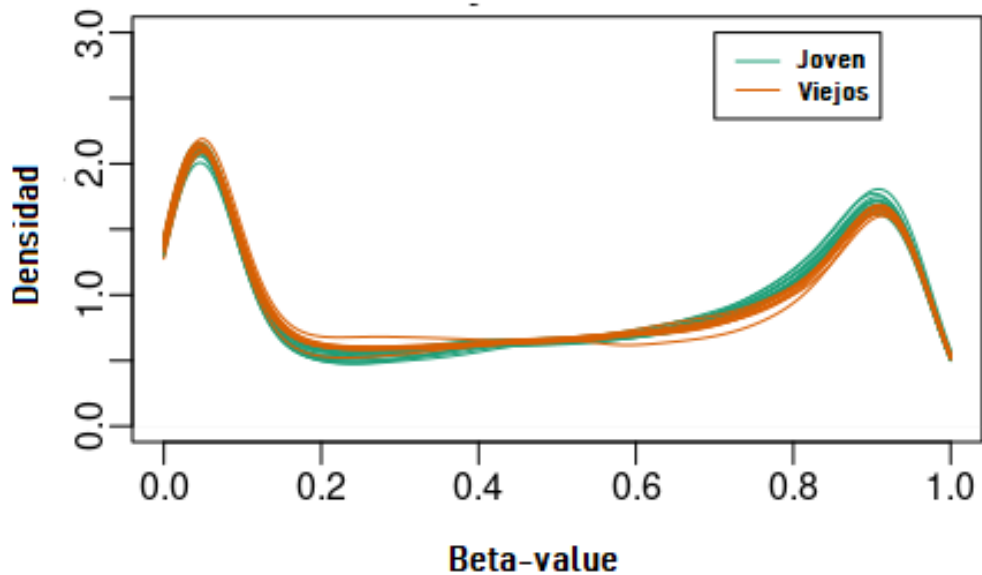


Figura 37 Gráfico de densidad mostrando la distribución de los valores beta para cada una de las muestras estudiadas. Ninguna muestra manifestó valores atípicos. Las líneas naranjas representan las muestras de hipocampo de rata envejecida mientras que las líneas verdes las muestras de hipocampo de rata joven.

El análisis exploratorio de datos se realizó a través de un agrupamiento jerárquico no supervisado, en él pueden distinguirse claramente ambos grupos etarios. (Figura 38)

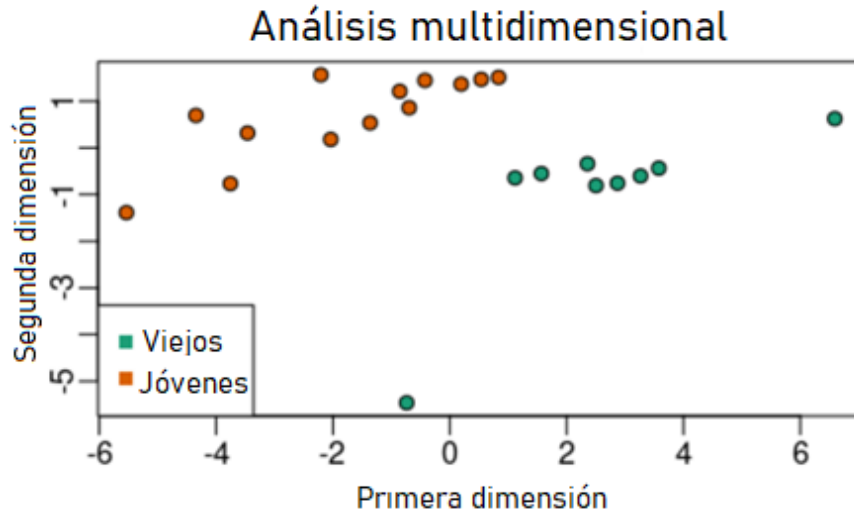


Figura 38 Gráfico de escala multidimensional (MDS) de los perfiles de metilación del ADN en el hipocampo de animales jóvenes y viejos. En el MDS, las muestras se agruparon según la edad de las ratas, como se esperaba.

Análisis de las CpGs diferencialmente metiladas con la edad

La evaluación de cada grupo de edad mostró que los niveles de metilación de 7222 CpGs fueron estadísticamente diferentes entre muestras de hipocampo jóvenes y viejas (valor $q < 0,05$). (Figura 39) De estas, 1090 CpGs exhibieron una mayor metilación (valores beta más altos) con la edad, mientras que 5252 CpGs mostraron niveles de metilación disminuidos.

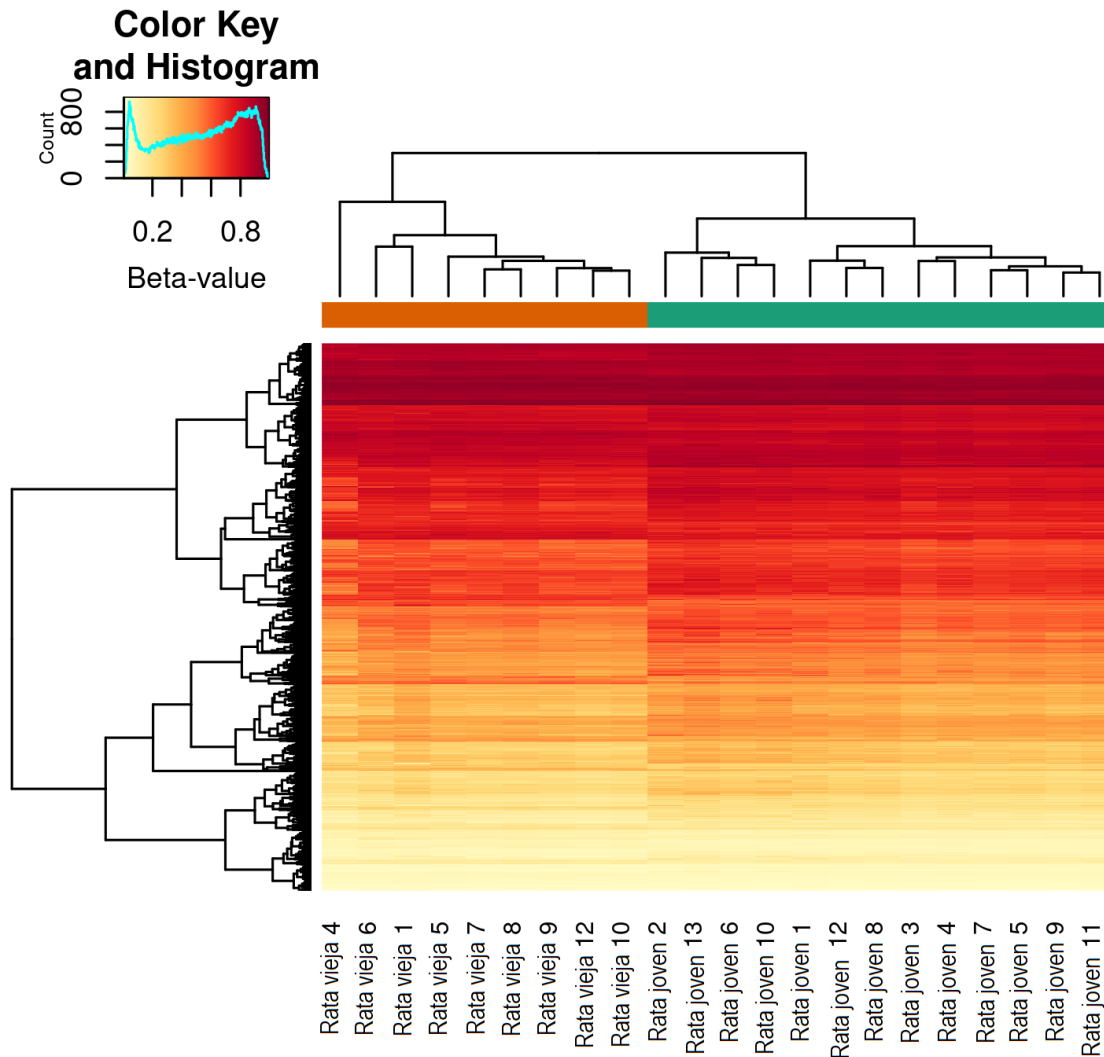


Figura 39 Mapa de calor de sitios CpG diferencialmente metilados en el grupo de rata vieja (franja naranja) en comparación con el grupo joven (franja verde). El amarillo indica los CpG con los niveles de metilación más bajos (valores beta cercanos a 0) y el rojo indica los CpG con los niveles de metilación más altos (valores beta cercanos a 1). Las muestras se agruparon en base a un agrupamiento jerárquico de aprendizaje automatizado.

Se localizaron dichas CpGs en el contexto genómico en base a su cercanía a: promotor, exón, intrón, intergénico, 5'UTR o 3'UTR. El perfil de distribución de las características de CpG en el genoma se muestra en la figura 40. El perfil de la distribución de características en CpG metilados positiva y negativamente es similar y ambos son similares a la distribución de las posiciones de características de los CpG de *Rattus norvegicus* presentes en el Illumina Infinium HorvathMammalMethylChip40. El número de CpGs localizados en islas de CpGs fue de 869.

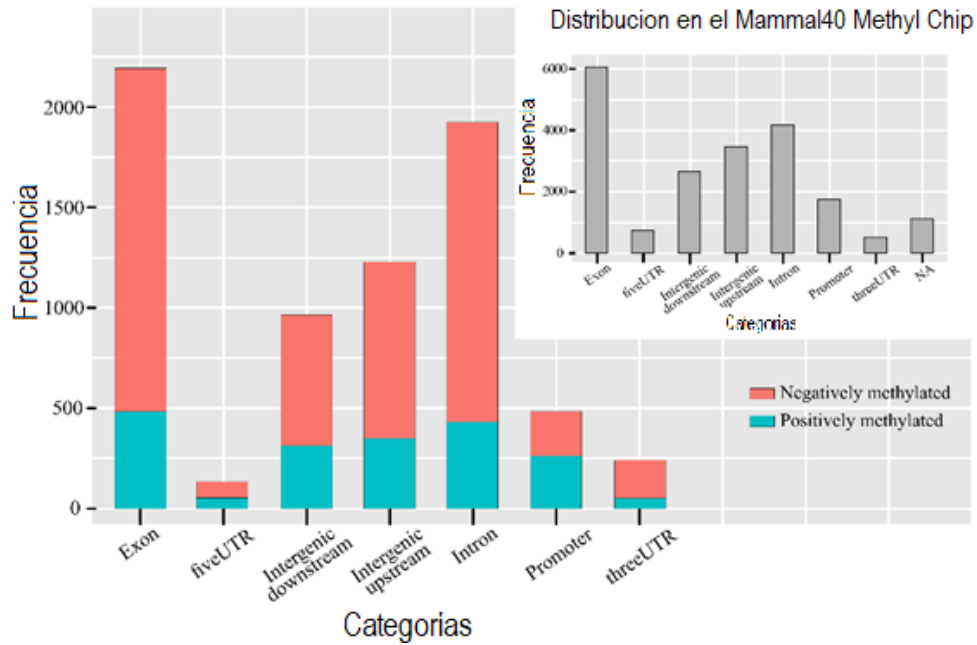


Figura 40 Posiciones de genómicas de las CpG diferencialmente metiladas. Gráfico de barras combinado de las ubicaciones genómicas para los CpG metilados positivamente dependientes de la edad (en color celeste) y los CpG metilados negativamente (en color rosa). De izquierda a derecha las barras representan las CpGs ubicadas en: exon, 5'UTR, región intergenica downstream, región intergénica upstream, intron, promotor y 3'UTR. Recuadro: distribución de características de sondas presentes en el genoma de *Rattus norvegicus* en el chip Illumina Infinium Horvath Mammal40 Methyl.

Para identificar las relaciones potenciales entre las diferencias relacionadas a la edad en la metilación del ADN y el sistema nervioso (hipocampo), realizamos un análisis de vía de enriquecimiento génico. Veintinueve conjuntos de genes se enriquecieron significativamente en las CpGs positivamente metilados (FDR <0.05). Entre ellos, tres procesos biológicos están relacionados con el sistema nervioso: la determinación de destino neuronal (*neuron fate commitment*), el desarrollo del cerebro (*brain development*) y el desarrollo del sistema nervioso central (*central nervous system development*). Por el contrario, al evaluar el enriquecimiento de CpGs metiladas negativamente, ningún conjunto de genes se enriqueció significativamente. (Figura 41)

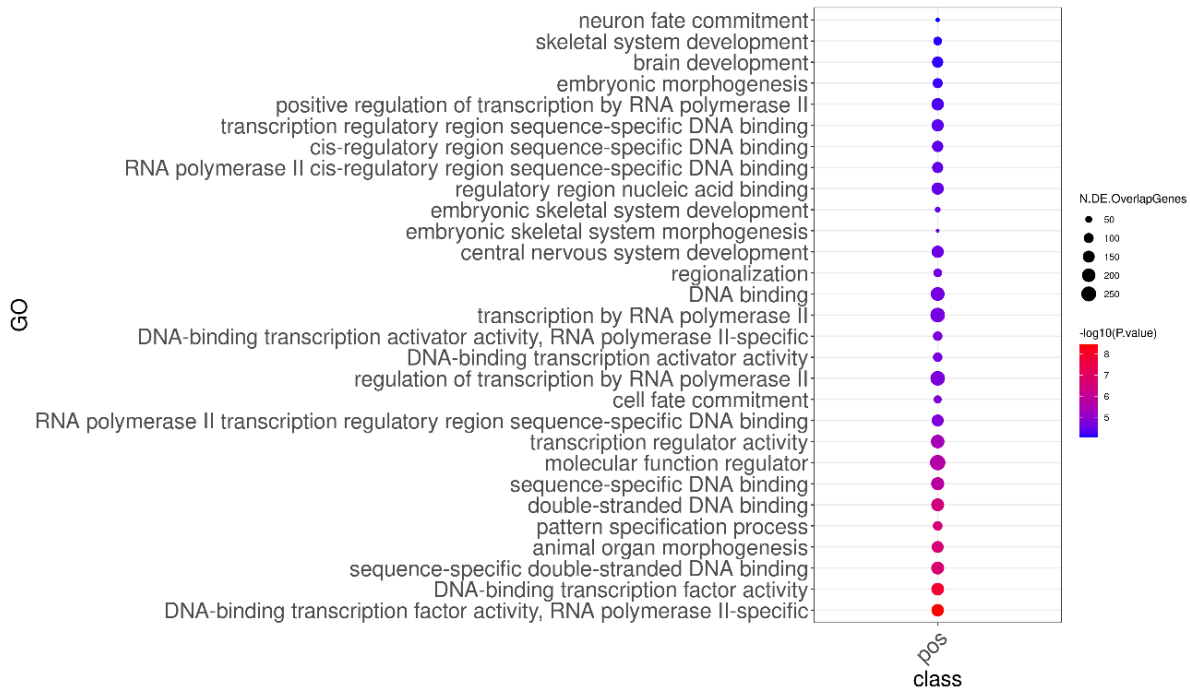


Figura 41 Enriquecimiento de ontología génica para CpG metilados positivamente. Se muestra gráfico de puntos para conjuntos de genes significativos con $FDR < 0.05$. El tamaño del círculo representa el número de genes que presentan CpG diferencialmente metilados en un conjunto génico o término de ontología génica (GO) particular.

Evaluación de la memoria espacial de ratas jóvenes y viejas en la prueba del laberinto de Barnes

Todos los parámetros de memoria espacial evaluados con la prueba del laberinto de Barnes mostraron una marcada disminución con la edad. Específicamente, el tiempo de permanencia en GS1 y GS3 se redujo en un 88 y 74% respectivamente en comparación con sus contrapartes jóvenes (Fig. 42, panel B). La frecuencia exploratoria total, un parámetro de la iniciativa exploratoria de los animales, cayó un 61% en comparación con sus contrapartes jóvenes (Fig. 42 panel C). Durante la prueba de evaluación, la frecuencia de exploración de agujeros de las ratas viejas mostró una distribución en forma de campana más plana alrededor del agujero 0 que sus contrapartes jóvenes. La mayor diferencia se detectó en el agujero 0 (93 %) (Fig. 42, panel D y recuadro, respectivamente). La latencia para escapar, una medida del desempeño del aprendizaje y la retención de la memoria que es inversamente proporcional al rendimiento de la memoria y el aprendizaje, mostró un aumento del 77 % en las ratas viejas frente a las contrapartes jóvenes (Fig. 42, panel E).

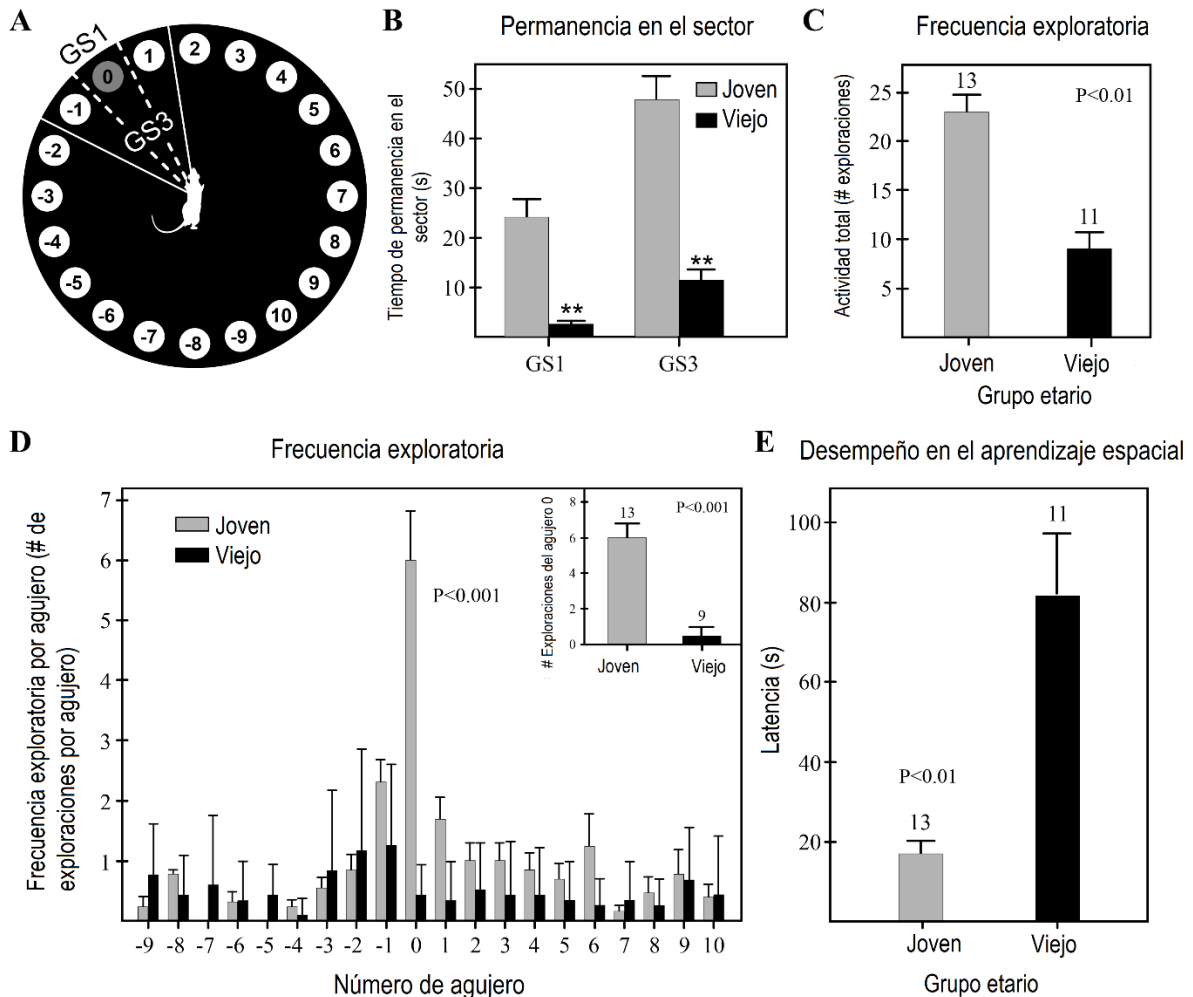


Figura 42 Resumen de los parámetros de la memoria espacial en ratas hembra jóvenes y viejas. A) plataforma del laberinto de Barnes que muestra las áreas del sector meta 1 (GS1) y el sector meta 3 (GS3). Panel B) Impacto del envejecimiento en la permanencia de GS1 y GS3. La permanencia se expresa como el tiempo de permanencia en el sector correspondiente durante el tiempo de prueba (2 min). C) Frecuencia exploratoria de la caja de escape en animales jóvenes y viejos. D) Frecuencia de exploración de todos los agujeros en las ratas jóvenes y viejas. Recuadro: número de exploraciones del orificio 0 (orificio de escape) en ratas jóvenes y viejas durante la prueba de evaluación (PT). E) Efecto del envejecimiento sobre el aprendizaje y la retención de la memoria espacial en ratas. Las columnas representan la latencia del orificio de escape (segundos que tardan las ratas en encontrar el orificio de escape) al final del entrenamiento.

Predicción de la edad epigenética de los hipocampus

Mientras que la edad cronológica mide el tiempo físico transcurrido desde que nacieron las ratas, la edad epigenética refleja el tiempo biológico, es decir, la dinámica biológica de un organismo. Un análisis de regresión de la edad del ADNm (edad epigenética) del hipocampo frente a la edad cronológica mostró un valor de R muy alto ($R = 0,99$) usando datos de prueba (Fig. 43, panel A). La pendiente era < 1 y la línea de regresión intersecaba el eje Y casi a los 3 meses. Los mismos datos mostrados en un gráfico de barras revelaron que en ratas jóvenes el tiempo epigenético se mueve más rápido que el tiempo físico (los animales eran epigenéticamente más viejos que lo indicado por la edad cronológica), pero en edades

más avanzadas el tiempo epigenético se mueve más lento que el tiempo físico, de modo que mientras la edad cronológica del grupo de edad tenía 26,6 meses, su edad epigenética era de solo 20,1 meses (Fig. 43, panel B).

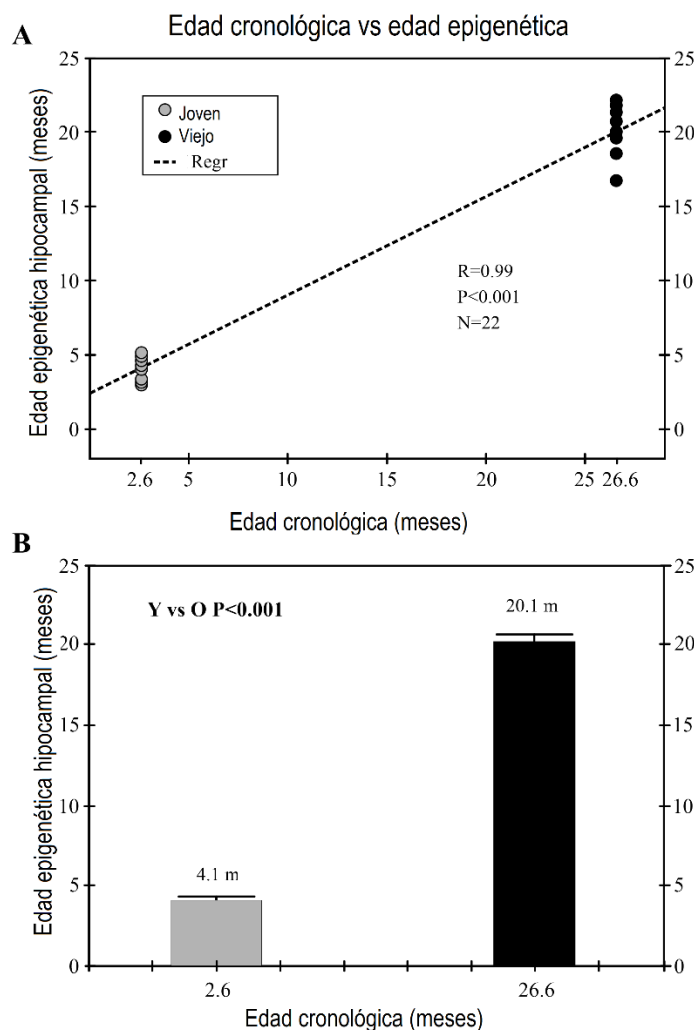


Figura 43 Correlación de la edad del epigenética del hipocampo frente a la edad cronológica en ratas hembra. A) Gráfica de regresión de la edad epigenética del hipocampo frente a la edad cronológica. Si bien existe una alta correlación entre los dos tipos de edad, la pendiente no es =1, es decir, no son idénticos. B) Se dibuja el mismo gráfico como un gráfico de barras. A edades tempranas el reloj epigenético avanza más rápido que el reloj físico. En los animales viejos, el tictac del reloj epigenético es más lento que el del tiempo físico.

Correlación de la memoria con la edad epigenética del hipocampo y la metilación del ADN

Se realizó un análisis de regresión entre los datos de la prueba del laberinto de Barnes y la edad epigenética del hipocampo. Cuando se tomaron datos de ratas jóvenes y viejas juntas, se encontró una regresión significativa para la frecuencia de exploración del hoyo 0 ($R=0.77$). Para el tiempo de permanencia de GS1 y GS3 la regresión fue significativa en ambos casos con $R=0.72$ y 0.79 , respectivamente (Fig. 44 paneles A, B y C). Esto es esperable ya que la edad epigenética y el desempeño en las pruebas de Barnes están confundidas con la

edad. En cambio, cuando las regresiones se realizaron usando datos de ratas jóvenes o viejas solas, no se encontró una regresión significativa.

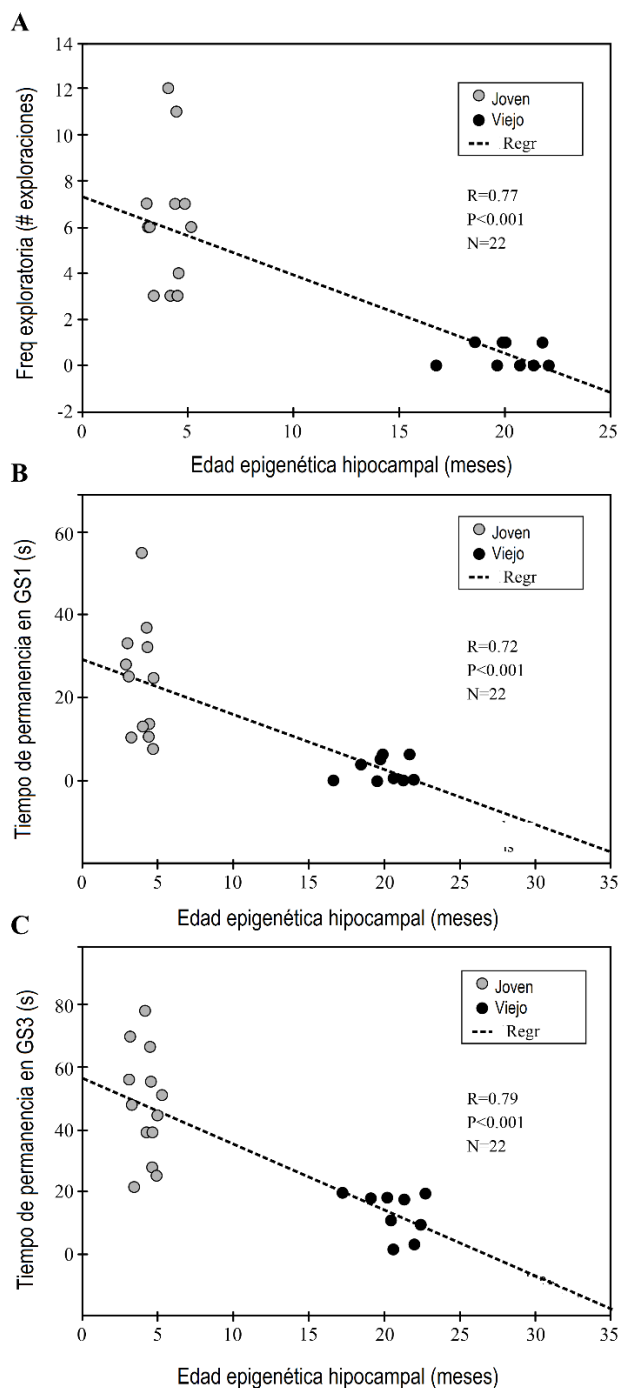


Figura 44 Gráficos de regresión que correlacionan las variables de memoria espacial medidas por la prueba del laberinto de Barnes frente a la edad epigenética del hipocampo. A) regresión de la frecuencia de exploración de agujeros frente a la edad epigenética del hipocampo en ratas jóvenes y viejas. La regresión es muy significativa. B) tiempo empleado por las ratas en el sector objetivo 1 representado frente a la edad epigenética del hipocampo. En este caso, la regresión también es muy significativa. C) Mismo gráfico para permanencia GS3. La regresión también es muy significativa aquí.

El último objetivo en el análisis del metiloma identificar la posible correlación entre los cambios relacionados con la edad en los niveles de metilación de CpG y el rendimiento de la memoria mediada por el hipocampo. El objetivo fue determinar la relación entre las diferencias asociadas a la edad en el rendimiento de la memoria y los niveles de metilación de CpG cerca de los genes de factores de transcripción implicados en el desarrollo del sistema nervioso. Para ello, se llevó a cabo un análisis de regresión para la metilación de dichos sitios CpG versus el tiempo de permanencia GS3 de la prueba del laberinto de Barnes. La razón por la que se eligió la permanencia de GS3 sobre otros parámetros del laberinto de Barnes es que refleja de forma fiable el rendimiento de la memoria espacial en su conjunto.

En el hipocampo de rata vieja, encontramos que los niveles de metilación de 14 CpG se correlacionan negativamente con el tiempo de permanencia en el sector GS3 (Fig. 45). Esos CpG están próximos a los genes de los factores de transcripción Pax5, Lbx1, Nr2f2, Hnf1b, Zic1, Zic4, Hoxd9; Hoxd10, Gli3, Gsx1 y Lmx1b, y Nipbl.

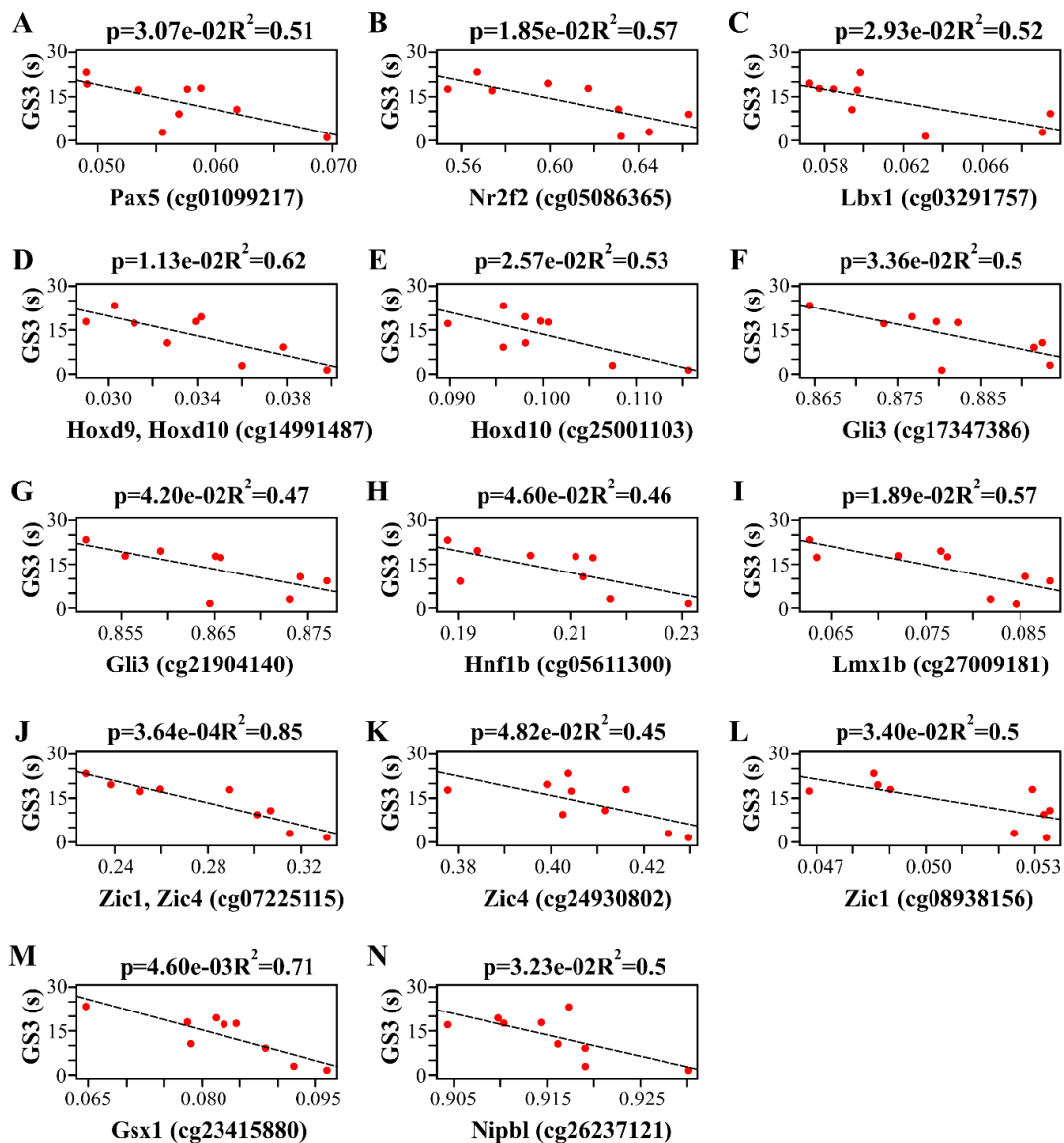


Figura 45 Gráficos de regresión que correlacionan la metilación (valor beta) de la CpG involucrada en el sistema nervioso central frente al tiempo de permanencia en el sector del laberinto de Barnes GS3: en hipocampus de rata vieja, los niveles de metilación de 14 CpG se correlacionan negativamente con el tiempo de permanencia en el sector GS3. Los CpG están próximos a los factores de transcripción asociados con los genes Pax5, Lbx1, Nr2f2, Hnf1b, Zic1, Zic4, Hoxd9; Hoxd10, Gli3, Gsx1 y Lmx1b, y Nipbl.

Discusión

En el cerebro, la metilación del ADN regula las actividades neuronales y la formación de la memoria a través del control de la expresión génica en las neuronas (Liu et al., 2009). Los primeros estudios mostraron que se produce una pérdida global de metilación del ADN en el cerebro de la rata durante el envejecimiento (Klose & Bird, 2006). En el hipocampo de la rata se observó que 73% de las 7222 CpGs cuya metilación es significativamente diferente con la edad, mientras que el 15% incrementan su metilación. Así, en el envejecimiento del hipocampo predomina la desmetilación del ADN. Esto es consistente con la observación

más general de que, casi invariablemente, el envejecimiento en mamíferos se asocia más comúnmente con la hipometilación de CpGs, particularmente en secuencias repetitivas de ADN (Bjornsson et al., 2008; Bollati et al., 2009; Bormann et al., 2016; Christensen et al., 2009). Es probable que esto sea debido, al menos en parte, a la desmetilación producida de manera azarosa. Esto a su vez es sustentado por el hecho de que en este estudio no se han encontrados conjuntos de genes enriquecidos para las CpGs hipometiladas.

En el hipocampo, el envejecimiento no parece tener un impacto significativo en los niveles de metilación de las islas CpG, ya que sólo el 12% de las CpGs metiladas diferencialmente se localizó en estas regiones de ADN.

En un estudio reciente, nuestro laboratorio colaboró con varios grupos para la puesta a punto de múltiples relojes epigenéticos para ratas macho y hembra Sprague Dawley, incluido el diseño de un reloj epigenético general para esta especie denominado “*pan-tissue*” (Steve Horvath, 2020). Con esta nueva herramienta, se pudo observar que la tasa de envejecimiento epigenético de los tejidos periféricos, incluidos el hígado, los ovarios, la piel, el tejido adiposo y la sangre muestran características comparables a las reportadas en humanos y ratones (Lehmann, Zappa-Villar, et al., 2019; Meer et al., 2018).

En ese mismo estudio, el reloj *pan-tissue* de rata se utilizó para evaluar el envejecimiento epigenético de varias regiones cerebrales como la neocorteza, el cerebelo, el hipocampo, la sustancia negra, el hipotálamo y la pituitaria anterior en hembras Sprague Dawley. Entre estas seis regiones, el hipotálamo y la glándula pituitaria mostraron una marcada desviación de la tasa promedio de envejecimiento epigenético del resto de los tejidos. Tanto en la glándula pituitaria como en el hipotálamo, la tasa de envejecimiento epigenético fue sustancialmente más lenta que la tasa promedio de otras regiones del cerebro y tejidos periféricos (Horvath, 20).

Con respecto al desempeño cognitivo de los animales, se observó una diferencia significativa entre ratas jóvenes y seniles para los parámetros de tiempo de permanencia GS1 y GS3. De la misma manera, la performance en la búsqueda activa del agujero meta mayor y estadísticamente significativa. Además, el tiempo transcurrido para encontrar agujero meta por las ratas seniles fue mayor. Estos resultados son esperables y coincidentes con la bibliografía (Morel et al., 2015; Pardo et al., 2017). Se puede apreciar también que existe una mayor variabilidad todos los parámetros del grupo etario mayor.

En la presente tesis, la edad epigenética de los hipocampos de las ratas se predijo utilizando el reloj *pan-tissue* de rata. Las predicciones de la edad epigenética explican la variación de la edad epigenética con la edad cronológica en un 0.99 de los animales, siendo un marcador de gran precisión para el tejido hipocampal. Sin embargo, la edad epigenética no predijo la memoria de los animales, ya que en ningún caso las regresiones de grupos de edad

individuales fueron significativas. Esto puede deberse a que, para realizar la predicción, el algoritmo del reloj epigenético elige las CpGs que cambian más precisamente con la edad, sin ser parte necesariamente de genes, es decir de tener una función biológica relacionada.

Dado que los niveles de hipermetilación de un grupo de 14 CpGs del hipocampo en ratas viejas se correlacionaron significativamente con el rendimiento de la memoria espacial, y se cree que la edad epigenética refleja la edad biológica en lugar de la cronológica, esperábamos que la regresión de diferentes índices del laberinto de Barnes versus la edad epigenética del hipocampo en ratas viejas revelara una asociación significativa. El hecho de que no haya regresión significativa sugiere que la hipermetilación de ciertas CpGs del hipocampo puede desempeñar un papel más relevante en la función de la memoria que la edad del ADN.

La observación de que el reloj epigenético del hipocampo anda más rápido que el tiempo físico a edades más jóvenes, pero la tasa del tiempo epigenético se vuelve más lenta que el tiempo físico en ratas viejas es consistente con el hecho de que los cambios de desarrollo son más rápidos en animales jóvenes que en animales viejos.

En las ratas viejas, el enriquecimiento en términos de ontología génica arrojó una serie de genes de los factores de transcripción cuyas CpGs cercanas aumentan su metilación durante el envejecimiento en el hipocampo de la rata. Entre ellos, se encuentran términos asociados al desarrollo del sistema nervioso, siendo probable que la metilación de estos genes sean parte del desarrollo biológico.

En el grupo de ratas viejas de 26,6 meses de edad se identificaron 14 CpGs cuyos niveles de metilación están significativa e inversamente asociados con la función de memoria espacial, evaluado por el parámetro de permanencia de GS3. Esto sugiere, aunque no prueba, que los niveles de metilación de esos CpG están causalmente involucrados en el deterioro observado de la función de memoria espacial relacionado con la edad.

Varias de esas 14 CpGs están próximos a los genes de las familias Zic y Gli. El dedo de zinc de los genes del cerebelo Zic y el dedo de zinc de la familia Gli, desempeñan funciones específicas en el desarrollo (Aruga, 2004; Hui & Angers, 2011). Se ha encontrado que la expresión de los genes Zic1, Zic4 y Gli3 está disminuida en el hipocampo envejecido de ratas Sprague Dawley (Shavlakadze et al., 2019). También se ha reportado que las proteínas de las familias Zic y Gli interactúan entre ellas y regulan su transcripción a través de sus respectivos dominios de dedos de zinc. Además, Zic 1 contribuye a la translocación de Gli3 del citoplasma al núcleo (Koyabu et al., 2001).

Las proteínas Gli forman parte de la vía de señalización Hedgehog, actúan como factores de transcripción activadores (o represores, en ausencia de la proteína Sonic Hedgehog) sobre

los genes diana en el último paso de la vía (Jacob & Briscoe, 2003). Estudios realizados en varias especies concluyeron que la ausencia de Zic puede reprimir la señalización de Sonic hedgehog (Shh), probablemente por la interacción entre las proteínas Zic y Gli (Bellchambers & Ware, 2018). Se ha sugerido que la señalización de Shh está involucrada en los trastornos neurológicos relacionados con la edad, ya que media en la formación y plasticidad de los circuitos neuronales (Yao et al., 2016). Por lo tanto, los resultados sugieren que el aumento en la metilación de CpG de estos genes en el hipocampo de ratas viejas puede tener un impacto negativo en el rendimiento cognitivo de los animales, posiblemente a través de los efectos de la vía de señalización Shh en la memoria mediada por el hipocampo, entre otras vías.

Conclusiones

El reciente desarrollo de Illumina Infinium HorvathMammalMethylChip40, un chip de metilación de mamíferos que posee una alta fidelidad en humanos, ratas y ratones (Arneson et al., 2021), ha permitido aprovechar una serie de ventajas que ofrece la rata como modelo animal. Por ejemplo, su tamaño, que es 10 veces mayor que el tamaño de un ratón, es una característica que permite extraer suficiente ADN tisular de regiones cerebrales pequeñas como el hipocampo.

Así, en un estudio previo nuestro grupo pudo predecir la edad epigenética y otras características relacionadas a la metilación del ADN durante el envejecimiento (Horvath, 2013). En este contexto, los resultados de la presente tesis, centrados en la metilación del ADN del hipocampo, muestran que 7222 CpGs modifican su metilación con la edad y parte de las que sufren hipermetilación asociada a la edad se encuentran presentes en genes asociados al desarrollo del sistema nervioso central. Más aún, la metilación de ciertas CpGs se correlaciona con el rendimiento de la memoria espacial de las ratas. En particular, la hipermetilación asociada a la edad de ciertos factores de transcripción las familias de genes Zic y Gli podrían desempeñar un papel causal en la disminución de la memoria espacial durante el envejecimiento. Por otra parte, al estudiar la edad epigenética no se observó correlación sobre la memoria espacial de las ratas, más que por el efecto propio de la edad.

Este es el primer estudio documentado en animales de experimentación que vincula los cambios relacionados con la edad en los niveles de metilación del hipocampo relacionados con genes particulares con la disminución de la memoria espacial durante el envejecimiento. Estos resultados ofrecen valiosos valores de referencia para futuros estudios epigenéticos que evalúen la efectividad de las estrategias de prolongación de la vida o rejuvenecimiento en esta especie.

Capítulo 4

Hipótesis

La terapia génica con OSKM mediante transducción del adenovirus HD-OSKM en el giro dentado de la rata hembra envejecida revierte el detrimento observado en la memoria espacial y aprendizaje de los animales.

Objetivos

Estudiar los cambios en la memoria espacial y el aprendizaje de la rata Sprague Dawley hembra envejecida sometida a terapia génica con el adenovirus HD-OSKM.

- Realizar terapia génica de largo plazo con el adenovirus HD-OSKM mediante cirugía estereotáxica en el giro dentado del hipocampo de la rata envejecida.
- Evaluar el desempeño cognitivo de los animales tratados con el adenovirus HD-OSKM mediante la prueba del laberinto de Barnes.
- Evaluar diferencias presentadas en poblaciones celulares como neuronas.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron doce ratas hembra Sprague-Dawley (SD) jóvenes (edad promedio 3,9 meses; rango \pm 5 días) y 31 ratas envejecidas (25,6 meses; rango \pm 5 días), dividiéndose en 15 animales para el grupo control y 16 para el grupo experimental. Los animales se alojaban en una habitación con temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h. Comida y agua estuvieron disponibles *ad libitum*. Todos los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con las Pautas de Bienestar Animal de NIH (Garantía de Bienestar Animal de INIBIOLP No A5647-01). La aceptabilidad ética de los protocolos con animales aquí utilizados ha sido aprobado por nuestra CICUAL institucional (Protocolo #06-08-2018).

Adenovirus

En los animales del grupo experimental se utilizó el adenovirus dependiente de auxiliar OSKM descrito y generado en el Capítulo 1. El título del lote utilizado en este experimento fue de 1×10^{15} partículas fluorescentes/ml.

Como adenovector control inyectado en los animales del grupo control, se utilizó un adenovirus de primera generación el cual contiene la proteína fluorescente verde GFP. El título del lote del Rad-GFP fue de 5×10^{11} pfu/ml.

Cirugía estereotáxica

Las cirugías se realizaron en condiciones de asepsia. Las ratas fueron anestesiadas con clorhidrato de ketamina intraperitonealmente (40 mg/kg de PC) y xilacina intramuscularmente (8 mg/kg de PC), previamente a ser colocadas en el aparato

estereotáxico. A continuación, se cortó el pelo de los animales y se desinfectó el cuero cabelludo, se realizó una incisión en la piel de la calota y se eliminaron las membranas que recubren el cráneo para poder visualizar el bregma y establecer las coordenadas de inyección.

Las ratas recibieron una inyección bilateral en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo utilizando jeringas Hamilton de 10 μ L. Las coordenadas utilizadas para la inyección intracerebrohipocampal fueron: 3,5 mm anteroposterior; \pm 2 mm mediolateral y - 4 mm dorsoventral, todas medidas relativas a bregma de acuerdo al Atlas del Cerebro de la Rata de Paxinos (Paxinos & Watson, 2014). Las inyecciones fueron de 3 μ L por lado de la suspensión viral correspondiente, a razón de 1 μ L por minuto. Luego de cada inyección, se esperó cinco minutos antes de retirar la aguja para evitar el reflujo de la solución inyectada.

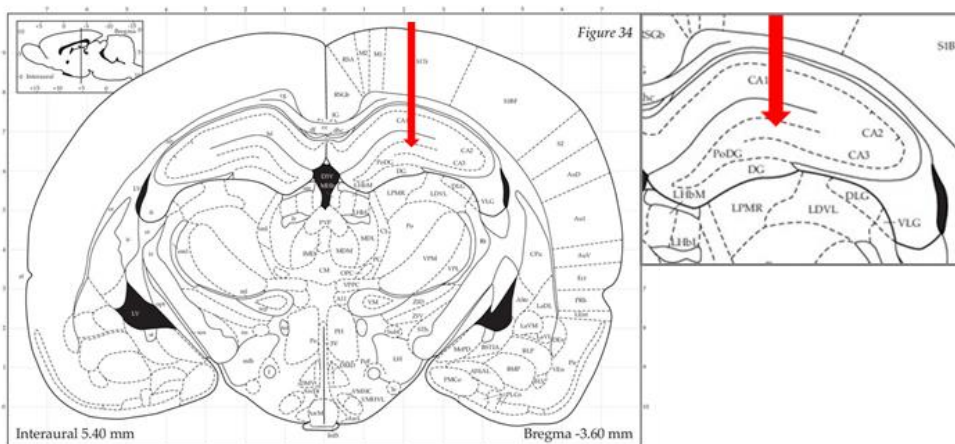


Figura 46 Corte coronal de rata. Esquema de atlas de Paxinos (Paxinos & Watson, 2014). La flecha roja muestra la zona de inyección en el hipocampo dorsal. Las coordenadas utilizadas en la cirugía estereotáxica fueron 3,5 mm anteroposterior; \pm 2 mm mediolateral y - 4 mm dorsoventral.

Diseño experimental

Para la realización de los experimentos con ratas hembra envejecidas, los animales se agruparon de forma completamente aleatorizada en: **Grupo Control Rad-GFP**, 15 ratas seniles que recibieron una inyección estereotáxica de Rad-GFP; y **Grupo HD-OSKM**, 16 ratas seniles que recibieron una inyección estereotáxica de adenovirus HD-OSKM.

Se definió como “día experimental 0” al día de la inyección estereotáxica de los adenovirus en las ratas envejecidas. A los 38 días, los animales se sometieron a la prueba comportamental laberinto de Barnes. El grupo de ratas jóvenes, si bien no fueron sometidas a las cirugías estereotáxicas, se las evaluó en el laberinto. A los 49 días, las ratas fueron sacrificadas.

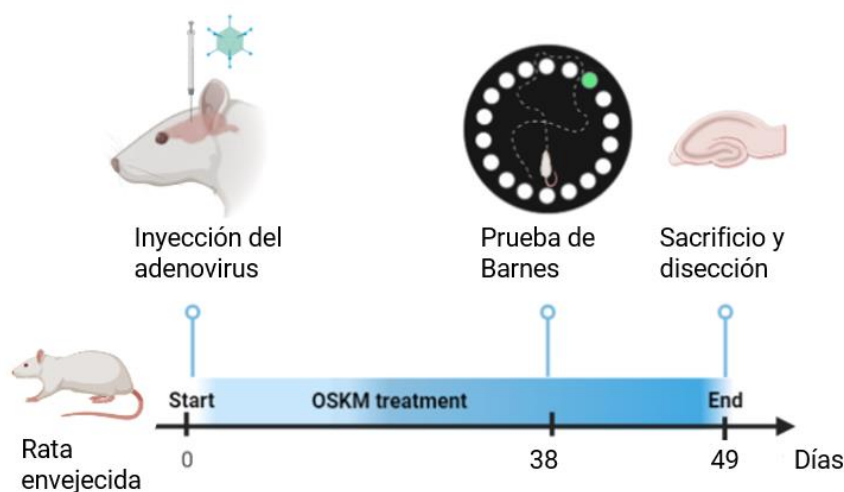


Figura 47 Diseño experimental de la terapia génica con el adenovirus HD-OSKM en el hipocampo de rata envejecida. Las ratas fueron inyectadas en el día 0 (cero). A los 38 días se realizó la prueba de Barnes y una vez finalizada se procedió al sacrificio de los animales y disección de los hipocampos (49 días).

Laberinto de Barnes

La prueba de laberinto de Barnes fue realizada tal como se describe en el Capítulo 3.

Sacrificio de los animales

De cada grupo experimental (jóvenes, envejecidos control y envejecidos tratados), la mitad de los animales fueron sacrificados por decapitación, para la extracción del tejido hipocampal y posterior evaluación de marcadores moleculares. La otra mitad, fue perfundida para realización de estudios histológicos.

Disección del hipocampo

Las ratas se sacrificaron por decapitación, se extrajo el cerebro cuidadosamente, seccionando los nervios ópticos y el tallo pituitario y se colocó en una placa fría. El hipocampo se diseccionó de la corteza en ambos hemisferios usando fórceps. El tejido se sumergió en nitrógeno líquido, luego se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posteriores estudios moleculares.

Perfusión

Los animales fueron dormidos por inhalación de isoflurano y se procedió a la perfusión intracardiaca. Se realizó una incisión a la altura del esternón, y se cortaron el diafragma y

las costillas en la unión costo condral. Una vez expuesto el corazón, se introdujo la cánula en la arteria aorta a través del ventrículo izquierdo con una aguja de punta roma.

Inmediatamente después, se efectuó un pequeño corte con tijera en la aurícula derecha para permitir el drenaje del sistema vascular al final del circuito. Se perfundió a una velocidad de 13 ml/min con una bomba peristáltica (Gilson modelo MP312), primero con 200 ml de buffer fosfato 0,01M y luego 200 ml de paraformaldehído al 4 %, (pH 7,4). Subsecuentemente, los animales se decapitaron con una guillotina, los cerebros se extrajeron cuidadosamente y se almacenaron en PFA al 4% durante toda la noche a 4 °C. Luego, los cerebros fueron conservados en solución criopreservadora (30 % de etilenglicol, 1 % de polivinilpirrolidona, 30 % de sacarosa, en PB 0,1 M, pH 7,4) a -20 °C. Al momento de utilizarlos, se cortaron coronalmente en secciones de 40 µm con vibrátomo (VT1000S; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) y se dividieron en doce series, cada serie conteniendo una de cada doce secciones. De esta manera se obtuvo un conjunto de secciones seriadas no contiguas que abarcaba el hipocampo dorsal (con una separación de 480 µm).

Inmunohistoquímica

Para el factor de transcripción OCT4

El protocolo se realizó con los cortes montados sobre vidrio. Para ello, los cortes de 40 µm se dejaron secar montados por 2 h a 37°C. Se realizó recuperación antigénica con buffer citrato por 15 min a 90°C. Los vidrios se dejaron enfriar en el buffer hasta alcanzar temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados con solución de lavado (PB 0,01 M, tritón 0,03%), de 5 min cada uno. La peroxidasa endógena se inhibió por goteo de los cortes con H₂O₂ 3%, durante 30 min en cámara húmeda. Luego se realizaron tres lavados con solución de lavado, de 5 min cada uno. Posteriormente se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas con suero normal de caballo (SNC) 10% disuelto en solución de lavado, durante 1 h a temperatura ambiente, con una gota por corte. La incubación con el anticuerpo primario anti-Oct 4 (disuelto en solución de lavado, SNC 3%) se realizó en dos etapas, 16h a 4°C y posteriormente 1 h a temperatura ambiente, ambas en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados con solución de lavado durante 5 min cada uno. Se incubó con el anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo 1:300. Se realizaron tres lavados de 5 min cada uno y se incubó con el complejo avidina-biotina, preparado 15 min antes. La incubación fue durante 45 min a temperatura ambiente. Finalmente, se reveló con diaminobenzidina (DAB) 0.025% y H₂O₂ 0,003% en PB durante 5 min, y la reacción fue frenada con agua corriente. Los cortes se dejaron secar y se sometieron a la tinción Nissl descrita más abajo.

Anticuerpo	Huésped	Distribuidor	Características	Dilución
Oct4	Conejo	Cell Signalling Cat. #C30A3C1	Primario	1/200
Biotinilado anti-conejo	Cabra	Vector labs Cat. #BA-1000	Secundario	1/300

Para el marcador de neuronas inmaduras Doblecortina

Este protocolo fue realizado por flotación libre. Las secciones de cerebro se lavaron con PB 0,01 M 3 veces durante 10 minutos, se permeabilizaron con solución de lavado (3 lavados de 10 minutos). A continuación, se inhibió la actividad peroxidasa endógena del tejido mediante la incubación con metanol 50% y peróxido de hidrógeno 3% en solución de lavado durante 30 minutos en agitación, seguido de 3 lavados de 10 minutos con solución de lavado. Posteriormente, se procedió al bloqueo de uniones inespecíficas mediante la incubación de las secciones durante 15 minutos a temperatura ambiente con SNC 10% en solución de lavado. A continuación, se lavaron los cortes con solución de lavado y se incubó el anticuerpo primario anti-doblecortina en solución de lavado 3% SNC 1 h a temperatura ambiente y en agitación. Posteriormente, se retiró el anticuerpo primario y el exceso se lavó con solución de lavado y se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario anti-cabra biotinilado durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras retirar el exceso de anticuerpo secundario y lavar con solución de lavado, se incubaron los cortes con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (kit ABC) durante 90 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras 3 lavados de 10 minutos con solución de lavado, se revelaron las secciones con DAB (Diaminobenzidina 0.025% y H₂O₂ al 0,003% en PB). Cuando la reacción fue visible se detuvo lavando las secciones con agua corriente. Finalmente, los cortes se colocaron en orden en portaobjetos gelatinizados. Los mismos se sometieron a la tinción de Nissl.

Anticuerpo	Huésped	Distribuidor	Características	Dilución
Doblecortina	Cabra	Santa Cruz Cat. #sc-8066	Primario	1/1000
Biotinilado anti-cabra	Caballo	Vector labs Cat. #BA-9500	Secundario	1/300

Tinción de contraste Violeta de Cresilo (Nissl)

Los vidrios previamente secados se dejaron 5 min en agua destilada para hidratarlos controlando que no se despeguen. Se sumergieron en violeta de cresilo 30 s a 37 °C. Luego se realizó la deshidratación, sumergiendo los cortes de la siguiente manera:

2 min 30 s en etanol 96.

2 min 30 s en etanol 96.

2 min en etanol 100.

2 min en etanol 100.

2 min en xilol.

2 min en xilol.

Se cubrieron con bálsamo de Canadá.

Obtención y análisis de las imágenes

En cada bloque cerebral, se seleccionó dos de las doce secciones en serie para obtener un conjunto de secciones en serie no contiguas. Para esta tarea se utilizó un microscopio Olympus BX-51 acoplado a una cámara de video CCD Olympus DP70 (Tokio, Japón). Las células se contaron en cuatro o cinco secciones anatómicamente emparejadas por animal. El número total de células se estimó utilizando una versión modificada del método del disector óptico (West, 1993). Las estimaciones individuales del número total de neuronas bilaterales (N) para cada región se calcularon de acuerdo con la siguiente fórmula: $N = RQ\Sigma \times 1/ssf \times 1/asf \times 1/tsf$, donde $RQ\Sigma$ es la suma de las neuronas contadas, ssf es la fracción de sección de muestreo, asf es la fracción área de muestreo y tsf es la fracción de espesor de muestreo. En todos los casos se utilizó el software Image Pro Plus v5.1 (IPP, Media Cybernetics) para el análisis.

Análisis estadístico

Para la comparación de los pesos corporales se utilizó la Prueba t de Student, se realizó el análisis entre el día 0 y en el día 28. En el análisis de supervivencia de los animales frente al tratamiento, se realizó una prueba de log rank, utilizando el paquete *survival* en R.

Con respecto al test de Barnes, los datos presentaban una distribución no normal. Por ello se sometieron a un análisis estadístico no paramétrico comparando los animales tratados con no tratados, utilizando el test de Mann Whitney.

En relación al conteo de células DCX positivas, para su análisis estadístico se utilizó la prueba t de Student para muestras no apareadas, comparando solo el grupo envejecido tratado contra el grupo control. Las ratas jóvenes se utilizaron a modo de referencia.

Resultados

Evaluación de la expresión del adenovirus HD-OSKM en el giro dentado

Inicialmente, para corroborar la expresión de la transducción por el adenovirus HD-OSKM y la expresión de sus genes, se inyectó bilateralmente 3 μ l del virus en el hipocampo de una rata joven (5 meses). A la rata control se le inyectó Rad-GFP. Ambas cirugías se realizaron siguiendo el protocolo descrito en materiales y métodos. A los 5 días post cirugía, las ratas fueron perfundidas y sus cerebros disecados. Se evaluó la expresión de la proteína GFP y, por inmunohistoquímica, el factor de transcripción Oct4. En la figura 48, se puede observar la presencia de la proteína verde fluorescente, así como del factor de transcripción Oct4.

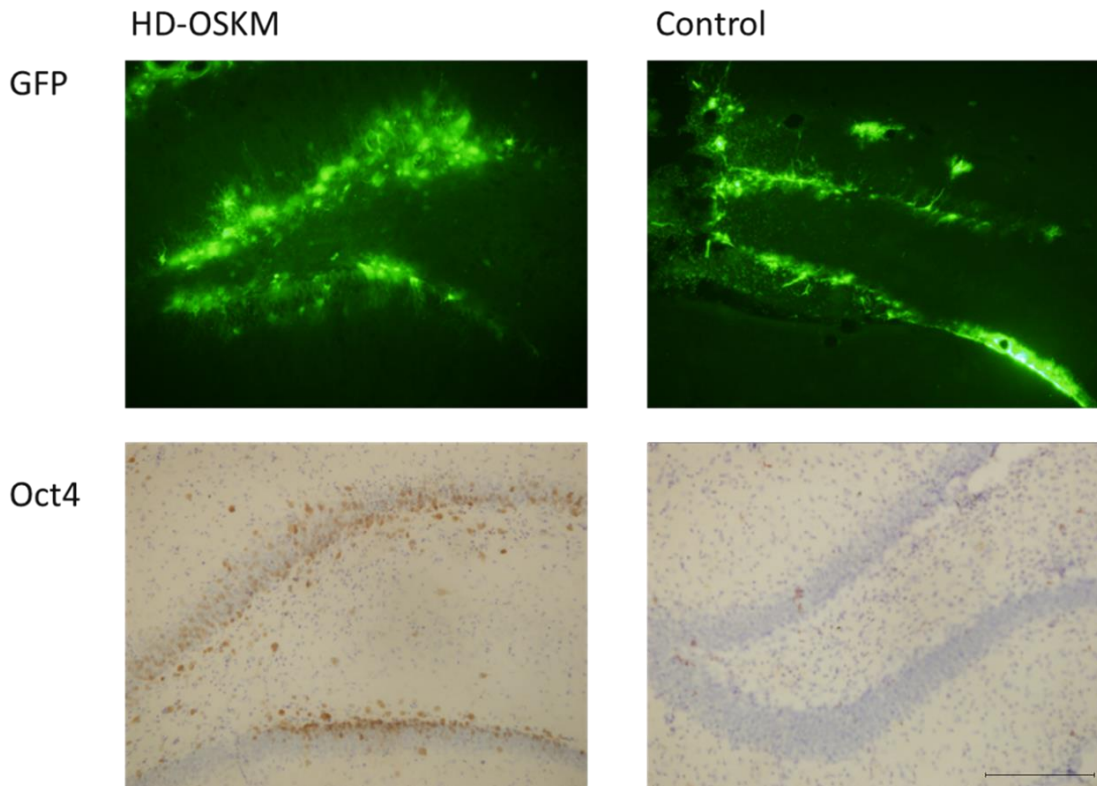


Figura 48 Imágenes del hipocampo de rata. A la izquierda, hipocampo inyectado con el adenovirus HD-OSKM, a la derecha, con el virus Rad-GFP. Ambos expresan la proteína verde GFP. En el caso del hipocampo inyectado con el adenovirus HD-OSKM, se puede observar la marca de células Oct4 positivas, a los cinco días post-inyección. Barra de escala 200 μ m.

Evaluación del desempeño cognitivo de ratas sometidas a terapia génica con OSKM

Las ratas envejecidas fueron inyectadas con el adenovirus HD-OSKM mediante cirugía estereotáxica, mientras que las ratas control fueron inyectadas con Rad-GFP. Los animales se sometieron a 38 días de sobreexpresión de los genes de pluripotencia OSKM. Ambos grupos presentaron una disminución inicial del peso corporal pero el mismo fue recuperado a las cuatro semanas de tratamiento. No hubo diferencias significativas entre los pesos corporales del grupo control y tratado (p-valor: 0.1845).

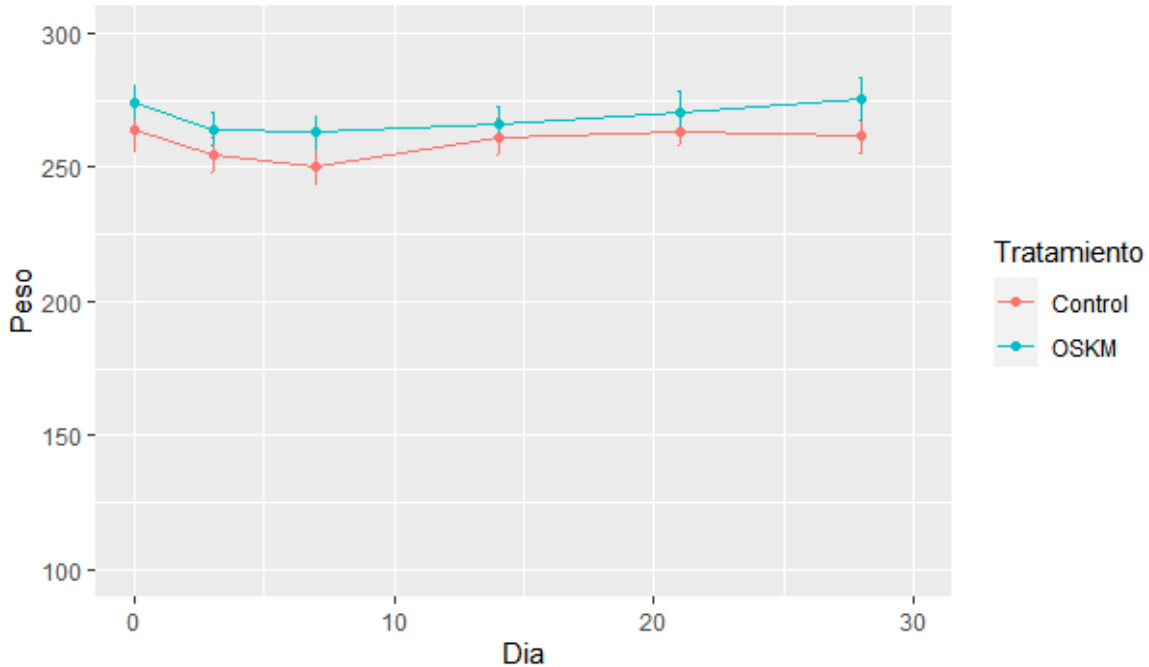


Figura 49 Gráfico de puntos de los pesos corporales de las ratas tratadas con el adenovirus HD-OSKM (celeste) y de las ratas control inyectadas con el virus Rad-GFP (rosa).

En cuanto a la supervivencia al tratamiento, no se observaron diferencias significativas entre ambas curvas de sobrevida (p -valor =0,07). Esto indica que el tratamiento con los genes OSKM mediante el uso del adenovirus no generó una mayor letalidad en los animales más que la propia asociada a la edad o a la intervención por cirugía estereotáxica.

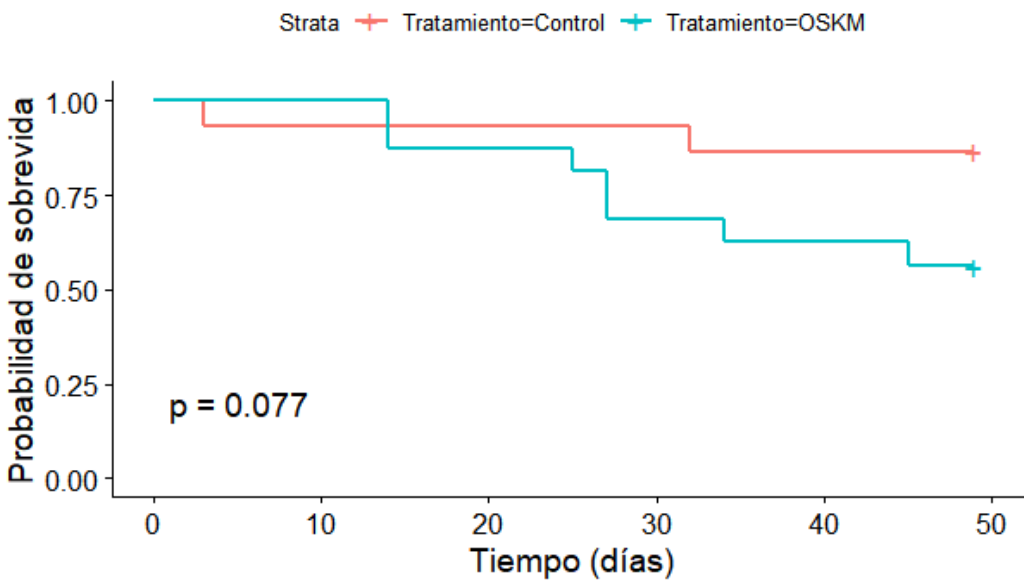


Figura 50 Curva de sobrevida Kaplan-Meier de los animales tratados con el adenovirus HD-OSKM (celeste) y los controles inyectados con Rad-GFP (rosa). No se encontraron diferencias significativas en los animales sometidos a la sobreexpresión de los genes OSKM en contraparte con su contraparte control ($p=0,077$).

Evaluación del desempeño cognitivo de ratas sometidas a terapia génica con OSKM

Al día 38 post inyección del adenovirus HD-OSKM se realizó la prueba de laberinto de Barnes. Los resultados de las pruebas de adquisición se muestran en la figura 51. En la primera prueba de entrenamiento, los tres grupos de animales mostraron una demora en encontrar el agujero de escape (o tiempo de latencia) alta. En el caso de los animales envejecidos, esta latencia se mantuvo sin cambios significativos a lo largo del periodo de aprendizaje (p -valor $>0,05$). En el caso de los animales jóvenes, la latencia fue disminuyendo conforme avanzaban las pruebas de entrenamiento en las ratas jóvenes desde un valor de $91,00 \pm 10,43$ s hasta alcanzar una media de $25,13 \pm 4,17$ s. En los animales envejecidos controles, la tardanza en encontrar el agujero meta permaneció en todos los entrenamientos en el mismo rango, con latencias medias por encima de los 100 s.

Las ratas envejecidas expuestas a la sobreexpresión de los genes OSKM, mostraron una latencia irregular hasta la prueba de entrenamiento 4, mientras que en las pruebas quinta y sexta se observó una disminución en estos tiempos de latencia, los cuales fueron significativamente menor que en los animales controles envejecidos ($p < 0,05$), pero sin llegar a los tiempos de desempeño de las ratas jóvenes.

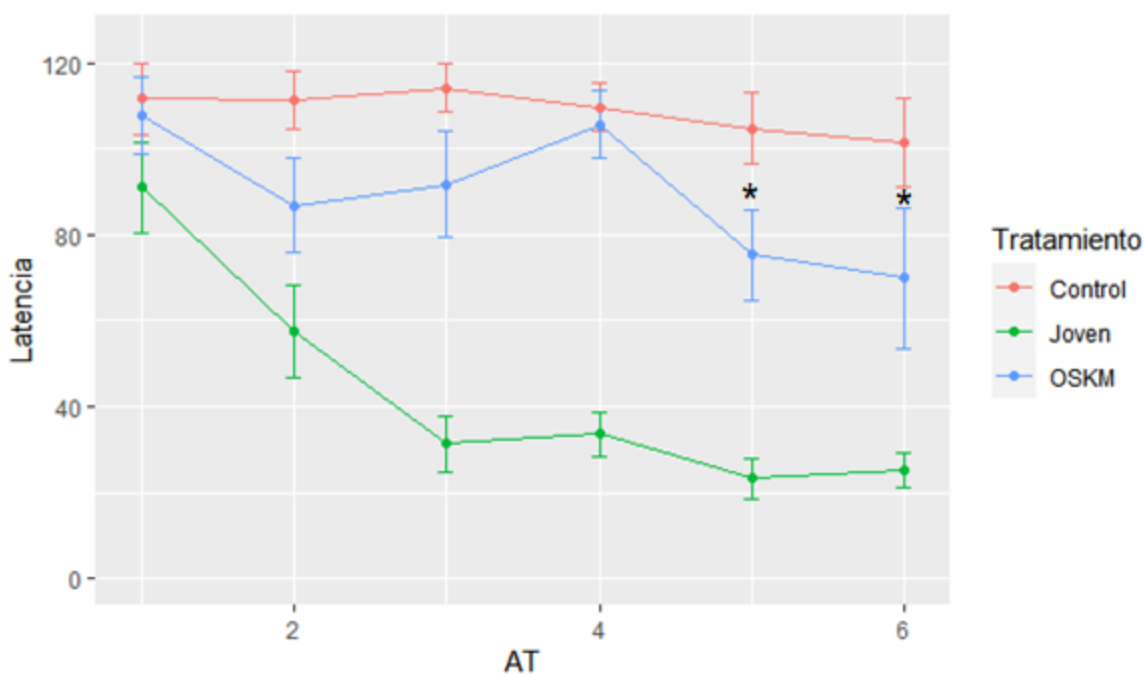


Figura 51 Tiempos de latencia (s) desempeñados en cada una de las pruebas de adquisición (AT). Las ratas sometidas a la terapia génica con el adenovirus HD-OSKM (celeste) mostraron menores tiempos de latencia que las ratas controles envejecidas (rosa) en los AT5 y AT6 (ambos p -valor $< 0,05$). Esta diferencia se traduce en un aprendizaje más veloz de los animales tratados con los genes OSKM.

En la prueba de evaluación de la memoria, se estudiaron los parámetros GS1 y GS3 (Figura 52). El tiempo de permanencia en el sector meta 0 (o agujero 0, sector GS1), así como en el sector GS3 el sector meta 3 (o agujeros -1,0,1, sector GS3) no fue estadísticamente diferente entre los grupos envejecidos. De igual manera, la latencia durante el PT de los animales tratados no mostró diferencias significativas respecto de los controles.

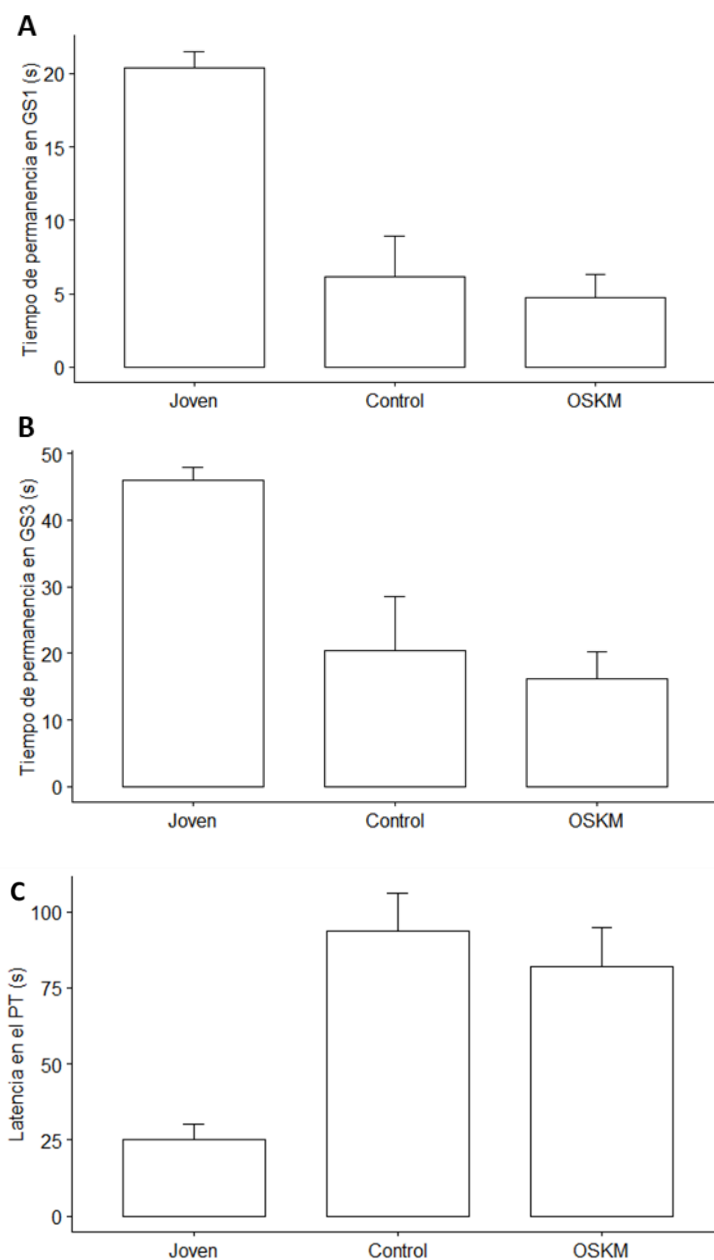


Figura 52 Evaluación del desempeño cognitivo de los animales durante el PT. Los animales tratados no mostraron diferencias significativas en los tiempos de permanencia en GS1 y GS3, así como la latencia respecto a los animales controles viejos.

Análisis de la neurogénesis adulta en respuesta a la terapia génica con OSKM

Finalmente, se procedió a evaluar si la mejora en el aprendizaje de las ratas envejecidas sometidas a la terapia génica responde a un aumento en la neurogénesis en el hipocampo adulto. Para ello, se realizó una inmunomarcación de neuronas inmaduras mediante el marcador doblecortina (DCX+). En estudios previos de nuestro laboratorio, se ha reportado la disminución en el número de neuronas inmaduras en el hipocampo de las ratas envejecidas y correlación con el deterioro cognitivo en la memoria espacial de los animales.(Canatelli-Mallat et al., 2022; Morel et al., 2015)

Como puede observarse en la figura 53, el recuento de células DCX fue estadísticamente igual para el grupo tratado y el control (p-valor=0.90).

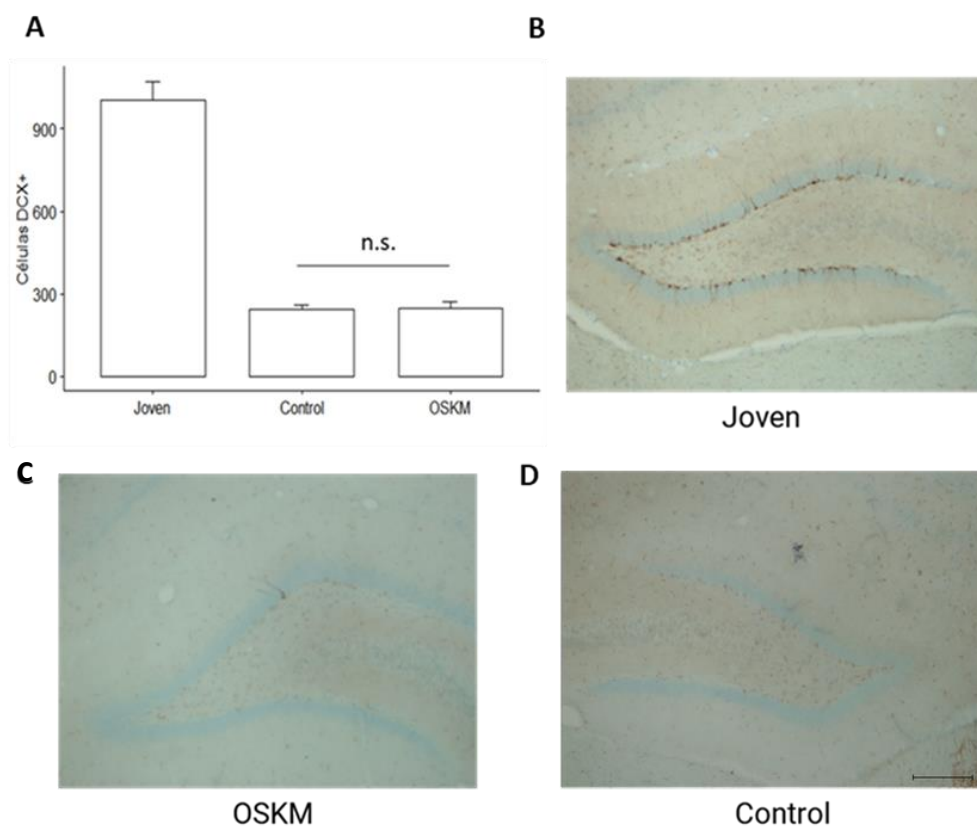


Figura 53 Número de neuronas inmaduras nacidas (DCX positivas) para los grupos joven, control envejecido y envejecidas tratadas con el adenovirus OSKM. Nótese una gran caída en el número de neuronas inmaduras en los animales viejos. No hubo diferencias significativas entre los animales viejos tratados y no tratados. B-D) Secciones coronales del DG en animales representativos de cada grupo de edad que muestran neuronas positivas para DCX. Grupo joven (B). Grupo envejecido tratado con los genes OSKM (C). Grupo control envejecidos (D). Barra de escala 250 μm.

Discusión

Los estudios de reprogramación celular parcial in vivo han representado grandes desafíos debido al riesgo de los genes OSKM de generar tumores (Abad et al., 2013). Tal es así, que se ha recurrido a diferentes estrategias para evitarlo, como la reprogramación parcial cíclica en ratones transgénicos (Ocampo et al., 2016; C. Wang et al., 2021).

Este es el primer estudio de expresión de los genes de pluripotencia en el giro dentado de rata envejecida utilizando terapia génica por medio de un adenovirus dependiente de auxiliar. La utilización del adenovector y su expresión por 49 días no mostró signos de neoplasia o tumores, de manera similar a otros vectores virales utilizados para la expresión ectópica (Y. Lu et al., 2020; Macip et al., 2023; Wi et al., 2016). Es evidente entonces que la ausencia de tumores en estudios de terapia génica con OSKM, o dicho de otra manera, el evitamiento de la reprogramación parcial total *in vivo*, se ve beneficiado por la utilización de vectores virales. Esto puede deberse a que, según la metodología utilizada para la sobreexpresión de los genes, varían varios factores, tales como como el nivel de expresión de los genes, el tiempo de expresión de los mismos, la capacidad proliferativa propia de las células en las que se está evaluando y la edad de los animales. Debe señalarse que en ninguno de los estudios donde se ha utilizado terapia génica *in vivo* se ha observado la aparición de tumores u otros efectos adversos (Kisby et al., 2021; Y. Lu et al., 2020; Macip et al., 2023). Este hecho sugiere que los genes OSKM (u OSK, en el caso de Lu et. al) poseen un comportamiento dual *in vivo*, siendo letales cuando se los expresa en ratones transgénicos pero carentes de efectos adversos cuando animales *wildtype* se someten a terapia génica para estos cuatro factores. (Chiavellini et al., 2021)

Uno de los estudios que avalan lo mencionado anteriormente es el estudio de regeneración de miocardio con un vector adenoviral similar al utilizado en esta tesis, se reportó que la sobreexpresión de OSKM durante 4 semanas tampoco se generaban tumores. Al estudiar los procesos génicos asociados, los autores concluyeron que se desencadena la fase de iniciación de la reprogramación por observación de un aumento en la expresión del gen Oct4 endógeno durante los primeros días post inyección. Posteriormente, esa reprogramación celular no prospera ya que no se alcanzan a expresar otros genes de pluripotencia ni se pierden las marcas de identidad, estando así frente a una reprogramación celular parcial (Kisby et al., 2021). Es factible que el adenovirus presentado aquí curse un proceso similar en el giro dentado y por tanto la reprogramación de las células sea parcial. Los estudios moleculares de seguimiento de expresión génica en el hipocampo inyectado con el HD-OSKM permitirán esclarecerlo.

La inyección del adenovirus HD-OSKM se realizó en la zona subgranular del hipocampo de rata envejecida, y a los 38 días se evaluó el desempeño cognitivo de los animales. En cuanto a los efectos adversos, la expresión de los genes OSKM en el giro dentado de los animales, no generó pérdidas de peso diferencialmente significativas a la de los animales controles. En estudios reportados previamente, se ha observado que la inducción de los genes por cuatro días consecutivos en ratones transgénicos produce la pérdida de peso corporal, conllevando posteriormente a la muerte del animal (Parras et al., 2022). Nuestros resultados demuestran que la expresión dirigida utilizando el adenovirus HD-OSKM evita la

pérdida de peso y consecuente muerte, en comparación con los ratones transgénicos donde los enterocitos son moléculas blanco de expresión de los genes y se produce la replicación indiscriminada de los mismos y la consecuente falla gastrointestinal.

En cuanto al desempeño cognitivo, las ratas tratadas con los genes OSKM presentaron tiempos de latencia menores en el último día en las pruebas de entrenamiento (AT5 y AT6), lo que se traduce en un aprendizaje más veloz. Sin embargo, al evaluar la retención memoria espacial de referencia de los mismos no se encontraron diferencias significativas, evaluado por los parámetros de tiempo de permanencia en GS1 y GS3 y la latencia en el PT. Ya que los animales tratados mostraron un aprendizaje más rápido, será interesante mostrar en experimentos futuros si un aumento en el número de entrenamientos permite consolidar la memoria de referencia diferencialmente en los animales tratados.

Se han reportado estudios en los que el tratamiento del hipocampo con los OSKM mejora la memoria de ratones expuestos a hipoxia (Wi et al., 2016) y ratones envejecidos naturalmente (Rodríguez-Matellán et al., 2020) de edad más temprana. En nuestro estudio, cinco semanas de tratamiento con el adenovirus HD-OSKM demostraron no ser suficientes para revertir el daño en la memoria de animales de tan avanzada edad con seis entrenamientos.

Nuestros hallazgos de mejora en el desempeño cognitivo, sumados a los estudios de restauración de visión (Y. Lu et al., 2020), de memoria hipocampal (Rodríguez-Matellán et al., 2020), y de prolongación de la vida en ratones (Macip et al., 2023), sugieren que la expresión continua de los genes de reprogramación mediada por vectores virales supone un efecto regenerativo.

A nivel celular, la terapia génica con los genes OSKM no ha demostrado aumentar la neurogénesis en el hipocampo adulto, evaluado por la presencia de células doblecortina positivas. Estos hallazgos se condicen con los obtenidos por Rodríguez-Matellán, quien tampoco observó un aumento en la neurogénesis de los ratones transgénicos OSKM (Rodríguez-Matellán et al., 2020).

Por estudios preliminares, sabemos que el adenovirus HD-OSKM posee un alto tropismo y pareciera no tener una preferencia de infección por un tipo celular en específico, ya que hemos verificado su presencia en células neuronales, así como de la glía. Así, la mejora cognitiva obtenida con la terapia OSKM con el adenovirus podría ser producto de favorecer un ambiente que recupere la plasticidad neuronal intrínseca. En ese sentido, es de gran interés evaluar si ocurre una mejora en la edad epigenética de las células hipocampales. Así como también, es importante estudiar los cambios en el perfil de metilación del ADN, ya que en un estudio reciente donde hemos prolongado la longevidad media de ratas seniles por tratamiento con plasma, hemos encontrado que los animales tratados mostraban

cambios en su perfil de metilación. Para estos objetivos, ya hemos enviado al Dr. Horvath las muestras de hipocampo correspondientes a este experimento para su análisis, sin embargo, escapará a los tiempos de esta tesis tal resultado.

Conclusiones

La expresión ectópica de los genes de pluripotencia OSKM en el giro dentado de la rata hembra envejecida por 49 días no produce tumores ni aumenta la letalidad, convirtiendo a esta estrategia en una terapia regenerativa segura.

Esta estrategia no produce un detrimento a nivel fisiológico, evaluado por el peso corporal, que se recuperó a las cuatro semanas de tratamiento.

En ese contexto, los animales sometidos a la sobreexpresión de los genes OSKM mejoran el desempeño cognitivo, no así la memoria de referencia de largo plazo. Esta mejora no se debe a un aumento en la neurogénesis celular, por lo que podría estar ocurriendo una mejora a nivel molecular en las células ya existentes.

Conclusiones generales

En la presente tesis se evaluó la capacidad de un adenovirus recombinante diseñado con el fin de implementar rejuvenecimiento por reprogramación parcial y manipular el reloj epigenético. Este adenovirus HD-OSKM, fue construido en nuestro laboratorio (Lehmann, Canatelli-Mallat, et al., 2019) y fue el primer vector viral reportado en contar con los genes de pluripotencia OSKM bajo el control de un promotor regulable que a su vez controla la expresión de la proteína GFP. En los estudios aquí presentados, se caracterizó y evaluó su utilidad para la implementación de rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial tanto *ex vivo* como *in vivo*.

En cuanto a su caracterización, observamos que una sobreexpresión de nueve días en fibroblastos humanos mantiene las marcas de identidad y no activa la expresión de marcas de pluripotencia. Durante ese tiempo, no se observó una activación de los genes de pluripotencia endógenos.

La inclusión de un gen reportero ha demostrado reducir los niveles de expresión de los genes OSKM (Y. Chen et al., 2021). El adenovirus utilizado aquí, expresa varios ordenes de magnitud más la proteína GFP que los genes OSKM, influyendo en las capacidades reprogramativas del mismo, a pesar de su alta eficiencia de transducción. Se ha demostrado que niveles de expresión altos de los genes OSKM son fundamentales para desdiferenciar completamente las células. Por ejemplo, se ha reportado evitar la reprogramación celular total mediante el uso de ratones transgénicos heterocigotos, vectores virales, o esquemas de inducción cíclica de los genes de pluripotencia (Kisby et al., 2021; Y. Lu et al., 2020; Ocampo et al., 2016; Wi et al., 2016). Aquí, se expuso que el adenovirus HD-OSKM es incapaz de completar la reprogramación celular de las células donde es expresado y generar de esa manera células madre. En esa misma dirección, se observó también *in vivo* que su utilización largo plazo no genera tumores en el sistema nervioso central. Así, el adenovirus HD-OSKM refuerza la hipótesis de que el éxito de la reprogramación celular dependerá de ciertas condiciones, como las células en donde se expresa, del vector y sus características y de la estrategia de reprogramación utilizada. En cambio, para los experimentos de rejuvenecimiento y regeneración por reprogramación celular parcial, el adenovirus HD-OSKM representa una herramienta promisoriosa y aquí fue demostrado en los experimentos *ex vivo* e *in vivo* resumidos a continuación.

Con respecto a los experimentos de rejuvenecimiento por reprogramación celular parcial *ex vivo*, con sobreexpresión de los genes OSKM de cuatro y siete días en fibroblastos de rata y humano respectivamente, se observó un mejoramiento en ciertas marcas celulares de envejecimiento. En el caso de los fibroblastos de rata, se observó una reposición en los niveles de H3K9me3, marcador epigenético y de beta-galactosidasa, marcador de senescencia celular. En tanto para la especie humana, observamos un aumento en la

reorganización de la cromatina, medida con a través de HP1. Otros marcadores como H3K9me3, SIRT1 y LAP2 no revirtieron los fenotipos asociados a la edad.

Algunos de los marcadores, como LAP2 y HP1 mostraron un comportamiento con la edad opuesto a lo reportado por otros autores (Ocampo et al., 2016; Sarkar et al., 2020). En la utilización de estos marcadores se encuentra la falta de robustez y precisión de estos, por lo que se procedió a utilizar un marcador de edad más preciso, la edad epigenética.

En los estudios presentados aquí, se analizó en primer lugar la precisión de diversos relojes epigenéticos para predecir la edad de fibroblastos humanos. Se observó que el reloj con mayor correlación entre la edad epigenética y la edad cronológica fue el reloj específico para piel y sangre humana (Horvath et al., 2018). Esto sugiere que es conveniente utilizar los relojes epigenéticos específicos para el origen tisular de la muestra en que fueron entrenados.

Al estudiar el efecto del tratamiento con el adenovirus sobre la edad epigenética de los fibroblastos expuestos a la sobreexpresión de los genes OSKM, no se observó una reversión de la edad estadísticamente significativa para el grupo tratado. Este mismo patrón fue observado al estudiar la edad epigenética con cinco relojes, aunque las reversiones fueron en muestras distintas. Así, esto podría indicar que la expresión de los genes OSKM mediante el adenovirus está generando modificaciones en el patrón de metilación de manera irregular (Horvath et al., 2018). En ese sentido, tampoco se encontraron diferencias significativas en el metiloma (aprox. 850 mil CpGs estudiadas) de las muestras tratadas respecto al control.

En cuanto a la especie *rattus norvegicus*, no existía previo a este trabajo un reloj epigenético para predecir su edad biológica. Aquí, se presentaron resultados utilizando uno de los primeros relojes epigenéticos para la rata denominado “*pan-tissue clock*” (Horvath et al., 2020). Se estudió la variación de la edad epigenética asociada a la edad en el sistema nervioso de la rata, más precisamente en el hipocampo y sus implicancias en el desempeño cognitivo espacial del animal.

La predicción del reloj epigenético *pan-tissue* explica la variación de la edad epigenética del tejido hipocampal en un 0.99, evaluado en los dos grupos etarios. Sin embargo, las variaciones en la edad epigenética de cada individuo no mostraron tener relación con la memoria espacial de los animales, evaluada por el parámetro de tiempo de permanencia en el GS3. Estos resultados indican que la edad epigenética no tiene una implicancia directa en el desempeño cognitivo de los animales. Es probable que la falta de asociación se deba a que el reloj epigenético está basado en CpGs que cambian su metilación de manera precisa con la edad y no necesariamente se encuentran presentes en genes que cumplan una función biológica en el sistema nervioso.

Por lo mencionado anteriormente se estudió el metiloma del hipocampo de las ratas, donde se observaron más de siete mil CpGs diferencialmente metiladas con la edad. Esas CpGs mostraron estar presentes en genes asociados al desarrollo del sistema nervioso. Se encontró que 14 CpGs cuya metilación aumenta con la edad mostraron una correlación inversa entre su metilación y la memoria espacial del animal, según el tiempo de permanencia en GS3. Dichas CpGs se encuentran presentes en la familia de los factores transcripción Zic y Gli. Los cambios en la metilación de tales CpGs podrían estar teniendo un efecto detrimental en la memoria de los animales al afectar vías de transducción de señales como la desencadenada por la proteína Sonic hedgehog (Shh), vía que involucra a factores Zic y Gli, alterando la plasticidad neuronal del hipocampo (Bellchambers & Ware, 2018).

Así, este es el primer estudio reportado en vincular los cambios en la metilación asociados a la edad a la memoria en rata, abriendo posibilidades para la utilización de esos CpGs como blancos terapéuticos en enfermedades neurodegenerativas.

Por último, se evaluó la utilización del adenovirus HD-OSKM como terapia génica de rejuvenecimiento del sistema nervioso de rata adulta y su efecto en el desempeño cognitivo de los animales. El adenovirus se inyectó en el giro dentado del hipocampo de la rata envejecida hembra Sprague Dawley por 49 días y no se observó presencia de teratomas en el cerebro. Esto es consistente con la incapacidad de generar células madre pluripotentes inducidas *ex vivo* mencionada previamente y estudiada en el Capítulo 1, y con el hecho de que la expresión es relativamente baja comparado con otros sistemas de transferencia génica (Browder et al., 2022; Ocampo et al., 2016). Se puede afirmar entonces que las células *in vivo* en el hipocampo no están sufriendo un proceso de reprogramación total. Es plausible que las células transducidas en el giro dentado se estén sometiendo a reprogramación parcial o interrumpida, en la que algunos de los genes de pluripotencia endógenos como Oct4 se expresan de manera transitoria, como lo demostró un sistema adenoviral similar al utilizado (Kisby et al., 2021).

Fisiológicamente, el tratamiento por 49 días con el adenovirus HD-OSKM no generó una disminución en el peso corporal de las ratas. Esto se asocia a la expresión dirigida específicamente al sistema nervioso central, haciendo de la utilización del mismo una terapia génica segura, evitando fallas gastrointestinales y hepáticas (Parras et al., 2022).

En cuanto a la mejora de la función cognitiva, la expresión por 38 días mostró un aprendizaje más veloz en las ratas hembra envejecidas, aunque no así en la memoria de estas. Estos resultados, en conjunto con los resultados de otros dos estudios publicados (Y. Lu et al., 2020; Rodríguez-Matellán et al., 2020), son los primeros en demostrar la utilidad de la terapia génica con OSKM para el rejuvenecimiento del sistema nervioso central en modelos

de envejecimiento. Una gran parte de los estudios reportados sobre tratamientos *in vivo* con los genes de pluripotencia OSKM fueron realizados en modelos de lesiones (Y. Chen et al., 2021; Kisby et al., 2021; Wi et al., 2016). En cambio, tanto Lu et al como Rodríguez-Matellán y colaboradores, encontraron mejora en la función biológica en modelos de envejecimiento natural. En ellos esta ganancia de función se logró sin generar un aumento en la proliferación celular, de igual manera que aquí no se encontró un aumento en la neurogénesis, evaluado por el número de células doblecortina positivas.

Estos estudios de restauración del sistema nervioso de la rata envejecida, por utilización del adenovirus HD-OSKM, son los primeros reportados en el área del rejuvenecimiento por reprogramación celular en tal especie. En este trabajo de tesis donde se combinan estos experimentos con experimentos de rejuvenecimiento en cultivo celular, se expone que es mucho más confiable y significativo lo logrado *in vivo* que *ex vivo*, siendo que este último carece de significación fisiológica y además pueden llevar a conclusiones erróneas, ya que resulta ser un escenario no fisiológico. Aquí, si bien hubo rejuvenecimiento de algunas marcas de envejecimiento a nivel celular en fibroblastos, el efecto fue limitado, mientras que por su parte el adenovirus HD-OSKM en el hipocampo de la rata produjo un efecto funcional cognitivo significativo.

Por todo lo mencionado anteriormente, en experimentos futuros realizados *in vivo*, será de gran interés estudiar si la expresión de los genes OSKM en el hipocampo produce un rejuvenecimiento celular intrínseco de las células ya existentes. Con tal fin, se estudiarán los cambios en la metilación y en la edad epigenética del hipocampo, marcadores de envejecimiento del hipocampo de la rata puestos a punto y analizados en la presente tesis.

Bibliografía

- Abad, M., Mosteiro, L., Pantoja, C., Cañamero, M., Rayon, T., Ors, I., Graña, O., Megías, D., Domínguez, O., Martínez, D., Manzanares, M., Ortega, S., & Serrano, M. (2013). Reprogramming in vivo produces teratomas and iPS cells with totipotency features. *Nature*, *502*(7471), 340–345. <https://doi.org/10.1038/nature12586>
- Anand, K., & Dhikav, V. (2012). Hippocampus in health and disease: An overview. *Annals of Indian Academy of Neurology*, *15*(4), 239–246. <https://doi.org/10.4103/0972-2327.104323>
- Arneson, A., Haghani, A., Thompson, M. J., Pellegrini, M., Kwon, S. bin, Vu, H., Yao, M., Li, C. Z., Lu, A. T., Barnes, B., Hansen, K. D., Zhou, W., Breeze, C. E., Ernst, J., & Horvath, S. (2021). A mammalian methylation array for profiling methylation levels at conserved sequences. *BioRxiv*, 2021.01.07.425637. <https://doi.org/10.1101/2021.01.07.425637>
- Aruga, J. (2004). The role of Zic genes in neural development. *Molecular and Cellular Neuroscience*, *26*(2), 205–221. <https://doi.org/10.1016/J.MCN.2004.01.004>
- Aryee, M. J., Jaffe, A. E., Corrada-Bravo, H., Ladd-Acosta, C., Feinberg, A. P., Hansen, K. D., & Irizarry, R. A. (2014). Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays. *Bioinformatics*, *30*(10), 1363–1369. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTU049>
- Asada, A., Hayakawa, H., Yanase, N., Abe, K., Sakurai, F., Mizuguchi, H., & Urata, Y. (2018). A Flow Cytometry-Based Method to Determine the Titer of Adenoviruses Expressing an Extraneous Gene. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, *41*(10), 1615–1619. <https://doi.org/10.1248/BPB.B18-00316>
- Barkats, M., Bilang-Bleuel, A., Buc-Caron, M. H., Castel-Barthe, M. N., Corti, O., Finiels, F., Horellou, P., Revah, F., Sabate, O., & Mallet, J. (1998). Adenovirus in the brain: recent advances of gene therapy for neurodegenerative diseases. *Progress in Neurobiology*, *55*(4), 333–341. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00028-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00028-8)
- Barnes, C. A. (1979). Memory deficits associated with senescence: A neurophysiological and behavioral study in the rat. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, *93*(1), 74–104. <https://doi.org/10.1037/H0077579>
- Bayart, E., & Cohen-Haguenaer, O. (2013). Technological overview of iPS induction from human adult somatic cells. *Current Gene Therapy*, *13*(2), 73–92. <https://doi.org/10.2174/1566523211313020002>
- Bell, J. T., Tsai, P. C., Yang, T. P., Pidsley, R., Nisbet, J., Glass, D., Mangino, M., Zhai, G., Zhang, F., Valdes, A., Shin, S. Y., Dempster, E. L., Murray, R. M., Grundberg, E., Hedman, A. K., Nica, A., Small, K. S., Dermitzakis, E. T., McCarthy, M. I., ... Deloukas, P.

- (2012). Epigenome-wide scans identify differentially methylated regions for age and age-related phenotypes in a healthy ageing population. *PLoS Genetics*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1002629>
- Bellchambers, H. M., & Ware, S. M. (2018). ZIC3 in heterotaxy. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1046, 301–327. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7311-3_15/COVER
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/J.2517-6161.1995.TB02031.X>
- Bjornsson, H. T., Sigurdsson, M. I., Fallin, M. D., Irizarry, R. A., Aspelund, T., Cui, H., Yu, W., Rongione, M. A., Ekström, T. J., Harris, T. B., Launer, L. J., Eiriksdottir, G., Leppert, M. F., Sapienza, C., Gudnason, V., & Feinberg, A. P. (2008). Intra-individual Change Over Time in DNA Methylation With Familial Clustering. *JAMA*, 299(24), 2877–2883. <https://doi.org/10.1001/JAMA.299.24.2877>
- Blagosklonny, M. v. (2013). Aging is not programmed: Genetic pseudo-program is a shadow of developmental growth. *Cell Cycle*, 12(24), 3736. <https://doi.org/10.4161/CC.27188>
- Blalock, E. M., Chen, K. C., Sharrow, K., Herman, J. P., Porter, N. M., Foster, T. C., & Landfield, P. W. (2003). Gene Microarrays in Hippocampal Aging: Statistical Profiling Identifies Novel Processes Correlated with Cognitive Impairment. *Journal of Neuroscience*, 23(9), 3807–3819. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-09-03807.2003>
- Bollati, V., Schwartz, J., Wright, R., Litonjua, A., Tarantini, L., Suh, H., Sparrow, D., Vokonas, P., & Baccarelli, A. (2009). Decline in genomic DNA methylation through aging in a cohort of elderly subjects. *Mechanisms of Ageing and Development*, 130(4), 234–239. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2008.12.003>
- Bormann, F., Rodríguez-Paredes, M., Hagemann, S., Manchanda, H., Kristof, B., Gutekunst, J., Raddatz, G., Haas, R., Terstegen, L., Wenck, H., Kaderali, L., Winnefeld, M., & Lyko, F. (2016). Reduced DNA methylation patterning and transcriptional connectivity define human skin aging. *Aging Cell*, 15(3), 563–571. <https://doi.org/10.1111/ACEL.12470>
- Brennand, K., & Gage, F. (2013). Neural Induction of Embryonic Stem/Induced Pluripotent Stem Cells. *Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS*, 111–129. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397265-1.00046-0>

- Browder, K. C., Reddy, P., Yamamoto, M., Haghani, A., Guillen, I. G., Sahu, S., Wang, C., Luque, Y., Prieto, J., Shi, L., Shojima, K., Hishida, T., Lai, Z., Li, Q., Choudhury, F. K., Wong, W. R., Liang, Y., Sangaraju, D., Sandoval, W., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2022). In vivo partial reprogramming alters age-associated molecular changes during physiological aging in mice. *Nature Aging* 2022 2:3, 2(3), 243–253. <https://doi.org/10.1038/s43587-022-00183-2>
- Brown, O. A., Canatelli-Mallat, M., Console, G. M., Camihort, G., Luna, G., Spinedi, E., & Goya, R. G. (2018). IGF-1 Gene Therapy as a Potentially Useful Therapy for Spontaneous Prolactinomas in Senile Rats. *Current Gene Therapy*, 18(4), 240–245. <https://doi.org/10.2174/1566523218666180905170020>
- Brunetti-Pierri, N., & Ng, P. (2010). Helper-dependent adenoviral vectors. In Y. Chernajovsky & P. D. Robbins (Eds.), *Gene Therapy for Autoimmune and Inflammatory Diseases* (pp. 193–207). Springer Basel. https://doi.org/10.1007/978-3-0346-0165-8_13
- Buganim, Y., Faddah, D. A., & Jaenisch, R. (2013). Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nature Reviews Genetics* 2013 14:6, 14(6), 427–439. <https://doi.org/10.1038/nrg3473>
- Burger, C., Lopez, M. C., Baker, H. v., Mandel, R. J., & Muzyczka, N. (2008a). Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 379–396. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2007.11.006>
- Burger, C., Lopez, M. C., Baker, H. v., Mandel, R. J., & Muzyczka, N. (2008b). Genome-wide analysis of aging and learning-related genes in the hippocampal dentate gyrus. *Neurobiology of Learning and Memory*, 89(4), 379–396. <https://doi.org/10.1016/J.NLM.2007.11.006>
- Canatelli-Mallat, M., Chiavellini, P., Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Age-related loss of recognition memory and its correlation with hippocampal and perirhinal cortex changes in female Sprague Dawley rats. *Behavioural Brain Research*, 435, 114026. <https://doi.org/10.1016/J.BBR.2022.114026>
- Capasso, C., Garofalo, M., Hirvonen, M., & Cerullo, V. (2014). The evolution of adenoviral vectors through genetic and chemical surface modifications. *Viruses*, 6(2), 832–855. <https://doi.org/10.3390/v6020832>
- Capetian, P., Azmitia, L., Pauly, M. G., Krajka, V., Stengel, F., Bernhardt, E.-M., Klett, M., Meier, B., Seibler, P., Stanslowsky, N., Moser, A., Knopp, A., Gillessen-Kaesbach, G., Nikkhah, G., Wegner, F., Döbrössy, M., & Klein, C. (2016). Plasmid-Based Generation of Induced Neural Stem Cells from Adult Human Fibroblasts. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 10, 245. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00245>

- Cevallos, R. R., Edwards, Y. J. K., Parant, J. M., Yoder, B. K., & Hu, K. (2020). Human transcription factors responsive to initial reprogramming predominantly undergo legitimate reprogramming during fibroblast conversion to iPSCs. *Scientific Reports*, *10*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-76705-y>
- Chappell, J., & Dalton, S. (2013). Roles for MYC in the Establishment and Maintenance of Pluripotency. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *3*(12). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A014381>
- Chen, C., Zhou, M., Ge, Y., & Wang, X. (2020). SIRT1 and aging related signaling pathways. *Mechanisms of Ageing and Development*, *187*, 111215. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2020.111215>
- Chen, L., Anton, M., & Graham, F. L. (1996). Production and characterization of human 293 cell lines expressing the site-specific recombinase Cre. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, *22*(6), 477–488. <https://doi.org/10.1007/BF02369439>
- Chen, Y., Lüttmann, F. F., Schoger, E., Schöler, H. R., Zelarayán, L. C., Kim, K. P., Haigh, J. J., Kim, J., & Braun, T. (2021). Reversible reprogramming of cardiomyocytes to a fetal state drives heart regeneration in mice. *Science (New York, N.Y.)*, *373*(6562), 1537–1540. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABG5159>
- Chiavellini, P., Canatelli-Mallat, M., Lehmann, M., Gallardo, M. D., Herenu, C. B., Cordeiro, J. L., Clement, J., & Goya, R. G. (2021). Aging and rejuvenation - a modular epigenome model. *Aging (Albany NY)*, *13*(4), 4734. <https://doi.org/10.18632/AGING.202712>
- Chiavellini, P., Canatelli-Mallat, M., Lehmann, M., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2022). Therapeutic potential of glial cell line-derived neurotrophic factor and cell reprogramming for hippocampal-related neurological disorders. *Neural Regeneration Research*, *17*(3), 469. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.320966>
- Choi, J., Costa, M. L., Mermelstein, C. S., Chagas, C., Holtzer, S., & Holtzer, H. (1990). MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(20), 7988–7992. <https://doi.org/10.1073/PNAS.87.20.7988>
- Chondronasiou, D., Gill, D., Mosteiro, L., Urduinguio, R. G., Berenguer-Llargo, A., Aguilera, M., Durand, S., Aprahamian, F., Nirmalathasan, N., Abad, M., Martin-Herranz, D. E., Stephan-Otto Attolini, C., Prats, N., Kroemer, G., Fraga, M. F., Reik, W., & Serrano, M. (2022). Multi-omic rejuvenation of naturally aged tissues by a single cycle of transient reprogramming. *Aging Cell*, *21*(3). <https://doi.org/10.1111/ACEL.13578>
- Christensen, B. C., Houseman, E. A., Marsit, C. J., Zheng, S., Wrensch, M. R., Wiemels, J. L., Nelson, H. H., Karagas, M. R., Padbury, J. F., Bueno, R., Sugarbaker, D. J., Yeh, R. F.,

- Wiencke, J. K., & Kelsey, K. T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genetics*, *5*(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PGEN.1000602>
- Coll, L., Rodriguez, S. S., Goya, R. G., & Morel, G. R. (2020). A regulatable adenovector system for GDNF and GFP delivery in the rat hippocampus. *Neuropeptides*, *83*. <https://doi.org/10.1016/J.NPEP.2020.102072>
- Connor, B., Firmin, E., McCaughey-Chapman, A., Monk, R., Lee, K., Liot, S., Geiger, J., Rudolph, C., & Jones, K. (2018). Conversion of adult human fibroblasts into neural precursor cells using chemically modified mRNA. *Heliyon*, *4*(11), e00918. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00918>
- Davis, R. L., Weintraub, H., & Lassar, A. B. (1987). Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, *51*(6), 987–1000. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90585-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90585-x)
- di Micco, R., Krizhanovsky, V., Baker, D., & d'Adda di Fagagna, F. (2021). Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *22*(2), 75–95. <https://doi.org/10.1038/S41580-020-00314-W>
- Efe, J. A., Hilcove, S., Kim, J., Zhou, H., Ouyang, K., Wang, G., Chen, J., & Ding, S. (2011). Conversion of mouse fibroblasts into cardiomyocytes using a direct reprogramming strategy. *Nature Cell Biology*, *13*(3), 215–222. <https://doi.org/10.1038/NCB2164>
- Gallaher, S. D., & Berk, A. J. (2013). *A rapid Q-PCR titration protocol for adenovirus and helper-dependent adenovirus vectors that produces biologically relevant results*. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.04.013>
- Gesson, K., Vidak, S., & Foisner, R. (2014). Lamina-associated polypeptide (LAP)2 α and nucleoplasmic lamins in adult stem cell regulation and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *29*(100), 116. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2013.12.009>
- Ghasemi-Kasman, M., Shojaei, A., Gol, M., Moghadamnia, A. A., Baharvand, H., & Javan, M. (2018). miR-302/367-induced neurons reduce behavioral impairment in an experimental model of Alzheimer's disease. *Molecular and Cellular Neurosciences*, *86*, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2017.11.012>
- Gill, D., Parry, A., Santos, F., Okkenhaug, H., Todd, C. D., Hernando-Herraez, I., Stubbs, T. M., Milagre, I., & Reik, W. (2022). Multi-omic rejuvenation of human cells by maturation phase transient reprogramming. *ELife*, *11*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.71624>

- Glassman, R. B. (1987). An hypothesis about redundancy and reliability in the brains of higher species: analogies with genes, internal organs, and engineering systems. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, *11*(3), 275–285. [https://doi.org/10.1016/s0149-7634\(87\)80014-3](https://doi.org/10.1016/s0149-7634(87)80014-3)
- Golubtsova, N. N., Filippov, F. N., & Gunin, A. G. (2017). Lamin A and lamin-associated polypeptide 2 (LAP-2) in human skin fibroblasts in the process of aging. *Advances in Gerontology 2017 7:1*, *7*(1), 60–67. <https://doi.org/10.1134/S2079057017010076>
- Goya, R. G. (1988). *Neuroendocrine System, Programmed Cell Death, and Aging*. *24*, 81–89. <https://doi.org/10.1159/000416137>
- Goya, R. G. (1991). The immune-neuroendocrine homeostatic network and aging. *Gerontology*, *37*(4), 208–213. <https://doi.org/10.1159/000213262>
- Guo, Z., Zhang, L., Wu, Z., Chen, Y., Wang, F., & Chen, G. (2014). In vivo direct reprogramming of reactive glial cells into functional neurons after brain injury and in an Alzheimer's disease model. *Cell Stem Cell*, *14*(2), 188–202. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.12.001>
- GURDON, J. B. (1962). The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, *10*, 622–640.
- Gurdon, J. B. (2006). From nuclear transfer to nuclear reprogramming: the reversal of cell differentiation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, *22*, 1–22. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.22.090805.140144>
- Hannum, G., Guinney, J., Zhao, L., Zhang, L., Hughes, G., Sada, S. V., Klotzle, B., Bibikova, M., Fan, J. B., Gao, Y., Deconde, R., Chen, M., Rajapakse, I., Friend, S., Ideker, T., & Zhang, K. (2013). Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular Cell*, *49*(2), 359–367. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2012.10.016>
- Hansson, J., Rafiee, M. R., Reiland, S., Polo, J. M., Gehring, J., Okawa, S., Huber, W., Hochedlinger, K., & Krijgsveld, J. (2012). Highly coordinated proteome dynamics during reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Reports*, *2*(6), 1579–1592. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2012.10.014>
- Hashizume, O., Ohnishi, S., Mito, T., Shimizu, A., Iashikawa, K., Nakada, K., Soda, M., Mano, H., Togayachi, S., Miyoshi, H., Okita, K., & Hayashi, J. I. (2015). Epigenetic regulation of the nuclear-coded GCAT and SHMT2 genes confers human age-associated mitochondrial respiration defects. *Scientific Reports 2015 5:1*, *5*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep10434>

- Hawkins, K. E., & Duchon, M. (2019). Modelling mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease using human induced pluripotent stem cells. *World Journal of Stem Cells*, *11*(5), 236–253. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i5.236>
- Hayano, M., Yang, J.-H., Bonkowski, M. S., Amorim, J. A., Ross, J. M., Coppotelli, G., Griffin, P. T., Chew, Y. C., Guo, W., Yang, X., Vera, D. L., Salfati, E. L., Das, A., Thakur, S., Kane, A. E., Mitchell, S. J., Mohri, Y., Nishimura, E. K., Schaeviz, L., ... Sinclair, D. A. (2019). DNA Break-Induced Epigenetic Drift as a Cause of Mammalian Aging. *BioRxiv*, 808659. <https://doi.org/10.1101/808659>
- Hernandez, D. G., Nalls, M. A., Gibbs, J. R., Arepalli, S., van der brug, M., Chong, S., Moore, M., Longo, D. L., Cookson, M. R., Traynor, B. J., & Singleton, A. B. (2011). Distinct DNA methylation changes highly correlated with chronological age in the human brain. *Human Molecular Genetics*, *20*(6), 1164–1172. <https://doi.org/10.1093/HMG/DDQ561>
- Hishida, T., Yamamoto, M., Hishida-Nozaki, Y., Shao, C., Huang, L., Wang, C., Shojima, K., Xue, Y., Hang, Y., Shokhirev, M., Memczak, S., Sahu, S. K., Hatanaka, F., Ros, R. R., Maxwell, M. B., Chavez, J., Shao, Y., Liao, H. K., Martinez-Redondo, P., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2022). In vivo partial cellular reprogramming enhances liver plasticity and regeneration. *Cell Reports*, *39*(4). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2022.110730>
- Hitt, D. C., Booth, J. L., Dandapani, V., Pennington, L. R., Gimble, J. M., & Metcalf, J. (2000). A flow cytometric protocol for titering recombinant adenoviral vectors containing the green fluorescent protein. *Molecular Biotechnology*, *14*(3), 197–203. <https://doi.org/10.1385/MB:14:3:197>
- Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology*, *14*(10), 1–20. <https://doi.org/10.1186/GB-2013-14-10-R115/COMMENTS>
- Horvath, S., Oshima, J., Martin, G. M., Lu, A. T., Quach, A., Cohen, H., Felton, S., Matsuyama, M., Lowe, D., Kabacik, S., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Maierhofer, A., Flunkert, J., Aviv, A., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., ... Raj, K. (2018). Epigenetic clock for skin and blood cells applied to Hutchinson Gilford Progeria Syndrome and ex vivo studies. *Aging*, *10*(7), 1758–1775. <https://doi.org/10.18632/AGING.101508>
- Horvath, S., Pirazzini, C., Bacalini, M. G., Gentilini, D., di Blasio, A. M., Delledonne, M., Mari, D., Arosio, B., Monti, D., Passarino, G., de Rango, F., D'Aquila, P., Giuliani, C., Marasco, E., Collino, S., Descombes, P., Garagnani, P., & Franceschi, C. (2015). Decreased epigenetic age of PBMCs from Italian semi-supercentenarians and their offspring. *Aging*, *7*(12), 1159–1170. <https://doi.org/10.18632/AGING.100861>

- Horvath, S., & Raj, K. (2018). DNA methylation-based biomarkers and the epigenetic clock theory of ageing. *Nature Reviews Genetics* 2018 19:6, 19(6), 371–384. <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0004-3>
- Hu, W., Qiu, B., Guan, W., Wang, Q., Wang, M., Li, W., Gao, L., Shen, L., Huang, Y., Xie, G., Zhao, H., Jin, Y., Tang, B., Yu, Y., Zhao, J., & Pei, G. (2015). Direct Conversion of Normal and Alzheimer’s Disease Human Fibroblasts into Neuronal Cells by Small Molecules. *Cell Stem Cell*, 17(2), 204–212. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.07.006>
- Hui, C. C., & Angers, S. (2011). Gli proteins in development and disease. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27, 513–537. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CELLBIO-092910-154048>
- Ieda, M. (2013). Direct reprogramming into desired cell types by defined factors. *The Keio Journal of Medicine*, 62(3), 74–82. <https://doi.org/10.2302/KJM.2012-0017-RE>
- Ilaria Decimo, Francesco Bifari, Mauro Krampera, & Guido Fumagalli. (2012). Neural Stem Cell Niches in Health and Diseases. *Current Pharmaceutical Design*, 18(13), 1755–1783. <https://doi.org/10.2174/138161212799859611>
- Israel, M. A., Yuan, S. H., Bardy, C., Reyna, S. M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M. P., van Gorp, S., Nazor, K. L., Boscolo, F. S., Carson, C. T., Laurent, L. C., Marsala, M., Gage, F. H., Remes, A. M., Koo, E. H., & Goldstein, L. S. B. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer’s disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482(7384), 216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
- Jacob, J., & Briscoe, J. (2003). Gli proteins and the control of spinal-cord patterning. *EMBO Reports*, 4(8), 761–765. <https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOR.EMBOR896>
- Johnson. (1963). REDUNDANCY AND BIOLOGICAL AGING. *Science (New York, N.Y.)*, 141(3584), 910–912. <https://doi.org/10.1126/science.141.3584.910>
- Jung, M., & Pfeifer, G. P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/S12915-015-0118-4>
- Kajon, A. E., Weinberg, J. B., & Spindler, K. R. B. T.-R. M. in B. S. (2019). *Adenoviruses* ☆. Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.00086-6>
- Kase, Y., Kase, Y., Shimazaki, T., & Okano, H. (2020). Current understanding of adult neurogenesis in the mammalian brain: how does adult neurogenesis decrease with age? *Inflammation and Regeneration*, 40(1). <https://doi.org/10.1186/S41232-020-00122-X>

- Kim, J., Ambasudhan, R., & Ding, S. (2012). Direct lineage reprogramming to neural cells. *Current Opinion in Neurobiology*, 22(5), 778. <https://doi.org/10.1016/J.CONB.2012.05.001>
- Kim, J., Efe, J. A., Zhu, S., Talantova, M., Yuan, X., Wang, S., Lipton, S. A., Zhang, K., & Ding, S. (2011). Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(19), 7838–7843. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1103113108>
- Kisby, T., de Lázaro, I., Fisch, S., Cartwright, E. J., Cossu, G., Kostarelos, K., Kisby, T., de Lázaro, I., Kostarelos, K., De, I., Harvard, L., & Paulson, J. A. (2021). Adenoviral Mediated Delivery of OSKM Factors Induces Partial Reprogramming of Mouse Cardiac Cells In Vivo. *Advanced Therapeutics*, 4(2), 2000141. <https://doi.org/10.1002/ADTP.202000141>
- Klose, R. J., & Bird, A. P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/J.TIBS.2005.12.008>
- Koyabu, Y., Nakata, K., Mizugishi, K., Aruga, J., & Mikoshiba, K. (2001). Physical and functional interactions between Zic and Gli proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(10), 6889–6892. <https://doi.org/10.1074/JBC.C000773200>
- Kremer, T., Jagasia, R., Herrmann, A., Matile, H., Borroni, E., Francis, F., Kuhn, H. G., & Czech, C. (2013). Analysis of Adult Neurogenesis: Evidence for a Prominent “Non-Neurogenic” DCX-Protein Pool in Rodent Brain. *PLOS ONE*, 8(5), e59269. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0059269>
- Kuhn, H. G., Dickinson-Anson, H., & Gage, F. H. (1996). Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 16(6), 2027–2033. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-06-02027.1996>
- Kumari, R., & Jat, P. (2021). Mechanisms of Cellular Senescence: Cell Cycle Arrest and Senescence Associated Secretory Phenotype. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.645593>
- Kushwaha, A., & Thakur, M. K. (2020). Increase in hippocampal histone H3K9me3 is negatively correlated with memory in old male mice. *Biogerontology*, 21(2), 175–189. <https://doi.org/10.1007/S10522-019-09850-1>
- L. Katcher, H. (2015). Towards an Evidence-based Model of Aging. *Current Aging Science*, 8(1), 46–55. <https://doi.org/10.2174/1874609808666150422110601>
- Lapasset, L., Milhavet, O., Prieur, A., Besnard, E., Babled, A., Ät-Hamou, N., Leschik, J., Pellestor, F., Ramirez, J. M., de Vos, J., Lehmann, S., & Lemaitre, J. M. (2011).

- Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes & Development*, 25(21), 2248–2253.
<https://doi.org/10.1101/GAD.173922.111>
- Lee, B. Y., Han, J. A., Im, J. S., Morrone, A., Johung, K., Goodwin, E. C., Kleijer, W. J., DiMaio, D., & Hwang, E. S. (2006). Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. *Aging Cell*, 5(2), 187–195. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2006.00199.X>
- Lehmann, M., Canatelli-Mallat, M., Chiavellini, P., Morel, G. R., Reggiani, P. C., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2019). Regulatable adenovector harboring the GFP and Yamanaka genes for implementing regenerative medicine in the brain. *Gene Therapy*, 26(10–11). <https://doi.org/10.1038/s41434-019-0063-x>
- Lehmann, M., Zappa-Villar, M. F., García, M. G., Mazzolini, G., Canatelli-Mallat, M., Morel, G. R., Reggiani, P. C., & Goya, R. G. (2019). Umbilical Cord Cell Therapy Improves Spatial Memory in Aging Rats. *Stem Cell Reviews and Reports*, 15(4), 612–617. <https://doi.org/10.1007/S12015-019-09895-2>
- Levine, M. E., Lu, A. T., Quach, A., Chen, B. H., Assimes, T. L., Bandinelli, S., Hou, L., Baccarelli, A. A., Stewart, J. D., Li, Y., Whitsel, E. A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Lohman, K., Liu, Y., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2018). An epigenetic biomarker of aging for lifespan and healthspan. *Aging*, 10(4). <https://doi.org/10.18632/aging.101414>
- Li, L., & Xie, T. (2005). Stem cell niche: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21, 605–631. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.CELLBIO.21.012704.131525>
- Li, R., Liang, J., Ni, S., Zhou, T., Qing, X., Li, H., He, W., Chen, J., Li, F., Zhuang, Q., Qin, B., Xu, J., Li, W., Yang, J., Gan, Y., Qin, D., Feng, S., Song, H., Yang, D., ... Pei, D. (2010). A mesenchymal-to-epithelial transition initiates and is required for the nuclear reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 7(1), 51–63. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2010.04.014>
- Liu, L., van Groen, T., Kadish, I., & Tollefsbol, T. O. (2009). DNA methylation impacts on learning and memory in aging. *Neurobiology of Aging*, 30(4), 549–560. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2007.07.020>
- Longo, V. D., Mitteldorf, J., & Skulachev, V. P. (2005). Programmed and altruistic ageing. *Nature Reviews. Genetics*, 6(11), 866–872. <https://doi.org/10.1038/NRG1706>
- Lopez-Rojas, J., & Kreutz, M. R. (2016). Mature granule cells of the dentate gyrus--Passive bystanders or principal performers in hippocampal function? *Neuroscience and*

- Biobehavioral Reviews*, 64, 167–174.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2016.02.021>
- Lu, A. T., Quach, A., Wilson, J. G., Reiner, A. P., Aviv, A., Raj, K., Hou, L., Baccarelli, A. A., Li, Y., Stewart, J. D., Whitsel, E. A., Assimes, T. L., Ferrucci, L., & Horvath, S. (2019). DNA methylation GrimAge strongly predicts lifespan and healthspan. *Aging*, 11(2).
<https://doi.org/10.18632/aging.101684>
- Lu, Y., Brommer, B., Tian, X., Krishnan, A., Meer, M., Wang, C., Vera, D. L., Zeng, Q., Yu, D., Bonkowski, M. S., Yang, J. H., Zhou, S., Hoffmann, E. M., Karg, M. M., Schultz, M. B., Kane, A. E., Davidsohn, N., Korobkina, E., Chwalek, K., ... Sinclair, D. A. (2020). Reprogramming to recover youthful epigenetic information and restore vision. *Nature*, 588(7836), 124–129. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2975-4>
- Lujan, E., Chanda, S., Ahlenius, H., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2012). Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2527–2532. <https://doi.org/10.1073/pnas.1121003109>
- Ma, T., Xie, M., Laurent, T., & Ding, S. (2013). Progress in the reprogramming of somatic cells. *Circulation Research*, 112(3), 562–574.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.249235>
- Macip, C. C., Hasan, R., Hoznek, V., Kim, J., Metzger, L. E., Sethna, S., & Davidsohn, N. (2023). Gene Therapy Mediated Partial Reprogramming Extends Lifespan and Reverses Age-Related Changes in Aged Mice. *BioRxiv*, 2023.01.04.522507.
<https://doi.org/10.1101/2023.01.04.522507>
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H. S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., Zhang, N., Liang, S., Donehower, L. A., & Issa, J. P. J. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Research*, 20(3), 332–340.
<https://doi.org/10.1101/GR.096826.109>
- Mah, L. J., El-Osta, A., & Karagiannis, T. C. (2010). γ H2AX: a sensitive molecular marker of DNA damage and repair. *Leukemia* 24(4), 679–686.
<https://doi.org/10.1038/leu.2010.6>
- McGreevy, K. M., Radak, Z., Torma, F., Jokai, M., Lu, A. T., Belsky, D. W., Binder, A., Marioni, R. E., Ferrucci, L., Pośpiech, E., Branicki, W., Ossowski, A., Sitek, A., Spólnicka, M., Raffield, L. M., Reiner, A. P., Cox, S., Kobor, M., Corcoran, D. L., & Horvath, S. (2023). DNAmFitAge: biological age indicator incorporating physical fitness. *Aging*, 15. <https://doi.org/10.18632/aging.204538>
- McGuinness, J. A., Scheinert, R. B., Asokan, A., Stadler, V. C., Lee, C. S., Rani, A., Kumar, A., Foster, T. C., & Ormerod, B. K. (2017). Indomethacin increases neurogenesis across

- age groups and improves delayed probe trial difference scores in middle-aged rats. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9(SEP), 280.
<https://doi.org/10.3389/FNAGI.2017.00280/BIBTEX>
- Meer, M. v., Podolskiy, D. I., Tyshkovskiy, A., & Gladyshev, V. N. (2018). A whole lifespan mouse multi-tissue DNA methylation clock. *ELife*, 7.
<https://doi.org/10.7554/ELIFE.40675>
- Mertens, J., Marchetto, M. C., Bardy, C., & Gage, F. H. (2016). Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(7), 424–437. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.46>
- Mertens, J., Paquola, A. C. M., Ku, M., Hatch, E., Böhnke, L., Ladjevardi, S., McGrath, S., Campbell, B., Lee, H., Herdy, J. R., Gonçalves, J. T., Toda, T., Kim, Y., Winkler, J., Yao, J., Hetzer, M. W., & Gage, F. H. (2015). Directly Reprogrammed Human Neurons Retain Aging-Associated Transcriptomic Signatures and Reveal Age-Related Nucleocytoplasmic Defects. *Cell Stem Cell*, 17(6), 705–718.
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2015.09.001>
- Mistriotis, P., Bajpai, V. K., Wang, X., Rong, N., Shahini, A., Asmani, M., Liang, M. S., Wang, J., Lei, P., Liu, S., Zhao, R., & Andreadis, S. T. (2017). NANOG Reverses the Myogenic Differentiation Potential of Senescent Stem Cells by Restoring ACTIN Filamentous Organization and SRF-Dependent Gene Expression. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 35(1), 207–221. <https://doi.org/10.1002/STEM.2452>
- Mitteldorf, J. (2016). An epigenetic clock controls aging. *Biogerontology*, 17(1), 257–265.
<https://doi.org/10.1007/S10522-015-9617-5>
- Miura, K., Okada, Y., Aoi, T., Okada, A., Takahashi, K., Okita, K., Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Ohnuki, M., Ogawa, D., Ikeda, E., Okano, H., & Yamanaka, S. (2009). Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nature Biotechnology*, 27(8), 743–745. <https://doi.org/10.1038/NBT.1554>
- Moghadam, F. H., Alaie, H., Karbalaie, K., Tanhaei, S., Nasr Esfahani, M. H., & Baharvand, H. (2009). Transplantation of primed or unprimed mouse embryonic stem cell-derived neural precursor cells improves cognitive function in Alzheimerian rats. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 78(2–3), 59–68.
<https://doi.org/10.1016/j.diff.2009.06.005>
- Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2012). DNA Methylation and Its Basic Function. *Neuropsychopharmacology* 2013 38:1, 38(1), 23–38.
<https://doi.org/10.1038/npp.2012.112>
- Morel, G. R., Andersen, T., Pardo, J., Zuccolilli, G. O., Cambiaggi, V. L., Hereñú, C. B., & Goya, R. G. (2015). Cognitive impairment and morphological changes in the dorsal

- hippocampus of very old female rats. *Neuroscience*, 303, 189–199.
<https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2015.06.050>
- Nagy, A., & Nagy, K. (2010). The mysteries of induced pluripotency: Where will they lead? *Nature Methods*, 7(1), 22–24. <https://doi.org/10.1038/NMETH.F.292>
- Nedelec, S., Onteniente, B., Peschanski, M., & Martinat, C. (2013). Genetically-modified human pluripotent stem cells: new hopes for the understanding and the treatment of neurological diseases? *Current Gene Therapy*, 13(2), 111–119.
<https://doi.org/10.2174/1566523211313020005>
- Nishimura, T., Kaneko, S., Kawana-Tachikawa, A., Tajima, Y., Goto, H., Zhu, D., Nakayama-Hosoya, K., Iriguchi, S., Uemura, Y., Shimizu, T., Takayama, N., Yamada, D., Nishimura, K., Ohtaka, M., Watanabe, N., Takahashi, S., Iwamoto, A., Koseki, H., Nakanishi, M., ... Nakauchi, H. (2013). Generation of rejuvenated antigen-specific T cells by reprogramming to pluripotency and redifferentiation. *Cell Stem Cell*, 12(1), 114–126.
<https://doi.org/10.1016/J.STEM.2012.11.002>
- Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009). A parallel circuit of LIF signalling pathways maintains pluripotency of mouse ES cells. *Nature*, 460(7251), 118–122.
<https://doi.org/10.1038/NATURE08113>
- Noodén, L. D. (1984). Integration of soybean pod development and monocarpic senescence. *Physiologia Plantarum*, 62(2), 273–284. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1984.TB00382.X>
- Noodén, L. D., & Leopold, A. C. (Aldo C. (1988). *Senescence and aging in plants*. Academic Press. <http://www.sciencedirect.com:5070/book/9780125209205/senescence-and-aging-in-plants>
- Nowak, M. A., Boerlijst, M. C., Cooke, J., & Smith, J. M. (1997). Evolution of genetic redundancy. *Nature*, 388(6638), 167–171. <https://doi.org/10.1038/40618>
- Ocampo, A., Reddy, P., Martinez-Redondo, P., Platero-Luengo, A., Hatanaka, F., Hishida, T., Li, M., Lam, D., Kurita, M., Beyret, E., Araoka, T., Vazquez-Ferrer, E., Donoso, D., Roman, J. L., Xu, J., Rodriguez Esteban, C., Nuñez, G., Nuñez Delicado, E., Campistol, J. M., ... Izpisua Belmonte, J. C. (2016). In Vivo Amelioration of Age-Associated Hallmarks by Partial Reprogramming. *Cell*, 167(7), 1719-1733.e12.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.052>
- Ohnishi, K., Semi, K., Yamamoto, T., Shimizu, M., Tanaka, A., Mitsunaga, K., Okita, K., Osafune, K., Arioka, Y., Maeda, T., Soejima, H., Moriwaki, H., Yamanaka, S., Woltjen, K., & Yamada, Y. (2014). Premature termination of reprogramming in vivo leads to cancer development through altered epigenetic regulation. *Cell*, 156(4), 663–677.
<https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.01.005>

- Okano, H., Nakamura, M., Yoshida, K., Okada, Y., Tsuji, O., Nori, S., Ikeda, E., Yamanaka, S., & Miura, K. (2013). Steps toward safe cell therapy using induced pluripotent stem cells. *Circulation Research*, *112*(3), 523–533.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.256149>
- Okumura-Nakanishi, S., Saito, M., Niwa, H., & Ishikawa, F. (2005). Oct-3/4 and Sox2 Regulate Oct-3/4 Gene in Embryonic Stem Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(7), 5307–5317. <https://doi.org/10.1074/JBC.M410015200>
- Olova, N., Simpson, D. J., Marioni, R. E., & Chandra, T. (2019). Partial reprogramming induces a steady decline in epigenetic age before loss of somatic identity. *Aging Cell*, *18*(1). <https://doi.org/10.1111/ACEL.12877>
- Palmer, D. J., & Ng, P. (2004). Physical and infectious titers of helper-dependent adenoviral vectors: a method of direct comparison to the adenovirus reference material. *Molecular Therapy*, *10*(4), 792–798.
<https://doi.org/10.1016/J.YMTHE.2004.06.1013>
- Pang, Z. P., Yang, N., Vierbuchen, T., Ostermeier, A., Fuentes, D. R., Yang, T. Q., Citri, A., Sebastiano, V., Marro, S., Südhof, T. C., & Wernig, M. (2011). Induction of human neuronal cells by defined transcription factors. *Nature*, *476*(7359), 220–223.
<https://doi.org/10.1038/nature10202>
- Pardo, J., Abba, M. C., Lacunza, E., Francelle, L., Morel, G. R., Outeiro, T. F., & Goya, R. G. (2017). Identification of a conserved gene signature associated with an exacerbated inflammatory environment in the hippocampus of aging rats. *Hippocampus*, *27*(4), 435–449. <https://doi.org/10.1002/HIPO.22703>
- Parks, R. J., & Graham, F. L. (1997). A helper-dependent system for adenovirus vector production helps define a lower limit for efficient DNA packaging. *Journal of Virology*, *71*(4), 3293–3298. <https://doi.org/10.1128/JVI.71.4.3293-3298.1997>
- Parras, A., Vílchez-Acosta, A., Desdín-Micó, G., Rechsteiner, C., Battiston, F., Branchina, C., Pérez, K., Sempoux, C., & Ocampo, A. (2022). *In vivo reprogramming leads to premature death due to hepatic and intestinal failure*.
<https://doi.org/10.1101/2022.05.27.493700>
- Patel, M., & Yang, S. (2010). Advances in reprogramming somatic cells to induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Reviews and Reports*, *6*(3), 367–380.
<https://doi.org/10.1007/S12015-010-9123-8>
- Paxinos, G., & Watson, C. (2014). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Seventh Edition*. Elsevier Academic Press, 170.
- Petkovich, D. A., Podolskiy, D. I., Lobanov, A. v., Lee, S. G., Miller, R. A., & Gladyshev, V. N. (2017). Using DNA Methylation Profiling to Evaluate Biological Age and Longevity

- Interventions. *Cell Metabolism*, 25(4), 954-960.e6.
<https://doi.org/10.1016/J.CMET.2017.03.016>
- Phipson, B., Maksimovic, J., & Oshlack, A. (2016). missMethyl: an R package for analyzing data from Illumina's HumanMethylation450 platform. *Bioinformatics*, 32(2), 286–288. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTV560>
- Polo, J. M., Anderssen, E., Walsh, R. M., Schwarz, B. A., Nefzger, C. M., Lim, S. M., Borkent, M., Apostolou, E., Alaei, S., Cloutier, J., Bar-Nur, O., Cheloufi, S., Stadtfeld, M., Figueroa, M. E., Robinton, D., Natesan, S., Melnick, A., Zhu, J., Ramaswamy, S., & Hochedlinger, K. (2012). A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. *Cell*, 151(7), 1617–1632. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.11.039>
- Pomatto, L. C. D., & Davies, K. J. A. (2017). The role of declining adaptive homeostasis in ageing. *The Journal of Physiology*, 595(24), 7275–7309.
<https://doi.org/10.1113/JP275072>
- Q, A., E, L. B., P, B., C, L., N, B., M, G., F, E., C, B.-G., L, P., K, T., J, V., C, H., D, N., C, J., F, C., O, M., & J, L. (2021). A single short reprogramming early in life improves fitness and increases lifespan in old age. <https://doi.org/10.1101/2021.05.13.443979>
- Raj, K. (2018). The Epigenetic Clock and Aging. *Epigenetics of Aging and Longevity: Translational Epigenetics Vol 4*, 95–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-8111060-7.00004-8>
- Raman, S., Brookhouser, N., & Brafman, D. A. (2020). Using human induced pluripotent stem cells (hiPSCs) to investigate the mechanisms by which Apolipoprotein E (APOE) contributes to Alzheimer's disease (AD) risk. *Neurobiology of Disease*, 138, 104788.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.104788>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rodríguez-Matellán, A., Alcazar, N., Hernández, F., Serrano, M., & Ávila, J. (2020). In Vivo Reprogramming Ameliorates Aging Features in Dentate Gyrus Cells and Improves Memory in Mice. *Stem Cell Reports*, 15(5), 1056–1066.
<https://doi.org/10.1016/J.STEMCR.2020.09.010>
- Ross, P. J., Kennedy, M. A., & Parks, R. J. (2009). Host Cell Detection of Noncoding Stuffer DNA Contained in Helper-Dependent Adenovirus Vectors Leads to Epigenetic Repression of Transgene Expression. *Journal of Virology*, 83(17), 8409–8417.
<https://doi.org/10.1128/jvi.00796-09>
- Rowe, W. B., Blalock, E. M., Chen, K. C., Kadish, I., Wang, D., Barrett, J. E., Thibault, O., Porter, N. M., Rose, G. M., & Landfield, P. W. (2007). Hippocampal expression

- analyses reveal selective association of immediate-early, neuroenergetic, and myelinogenic pathways with cognitive impairment in aged rats. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(12), 3098–3110. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4163-06.2007>
- Rowland, H. A., Hooper, N. M., & Kellett, K. A. B. (2018). Modelling Sporadic Alzheimer's Disease Using Induced Pluripotent Stem Cells. *Neurochemical Research*, 43(12), 2179–2198. <https://doi.org/10.1007/s11064-018-2663-z>
- Rozovsky, I., Wei, M., Morgan, T. E., & Finch, C. E. (2005). Reversible age impairments in neurite outgrowth by manipulations of astrocytic GFAP. *Neurobiology of Aging*, 26(5), 705–715. <https://doi.org/10.1016/J.NEUROBIOLAGING.2004.06.009>
- Sancho-Martinez, I., Baek, S. H., & Izpisua Belmonte, J. C. (2012). Lineage conversion methodologies meet the reprogramming toolbox. *Nature Cell Biology*, 14(9), 892–899. <https://doi.org/10.1038/NCB2567>
- Sandig, V., Youil, R., Bett, A. J., Franlin, L. L., Oshima, M., Maione, D., Wang, F., Metzker, M. L., Savino, R., & Caskey, C. T. (2000). Optimization of the helper-dependent adenovirus system for production and potency in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(3), 1002–1007. <https://doi.org/10.1073/PNAS.97.3.1002>
- Sarkar, T. J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C. M., Chu, C. R., Horvath, S., Qi, L. S., Bhutani, N., Rando, T. A., & Sebastiano, V. (2020a). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15174-3>
- Sarkar, T. J., Quarta, M., Mukherjee, S., Colville, A., Paine, P., Doan, L., Tran, C. M., Chu, C. R., Horvath, S., Qi, L. S., Bhutani, N., Rando, T. A., & Sebastiano, V. (2020b). Transient non-integrative expression of nuclear reprogramming factors promotes multifaceted amelioration of aging in human cells. *Nature Communications*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15174-3>
- Shavlakadze, T., Morris, M., Fang, J., Wang, S. X., Zhu, J., Zhou, W., Tse, H. W., Mondragon-Gonzalez, R., Roma, G., & Glass, D. J. (2019). Age-Related Gene Expression Signature in Rats Demonstrate Early, Late, and Linear Transcriptional Changes from Multiple Tissues. *Cell Reports*, 28(12), 3263–3273.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2019.08.043>
- Shivraj Sohur, U., Emsley, J. G., Mitchell, B. D., & Macklis, J. D. (2006). Adult neurogenesis and cellular brain repair with neural progenitors, precursors and stem cells. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 361(1473), 1477–1497. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2006.1887>

- Simon, N., Friedman, J., Hastie, T., & Tibshirani, R. (2011). Regularization Paths for Cox's Proportional Hazards Model via Coordinate Descent. *Journal of Statistical Software*, 39(5), 1–13. <https://doi.org/10.18637/jss.v039.i05>
- Simpson, D. J., Olova, N. N., & Chandra, T. (2021). Cellular reprogramming and epigenetic rejuvenation. *Clinical Epigenetics* 2021 13:1, 13(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/S13148-021-01158-7>
- Sinclair DA, LaPlante MD, D. C. (2019). *Lifespan* (Atria Books, Ed.; 1st ed.).
- Sommer, C. A., Stadtfeld, M., Murphy, G. J., Hochedlinger, K., Kotton, D. N., & Mostoslavsky, G. (2009). Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette EMBRYONIC STEM CELLS/INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS Induced Pluripotent Stem Cell Generation Using a Single Lentiviral Stem Cell Cassette. *STEM CELLS*, 27, 543–549. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2008-1075>
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., & Hochedlinger, K. (2008). Induced pluripotent stem cells generated without viral integration. *Science*, 322(5903), 945–949. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1162494/SUPPL_FILE/STADTFELD.SOM.PDF
- Steve, H., Singh, K., Raj, K., Khairnar, S., Sanghavi, A., Shrivastava, A., Zoller, J. A., Li, C. Z., Herenu, C. B., Canatelli-Mallat, M., Lehmann, M., Woods, L. C. S., Martinez, A. G., Wang, T., Chiavellini, P., Levine, A. J., Chen, H., Goya, R. G., & Katcher, H. L. (2020). *Reversing age: dual species measurement of epigenetic age with a single clock*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.05.07.082917>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4), 663–676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2016). A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2016 17:3, 17(3), 183–193. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.8>
- Tincer, G., Mashkaryan, V., Bhattarai, P., & Kizil, C. (2016). Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 89(1), 23–35.
- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H., & Yamanaka, S. (2003). Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for embryonic stem cell self-renewal and mouse development. *Molecular and Cellular Biology*, 23(8), 2699–2708. <https://doi.org/10.1128/MCB.23.8.2699-2708.2003>
- Tomioka, M., Nishimoto, M., Miyagi, S., Katayanagi, T., Fukui, N., Niwa, H., Muramatsu, M., & Okuda, A. (2002). Identification of Sox-2 regulatory region which is under the control of Oct-3/4-Sox-2 complex. *Nucleic Acids Research*, 30(14), 3202–3213. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKF435>

- Vanyushin, B. F., Mazin, A. L., Vasilyev, V. K., & Belozersky, A. N. (1973). The content of 5-methylcytosine in animal DNA: The species and tissue specificity. *BBA Section Nucleic Acids And Protein Synthesis*, 299(3), 397–403. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(73\)90264-5](https://doi.org/10.1016/0005-2787(73)90264-5)
- Verbitsky, M., Yonan, A. L., Malleret, G., Kandel, E. R., Gilliam, T. C., & Pavlidis, P. (2004). Altered Hippocampal Transcript Profile Accompanies an Age-Related Spatial Memory Deficit in Mice. *Learning & Memory*, 11(3), 253. <https://doi.org/10.1101/LM.68204>
- Waddington, C. H. (1957). The strategy of the genes. A discussion of some aspects of theoretical biology. With an appendix by H. Kacser. *The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology. With an Appendix by H. Kacser.*
- Wahlestedt, M., Erlandsson, E., Kristiansen, T., Lu, R., Brakebusch, C., Weissman, I. L., Yuan, J., Martin-Gonzalez, J., & Bryder, D. (2017). Clonal reversal of ageing-associated stem cell lineage bias via a pluripotent intermediate. *Nature Communications*, 8. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS14533>
- Wang, C., Rabadan Ros, R., Martinez-Redondo, P., Ma, Z., Shi, L., Xue, Y., Guillen-Guillen, I., Huang, L., Hishida, T., Liao, H. K., Nuñez Delicado, E., Rodriguez Esteban, C., Guillen-Garcia, P., Reddy, P., & Izpisua Belmonte, J. C. (2021). In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nature Communications*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-021-23353-Z>
- Wang, Y., Fu, A. K. Y., & Ip, N. Y. (2022). Instructive roles of astrocytes in hippocampal synaptic plasticity: neuronal activity-dependent regulatory mechanisms. *The FEBS Journal*, 289(8), 2202–2218. <https://doi.org/10.1111/FEBS.15878>
- Watanabe, S., Mishima, Y., Shimizu, M., Suetake, I., & Takada, S. (2018). Interactions of HP1 Bound to H3K9me3 Dinucleosome by Molecular Simulations and Biochemical Assays. *Biophysical Journal*, 114(10), 2336–2351. <https://doi.org/10.1016/J.BPJ.2018.03.025>
- Weintraub, H., Tapscott, S. J., Davis, R. L., Thayer, M. J., Adam, M. A., Lassar, A. B., & Miller, A. D. (1989). Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(14), 5434–5438. <https://doi.org/10.1073/PNAS.86.14.5434>
- Wernig, M., Lengner, C. J., Hanna, J., Lodato, M. A., Steine, E., Foreman, R., Staerk, J., Markoulaki, S., & Jaenisch, R. (2008). A drug-inducible transgenic system for direct reprogramming of multiple somatic cell types. *Nature Biotechnology*, 26(8), 916–924. <https://doi.org/10.1038/NBT1483>

- Wi, S., Yu, J. H., Kim, M., & Cho, S. R. (2016). In Vivo Expression of Reprogramming Factors Increases Hippocampal Neurogenesis and Synaptic Plasticity in Chronic Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Neural Plasticity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2580837>
- Winięcka-Klimek, M., Smolarz, M., Walczak, M. P., Zieba, J., Hulas-Bigoszewska, K., Kmiecik, B., Piaskowski, S., Rieske, P., Grzela, D. P., & Stoczynska-Fidelus, E. (2015). SOX2 and SOX2-MYC Reprogramming Process of Fibroblasts to the Neural Stem Cells Compromised by Senescence. *PLoS One*, 10(11), e0141688. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141688>
- Wolfgang, H. (1992). *Early Embryonic Development of Animals - Results and Problems in Cell Differentiation*. <https://imusic.co/books/9783662218365/wolfgang-hennig-2013-early-embryonic-development-of-animals-results-and-problems-in-cell-differentiation-paperback-book>
- Wood, J. G., Hillenmeyer, S., Lawrence, C., Chang, C., Hosier, S., Lightfoot, W., Mukherjee, E., Jiang, N., Schorl, C., Brodsky, A. S., Neretti, N., & Helfand, S. L. (2010). Chromatin remodeling in the aging genome of Drosophila. *Aging Cell*, 9(6), 971–978. <https://doi.org/10.1111/J.1474-9726.2010.00624.X>
- Wu, D. Y., Zhang, X., & Miao, Y. L. (2019). Reprogramming of Aged Cells into Pluripotent Stem Cells by Nuclear Transfer. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 2045, 271–281. https://doi.org/10.1007/7651_2018_118
- Yagita, K., Horie, K., Koinuma, S., Nakamura, W., Yamanaka, I., Urasaki, A., Shigeyoshi, Y., Kawakami, K., Shimada, S., Takeda, J., & Uchiyama, Y. (2010). Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(8), 3846–3851. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0913256107>
- Yang, H., Zhang, L., An, J., Zhang, Q., Liu, C., He, B., & Hao, D.-J. (2017). MicroRNA-Mediated Reprogramming of Somatic Cells into Neural Stem Cells or Neurons. *Molecular Neurobiology*, 54(2), 1587–1600. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0115-9>
- Yang, J.-H., Griffin, P. T., Vera, D. L., Apostolides, J. K., Hayano, M., Meer, M. v, Salfati, E. L., Su, Q., Munding, E. M., Blanchette, M., Bhakta, M., Dou, Z., Xu, C., Pippin, J. W., Creswell, M. L., O’Connell, B. L., Green, R. E., Garcia, B. A., Berger, S. L., ... Sinclair, D. A. (2019). Erosion of the Epigenetic Landscape and Loss of Cellular Identity as a Cause of Aging in Mammals. *BioRxiv*, 808642. <https://doi.org/10.1101/808642>
- Yang, J.-H., Hayano, M., Griffin, P. T., Amorim, J. A., Bonkowski, M. S., Apostolides, J. K., Salfati, E. L., Blanchette, M., Munding, E. M., Bhakta, M., Chew, Y. C., Guo, W., Yang, X., Maybury-Lewis, S., Tian, X., Ross, J. M., Coppotelli, G., Meer, M. v, Rogers-Hammond, R., ... Sinclair, D. A. (2023). Loss of epigenetic information as a cause of

mammalian aging. *Cell*, 186(2), 305-326.e27.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.12.027>

Yao, P. J., Petralia, R. S., & Mattson, M. P. (2016). Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity. *Trends in Neurosciences*, 39(12), 840–850.
<https://doi.org/10.1016/J.TINS.2016.10.001>

Zhang, B., Trapp, A., Kerepesi, C., & Gladyshev, V. N. (2022). Emerging rejuvenation strategies—Reducing the biological age. *Aging Cell*, 21(1).
<https://doi.org/10.1111/ACEL.13538>

Zhang, Q., Vallerga, C. L., Walker, R. M., Lin, T., Henders, A. K., Montgomery, G. W., He, J., Fan, D., Fowdar, J., Kennedy, M., Pitcher, T., Pearson, J., Halliday, G., Kwok, J. B., Hickie, I., Lewis, S., Anderson, T., Silburn, P. A., Mellick, G. D., ... Visscher, P. M. (2019). Improved precision of epigenetic clock estimates across tissues and its implication for biological ageing. *Genome Medicine*, 11(1).
<https://doi.org/10.1186/s13073-019-0667-1>

Zhang, Y., & Bergelson, J. M. (2005). Adenovirus receptors. *Journal of Virology*, 79(19), 12125–12131. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.19.12125-12131.2005>