

“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”



El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Reprogramación Celular e Ingeniería Genética del Departamento de Biología Molecular, de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto para obtener el título de Microbióloga.

Seminarista: Virginia Capella.

Directora: Dra. Nancy Rodríguez.

Co-Directora: Lic. María Florencia Olmos Nicotra.

Miembros del Tribunal Evaluador: Dra. Nancy Rodríguez.

Dra. María Cristina Romanini.

MSc. Nora Mayer.

Río Cuarto, 17 de Diciembre del 2014.

“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”



*A mis padres, a quienes amo con toda el alma.*



### *Agradecimientos:*

- ✓ A Dios, por darme la vida e iluminarme cada día de ella. Por estar presente en los buenos momentos y en las caídas. Por darme las señales indicadas cada vez que las necesitaba.
- ✓ A mis padres, por todo su amor y comprensión. Por enseñarme desde niña que los límites se los pone uno mismo y que existe todo un mundo de posibilidades si nos atrevemos a luchar por nuestros sueños. Por contenerme en los peores momentos y disfrutar a mi lado en aquellos de felicidad plena. Por estar siempre sin pedir nada a cambio. Por darme la posibilidad de estudiar aunque eso significara sacrificios.
- ✓ A mi hermano Quique, por ser esa persona especial que me entiende y que, a pesar de las peleas naturales de hermanos, está a mi lado ayudándome a comprender este bello desorden de vida.
- ✓ A mis abuelos, por ser mis confidentes eternos. Por enseñarme, aconsejarme, quererme y casi siempre, malcriarme. Por ser tan maravillosos.
- ✓ A mis tíos, por estar siempre presentes y brindarme todo su afecto.
- ✓ A mi primo Mateo, por volver el tiempo más hermoso.
- ✓ A Micaela, por ser esa hermana que me dio la vida. Por ser la persona que mejor me entiende. Por no estar nunca lejos a pesar de la distancia.
- ✓ A mis compañeros y amigos: Paula, Bianca, María, Jesica, Camila, Carla, Ladislao y Diego. Por las tardes y noches de estudio, los mates con confidencias, los ataques de risa y las locuras momentáneas. Por acompañarme en los últimos 6 años, haciendo que cada día se vuelva memorable. Por escucharme, incluso en momentos de desesperación previos a rendir. Por estar ahí incluso cuando no me soportaba ni yo misma. Sobre todo por su gran amistad.
- ✓ A Nancy, por haberme dado todas las posibilidades que estaban a su alcance. Por su paciencia, tranquilidad y por esa energía positiva que me siempre me transmitió. Por haber creído en mí aún cuando yo dudaba.
- ✓ A Pablo, por dejarme formar parte del maravilloso grupo de trabajo. Por estar siempre predispuesto a enseñarme y ayudarme.

“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”

- ✓ A Florencia, por su dedicación al enseñarme todo lo que se. Por permitirme trabajar con plena libertad y confiar en mí. Por su tiempo y sus correcciones. Por su ayuda dentro y fuera del laboratorio.
- ✓ A mis compañeros de laboratorio: Ana, Cecilia, Florencia, Alejandro, Fabricio y Diego. Por su compañía, enseñanzas y consejos en estos 2 años de trabajo. Por las rondas de mates, café, asados, salidas y bromas. Por la paciencia y buena onda.
- ✓ Al Tribunal Evaluador: María Cristina Romanini y Nora Mayer, por su tiempo y sus correcciones.
- ✓ A la Universidad Nacional de Río Cuarto estatal, libre y gratuita por darme la formación de grado con excelente calidad. A la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y al Departamento de Biología Molecular por abrirme las puertas.

***“Creo que más fuerte que la sabiduría, es la imaginación. Que más potente que la historia, es el mito. Que la esperanza siempre triunfa sobre la experiencia. Que la única cura para el dolor es la risa. Que más poderosos que la realidad, son los sueños”***



## Índice

<i>Resumen</i> .....	1
<i>Introducción</i> .....	2
Capítulo 1: Transgénesis Animal.....	2
Capítulo 2: Métodos de transgénesis en animales.....	3
2.1. Transgénesis mediante microinyección pronuclear.....	3
2.2. Transgénesis mediante el uso de vectores virales.....	4
2.3. Transgénesis mediada por espermatozoides.....	5
2.4. Transgénesis mediante células madres embrionarias.....	5
2.5. Transgénesis mediante transferencia nuclear de células somáticas.....	6
Capítulo 3: Métodos de Transfección.....	8
3.1. Transfección mediante métodos químicos: agentes de transfección.....	8
3.1.1. Polietilenimina.....	8
3.1.2. Lipofectamina.....	9
3.1.3. JetPrime.....	10
3.2. Transfección mediante métodos físicos: electroporación.....	10
Capítulo 4: Telomerasa.....	12
<i>Hipótesis</i> .....	20
<i>Objetivo general</i> .....	21
<i>Objetivos específicos</i> .....	21
<i>Materiales y Métodos</i> .....	22
Capítulo 1: Aislamiento y cultivo de fibroblastos adultos bovinos.....	22
1.1 Congelado y descongelado de fibroblastos adultos bovinos.....	23
Capítulo 2: Vectores Plasmídicos.....	23
Capítulo 3: Cepa bacteriana.....	24
Capítulo 4: Clonación de plásmidos pZGreenN1 y pCIneo-hEST2.....	25
Capítulo 5: Recuperación plasmídica, almacenado y cuantificación.....	25

“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”

5.1. mini-extracción de ADN plasmídico a través de Kit Comercial.....	26
5.2. Midiextracción de ADN plasmídico.....	26
5.2.1. Midiextracción alcalina.....	26
5.2.2. Midiextracción a través de kit comercial.....	26
5.3. Almacenamiento de ADN plasmídico.....	27
5.4. Estimación de la concentración.....	27
Capítulo 6: Identificación del plásmido de interés pCI neo-hEST2.....	27
Capítulo 7: Transfección de Fibroblastos Adultos Bovinos. ....	29
7.1. Método físico: electroporación.....	29
7.2. Método químico: agente poliamínico JetPrime (Polyplus).....	30
Capítulo 8: Selección de colonias resistentes.....	30
Capítulo 9: Optimización de la amplificación del gen de hTERT mediante PCR.....	31
<i>Resultados.</i> ....	33
Capítulo 1: Aislamiento y cultivo de Fibroblastos Adultos Bovinos. ....	33
Capítulo 2: Plásmidos pZGreenN1 y pCIneo-hEST2. ....	33
2.1. Purificación del ADN plasmídico e identificación del mismo. ....	33
2.2. Cuantificación del ADN plasmídico purificado. ....	35
Capítulo 3: Transfección de Fibroblastos Adultos Bovinos. ....	36
3.1. Método físico: electroporación.....	36
3.2. Método químico: agente poliamínico JetPrime (Polyplus). ....	37
Capítulo 4: Selección de colonias celulares resistentes a G418.....	40
4.1. Método físico: electroporación.....	40
4.2. Método químico: agente poliamínico JetPrime (PolyPlus). ....	40
Capítulo 5: Optimización de las condiciones de amplificación por PCR del gen de la hTERT. ....	41
<i>Discusión.</i> ....	42
<i>Conclusiones.</i> ....	44
<i>Bibliografía.</i> ....	45



*Abreviaturas.*

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µs	Microsegundo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNsc	Ácido Ribonucleico simple cadena
atm	atmósfera
c.s.p	cantidad suficiente para
C+	Control Positivo
cm	centímetros
cm <sup>3</sup>	centímetros cúbicos
DMEM*	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DNAsa*	Desoxirribonucleasa.
DO	Densidad Óptica
DPBS*	Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline
E. coli	Escherichia coli
EGFP*	Proteína Verde Fluorescente
FAB	Fibroblastos Adultos Bovinos
FB	Fibroblastos Bovinos

“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”



GTE	Glucosa Tris EDTA
hs	horas
Kb	Kilobases
LB	Luria Bertani
mg	miligramos
mL	mililitros
mM	miliMolar
ms	milisegundos
nm	nanomolar
°C	Grado centígrado
ON*	Over Night
P16	Proteína 16
pb	Pares de Bases
PCR*	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PEI	Polietilenimina
Rb	Proteína del Retinoblastoma.
RNAsa*	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
SDS*	Dodecilsulfato Sódico
SFB	Suero Fetal Bovino
TAE	Tris Acetato EDTA
TER*	Cebador de Telomerasa



“PRODUCCIÓN DE UNA LÍNEA FIBROBLÁSTICA INMORTAL  
PARA APLICACIONES TRANSGÉNICAS EN LA ESPECIE  
BOVINA”



TERT*	Telomerasa Transcriptasa inversa.
TN	Transferencia Nuclear
TNCS	Transferencia Nuclear de Células Somáticas
U	Unidad
V	Voltios

\* Proveniente de sus siglas en ingles.

### ***Resumen.***

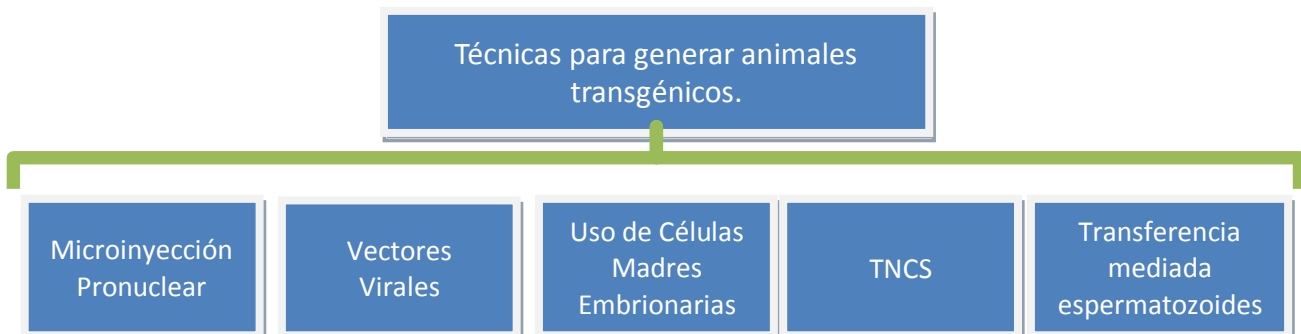
Las líneas celulares primarias poseen una vida finita bajo condiciones *in vitro* debido a la senescencia replicativa, lo que impide la introducción de modificaciones complejas. Una alternativa a este impedimento es la introducción del gen de la telomerasa transcripta reversa humana (hTERT), la subunidad activa de la telomerasa, que posee actividad polimerasa RNA-DNA dependiente y adiciona así desoxirribonucleótidos en los extremos de los telómeros que se pierden por la incapacidad de la ADN polimerasa de sintetizar en dirección 3'→5'. El objetivo de este trabajo fue la producción de una línea celular bovina inmortal mediante la expresión forzada de la subunidad catalítica de la enzima TERT humana (hTERT). Se utilizaron cultivos de fibroblastos bovinos (L260 y 10.952), provenientes de biopsias de piel de bovinos adultos, crecidos en medio D-MEM con 10% de SFB y se transfectaron con 2 plásmidos, propagados en E.Coli DH5a. Uno de ellos fue: pZGreen1N1, que posee un casete para la expresión de la proteína verde fluorescente y otro para la neomicinafosfotransferasa (resistencia a Neomicina) y el otro pCIneo-hEST2, con casete para la expresión de hTERT y resistencia a neomicina. Previo a la incorporación de dichos plásmidos a las células bovinas, los mismos fueron identificados mediante restricción por endonucleasas. Se realizó mediante 2 técnicas, una de ella física (electroporación), estudiando distintos voltajes para su puesta a punto, y la otra química, (JetPrime). En cada técnica se realizaron tres experimentos: transfección con pZGreenN1, transfección con pCIneo-hEST2 y co-transfección con ambos plásmidos. A las 72 hs luego de la transfección se contaron las células que mostraron expresión de la proteína verde fluorescente y el total de células por campo, calculando el porcentaje de transfección transitoria del plásmido pZGreen1N1. Se obtuvieron líneas celulares de fibroblastos adultos bovinos luego de 21 días de selección con G418 y se recuperaron mediante el uso de anillos de clonado (“cloning rings”). Por ello fue posible determinar el porcentaje de transfección del plásmido pCIneo- hEST2. La transfección que otorgó mejor eficiencia fue aquella realizada sobre la línea celular 10.596 co-transfectada con ambos plásmidos. Además se puso a punto la detección de la construcción pCI neo-hEST2 mediante PCR. En conclusión, la expresión forzada de la subunidad catalítica de la enzima TERT humana (hTERT) inmortaliza las líneas celulares bovinas.

## *Introducción.*

### **Capítulo 1: Transgénesis Animal.**

Desde sus comienzos, el hombre ha seleccionado plantas y domesticado animales mediante el cruzamiento selectivo de individuos con el fin de transferir a la descendencia los caracteres deseados. Pero fue recién a partir de los años '70 que se produjo un rápido avance en las técnicas de ingeniería genética, las cuales se aplicaban a células bacterianas aisladas como así también a organismos eucarióticos uni o multicelulares, permitiendo la incorporación en ellos de genes exógenos. Los organismos genéticamente modificados, son organismos vivos a los cuales se les ha alterado al menos un gen con un fin práctico<sup>1</sup>. Si la modificación consiste en la introducción de fragmentos de genes (o de genes completos) de otros organismos, se genera lo que se denomina organismo transgénico. La transgénesis representa un modelo primordial para estudiar la regulación de la expresión génica<sup>2</sup>, la regulación de promotores y secuencias codificantes<sup>3</sup>, la regulación de procesos celulares y fisiológicos. El uso de ésta técnica en biomedicina (producción de órganos y tejidos para xenotransplantes)<sup>4,6</sup>, agricultura, biología y biotecnología requiere la capacidad de dirigir y controlar los niveles de ésta expresión.

El transgén es una secuencia de ADN que se transfiere o moviliza entre dos organismos o líneas distintas, y que no pertenece al repertorio genético del organismo receptor. Para el caso particular de la transgénesis animal, la transferencia del material genético se puede realizar por medio de varias técnicas. (Figura 1).



**Figura 1:** Metodologías más ampliamente usadas para generar animales transgénicos.

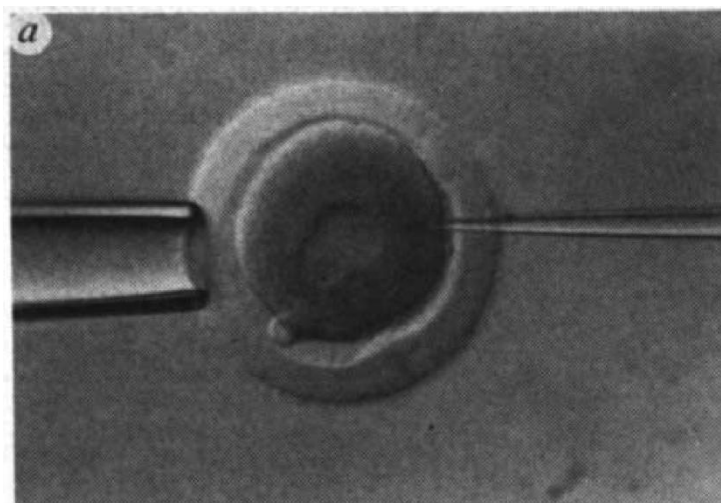
TNCS: Transferencia Nuclear de Células Somáticas

## Capítulo 2: Métodos de transgénesis en animales.

### 2.1. Transgénesis mediante microinyección pronuclear.

En los comienzos de la década de 1980, Gordon y colaboradores describieron una de las primeras técnicas utilizadas para generar ratones transgénicos. Este procedimiento se basó en inyectar ADN desnudo en el pronúcleo masculino de un embrión de ratón al estadio de cigoto, y posteriormente transferirlo a una hembra receptora sincronizada<sup>7</sup>. (Figura 2). Eventualmente, el ADN se integró al azar en el genoma y pudo ser heredado por la descendencia. Esto permitió obtener una integración temprana del transgén; lo que contribuyó en el genoma de todas las células tanto somáticas como germinales. Sin embargo este método normalmente resulta en un alto porcentaje de animales con mosaicismo, lo cual es causado por inserción tardía del transgén luego del primer clivaje.

A lo largo de los años la microinyección pronuclear ha sido la técnica de transgénesis más utilizada debido a su confiabilidad, aunque desafortunadamente posee una baja eficiencia; sobre todo en animales de granja ya que 5-40% de los cigotos manipulados integran el transgén. Ésta eficiencia está influenciada por una serie de factores, siendo los más relevantes la concentración, tamaño y forma del ADN. Para esta metodología se microinyecta el pronúcleo masculino debido a su tamaño<sup>8</sup>. A pesar de las desventajas nombradas, éste procedimiento se ha implementado con éxito en porcinos<sup>9</sup>, caprinos<sup>10</sup>, ovinos<sup>11</sup> y en menor medida en bovinos<sup>12</sup>.



**Figura 2:** Microinyección pronuclear en ovocito de conejo. Imagen tomada de <sup>9</sup>.

## **2.2. Transgénesis mediante el uso de vectores virales.**

A mediados de la década de 1970, se produjeron los primeros animales transgénicos mediante la microinyección, en blastocite de embriones de ratón, de ADN del virus 40 vacuolado del simio (SV40)<sup>13</sup>. Actualmente se utilizan dos tipos de vectores virales para lograr introducir ADN dentro del genoma, siendo éstos los retrovirus<sup>14-16</sup> y los adenovirus recombinantes de replicación defectiva<sup>17</sup>.

### 2.2.1. Retrovirus.

Los retrovirus poseen la ventaja de tener mecanismos naturales de infectividad, donde el material genético incorporado en ellos se libera en el interior de las células en forma de ARN. Éste es reversamente transcrito a ADN por la retrotranscriptasa viral asociada al virus y posteriormente integrado en el genoma de la célula animal por integrasas asociadas al virus<sup>18-20</sup>. Sin embargo existe una importante desventaja, produciéndose la integración al azar del ADN viral a células en división exclusivamente, produciéndose en etapas diferentes del embrión en desarrollo, resultando en diferentes sitios de inserción en el genoma o directamente sin inserción<sup>21</sup>. Otra desventaja de los retrovirus es su baja capacidad para transportar ADN foráneo, alrededor de 8 Kb, que limita las secuencias genómicas posibles para ser incorporadas.

### 2.2.2. Adenovirus recombinantes de replicación defectiva.

Los adenovirus son una alternativa para la transgénesis ya que poseen varias ventajas: pueden infectar un amplio rango de tipos celulares, transportar hasta 20 Kb de secuencias genómicas y producir altos títulos virales. Igualmente todavía no son claras las evidencias de su efectividad sobre gametos o embriones<sup>17</sup>.

El uso de vectores virales para generar animales transgénicos no es el método de elección, debido al riesgo de que produzcan ciclos líticos y/o integren al genoma genes virales.

### **2.3. Transgénesis mediada por espermatozoides.**

En 1971 Brackett y colaboradores reportaron por primera vez la capacidad de incubar semen con ADN exógeno y utilizarlo para fertilizar ovocitos<sup>22</sup>. Sin embargo, ésta técnica no adquirió relevancia hasta que en 1989 Lavitrano y colaboradores describieron la producción de ratones transgénicos mediante inseminación artificial, utilizando el mismo procedimiento general. Si bien estos resultados han sido cuestionados por no ser reproducibles en ratón<sup>23</sup>, se ha utilizado esta metodología para producir varios animales transgénicos como cerdos<sup>24-25</sup>, conejos<sup>26</sup>, sapos<sup>27</sup> y pez zebra<sup>28</sup>.

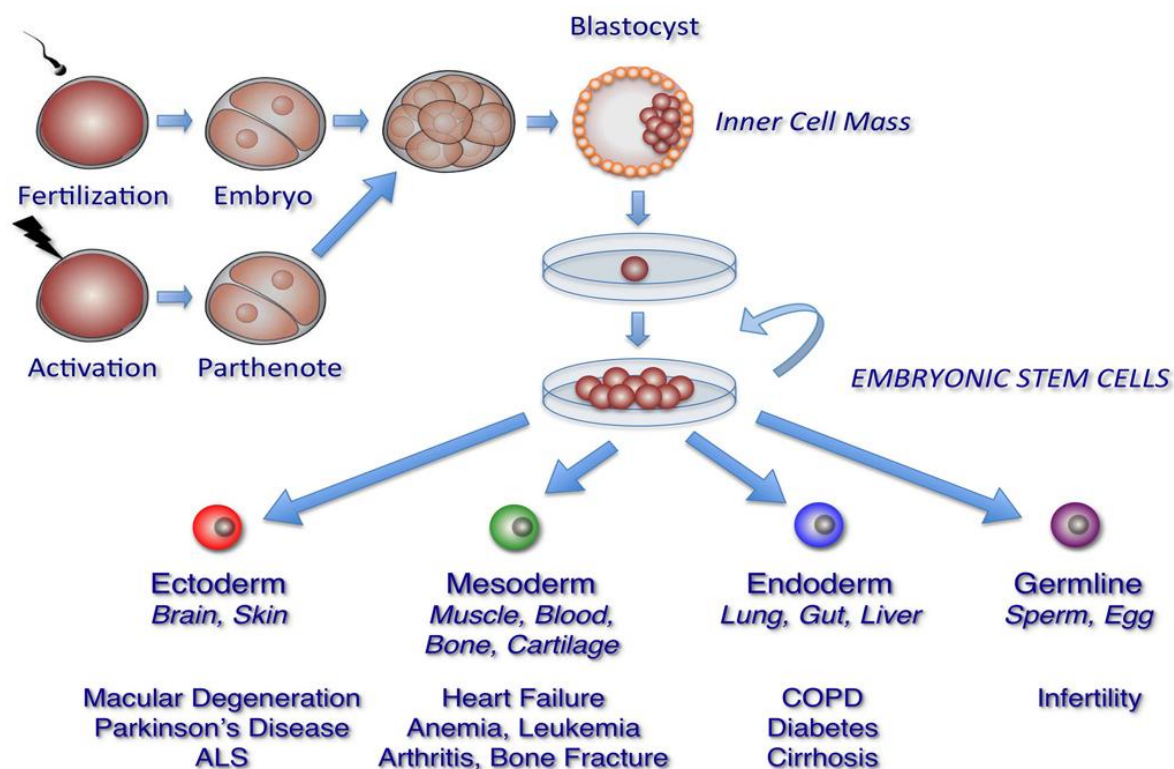
Ésta técnica es muy sencilla de realizar ya que no se requiere manipular embriones individualmente como en la microinyección, y permite inseminar varios ovocitos en un solo paso. Sin embargo también posee varias limitaciones, como la integración al azar del transgén, la disminución de movilidad de los espermatozoides cuando se utilizan complejos ADN-liposomas y la disminución del grado de fertilización *in vitro* a medida que aumenta la concentración de ADN.

Un método alternativo es la inyección directa del esperma, previamente incubado con el ADN foráneo, en el citoplasma del ovocito, mediante la técnica conocida como “Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides” (ICSI).

### **2.4. Transgénesis mediante células madres embrionarias.**

El desarrollo de células madres embrionarias (Embrionic Stem cells) para experimentos de recombinación homóloga en ratón comenzó a describirse a inicios de la década de 1980<sup>29-30</sup>. Ésta técnica consiste en aislar células del macizo celular interno del blastocito, modificarlos genéticamente *in vitro* y posteriormente inyectarla en el blastocele; originando ratones quiméricos<sup>31</sup> (Figura 3).

A pesar de las múltiples aplicaciones de las células madres embrionarias en diferentes especies, existen limitaciones en su uso en animales de granja<sup>32-34</sup>. Esto es debido a la dificultad en el cultivo de las mismas al tratar de mantenerlas indiferenciadas y a las dificultades para expandirlas *in vitro*<sup>35</sup>.



**Figura 3:** Generación de líneas de células madres embrionarias pluripotentes. Imagen tomada de <sup>94</sup>.

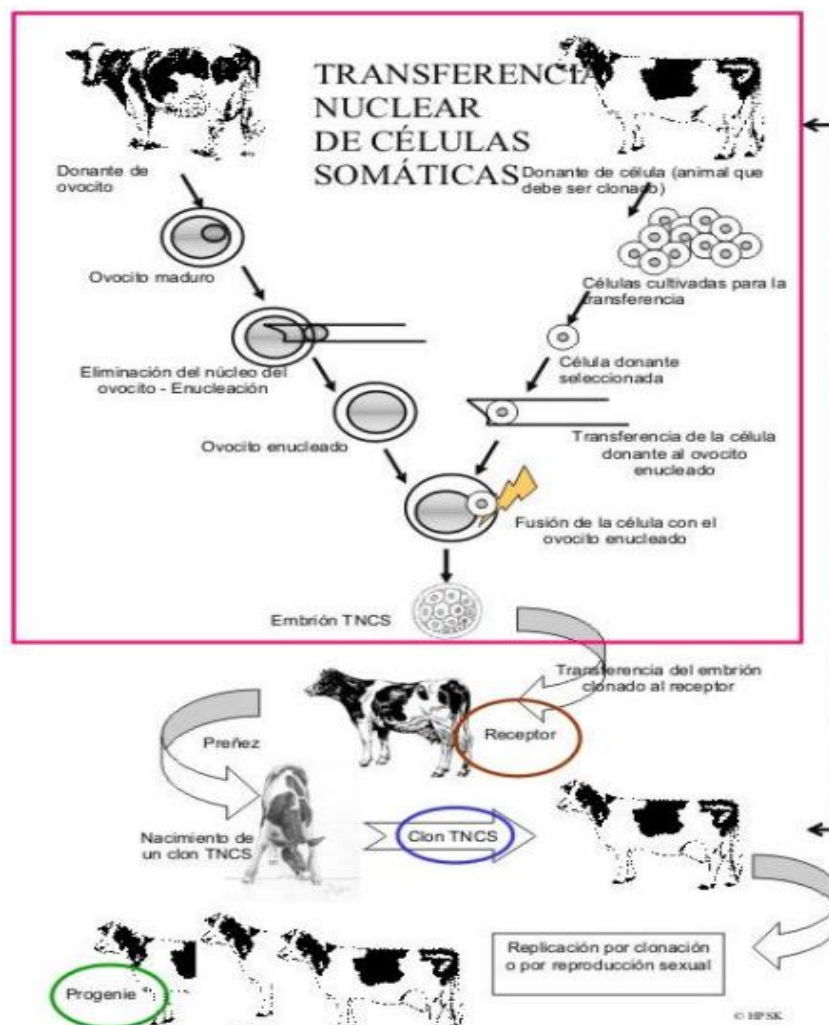
## 2.5. Transgénesis mediante transferencia nuclear de células somáticas.

La transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) es un procedimiento de laboratorio que ha generado un fuerte impacto en la ciencia. Ésta técnica ha permitido crear modelos para el estudio de diversos procesos celulares (función de los genes y reprogramación genómica) como así también patologías genéticas, terapia génica y cáncer. Pero quizás lo más importante como controversial, es que ha hecho posible crear una copia genéticamente idéntica de un animal, es decir un clon.

Las investigaciones iniciales en TN se describieron en 1987 por Prather y colaboradores. Éstas consistían en transferir una blastómera de embriones bovinos de 2 a 32 células a ovocitos madurados *in vitro* a los que previamente se les había extraído el material genético (enucleado) <sup>36</sup> (Figura 4). A lo largo de la década de los '80 se lograron obtener transferencias nucleares exitosas en animales como conejos<sup>37</sup>, cerdos<sup>38</sup>, bovinos<sup>36</sup> y ovejas<sup>39</sup>. En todas ellas se utilizaron como células donantes blastómeros embrionarios, es decir células



no diferenciadas. Sin embargo, cuando se repitieron los experimentos con células diferenciadas no se obtuvieron los resultados esperados, lo que llevó a pensar en que el ADN de las mismas no podía reprogramarse. Ésta hipótesis fue refutada con la clonación exitosa de la oveja “Dolly”<sup>40</sup>, que resultó de la fusión de un núcleo procedente de una célula mamaria extraída de una oveja adulta con un óvulo enucleado. De esta manera se demostró que las células diferenciadas podían ser reprogramadas. La reprogramación nuclear se puede definir como un conjunto de eventos epigenéticos requeridos por un núcleo para desarrollarse en diferentes destinos, por lo que se requiere una reprogramación adecuada del ovocito receptor para mantener al núcleo donante bajo el mismo control. En el proceso de clonación de la oveja “Dolly” el evento clave fue la sincronización de los ciclos celulares de la célula receptora y la célula donante que se logró mediante la privación de suero en esta última<sup>40-41</sup>.



**Figura 4:** Generación de un clon bovino mediante el uso de transferencia nuclear de células somáticas. Imagen tomada de <sup>95</sup>.



La TNCS se convirtió en una alternativa a las técnicas anteriormente mencionadas, ya que acorta el tiempo entre la obtención de un animal transgénico fundador y el establecimiento de un rebaño transgénico<sup>42</sup>. Debido a ello fue posible la eliminación de genes endógenos en animales de granja (knock out) y/o la inserción de genes de interés en regiones transcripcionalmente activas permitiendo el estudio de funciones biológicas de interés<sup>43-44</sup>. El primer paso para la producción de animales transgénicos mediante TNCS es incorporar el material genético de interés dentro de una célula en cultivo para que luego se integre en el genoma, al azar o en un sitio específico<sup>45</sup>. Para ello existen métodos de transfección que aseguran la incorporación del ADN exógeno a la célula y algunos, además, al núcleo<sup>46</sup>.

### **Capítulo 3: Métodos de Transfección.**

Para lograr obtener un animal transgénico es necesario modificar previamente su genoma; para ello es necesario el ingreso del transgén a la célula. Esto se puede realizar utilizando métodos químicos o físicos.

#### **3.1. Transfección mediante métodos químicos: agentes de transfección.**

En la actualidad la incorporación del ADN foráneo se puede llevar a cabo mediante agentes químicos que se encuentran disponibles en el mercado. Los más utilizados son: polietilenimina (PEI), Lipofectamina y JetPrime.

##### **3.1.1. Polietilenimina.**

La polietilenimina (PEI) es el polímero orgánico de mayor carga positiva que actualmente existe, debido a que en su estructura contiene una alta proporción de grupos aminos capaces de ser protonados. La estructura de este agente es:



La PEI conserva su estructura incluso a pH fisiológico que le permite actuar como tampón (buffer) dentro de los endosomas, protegiendo al ADN de la degradación lisosomal y así promover un ingreso eficiente del mismo al interior celular<sup>46</sup>. Éste agente funciona

capturando el ADN en suspensión, debido a la atracción generada por la diferencia de cargas, condensándolo sobre si y manteniendo las propiedades de tampón previamente mencionadas.

Las dos características más relevantes de este polímero son: es un polímero soluble en solventes polares; y presenta una cinética de formación de complejos (agente-ADN) muy rápida que disminuye así la sensibilidad a las ADNasas que contienen los medios de cultivo utilizados usualmente<sup>47</sup>.

Las ventajas son: su elevada eficiencia de transfección, su bajo costo y su alta capacidad de unirse al ADN forráneo. Uno de los grandes inconvenientes en el uso de la PEI como agente de transfección es su elevada toxicidad<sup>48-49</sup>. Debido a esto, es necesario optimizar la cantidad utilizada del agente según la línea celular utilizada, para minimizar el daño celular.

### 3.1.2. Lipofectamina.

Es un agente de transfección comercial (Life Technologies) que contiene subunidades lipídicas que forman, en un ambiente acuoso, liposomas con carga positiva que permiten el ingreso del ADN en su interior. El ingreso a las células se realiza cuando el complejo Lipofectamina-ADN se fusiona con la membrana plasmática o por medio de mecanismos flip-flap que permiten el paso de lípidos a través de la bicapa. También se postula que la Lipofectamina facilita el movimiento del ADN hacia el núcleo durante el proceso de mitosis<sup>50</sup>.

Algunas de las ventajas de este método son su baja toxicidad, su nula inmunogenicidad y su sencillez de aplicación. Sin embargo la mayor desventaja, junto a su alto costo, es el hecho de que el agente no funciona en todos los tipos celulares, resultando necesario optimizar el ensayo a cada uno. Los parámetros a optimizar, en la reacción de transfección, son: relación entre el agente y el ADN, cantidad de ADN empleado, tiempo de exposición de las células al complejo agente-ADN y presencia o ausencia de suero en el medio de cultivo utilizado.

### 3.1.3. JetPrime.

Es un agente de transfección comercial (Polyplus) derivado de la PEI. Por lo tanto posee la misma naturaleza y el mismo mecanismo de acción; pero fue optimizado para generar una mayor eficiencia y disminuir su toxicidad. Se utiliza para transfectar ADN como ARNsc exógeno y es ideal para realizar co-transfecciones ADN/ARNsc.

### **3.2. Transfección mediante métodos físicos: electroporación.**

La electroporación consiste en una simple técnica que utiliza pulsos eléctricos de alto voltaje; que aplicados a una célula generan un aumento significativo de la conductibilidad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática. Cuando el voltaje atraviesa la membrana plasmática excede su rigidez dieléctrica y permite la formación de poros. Los mismos permanecen abiertos por un corto período, momento en el cual ingresan productos extracelulares como el ADN foráneo en suspensión.

Éste método de transfección puede ser aplicado a una amplia gama de células desde procariotas hasta eucariotas, tanto vegetales como animales. La electroporación tiene la ventaja de ser un método simple, rápido y económico y por ello es utilizado con frecuencia. Existen varios factores que afectan la eficiencia de transfección, como la temperatura, parámetros de campo eléctrico (voltaje, resistencia y capacitancia), forma topológica del ADN y factores propios de la célula huésped (genética, condiciones de crecimiento y tratamiento post-pulso)<sup>51</sup>.

Luego de ingresar al interior celular, el ADN foráneo, que es el gen de interés, debe dirigirse al núcleo. Una vez dentro, el ADN puede seguir dos posibles vías: mantenerse en estado extracromosomal o incorporarse al genoma celular. En caso de que ocurra la primera opción, solamente persiste un corto tiempo; ya que se pierde a través de las divisiones celulares debido a que no posee generalmente un origen de replicación apto para la célula huésped. Esto se conoce como transfección transitoria. La segunda opción es cuando sucede la integración del ADN exógeno al genoma celular, situación denominada transfección estable y permite la generación de una línea celular transgénica que contiene y expresa el gen de interés. La transfección transitoria es útil para experimentos de corto plazo, mientras que la

transfección estable es requerida para procedimientos largos y con alta producción de proteína recombinante. Cuando se necesita una transfección estable, se requiere diferenciar aquellas células que incorporaron el transgén de las que no lo hicieron. Para lograr esta selección, en la reacción de transfección se incorpora además del gen de interés, un gen marcador de selección. Éstos suelen ser genes que confieren resistencia a antibióticos o genes que codifican proteínas fluorescentes, cuya función es permitir diferenciar las células transfectadas que hayan expresado correctamente el ADN exógeno de aquellas que no lo hicieron.

Existen varios mecanismos posibles a través de los cuales el ADN exógeno es integrado al genoma celular. Entre ellos se encuentran: inserción al azar, recombinación homóloga, recombinación no homóloga, recombinación específica de sitio, transposición, y mediante enzimas de restricción como las nucleasas con dedos de zinc (ZFN) y las nucleasas efectoras tipo activadoras de transcripción (TALENs).

Actualmente es posible incorporar (o eliminar) un determinado gen en células somáticas en cultivo (Ej.: cultivos primarios de fibroblastos) y luego utilizarlas como donantes de núcleos para producir animales clonados que portarán la modificación génica deseada<sup>52-53</sup>. Se considera que las líneas celulares primarias poseen una vida finita bajo condiciones de cultivo *in vitro*, por lo tanto, la introducción de modificaciones complejas es, en muchas oportunidades, imposible de lograr antes de que la línea sufra senescencia replicativa. Por ello, existe interés en desarrollar métodos que prolonguen la vida media de los cultivos primarios, otorgando así un margen de tiempo mayor para manipulaciones genéticas *in vitro*. Una alternativa es la introducción del gen de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT) que mantiene el largo de los telómeros y posiblemente inmortaliza, por sí sola, las células que la expresan.

#### Capítulo 4: Telomerasa.

Durante la interfase del ciclo de división celular, el material genético existe como un complejo de nucleoproteínas llamado cromatina que se encuentra disperso en la mayor parte del núcleo. El plegamiento y compactación de la cromatina, durante la mitosis, produce los visibles cromosomas metafásicos. Los cromosomas eucariontes son estructuras lineales compuestas de una molécula de ADN que se enrolla alrededor de octámeros de proteínas básicas denominadas histonas. Se pueden diferenciar en los cromosomas dos tipos de regiones; una de ellas denominada eucromatina que se encuentra ligeramente compactada con gran concentración de genes y a menudo transcripcionalmente activa. La segunda es la heterocromatina más condensada y con transcripción menos activa. Ésta última suele corresponder frecuentemente a los centrómeros y telómeros de los cromosomas<sup>54</sup>.

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas compuestas de repeticiones hexaméricas en tándem (por ejemplo 5'-TTAGGG-3' en humanos)<sup>55</sup>, cuya secuencia nucleotídica se encuentra altamente conservada en vertebrados. El extremo 3' de la hebra rica en G se extiende de 12 a 16 nucleótidos más allá del extremo 5' de la hebra complementaria. Esta región está unida a proteínas específicas que protegen los extremos de los cromosomas del ataque de exonucleasas, del acortamiento por desgaste y de recombinaciones inapropiadas y/o fusiones entre los cromosomas; convirtiendo así a los telómeros en elementos esenciales para mantener la integridad y estabilidad cromosomal<sup>56-57</sup>. En las células somáticas normales, se produce pérdida progresiva en los telómeros, debido a una replicación incompleta del extremo terminal que pierde entre 15 a 20 pares de bases (pb) con cada división celular<sup>54</sup>. Esto es a causa de la incapacidad que tienen las ADN polimerasas de agregar nucleótidos en dirección 3'-5'. Para evitar este problema, en las células germinales y tumorales, se expresa una enzima, llamada telomerasa, que adiciona repeticiones hexaméricas en los extremos impidiendo el acortamiento del telómero.

La telomerasa es una ADN polimerasa ARN dependiente que está constituida por una serie de componentes<sup>58-61</sup>:

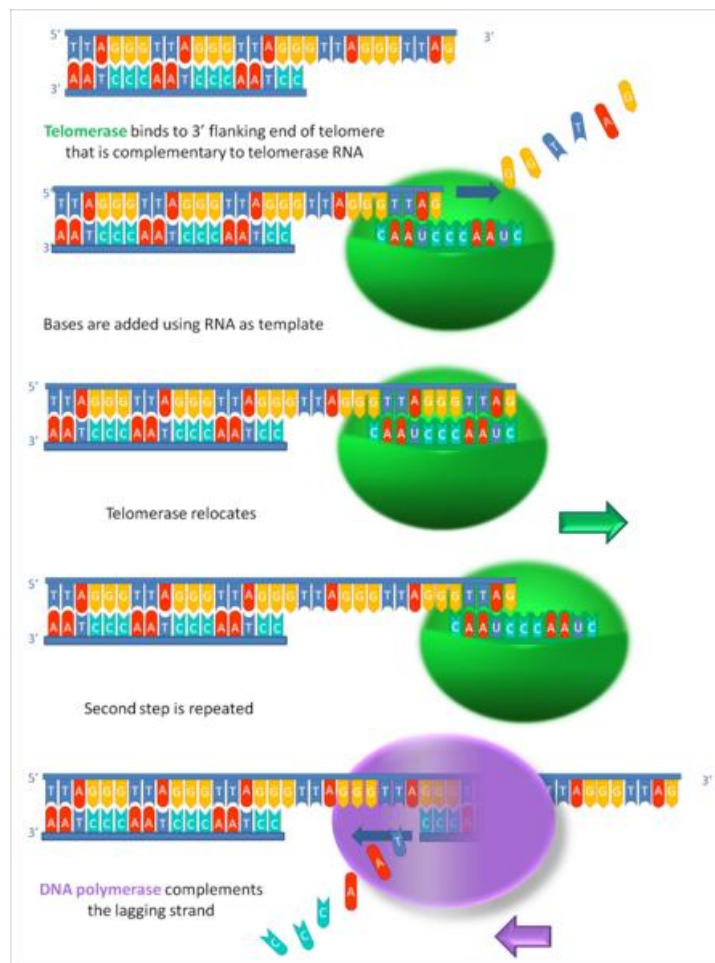
- Componente ribonucleotídico: es la porción de ARN de la enzima (también llamada TER, de *telomerase RNA*) que corresponde a la secuencia molde. Posee

una estructura secundaria bien definida y puede tener entre 146 y 1544 nucleótidos (nt) de longitud;

- Componente proteico: es la parte de la enzima que posee la actividad transcriptasa reversa (TERT, de *telomerase reverse transcriptase*);
- Proteínas de maduración y ensamblaje;
- Proteínas adicionales: Es1p y Es3p, TEP1 y DKC1.

Sin embargo se ha demostrado que para restablecer la actividad telomerasa en células somáticas es necesario incorporarles las subunidades TER y hTERT (*human telomerase reverse transcriptase*)<sup>58-59, 62-64</sup>. Evidencias recientes sugieren que solo es necesaria la subunidad hTERT para restaurar esta actividad en células epiteliales y fibroblastos humanos<sup>65-69</sup>.

La función de la telomerasa es elongar el extremo 3' de la hebra de ADN simple de un telómero mediante un mecanismo reiterativo de transcripción inversa. Este proceso comienza con la unión, a través de puentes de hidrógeno, del componente TER en el extremo 3' de la hebra retardada para posibilitar que la enzima TERT añada al final de ésta hebra desoxirribonucleótidos; la transcripción inversa continúa hasta alcanzar el nucleótido 35 del TER. A continuación las hebras del heterodúplex ADN-ARN formado se deslizan una respecto de la otra generando una exposición de la secuencia TER. Esto es posible por el apareamiento inusual de bases entre los residuos G desplazados, el cual es menos estable que el apareamiento de bases de Watson-Crick. Luego la TERT extiende nuevamente el extremo 3' hasta la posición 35 de la hebra ARN molde, y el heterodúplex sufre desplazamiento como antes. Esto se repite varias veces hasta completar la extensión del extremo telomérico 3'. Finalizando el proceso, la ADN polimerasa  $\alpha$ -primasa cataliza la síntesis de la cadena retardada para dar lugar a un telómero bicatenario. (Figura 5).



**Figura 5:** Representación ilustrativa del funcionamiento de la telomerasa. Imagen tomada de <sup>96</sup>.

Se ha observado que las células de ratones *knockout* que no pueden producir el RNA asociado con la telomerasa no exhiben actividad de la enzima y sus telómeros se acortan progresivamente con cada generación. Estos pueden criarse y reproducirse normalmente durante tres generaciones antes de que las repeticiones teloméricas largas se acorten sustancialmente. Para la cuarta generación, el potencial reproductivo de estos ratones declina y no pueden producir descendientes luego de la sexta generación<sup>54</sup>. Esto es explicado por la ausencia del molde de ARN que genera resultados adversos, como la fusión de los extremos de los cromosomas y la pérdida de información genética, derivando en la pérdida de la capacidad de las células de dividirse, lo que se conoce como senescencia celular.

Hace más de 30 años, se observó por primera vez senescencia replicativa en fibroblastos cultivados *in vitro*<sup>70</sup>. Estos dejaban de dividirse luego de 50 divisiones,

manteniéndose metabólicamente activos pero sin proliferación (estado G0 del ciclo celular), hasta morir eventualmente. A lo largo de los años se estudió la relación entre la expresión de la enzima telomerasa y el número de divisiones y por consiguiente la muerte celular; permitiendo establecer el motivo de senescencia de las células somáticas. Estos resultados permitieron concluir que esta senescencia celular se debe a la regulación sufrida por el gen codificante de la subunidad TERT, que disminuye su expresión y eventualmente lleva a un período de crisis que deriva en la muerte celular por apoptosis.<sup>71</sup> (Figura 6) En las células madres y germinales, en cambio, la expresión de esta subunidad se mantiene constante independientemente del tiempo y el número de divisiones celulares<sup>71-72</sup>. Las células tumorales pueden escapar de la senescencia mediante una serie de divisiones celulares ocurridas luego del período de pre-crisis pudiendo llegar a la inmortalidad celular mediante la expresión prolongada de la TERT.<sup>71-72</sup>

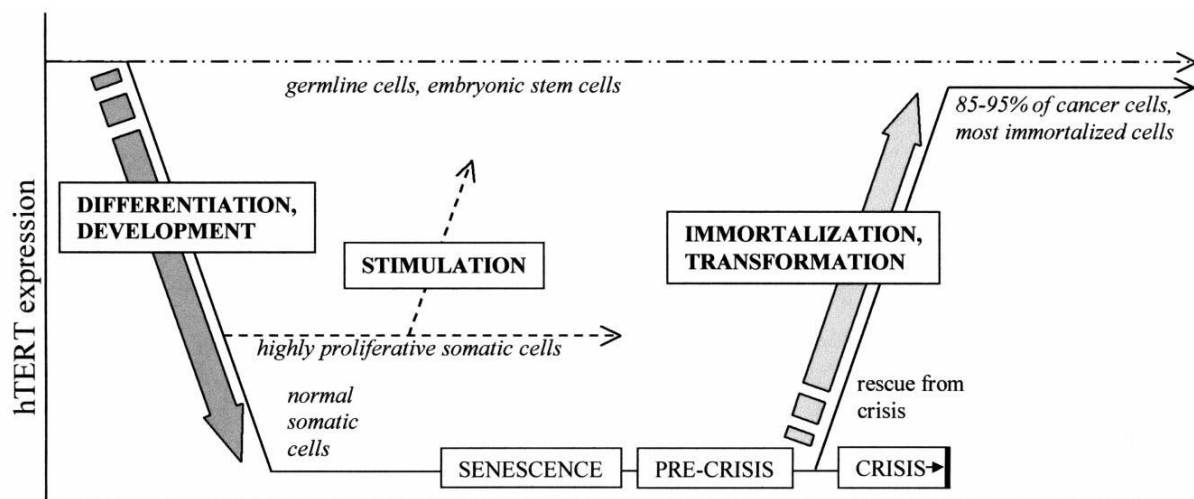


Figura 6: Diagrama que muestra la expresión de hTERT en diversos tipos de células durante el transcurso de la diferenciación, envejecimiento, estimulación e inmortalización. Imagen tomada de <sup>56</sup>.



La secuencia genómica hTERT posee una región promotor que carece de una caja TATA o CAAT<sup>73</sup> y posee una alta densidad de motivos CpG y sitios Sp1<sup>74-77</sup>. También posee una región regulatoria con motivos canónicos y no canónicos al cual se unen diversos factores de transcripción, tanto activadores como represores. (Figura 7)

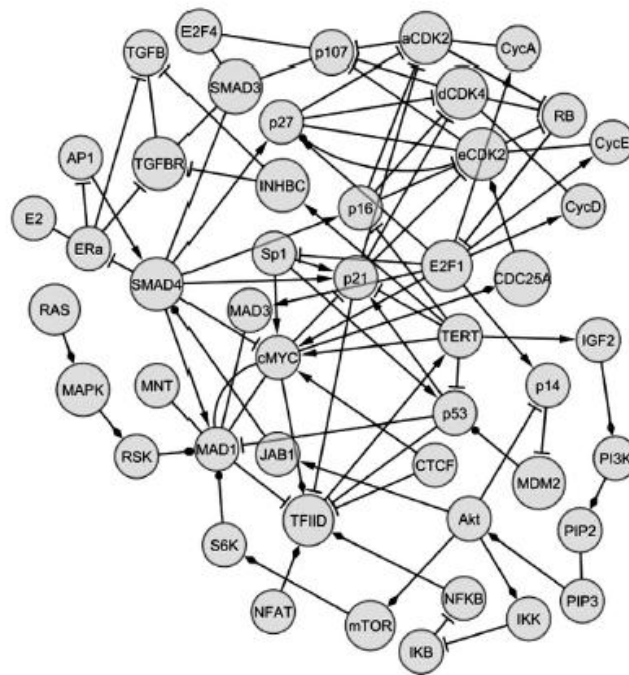


Figura 7: Interacción parcial entre activadores y represores de la transcripción de la hTERT. Imagen tomada de <sup>57</sup>.

Entre los activadores más importantes del gen hTERT se encuentran:

- Factores de transcripción:
  - Sp1: es un factor de transcripción con motivo dedos de zinc que se une al promotor para activar la expresión de hTERT<sup>78</sup>. Investigaciones muestran que cualquier mutación en este factor disminuye drásticamente la actividad de la enzima<sup>79</sup>. Sin embargo por sí solo no tiene efecto, requiere de la cooperación del oncogén c-Myc<sup>78</sup>. El Sp1 es el factor de mayor importancia y el más estudiado;

- MCAF1: es un factor asociado a la proteína de unión a regiones de ADN metiladas, MBD1. Ésta proteína reprime la transcripción de promotores metilados. Éste factor se asocia directamente con el Sp1.<sup>80</sup>;
- HMGA2: es una proteína de unión al ADN que se encuentra involucrada en la regulación transcripcional e interactúa con el Sp1<sup>81</sup>. Es frecuentemente expresada en una gran variedad de cánceres humanos, como por ejemplo en el cáncer de mamas. Parcialmente reemplaza al Sp1 en la transformación tumorigénica de fibroblastos humanos normales<sup>81</sup>;
- Oncogén:
  - c-Myc: es un oncogén usualmente involucrado en la proliferación, diferenciación y muerte en células humanas normales como así también en células cancerosas que contienen este oncogén mutado y lo sobreexpresan<sup>82</sup>. Los niveles de expresión de la proteína Myc (codificada por c-Myc) son mínimos en células somáticas<sup>83</sup> y elevados en células indiferenciadas y neoplásicas<sup>84</sup>.
- Hormonas:
  - Estrógenos: se unen a dos elementos de respuesta a estrógenos (EREs) presentes en el promotor<sup>71</sup> y estimulan la expresión del gen. Se ha observado un aumento en los niveles de estrógenos durante la fase proliferativa del ciclo uterino que aumentan los niveles de expresión de la telomerasa<sup>78</sup>. También existe evidencia de esta regulación en cáncer de próstata y mamas<sup>85-86</sup>.

Entre los represores más importantes de la expresión de hTERT se encuentran:

- Factores de transcripción:
  - Mad1: es un factor de transcripción que suprime la transcripción de hTERT debido a que compite con la proteína Myc por los sitios de unión al ADN<sup>87</sup>. Su nivel de expresión es mínimo en las células indiferenciadas a diferencia del c-Myc.<sup>84</sup>
  - MZF-2: es una proteína que presenta motivo dedos de zinc y es específica de mieloides. Tiene 4 sitios específicos de unión en la región promotora de la hTERT, a través de los cuales ejerce su acción represora<sup>76</sup>.

- Supresores tumorales:
  - p53: es una proteína anti-oncogénica que tiene una relación inversa con la actividad de la telomerasa<sup>82</sup>. Actúa induciendo el arresto del ciclo celular y la apoptosis en respuesta a estímulos estresantes<sup>82</sup>. Investigaciones demuestran que el gen que expresa esta proteína se encuentra mutado en el 50% de los tumores humanos<sup>88</sup>.
  - WT1: es una proteína esencial para el desarrollo normal del sistema urogenital. Cuando presenta algún tipo de mutación, su gen codificante, se genera crecimiento tumoral, denominado tumor de Wilms (de allí su nombre). Actúa como un importante regulador en procesos celulares, particularmente en el desarrollo y crecimiento celular, como así también es un fuerte regulador transcripcional de hTERT<sup>89</sup>.

La expresión forzada de TERT en fibroblastos ha permitido generar líneas celulares que no alcanzan la senescencia proliferativa durante su cultivo *in vitro*<sup>90</sup>. En 2009 He y colaboradores<sup>90</sup> describieron la obtención de una línea celular de epitelio mamario de cabra. Ellos transfectaron las células con la subunidad hTERT y detectaron altos niveles de expresión de la enzima, que conllevó a la prolongación de la vida celular. Además pudieron verificar que sus resultados no estaban asociados a un fenotipo maligno o a alteraciones en la normal división celular. Sin embargo en otras investigaciones llevadas a cabo por Dickson y col.<sup>91</sup> y Kiyono y col.<sup>92</sup> se observó que la expresión ectópica de la telomerasa no fue suficiente para alargar la vida media de determinadas células, como los queratinocitos y las células mamarias humanas. En ellos era requerida además la inactivación de la proteína p16 que actúa como supresora tumoral.

El uso de líneas celulares con vida media prolongada permitiría realizar modificaciones genéticas, que requieren tiempos de cultivo más extensos. Desafortunadamente, en un estudio, las células ovinas immortalizadas por TERT no fueron capaces de producir animales vivos cuando se utilizaron como donantes de núcleos como parte de la técnica de transferencia nuclear para producir animales clonados<sup>93</sup>. Este hallazgo hace suponer que la expresión constitutiva de la enzima TERT en las células donantes de núcleo interfiere con el normal desarrollo embrionario/fetal en esta especie.

El presente trabajo final se enmarca dentro de un proyecto general que persigue abordar experimentalmente ciertos problemas particulares asociados a la transgénesis en animales mayores de interés productivo. En este sentido se están desarrollando métodos alternativos como así también perfeccionando los ya existentes; para maximizar la eficiencia de las modificaciones génicas controladas en animales domésticos para aplicaciones pecuarias (mejoras en la performance productiva) y biomédicas (producción de proteínas recombinantes y modelos animales).

***Hipótesis.***

La expresión forzada de la subunidad catalítica de la hTERT es capaz de inmortalizar líneas celulares fibroblásticas bovinas provenientes de un cultivo primario de fibroblastos obtenidos a partir de muestras de piel de un bovino adulto.

### ***Objetivo general.***

Producir una línea celular bovina inmortal mediante la expresión forzada de la subunidad catalítica de la enzima TERT humana (hTERT).

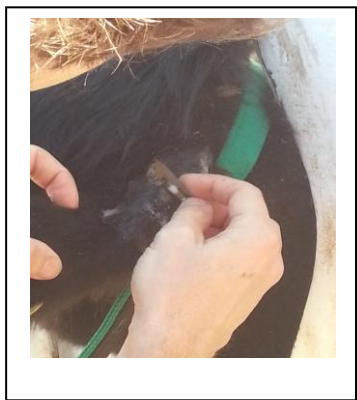
### ***Objetivos específicos.***

- ✚ Aislar fibroblastos bovinos a partir de biopsias de piel de bovinos adultos y mantenerlos en cultivo in vitro.
- ✚ Propagar el plásmido pCI neo-hEST2 en bacterias.
- ✚ Identificar el plásmido pCI neo-hEST2 mediante mapas de restricción.
- ✚ Estudiar diferentes metodologías de transfección, tanto químicas (JetPrime), como físicas (electroporación) y ver su eficiencia en la transfección de fibroblastos.
- ✚ Obtener, mediante selección con antibiótico, clones celulares que posean resistencia al antibiótico y que, por lo tanto, han incorporado las secuencias de ADN foráneas.
- ✚ Desarrollar una metodología basada en la técnica de PCR para corroborar la incorporación de la construcción genética en la línea celular resistente al antibiótico.

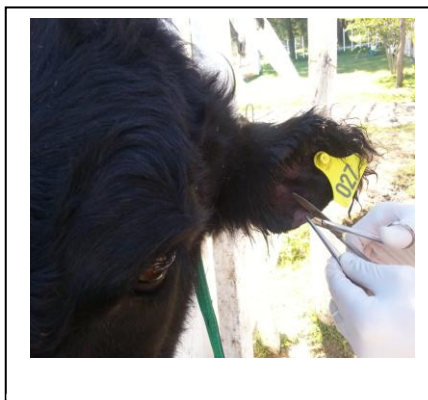
## *Materiales y Métodos.*

### **Capítulo 1: Aislamiento y cultivo de fibroblastos adultos bovinos.**

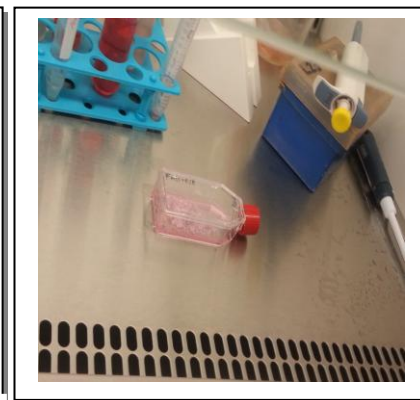
Las células utilizadas en este trabajo se obtuvieron a partir de explantos provenientes de biopsias de piel de oreja de bovinos adultos. Las muestras fueron tomadas de dos ejemplares diferentes y los fibroblastos obtenidos se denominaron L260 y 10.952, en referencia a los animales donantes. Para ello el animal fue inmobilizado en un cepo, se lavó la zona a ser extirpada con una solución de detergente neutro al 5 %, y se afeitó previa a la incisión en forma de medialuna de unos 0.5 cm que involucró piel y subcutáneo. Las muestras se transportaron, por separado, al laboratorio en tubos cónicos de 15 mL estériles. Una vez allí se lavaron con PBS estéril, se les extrajo la epidermis con la ayuda de un bisturí y se seccionaron en pequeños trozos de tejido (explantos) que fueron lavados con PBS estéril. Estos se cultivaron en frascos T25 empleando medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB) a 38.5°C, atm. 5% CO<sub>2</sub> con cambio de medio cada 48 hs teniendo la precaución de no desprender los explantos adheridos. Luego de un período de 10 a 12 días confirmada la presencia de fibroblastos, mediante observación al microscopio, se sometió cada cultivo a tripsinización y las células recuperadas se sembraron en un nuevo frasco de cultivo. Al llegar a un 80-85% de confluencia se tripsinizó el cultivo y se repicaron las células en frascos nuevos para continuar con su cultivo. Cuando los mismos alcanzaron pasaje 2 ó 3, los fibroblastos adultos bovinos (FAB) fueron utilizados en los experimentos. Paralelamente, se congelaron mediante procedimientos de criopreservación estándares y se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso.



**Figura 8:** Tricotomía y antisepsia de la zona de la piel a ser extirpada.



**Figura 9:** Incisión de piel y subcutáneo.



**Figura 10:** cultivo de explantos en medio D-MEM suplementada con 10% de SFB.

### **1.1 Congelado y descongelado de fibroblastos adultos bovinos.**

Una vez que las células cultivadas en frascos de 25cm<sup>3</sup> llegaron a confluencia del 90-95% se procedió a congelarlas en nitrógeno líquido. Para ello se lavaron varias veces con 2 mL de DPBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>; se tripsinizaron con 1 mL de tripsina al 1% y se centrifugaron, en tubos de 15 mL, a 3.000 rpm durante 7 minutos. Luego, se resuspendieron en DMEM suplementado al 10% de SFB y se agregó la misma cantidad de medio de congelación (una parte de DMEM 20% SFB, una parte de SFB y media parte de DMSO). A continuación se colocó la suspensión celular en crioviales de 2 mL de capacidad, a razón de 1 x 10<sup>5</sup> células/mL de medio de congelación por criovial. Se almacenaron en un recipiente apropiado (MiFrostyFreezercontainer) y se llevaron a freezer -80°C por lo menos 24 hs. Pasado este tiempo se trasladaron los crioviales a un termo de nitrógeno líquido para un almacenaje prolongado.

Para descongelar las células, los crioviales se retiraron del termo de nitrógeno líquido y se colocaron a baño de agua a 37°C hasta su descongelación. Luego la suspensión de células se colocó en un tubo de centrifuga de 15 mL de capacidad con 5 mL de medio DMEM suplementado al 10% con SFB y se centrifugaron durante 7 minutos a 3.000 rpm. Se descartó el sobrenadante, se resuspendieron los FB en 5 mL de medio adecuado y se transfirieron a frascos T25, los cuales se mantuvieron en estufa a 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> en aire y máxima humedad.

## **Capítulo 2: Vectores Plasmídicos.**

En el presente trabajo se utilizaron los siguientes vectores plasmídicos:

Plásmido ZsGreen1 N1 (Control Positivo): posee cassette para la expresión en células eucariotas de la proteína fluorescente verde –ZsGreen1- y otro cassette que codifica para la enzima neomicinafosfotransferasa, la cual le confiere resistencia al antibiótico neomicina ó G418 (Clontech; Figura 11).



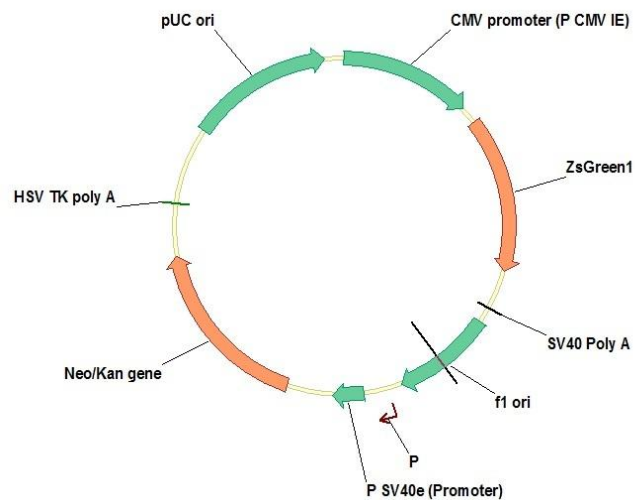


Fig. 11: Mapa del plásmido pZGreenN1

Plásmido de interés CIneo-hEST2: posee un cassette para la expresión de la subunidad catalítica de la enzima telomerasa transcripta reversa humana –hTERT- y un segundo cassette de expresión que le confiere resistencia a G418 (neomicinafosfotransferasa), (Figura 12)

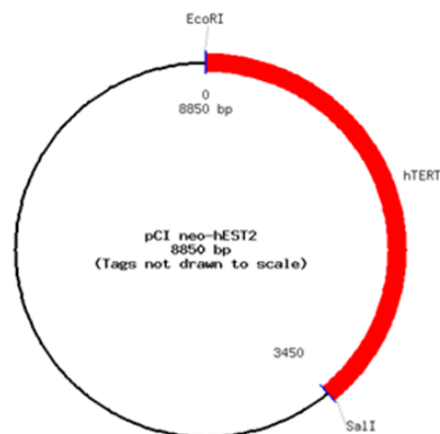


Figura 12: Mapa del plásmido pCIneo-hEST2

### Capítulo 3: Cepa bacteriana.

A fin de propagar los plásmidos descritos con anterioridad, se utilizó la cepa bacteriana *E. coli* DH5 $\alpha$  debido a su alta eficiencia de transformación y a su incapacidad para metilar el ADN. Posee el siguiente genotipo: *fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44  $\Phi$ 80'*

$\Delta(lacZ)M15$  *gyrA96* *recA1* *relA1* *endA1* *thi-1* *hsdR17*, del cual los genes más importantes son:

- La mutación EndA1, que inactiva una endonucleasa intracelular que degrada ADN plasmídico.
- $\Delta(lacZ)M15$ , el alelo alfa receptor necesario para usar el sistema LacZ como gen de selección positiva.
- *recA*, elimina la recombinación homóloga reduciendo así la formación de deleciones y la multimerización de plásmidos.

Estas mutaciones facilitan el proceso de incorporación de ADN exógeno y su posterior amplificación para ser empleado en la metodología de ADN recombinante.

#### **Capítulo 4: Clonación de plásmidos pZGreenN1 y pCIneo-hEST2.**

La generación de células E. coli DH5 $\alpha$  competentes se realizó por medio del método químico, utilizando CaCl<sub>2</sub> 50 mM que permitió generar poros en la membrana celular permitiendo así la entrada del ADN foráneo.

Las células transformadas se conservaron a -80 °C en glicerol al 30 % hasta el momento de su utilización. Para ello se realizó un cultivo over night (ON) en 6 mL de medio Luria Bertani (LB) líquido, de éste se tomaron 200  $\mu$ L y se incubaron durante 2 hs aprox. en 20 mL de medio LB líquido a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica (DO) de 0.4. Luego se colocaron 800  $\mu$ L del cultivo y 200  $\mu$ L de glicerol (20%) por eppendorff, se mezclaron y se conservaron a -80 °C.

#### **Capítulo 5: Recuperación plasmídica, almacenado y cuantificación.**

Las bacterias conservadas se descongelaron para realizar el ON correspondiente. Para ello se retiró un eppendorff del freezer a -80 °C y se lo colocó en estufa a 37 °C para atemperar las células procariontas. Luego se colocaron 100  $\mu$ L en placa de Petri con LB sólido

y el correspondiente antibiótico (100 µg/mL de ampicilina y 5 mg/mL de kanamicina) y se cultivó a 37 °C durante 12 horas para obtener colonias aisladas.

### **5.1. Mini-extracción de ADN plasmídico a través de Kit Comercial.**

Se tomó una colonia transformada de la placa cultivada previamente y con ella se realizó un cultivo ON en 6 mL de medio LB suplementado con el antibiótico respectivo. Se cosecharon las bacterias por centrifugación y se procedió a utilizar el kit comercial GeneJET Plasmid MiniPrep (Fermentas) según las instrucciones dadas por el fabricante. Este kit utiliza una membrana de sílicagel que absorbe selectivamente los ácidos nucleicos en presencia de una elevada concentración de sal.

### **5.2. Midiextracción de ADN plasmídico.**

Las bacterias fueron cultivadas en 150 mL de medio LB con antibiótico durante toda la noche a 37 °C. Éstas se centrifugaron a máxima velocidad durante 10 minutos y luego se procedió a obtener el ADN plasmídico.

#### **5.2.1. Midiextracción Alcalina.**

El fundamento de la técnica se basa en resuspender las células en solución de Glucosa/Tris/EDTA (GTE) pH=8, lisarlas luego con solución alcalina de 0.2 N de NaOH y dodecil sulfato de sodio (SDS) al 1% y neutralizarla con acetato de potasio 3 M pH=4.8, el cual forma un complejo con el DNA cromosómico, que es removido por centrifugación. Luego se eliminan las proteínas con cloroformo, se concentra el ADN plasmídico por precipitación con isopropanol y se lava con etanol para eliminar restos de la solución anterior. Finalmente se resuspende en buffer TE.

#### **5.2.2. Midiextracción a través de Kit Comercial.**

Con el fin de obtener ADN de mayor pureza, se utilizó el kit comercial Nucleo Bond PC100 (Macherey-Nagel), y se siguieron las especificaciones del fabricante. La diferencia radica en la utilización de un filtro que elimina el concentrado de las soluciones utilizadas y una columna que aumenta el nivel de purificación. El kit además incluye RNAsa en el buffer de resuspensión para degradar el ARN contaminante.

### 5.3. Almacenamiento de ADN plasmídico.

Los plásmidos purificados y resuspendidos en buffer TE fueron almacenados en freezer a -20 °C hasta su uso en los experimentos posteriores.

### 5.4. Estimación de la concentración.

Para cuantificar las muestras purificadas, se realizaron diluciones 1:200 y 1:1000 en agua bidestilada para las obtenidas por Miniprep y Midiprep respectivamente. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro Beckman empleando celdas de cuarzo de 1 mL de volumen final y tomando lecturas a 260 y 280 nm, teniendo en cuenta que los ácidos nucleicos absorben luz UV a una longitud de onda de 260 nm y las proteínas a 280 nm. Con ellas se determinaron las concentraciones de las muestras mediante la siguiente fórmula:

$$1 \text{ DO (densidad óptica)} = 50 \mu\text{g ADN}$$

De este modo:

$$[\text{ADN muestra}] = \text{lectura DO} \times 50 \mu\text{g} \times \text{factor de dilución}$$

El índice de pureza también fue determinado relacionando las absorbancias medidas (260/280) siendo el valor de referencia óptimo de 1.8 – 2.

Asimismo para poder determinar la integridad y presencia de los plásmidos se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa al 1% de bajo punto de fusión coloreado con Gel Green 1X, usando buffer TAE 1 X. Por cada muestra se sembraron 5 y 2  $\mu\text{L}$  (Miniprep y Midiprep) con el agregado de 1  $\mu\text{L}$  de buffer de siembra (Loading Buffer). La corrida se llevó a cabo en una cuba electroforética a 90 V durante 75 minutos. Una vez concluida, el gel fue observado en un transiluminador de luz azul.

## Capítulo 6: Identificación del plásmido de interés pCI neo-hEST2.

El plásmido pCI neo-hEST2 es una molécula de ADN circular de 8850 pb que posee en su secuencia nucleotídica un sitio único de corte para la enzima de restricción EcoRI y otro para la enzima Sall. Ambos sitios flanquean al cassette de expresión para la subunidad catalítica hTERT. De esta manera, sometiendo el plásmido a digestión por ambas enzimas se

espera obtener dos fragmentos, uno de 3450 pb (cassette hTERT) y otro de 5400 pb (esqueleto del plásmido).

Para realizar la identificación del plásmido de interés se realizaron tres digestiones paralelas: la primera con la enzima EcoRI, la segunda con la enzima Sall y la tercera fue una doble digestión con ambas enzimas. Las dos primeras se llevaron a cabo a fin de determinar el correcto funcionamiento de las enzimas y la presencia de un único sitio de corte en el plásmido, y la tercera con el fin de identificarlo.

El protocolo de digestión se realizó según las instrucciones del fabricante (Fermentas y Promega), como se detalla a continuación:

	<b>EcoRI (μL)</b>	<b>Sall (μL)</b>	<b>Doble Digestión (μL)</b>
<b>Buffer 10 x</b>	2	2	2
<b>ADN</b>	5	5	10
<b>EcoRI 10 U/μL</b>	1	-	2
<b>Sall 10 U/μL</b>	-	1	1
<b>Agua</b>	12	12	5
<b>Volumen final</b>	20	20	20

Se tuvo en cuenta que las enzimas EcoRI (Fermentas) y Sall (Promega) son de distintos fabricantes por lo cual se utilizó buffer D en la doble digestión, por recomendación de Promega, y el doble de cantidad de EcoRI ya que posee 50 % de actividad en buffer D mientras que Sall posee el 100%. En la digestión con EcoRI se utilizó el buffer Tango (Fermentas) y con Sall se usó el buffer D (Promega).

Los tubos de reacción se incubaron a 37 °C durante 16 horas y al finalizar se inactivaron las reacciones a 80 °C durante 20 minutos.

Los productos de digestión se corrieron en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% coloreado con Gel Green 1X, durante 75 minutos a 90 V en buffer TAE 1X. Se sembraron 5 μL de cada reacción junto a 1 μL de buffer de siembra; como marcador de peso molecular se utilizó Lambda EcoRI + HindIII (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para poder visualizar los fragmentos se utilizó un transiluminador de luz azul. La utilización del colorante Gel Green se basa en su baja toxicidad y la incapacidad para generar

mutaciones a las concentraciones utilizadas, a diferencia de otros reactivos empleados usualmente para revelar ácidos nucleicos como por ejemplo Bromuro de Etidio.

## **Capítulo 7: Transfección de Fibroblastos Adultos Bovinos.**

Cuando las células en cultivo alcanzaron una confluencia de 80-90% confluencia, se repicaron a placas multipocillo de 6 o 24 pocillos de acuerdo al tratamiento elegido. Se requiere un número determinado de células por pocillo (50.000 células para placa de 24 pocillos y 100.000 para placa multipocillo de 6) por lo cual se utilizó la cámara de Neubauer para contar las células totales por frasco y se realizaron los cálculos correspondientes para colocar las cantidades deseadas.

### **7.1. Método físico: Electroporación.**

Este método debió ser puesto a punto debido a que era la primera vez que se utilizaba como técnica de transfección, sobre estas células, en el laboratorio donde se realizó este trabajo final. Para ello se utilizó el plásmido pZGreenN1.

Se decidió trabajar en placa multipocillo de 6 a razón de 100.000 células por well. Las células cultivadas en frascos se tripsinizaron, se cosecharon, se centrifugaron durante 7 minutos a 3.000 rpm y se resuspendieron en 1000  $\mu\text{L}$  de D-MEM 10% SFB. Luego se contaron en cámara de Neubauer y se colocaron  $1 \times 10^5$  células en un tubo eppendorf de 1.5 mL junto a 15  $\mu\text{g}$  de ADN del plásmido pZGreenN1 y se completó con medio D-MEM sin suero sin antibiótico hasta llegar a 100  $\mu\text{L}$  de volumen final. Cada tubo se incubó en hielo durante 2 minutos, se electroporó y se volvió a incubar en las mismas condiciones previas. Luego se sembraron las células electroporadas en el pocillo de la placa de cultivo junto a 2 mL de D-MEM 10% SFB y se cultivó por 72 horas momento en el que se observó la expresión de la proteína verde fluorescente (EGFP) codificada por el plásmido.

Los parámetros a tener en cuenta para la técnica fueron: longitud de pulso (100  $\mu\text{s}$ ), cantidad de pulsos (4), intervalo entre los pulsos (100 ms) y voltaje de los pulsos. Todos los parámetros se mantuvieron constantes exceptuando el voltaje; siendo 300, 450 y 600 V los analizados. Cada tratamiento se realizó por duplicado.

## **7.2. Método Químico: Agente poliamínico JetPrime (Polyplus).**

Los parámetros fueron determinados, mediante repetidas experiencias, con anterioridad en el laboratorio. Se definió como relación óptima 1:2 (ADN: JetPrime)

Veinticuatro horas antes de la transfección con el agente químico se sembraron 50.000 células en medio D-MEM 10% SFB en una placa multiwell de 24. Para cada cultivo celular (L260 y 10.952) se sembraron 8 pocillos. La relación ADN: JetPrime ( $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) usada fue de 1:2, determinada por experimentos previos en el laboratorio.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, como primer paso se diluyó el ADN en el buffer JetPrime y se lo mezcló mediante vórtex durante 10 segundos. Luego, se agregó el agente químico, se agitó 10 segundos y se lo dejó incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Por último, se transfirió la mezcla a las células. Por cada tipo celular utilizado se dejó sin transfectar un pocillo que corresponde al control de crecimiento celular. Los tratamientos fueron los siguientes: transfección con pZGreen1N1 que se utilizó como control positivo de la metodología y funcionamiento del agente, transfección con el plásmido pCI neo-hEST2 y co-transfección con ambos plásmidos (pCI neo-hEST2 + pZGreen1N1). Paso siguiente se cultivó en estufa de cultivo.

Cuatro horas post-transfección se realizó un cambio de medio de cultivo y a las 72 horas se observó la expresión de la proteína de interés en microscopio de fluorescencia contándose las células presentes en 5 campos, elegidos al azar y con aumento de 400 x por well. Aquellas que expresaban EGFP se contaron observándolas con luz UV y las células totales con luz blanca. Esto fue realizado para determinar el porcentaje de transfección transitoria con el plásmido pZGreenN1.

## **Capítulo 8: Selección de colonias resistentes.**

Se comenzó la selección de células resistentes al antibiótico G418 debido a la integración en el genoma del plásmido pCIneo-hEST2; para ello las células de cada tratamiento se sembraron en placas de 100 mm. Las mismas se cultivaron con 8 mL de D-MEM 10% SFB por placa y 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de G418 por 21 días, con cambio de medio y agregado de antibiótico cada 72 horas. Culminado el tiempo de selección se procedió a

recuperar las colonias monoclonales mediante el uso de anillos de clonado (“cloning rings”) y se transfirieron a placa multipocillo de 24 para su propagación.

### **Capítulo 9: Optimización de la amplificación del gen de hTERT mediante PCR.**

Se procedió a optimizar las condiciones de la PCR para los juegos de primers correspondientes a la identificación del gen de la hTERT. Estos primers son inespecíficos y amplifican un segmento de 1504 pb perteneciente al gen. Se realizaron dos experimentos donde se mantuvieron constantes todas las condiciones aplicadas al termociclador; a excepción de las concentraciones de  $Cl_2Mg^{++}$  y ADN plasmídico. El  $Mg^{++}$  es uno de los factores más importantes del éxito en una PCR.

Teniendo en cuenta esto, se analizaron: 2 concentraciones finales de  $Cl_2Mg$  diferentes, 1mM y 2mM; y 5 concentraciones iniciales de ADN plasmídico, 0.12  $\mu g$ , 0.24  $\mu g$ , 0.6  $\mu g$ , 1.2 $\mu g$  y 2.4 $\mu g$ .

Concentraciones finales de $Cl_2Mg$	1mM	1mM	1mM	1nM	1mM
Buffer (10 X)	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$
$Cl_2Mg$ (25mM)	0.8 $\mu l$	0.8 $\mu l$	0.8 $\mu l$	0.8 $\mu l$	0.8 $\mu l$
dNTPs (10mM)	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$
Primer Forward (50 $\mu M$ )	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$
Primer Reverse (50 $\mu M$ )	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$
Taq Polimerasa (5u/ $\mu l$ )	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$	0.1 $\mu l$
ADN	2.4 $\mu g$	1.2 $\mu g$	0.6 $\mu g$	0.24 $\mu g$	0.12 $\mu g$
$H_2O$	c.s.p. 10 $\mu l$	c.s.p. 10 $\mu l$	c.s.p. 10 $\mu l$	c.s.p. 10 $\mu l$	c.s.p. 10 $\mu l$

Concentraciones finales de $Cl_2Mg$	2mM	2mM	2mM	2mM	2mM
Buffer (10 X)	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$	1 $\mu l$
$Cl_2Mg$ (25mM)	1.6 $\mu l$	1.6 $\mu l$	1.6 $\mu l$	1.6 $\mu l$	1.6 $\mu l$
dNTPs (10mM)	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$	0.2 $\mu l$



<b>Primer Forward (50 <math>\mu</math>M)</b>	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l
<b>Primer Reverse (50 <math>\mu</math>M)</b>	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l
<b>Taq Polimerasa (5u/<math>\mu</math>l)</b>	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l	0.1 $\mu$ l
<b>ADN</b>	2.4 $\mu$ g	1.2 $\mu$ g	0.6 $\mu$ g	0.24 $\mu$ g	0.12 $\mu$ g
<b>H<sub>2</sub>O</b>	c.s.p. 10 $\mu$ l	c.s.p. 10 $\mu$ l	c.s.p. 10 $\mu$ l	c.s.p. 10 $\mu$ l	c.s.p. 10 $\mu$ l

Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes:

		<b>Protocolo PCR</b>
<b>95°C</b>		5'
<b>95°C</b>	} x25	30"
<b>50°C</b>		30"
<b>72°C</b>		1'
<b>72°C</b>		5'

Los productos de PCR de todos los análisis realizados se corrieron a 90V durante 45 minutos en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1% coloreado con Gel Green 1X, empleando buffer TAE 1X. Para poder visualizar los productos de amplificación, se observó el gel en transiluminador de luz azul.

## ***Resultados.***

### **Capítulo 1: Aislamiento y cultivo de Fibroblastos Adultos Bovinos.**

Se realizaron biopsias de oreja de hembras adultas y mediante el cultivo *in vitro* de los explantos obtenidos, se lograron dos líneas celulares, L260 y 10.952, las cuales fueron utilizadas durante el transcurso de los experimentos. (Figura 13)



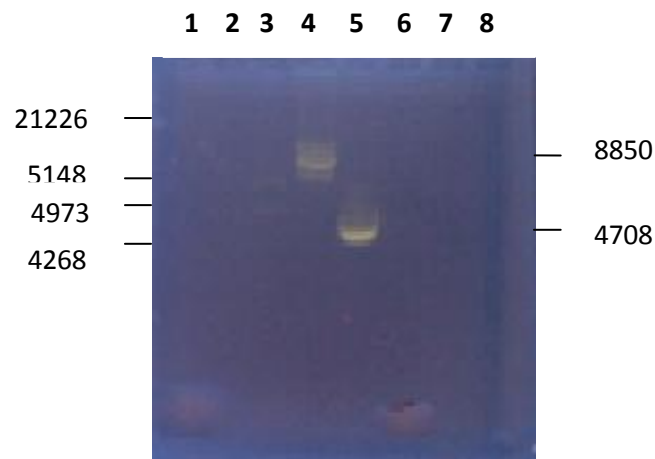
**Figura 13:** Fibroblastos adultos bovinos en cultivo, que presentan un nivel de confluencia de  $\approx 50\%$ , observados con aumento 100X

### **Capítulo 2: Plásmidos pZGreenN1 y pCIneo-hEST2.**

#### **2.1. Purificación del ADN plasmídico e identificación del mismo.**

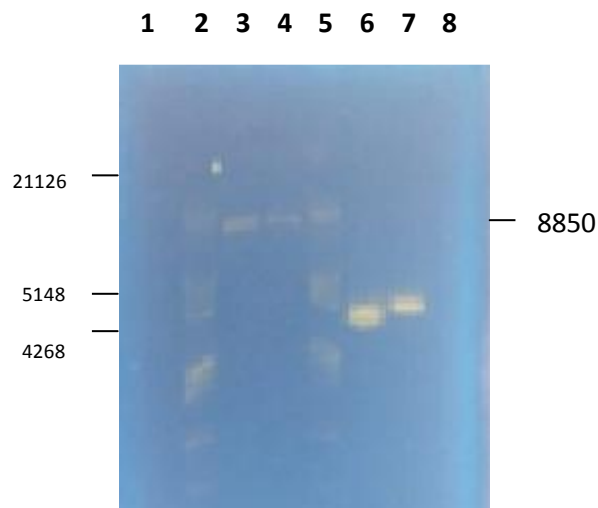
Luego de realizada la purificación de los plásmidos, pCIneo-hEST2 y pZGreenN1, se procedió a comprobar su integridad.

En primer lugar se realizó una corrida electroforética con ambos plásmidos sin digerir para confirmar su presencia (Figura14).



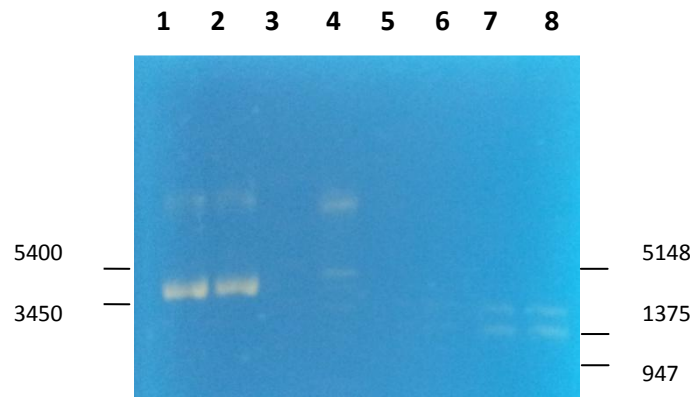
**Figura14:** Identificación de los plásmidos pCIneo-hEST2 y pZGreenN1. Calle 3: Marcador de peso molecular  $\lambda$ ; digerido con EcoRI e HindIII. Calle 4: pCIneo-hEST2. Calle 5: pZGreenN1.

En segundo lugar, se comprobó la integridad y se caracterizó el plásmido pCIneo-hEST2 mediante digestión con enzimas de restricción, EcoRI y Sall. Este plásmido es una molécula de ADN circular de 8850 pb. Cuando se lo sometió a restricción con las enzimas mencionadas por separado, se obtuvo una molécula lineal (Figura 15).



**Figura 14:** Identificación del plásmido pCI neo-hEST2. Calles 2 y 5: Marcador de peso molecular  $\lambda$ ; digerido con EcoRI y HindIII. Calle 3: pCIneo-hEST2 linealizado con Sall. Calle 4: pCIneo-hEST2 linealizado con EcoRI.

Al mismo tiempo se realizó la doble digestión del plásmido pCIneo-hEST2 con las enzimas de restricción Sall y EcoRI, obteniendo los fragmentos de 3450 pb y 5400 pb esperados.



**Figura 15:** Identificación del plásmido pCI neo-hEST2 por mapeo de restricción. Calle 3: restricción (véase que las bandas de 3450 pb y 5400 pb son ténues y no logran observarse con claridad). Calle 4: Marcador de peso molecular  $\lambda$ ; digerido con EcoRI y HindIII.

## 2.2. Cuantificación del ADN plasmídico purificado.

Se cuantificó el ADN plasmídico en un espectrofotómetro Beckman empleando celdas de cuarzo. Se tomaron lecturas a 260 y 280 nm.

Plásmido	260 nm	280 nm	260 nm	260/280	[ $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ]	$\mu\text{g}$ totales
Miniprep pCIneo- hEST2	0.3484	0.1828	0.3485	1.91	17.42	2613 (150 $\mu\text{L}$ totales)
Miniprep pZGreenN1	0.4805	0.3041	0.4804	1.58	24	3600 (150 $\mu\text{L}$ totales)
Midiprep pCIneo- hEST2	0.0562	0.0321	0.0565	1.75	0.56	28 (50 $\mu\text{L}$ totales)
Midiprep pZGreenN1	0.437	0.0221	0.0442	1.98	0.44	21.85 (50 $\mu\text{L}$ totales)

### Capítulo 3: Transfección de Fibroblastos Adultos Bovinos.

Se llevaron a cabo las dos metodologías propuestas, y se le aplicaron a las células 3 tratamientos diferentes: transfección con pZGreenN1, transfección con pCIneo-hEST2 y co-transfección con ambos plásmidos. En las dos técnicas se observó la eficacia de transfección transitoria del plásmido control pZGreenN1 a las 72 hs post-transfección. La presencia de fluorescencia indica que el vector fue incorporado y expresó la proteína mencionada.

#### 3.1. Método físico: electroporación.

Mediante el método de electroporación las células fueron sometidas a 3 pulsos eléctricos diferentes: 300, 450 y 600 volts (v), manteniendo constante los parámetros de longitud de pulso e intervalo.

Cabe destacar que se calculó el porcentaje de expresión de la proteína EGFP en el cultivo de fibroblastos bovinos, cuantificando el número de células fluorescentes con luz UV y el número de células vivas con luz blanca.

#### *Línea L260.*

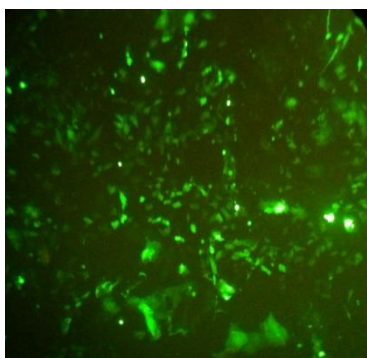
	<b>Control</b> +	<b>Co-</b> <b>transf.</b>	<b>Control</b> +	<b>Co-</b> <b>transf.</b>	<b>Control</b> +	<b>Co-</b> <b>transf.</b>
<b>Tratamiento (v)</b>	300	300	450	450	600	600
<b>Voltaje real (v)</b>	297	297	444	444	568	552
<b>Longitud de pulso</b> <b>(μs)</b>	101	101	101	101	101	101
<b>Pulsos</b>	4	4	4	4	4	4
<b>Intervalo (ms)</b>	89	81	92	87	89	87
<b>Expresión EGFP</b> <b>(%)</b>	30.1%	32.7%	41.9%	42.6%	45.8%	46.1%
<b>Mortalidad (%)</b>	38.5 %	37.9%	55.3%	54.2%	69.9%	72.4%

*Línea 10.952*

	Control +	Co- transf.	Control +	Co- transf.	Control +	Co- transf.
<b>Tratamiento (v)</b>	<b>300</b>	<b>300</b>	<b>450</b>	<b>450</b>	<b>600</b>	<b>600</b>
<b>Voltaje real (v)</b>	291	298	444	444	576	563
<b>Longitud de pulso (µs)</b>	101	101	101	101	101	101
<b>Pulsos</b>	4	4	4	4	4	4
<b>Intervalo (ms)</b>	88	87	89	86	89	92
<b>Expresión EGFP (%)</b>	32.9%	33.7%	43.8%	44.3%	45.7%	47.3%
<b>Mortalidad (%)</b>	38.1%	39.4%	54.7%	53.6%	73.2%	71.7%

**3.2. Método químico: agente poliamínico JetPrime (Polyplus).**

Con respecto al uso del agente comercial JetPrime, se siguieron las especificaciones provistas por el fabricante y se utilizó la relación optimizada previamente en el laboratorio, la cual es de 1:2 (ADN:JetPrime). A las 72 hs posteriores a la transfección, se observó el nivel de expresión de la proteína EGFP con luz UV (Figura 16) y se realizó un recuento de células totales con luz blanca (Figura 17).



**Figura 16:** FAB transfectados con pZGreenN1 utilizando el agente JetPrime, fotografiados a las 72 hs post-transfección. Luz UV. Aumento de 100X.



**Figura 17:** FAB 72 hs post-transfección. Luz blanca. Aumento 100 x

**Línea 260:**

<b>Control +</b>	<b>Control +</b>	<b>Control +</b>	<b>Control células</b>
<b>Nº células fluorescentes</b>	<b>Nº células totales</b>	<b>Transfección (%)</b>	<b>Nº células totales</b>
101	256	39.45	300
17	48	35.42	278
10	40	25	193
4	5	80	298
7	7	100	275
27.8	71.2	55.97%	268.8

<b>Co-transfección</b>	<b>Co-transfección</b>	<b>Co-transfección</b>	<b>Transfección pCIneo-hEST2</b>
<b>Nº células fluorescentes</b>	<b>Nº células totales</b>	<b>Transfección (%)</b>	<b>Nº células totales</b>
22	370	5.95	71
6	178	3.37	183
14	61	22.95	125
35	131	26.72	82
30	236	12.71	176
21.4	195	14.34%	127.4

**Línea 10.952:**

<b>Control +</b>	<b>Control+</b>	<b>Control+</b>	<b>Control células</b>
<b>Nº células fluorescentes</b>	<b>Nº células totales</b>	<b>Transfección (%)</b>	<b>Nº células totales</b>
151	179	84.36	137
19	29	65.51	115
121	187	64.70	79
62	141	43.97	129
126	256	47.55	106
95.8	158.4	61.22%	113.2

<b>Co-transfección</b>	<b>Co-transfección</b>	<b>Co-transfección</b>	<b>Transfección pCIneo-hEST2</b>
<b>Nº células fluorescentes</b>	<b>Nº células totales</b>	<b>Transfección (%)</b>	<b>Nº células totales</b>
61	110	55.45	143
70	146	47.95	66
63	170	37.06	191
55	132	41.67	137
78	187	41.71	83
65.4	149	44.65%	124

En base a los resultados preliminares, se infirió que el tratamiento de transfección que otorgó mejor eficiencia fue la co-transfección realizada sobre la línea celular 10.952 con un porcentaje de 61.22%. A su vez, se puede observar también en la línea celular L260, una mayor eficiencia cuando se co-transfectan ambos plásmidos.



#### Capítulo 4: Selección de colonias celulares resistentes a G418.

Aproximadamente a los 10 días de selección con antibiótico G418 se comenzaron a observar pequeños grupos de células que formaban colonias monoclonales. Con el correr de los días estos conglomerados incrementaron su tamaño hasta formar colonias bien definidas. (Figura 18).



**Figura 18:** colonias de FAB transgénicas resistentes a antibiótico, utilizando el agente JetPrime. Véase el incremento de tamaño a lo largo de las semanas; 7 días, 14 días y 21 días, respectivamente. Aumento total 100 X.

##### **4.1. Método físico: electroporación.**

A consecuencia de la elevada mortalidad celular propia de la técnica, no fue posible aislar colonias resistentes al antibiótico G418 luego de 21 días de selección.

##### **4.2. Método químico: agente poliamínico JetPrime (PolyPlus).**

Transcurridos los 21 días de selección con el antibiótico previamente nombrado se procedió a levantar las colonias monoclonales que poseían bordes claramente definidos. Para ello se realizó la técnica conocida como “anillos de clonado” (“cloning rings”) y se recuperaron las siguientes colonias: 6 de la línea 10.952 transfectadas con pCIneo-hEST2, 13 de 10.952 co-transfectadas, 4 de L260 transfectadas con pCIneo.hEST2 y 10 de L260 co-transfectadas.

Con estos datos se pudo calcular un porcentaje de transfección del plásmido pCI neo-hEST2 en los FAB, para cada tratamiento, los cuales se correlacionan con los obtenidos en la transfección transitoria con el plásmido pZGreenN1. Teniendo en cuenta que el número inicial de células era de aproximadamente 100.000, los porcentajes son los siguientes:

0.006% 10.952 transfectada con pCI neo-hEST2.

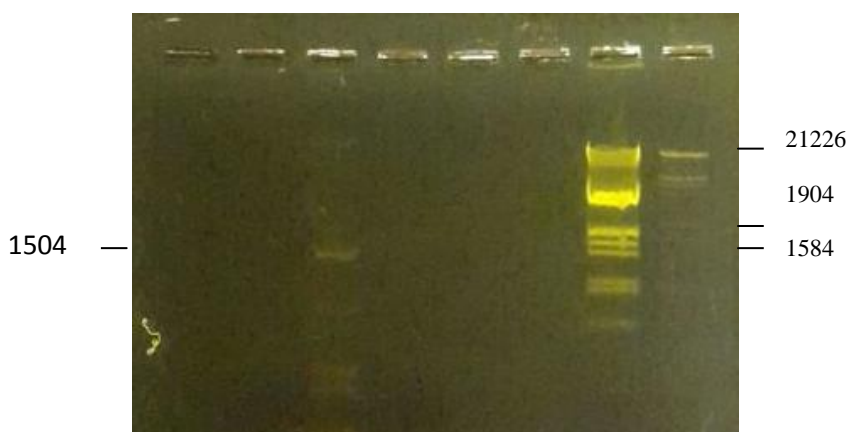
0.013% 10.952 co-transfectada.

0.004% L260 transfectada con pCI neo-hEST2.

0.010% L260 co-transfectada.

### **Capítulo 5: Optimización de las condiciones de amplificación por PCR del gen de la hTERT.**

Luego de optimizar las condiciones de la reacción para la amplificación del gen de la hTERT, fue posible obtener un producto de 1504 pb (Figura 19). Se determinó que las concentraciones de 2mM de  $Cl_2Mg$  y 0.12  $\mu g$  de ADN plasmídico fueron las óptimas para lograr amplificar el fragmento.



**Figura 19:** Amplificación por PCR de la secuencia del gen de hTERT. Calle 3: Banda perteneciente al amplificado del gen de la hTERT (1504 pb). Calle 6: control (-). Calle 7: Marcador de peso molecular  $\lambda$ , digerido con EcoRI e HindIII.

### *Discusión.*

El desarrollo de técnicas para crear animales transgénicos ha revolucionado el estudio de las ciencias biológicas como así nuestro entendimiento de las mismas, adquiriendo suma importancia en diversos ámbitos como en agricultura, farmacología, biomedicina y biotecnología. Una de las técnicas más novedosas y quizá la de mayor impacto social, es la Transferencia Nuclear de Células Somáticas, la cual se ha convertido en una alternativa al resto de los procedimientos, ya que acorta el tiempo necesario entre la obtención de un animal transgénico fundador y el establecimiento de un rebaño transgénico<sup>42</sup>. Para lograr una TNCS exitosa, las células donantes de núcleo deben tener alto potencial de división celular y un contenido citogenético estable<sup>97</sup>, lo que permite realizar modificaciones complejas en su material genético. Sin embargo la senescencia limita la proliferación de células de mamíferos durante el cultivo *in vitro*, debido a que las regiones de los telómeros se acortan con cada división celular y eventualmente dejan de dividirse. Sin embargo, la senescencia puede eludirse si se previene este acortamiento. Una alternativa es la introducción del gen de la telomerasa transcriptasa reversa (TERT)<sup>98-99</sup>.

En el presente trabajo se planteó el uso del plásmido pCIneo-hEST2, que contiene el cassette codificante de la telomerasa transcriptasa reversa humana (hTERT), para alargar la vida media de fibroblastos adultos bovinos cultivados *in vitro*. Para ello se estudiaron los efectos del agente poliamínico comercial JetPrime y la electroporación sobre la tasa de transfección. Los resultados obtenidos sugieren que la expresión forzada de esta enzima es capaz de eludir el acortamiento telomérico y evitar la senescencia de los cultivos. Resultados similares se han descrito por He, X.Y. y colaboradores sobre células epiteliales de glándula mamaria bovina<sup>100</sup>.

Si bien la electroporación no resultó de utilidad para la transfección, debido a la alta mortalidad celular que produce, se lograron obtener 33 colonias monoclonales resistentes al tratamiento con antibiótico G418 mediante el uso de JetPrime. Sin embargo, se presentaron dificultades para propagar estas colonias. Algunas de ellas, luego de algunos pasajes, detuvieron su división celular manteniéndose metabólicamente activas por unos días, hasta su eventual muerte. Otras se dividían continuamente de manera muy lenta, generando

insuficiente cantidad de ADN genómico, razón por la que al momento de la redacción de este trabajo final fue muy baja la eficiencia de integración para amplificar el constructo pCIneo-hEST2 por PCR. Adicionalmente, cabe aclarar que la integración del ADN de interés al genoma eucariota se lleva a cabo mediante un mecanismo de inserción al azar, pudiendo localizarse en cualquier región del genoma, ya sea transcripcionalmente activa o no. Esto justifica por un lado la baja eficiencia de transfección estable encontrada, y al mismo tiempo la muerte de las células en el proceso de propagación.

Kiyono y colaboradores en 1998 demostraron experimentalmente que la expresión ectópica de la hTERT no era suficiente para restaurar la actividad telomerasa en queratinocitos y células del epitelio mamario humano<sup>92</sup>. Dickson y colaboradores llegaron a la misma conclusión experimentando con estos cultivos *in vitro*<sup>91</sup>. Para lograr immortalizarlos requirieron, además de la actividad telomerasa, desactivar el camino por el cual la proteína p16 era inactivada por la proteína del retinoblastoma 16 (Rb/p16). La proteína p16 se encarga de regular la división celular normal, y cuando se dimeriza con la proteína Rb se arresta el ciclo celular impidiendo la replicación. Una vez impedida esta dimerización, debieron regular la expresión de la p16 manteniéndola en bajos niveles de expresión, para lograr immortalizar los cultivos. Las células de diferentes especies o tejidos, pueden diferir en los requerimientos genéticos y nutricionales que necesitan para lograr immortalizarse. En base a estas investigaciones, es de esperar encontrar diferencias en los porcentajes de transfección, entre las dos líneas utilizadas en este trabajo. Cabe aclarar que estas líneas provienen de hembras de diferentes edades, siendo entre ellas, madre (10.952) e hija (L260), y que generalmente las células de animales más jóvenes necesitan mayores requerimientos nutricionales cultivadas *in vitro*, lo que probablemente justifica la menor eficiencia de transfección en L260.

Los resultados obtenidos en este trabajo final brindan información acerca de la incorporación y expresión de la hTERT en fibroblastos adultos bovinos, presentando un método simple para obtener cultivos celulares inmortales que pueden utilizarse para producir animales transgénicos mediante transferencia nuclear.

### *Conclusiones.*

- Se propagaron correctamente los plásmidos pZGreenN1 y pCIneo-hEST2 y posteriormente se purificaron a través de diferentes kit comerciales y extracción alcalina obteniendo grandes concentraciones.
- Se identificó el plásmido de interés mediante el uso de enzimas de restricción, concluyendo que las purificaciones realizadas fueron correctas y el constructo se encontraba en perfectas condiciones para su uso en experimentos posteriores.
- Se transfectó eficientemente fibroblastos adultos bovinos con el agente químico no así con la electroporación, concluyendo que el JetPrime es una alternativa eficiente en el caso de células con mayor sensibilidad respecto a las fetales, como lo son las células adultas.
- Se obtuvieron colonias transgénicas con el plásmido de interés luego de selección positiva, durante 21 días, aplicando el antibiótico G418 como tratamiento.
- La co-transfección de pCIneo-hEST2 y pZGreenN1 otorga mejor eficiencia de transfección en las dos líneas cultivadas. Además se concluyó que se obtiene una mejor eficiencia en la línea 10.952.
- La eficiencia de integración del fragmento de 1504 pb (PCR) que forma parte del cassette para la expresión de hTERT fue muy baja.
- La menor eficiencia de transfección en la línea L260 se debería a los mayores requerimientos nutricionales en células de animales jóvenes.

### ***Bibliografía.***

1. Gordon, J. W & Ruddle, F. H. *DNA-mediated genetic transformation of mouse embryos and bone marrow*. *Gene* **33**, 121-136 (1985)
2. Grabher, C. & Wittbrodt, J. *Meganuclease and transposon mediated transgenesis in medaka*. *Genome Biology* **8**, S10 (2007).
3. Haruyama, N., Cho, A. & Kulkarni, A. B. *Overview: engineering transgenic constructs and mice*. *Current protocols in cell biology* editorial board Juan S Bonifacino et al **Chapter 19**, Unit 19.10 (2009).
4. MacKenzie, D. A., Hullett, D. A. & Sollinger, H. W. *Xenogeneic transplantation of porcine islets: an overview*. *Transplantation* **76**, 887–891 (2003).
5. Sprangers, B., Waer, M. & Billiau, A. D. *Xenotransplantation: where are we in 2008?* *Kidney International* **74**, 14–21 (2008).
6. Ekser, B., Rigotti, P., Gridelli, B. & Cooper, D. K. C. *Xenotransplantation of solid organs in the pig-to-primate model*. *Transplant Immunology* **21**, 87–92 (2009).
7. Gordon, J. W., Scangos, G. a, Plotkin, D. J., Barbosa, J. a & Ruddle, F. H. *Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**, 7380–4 (1980).
8. Brinster, R. L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K., Palmiter, R.D. *Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs*. *Proc Natl Acad Sci*. **82(13)** 4438-4442 (1985).
9. Hammer, R.D., Pursel, V.G., Rexroad, C.E. jr., Wall R.J., Bolt, D. J., Ebert, K. M. *Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection*. *Nature* **315**, 680-683 (1985).
10. Ebert, K. M., Selgrath, J.P., DiTullio, P., Denman, J., Smith, T.E., Memon, M. A. *Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression*. *Biotechnology (NY)* **9**, 835-838 (1991).
11. Murray, J. D., Nancarrow, C. D., Marshall, J. T., Hazelton, I. G, Ward, K. A. *Production of transgenic merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusión genes*. *Reprod Fertil Dev.*, **1**, 147-155 (1989).
12. Krimpenfort, P., Rademakers, A., Eyestone, W., Van Der Schans, A., Van Den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk, E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R. *Generation of transgenic dairy cattle using in vitro embryo production*. *Biotechnology* **9**, 844-7. (1991).
13. Jaenish, R., Mintz, B. *Simian virus 40 DNA sequences in healthy adult mice derived from preimplantation blastocist injected with viral DNA*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **21**, 1250-1254. (1974).
14. Soriano, P., Cone, R. D., Mulligan, R.C., Jaenisch, R. *Tissue-specific and ectopic expression of genes introduced into transgenic mice by retroviruses*. *Science* **234**, 1409-1413 (1986).
15. Chan, A. W., Homan, E. J., Ballou, L. U., Buins, J. C., Bremel, R. D. *Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **95**, 14028-14033.

16. Chan, A. W., Chong, K. Y., Martinovich, C., Simerly, C., Schatten, G. *Transgenic monkeys produced by retroviral gene transfer into mature oocytes*. *Science* **291**, 309-312 (2001).
17. Zheng, C., Baum, B. J., Iadarola, M.J., O’Connell, B. C. *Genomic integration and gene expression by a Modified adenoviral vector*. *Nat. Biotechnol* **18**, 176-180 (2000).
18. Goff, S. P. *Genetics of retroviral integration*. *Annu. Rev. Genet.* **26**, 527-544 (1992).
19. Brown, P.O., Bowerman, B., Varmus, H. E., Bishop, J. M. *Retroviral integration structure of the initial covalent product and its precursor, and a role for the viral IN protein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **86**, 2525-2529 (1989).
20. Kulkosky, J., Skalka, A. M. *Molecular mechanism of retroviral DNA integration*. *Pharmacol Ther.* **61**, 185-203 (1994).
21. Wheeler, M. B., Walters, E. M. *Transgenic technology and applications in swine*. *Theriogenology* **56** 1345-1369 (2001).
22. Brackett, B. G., Baranska, W., Sawicki, W., Kaprowski, H. *Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization*. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)* **68**, 353-357 (1971).
23. Brinster, R. L., Sandgren, E. P., Behringer, R. R. Palmiter, R. D. *No simple solution for making transgenic mice*. *Cell* **59**, 239-241 (1989).
24. Cappello, F., Stassi, G., Lazzereschi, D., Renzi, L., Di Stefano, C., Marfe, G. *hDAF expression in hearts of transgenic pigs obtained by sperm-mediated gene transfer*. *Transplant Proc.* **32**, 895-896 (2000).
25. Lavitrano, M.; Bacci, M. L.; Forni, M., Lazzereschi, D., Di Stefano, C.; Fioretti, D. *Efficient production by sperm-mediated gene transfer of human decay accelerating factor (hDAF) transgenic pigs for xenotransplantation*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **99**, 14230-14235 (2002).
26. Kuznetsov, A. V.; Kuznetsov, I. V., Schit, I. Y. *DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova in vitro and in vivo*. *Mol. Reprod. Dev.* **56**, 292-297 (2000).
27. Jonak, J. *Sperm-mediated preparation of transgenic Xenopus laevis and transmisión of transgenic DNA to the next generation*. *Mol. Reprod. Dev.* **56**, 298-300 (2000).
28. Khoo, H.W. *Sperm-mediated gene transfer studies on zebrafish in Singapore*. *Mol. Reprod. Dev.* **234**, 278-280 (2000).
29. Evans, M. J. & Kaufman, M. H. *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature* **292**, 154–156 (1981).
30. Martin, G. R. *Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 7634–7638 (1981).
31. Evans, M. J., Kaufman, M. H. *Establishment in cultura of pluripotential cells from mouse embryos*. *Nature* **292**, 154-156 (1981).
32. Iannaccone, P. M., Taborn, G. U., Garton, R. L, Caplice, M. D., Brenin, D. R. *Pluripotent embryonic Stem cells from the rat are capable of producing chimeras*. *Dev. Biol.* **163**, 288-292 (1994).



33. Notarianni, E., Galli, C., Laurie, S., Moor, R. M.; Evans, M. J. *DErivation of pluripotent embryonic cell lines from the pig and sheep*. J. Reprod. Fertil Suppl. **43**, 255-260 (1991).
34. Thompson, J. A., Kalishman, J., Golos, T. G., Durning, M., Harris, C. P., Becker R.A. *Isolation of a primate embryonic Stem cell line*. Produc. Natl. Acad. Sci. (USA) **92**, 7844-7848 (1995).
35. Cibelli, J.B., Stice, S. L., Golueke, P. J., Kane, J. J., Jerry, J., Blackwell, C. *Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived Stem-cell*. Nat. Biotechnol **16**, 642-646 (1998).
36. Prather, R., Barnes, F., Sims, M., Robl, J., Eyestone, W., First, N. *Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte*. Biol. Reprod. **4**,859-66 (1987).
37. Stice, S., Robl, J. *Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos*. Biol Reprod. **39**,657-664 (1988).
38. Prather, R., Sims, M., First, N. *Nuclear transplantation in early pig embryos*. Biol. Reprod. **41**, 414-418 (1989).
39. Willadsen, S. M. *Nuclear transplantation in sheep embryos*. Nature. **320**, 63-65 (1986).
40. Wilmut, I., Schnieke, A., Mcwhir, J., Kind, A., Campbell K. *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells*. Nature. **385**, 810-813 (1997).
41. Campbell, K. H., McWhir, J., Ritchie, W. A., Wilmut, I. *Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line*. Nature. **380**, 64-66 (1996).
42. Houdebine, L.-M. *The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression*. Journal of biotechnology **98**, 145–60 (2002).
43. McCreath, K. J. *et al. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells*. Nature **405**, 1066–9 (2000).
44. Lai, L. *et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning*. Science **295**, 1089–1092 (2002).
45. Thomas, K. R. & Capecchi, M. R. *Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells*. Cell **51**, 503–512 (1987).
46. Camacho, F., Capo, M., Toledo, R., de León, J., Talavera, A., Pérez, E. M. *Transferencia de genes in vitro con polímeros catiónicos*. Vacca Monitor **15 (1)** (2006).
47. Boussif, O., Zanta, M. A., Behr, J. P. *Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold*. Gene Ther. **3**,1074-80(1996)
48. Fischer, D., Li, Y., Ahlemeyer, B., Krieglstein, J. & Kissel, T. *In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis*. Biomaterials **24**, 1121–1131 (2003).
49. Xia, T., Kovochich, M., Liong, M., Zink, J. I. & Nel, A. E. *Cationic Polystyrene Nanosphere Toxicity Depends on Cell-Specific Endocytic and Mitochondrial Injury Pathways*. ACS Nano **2**, 85–96 (2007).
50. Romero, E. L., Morilla, M. J., Bakas, L. S. *Vectores lipídicos: nuevas estrategias aplicadas a la terapia génica*. Medicina (Buenos Aires) **61**, 205-214 (2000).



51. Hanahan, D., Jessee, J. & Bloom, F. R. *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. Bacterial Genetic Systems, **Volume 204**, 63–113 (1991).
52. McCreath, K. J., Howcroft, J., Campbell, K. H., Colman, A., Schnieke, A. E., Kind, A. J. *Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells*. Nature **405**, 1066-1069 (2000).
53. Lai, L., Kolber-Simond, D., Park, K. W., Cheong, H. T., Greenstein, J. L., Im, G. S., Samuel, M., Bonk, A., Rieke, A., Day, B. N., Murphy, C. N., Carter, D. B., Hawley, R.J., Prather, R. S. *Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning*. Science **295**, 1089-1092 (2002).
54. Lodish, Berk, Matsudaira, Kaiser, Krieger, Scott, Zipursky, Darnell. *Biología celular y molecular*. Editorial Panamericana et al, Capítulo 10, Unidad 10.4 (2003).
55. Greider, C. W. *Telomere length regulation*. Annu. Rev. Biochem **65**, 337-365 (1996).
56. Poole, J. C., Andrews, L. G., Tollefsbol, T. O. *Activity, function and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT)* Gene **269**, 1-12 (2001).
57. Daniel, M., Peek, G. W., Tollefsbol, T. O. *Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)* Gene **498**, 135-146 (2012).
58. Liu, L., Lai, S., Andrews, L. G., Tollefsbol, T. O. *Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease*. Gene **340 (1)**, 1-10 (2004a).
59. Liu, L., Saldanha, S. N., Pate, M. S., Andrews, L.G., Tollefsbol, T.O. *Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during celular differentiation*. Genes Chromosomes Cancer **41 (1)**, 26-37 (2004b).
60. Saito, T. et al. *Comparative gene mapping of the human and mouse TEP1 genes, which encode one protein component of telomerases*. Genomics **46 (1)**, 46-50 (1997).
61. Cohen, S. B., et al. *Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells*. Science **315 (5820)**, 1850-1853 (2007).
62. Beattie, T. L., Zhou, W., Robinson, M. O., Harrington, L. *Reconstitution of human telomerase activity in vitro*. Curr. Biol. **8 (3)**, 177-180 (1998).
63. Ishikawa, F. *Regulation mechanism of mammalian telomerase*. A review. Biochemistry (Mosc) **62 (11)**, 1332-1337 (1997).
64. Weinrich, S. L. et al. *Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT*. Nat. Genet. **17 (4)**, 498-502 (1997).
65. Artandi, S. E. et al. *Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice*. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) **99 (12)**, 8191-8196 (2002).
66. González Suárez, E. et al. *Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes*. EMBO J. **20 (11)**, 2619-2630 (2001).
67. González Suárez, E., Flores, J. M., Blasco, M. A. *Cooperation between p53 mutation and high telomerase transgenic expression in spontaneous cancer development*. Mol. Cell. Biol. **22 (20)**, 7291-7201 (2002).

68. Qi, D. L. et al. *Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5*. Mol. Cell. Biol. **31** (8), 1624-1636 (2011).
69. Stewart, S. A. et al. *Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) **99** (20), 12606-12611 (2002).
70. Razin, S., Pfenndt, E. A., Matsumura, T., Hayflick, L. *Comparison by autoradiography of macromolecular biosynthesis in “young” and “old” human diploid fibroblast cultures. A brief note*. Mechanism of Ageing and Development **6**, 379-384 (1977).
71. Kyo, S., Takakura, M., Fujiwara, T., Inoue, M. *Understanding and exploiting hTERT promoter regulation for diagnosis and treatment of human cancers*. Cancer Sci. **99** (8), 1528-1538 (2008).
72. Harley, C. B., Vaziri, H., Counter, C. M., Allsopp, R. C. *The telomere hypothesis of cellular aging*. Exp. Gerontol **27**, 375-382 (1992).
73. Boisclair, Y.R., Brown, A.L., Casola, S., Rechler, M. M. *Three clustered Sp1 sites are required for efficient transcription of the TATA-less promoter of the gene for insulin-like growth factor-binding protein-2 from the rat*. J. Biol. Chem. **268**, 24892-24901 (1993).
74. Cong, Y. S., Wen, J., Bacchetti, S. *The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter*. Hum. Mol. Genet. **8**, 137-142 (1999).
75. Horikawa, I., Cable, P. L., Afshari, C., Barrett, J. C. *Cloning and characterization of the promoter region of human telomerase reverse transcriptase gene*. Cancer Res. **59**, 826-830 (1999).
76. Takakura, M., Kyo, S., Kanaya, T., Hirano, H., Takeda, J., Yutsudo, M., Inoue, M. *Cloning of human telomerase reverse transcriptase gene promoter and identification of proximal core promoter essential for transcriptional activation of hTERT in immortalized and cancer cells*. Cancer Res. **59**, 551-559 (1999).
77. Wick, M., Zubov, D., Hagen, G. *Genomic organization and promoter characterization of the gene encoding the human telomerase reverse transcriptase (hTERT)*. Gene **232**, 97-106 (1999).
78. Kyo, S. et al. *Ap1 cooperates with c-Myc to activate transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT)*. Nucleic Acids Res. **28**, 669-677(2000).
79. Cong, Y. S., Bacchetti, S. *Histone deacetylation is involved in the transcriptional repression of hTERT in normal human cells*. J. Biol. Chem. **275**, 35665-35668 (2000).
80. Liu, L. et al. *MCAF1/AM is involved in Sp1-mediated maintenance of cancer-associated telomerase activity*. J. Biol. Chem **284**, 5165-5170 (2009).
81. Li, A. Y. et al. *High-mobility Group A2 Protein Modulates hTERT transcription to promote tumorigenesis*. Mol. Cell. Biol. **31**, 2605-2617 (2011<sup>a</sup>)
82. Cukusić, A., Skrobot Vidacek, N., Sopta, M., Rubelj, I. *Telomerase regulation at the crossroad of cell fate*. Cytogenect. Genome Res. **122**, 263-272 (2008).
83. Li, H., Lee, T. H., Avraham, H. *A novel tricomplex of BRCA1, Nmi and c-Myc inhibits c-Myc-induced human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT) promoter activity in breast cancer*. J. Biol. Chem. **277**, 20965-20973 (2002)

84. Günes, C., Linchtsteiner, S., Vasserot, A. P., Englert, C. *Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1*. *Cancer Res.***60**, 2116-2121(2000).
85. Gao, J., Chen, D., Tian, Y., Zhang, J., Cai, K. *Effect of estrogen on telomerase activity in human breast cancer cells*. *J.Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.***23**, 286-287 293 (2003).
86. Nanni, S. et al. *Signaling through estrogen receptors modulates telomerase activity in human prostate cancer*. *J. Clin. Invest.* **110**, 219-227 (2002).
87. James, L., Einsman, R. N. *Myc and Mad bHLHZ domains possess identical DNA-binding specificities but only partially overlapping functions in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **99**, 10429-10434 (2002).
88. Ko, L. j., Prives, C. et al. *P53: puzzle and paradigm*. *Genes Dev.***10**, 1054-1072 (1996).
89. Sitaram, T. et al. *Comparative gene mapping of the human and mouse TEP1 genes, which encode one protein component of telomerases*. *Genomics* **46**, 46-50 (1997).
90. He, Y. L., Wu, Y. H., He, X.N., Liu, F.J., He, X.Y., Zhang, Y. *An immortal goat mammary epithelial cell line induced with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene transfer*. *Theriogenology* **71**, 1417-1424 (2009).
91. Dickson, M. A., Hahn W. C., Ino, Y., Ronfard, V., Wu, J. Y, Weinberg, R. A, et al. *Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16(INK4a)-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics*. *Mol. Cell Biol.* **20**, 1436-1437(2000).
92. Kiyono, T., Foster, S. A., Koop, J.I., McDougall, J. K., Galloway, D. A., Klingehuzt, A. J. *Both Rb/p16 INK 4<sup>a</sup> inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells*. *Nature* **396**, 84-88 (1998).
93. Cui. W., Wylie D., Aslam, S., Dinnyes A., King, T., Clark J. *Telomerase immortalized sheep fibroblast can be reprogrammed by nuclear transfer to undergo early development*. **69**, 15-21 (2003).
94. Yabut, O. & Bernstein, H. S. *The promise of human embryonic Stem cells in aging-associated diseases*. *Aging*, **Vol. 3, N°5**, 494-508 (2011).
95. *Transferencia nuclear de células somáticas en el ganado y los caballos de cría*. Código sanitario para los animales terrestres. **Capítulo 4.11**. (2010).
96. Uzbas, F. *An image showing how telomerase elongates telomeric DNA progressively*. Wikipedia (2011).
97. Shen, W., Lan, G., Yang, X., Li, L., Min, L., Yang, Z, et al. *Targeting the exogenous htPAm gene on goat somatic cell beta-casein locus for transgenic goat production*. *Mol. Reprod. Dev.* **74**, 428-434 (2007).
98. Bodnar, A. G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S. E., Chiu, C., Morin, G. B., Harley, C. B., Shay, J. W., Lichtsteiner, S., Wright, W. E. *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*. *Science* **279**, 349-352 (1998).
99. Shay, J. W., Wright, W. E. *When do telomeres matter?* *Science* **291**, 839-840 (2001).

100. He, X. Y., Zheng Y. M., Lan, J., Wu, Y. H., Yan, J., He, X. N., Zhang, T., He, Y. L., Zheng, Y. L., Zhang, Y. *Recombinant adenovirus-mediated human telomerase reverse transcriptase gene can stimulate cell proliferation and maintain primitive characteristics in bovine mammary gland epithelial cells*. *Growth Differ Dev.* **53**, 312-322 (2011).