



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**COOPERACIÓN ENTRE LOS ONCOGENES E6/E7 Y FACTORES
PROMOTORES DE LA ANGIOGÉNESIS EN LA REGENERACIÓN DE
PORCIONES DE LA OREJA DE RATÓN**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Sergio Eliezer López Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles
Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Álvaro Marín Hernández
Instituto Nacional de Cardiología

Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl
Instituto Nacional de Salud Pública

Cuernavaca, Morelos. Abril, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

En las siguientes líneas expreso mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial a la Dra. Celina García Melendrés por su atenta y oportuna asesoría sobre las cuestiones científicas centrales del presente.

A mi comité tutorial el Dr. Luis Fernando Covarrubias Robles, la Dra. María de Lourdes Gutiérrez Xicoténcatl y el Dr. Álvaro Marín Hernández.

A mis compañeros de laboratorio, al Dr. Leandro David Hernández García, a la L.C.G. Lucía Guadalupe Ramírez Navarro y al Q.F.B. Jorge Alberto Valeriano Guerrero por sus contribuciones al presente trabajo. A la M.C. Concepción Valencia García por su apoyo técnico.

A mi familia, Ana Isabel y mis amigos de la generación.

Al bioterio, las unidades de Producción de roedores transgénicos, y Síntesis y secuenciación de DNA.

Por supuesto agradezco a todos los ciudadanos que, con sus impuestos han colaborado para otorgarme una beca y realizar una maestría en ciencias. A las instituciones y programas destinados para tal fin. A CONACyT por su apoyo mediante la beca No. 384815 y los donativos de Ciencia Básica No. 239891 y PAPIIT-DGAPA IA200915.

Dedicatoria

A todos los habitantes del planeta tierra.

CONTENIDO

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
MECANISMOS DE REGENERACIÓN	3
MORFOLAXIS Y EPIMORFOSIS	5
PROLIFERACIÓN CELULAR EN EL BLASTEMA	5
LA REGENERACIÓN DE PORCIONES DE OREJA DE RATÓN	6
EL CICLO CELULAR Y LOS ONCOGENES E6/E7 DEL VPH	7
<i>Regulación del ciclo celular</i>	7
<i>Generalidades del virus del papiloma humano</i>	8
<i>Desregulación del ciclo celular por los oncogenes E6 y E7 del VPH</i>	8
LA DESDIFERENCIACIÓN CELULAR Y LA DESACTIVACIÓN DE LOS REPRESORES MAESTROS DEL CICLO CELULAR	9
<i>La reprogramación celular: una forma de desdiferenciación celular</i>	9
OTROS FACTORES ASOCIADOS A LA REGENERACIÓN	11
PARTICIPACIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL DESARROLLO DE TEJIDOS	11
<i>Angiogénesis y desarrollo embrionario</i>	11
<i>Angiogénesis y regeneración</i>	12
<i>Angiogénesis y cáncer</i>	13
MODELOS TRANSGÉNICOS GENERADOS CON SISTEMAS MOLECULARES DE EXPRESIÓN INDUCIBLE	13
ANTECEDENTES	16
JUSTIFICACIÓN	19
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS PARTICULARES	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
ANIMALES	22
GENOTIPIFICACIÓN	22
EXTRACCIÓN DE RNA	22
REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN	24
PCR Y qPCR	24
ENSAYO DE REGENERACIÓN	27
HISTOQUÍMICA	28
DIGESTIONES DE DNA PLASMÍDICO	28
LIGACIÓN DE DNA	28
TRANSFORMACIÓN DE BACTERIAS POR CHOQUE TÉRMICO	29
EXTRACCIÓN DE DNA PLASMÍDICO	29
SECUENCIACIÓN	30
CULTIVO CELULAR	30
TRANSFECCIÓN CON LIPOFECTAMINA	31
GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES TRONCALES W9.5-E6/E7	32
DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES W9.5-E6/E7	32

ENSAYOS PARA LA GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS.....	33
ESTADÍSTICA.....	33
RESULTADOS	34
CONSTRUCCIÓN DE VECTORES QUE EXPRESAN DE FORMA INDUCIBLE LOS ONCOGENES E6/E7 O EL AGF ..	37
CONSTRUCCIÓN DEL TRANSPOSÓN PB-E6/E7	37
CONSTRUCCIÓN DEL TRANSPOSÓN PB-AGF.....	40
VALIDACIÓN DE LOS VECTORES QUE EXPRESAN DE FORMA INDUCIBLE LOS ONCOGENES E6/E7 O EL AGF .	43
<i>Transfección en células HEK293.....</i>	<i>43</i>
<i>Inducción de E6 y AGF a nivel de mRNA.....</i>	<i>44</i>
<i>Efecto de la inducción de los oncogenes E6/E7 sobre células HeLa.....</i>	<i>46</i>
GENERACIÓN DE ROEDORES TRANSGÉNICOS POR INYECCIÓN PRONUCLEAR	48
GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR TRONCAL EMBRIÓNICA QUE EXPRESA LOS ONCOGENES E6/E7 (W9.5-E6/E7).....	49
GENERACIÓN DE RATONES TRANSGÉNICOS POR FORMACIÓN DE QUIMERAS	50
DISCUSIÓN	52
CONCLUSIONES.....	57
PERSPECTIVAS	58
REFERENCIAS	59

Resumen

La regeneración epimórfica es una característica distintiva de algunos vertebrados como el pez cebra y el ajolote. Este proceso complejo involucra la participación de diversos eventos como la formación transitoria del blastema donde existe un incremento de la proliferación y posterior diferenciación celular. Los mamíferos a diferencia de los animales anteriormente mencionados presentan una escasa regeneración confinada a pocos órganos y tejidos como el hígado o la piel. Nosotros utilizamos como modelo de estudio un ratón transgénico, que expresa transitoriamente en la capa suprabasal de la epidermis, los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano (VPH) bajo el promotor de la citoqueratina bovina 6b (Tg(bK6-E6/E7)). Este modelo regenera la oreja posterior de que esta ha sido perforada. Evaluamos la expresión de 5 genes que promueven la angiogénesis, *Agf* (Angiopoietin-related growth factor), *Ang1* (Angiopoietin 1), *Fst* (Follistatin), *Hif1 α* (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) y *VegfA* (Vascular endothelial growth factor A) en la oreja intacta y luego de ser perforada. De los cuales, dos (*Hif1 α* y *VegfA*) se encontraron a estar incrementados en los transgénicos Tg(bK6-E6/E7) versus los ratones silvestres en condiciones de daño. Además, la administración de ciclosporina A inhibe el proceso regenerativo. Finalmente, con el fin de producir un nuevo modelo murino que, expresará transitoriamente y de manera ubicua los oncogenes E6/E7 e investigar su cooperación con el factor angiogénico Agf, generamos primeramente vectores que contienen dentro del transposón piggyBac, un sistema de expresión inducible mediado por doxiciclina (PB-E6/E7 y PB-AGF), mismos que fueron funcionales *in vitro*. Posteriormente con el objetivo de obtener los ratones transgénicos, se generaron líneas de células troncales embriónicas que, contienen el vector PB-E6/E7. Actualmente está en progreso la incorporación de estas células o directamente los transposones referidos a embriones de ratón que, eventualmente, darán lugar a los ratones transgénicos requeridos para los experimentos de regeneración.

Introducción

Es nuestra tendencia como humanos, la de mantener un estado óptimo de salud, minimizar el sufrimiento, el dolor y recuperarnos de cualquier perjuicio con el que nos encontremos en la vida. La idea recurrente, de que podemos restaurar cualquier parte dañada del cuerpo de forma ilimitada, es tan antigua que, es ilustrada en el mito griego del titán Prometeo, el cual fue atado en el monte Cáucaso y condenado para siempre por el dios Zeus, en un tormento donde un ave comía el hígado durante el día y, siendo Prometeo inmortal el órgano volvía a crecer durante la noche (Tiniakos et al. 2010). Esta idea ha permanecido y es retratada en historietas o películas como algo ficticio, sin embargo, es muy probable que, a la luz de los avances científicos, dentro de poco, no lo sea más.

Los organismos en ambientes silvestres pueden dañar sus tejidos que, de no repararse eficientemente, comprometerían la vida en el corto o largo plazo. Para hacer frente a una lesión, los vertebrados han desarrollado básicamente dos estrategias. Una es la fibrosis que, resulta de un proceso inflamatorio mediado por fibroblastos y miofibroblastos los cuales depositan proteínas como la colágena y se desarrolla tejido conectivo fibroso en el sitio lesionado. Cuando la fibrosis ocurre en respuesta a un daño como parte de un proceso normal de sanación se le llama cicatrización (Wick et al. 2013). La segunda es la regeneración, que es el proceso más efectivo de reparación y a diferencia de la fibrosis, todos los componentes del tejido u órgano perdido o dañado, son reemplazados por el mismo tipo celular del que estaba constituido antes del insulto, de tal forma que la función y estructura llega a restaurarse completamente (Harty et al. 2003).

Entre los animales, la capacidad de regeneración es altamente variable, pues no todos los organismos regeneran con la misma eficiencia ni emplean los mismos mecanismos para lograrlo. Por ejemplo, se ha observado que los animales jóvenes regeneran mejor que los adultos. Algunos de forma espectacular son capaces de regenerar un organismo completo a partir de un pequeño fragmento del espécimen, mientras que otros solo pueden regenerar ciertos tejidos u órganos (Bely & Nyberg 2010). Entre los vertebrados, ciertos anfibios como las salamandras destacan porque regeneran eficientemente una gran cantidad de tejidos, respecto a los mamíferos que son pobremente regeneradores. Estas diferencias estimulan la investigación en los tejidos de los primeros y plantea la interrogante de si sus estrategias naturales de regeneración pueden ser replicadas artificialmente en los segundos y por supuesto en humanos.

Mecanismos de regeneración

En los estudios de regeneración, existen preguntas básicas que son esenciales para el entendimiento del fenómeno: (1) ¿Cuál es el origen y características de las células que constituyen una estructura en regeneración?, (2) ¿Qué mecanismos realizan los organismos para llevar a cabo la regeneración? y, (3) ¿Qué factores regulan tales mecanismos? (Stocum 2006). Algunas respuestas se han obtenido utilizando distintos organismos modelo y mediante técnicas de marcaje celular, microscópicas, moleculares y de ingeniería de tejidos. Ahora se sabe que, existen diversos mecanismos celulares por medio de los cuales se induce la regeneración; ciertos detalles son específicos de cada especie y tipos celulares, pero básicamente se han descrito dos: la activación de células troncales adultas, y la conversión celular. No se descarta que se requieran de los dos mecanismos para llevar a cabo el proceso regenerativo eficiente en tejidos complejos. Estas células desencadenan una serie de eventos relacionados como la proliferación, migración, hiperplasia, transición epitelio-mesénquima o mesénquima-epitelio que culminan en un tejido regenerado. Por otra parte, no son procesos aleatorios, sino que son sujetos a señales regulatorias intrínsecas y extrínsecas. Entre ellas destacan varias vías de transducción de señales como son: la vía Notch, Wnt, Hedgehog, así como señales que determinan la muerte mediante apoptosis. Lograr dilucidar y controlar estos y otros mecanismos a voluntad, supone un gran avance para la medicina regenerativa.

La materia prima para el desarrollo de cualquier tejido es la célula. A través de los diferentes estadios de diferenciación, la identidad de una célula se va definiendo, al igual que, aspectos estructurales y moleculares, mismos que, están asociados a su función (Strauss et al. 2012). Esto hace pensar que, cuando la célula se ha diferenciado totalmente, deja de dividirse y permanece así para no comprometer su función fisiológica. Sin embargo, en diversos casos, principalmente frente a daño tisular, esto parece no ser tan rígido. Para que se lleve a cabo la regeneración de tejidos y órganos complejos después de un daño, es necesario que existan eventos que activen la proliferación celular, donde participa toda la maquinaria de regulación del ciclo celular. La proliferación, complementada con procesos de diferenciación y morfogénesis, permitirán que, el organismo logre reconstruir la estructura y función del tejido en cuestión de tal forma sea reemplazado el tejido celular perdido.

El reemplazo celular, se lleva a cabo a través de diversos mecanismos como se ha mencionado anteriormente, uno de ellos es la activación de células troncales adultas. Estas células no poseen un grado de especialización elevado ya que, no son terminalmente diferenciadas, pero pueden recibir señales que las estimulan y de esta forma contribuyen a

la regeneración de un tejido. Un ejemplo clásico son las células troncales hematopoyéticas que generan todos los elementos celulares de la sangre; la exposición a la radiación daña dichas células troncales y en consecuencia, disminuyen la mayoría de las células sanguíneas, pero poblaciones de células troncales radio-resistentes o el trasplante de una población que contiene las células troncales sanas puede lograr recuperar toda la población celular hemática (Mendelson & Frenette 2014).

Otra estrategia para obtener células durante la regeneración es la conversión celular. Se han descrito dos tipos de mecanismos de conversión: la desdiferenciación y la transdiferenciación. El primero implica que un tipo celular especializado y terminalmente diferenciado revierta a uno menos diferenciado como una célula troncal o una célula progenitora; este evento facilita su proliferación antes de volver a rediferenciar y reemplazar el tejido dañado. Por ejemplo, estudios de regeneración realizados en el pez cebra en los que se remueve quirúrgicamente aproximadamente el 20% del ventrículo del corazón muestran que pocos segundos después de la operación se forma un coágulo, que evita el sangrado, luego éste coágulo es sustituido transitoriamente por depósitos de tejido fibroso que contiene proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, que finalmente es reemplazado por células musculares del corazón (cardiomiocitos) que han proliferado para restaurar sitio del daño; la regeneración total se lleva a cabo en aproximadamente 60 días dando lugar a un corazón con las capacidades contráctiles normales, similares a las que estaban presentes antes del daño. (Poss et al. 2002). Estudios más recientes indican que, el mecanismo por el cual se genera el nuevo tejido incluye la desdiferenciación, proliferación de los cardiomiocitos y posterior rediferenciación, evidenciado por la pérdida de organización del sarcómero, la morfología celular y la activación de *plk1* (Polo Like Kinase 1), un gen regulador del ciclo celular cuya inhibición también causa un decremento en la proliferación y la regeneración del corazón (Jopling et al. 2010). En mamíferos, las células secretorias del epitelio respiratorio también realizan un proceso similar. Este epitelio está conformado por tres capas de tres tipos celulares, las células basales, las células secretorias y las ciliadas. Cuando las células troncales de la capa basal son removidas, las células secretorias desdiferencian para regenerar la capa basal (Tata et al. 2013).

Por otra parte, la transdiferenciación, se refiere a la conversión de un tipo celular terminalmente diferenciado, a un tipo celular de otro linaje. Esta es considerada una forma de reprogramación de linaje, pues implica un fenómeno de reprogramación celular sin llegar a un estado de pluripotencia (Graf & Enver 2009). Generalmente en el tránsito de esta conversión, existe un proceso de desdiferenciación seguido por uno de rediferenciación

hacia el nuevo tipo celular. Es posible que, la desdiferenciación no sea completamente un requerimiento en todos los casos. De forma natural, la transdiferenciación se ha observado en anfibios. Por ejemplo, después de remover el cristalino del ojo, las células del iris desdiferencian, lo que conlleva a la pérdida de su pigmentación y su morfología globular típica; estas células mantienen un ciclo celular activo, proliferan y forman una vesícula cuyo crecimiento y posterior rediferenciación dará lugar al nuevo cristalino (Tsonis et al. 2004).

Morfolaxis y epimorfosis

Como ya mencionamos, no todas las especies regeneran de la misma manera. A nivel tisular se han observado dos formas por las que en general los organismos complejos reemplazan los tejidos perdidos: la morfolaxis y la epimorfosis. Durante el primero existe un remodelamiento y reespecificación extensiva de los tejidos y células remanentes, por lo cual este tipo de regeneración se asocia comúnmente con procesos de transdiferenciación. La proliferación celular no existe o contribuye muy poco al proceso de regeneración, por lo que el organismo regenerado es mucho más pequeño que el original (Galliot & Chera 2010). En general ciertos invertebrados como la hidra, presentan este tipo de regeneración que, adicionalmente tiene fines reproductivos ya que, puede generarse un organismo completo a partir de un pequeño fragmento del original (Bosch 2007).

La epimorfosis ocurre principalmente en vertebrados como el ajolote. Al contrario de la morfolaxis, se desencadena inicialmente la proliferación y luego el remodelamiento del tejido en cuestión. Después de que el organismo ha sufrido una amputación sucede: (1) la reepitelización de la herida que ha sido expuesta por el daño, (2) bajo esta epidermis se formará una cúmulo de células desdiferenciadas de linaje restringido (Kragl et al. 2009) y altamente proliferativas llamado blastema, el cual una vez que esta alcanza la masa crítica, será la fuente para reemplazar las células perdidas (McCusker et al. 2015), (3) seguirá la rediferenciación de las células del blastema a la par de procesos morfogénicos que resultarán en una estructura rudimentaria, (4) la estructura crecerá hasta alcanzar un tamaño igual al presentado antes de la amputación (Quijano et al. 2015).

Proliferación celular en el blastema

La característica principal de la regeneración epimórfica es la formación del blastema, en el cual están albergadas una gran cantidad de células progenitoras que alguna vez estuvieron en un estado totalmente diferenciado o quiescente. Sin embargo, esta actividad altamente proliferativa es un acontecimiento transitorio, pues luego de alcanzar una masa crítica se detiene, lo cual permite la progresión de subsecuentes eventos igualmente importantes

como es la diferenciación celular. El incremento proliferativo durante la epimorfosis está asociada a la modificación de la actividad de reguladores del ciclo celular y a la vez a la desdiferenciación. Es de esperarse que, factores que regulan de las vías de progresión del ciclo celular y desdiferenciación sean de la misma manera transitorias. Entre dichos factores destacan dos tipos: los proto-oncogenes que estimulan la proliferación celular y supresores de tumores que, ejercen el efecto contrario.

Estudios en salamandras revelan que la actividad de p53 (un supresor tumoral) se ve disminuida durante la formación del blastema e incrementa gradualmente a valores normales en estadios tardíos, es decir aumenta cuando se hacen presentes los procesos de diferenciación celular (Yun et al. 2013). Por el contrario, análisis globales de expresión también revelan que existe una gran cantidad de factores catalogados como proto-oncogenes que, se expresan abundantemente durante las etapas tempranas de la formación del blastema y no así en las tardías (Stewart et al. 2013). En este contexto llama la atención que el locus *Ink4a* de los anfibios carece, en comparación al mismo locus en mamíferos, del gen que codifica para *Arf* (*Cdkn2a*), un supresor tumoral relevante del ciclo celular (Pomerantz & Blau 2013). Estos ejemplos ilustran el fenómeno de transitoriedad que, es necesaria para mantener un estado proliferativo desdiferenciado temporal del blastema y su asociación con genes relacionados a un ciclo celular activo.

La regeneración de porciones de oreja de ratón

Existen distintos organismos modelo para estudiar la regeneración, desde los invertebrados como la hidra y las planarias, hasta vertebrados como peces, anfibios, reptiles y mamíferos. Aunque es cierto que los mamíferos se distinguen de los demás por su muy limitada capacidad regenerativa, existen ciertos órganos que regeneran naturalmente, aunque con limitada eficiencia; entre ellos se encuentran la piel, los folículos pilosos, el hígado, la punta de los dígitos a edades muy tempranas y porciones de orejas. El principio sobre el que se basa el estudio de la regeneración es sencillo, consiste en causar un daño de cierta magnitud y observar si los cambios tisulares, celulares, moleculares en el sitio en cuestión corresponden a un fenómeno regenerativo.

La realización de muescas o perforaciones en las orejas de los ratones de laboratorio se ha realizado con frecuencia como método de identificación de estos animales que, además de ser fácil de realizar, aparentemente causa poco o por muy corto tiempo dolor, y así provee de un sistema de marcaje a largo plazo basado en el hecho de que, por el resto de la vida del animal la muesca o perforación no se reparará o lo hará pobremente. Sin embargo, se ha observado que, en ciertas líneas de ratones silvestres o modificados

genéticamente, estas heridas son transitorias y son reparadas en un lapso de tres a cuatro semanas, presentando una arquitectura casi normal, sin la formación de cicatriz. El prototipo de las cepas de ratón regeneradoras es la llamada MRL, utilizada frecuentemente para estudios autoinmunidad (Clark et al. 1998).

En mamíferos se realizan ensayos y técnicas cuantitativas para evaluar la regeneración; comúnmente amputando dígitos, haciendo una hepatectomía, o depilando cierta área de piel. Sin embargo, entre las más destacadas, informativas y fáciles de realizar está la perforación de la oreja pues, como se mencionó anteriormente, es un ensayo (comparado con otros) menos traumático que permite una evaluación macroscópica de la morfología del tejido en el animal (Heber-Katz 1999). Adicionalmente se pueden hacer estudios histológicos del sitio de la herida para evaluar la regeneración de cartílago, dermis, epidermis y folículos pilosos e inmunohistoquímicos para analizar procesos celulares importantes como la proliferación, marcaje celular e identificación de las moléculas que participan en estos eventos. En las líneas regeneradoras de ratones, se considera que, se ha llevado un proceso de regeneración si el nuevo tejido presenta, entre otras características, un crecimiento dermal normal acompañado por la deposición de matriz extracelular organizada, folículos pilosos, glándulas sebáceas, cartílago, similares a la exhibida antes del daño.

El ciclo celular y los oncogenes E6/E7 del VPH

Regulación del ciclo celular

El ciclo celular es un proceso finamente organizado y su progresión es regulada a través de ciertos “*puntos de control*”. Estos puntos de control se encuentran temporalmente ubicados entre las fases G1/S y G2/M donde los complejos formados entre las ciclinas y las enzimas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk: cyclin-dependent kinase) juegan un papel esencial (Malumbres & Barbacid 2009). Específicamente la progresión de la fase G1 a la S es regulada por las Cdk4 y Cdk6, las cuales se activan por la unión preferencial con las ciclinas tipo D; la formación de estos complejos promueve el estado hiperfosforilado (inactivo) a partir de uno hipofosforilado (activo) de la proteína Rb (pRb) liberando a su blanco, el factor de transcripción E2F, el cual reconoce la región promotora de varios genes con funciones relevantes en el ingreso a la fase S (e.g., las ciclinas A y E) y algunas requeridas para la replicación de DNA (e.g., las subunidades de la DNA polimerasa) (Bertoli et al. 2013). Por otro lado, el ciclo celular puede detener su progresión en los puntos de control si existe alguna anomalía que implique algún riesgo para la célula, como daño al DNA o algún tipo de

estrés. La célula progresará normalmente a través del ciclo celular si el riesgo es superado, por ejemplo, a través de mecanismos de reparación. Uno de los procesos más importantes de respuesta ante estas condiciones es mediada por la acción de p53 que, en condiciones de daño y otras señales de estrés, incrementa su concentración, estimulando así, entre otras actividades, la expresión de p21, una proteína inhibidora de Cdk (CKI, Cdk inhibitor protein) que se une a los complejos ciclina D-Cdk4 y ciclina E-Cdk2 de la fase G1/S, inhibiéndolos y contribuyendo el frenado del ciclo celular en este punto de control (He et al. 2005).

Como cualquier otra vía de señalización celular, estas vías proliferativas son susceptibles de ser alteradas. En ocasiones las alteraciones son mediadas por genes de virus como el SV40, adenovirus y papilomavirus que utilizan la maquinaria de replicación para favorecer la replicación de su propio genoma. Estos virus codifican proteínas que liberan a E2F del control inhibitorio de Rb y favorecen la inactivación de p53, lo que resulta en un ciclo celular desregulado que, en muchos casos conlleva a la generación de procesos carcinogénicos (Polager & Ginsberg 2009).

Generalidades del virus del papiloma humano

Los virus del papiloma humano (VPH) conforman un grupo de virus compuesto por más de doscientos tipos y variantes, los cuales son clasificados como de “bajo” y “alto” riesgo por su asociación con el desarrollo de carcinomas y su capacidad transformante; entre los VPHs de alto riesgo el VPH tipo 16 es frecuentemente detectado en carcinoma cérvico vaginal. Su estructura está constituida por partículas icosaédricas no envueltas, que encapsula un genoma circular de DNA de doble cadena, con un tamaño de 7096 pb. El genoma se divide en una región larga de control no codificante (LCR: Long control región); una región de genes de expresión temprana en el ciclo de vida del virus (E, Early) que incluye a E6 y E7, los dos principales oncogenes; a E1, que codifica una proteína iniciadora de la replicación, a E2, un factor de transcripción; a E4 una proteína involucrada en el ensamblaje y liberación del virión; y a E5, otro oncogén; y, por último, una región de expresión tardía (L, Late) que codifican para L1 y L2, las proteínas mayor y menor de la cápside, respectivamente (Doorbar 2006).

Desregulación del ciclo celular por los oncogenes E6 y E7 del VPH

Como describimos previamente, los oncogenes E6 y E7 del VPH pertenecen a los genes de expresión temprana. La proteína E6, esta es capaz de unirse a p53 y mediante la interacción con E6-AP (E6-associated protein), una proteína con actividad ubiquitina ligasa, tal que promueve la degradación proteosomal de p53, así evitando que se frene el ciclo celular aún en presencia de un daño crítico. Para el caso de E7, la proteína tiene una afinidad

preferencial por el estado hipofosforilado de pRb impidiendo la formación del complejo de pRb-E2F y también promoviendo su degradación, con la consecuente entrada a la fase S del ciclo celular (Moody & Laimins 2010). De esta manera E6 y E7 son capaces de promover la proliferación continua y la reentrada al ciclo de células diferenciadas o en fase G0 mediante la eliminación de puntos de control entre las fases G1 y S, lo que favorece la replicación del genoma viral e inevitablemente propicia la aparición de tejidos hiperplásicos (Herber et al. 1996) y carcinogénicos (Song et al. 1999).

La desdiferenciación celular y la desactivación de los represores maestros del ciclo celular

Del estudio de las células troncales embrionarias (ESC) derivó una observación interesante que estriba en que éstas poseen un ciclo celular peculiar; es decir, sus fases G2 y G1 son de menor duración en contraste con estadios más diferenciados (Gonzales et al. 2015; Dalton 2015). La prolongación artificial en la temporalidad de estas fases, provoca la diferenciación de las ESC, lo que indica que, el alargamiento de las mencionadas son causa de la diferenciación y no solo una consecuencia (Roccio et al. 2013). Estudios más detallados muestran que, ciertos reguladores del ciclo celular influyen sobre los procesos de diferenciación, a través de activar enzimas encargadas de fijar marcas epigenéticas en promotores de genes involucrados en establecer un compromiso celular (Singh et al. 2015). En el mismo sentido, un embrión en desarrollo que ha generado las suficientes células, debe salir del ciclo celular para permitir la diferenciación, es decir, la ausencia de división celular es una de las características asociadas a una célula totalmente diferenciada (Li & Kirschner 2014; Hindley & Philpott 2012). La reactivación del ciclo celular en células diferenciadas comúnmente desencadena procesos que lleven a la apoptosis (Frade & Ovejero-Benito 2015), pero si esto no ocurre, puede causar desdiferenciación y desencadenar el desarrollo de procesos carcinogénicos. Bajo estas premisas es factible que, con solo activar el ciclo celular, a través de la modificación de la actividad de las principales proteínas reguladoras del ciclo celular, se pueda favorecer un proceso de desdiferenciación celular.

La reprogramación celular: una forma de desdiferenciación celular

Actualmente es posible desdiferenciar artificial y extensivamente una célula hasta alcanzar un estado de pluripotencia, mediante la expresión forzada de los factores Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM), también nombrados, los factores de Yamanaka (Takahashi & Yamanaka 2006). A este fenómeno se le conoce como reprogramación celular, el cual se puede considerar como una de las formas más extremas de desdiferenciación (Merrell & Stanger

2016). A las células que alcanzan tal condición se les conoce como iPSC (induced Pluripotent Stem Cell). El proceso de generación de iPSC tiene algunos inconvenientes, pues es lento e ineficiente, típicamente de no más de 1% (sin c-Myc es menor). En este contexto se han identificado algunos factores que actúan como barreras que impiden la desdiferenciación, entre los cuales se encuentran precisamente represores del ciclo celular como pRb (Kareta et al. 2015); en presencia de los factores de reprogramación OSKM, la sola depleción de pRb en fibroblastos *in vitro*, favorece la generación de células que asemejan a las células embrionicas troncales. Un efecto similar producen otros supresores oncogénicos como: el gen maestro p53 (Guo et al. 2014) y sus efectores como p21, mir34 (Choi et al. 2011), el RNA no codificante largo lincRNAp21 (Bao et al. 2015), el regulador negativo de p53, MDM2 que, mimetiza la supresión de p53 (Hong et al. 2009), el producto del locus Ink4/Arf, p19-Arf (Utikal et al. 2009). Dado que la pérdida de función de cada uno de los anteriores genes en alguna medida incrementa la eficiencia de reprogramación, estos factores parecen estar involucrados en atenuar la adquisición del estado pluripotente.

La desdiferenciación promovida por la inactivación por supresores maestros del ciclo celular es un proceso lógico para promover regeneración y menos demandante que la reprogramación celular hacia células pluripotentes. Se ha mostrado que la reentrada a la fase S del ciclo celular de miotubos (células musculares multinucleadas terminalmente diferenciadas) se promueve por la desactivación de pRb mediante fosforilación en salamandras (Tanaka et al. 1997). Esto no sucede si es deletado pRb en miotubos de mamíferos (Camarda et al. 2004), sin embargo la síntesis de DNA, mitosis, y desdiferenciación puede provocarse si los miotubos de mamíferos se exponen a un extracto de tejidos de salamandras en regeneración (McGann et al. 2001), indicando que existen factores adicionales para que la desdiferenciación se lleve a cabo, entre los cuales destacan otros supresores tumorales que compensen la pérdida de función de pRb. En atención a esto, la atenuación de la expresión de pRb en cooperación con la atenuación de ARF, (un supresor tumoral) que impide la regeneración del pez cebra (Hesse et al. 2015), provoca la desdiferenciación de miocitos (precursores mononucleados de miotubos), pero es incompleta en miotubos, pues no logran transitar hacia la fase de mitosis debido a impedimentos estructurales (Pajcini et al. 2010). Otras estrategias involucran como primer paso el tratamiento de miotubos con mioseverina, la cual provoca su fragmentación hacia células mononucleadas, sin embargo, inmediatamente desencadenan apoptosis. La supresión de este proceso eliminando a p53 y ARF logran su proliferación y desdiferenciación (Wang et al. 2015). Otros grupos de investigación han logrado la

proliferación de cardiomiocitos lo cual está asociado con un decremento de supresores tumorales como p21 y p53 (Zhang et al. 2010).

Otros factores asociados a la regeneración

Además de los reguladores maestros del ciclo celular antes mencionados, se han descrito otros que están asociados con la permisividad o inhibición de la regeneración en diferentes organismos (Bednarek et al. 2015). Procesos metabólicos también están relacionados con el incremento de las capacidades regenerativas (Johnson & Singer 1962; Shyh-Chang et al. 2013; Zhang et al. 2015). Factores epigenéticos entre los que cabe destacar secuencias reguladoras del DNA como los “enhancers” (Kang et al. 2016) y proteínas remodeladoras de la cromatina (Sun et al. 2016) también contribuyen al control de la regeneración. La invasión (Kumar et al. 2007; Simões et al. 2014; Buckley et al. 2012), el sistema inmune (Yun et al. 2015) y factores promotores de la angiogénesis (Hacker et al. 2016; Ding et al. 2014) son importantes promotores de la regeneración. Este último toma especial interés porque además de estar involucrado en la formación de la vasculatura, su naturaleza soluble los convierte en señales extrínsecas que generan respuestas en sus células blanco como la autorenovación/diferenciación de células troncales adultas, el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos, la morfogénesis, y el metabolismo, entre otras (Rafii et al. 2016).

Participación de la angiogénesis en el desarrollo de tejidos

Angiogénesis y desarrollo embrionario

Durante las etapas tempranas del desarrollo de un individuo, cuando el embrión está conformado por apenas unas cuantas células, este puede sostener la vida obteniendo oxígeno y nutrientes del entorno, aprovechando las propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de sistemas como la difusión o el transporte. Sin embargo, conforme los estadios del desarrollo se vuelven más complejos, la masa celular aumenta provocando que, la obtención de los nutrientes y el oxígeno sea ineficiente. Aunado a esto, los desechos producto del metabolismo, son tóxicos e incrementan al mismo ritmo generando así la necesidad de liberarlos. Antes de que esto suceda, el sistema cardiovascular se empieza a desarrollar, el corazón primordial propulsa la sangre distribuyendo los nutrientes y oxígeno a los tejidos de difícil acceso, al tiempo que permite la remoción de los desechos, manteniendo vivo el embrión (Eichmann et al. 2005).

Las redes primitivas de vasos sanguíneos se forman de novo en el embrión mediante un proceso llamado vasculogénesis, anticipando los requerimientos de nutrientes y el

crecimiento del embrión; mientras que, en el adulto, los vasos sanguíneos se expanden y remodelan a partir de vasos preexistentes por un proceso denominado angiogénesis que, se induce en respuesta a la demanda metabólica del tejido, así como a condiciones de baja concentración de oxígeno (hipoxia). Una amplia gama de cambios bioquímicos, morfológicos, así como la expresión de genes que codifican para diversos factores proteínicos, ocurren durante el proceso angiogénico (Drake 2003). Dentro de estos, se han descrito algunos como el Factor inducible por hipoxia (Hif1 α), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), Folistatina (Fst), las angiopoyetinas (Ang), (Otrock et al. 2007), y proteínas similares (AGF) (Oike et al. 2004), entre otros.

De acuerdo con su tamaño, los vasos sanguíneos se dividen en cinco categorías arterias/venas, arteriolas/vénulas y capilares. Estos últimos son de menor tamaño, comunican el sistema arterial compuesto por arteriolas, rico en nutrientes/oxígeno y al sistema venoso constituido por vénulas, con características opuestas a las primeras. Mientras que las arterias/venas y las arteriolas/vénulas son conductos complejos que contienen varias capas de tejido celular y fibroso, los capilares son de menor calibre y constituidas solamente de la capa más interna de tejido llamada túnica íntima, recubierta a lo largo del lumen, por una capa de células endoteliales. Por otro lado, toda esta red vascular no siempre es estable; las células que las componen están sujetas a fenómenos de supervivencia, especialización y remodelamiento de acuerdo a las condiciones en las que se encuentre (Potente et al. 2011). Un refinado equilibrio entre moléculas estimuladoras e inhibitoras de la angiogénesis se manifiesta durante el proceso que, mecánicamente se inicia con la vasodilatación e incremento de la permeabilidad de las células endoteliales, prosigue con la proliferación-migración de dichas células y, finalmente, con la formación del lumen.

Angiogénesis y regeneración

De la misma manera en que la angiogénesis es un proceso importante para una embriogénesis exitosa, también es indispensable cuando un tejido lleva a cabo reparación a consecuencia de una herida, ya que aceleran dicho proceso y orquestan la morfogénesis de los tejidos o la diferenciación celular. Es importante resaltar que los conductos del sistema vascular no están limitados al transporte y liberación pasiva de sustancias (Ramasamy et al. 2015), al grado que la formación de nuevos vasos sanguíneos es un prerrequisito para llevar a cabo cicatrización o un proceso regenerativo facilitando no solo el suministro de nutrientes, líquido, oxígeno, sino también de hormonas, citocinas, y/o factores de crecimiento a las

áreas metabólicamente activas de los tejidos en crecimiento. Nuevos capilares se producen principalmente debido a la migración y ramificación de células endoteliales, posteriormente algunos de estos madurarán para dar a lugar a una vasculatura estable. Ciertos estudios se han encaminado a incrementar la regeneración a través del trasplante de células troncales modificadas genéticamente, para expresar transitoriamente VEGF, mismo que, genera un ambiente angiogénico e incrementa la supervivencia de las células antes mencionadas (Cho et al. 2016). Siguiendo el mismo modelo de daño y utilizando estrategias libres de células, se ha observado regeneración mediada por angiogénesis, al administrar exosomas que liberan moléculas proangiogénicas como el PDGF-D (Platelet-Derived Growth Factor D) (Ma et al. 2016). Otros han hecho lo propio en piel dañada por quemaduras, al exponer el tejido a secretomas “angiogénicos”, es decir, al conjunto de factores solubles citoprotectores y pro-angiogénicos generados por células sanguíneas cultivados in vitro (Hacker et al. 2016).

Angiogénesis y cáncer

La angiogénesis es un componente crucial en el desarrollo y mantenimiento de los tejidos. Su desregulación, ya sea por incremento o decremento, está implicado en la progresión de ciertas patologías (Chung & Ferrara 2011). Por ejemplo, durante el desarrollo de un tumor, las células más internas están sometidas a un estrés por la falta de oxígeno y nutrientes. Frente a esta situación, las células desencadenan procesos adaptativos para no morir y en muchas instancias estos procesos son mediados por HIF-1 (Hypoxia-inducible factor 1), un factor de transcripción maestro implicado en la regulación del metabolismo, metástasis cancerosa y angiogénesis. HIF-1 es degradado cuando la concentración de oxígeno es alta y su acumulación activa la expresión entre otros, de genes proangiogénicos, como VEGF (Yang et al. 2013). Por consiguiente, existe un aumento de la vasculatura, necesario para que el tumor crezca y, en ciertas situaciones, favorecer la metástasis. Por tanto, la administración de drogas antiangiogénicas limitan el crecimiento tumoral (Vasudev & Reynolds 2014), consecuencia de la importante demanda de energía y compuestos base que exige la síntesis de macromoléculas durante la proliferación celular. Es de esperarse que en los tejidos en regeneración y en la embriogénesis, también la angiogénesis sea un proceso limitante.

Modelos transgénicos generados con sistemas moleculares de expresión inducible

Actualmente es posible modificar el genoma y su regulación de prácticamente cualquier organismo, mediante tecnologías cada vez más poderosas. La función de muchos genes en

un ser vivo desarrollado se ha dilucidado mediante una idea muy sencilla, introducir una mutación para desactivarlo o eliminar gen por completo. Sin embargo, ciertos genes resultan ser esenciales para el desarrollo temprano, lo que desencadena la muerte o la generación de anomalías que pronto terminan con la vida del organismo en cuestión, con el consecuente impedimento de poder llevar a cabo estudios posteriores. Con el desarrollo de nuevas tecnologías este problema se vio superado ya que, es posible suprimir un gen en cualquier etapa del desarrollo mediante el sistema Cre-lox (Green & Ried 2012). Más recientemente se ha desarrollado el sistema CRISPR-Cas9 con un espectro más amplio de aplicaciones (Barrangou & Doudna 2016).

Por otro lado, es posible insertar un gen y estudiar su función cuando se expresa ectópicamente o en tiempos diferentes a los normales. Uno de los sistemas que ha ganado mayor preferencia en la investigación de eucariotas, es el sistema de expresión inducible mediado por tetraciclina, cuyos componentes se han modificado a partir del operón de resistencia a tetraciclina presente en *E. coli*. Este operón consta de una proteína represora llamada Tet-R que, al formar un complejo con las tetraciclinas, disminuye su afinidad por la secuencia operadora TetO, permitiendo la expresión de la proteína de resistencia Tet-A (Orth et al. 2000). El sistema de expresión inducible mediado por tetraciclina tiene dos variantes Tet-Off y Tet-On. El primero utiliza la proteína tTA producto de la fusión del represor Tet-R con el dominio activador de la proteína VP16 del virus Herpes simple. La proteína resultante tTA, tiene una elevada afinidad por el elemento de respuesta a tetraciclina (TRE), compuesto de varios repetidos de la secuencia TetO río abajo de un promotor mínimo. El complejo tetraciclina-tTA tiende a ser incapaz de unirse al TRE y, por tanto, no puede activar la expresión de los genes río abajo del TRE (Gossen & Bujard 1992). El sistema Tet-ON, por el contrario, es capaz de inducir la expresión de los productos génicos río abajo del TRE, si existe un complejo entre el denominado transactivador reverso de tetraciclina (rtTA) y la tetraciclina.

Un modelo mamífero de estudio basado en el sistema Tet-On poseen varias ventajas sobre otros sistemas de expresión condicionales como el Cre (Cyclization recombination), FRT (Flippase recognition target) y sistemas inducibles por estrógenos. Los sistemas Cre y FRT no son reversibles, mientras que la administración de estrógenos puede tener efectos indeseables sobre el organismo en cuestión.

Existen diversas técnicas para generar mamíferos transgénicos, dos son las más utilizadas. En una se transfecta el DNA deseado en células troncales embrionarias crecidas en cultivo, para después inyectarlas en un blastocisto o cigoto el cual seguirá su desarrollo

hasta la formación un roedor quimérico. Si las células modificadas contribuyen a la línea germinal, se podrán obtener los ratones deseados en subsecuentes generaciones (Hu et al. 2013). La otra estrategia se realiza inyectado el DNA linearizado dentro de uno de los pronúcleos de un ovocito fertilizado. Los cigotos son entonces depositados dentro de una ratona pseudopreñada donde terminan su desarrollo. Sin embargo, la inserción del DNA de forma espontánea al genoma de la célula receptora es azarosa, poco eficiente y está sujeta a la influencia de regiones reguladoras y factores epigenéticos en las inmediaciones del sitio de integración de los transgenes (Vaisman 2013). Otros sistemas utilizan vectores virales y transposones para hacer llegar el material génico al núcleo. En particular los sistemas basados en el transposón PiggyBac poseen varias ventajas sobre los demás (Woodard & Wilson 2015). Mediante la catálisis de una transposasa, el transposón PiggyBac se inserta dentro del genoma por un mecanismo de “corte y pegado” en sitios TTAA. La frecuencia de inserción mejora significativamente y mayoritariamente en regiones intergénicas e intrones (Li et al. 2016).

Crear un modelo transgénico generado a partir de un sistema inducible dentro de un vector PiggyBac, permite en principio obtener un sistema poderoso y eficiente con el que modelar diversos fenómenos biológicos, en especial aquellos que se requieran de forma transitoria de ganancia o pérdida de función, como podría ser durante la formación del blastema en la regeneración.

Antecedentes

Existen distintos organismos modelo para estudiar la regeneración. Todos normalmente varían en su capacidad y naturaleza para regenerar; los hay desde invertebrados, pasando por los anfibios hasta los mamíferos. Éstos últimos se distinguen de los demás por su limitada capacidad regenerativa. El incremento de esta habilidad en ratones se puede valorar mediante la determinación del cerrado de una perforación de la oreja; es un ensayo poco traumático que permite una evaluación macroscópica a lo largo del tiempo y microscópica para evaluar la formación *de novo* de cartílago, dermis, epidermis y folículos pilosos, estructuras esperadas de un proceso de regeneración epimórfica.

Diversos estudios han mostrado que existe una relación entre los fenómenos de angiogénesis y reparación de heridas mediado por la expresión de factores proangiogénicos. Por ejemplo, ratones que fueron tratados sistémica o tópicamente con la proteína COMP-Ang1 (cartilage oligomeric matrix protein-angiopoietin 1), una forma soluble, estable y potente de la angiopoyetina 1, mostraron un aumento de la angiogénesis y sanación después de la perforación de la oreja; lo mismo sucedió en heridas realizadas en la cola de ratones diabéticos (Cho et al. 2006). Otro reporte similar, relaciona los efectos de la angiopoyetina 1 con el aumento de la angiogénesis, así como una mayor sanación de heridas en la oreja (Jeansson et al. 2011). Sin embargo, en el último estudio mencionado el proceso de sanación fue debido principalmente a fenómenos cicatrizantes puesto que, el cartílago y los folículos pilosos no se regeneraron además de que, se evidenció una abundante presencia de fibras de colágeno, característica típica de una cicatrización.

En un estudio adicional, se aplicaron directamente en la vena principal de la oreja de ratones, plásmidos con los genes phVEGF (VEGF, Vascular endothelial growth factor) o phNGF, que permiten la producción de isoformas del VEGF y del factor de crecimiento nervioso (NGF, Nerve growth factor) respectivamente. Ambos plásmidos promovieron una mejor regeneración que los animales control pero, en el caso de phVEGF, el efecto fue mayor respecto al obtenido por el tratamiento con phNGF; se especula que esto se debió a un incremento en la angiogénesis, y la menor potencia con phNGF se asocia a un aumento en la respuesta inflamatoria (Kolostova et al. 2012). Además el VEGF se expresa en la epidermis predominantemente en los queratinocitos y en los folículos pilosos (Kishimoto et al. 2000) y promueve la cicatrización de orejas de conejo inducida por isquemia (Corral et al. 1999) mostrando que al favorecer la angiogénesis también se favorece el proceso regenerativo.

En un paradigma experimental más robusto, se sobre expresó un gen relacionado a la angiopoyetina (AGF: Angipoietin-related growth factor), una proteína angiogénica similar a la angiopoyetina pero que no se une a los mismos receptores Tie1 y Tie2 (Oike et al. 2004). La expresión de AGF bajo el promotor de la citoqueratina 14 (K14) promueve la migración y proliferación de queratinocitos, cubriendo así el sitio de la herida rápidamente y, aunque en este reporte no se evalúa la regeneración a detalle, las determinaciones histológicas de las orejas perforadas muestran un número mayor de vasos sanguíneos, de tejido conectivo y cartílago en la nueva zona de crecimiento, lo que corresponde claramente a un fenómeno de regeneración (Oike et al. 2003).

Otro modelo de regeneración en mamíferos está relacionado en su mayor parte con la modificación de una vía de señalización intracelular, más que con factores extrínsecos a la célula. Por ejemplo, en ratones a los que se les ha deletado p21, se observa un fenotipo regenerativo en la oreja, lo que parece deberse a una mayor proliferación celular (Arthur et al. 2010).

En concordancia con lo anterior, y dadas las características que las proteínas E6/E7 del VPH tienen al intervenir con el ciclo celular teniendo como blanco las proteínas moduladoras pRb y p53, en nuestro grupo de trabajo se generó una línea de ratones transgénicos que expresan E6/E7 del VPH tipo 16 bajo el promotor de la citoqueratina bovina 6b, formalmente denominados Tg(bK6-E6/E7) (Escalante-Alcalde et al. 2000). Se consideraron tres aspectos para la elección del promotor que dirigiría la expresión de los oncogenes E6/E7 en este ratón; primero, porque la expresión del gen que codifica para citoqueratina bovina 6b (bK6) se induce en respuesta a la aplicación de esteres de forbol, ácido retinoico así como en respuesta a daño (Rothnagel et al. 1999), que son factores promotores de la regeneración epidérmica; segundo, la bK6 se asocia a la proliferación de queratinocitos (Bernerd et al., 1993) y; tercero, los tejidos donde se expresa la bK6 coinciden con los sitios donde se detecta actividad de la región LCR (Long Control Región) del VPH en ratones transgénicos (Cid et al. 1993). Los ratones transgénicos Tg(bK6-E6/E7) no mostraron ningún patrón tumoral aparente como pudiera esperarse. Sin embargo, presentan una alta incidencia de muerte, principalmente los machos a edad temprana (2 meses de edad); desconocemos con precisión la causa de muerte, pero parece estar asociada con la degeneración del riñón. Los animales que lograron pasar esta edad, mostraron un aumento en las capacidades regenerativas respecto al control, que se evidenció por la reparación del daño en la oreja, la formación de folículos pilosos, glándulas sebáceas y cartílago en el área de crecimiento (Escalante-Alcalde et al. 2000; Valencia et al. 2008). La elevada capacidad

regenerativa correlacionó con un incremento en la proliferación de las células epidermicas, así como en la velocidad con las que estas migraron hacia el borde de la lesión. Adicionalmente, se encontró un mayor número de células troncales epidermicas. Es interesante que las hembras respecto a los machos regeneraron en mayor medida; este efecto parece estar mediado por factores adicionales como las hormonas sexuales. Estudios recientes mostraron que el estradiol favorece la regeneración mientras que la testosterona parece disminuirla (García et al. 2017). En relación con el último modelo referido, es importante mencionar que el estradiol pertenece a la familia de biomoléculas llamados estrógenos, a los que se les ha reportado entre otras funciones, que son inductores de la angiogénesis. Estudios *in vitro* indican que, los oncogenes E6/E7 inducen la expresión de VEGF que, es un potente factor angiogénico (Tang et al. 2007); así como de SDF-1, una quimiocina implicada también en angiogénesis (Yamada et al. 2015) y regeneración de los dígitos (Lee et al. 2013). Naturalmente, la angiogénesis es una característica distintiva de los tejidos en regeneración ya que, la vasculatura funciona como una vía para contender con el incremento metabólico de las células en proliferación, promover la infiltración de otras células que, son fuente de factores de crecimiento y diferenciación, lo que finalmente podría favorecer el aumento de la masa celular contenida en el blastema y los procesos morfogénicos asociados, resultando finalmente en un incremento en la eficiencia de regeneración. Adicionalmente, en otros modelos de regeneración en mamíferos, como el ratón de vida silvestre *Acomys*, se ha observado una abundante presencia de vasos sanguíneos en el área lesionada (Matias Santos et al. 2016).

La regeneración es un proceso complejo que involucra la participación de diversos factores, algunos podrían contribuir solo en cierto momento y/o en ciertos lugares, por lo que lograr dilucidar su dinámica y discernir aquellos que son esenciales o limitantes, llevaría a establecer intervenciones oportunas, para potencializar la capacidad regenerativa en los mamíferos.

Justificación

Un modelo de regeneración mamífero ideal debe tener ciertas características, las cuales corresponden con la dinámica presente en los organismos hiper-regeneradores como las salamandras. Estas características incluyen: (1) El estímulo proliferativo que genera el blastema, debe ser transitorio. La presencia sostenida de este aumenta considerablemente la probabilidad de desencadenar eventos contraproducentes, como el cáncer. (2) Debe contarse con la variedad de precursores celulares necesarios para producir todos los tipos celulares que constituyen los tejidos de una estructura compleja. Estos precursores podrían preexistir en especies regeneradoras, sin embargo, se ha mostrado que, para contar con el número de precursores requeridos, durante la formación del blastema se activa un proceso de desdiferenciación. Recientemente se ha mostrado que, durante la carcinogénesis, la desdiferenciación puede contribuir al origen de las células cancerosas. Y, por último, (3) el estímulo debe ocurrir localmente, tal que los tejidos no dañados estén sujetos a un estímulo innecesario que puede causar alteraciones a largo plazo. Ninguno de los modelos actuales de regeneración en mamíferos se ha mostrado que cumple con el esquema antes mencionado. En particular, pese a la capacidad regenerativa de los ratones Tg(bK6-E6/E7), la inducción de los oncogenes está restringida a las capas suprabasales de la epidermis, por lo que se ha sugerido que la influencia en la regeneración se relaciona principalmente con el cerrado de la herida. No obstante, lo anterior, en estos ratones también es notable una influencia en el crecimiento durante la regeneración, pero dada la restricción de la expresión de los oncogenes, no todos los tipos celulares requeridos para una regeneración eficiente pueden haber aumentado para promover una regeneración completa. Por otro lado, E6/E7 también se expresa sin necesidad de daño en los folículos pilosos lo que genera un fenotipo de poco pelo, si bien en comparación con otros transgénicos similares, la epidermis en general no muestra alteraciones. Estos animales también mueren a una relativa alta frecuencia, sin que aún se conozca la causa, pero que complica la realización de experimentos.

Esta propuesta tiene como fin resolver aquellos aspectos que pueden limitar la capacidad de regeneración. Por un lado, para incrementar la capacidad de proliferación se ampliará el espectro de expresión de los oncogenes en el tejido en regeneración, pero manteniendo su inducibilidad. Esta misma ampliación del espectro de expresión haría posible la reentrada al ciclo celular y activar un mecanismo de desdiferenciación, como se mencionó anteriormente. Por otro lado, considerando que, como en el cáncer, la

angiogénesis puede ser un factor limitante en el crecimiento de un tejido, proponemos incrementarla mediante la expresión del AGF, un factor angiogénico que previamente a mostrado incrementar la capacidad regenerativa.

Tomando en cuenta lo anterior, desarrollamos un sistema de expresión inducible que nos permitirá generar ratones transgénicos que cumplan con las tres características antes descritas. El sistema está basado en el sistema Tet-On contenido dentro de un transposon PiggyBac. Este sistema inducirá de manera robusta la expresión de los oncogenes E6/E7 o AGF en presencia de doxíciclina. El arreglo en el transposón a probar permitirá no solo mejores niveles de expresión, sino también menores dosis de doxíciclina, lo que favorecerá estudios *in vivo*. Además de un significativo incremento en la eficiencia de transgénesis con el transposón, otra característica respecto a otros sistemas para producir ratones transgénicos es que solo se inserta una copia, preferencialmente en regiones ricas en AT, y el mecanismo no produce re-arreglos cromosómicos. La combinación de estos elementos contribuye a dar lugar a bajos niveles de expresión basal del gen de interés, y alta probabilidad de expresión ubicua en presencia del inductor doxíciclina. De esta forma, todos los tejidos del ratón transgénico generado deberán potencialmente tener la capacidad de inducir la expresión de los genes E6/E7 o AGF solo en presencia de doxíciclina, con lo que se cumpliría el primer y segundo punto. Para cumplir con el tercer punto, es posible administrar localmente la doxíciclina en el sitio de daño. El efecto cooperativo en E6/E7 y AGF se observaría al inducir ambos genes en un mismo organismo.

Hipótesis

Factores promotores de la angiogénesis cooperan con los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano para promover la regeneración de la oreja del ratón.

Objetivo general

Determinar si existe cooperación entre factores promotores de la angiogénesis y los oncogenes E6/E7 del virus del papiloma humano en el proceso regenerativo de la oreja del ratón.

Objetivos particulares

- Analizar la expresión de factores proangiogénicos durante la regeneración de la oreja en ratones silvestres y Tg(bK6-E6/E7).
- Evaluar la capacidad regenerativa de la oreja de ratones silvestres y Tg(bK6-E6/E7) en presencia o ausencia de ciclosporina A.
- Desarrollar vectores que expresen de forma inducible los oncogenes E6/E7 o el AGF.
- Desarrollar una línea de células troncales embriónicas que exprese de forma inducible los oncogenes E6/E7.
- Generar ratones transgénicos que expresen ubicuamente los genes E6/E7, AGF y ambos.

Materiales y métodos

Animales

Se utilizaron ratones hembra silvestres y Tg(bK6-E6/E7) de la cepa CD1 de 3 meses de edad. Mismos que fueron mantenidos en condiciones de luz-obscuridad (12-12) y alimentados *ad libitum* en las instalaciones del bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM. El comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM aprobó todos los procedimientos de manejo de los animales utilizados.

Genotipificación

Para la extracción de DNA genómico a partir de la cola del ratón se colocó un pequeño fragmento de esta en un tubo de 0.6 ml (se puede congelar inmediatamente a -70 °C si la extracción no se lleva a cabo inmediatamente después de colectar el tejido). Se adicionaron 50 µL del buffer de lisis 1X por colita, e incubó 20 minutos a 95 °C. El buffer de lisis 10X (10 ml) contiene: Tris-HCl 1M pH8: 1 ml, KCl 1M: 5 ml, 10% Tween 20: 1 ml, H₂O: 3 ml. (Este buffer se puede mantener a 4 °C por meses. Al diluir a 1X con agua se debe utilizar en el lapso de dos semanas). Se dejó enfriar a temperatura ambiente, luego se adicionó 2.5 uL de proteinasa K (10mg/ml; Invitrogen Cat.: 25530-015) e incubó 5 horas a 55 °C a 350 rpm en un termomixer. Se dio vortex e incubó a 95°C por 5 min. Se centrifugó a velocidad máxima en una microcentrífuga por 20 min a 4 °C. Se recolectó el sobrenadante el cual contiene el DNA genómico. Se utilizó 1 µL para llevar a cabo la amplificación de E7 mediante PCR, en un volumen total de 10 µL. El DNA genómico puede ser almacenado a -20°C para futuras determinaciones.

Extracción de RNA

Extracción de RNA de orejas de ratón: Para los análisis de expresión génica de factores pro-angiogénicos en orejas de ratón, se hicieron tres perforaciones de 2mm en una oreja de hembras silvestres o transgénicas Tg(bK6-E6/E7) de 3 meses de edad con un instrumento metálico (Harris-Punch). Al cabo de 7 días fueron sacrificados y ambas orejas fueron recolectadas. El RNA se extrajo utilizando el estuche comercial Hybrid-R™ de GeneAll®, mediante congelamiento y pulverización del tejido con nitrógeno líquido en un mortero, una vez pulverizado el tejido se pasó a un tubo, al cual se le agregó 1 mL de RiboEx™ y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, se le agregó 0.2 mL de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, incubándose 2 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12 000 x g por 15 minutos a 4 °C, la fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo.

Luego se le adicionó un volumen del buffer RBI y se mezcló por inversión. Se tomaron 700 μL de la mezcla y se depositó en una columna la cual se centrifugó a 10 000 x g, por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó la solución filtrada. A la columna se le adicionaron 500 μL de buffer SWI y se centrifugó 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó la solución filtrada. La misma se lavó con 500 μL del buffer RNW centrifugando nuevamente a 10 000 x g por 30 segundos a temperatura ambiente, se descartó la solución filtrada. Para eliminar residuos, se realizó un centrifugado adicional en las mismas condiciones, por un minuto. La columna se depositó dentro de un tubo de 1.5 mL nuevo, adicionándose 30 μL de agua libre de RNAasa en el centro de la columna, se dejó reposar por un minuto para su posteriormente recolectar el líquido que se llevó a cabo por centrifugado a 10 000 x g por un minuto. La concentración de RNA se midió en un nanofotómetro IMPLEN NanoPhotometer® Pearl. Se verificó la integridad del RNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 2 %. Se descartó la presencia de DNA genómico por la falta de amplificación del gen Rplp0 mediante PCR. Las muestras se almacenaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior utilización.

Extracción de RNA de hígado: Se pesaron aproximadamente 100 mg del tejido (de un ratón macho adulto de la cepa CD1), se trituró con mortero y pistilo en nitrógeno líquido, una vez evaporado se le agregó al tejido pulverizado 1 mL de solución RiboEx™ y se trituró nuevamente con el pistilo y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, la suspensión resultante se transfirió a un tubo centrifugándose a 12 000 x g por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un nuevo tubo, al que se le adicionó 0.2 mL de cloroformo, luego se agito 15 segundos e incubó 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12 000 x g durante 15 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para después transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionó 0.4 mL de alcohol isopropílico y 0.1 mL de la solución de precipitación de polisacáridos (0.8 M de citrato de sodio y 1.2 M de NaCl) luego se mezcló por inversión 3 a 5 veces llevándose a incubación 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar 12 000 x g 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y descartar el sobrenadante, se adicionó 1 mL de etanol al 75% para lavar la pastilla formada, se centrifugó de nuevo a 7 500 x g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, se secó la pastilla al aire libre por 5 minutos disolviendo el RNA en agua DEPC a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. La concentración de RNA y la integridad del mismo se determinó como se describió previamente.

Extracción de RNA de células HEK 293 y W9.5-E6/E7 crecidas en monocapa: Células crecidas a en un pocillo de 9 cm^2 (Placa de 6 pocillos) les fue retirado el medio de cultivo, se les agregó directamente 1 mL de solución RiboEx™, homogenizándose mediante

pipeteo. Posteriormente se incubó 5 minutos a temperatura ambiente, la suspensión resultante se transfirió a un tubo al que se le adicionó 0.2 mL de cloroformo, luego se agitó 15 segundos e incubó 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 12 000 x g durante 15 minutos a 4 °C para después transferir la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionó 0.5 mL de alcohol isopropílico luego se mezcló por inversión 3 a 5 veces llevándose a incubación 10 minutos a temperatura ambiente, para después centrifugar 12 000 x g 10 minutos a 4 °C y descartar el sobrenadante, se adicionó 1 mL de etanol al 75% para lavar la pastilla formada, se centrifugó de nuevo a 7 500 x g por 5 minutos y se descartó el sobrenadante, se secó la pastilla al aire libre por 5 minutos disolviendo el RNA en agua DEPC a 56° C. La concentración de RNA y la integridad del mismo se determinó como se describió previamente.

Reacción de retrotranscripción

Se utilizó el estuche comercial de retrotranscripción Cloned AMV reverse transcriptase No. de catálogo 601-100 de Gene All®. Se preparó una mezcla que contenía (1) Oligo random (250 ng/ µL) u oligo dT (500 µg/mL): 1 µL, (2) RNA: 0.5 µg, (3) dNTPs: 1 µL, (4) Agua: cuanto baste para 15.5 µL. Esta mezcla se calentó en un termociclador a 65 °C, 5 minutos, colocando inmediatamente después en baño de hielo. Luego se agregaron los siguientes componentes (1) 5x cDNA Buffer: 2 µL, (2) 0.1 M DTT: 2 µL, (3) HyperScript Reverse Transcriptase: 0.5 µL. La mezcla final se incubó por 25 °C por 5 minutos, 55 °C por 60 minutos y 85 °C 5 minutos. El cDNA resultante se almacenó -70 °C hasta su utilización.

PCR y qPCR

Las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR: Polymerase chain reaction) se realizaron en un volumen total de 15 µL utilizando la siguiente mezcla: (1) Agua: 11.04 µL, (2) Buffer 10X: 1.5 µL, (3) dNTPs 0.3 µL, (4) DNA: 1.5 µL, (5) Oligo sentido 0.3 µL, (6) Oligo antisentido: 0.3 µL, (7) Taq polimerasa Roche: 0.06 µL. De acuerdo con las necesidades de los ensayos, el volumen final en algunos casos fue modificado, pero siempre respetando las proporciones de los componentes.

Para medir la expresión de genes por PCR cuantitativo (qPCR), se utilizó el sistema: Rotor-Gene Q 2plex HRM Platform. Las reacciones se realizaron por duplicado y cada reacción contenía los siguientes componentes: 1µL de cDNA, 0.2 µL de oligonucleótidos 10 mM (Tabla 1), 3.8 µL de agua y 5 µL de la mezcla maestra del estuche comercial KAPA SYBR FAST Universal qPCR Kit. Las condiciones de termociclado fueron: Activación inicial de 95°C por 3 min, y 40 ciclos de 95°C por 5s, 60°C por 20s (La adquisición de la señal de

fluorescencia se llevó en este último paso). La recolección de datos y análisis del valor Ct (Threshold cycle) se llevaron a cabo con el software Rotor Gene Q-Pure Detection versión 2.1.0. Se utilizó el gen Rplp0 como gen de referencia. Para calcular el cambio de expresión de los diferentes factores proangiogénicos entre tratamientos, se utilizó el método $\Delta\Delta Ct$.

Tabla 1. Lista de oligonucleótidos utilizados

Nombre	Dirección	Secuencia 5'3'	Tm (°C)	Uso
FwE6E7Kozak	Sentido	CGTCGGATCCGCCACCATGCACCAAAAGAGAACTGCAA	60	Amplificación de los genes E6/E7
RvE6E7Kozak	Antisentido	CCATGCTCGAGTACTGCAGGATCAGCCATGGTAGAT		utilizando como molde el plásmido pKS(+)E6/E7
FwrAGFBamHI	Sentido	CGTCGGATCCGCCACCATGGGGACCGCCAGGCTA	63	Amplificación del gen AGF
RevAGFXhoI	Antisentido	CCATGCTCGAGTCACAAGCGCACAAAGCCGGGTCAAC		utilizando como molde cDNA de hígado de ratón.
AGF424Fwr	Sentido	GCACAGTCTCACCTGAACA	60	Amplificación de un fragmento del gen AGF
AGF424Rev	Antisentido	TGTGGGCAGCAGAGAAGAT		utilizando como molde cDNA de células HEK293 y W9.5.
E6	Sentido	TTTTATGCACCAAAAGAGAACTG	57	Secuenciación Amplificación del gen E6, utilizando

E6	Antisentido	GTATCTCCATGCATGATTACAG		como molde DNA genómico del Tg(bK6- E6/E7) o cDNA de células HEK293 y W9.5.
E7	Sentido	CTCGGATCGATACCCAGCTGTAATCATGCATG		Amplificación del gen E6 utilizando
E7	Antisentido	CTCATCGATTACCTGCAGGATCAGCCATG	57	como molde DNA genómico del Tg(bK6- E6/E7)
Rplp0	Sentido	CACTGGTCTAGGACCCGAGAA		qPCR. Gen de referencia.
Rplp0	Antisentido	AGGGGGAGATGTTTCAGCATGT	60	
AgfFwr172	Sentido	TCGTGTAGTAGCCGTGTGGTGT		qPCR
AgfRev172	Antisentido	CACCTGATGCACAGTTCCA	60	
FstFwr94	Sentido	CTGAGAAAGGCCACCTGCTT		qPCR
FstRev94	Antisentido	CACACTGGATATCTTCACAGGACT	60	
Hif1aFwr97	Sentido	TTCTCAGTCGACACAGCCTC		qPCR
Hif1aRev97	Antisentido	GAGCGGCCCAAAGTTCTTC	60	
VegfaFwr85	Sentido	AACGATGAAGCCCTGGAGTG		qPCR
			60	

VegfaRev85	Antisentido	GCTGGCTTTGGTGAGGTTTG	
pPGK	Antisentido	GCGCCTACCGGTGGATGTGGAATG	60

Secuenciación
tomando
como molde el
transposón PB

Ensayo de regeneración

Para analizar la regeneración de la oreja de los ratones se hizo una perforación de 2 mm de diámetro con un artefacto metálico (Harris punch) en el centro de la oreja, entre las dos venas principales de hembras silvestres y transgénicas Tg(bK6-E6/E7) de 3 meses de edad, anestesiadas con Avertina al 2.5% (15 µL por g de peso corporal). Ambos grupos de ratonas recibieron intraperitonealmente Sandimmun Neoral® (100mg/mL) de Novartis (20 mg/kg de peso), este fue diluido 1:20 en agua inyectable (PiSA®) a lo largo del experimento de regeneración. Al término de las 4 semanas, las perforaciones fueron medidas con una microreglilla bajo el microscopio de disección. El porcentaje de regeneración fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de regeneración} = 100 - \left(100 \frac{\text{Área no regenerada}}{\text{Área cortada}} \right)$$

$$R = 100 - \left(100 \frac{\pi r_1^2}{\pi r_2^2} \right)$$

Y la clasificación del porcentaje de regeneración se hizo utilizando la siguiente tabla:

Tabla 2. Porcentaje de regeneración de orejas de ratón

Diámetro Medido	Radio	Porcentaje de Regeneración	Clasificación
2	1	0	
1.9	0.95	9.7	Menor a 30%
1.8	0.9	19	
1.7	0.85	30	
1.6	0.8	36.3	Entre 30% y 60%
1.5	0.75	44	
1.4	0.7	51.2	
1.3	0.65	57.9	
1.2	0.6	64	Entre 61% y 90%

1.1	0.55	69	
1	0.5	75.2	
0.9	0.45	80	
0.8	0.4	84	
0.7	0.35	87.9	
0.6	0.3	91	
0.5	0.25	94	
0.4	0.2	96	
0.3	0.15	97.7	Mayor a 90%
0.2	0.1	99	
0.1	0.05	99.7	
0	0	100	

Histoquímica

Las orejas disectadas fueron fijadas con solución de paraformaldehído 4%, sacarosa 30% y mantenidas a 4°C. Después de embeber las orejas en Tissue-Tek®, fueron congeladas en hielo seco, luego se realizaron cortes seriados en un criostato LEICA CM1850 a -30°C. La tinción de hematoxilina-eosina de dichos cortes se desarrolló con el siguiente protocolo de lavados: Agua de grifo 5 minutos, hematoxilina 2 minutos, agua destilada 5 minutos, agua de grifo 5 minutos, etanol al 50% 3 minutos, etanol al 70% 3 minutos, eosina 1 minuto, etanol 96% 5 minutos, etanol absoluto 3 minutos, sustituto de xileno 5 minutos, cubrir los cortes con resina para cubreobjetos.

Digestiones de DNA plasmídico

Las reacciones de digestión de DNA se llevaron a cabo en un volumen total de 15 µL siguiendo las instrucciones del fabricante. La mezcla de reacción contenía (1) DNA, (2) solución amortiguadora (buffer), (3) agua y (4) enzima de restricción, misma que fue agregada al final en cada mezcla de digestión. Las cantidades de cada componente varió para cada reacción y fue dependiente de las necesidades de cada experimento. Para lograr digestiones eficientes utilizamos siempre DNA libre de contaminantes.

Ligación de DNA

Se utilizó la enzima ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific No. De catálogo #EL0013). Para realizar los cálculos de las cantidades de DNA a ligar utilizamos la siguiente formula:

$$\frac{(cV)(tl)}{(tV)} \times \frac{I}{V} = cl$$

Donde:

cV= Cantidad de vector en nanogramos.

tl= Tamaño del inserto en kilobases.

tV= Tamaño del vector en kilobases.

I= Moléculas de inserto (Comúnmente 2).

V= Moléculas de vector (Comúnmente 1).

cl= Cantidad de inserto

Las mezclas de reacción se llevaron a cabo en un volumen final de 10 µL con los siguientes componentes (1) DNA del vector, (2) DNA del inserto, (3) Buffer 10X, (4) Agua, (5) Ligasa T4. Se utilizó siempre una cantidad de 100 ng de vector y 0.5 µL de ligasa T4 para el volumen final antes mencionado. Los volúmenes de los demás componentes variaron de acuerdo con las condiciones y requerimientos experimentales. Una vez hecha la mezcla la reacción se incubó a temperatura ambiente por espacio de 3 horas.

Transformación de bacterias por choque térmico

Para realizar el proceso de transformación bacteriana, tomamos 2 µL de la reacción de ligación y los colocamos en tubos que contenían bacterias competentes de la cepa *E. coli* DH10B o DH5α, los mismos que incubamos en hielo por 30 minutos para posteriormente dar un choque térmico a 42 °C por 40 segundos, luego incubamos 2 minutos más en hielo. Al terminar este tiempo se le agregó medio Luria cuanto baste para 1 mL e incubamos por 1 hora en agitación (400 rpm/min). Posteriormente centrifugamos 1 minuto a 3000 rpm, retiramos 650 µL de sobrenadante y resuspendimos la pastilla en los 350 µL restantes. De estos se distribuyeron 100 y 200 µL con un asa triangular de metal en dos placas de agar-Luria con ampicilina (200 µg/mL). Estas se incubaron por 12 horas a 37 °C para al paso de ese tiempo obtener las colonias.

Extracción de DNA plasmídico

Para extraer los presuntos plásmidos PB-E6/E7, PB-AGF y otros, resultado de las transformaciones realizadas, se utilizó el siguiente protocolo. De las placas de agar-Luria se seleccionaron colonias y con un asa estéril se colectaron para sumergirlas en tubos con 1.5

mL de medio Luria con ampicilina (200 µg/mL). Los que se incubaron 10 horas a 37 °C. Posteriormente depositamos el medio en tubos de 1.5 mL y centrifugamos a 12 000 rpm por 30 segundos, removimos el sobrenadante por decantación, resuspendimos la pastilla formada mediante agitación en vortex en 250 µL de solución P1 (50 M de TRIS-HCl pH8, 10 Mm de EDTA y 100 µL/mL de RNAasa), luego se agregaron 250 µL de buffer de lisis P2 (0.2 N de NaOH y 1 % de SDS) mezclándolos por inversión hasta obtener una solución translúcida, se agregaron 250 µL de solución P3 (Acetato de potasio 5M, ácido acético 96 %, agua, pH 5.5 ajustado con ácido acético) mezclamos de nuevo por inversión e incubamos 3 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó el tubo a 12 000 rpm por 10 minutos, se tomaron 600 µL y se colocaron en un tubo nuevo agregando 400 µL de fenol en solución (Sigma Aldrich No. de catálogo P4557), se agito vigorosamente 3 veces, se añadieron 200 µL de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitaron vigorosamente otras 3 veces, centrifugamos 5 minutos a 13 000 rpm y extrajimos la fase acuosa (500 µL aproximadamente) adicionamos un volumen de isopropanol al 100%, mezclamos por inversión e incubamos por 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron por 10 minutos a 13 000 rpm y se decantó el sobrenadante, se agregó etanol frio al 70% (0.5 mL) mezclando por inversión hasta despegar la pastilla, se llevó a cabo una última centrifugación a 13 000 rpm por un minuto, se decantó el sobrenadante y se dejaron secar a temperatura ambiente para luego resuspender el precipitado en 15 µL de agua estéril y libre de endonucleasas, por último se cuantificó la cantidad de DNA por espectrofotometría.

Secuenciación

La secuenciación del segmento E6/E7 del plásmido PB-E6/E7 se realizó en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, preparando la siguiente mezcla de reacción (1) 800 ng de DNA, (2) 1 µL de oligonucleótido (5'->3'): GCG CCT ACC GGT GGA TGT GGA ATG (3) Agua cuanto baste para 16 µL. El mismo procedimiento se siguió para AGF cuya longitud es de 1374 pb. Sin embargo, puesto que la técnica de secuenciación solo arroja datos confiables de una longitud aproximada de 800 pb, se utilizó otro primer (TGTGGGCAGCAGAGAAGATG) el cual hibrida a partir de la base 693 del gen AGF, para secuenciar la parte faltante del extremo 5').

Cultivo celular

El medio para cultivo de células HEK293 contiene 10% de suero fetal bovino (SFB), 1X GPS, 1X aminoácidos no esenciales, 1X piruvato y DMEM cuanto baste para 100%, 3.7 g/L de bicarbonato de sodio. El pH se ajustó a 7.2 con solución HCl 2 N. Para garantizar la

esterilidad, se filtró con una membrana de 0.22 μm . Las cajas donde fueron sembradas las células se cubrieron previamente con gelatina de piel porcina al 0.1 % estéril por 15 minutos.

El medio para cultivo de células HeLa contiene 10% de suero fetal bovino (SFB), 1X GPS, 1X piruvato y DMEM cuanto baste para 100%, 3.7 g/L de bicarbonato de sodio, 5.5 g/L de HEPES. El pH se ajustó a 7.2 con solución HCl 2 N. Para garantizar la esterilidad, se filtró con una membrana de 0.22 μm .

El medio para cultivo de células troncales W9.5 (M15) contiene 15% suero fetal bovino (SFB), 1X GPS, 1X aminoácidos no esenciales, 1X piruvato, 180 μL de β -mercaptoetanol por 100 mL de medio y DMEM cuanto baste para el 100% de la solución final. Para garantizar la esterilidad se filtró la mezcla con un filtro cuya membrana es de 0.22 μm . Las cajas donde fueron sembradas las células se cubrieron previamente con 150 000 a 200 000 células alimentadoras (fibroblastos embrionarios de ratón mitomizados) por centímetro cuadrado. El cultivo fue suplementado con LIF (Leukemia Inhibitory Factor), 1 μL (0.01 μg) por mL de medio.

Transfección con lipofectamina

Se utilizó el estuche comercial Lipofectamine® 3000 de ThermoFisher Scientific, para transfectar los transposones PB-E6/E7 y PB-AGF en células HEK293, en pocillos de 200 mm^2 al 80% de confluencia (160 000 células aproximadamente). Se prepararon dos mezclas, un tubo conteniendo el complejo #1 con (1) 50 μL de Opti-MEM, (2) 3 μL de lipofectamina 3000, y dos tubos conteniendo el complejo #2 un tubo con (1) 25 μL de Opti-MEM, (2) 2 μg de DNA PB-E6/E7 o PB-AGF y (3) 1 μL de P3000, el otro tubo con (1) 25 μL de Opti-MEM, (2) 2 μg de DNA total (PB-E6/E7 o PB-AGF más el plásmido pKs-CAG/HyPBase/bpA en una relación 10:1 y (3) 1 μL de P3000. Se mezcló el complejo #1 con el complejo #2 en una relación 1:1 incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente, luego adicionamos la mezcla a las células HEK293 e incubamos a 37 °C. Se reemplazó el medio a las 24 horas.

Para el caso de células HeLa, se utilizó el estuche comercial Lipofectamine® 3000 de ThermoFisher Scientific, para transfectar el transposon PB-E6/E7, en pocillos de 200 mm^2 al 80% de confluencia (160 000 células aproximadamente). Se prepararon dos mezclas, un tubo conteniendo el complejo #1 con (1) 50 μL de Opti-MEM, (2) 3 μL de lipofectamina 3000, y un tubo conteniendo el complejo #2 con (1) 25 μL de Opti-MEM, (2) 1.01 μg de DNA total (El plásmido PB-E6/E7 más el plásmido que, contiene la transposasa HyPBase y gen de resistencia a puromicina, en una relación 100:1) y (3) 1 μL de P3000. Se mezcló el complejo #1 con el complejo #2 en una relación 1:1 incubándose por 5 minutos a temperatura

ambiente, luego adicionamos la mezcla a las células HeLa e incubamos a 37 °C. Se reemplazó el medio a las 24 horas. Luego fueron sometidas a una selección de 96 h con puromicina. Posteriormente se generaron líneas celulares a partir de la población capaz de expresar las proteínas E6 y E7 por el método de dilución, se eligió la línea con morfología normal y las cuales no expresan los transgenes de forma basal.

Para transfectar la línea de células troncales W9.5 con el transposón PB-E6/E7. Se prepararon dos mezclas: un tubo conteniendo el complejo #1 con (1) 25 µL de medio Opti-MEM, (2) 0.75 µL de Lipofectamina 3000, y otro tubo conteniendo el complejo #2 con (1) 25 µL de medio Opti-MEM, (2) 1.1 µg DNA (1 µg del plásmido PB-E6/E7 y 0.1 µg del plásmido pKs-CAG/HyPBase/bpA), (3) 2.2 µL del reactivo P3000. Se mezcló el complejo #1 con el complejo #2 incubándose por 5 minutos a temperatura ambiente. Esta mezcla se utilizó para resuspender una pastilla de células W9.5 recién tripsinadas. La suspensión se incubó a temperatura ambiente y en agitación por 30 minutos, para posteriormente ser depositado en un pocillo de 2 cm² previamente cubierto con células alimentadoras y 0.5 mL de medio M15 y LIF. Se reemplazó el medio a las 24 horas.

Generación de líneas celulares troncales W9.5-E6/E7

Una vez transfectadas las células troncales W9.5, se dejaron crecer hasta formar colonias de tamaño medio (aproximadamente 200 - 250 µm), se tripsinaron, se contaron y se procedió a aislar por dilución en una caja de 96 pocillos previamente cubierta con células alimentadoras. Una vez alcanzado un tamaño medio, se tripsinaron las colonias aisladas que presentaron fluorescencia debido a la expresión basal de venus, para lo cual se utilizó un microscopio de fluorescencia (Zeiss Axio Observer Z1. Estas colonias se amplificaron y se congelaron en medio de congelación 2X, el cual contiene 60% de medio DMEM, 20% de SFB y 20% de DMSO.

Diferenciación de células troncales W9.5-E6/E7

Se expandieron 1x10⁶ células W9.5-E6/E7 sobre células alimentadoras en una caja adherente de 6 cm, mantenidas con medio M15 suplementado con LIF (1µL/mL). Posteriormente se hizo un pase de 1x10⁶ a otra caja, mismas que fueron mantenidas por tres días condiciones similares, exceptuando las células alimentadoras. Se reemplazó el medio cada 24 h. Luego se hizo un pase de 2x10⁶ de células a una caja bacteriológica, mantenido solo con medio M15 (Sin LIF ni células alimentadoras), se cambió el medio a las 48 horas, para permitir la formación de cuerpos embrioides. Luego de tres días, se dejaron

sedimentar por espacio de 10 minutos en un tubo falcon, para después ser sembrados y mantenidas en cajas adherentes.

Ensayos para la generación de ratones transgénicos

Los ensayos de generación de roedores transgénicos fueron realizados por el Dr. Leandro David Hernández de la Unidad de Producción de Roedores Transgénicos. Utilizando el transposon PB-E6/E7 mediante microinyección de DNA plasmídico en el pronúcleo de ovocitos fertilizados o células troncales embrionicas W9.5 que expresa E67E7 (W9.5-E6/E7 línea 1) en blastocistos, usando técnicas estándar que han sido previamente descritas (Nagy et al. 2003).

Estadística

Las comparaciones estadísticas se hicieron utilizando la prueba t-Student para el caso de los análisis de qPCR y la prueba exacta de Fisher para los ensayos de regeneración. Valores de $P \leq 0.05$ fueron considerados significativos.

Resultados

La expresión de factores pro-angiogénicos se incrementa durante el proceso de regeneración de la oreja, y este parece ser mayor en los ratones Tg(bK6-E6/E7)

Durante los ensayos de perforación de las orejas de ratonas se aprecia a simple vista que, comúnmente las ratonas silvestres y Tg(bK6-E6/E7) presentan mayor eritema en las orejas perforadas, así como un incremento en la cantidad de vasos sanguíneos en las cercanías del sitio de daño, respecto a las orejas intactas. Adicionalmente en otros estudios se ha observado que, durante el sanado normal en ratones silvestres existe un incremento de la expresión del receptor de VEGF, donde un pico máximo de actividad es alcanzado alrededor de los siete días, se mantiene un par de días y después disminuye (Zhang et al. 2008). Por lo que, para valorar si durante el proceso regenerativo de la oreja de los ratones existe inducción de factores pro-angiogénicos, y si este es mayor o menor en las ratonas Tg(bK6-E6/E7) versus las ratonas silvestres, determinamos los niveles de transcrito mediante PCR cuantitativo en tiempo real (qPCR). Al día séptimo después de las perforaciones, se tomaron las orejas y se midieron los niveles de cinco de estos factores que, se han descrito están involucrados en el desarrollo de un proceso angiogénico: (1) AGF (Angiopietin-related growth factor), también llamado Anptl6 (Angiopietin-like 6), por estar relacionada estructuralmente a la familia de proteínas de secreción las angiopoyetinas. Promueve angiogénesis al incrementar migración de células endoteliales (Oike et al. 2004). Su presencia está restringida mayoritariamente al hígado y su expresión ectópica está involucrada directamente en la regeneración de orejas de ratón (Oike et al. 2003). (2) Angpt1 (Angiopietin 1), como los demás miembros de la familia angiopoyetina, se unen con similar afinidad a los receptores Tie, en específico al receptor Tie2. Angpt1 regula el remodelamiento vascular (Koh 2013), está involucrado en la regeneración de músculo esquelético (Mofarrahi et al. 2015), versiones recombinantes se han utilizado en la sanación de diversas heridas (Cho et al. 2006). (3) Fst (Follistatin) también es una proteína de secreción que, favorece la proliferación de células endoteliales, su expresión es inducible por bFGF (basic fibroblast growth factor). Se une y antagoniza a la Activina, al igual que a otros miembros de la familia TGF- β (Thompson et al. 2005). Esta familia entre otras funciones, ejercen efectos antiproliferativos a través de diversas proteínas inhibidoras del ciclo celular, mediados los factores de transcripción SMAD (Dijke et al. 2002) particularmente la Activina atenúa la proliferación de células endoteliales en tumores

(Kaneda et al. 2011). Adicionalmente Fst incrementa la regeneración del musculo y otros tejidos (Zhu et al. 2011; Aoki & Kojima 2007). (4) Hif1 α (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) es un factor de transcripción que se le asocia con estimular la regeneración (Cho et al. 2015; Vivek & Post 2017; Maeno et al. 2005), e inducir la expresión de una gran variedad de genes, entre los que se encuentran varios factores proangiogénicos y sus receptores tales como Ang-1, Ang-2, Tie-1, VEGFR, (Hickey & Simon 2006) y (5) VEGFA (Vascular endothelial growth factor A), el cual es un potente inductor de la permeabilidad vascular, proangiogénico, vasculogénico, pues estimula la división y migración de células endoteliales, también posee efectos sobre otros tipos celulares, cáncer (Shibuya 2011) y regeneración (Bockhorn et al. 2007).

Los datos mostraron que existe una tendencia incrementada de la expresión a nivel de mRNA de los factores pro-angiogénicos analizados en respuesta a una lesión y que dicha respuesta en los ratones hembra transgénicas Tg(bK6-E6/E7) es mayor para Hif1 α y VegfA en comparación con las silvestres (Fig. 1).

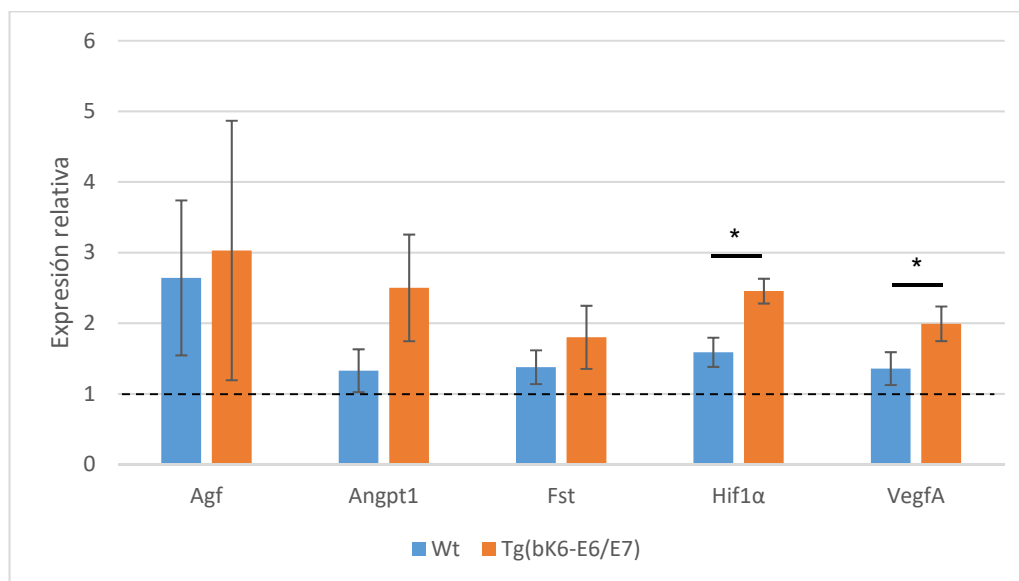


Figura 1. Gráficos de expresión relativa de Agf, Angpt1, Fst, Hif1 α y VegfA. Se muestra el cambio de expresión de los cinco factores proangiogénicos, en orejas que recibieron perforación versus la oreja intacta del mismo ratón, de hembras silvestres (Wt) o transgénicas Tg(bK6-E6/E7) al día siete después de haber recibido el mencionado tratamiento. Se han graficado los valores $\Delta\Delta CT$, por lo que el valor 1 corresponde al de una oreja intacta (Línea punteada). n=3. *p \leq 0.05. Valores p Wt Vs Tg(bK6-E6/E7) para Agf=0.76, Angpt1=0.06, Fst=0.22, Hif1 α =0.005 y VegfA=0.03. Barras de error como desviación estándar.

La angiogénesis contribuye a la regeneración de la oreja en ratones silvestres y Tg(K6b-E6/E7)

Una vez que, determinamos el patrón de expresión de los cinco factores proangiogénicos durante la regeneración de la oreja de los ratones silvestres y Tg(bK6-E6/E7), decidimos determinar si existe cooperación entre los oncogenes E6/E7 del VPH y la angiogénesis en la

regeneración de la oreja del ratón. Para este fin, utilizamos la ciclosporina A (CsA), un fármaco que se utiliza ampliamente como inmunosupresor, atenuando el rechazo de un trasplante. La ciclosporina A inhibe indirectamente la importación nuclear de los factores de transcripción NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) que, son esenciales para la activación de los linfocitos T y la expresión de diversas citosinas en la respuesta inmune (Venkatesh et al. 2004). En células endoteliales, VEGF induce la activación de NFAT y este a su vez la expresión de otros genes de esta cascada proangiogénica, por lo que tal activación también es sensible a CsA, produciendo un efecto antiangiogénico (Hernández et al. 2001).

Aplicamos ciclosporina A sistémicamente en los ratones de ambos genotipos durante las cuatro semanas que dura el ensayo de regeneración de la oreja. Encontramos que, la administración de la ciclosporina A redujo la capacidad regenerativa de los ratones, sin importar si estos eran silvestres o transgénicos (Fig. 2). Por otro lado, contrario a lo esperado, los ratones tratados con solución salina también tuvieron un efecto similar en las silvestres. Así mismo la observación histológica de los tejidos corroboró lo anterior mencionado, es decir las Tg(bK6-E6/E7) lograron unir los dos extremos de tejido, no así las silvestres ni el Tg(bK6-E6/E7) y silvestres tratados con ciclosporina (Fig.3).

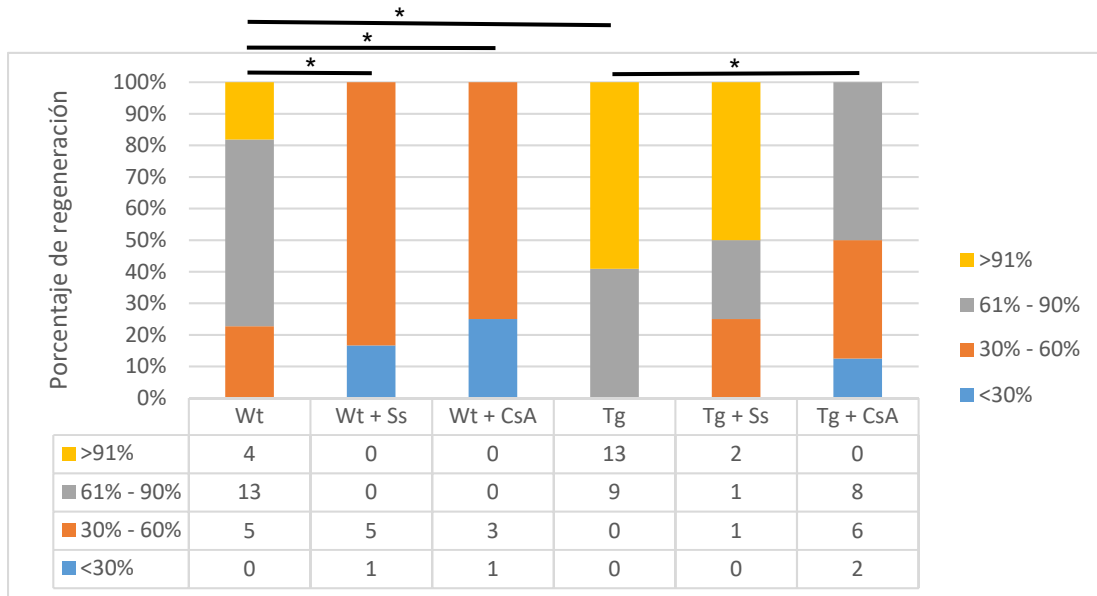


Figura 2. Representación del porcentaje de regeneración de porciones de orejas. Se muestra la cantidad de orejas regeneradas de ratones hembra clasificadas de acuerdo con su porcentaje de regeneración, tratados o no con Ss (Solución salina), CsA (Ciclosporina A), silvestres (Wt) o transgénicas (Tg) Tg(bK6-E6/E7). Se observa una atenuación de la regeneración de la oreja de ratonas silvestres y transgénicas después de 4 semanas de tratamiento con CsA. * $p < 0.05$. Valores p para Wt/Wt+Ss=0.002, Wt/Wt+CsA=0.012, Wt/Tg(bK6-E6/E7) =0.004, Tg(bK6-E6/E7)/Tg(bK6-E6/E7)+CsA=1.013e-05.

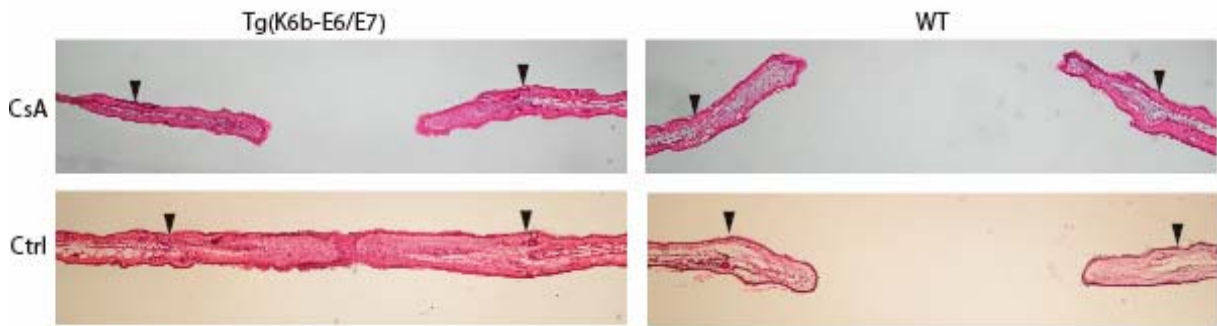


Figura 3. Histología de orejas perforadas de ratón. Tinción con hematoxilina y eosina en cortes histológicos de las orejas de ratones hembra, silvestres (Wt) o transgénicas Tg(bK6-E6/E7) al final de cuatro semanas de tratamiento con o sin CsA (Ciclosporina A). Las flechas indican el límite de la presencia de cartilago.

Estos resultados apoyan la participación de la angiogénesis durante la regeneración de la oreja, sin embargo, no descartan la participación de procesos inmuno-inflamatorios que han sido eliminados por la acción inmunosupresora del fármaco.

Construcción de vectores que expresan de forma inducible los oncogenes E6/E7 o el AGF

Para iniciar con la generación de herramientas que nos permitan generar un nuevo ratón transgénico que exprese de forma inducible los oncogenes E6/E7 y/o AGF, comenzamos por desarrollar las construcciones que expresen dichos genes de forma independiente (Fig.4).

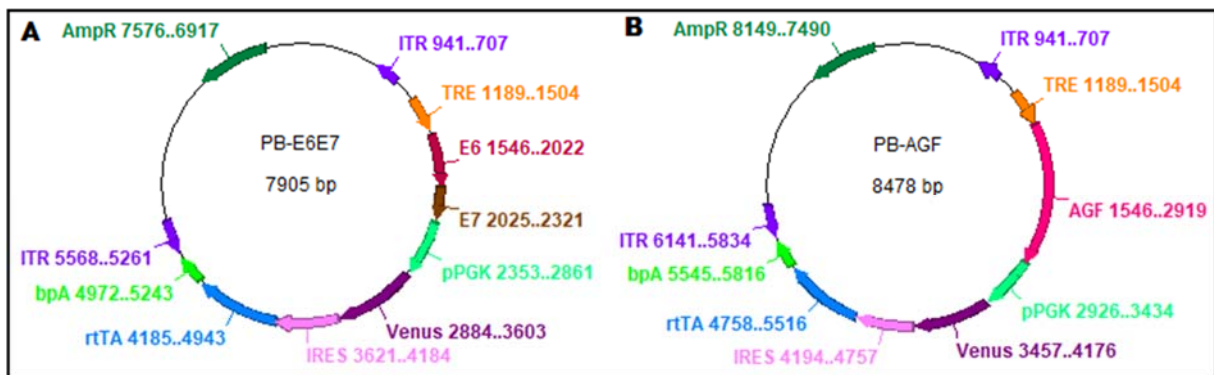


Figura 4. Mapa de los plásmidos (A) PB-E6/E7 y (B) PB-AGF. Ambas construcciones contienen la estructura básica del transposon ITR-TRE-(GenDeInterés)-pPGK-Venus-IRES-rtTA-ITR. ITR: Inverted terminal repeats. TRE: Tetracycline response elements. pPGK: Phosphoglycerate kinase promoter. IRES: Internal ribosome entry site. rtTA: Reverse tetracycline-controlled transactivator. bpA: Bovine growth hormone polyadenylation site. AmpR: Ampicillin resistance.

Construcción del transposón PB-E6/E7

Para la construcción del plásmido PiggyBac (PB) que contiene los genes E6 y E7 (E6/E7) del VPH tipo 16, partimos de dos plásmidos: el plásmido PB-Sox2-T2A-eBFP con el

siguiente esquema ITR-TRE-Sox2-T2A-eBFP-pPGK-Venus-IRES-rtTA-ITR con un tamaño de 8844 pb y el plásmido pBluescript KS(+) E6/E7 (pKS(+)-E6/E7) de 3770 pb.

El plásmido PB-Sox2-T2A-eBFP se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I para eliminar el fragmento Sox2-T2A-eBFP resultando un fragmento de 7092 pb y otro de 1742 pb; este último corresponde a la secuencia Sox2-T2A-eBFP. Hicimos una PCR utilizando como molde el plásmido pKS(+) E6/E7 y oligonucleótidos sentido FwE6E7Kozak y antisentido RvE6E7Kozak (Tabla 1), los mismos que contienen la secuencia Kozak (GCCACC) y los sitios de restricción *Bam*HI y *Xho*I. El programa de temperaturas fue: (1) 95 °C 5 minutos, (2) 95 °C 30 segundos, (3) 65 °C ± 7 °C 30 segundos, (4) 72° C 45 segundos, (5) ciclado desde el paso (2) al (4) por 35 veces, (6) 75 °C 5 minutos. El amplicón resultante de aproximadamente 801 pb (Fig. 5) se purificó y digirió con las enzimas *Bam*HI y *Xho*I ligándose posteriormente al transposón PB linearizado de 7092 pb. Luego de la ligación, se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH10B y se sembraron en cajas con agar en presencia de ampicilina, se seleccionaron diez colonias para crecerlas en medio luria, de las cuales se extrajo el plásmido para digerirlo con la enzima *Acc*I como diagnostico preliminar; todas las muestras presentaron el patrón de restricción esperado para nuestra construcción de interés (Fig. 6). De las 10 muestras se eligió la colonia número uno; restricciones adicionales con la enzima *Bam*HI, *Kpn*I, y *Bgl*I se llevaron a cabo para verificar la identidad e integridad del plásmido resultante (Fig. 7). Sobre esta muestra y como último paso, se secuenció el inserto utilizando un oligonucleótido antisentido que es complementario con una región dentro del promotor PGK del transposón PB. Los datos confirman la presencia del inserto en alineamiento BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Se verificó el sentido de la secuencia correspondiendo con lo esperado. No se encontraron mutaciones en E6/E7, por lo tanto, logramos construir el plásmido PB-E6/E7 (7954 pb) deseado.

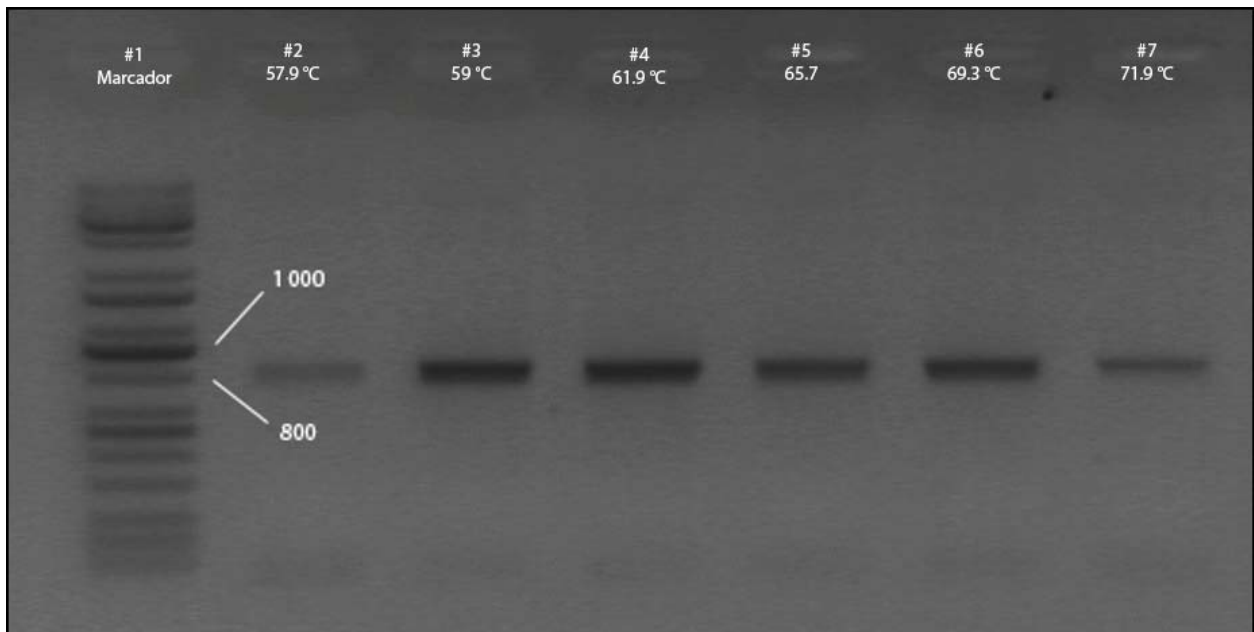


Figura 5. Productos de PCR de los genes E6/E7. Se muestra la amplificación por PCR de E6/E7 en un gradiente de temperatura, utilizando como DNA molde el plásmido pKS(+)E6/E7, la banda esperada es de aproximadamente 801 pb. Se observa una mayor eficiencia de amplificación en las temperaturas 59 y 61.9 °C. El Carril #1 muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.

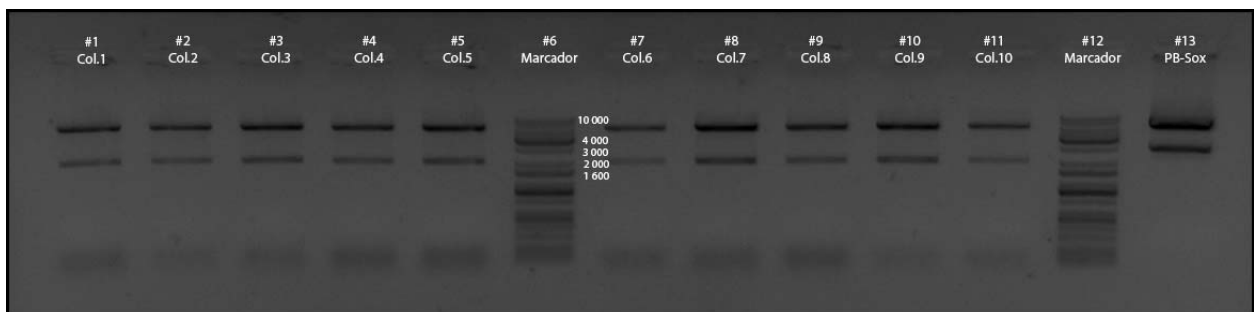


Figura 6. Patrones de restricción esperados con la enzima Accl sobre los plásmidos provenientes de diez colonias seleccionadas al azar. Los carriles #1, #2, #3, #4, #5, #7, #8, #9, #10 y #11 muestran dos bandas comparables con peso molecular esperado (5948 y 1957 pb) resultantes de la digestión del plásmido PB-E6/E7. Se compara con un plásmido PB parental (Carril #13) cuyas bandas luego de la restricción son (6121, 2190 y 533 pb). Carril #6 y 12 muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.

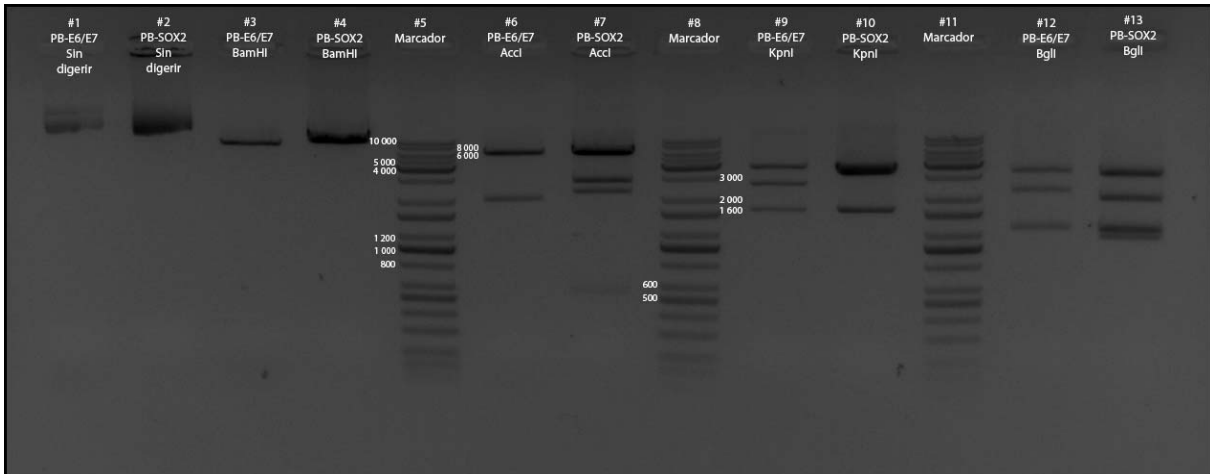


Figura 7. Patrones de restricción esperados de la colonia 1. Se muestra el patrón de restricción con las enzimas BamHI, Accl, KpnI y BglI sobre el plásmido extraído de la colonia 1 (Carriles #3, #6, #9 y #12), los fragmentos esperados para todas las restricciones son: BamHI, 7905 pb, Accl, 5948 y 1957 pb, KpnI 3734, 2526 y 1645 pb, BglI 3195, 2187, 1273 y 1250 pb. Se compara con el plásmido parental carriles #4, #7, #10, #13. Los fragmentos esperados para todas las restricciones son: BamHI, 8844 pb, Accl, 6121, 2190, 533 pb, KpnI 3734, 3465 y 1645 pb, BglI 3195, 1974, 1273, 1250, 1152 pb. Para el caso de BglI las bandas de peso molecular más bajo presentamente no se alcanzan a resolver por ser de peso similar. En el carril #7 se aprecian 4 bandas, la banda de 3000 pb es posiblemente debido a una digestión incompleta. En el carril #10 solo se observan dos bandas, la de peso molecular más alto se asume que no se ha resuelto por tener pesos moleculares similares, lo mismo sucede con una de las bandas del carril #12 y #13. Carriles #1 y #2 muestran los plásmidos sin digerir. Carriles #5, #8 y #11 muestra el patrón de bandedo del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.

Construcción del transposón PB-AGF

Para obtener el transposón PB-AGF obtuvimos el RNA total de hígado de un ratón macho adulto de la cepa CD1. Se realizó una reacción de retrotranscripción utilizando el oligo dT, se tomó el cDNA resultante para utilizarlo como molde en una PCR, amplificando con oligonucleótidos (Sentido FwrAGFBamHI y antisentido RevAGFXhoI) (Tabla 1) que hibridan en los flancos del gen AGF, y además contienen la secuencia Kozak (GCCACC) y los sitios de restricción *BamHI* y *XhoI*. Dado que el gen tiene un porcentaje de GC superior al 60 %, se utilizó un buffer acorde a esta circunstancia (ver Materiales y Métodos) y el programa de temperaturas (1) 95 °C 5 minutos, (2) 95 °C 30 segundos, (3) 65 °C ± 7 °C 30 segundos, (4) 72° C 1.5 minutos, (5) ciclado desde el paso (2) al (4) por 40 veces, (6) 75 °C 5 minutos. La electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR reveló una banda nítida de aproximadamente el peso esperado es decir 1401 pb (Fig. 8). Este DNA se recuperó y se digirió con las enzimas *BamHI* y *XhoI*, se ligó al transposón PB linearizado de 7092 pb, y se utilizó para transformar la cepa bacteriana DH10B. Las bacterias se hicieron crecer en agar LB con ampicilina, y diez colonias fueron seleccionadas para ser crecidas en medio Luria. El plásmido extraído de estas colonias se digirió con la enzima Accl para realizar un primer diagnóstico. De las 10 colonias seleccionadas, 8 corresponde a la construcción esperada (Fig. 9). Se seleccionó la colonia número uno para verificar la integridad del plásmido

mediante restricción con las enzimas *BamHI*, *XhoI*, *AccI*, *NcoI* y *KpnI*, los patrones correspondieron a un plásmido que había integrado el gen AGF dentro del transposon PB (Fig. 10). Para verificar la ausencia de mutaciones en el gen AGF, fue secuenciado completamente por partes debido a limitaciones técnicas. Una parte fue secuenciada dentro del transposón PB mediante el oligonucleótido pPGK antisentido, referido anteriormente, y otra parte con el oligonucleótido antisentido AGF424Rev (Tabla 1). La secuenciación nos confirmó la presencia del inserto en alineamiento BLAST. Se verificó el sentido de la secuencia correspondiendo con lo esperado, no se encontraron mutaciones, mostrando que logramos construir el plásmido PB-AGF (8478 pb) deseado.

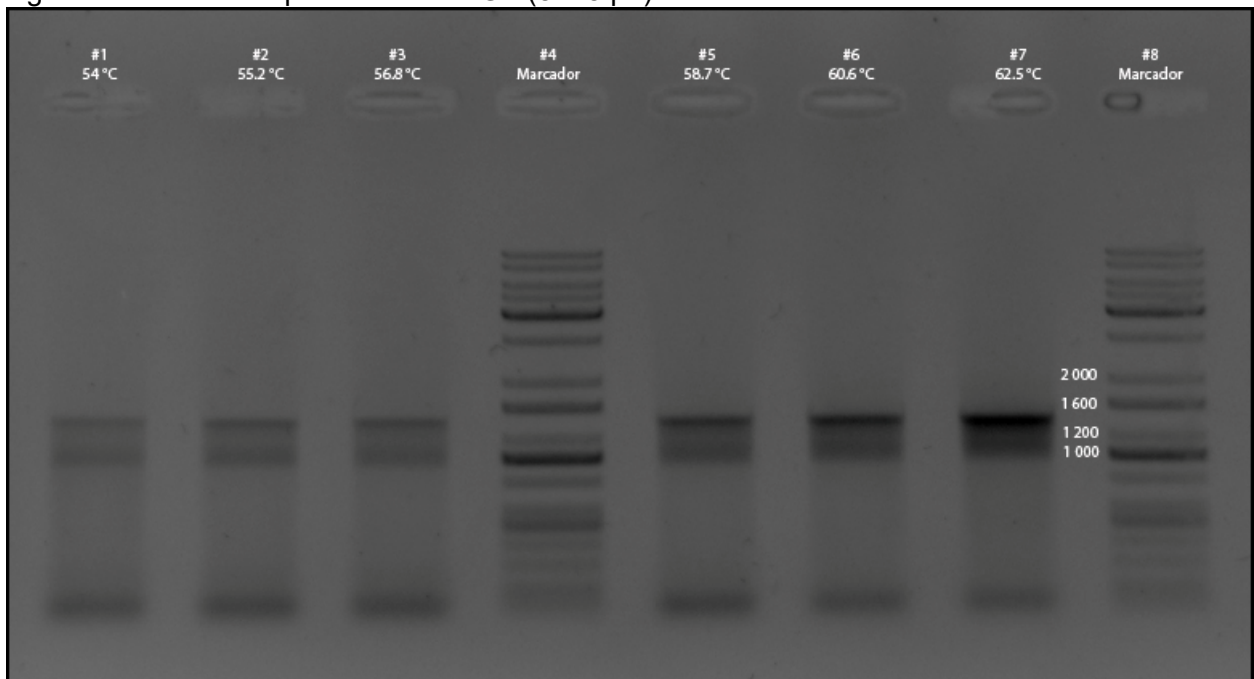
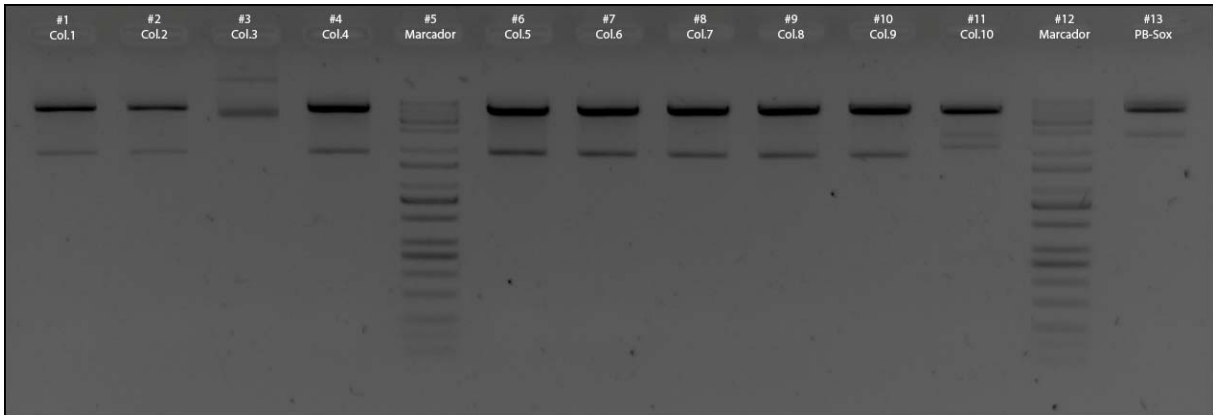
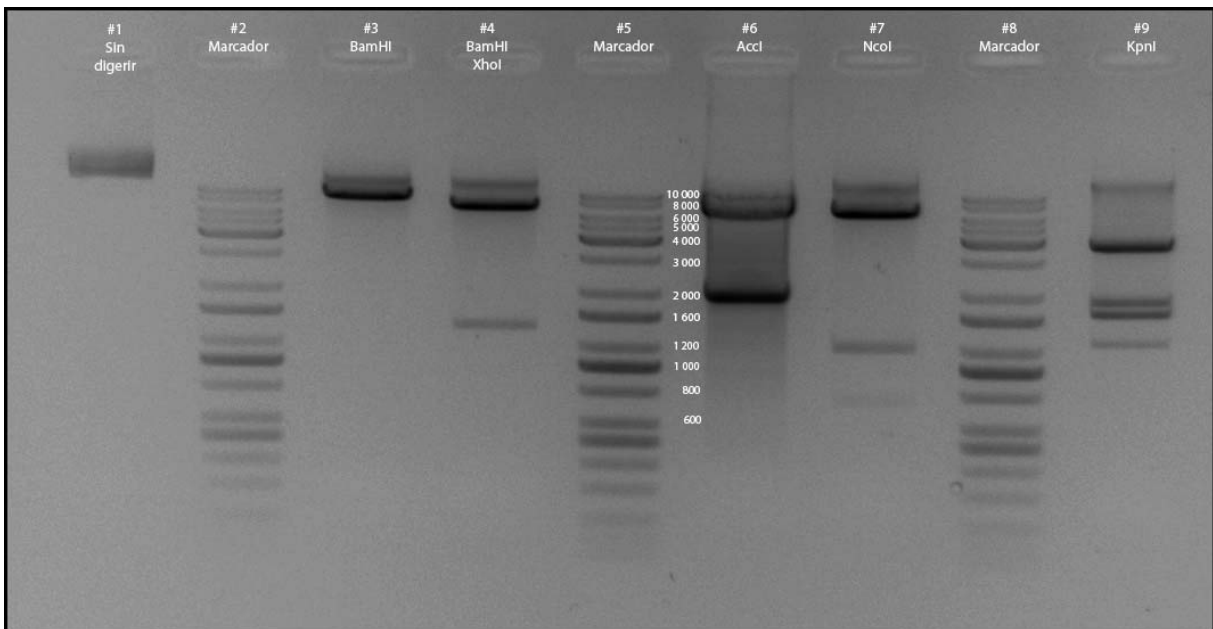


Figura 8. Productos de PCR del gen AGF. Se muestra la amplificación por PCR del gen AGF en un gradiente de temperatura, utilizando como molde cDNA, el tamaño de banda esperado es de 1401 pb. Se observa una mayor eficiencia de amplificación en las temperaturas de 60 y 62.5 °C. Carriles #4, y #8 muestran el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.



*Figura 9. Patrones de restricción esperados con la enzima *Accl* sobre los plásmidos provenientes de diez colonias seleccionadas al azar. Solo los carriles #1, #2, #4, #6, #7, #8, #9, y #10 muestran un patrón de restricción esperado correspondiente al plásmido PB-AGF, es decir dos bandas con peso molecular de 6546 y 1932 pb. Se compara con un plásmido PB parental (Carril #13) cuyas bandas de restricción esperados son (6121, 2190 y 533 pb), la banda de 533 no se alcanza a visualizar posiblemente porque existe muy poca cantidad de DNA. Carriles #5, y #12 muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.*



*Figura 10. Patrones de restricción esperados de la colonia 1. Se muestra el patrón de restricción con las enzimas *BamHI*, *BamHI-XhoI*, *Accl*, *NcoI* y *KpnI* sobre el plásmido extraído de la colonia 1 (Carriles #3, #4, #6, #7 y #9), los fragmentos esperados para todas las restricciones son: *BamHI* 8478 pb, *BamHI-XhoI* 7092 y 1386 pb, *Accl* 6546, 1932, *NcoI* 6567, 1183, 728 pb, *KpnI* 3734, 1862, 1645 y 1237 pb. En prácticamente todos los carriles se aprecia una banda adicional de alto peso molecular posiblemente debido a una digestión incompleta de plásmido. Carriles #2, #5 y #8 muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.*

Validación de los vectores que expresan de forma inducible los oncogenes E6/E7 o el AGF

El transposon PB posee dos modalidades de expresión. Una basal donde se transcribe y traduce la proteína fluorescente venus y el transactivador reverso de tetraciclina (rtTA), y otra modalidad inducida que requiere de la activación del promotor TRE por el complejo formado por la doxiciclina unido a rtTA, provocando así la expresión del gen de interés (Fig. 11). Para verificar que nuestras construcciones son funcionales, es decir que venus y las proteínas de interés E6/E7 y AGF se expresan a nivel de mRNA, se realizó un ensayo de transfección de nuestras construcciones en células HEK293 y, posteriormente, se determinó la presencia del mRNA de los transgenes correspondientes por RT-PCR.

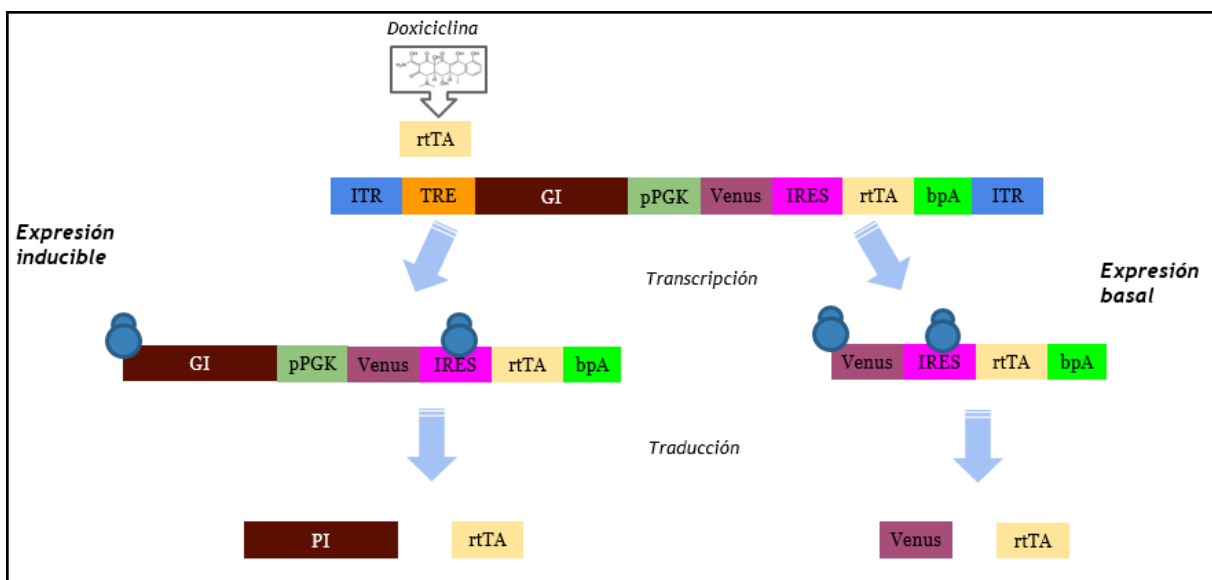


Figura 11. Dinámica de expresión del sistema piggyBac/Tet-On generado. El sistema, es capaz de generar dos transcritos distintos, uno de los cuales es dependiente de doxiciclina y a partir del cual se traduce la proteínas de interés. GI: Gen de interés. PI: Proteína de interés.

Transfección en células HEK293

Se transfectaron los plásmidos PB-AGF o PB-E6/E7 con o sin la transposasa hiperactiva piggyBac, en células HEK293 (Fig. 12). La transposasa hiperactiva piggyBac (HypBase) es expresada bajo el promotor CAG y está contenida en el plásmido pBluescript KS(+) (pKS(+)-CAG/HyPBBase/bpA). En todos los casos, la proteína venus fue detectada 16 horas después de la transfección con los plásmidos PB-AGF o PB-E6/E7 en co-transfección o no con el plásmido pKS(+)-CAG/HyPBBase/bpA.

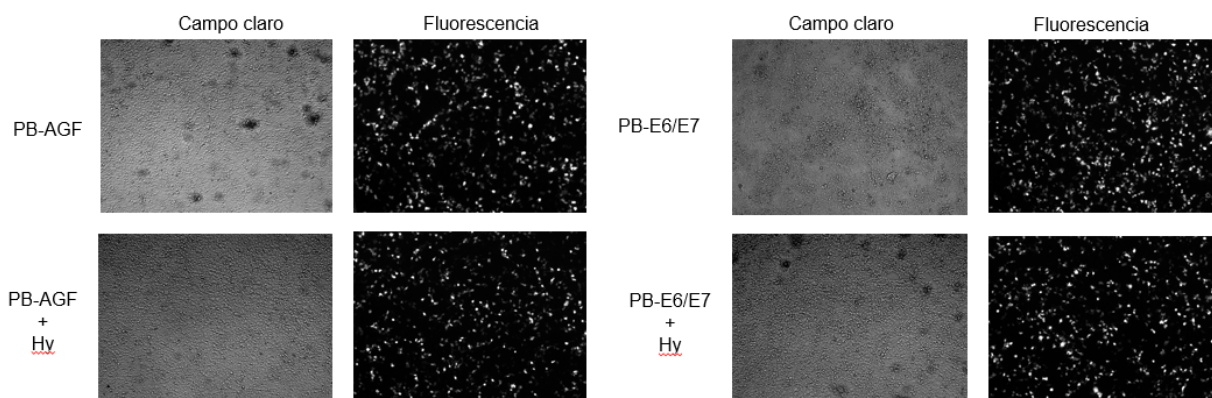


Figura 12. Detección de la proteína venus en células HEK293. Células HEK293 vistas 16 horas postransfección con los transposones PB-AGF y PB-E6/E7 con o sin transposasa HyPBase (Hy), se observa una gran cantidad de células que fluorescen debido a la expresión basal de la proteína venus. Imágenes obtenidas en campo claro o epifluorescencia usando un objetivo de 5X utilizando el filtro de 527 nm.

Inducción de E6 y AGF a nivel de mRNA

El marco de lectura de los genes E6/E7 se transcriben como un solo mRNA bisistrónico. Dentro de este transcrito, el gen E6 de 514 pb, sufre cortes y empalmes alternativos produciendo adicionalmente otros dos transcritos de menor tamaño donde E6*I tiene 330 pb y E6*II 214 pb (Escalante-Alcalde et al., 2000). Para verificar que, en respuesta a doxiciclina el transposón PB-E6/E7 es funcional a nivel de transcripcional. Se amplificó E6 por RT-PCR a partir del mRNA de células HEK293 previamente transfectadas con el transposón. Se utilizó un juego que oligonucleótidos que amplifican y flanquean al gen E6 en el transcrito primario, al igual que las otras dos variantes E6*I y E6*II, por lo que el PCR arrojó tres bandas de diferentes tamaños. En cuanto al análisis de funcionalidad correspondientes al transposón PB-AGF, se utilizaron los oligonucleótidos sentido y antisentido que, hibridan en los exones 2 y 3 del gen, respectivamente, y cuyo amplicón tiene un peso molecular de 424 pb.

Cuarenta y ocho horas posteriores a las respectivas transfecciones, de los transposones con y sin transposasa, las células HEK293 se pasaron a una caja de mayor tamaño y fueron tratadas con una dosis de 1.5 µg de doxiciclina por mL de medio, manteniéndose en esas condiciones por noventa y seis horas. Las células con tratamiento y sus correspondientes controles fueron procesados para extraer el RNA. Posteriormente se llevó a cabo la retrotranscripción para obtener cDNA, y a partir de éste se realizó una PCR para obtener los amplicones de E6 (Fig. 13) y AGF (Fig. 14) antes descritos. Se utilizaron como controles positivos DNA genómico proveniente de la cola del ratón transgénico Tg(bK6-E6/E7) y el plásmido PB-AGF. Como control negativo células HEK293 sin

transfectar. Previamente a esto, para verificar que no existiera DNA genómico, se realizaron PCRs en todas las muestras de RNA con los oligonucleótidos E6 y AGF antes mencionados; los productos correspondientes al DNA genómico son 477 y 424, respectivamente. Para evaluar la integridad cDNA se realizó una PCR con los oligonucleótidos contra RPLP0, un gen que codifica para una proteína ribosomal.

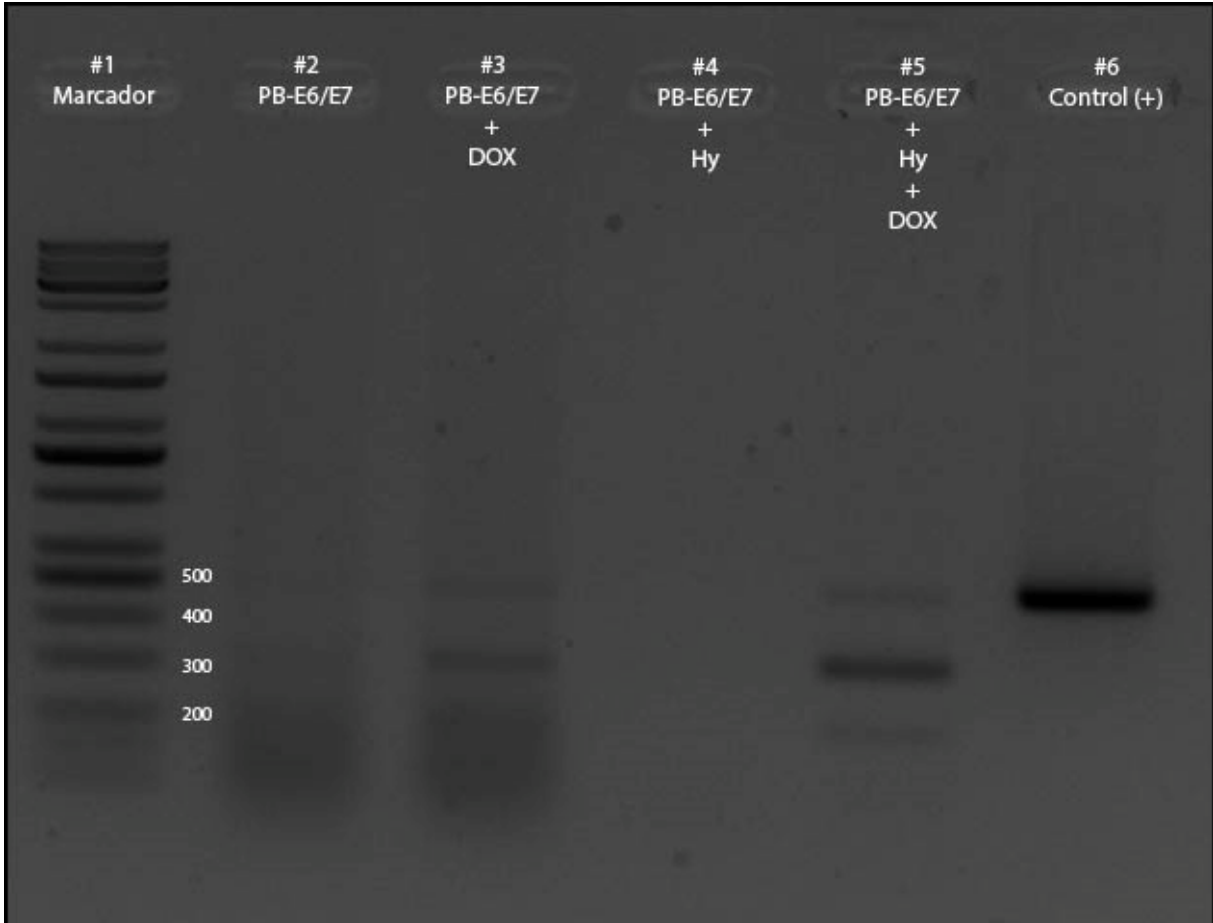


Figura 13. Patrón de expresión esperado, generado por RT-PCR de los transcritos de E6 en respuesta a doxiciclina. La expresión de E6 da como resultado tres transcritos alternativos: 514 pb (E6), 330 pb (E6) y E6*II (214 pb). La inducción del transposón con doxiciclina (DOX) con o sin transposasa HypBase (Hy), genera la presencia del patrón de bandeo con los tamaños de los transcritos antes mencionados (carriles #3 y #5), lo que no sucede en ausencia de DOX (Carriles #2 y #4) indicando que el transposón es funcional a nivel de mRNA. Carril #6 control positivo (PCR de DNA genómico). Carril #1, muestra el patrón de bandeo del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.*

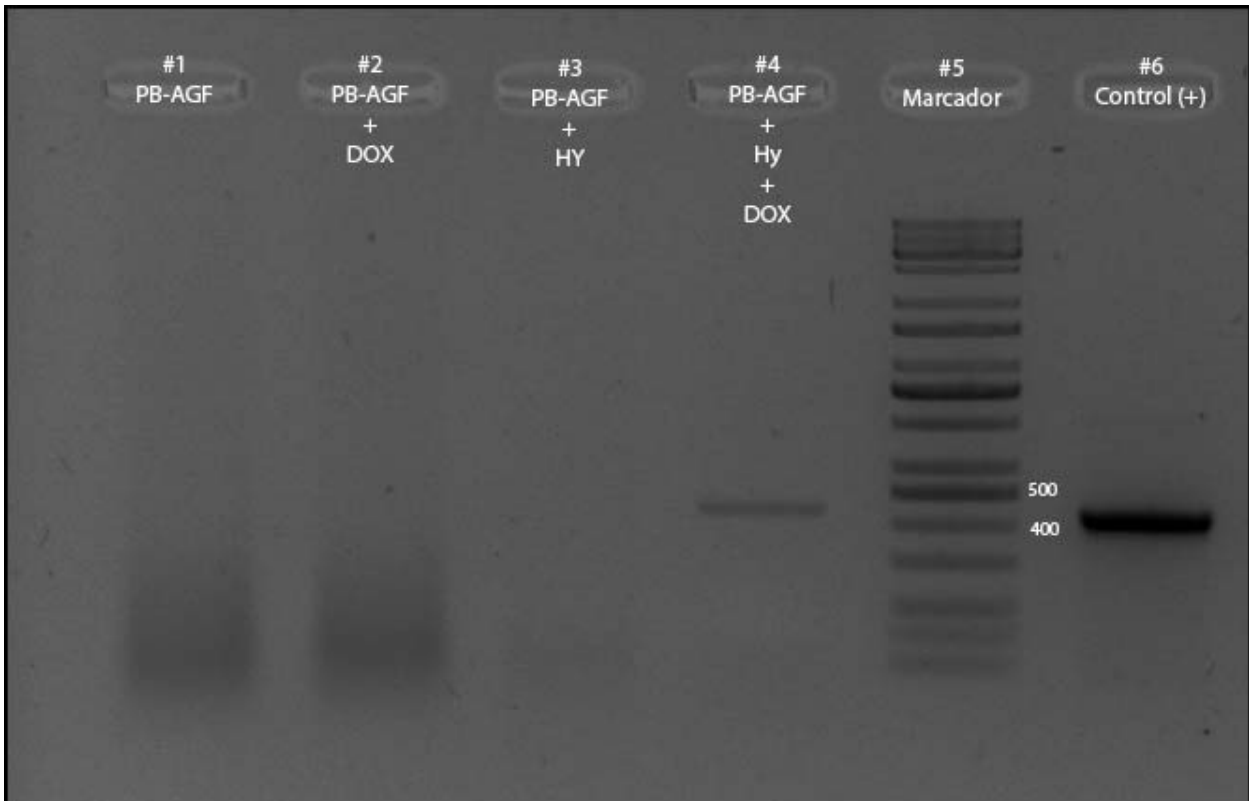


Figura 14. Patrón de expresión esperado, generado por RT-PCR del transcrito de AGF en respuesta a doxiciclina. Se observa la presencia de una banda amplificados mediante RT-PCR con el tamaño esperado (424 pb) que, se hace evidente mediante la inducción con doxiciclina (DOX) con la transposasa hypBase (Hy) (Carril #4) lo que no ocurre sin la adición de este (Carril #1 y #3). A diferencia de la figura 7 no se detecta expresión en la forma episomal del transposón en tratamiento con DOX. Carril #6, control positivo (PCR del plásmido PB-AGF). Carril #1, muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.

Efecto de la inducción de los oncogenes E6/E7 sobre células HeLa

Las células HeLa provienen de una muestra de cáncer cervicouterino que, fueron transformadas por el HPV-18. Por lo que nos preguntamos si una sobreinducción de E6/E7 en tales células incrementaría aún más su capacidad hiperproliferativa. Para tal fin, estas células se transfectaron con el transposón PB-E6/E7, se aislaron clonas y se indujo la expresión de los oncogenes con 1.5 µg/µL de doxiciclina. Contrario a lo esperado las células no proliferaron más, si no que cambiaron su fenotipo a uno más redondo, perdiendo adhesión y, consecuentemente, tendieron a desprenderse del plato de cultivo, manteniéndose suspendidas vivas en el medio de cultivo por un tiempo (Valeriano, 2016, comunicación personal) (Fig.15).

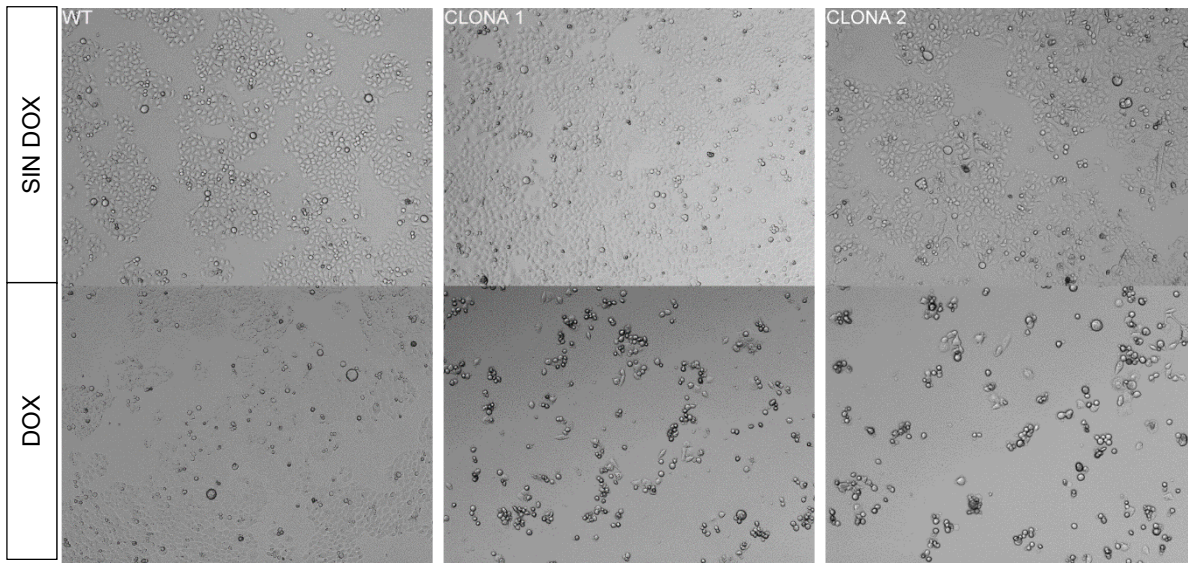


Figura 15. Pérdida de adhesión debido a la inducción de los oncogenes E6/E7 en células HELA. Los oncogenes E6/E7 fueron inducidos con doxiciclina (Dox), en células HELA transfectadas con el transposon PB-E6/E7. Se observa que la inducción provoca la pérdida de adhesión celular al plato de cultivo en dos clones (Fila inferior), mientras que las mismas clonas no presentan el fenotipo descrito en ausencia de doxiciclina (Fila superior).

El fenotipo antes descrito es reversible ya que, si se le retira la doxiciclina después de 24 horas de exposición, tanto las células que permanecen aún adheridas al plato, como las suspendidas, recuperan su morfología característica y se adhieren nuevamente al plato. Este fenómeno, aunque es contrario a lo esperado, muestra que la inducción del fenotipo descrito anteriormente es dependiente de doxiciclina (Fig. 16) (Valeriano, 2016 comunicación personal).

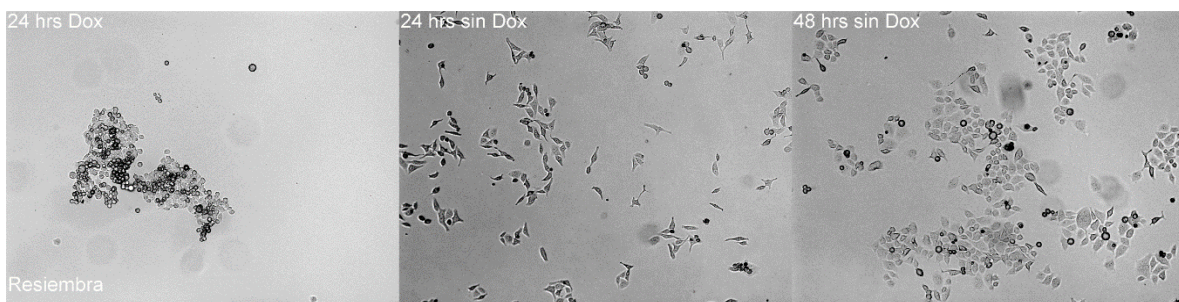


Figura 16. Reversibilidad del fenotipo de pérdida de adhesión debido a la inducción de los oncogenes E6/E7 en células HELA. Se observa que, las células HeLa transfectadas con el transposon PB-E6/E7 que han sido expuestas por 24 horas a doxiciclina (Izquierda) recuperan su adhesión y morfología al plato de cultivo luego de 24 horas (En medio y derecha).

Generación de roedores transgénicos por inyección pronuclear

Una vez que se construyeron los transposones PB-E6/E7 y PB-AGF con las secuencias correctas, y se verificó que los transcritos de interés se expresaron en presencia de doxiciclina in vitro, procedimos a generar primero el ratón transgénico con el transposón PB-E6/E7. Para esto tomamos como referencia diversos estudios que han utilizado transposones PiggyBac para generar ratones transgénicos (Tabla 3).

Tabla 3. Estudios de transgénesis con transposones piggyBac. ^a En paréntesis se muestra la concentración de transposasa inyectada. ^bLa eficiencia de transgénesis esta expresada en porcentaje de transgénicos positivos relativo a embriones transferidos.

Especie	Tipo de transposon	Tipo de transposasa	^a Material genético inyectado (ng/μL)	Radio	^b Eficiencia (%)	Referencia
Vaca	Plásmido	DNA	0.1 (0.1)	1:1	47	(Yum et al. 2016)
Rata	Plásmido	DNA	30 (10)	3:1	14.6 - 25	(Li et al. 2016)
Rata	BAC	RNA	3 (100)	0.03:100	5.3	(Jung et al. 2016)
Ratón	Plásmido	DNA	2	2:1	34.8	(Ding et al. 2005)
Ratón	Plásmido	RNA	2 (15)	0.13:1	18	(Katter et al. 2013)
Ratón	BAC	RNA	2 (2.5)	0.8:1	1.7 - 2.7	(Zhao et al. 2014)

Se realizaron tres ensayos con diferentes condiciones los cuales se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Ensayos de generación de ratones transgénicos por inyección pronuclear.

Concentración de DNA (ng)	Relación Transposón:Transposasa	Resultado
10	10:1	No hubo nacimientos
2	1:1	8 nacimientos sin transgénicos
2	10:1	11 nacimientos sin transgénicos

Después de transferir los embriones a los ratones hembra pseudopreñadas, no culminaban su desarrollo y aparentemente se reabsorbían ya que, solo nacían los ratones provenientes de embriones que aparentemente no habían incorporado el transposón.

Generación y caracterización de la línea celular troncal embrionica que expresa los oncogenes E6/E7 (W9.5-E6/E7)

Para lograr la generación de ratones transgénicos con otra estrategia. Se transfectó el plásmido PB-E6/E7 con la transposasa hiperactiva pKS(+)-CAG/HyPBase/bpA, en una relación 10:1, en la línea celular embrionica W9.5. La presencia de la proteína venus se observó 16 horas después de la transfección en el microscopio de epifluorescencia. Las células se dejaron crecer por 3 días, y posteriormente se tripsinaron para así proceder a aislar, por dilución, células individuales transfectadas capaces de generar colonias (i.e., clonas) en un plato de 96 pocillos. Se lograron aislar 4 células independientes, de las cuales se derivaron 4 líneas celulares que presentan integración estable del transposón PB-E6/E7. Estas líneas generan colonias que mantienen la morfología característica de células troncales embrionicas (bordes redondeados y refringentes). Vistas al microscopio de epifluorescencia las colonias presentan fluorescencia. La inducción con doxiciclina por 48 horas provoca la atenuación de la expresión de la proteína venus de acuerdo con lo esperado, si bien dicha atenuación se presenta de forma heterogénea en algunas células que derivan de la formación de cuerpos embrioides (Fig. 17).

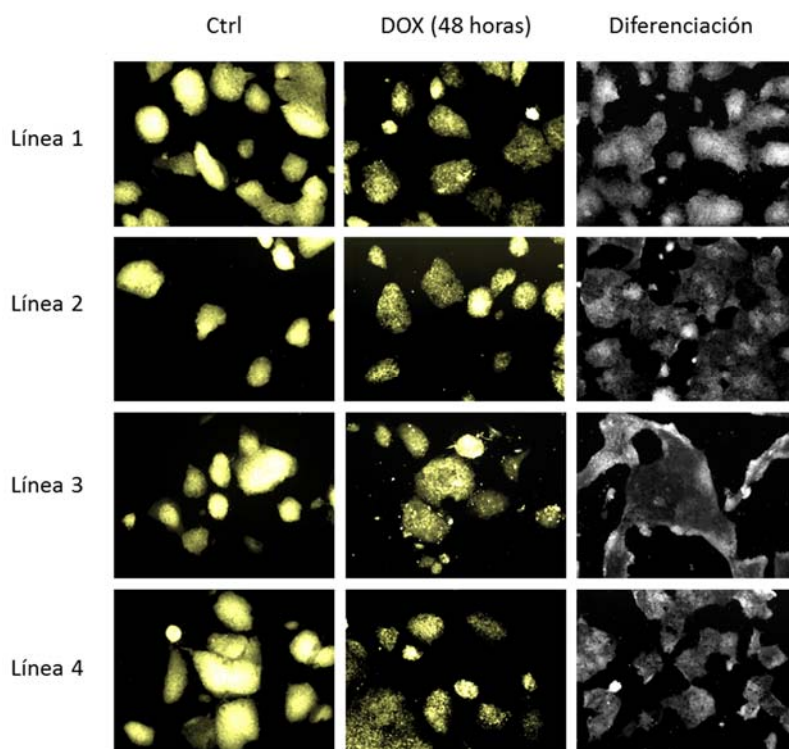
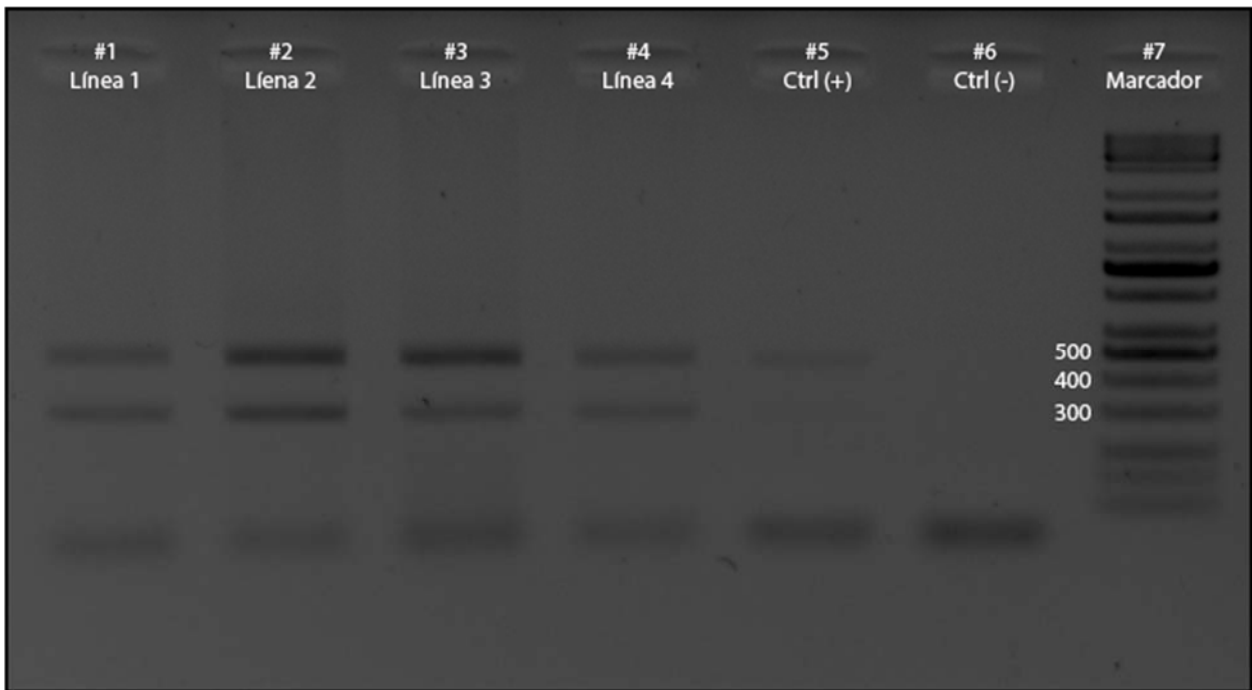


Figura 17. Imágenes de epifluorescencia de las líneas celulares W9.5 que poseen la integración genómica del transposón PB-E6/E7. En la columna uno, se observa la fluorescencia (527 nm) de las líneas generadas, debido a la expresión de la proteína venus. En la segunda columna se muestra las mismas líneas después de 48 horas de inducción con doxiciclina (DOX), observándose la atenuación de venus. La tercera columna muestra la expresión heterogénea de venus en células en estado de diferenciación inducido por la formación de cuerpos embrioides.

Inesperadamente, el análisis de la expresión del oncogén E6 a nivel transcripcional, observado por la amplificación del cDNA por PCR cualitativo, muestra su presencia aún sin que las células estén expuestas al inductor doxiciclina (Fig. 18). Nótese la presencia de dos bandas una de 424 pb corresponde al transcrito primario de E6 y la otra que corresponde uno de los transcritos procesado (E6*I de 330 pb).



*Figura 18. Patrón de expresión fuga de E6 generado por RT-PCR, en las cuatro líneas celulares W9.5-E6/E7. La expresión de E6 da como resultado tres transcritos alternativos, uno de 514 pb (E6) el cual es igual a la secuencia del DNA, otro de 330 pb (E6*I) y 214 pb (E6*II). Se observa el patrón de expresión de E6, en las cuatro líneas celulares generadas, sin la inducción mediada por doxiciclina (DOX) (carriles #1 al #4). Para el control positivo se utilizó cDNA del transgénico Tg(bK6-E6/E7) (Carril #5). El control negativo corresponde al cDNA de células no transfectadas (Carril #6). Carril #7, muestra el patrón de bandeado del marcador de peso molecular KAPA™ Universal Ladder.*

Generación de ratones transgénicos por formación de quimeras

Una vez que se generaron las cuatro líneas celulares embriónicas W9.5-E6/E7, la línea 1 se cultivó in vitro en medio 2i para incrementar su capacidad pluripotente. Análisis del cariotipo de estas células, arrojó un porcentaje de 54% de células con el número normal de cromosomas. Las células se inyectaron a mórulas de la cepa CD1 para la generación de quimeras. Al parecer las células transgénicas W9.5-E6/E7 se integraron adecuadamente, pero no hubo nacimientos. Existen dos posibles causas de este fenómeno. La primera es que, la expresión fuga de los oncogenes en las células estuviera generando efectos negativos en el desarrollo de los embriones. La segunda, radica en la posible genotoxicidad

provocada por una expresión excesiva y prolongada de la transposasa HypBase, posterior a la trasposición (Urschitz et al. 2010).

Construcción del plásmido pKS(+)-HypBase

La transposasa HypBase puede remover el transposón PiggyBac una vez que se ha insertado en el genoma, y causar efectos indeseados a la célula si existen las condiciones que favorezcan su exposición prolongada, por ejemplo, la inserción espontánea de la transposasa al DNA celular, por lo cual, comúnmente la transposasa se emplea como mRNA o proteína (Chakraborty et al. 2014). Para eludir este inconveniente y evitar posible genotoxicidad por parte del plásmido pKS(+)-CAG/HypBase/bpA, el cual se utilizó para realizar los experimentos de transfección antes descritos, decidimos crear otro plásmido (pKS(+)-HypBase) a partir del cual pudiéramos generar in vitro la transposasa HypBase codificada en mRNA y luego realizar los mismos experimentos de microinyección pronuclear o células troncales embriónicas. Una vez generado el plásmido fue secuenciado, verificamos la ausencia de mutaciones y el sentido correcto de la construcción. Se están realizando los ensayos pertinentes utilizando este plásmido.

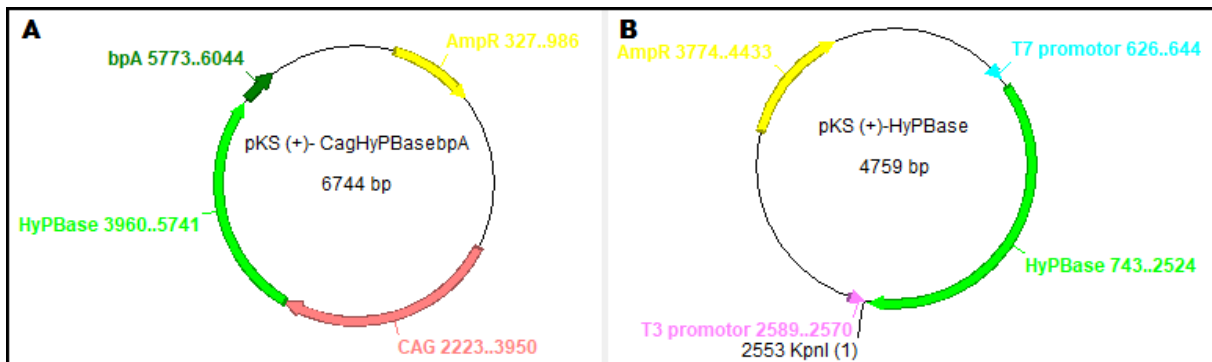


Figura 19. Plásmidos que expresan la transposasa HypBase bajo el promotor CAG (A) y bajo el promotor T7 (B). El plásmido (B) se utiliza para generar transposasa in vitro codificada en mRNA, para lo cual existe un sitio de restricción KpnI, requerido para linealizar el plásmido e interrumpir la transcripción por la RNA polimerasa T7.

Discusión

Algunos animales poseen una extraordinaria capacidad de regeneración, mientras que otros prácticamente carecen de ello. Diversos factores intrínsecos a la célula generan un estado transitorio de proliferación que sustituirán a las células perdidas, mientras que otros extrínsecos generan el ambiente para mantener tal fenómeno. Entre los últimos, es común localizar a la angiogénesis como parte de un proceso de sanación, para restituir el flujo de sangre hacia los tejidos que han sido dañados. Diversas proteínas regulan este proceso, y básicamente se agrupan en dos, pro-angiogénicos y anti-angiogénicos, el balance entre estos dos resulta en la generación de nuevos vasos sanguíneos o no.

En los ratones Tg(bK6-E6/E7) aparentemente, la regeneración de la oreja no ha alcanzado su máxima eficiencia, al parecer porque está limitada por factores adicionales que no son modificados por los oncogenes E6/E7. Para vislumbrar si durante la regeneración de la oreja en estos transgénicos existe un componente que indique la presencia de factores promotores de la angiogénesis, medimos la expresión de diversos genes que se han relacionado con este fenómeno en diferentes tejidos. Evaluamos cinco, *Agf* (Angiopoietin-related growth factor), *Ang1* (Angiopoietin 1), *Fst* (Follistatin), *Hif1 α* (Hypoxia-inducible factor 1-alpha) y *VegfA* (Vascular endothelial growth factor), de los cuales, solo *Agf* ha sido reportado como un efector robusto en la regeneración de la oreja de ratón y naturalmente su expresión está localizada en el hígado principalmente (Oike et al. 2003). El daño mostró un incremento en el cambio de expresión de los factores *Hif1 α* y *VegfA* en ratones hembra Tg(bK6-E6/E7) analizadas versus las silvestres, mientras que para *Agf*, *Ang1* y *Fst* sólo se observó una tendencia ligeramente aumentada. Las diferencias detectadas posiblemente se deben al mayor crecimiento observado en las orejas de las transgénicas, en condición de que debe demandar mayor actividad angiogénica. Es conocido que E6 indirectamente induce la acumulación de *Hif1 α* a nivel postraduccional (Tang et al. 2007); sin embargo, también se ha reportado que E7 también induce la expresión de ésta a nivel transcripcional, *in vitro* (Bodily et al. 2011). *Hif1 α* es un regulador transcripcional positivo de VEGF por lo que, los incrementos de ambos en nuestro modelo están acorde con lo reportado en la literatura. La participación crítica de la angiogénesis en la regeneración de las perforaciones en la oreja se revela en los experimentos realizados en la presencia de la ciclosporina A, un fármaco que, además de ser un inmunosupresor es también un anti-angiogénico (Hernández et al. 2001). La administración sistemática inhibió el proceso de cerrado de las perforaciones realizadas tanto en las silvestres como en las transgénicas Tg(bK6-E6/E7). Sin embargo, si

bien este resultado es acorde a lo esperado, por el momento no se puede descartar que el efecto observado también se relacione a la actividad inmunosupresora del fármaco. Un efecto similar se ha observado en el hígado al administrar angiostatina (un anti-angiogénico); en este caso la regeneración después de una hepatectomía no ocurre la regeneración en presencia de angiostatina y, por tanto, es dependiente de la angiogénesis (Drixler et al. 2002). Por mucho tiempo se consideró que la actividad inflamatoria podría ser causa de la pobre regeneración en animales (Simkin et al. 2017), en cuyo caso la ciclosporina A pudo haber incrementado la eficiencia de regeneración en nuestros ratones. Sin embargo, recientemente algunos reportes indican que factores pro-inflamatorios puede coadyuvar a una eficiente regeneración (Ding et al. 2014; Wynn TA 2017). En particular, en algunos modelos de regeneración se ha mostrado que la presencia de los macrófagos puede ser esencial para la regeneración eficiente del tejido (Godwin et al. 2013; Yun et al. 2015; Simkin et al. 2017). En este caso, la ciclosporina A en nuestros experimentos produciría un efecto inhibitorio sobre la regeneración. Inhibidores que sean específicos para la angiogénesis o para la respuesta inflamatoria serán esenciales para determinar la contribución a la regeneración de cada uno de estos procesos. Por otro lado, se observó un efecto antiregenerativo en el tratamiento con solución salina el cual posiblemente se debe a condiciones estresantes debido al tratamiento. Un fenómeno similar se presenta en los peces cebra, ya que se ha observado la atenuación de sus capacidades regenerativas en respuesta a factores paracrinós desencadenados por estrés (Sallin & Jaźwińska 2016).

Como se mencionó anteriormente una actividad persistente de oncogenes inmortalizantes o de la actividad angiogénica favorecería el desarrollo del cáncer y, por tanto, sería contrario a una eficiente regeneración. Nosotros nos propusimos incrementar estas dos actividades, pero de manera transitoria tal que el tejido se restaure correctamente. Para estimular un fenómeno proliferativo y angiogénico transitorio, y así mejorar la eficiencia de la regeneración en un modelo mamífero, nos planteamos generar un sistema que nos permitiera modular la expresión ubicua de los oncogenes E6/E7 y de AGF en un ratón transgénico. Actualmente existen diversos sistemas inducibles que nos permitirían lograr tal objetivo. En células eucariotas se han descrito varios que responden a diferentes estímulos como las hormonas; sin embargo, éstas poseen actividad biológica intrínseca por lo que los efectos del transgén podrían ser confundidos con los efectos de la molécula inductora. Para evitar esta respuesta cruzada, se ha preferido adaptar los sistemas inducibles bacteriales a células eucariotas. Uno de los preferidos en investigación en mamíferos es el sistema TET del cual existen dos variantes, TET-Off si el gen de interés es reprimido o TET-On si es

activado en presencia de tetraciclina. En general el sistema ha mostrado ser eficiente, resultando en altos niveles de inducción y/o represión. El transposón piggyBac ha sido utilizado en diversas aplicaciones, desde generar líneas celulares hasta la producción de roedores transgénicos (Woodard & Wilson 2015). Varios transgenes junto con secuencias regulatorias han sido contenidos entre las dos secuencias ITRs del transposón. Las principales virtudes de utilizar transposones para la transgénesis, no es solo la expectativa de tener una mayor eficiencia a la convencional usando fragmentos plasmídicos sino, además, dado que la inserción se lleva a cabo preferente en secuencias intragénicas e intrones, la posibilidad de tener los transgenes silenciados en ausencia de doxiciclina y solo activos en su presencia es mayor (Li et al. 2016).

En el presente estudio generamos dos plásmidos TET-On, uno contiene los genes E6/E7 y otro el AGF, ambos dentro de un transposón piggyBac. La integridad de los plásmidos se evaluó por secuenciación. Para mostrar que nuestras construcciones son inducibles, transfectamos células HEK293 con los plásmidos antes mencionados exponiéndolas a doxiciclina en una concentración de 1.5 µg/mL de medio. Se observó cualitativamente la expresión de los transgenes respecto a las no inducidas; este efecto se observó incluso cuando el plásmido se encontraba de forma episomal (transfección sin transposasa). Con el interés de incrementar la velocidad del ciclo celular que, es una de las consecuencias esperadas por la inducción de los oncogenes E6/E7, se transfectaron células HeLa. La inducción dio a lugar a un fenómeno inesperado, donde las células al estar expuestas a doxiciclina perdían adherencia a la caja, misma que se restituyó al retirarle la doxiciclina. Este resultado parece deberse a que los oncogenes en este contexto detienen el ciclo celular en la fase G2. Se ha mostrado que el oncogén E7 es suficiente para frenar el ciclo celular prolongando la fase G2 ya que, inhibe la acumulación nuclear del complejo CDK1/CiclinaB1, el cual es necesario para su progresión (Banerjee et al. 2011). Esta actividad es común en muchos virus y parece correlacionar con el incremento de la capacidad de producción proteica de la célula (Davy & Doorbar 2007) y el requerimiento que tiene el HPV para incrementar la replicación del genoma viral (Wang et al. 2009), así como mejorar la eficiencia de producción de viriones (Davy et al. 2005), lo cual únicamente puede ocurrir cuando las células están en fase G2. Aunque este ensayo no mostró el efecto típico de los oncogenes en este contexto celular, evidencia la pérdida o ganancia de función en respuesta a doxiciclina, dado que el transgén proveniente del transposon se detecta y es claramente diferenciado del endógeno por provenir del VPH tipo 16.

El transposón PB-E6/E7 se microinyectó en presencia de un plásmido que codifica para transposasa HypBase en el pronúcleo de ovocitos fertilizados, para generar ratones transgénicos. Las cantidades de DNA en la transgénesis de roedores son típicamente 2 ng/ μ L del plásmido PiggyBac y hasta 15 ng/ μ L de transposasa resultando en eficiencias que van desde 1.7 a 34.8% (Tabla 3). Cantidades que varían desde 2 ng/ μ L hasta 10 ng/ μ L y ratios de 2:1 a 10:1 se utilizaron en los ensayos realizados en el presente trabajo; sin embargo, no resultaron en nacimiento de ratones transgénicos. La función de la transposasa se vuelve esencial hasta que el transposón se ha integrado dentro del genoma; luego de este evento, si la transposasa sigue presente el transposón continuará movilizándose, incrementando la posibilidad que cause mutagénesis por inserción, o una respuesta de reparación que lleve a las células a la muerte. Frecuentemente se ha utilizado la transposasa codificada en un RNA recombinante o en forma proteínica, ya que disminuye la presencia prolongada o integración espontánea de la transposasa contenida en plásmidos (Chakraborty et al. 2014; Urschitz et al. 2010). En nuestros ensayos utilizamos una transposasa contenida en un plásmido superenrollado, el cual muestra una muy baja eficiencia de integración. Sin embargo, alcanzamos a observar que los plásmidos superenrollados llegan a mantenerse hasta la etapa de blastocisto, lo que implicaría para el caso de la transposasa, que ésta se mantendría expresando por más divisiones de las necesarias. Hemos disminuido la transposasa hasta 50:1 y aunque aparentemente todavía hubo integración del transposón desconocemos la eficiencia y si aún el plásmido superenrollado en esa cantidad todavía puede causar complicaciones. Recientemente se construyó un plásmido para utilizarlo en un sistema de síntesis de RNA *in vitro*.

Por otro lado, se generaron líneas de células troncales embrionarias con el fin de que se utilizaran para producir ratones quiméricos y que, mediante la contribución a la línea germinal del transposón, generar ratones transgénicos. Las líneas cumplieron con los mínimos requerimientos, en cuanto a la morfología y cariotipos por lo que se procedió a generar las quimeras. Sin embargo, solo se detectó un nacimiento con el 1% de quimerismo. Aunque el sistema TET-On posee varias ventajas sobre otros sistemas inducibles como el alto grado de control de la expresión del gen de interés, este no es absoluto. Se ha reportado la existencia de expresión fuga, es decir, expresión del gen de interés en ausencia de doxiciplina. Diversos factores pueden estar asociados a este fenómeno, como la reminiscente afinidad del rtTA al promotor TRE en ausencia de doxiciplina, secuencias adyacentes al sitio de inserción en el genoma como elementos regulatorios, o una mínima actividad del promotor TRE (Johansen et al. 2002). Nosotros determinamos la expresión de

nuestros genes de interés en las líneas W9.5-E6/E7 generadas, en ausencia de doxiciclina. Se observó evidencia de la presencia de los transcritos de los oncogenes, es decir de expresión fuga en todas las líneas. Bajo esta condición, la traducción de los oncogenes podría estar afectando un proceso efectivo de diferenciación celular en las líneas generadas y, por tanto, embriones no viables. No obstante, lo anterior, como se mostró en los experimentos de transfección en células HeLa y de la experiencia de otros miembros del grupo, la expresión fuga parece ser muy baja, respecto a la inducida. Además, de mantener una actividad importante de los oncogenes, se esperaría un fenotipo, el cual no se observó en condiciones de mantenimiento de ES como en condiciones de diferenciación. Más estudios serán necesarios para explicar los resultados obtenidos en las células troncales embrionarias.

Conclusiones

- Factores proangiogénicos cooperan con los oncogenes E6/E7 durante la regeneración en el transgénico Tg(bK6-E6/E7).
- La expresión de genes que codifican para factores pro-angiogénicos se incrementó durante la regeneración, con una moderada mayor expresión en los ratones Tg(bK6-E6/E7).
- La regeneración de la oreja en el ratón silvestre y transgénico Tg(bK6-E6/E7) es inhibida por la ciclosporina A.
- Generamos los transposones PB-E6/E7 y PB-AGF. Ambos fueron funcionales a nivel de su expresión. Actividad de E6/E7 se observó en células HeLa, pero esta no se asocia a un incremento en la proliferación celular.
- Generamos cuatro líneas de células troncales embrionarias que expresan de forma estable los oncogenes E6/E7 (W9.5-E6/E7) en ausencia de doxiciclina.
- No se han logrado obtener el nacimiento de los ratones transgénicos ni por inyección pronuclear, ni por la generación de quimeras. Posiblemente al efecto “tóxico” de la expresión fuga los oncogenes E6/E7 o genotoxicidad provocada por la transposasa.

Perspectivas

- Es posible obtener aún más evidencia sobre la cooperación de los oncogenes E6/E7 y AGF en otros contextos de crecimiento tisular. Por ejemplo, se pueden generar teratomas *in vivo* en ratones desnudos, que se les ha implantado células W9.5-E6/E7 y W9.5-AGF. Se esperaba que los tumores formados fueran de mayor tamaño y más agresivos en presencia de ambos factores.
- Es posible transfectar plásmidos *in vivo*, sin embargo, la eficiencia es muy baja y la capacidad de penetración es distinta en los diversos tejidos de una estructura compleja. De no lograr la generación de ratones transgénicos, esta es una opción, aunque no ideal, es viable.
- Generar los ratones transgénicos E6/E7, AGF y E6/E7-AGF por microinyección o la transfección de células embrionarias, de los transposones correspondientes y un RNA sintetizado *in vitro* que codifica para la transposasa.
- Determinar la “toxicidad” de la expresión basal de E6/E7 en células troncales embrionarias para apoyar este evento como posible causa de la inviabilidad de los ratones transgénicos.
- De demostrarse la actividad tóxica de niveles basales de E6/E7, diseñar un sistema de activación transcripcional basados en el sistema Cre-Lox en locus Rosa26.
- De lograr obtener los ratones transgénicos referidos, ensayar *in vivo* la capacidad de regeneración de la oreja en los ratones transgénicos E6/E7, AGF y E6/E7-AGF.

Referencias

- Aoki, F. & Kojima, I., 2007. Therapeutic potential of follistatin to promote tissue regeneration and prevent tissue fibrosis. *Endocr J*, 54(6), pp.849–854.
- Arthur, L.M. et al., 2010. Epimorphic regeneration in mice is p53-independent. *Cell Cycle*, 9(18), pp.3667–3673.
- Banerjee, N.S. et al., 2011. Human papillomavirus (HPV) E7 induces prolonged G2 following S phase reentry in differentiated human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 286(17), pp.15473–15482.
- Bao, X. et al., 2015. The p53-induced lincRNA-p21 derails somatic cell reprogramming by sustaining H3K9me3 and CpG methylation at pluripotency gene promoters. *Cell research*, 25(1), pp.80–92.
- Barrangou, R. & Doudna, J.A., 2016. Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nature Biotechnology*, 34(9), pp.933–941.
- Bednarek, D. et al., 2015. Telomerase Is Essential for Zebrafish Heart Regeneration. *Cell Reports*, 12(10), pp.1691–1703.
- Bely, A.E. & Nyberg, K.G., 2010. Evolution of animal regeneration: re-emergence of a field. *Trends in Ecology and Evolution*, 25(3), pp.161–170.
- Bertoli, C., Skotheim, J.M. & de Bruin, R.A.M., 2013. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 14(8), pp.518–28.
- Bockhorn, M. et al., 2007. VEGF is Important for Early Liver Regeneration After Partial Hepatectomy. *Journal of Surgical Research*, 138(2), pp.291–299.
- Bodily, J.M., Mehta, K.P.M. & Laimins, L.A., 2011. Human papillomavirus E7 enhances hypoxia-inducible factor 1-mediated transcription by inhibiting binding of histone deacetylases. *Cancer Research*, 71(3), pp.1187–1195.
- Bosch, T.C.G., 2007. Why polyps regenerate and we don't: Towards a cellular and molecular framework for Hydra regeneration. *Developmental Biology*, 303(2), pp.421–433.
- Buckley, G. et al., 2012. Denervation affects regenerative responses in MRL/MpJ and repair in C57BL/6 ear wounds. *Journal of Anatomy*, 220(1), pp.3–12.
- Camarda, G. et al., 2004. A pRb-independent mechanism preserves the postmitotic state in terminally differentiated skeletal muscle cells. *Journal of Cell Biology*, 167(3), pp.417–423.
- Chakraborty, S. et al., 2014. Vector modifications to eliminate transposase expression following piggyBac-mediated transgenesis. *Scientific reports*, 4, p.7403.
- Cho, C. et al., 2006. COMP-angiopoietin-1 promotes wound healing through enhanced

- angiogenesis, lymphangiogenesis, and blood flow in a diabetic mouse model. *Proc . Natl . Acad . Sci . USA*, 103(26), pp.4946–4951.
- Cho, H. et al., 2016. Targeted Genome Engineering to Control VEGF Expression in Human Umbilical Cord Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells: Potential Implications for the Treatment of Myocardial Infarction. *STEM CELLS Translational Medicine*.
- Cho, Y. et al., 2015. Activating Injury-Responsive Genes with Hypoxia Enhances Axon Regeneration through Neuronal HIF-1 α . *Neuron*, 88(4), pp.720–734.
- Choi, Y.J. et al., 2011. miR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nature Cell Biology*, 13(11), pp.1353–1360.
- Chung, A.S. & Ferrara, N., 2011. Developmental and pathological angiogenesis. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, pp.563–84.
- Cid, A. et al., 1993. Cell-type-specific activity of the human papillomavirus type 18 upstream regulatory region in transgenic mice and its modulation by tetradecanoyl phorbol acetate and glucocorticoids. *Journal of Virology*, 67(11), pp.6742–6752.
- Clark, L.D., Clark, R.K. & Heber-Katz, E., 1998. A new murine model for mammalian wound repair and regeneration. *Clinical immunology and immunopathology*, 88(1), pp.35–45.
- Corral, C.J. et al., 1999. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. *Archives of surgery*, 134(2), pp.200–205.
- Dalton, S., 2015. Linking the Cell Cycle to Cell Fate Decisions. *Trends in Cell Biology*, 25(10), pp.592–600.
- Davy, C. & Doorbar, J., 2007. G2/M cell cycle arrest in the life cycle of viruses. *Virology*, 368(2), pp.219–226.
- Davy, C.E. et al., 2005. Human papillomavirus type 16 E1 E4-induced G2 arrest is associated with cytoplasmic retention of active Cdk1/cyclin B1 complexes. *Journal of virology*, 79(7), pp.3998–4011.
- Dijke, P. Ten et al., 2002. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *Journal of Cellular Physiology*, 191(1), pp.1–16.
- Ding, B.-S. et al., 2014. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance liver regeneration and fibrosis. *Nature*, 505(7481), pp.97–102.
- Ding, S. et al., 2005. Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. *Cell*, 122(3), pp.473–483.
- Doorbar, J., 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110(5), pp.525–541.

- Drake, C.J., 2003. Embryonic and adult vasculogenesis. *Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews*, 69(1), pp.73–82.
- Drixler, T.A. et al., 2002. Liver Regeneration Is an Angiogenesis- Associated Phenomenon. *Annals of Surgery*, 236(6), pp.703–712.
- Eichmann, A. et al., 2005. Vascular development: From precursor cells to branched arterial and venous networks. *International Journal of Developmental Biology*, 49(2–3 SPEC. ISS.), pp.259–267.
- Escalante-Alcalde, D. et al., 2000. Expression of E6 and E7 papillomavirus oncogenes in the outer root sheath of hair follicles extends the growth phase and bypasses resting at telogen. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 11(10), pp.527–39.
- Frade, J.M. & Ovejero-Benito, M.C., 2015. Neuronal cell cycle: The neuron itself and its circumstances. *Cell Cycle*, 14(5), pp.712–720.
- Galliot, B. & Chera, S., 2010. The Hydra model: Disclosing an apoptosis-driven generator of Wnt-based regeneration. *Trends in Cell Biology*, 20(9), pp.514–523.
- García, C. et al., 2017. E6/E7 oncogenes in epithelial suprabasal layers and estradiol promote cervical growth and ear regeneration. *Oncogenesis*, 6(8), p.e374.
- Godwin, J.W., Pinto, A.R. & Rosenthal, N.A., 2013. Macrophages are required for adult salamander limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(23), pp.9415–20.
- Gonzales, K.A.U. et al., 2015. Deterministic Restriction on Pluripotent State Dissolution by Cell-Cycle Pathways. *Cell*, 162(3), pp.564–579.
- Gossen, M. & Bujard, H., 1992. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(12), pp.5547–51.
- Graf, T. & Enver, T., 2009. Forcing cells to change lineages. *Nature*, 462(7273), pp.587–594.
- Green, J.E. & Ried, T., 2012. Genetically engineered mice for cancer research: Design, analysis, pathways, validation and pre-clinical testing. *Genetically Engineered Mice for Cancer Research: Design, Analysis, Pathways, Validation and Pre-Clinical Testing*, pp.1–632.
- Guo, S. et al., 2014. Nonstochastic reprogramming from a privileged somatic cell state. *Cell*, 156(4), pp.649–662.
- Hacker, S. et al., 2016. Paracrine Factors from Irradiated Peripheral Blood Mononuclear Cells Improve Skin Regeneration and Angiogenesis in a Porcine Burn Model. *Scientific*

- reports*, 6(April), p.25168.
- Harty, M. et al., 2003. Regeneration or scarring: An immunologic perspective. *Developmental Dynamics*, 226(2), pp.268–279.
- He, G. et al., 2005. Induction of p21 by p53 following DNA damage inhibits both Cdk4 and Cdk2 activities. *Oncogene*, 24(18), pp.2929–43.
- Heber-Katz, E., 1999. The regenerating mouse ear. *Seminars in cell & developmental biology*, 10, pp.415–419.
- Herber, R. et al., 1996. Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *Journal of virology*, 70(3), pp.1873–81.
- Hernández, G.L. et al., 2001. Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-mediated Angiogenesis by Cyclosporin A: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2. , 193(5).
- Hesse, R.G. et al., 2015. The human ARF tumor suppressor senses blastema activity and suppresses epimorphic tissue regeneration. *eLife*, 4(NOVEMBER2015), pp.1–23.
- Hickey, M.M. & Simon, M.C., 2006. Regulation of Angiogenesis by Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors. *Current Topics in Developmental Biology*, 76(6), pp.217–257.
- Hindley, C. & Philpott, A., 2012. Co-ordination of cell cycle and differentiation in the developing nervous system. *Biochemical Journal*, 444(3), pp.375–382.
- Hong, H. et al., 2009. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway. *Nature*, 460(7259), pp.1132–1135.
- Hu, M. et al., 2013. Efficient production of chimeric mice from embryonic stem cells injected into 4- to 8-cell and blastocyst embryos. *Journal of animal science and biotechnology*, 4(1), p.12.
- Jeansson, M. et al., 2011. Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(11).
- Johansen, J. et al., 2002. Evaluation of Tet-on system to avoid transgene down-regulation in ex vivo gene transfer to the CNS. *Gene therapy*, 9(19), pp.1291–1301.
- Johnson, E.A. & Singer, M., 1962. A Histochemical Study of Succinic and Lactic Dehydrogenases in the Regenerating Forelimb of the Adult Newt, *Triturus*. *Experimental Biology and Medicine*.
- Jopling, C. et al., 2010. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*, 464(7288), pp.606–9.
- Jung, C.J. et al., 2016. Comparative Analysis of piggyBac, CRISPR/Cas9 and TALEN

- Mediated BAC Transgenesis in the Zygote for the Generation of Humanized SIRPA Rats. *Scientific reports*, 6(August), p.31455.
- Kaneda, H. et al., 2011. Activin A inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumour angiogenesis in gastric cancer. *British journal of cancer*, 105(8), pp.1210–1217.
- Kang, J. et al., 2016. Modulation of tissue repair by regeneration enhancer elements. *Nature*, 532(7598), pp.201–6.
- Kareta, M.S. et al., 2015. Inhibition of pluripotency networks by the Rb tumor suppressor restricts reprogramming and tumorigenesis. *Cell Stem Cell*, 16(1), pp.39–50.
- Katter, K. et al., 2013. Transposon-mediated transgenesis, transgenic rescue, and tissue-specific gene expression in rodents and rabbits. *FASEB Journal*, 27(3), pp.930–941.
- Kishimoto, J. et al., 2000. In vivo detection of human vascular endothelial growth factor promoter activity in transgenic mouse skin. *Am J Pathol*, 157(1), pp.103–110.
- Koh, G.Y., 2013. Orchestral actions of angiopoietin-1 in vascular regeneration. *Trends in Molecular Medicine*, 19(1), pp.31–39.
- Kolostova, K. et al., 2012. Tissue repair driven by two different mechanisms of growth factor plasmids VEGF and NGF in mice auricular cartilage: Regeneration mediated by administering growth factor plasmids. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(7), pp.1763–1770.
- Kragl, M. et al., 2009. Cells keep a memory of their tissue origin during axolotl limb regeneration. *Nature*, 460(7251), pp.60–65.
- Kumar, A. et al., 2007. Molecular basis for the nerve dependence of limb regeneration in an adult vertebrate. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5851), pp.772–777.
- Lee, J. et al., 2013. SDF-1/CXCR4 signaling mediates digit tip regeneration promoted by BMP-2. *Developmental Biology*, 382(1), pp.98–109.
- Li, T. et al., 2016. Efficient Production of Fluorescent Transgenic Rats using the piggyBac Transposon. *Scientific Reports*, 6, p.33225.
- Li, V.C. & Kirschner, M.W., 2014. Molecular ties between the cell cycle and differentiation in embryonic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(26), pp.9503–8.
- Ma, J. et al., 2016. Exosomes Derived From Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. *Stem cells translational medicine*, pp.1–9.
- Maeno, H. et al., 2005. Expression of hypoxia inducible factor-1 during liver regeneration induced by partial hepatectomy in rats. *Liver International*, 25(5), pp.1002–1009.

- Malumbres, M. & Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature reviews. Cancer*, 9(3), pp.153–166.
- Matias Santos, D. et al., 2016. Ear wound regeneration in the African spiny mouse *Acomys cahirinus*. *Regeneration*, 3(1), pp.52–61.
- McCusker, C., Bryant, S. V. & Gardiner, D.M., 2015. The axolotl limb blastema: cellular and molecular mechanisms driving blastema formation and limb regeneration in tetrapods. *Regeneration*, 2(2), pp.54–71.
- McGann, C.J., Odelberg, S.J. & Keating, M.T., 2001. Mammalian myotube dedifferentiation induced by newt regeneration extract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(24), pp.13699–704.
- Mendelson, A. & Frenette, P.S., 2014. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nature medicine*, 20(8), pp.833–846.
- Merrell, A.J. & Stanger, B.Z., 2016. Adult cell plasticity in vivo: de-differentiation and transdifferentiation are back in style. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, (March).
- Mofarrahi, M. et al., 2015. Angiopoietin-1 enhances skeletal muscle regeneration in mice. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*, 308(7), p.ajpregu.00267.2014.
- Moody, C.A. & Laimins, L.A., 2010. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nature Reviews Cancer*, 10(8), pp.550–560.
- Oike, Y. et al., 2004. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes angiogenesis. *Blood*, 103(10), pp.3760–3765.
- Oike, Y. et al., 2003. Angiopoietin-related growth factor (AGF) promotes epidermal proliferation, remodeling, and regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(16), pp.9494–9.
- Orth, P. et al., 2000. Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. *Nature structural biology*, 7(3), pp.215–9.
- Otrock, Z.K. et al., 2007. Understanding the biology of angiogenesis: Review of the most important molecular mechanisms. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 39(2), pp.212–220.
- Pajcini, K. V. et al., 2010. Transient inactivation of Rb and ARF yields regenerative cells from postmitotic mammalian muscle. *Cell Stem Cell*, 7(2), pp.198–213.
- Polager, S. & Ginsberg, D., 2009. p53 and E2f: partners in life and death. *Nature reviews. Cancer*, 9(10), pp.738–748.
- Pomerantz, J.H. & Blau, H.M., 2013. Tumor suppressors: enhancers or suppressors of

- regeneration? *Development (Cambridge, England)*, 140(12), pp.2502–12.
- Poss, K.D., Wilson, L.G. & Keating, M.T., 2002. Heart regeneration in zebrafish. *Science*, 298(5601), pp.2188–2190.
- Potente, M., Gerhardt, H. & Carmeliet, P., 2011. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis. *Cell*, 146(6), pp.873–887.
- Quijano, L. et al., 2015. Looking ahead to engineering epimorphic regeneration of a human digit or limb. *Tissue Engineering Part B: Reviews*, 22(1), pp.1–39.
- Rafii, S., Butler, J.M. & Ding, B.-S., 2016. Angiocrine functions of organ-specific endothelial cells. *Nature*, 529(7586), pp.316–325.
- Ramasamy, S.K., Kusumbe, A.P. & Adams, R.H., 2015. Regulation of tissue morphogenesis by endothelial cell-derived signals. *Trends in Cell Biology*, 25(3), pp.148–157.
- Roccio, M. et al., 2013. Predicting stem cell fate changes by differential cell cycle progression patterns. *Development*, 140(2), pp.459–470.
- Rothnagel, J.A. et al., 1999. The mouse keratin 6 isoforms are differentially expressed in the hair follicle, footpad, tongue and activated epidermis. *Differentiation*, 65(2), pp.119–130.
- Sallin, P. & Jaźwińska, A., 2016. Acute stress is detrimental to heart regeneration in zebrafish. *Open biology*, 6(3), p.160012-.
- Shibuya, M., 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, 2(12), pp.1097–1105.
- Shyh-Chang, N. et al., 2013. XLin28 enhances tissue repair by reprogramming cellular metabolism. *Cell*, 155(4), pp.778–792.
- Simkin, J. et al., 2017. Macrophages are necessary for epimorphic regeneration in African spiny mice. *eLife*, 6, pp.1–26.
- Simões, M.G. et al., 2014. Denervation impairs regeneration of amputated zebrafish fins. *BMC developmental biology*, 14(1), p.780.
- Singh, A.M. et al., 2015. Cell-Cycle Control of Bivalent Epigenetic Domains Regulates the Exit from Pluripotency. *Stem Cell Reports*, 5(3), pp.323–336.
- Song, S., Pitot, H.C. & Lambert, P.F., 1999. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals. *Journal of virology*, 73(7), pp.5887–93.
- Stewart, R. et al., 2013. Comparative RNA-seq Analysis in the Unsequenced Axolotl: The Oncogene Burst Highlights Early Gene Expression in the Blastema. *PLoS Computational Biology*, 9(3).

- Stocum, D., 2006. An Overview of Regenerative Biology and Medicine. *Regenerative Biology and Medicine*, pp.1–20.
- Strauss, R. et al., 2012. Regulation of Stem Cell Plasticity: Mechanisms and Relevance to Tissue Biology and Cancer. *Molecular Therapy*, 20(5), pp.887–897.
- Sun, X. et al., 2016. Suppression of the SWI/SNF Component Arid1a Promotes Mammalian Regeneration. *Cell Stem Cell*, 18(4), pp.456–466.
- Takahashi, K. & Yamanaka, S., 2006. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126(4), pp.663–676.
- Tanaka, E.M. et al., 1997. Newt myotubes reenter the cell cycle by phosphorylation of the retinoblastoma protein. *Journal of Cell Biology*, 136(1), pp.155–165.
- Tang, X. et al., 2007. Overexpression of human papillomavirus type 16 oncoproteins enhances hypoxia-inducible factor 1 alpha protein accumulation and vascular endothelial growth factor expression in human cervical carcinoma cells. *Clin Cancer Res*, 13(9), pp.2568–2576.
- Tata, P.R. et al., 2013. Dedifferentiation of committed epithelial cells into stem cells in vivo. *Nature*, 503(7475), pp.218–23.
- Thompson, T.B. et al., 2005. The structure of the follistatin: Activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Developmental Cell*, 9(4), pp.535–543.
- Tiniakos, D.G., Kandilis, A. & Geller, S.A., 2010. Tityus: A forgotten myth of liver regeneration. *Journal of Hepatology*, 53(2), pp.357–361.
- Tsonis, P.A. et al., 2004. A newt's eye view of lens regeneration. *International Journal of Developmental Biology*, 48(8–9), pp.975–980.
- Urschitz, J. et al., 2010. Helper-independent piggyBac plasmids for gene delivery approaches: Strategies for avoiding potential genotoxic effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(18), pp.8117–8122.
- Utikal, J. et al., 2009. Immortalization eliminates a roadblock during cellular reprogramming into iPS cells. *Nature*, 460(7259), pp.1145–1148.
- Vaisman, B.L., 2013. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease*, Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60327-369-5>.
- Valencia, C. et al., 2008. Human papillomavirus E6/E7 oncogenes promote mouse ear regeneration by increasing the rate of wound re-epithelization and epidermal growth. *The Journal of investigative dermatology*, 128(12), pp.2894–903.
- Vasudev, N.S. & Reynolds, A.R., 2014. Anti-angiogenic therapy for cancer: Current progress,

- unresolved questions and future directions. *Angiogenesis*, 17(3), pp.471–494.
- Venkatesh, N. et al., 2004. Chemical genetics to identify NFAT inhibitors: potential of targeting calcium mobilization in immunosuppression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(24), pp.8969–8974.
- Vivek, R. & Post, A.L.M., 2017. Impact of hypoxia induced VEGF and its signaling during caudal fin regeneration in Zebrafish.
- Wang, H. et al., 2015. Turning terminally differentiated skeletal muscle cells into regenerative progenitors. *Nature communications*, 6, p.7916.
- Wang, H.K. et al., 2009. Robust production and passaging of infectious HPV in squamous epithelium of primary human keratinocytes. *Genes and Development*, 23(2), pp.181–194.
- Wick, G. et al., 2013. *The Immunology of Fibrosis*.
- Woodard, L.E. & Wilson, M.H., 2015. PiggyBac-ing models and new therapeutic strategies. *Trends in Biotechnology*, 33(9), pp.525–533.
- Wynn TA, M.P.E.S., 2017. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science*, 356(6342), pp.1026–1030.
- Yamada, K. et al., 2015. CXCL12-CXCR7 axis is important for tumor endothelial cell angiogenic property. *International Journal of Cancer*, 137(12), pp.2825–2836.
- Yang, Y. et al., 2013. HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(5), pp.967–974.
- Yum, S.-Y. et al., 2016. Efficient generation of transgenic cattle using the DNA transposon and their analysis by next-generation sequencing. *Scientific reports*, 6(January), p.27185.
- Yun, M., Gates, P. & Brockes, J.P., 2013. Regulation of p53 is critical for vertebrate limb regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(43), pp.17392–17397.
- Yun, M.H., Davaapil, H. & Brockes, J.P., 2015. Recurrent turnover of senescent cells during regeneration of a complex structure. *eLife*, 4, p.e05505.
- Zhang, N. et al., 2008. Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse Tracking angiogenesis induced by skin wounding and contact hypersensitivity using a Vegfr2-luciferase transgenic mouse. , 103(2), pp.617–626.
- Zhang, Y. et al., 2010. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes. *PLoS ONE*, 5(9), pp.1–13.

- Zhang, Y. et al., 2015. Drug-induced regeneration in adult mice. , 7(290).
- Zhao, L., Ng, E.T. & Koopman, P., 2014. A piggyBac transposon- and gateway-enhanced system for efficient BAC transgenesis. *Developmental Dynamics*, 243(9), pp.1086–1094.
- Zhu, J. et al., 2011. Follistatin improves skeletal muscle healing after injury and disease through an interaction with muscle regeneration, angiogenesis, and fibrosis. *American Journal of Pathology*, 179(2), pp.915–930.