

Nuevo método de reprogramación celular para obtener células madre pluripotentes a partir de células somáticas descubierto por investigadores de la Universidad de Pekín

Dra. Lilia Cruz de Montbrun

Individuo de Número

e-mail: lcruz987@gmail.com

RESUMEN

Se reseña la publicación de un importante trabajo donde se reporta el éxito obtenido por científicos chinos utilizando sustancias de bajo tamaño molecular, que actúan como reguladores de enzimas y de procesos bioquímicos de señalización, en la reprogramación de células diferenciadas de ratón para convertirlas en células madre pluripotentes similares a las células madre embrionarias y a las células madre pluripotentes inducidas por genes de factores de transcripción. Se hace referencia a las publicaciones previas de los investigadores que lograron por primera vez el mismo propósito con diferentes métodos. Se comentan las ventajas del nuevo método.

Palabras clave: Reprogramación celular. Reprogramación química. Células madre pluripotentes inducidas. Células madre pluripotentes inducidas químicamente.

SUMMARY

This is a review of an important publication by Chinese scientists about the successful reprogramming of differentiated murine cells to pluripotent stem cells that resemble embryonic stem cells using small-molecule compounds that act as regulators of enzymes and signaling pathways. Reference is made of previous publications by researchers who achieved for the first time the same goal by different methods. Comments on the advantages of the new method are included.

Key words: Cell reprogramming. Chemical reprogramming. Induced pluripotent stem cells. Chemically induced pluripotent stem cells

El 18 de julio de 2013 fue publicado en Scienceexpress un importante trabajo realizado por un grupo de 15 investigadores dirigidos por Hongkui Deng (1) de la Universidad de Peking, Beijing, China. Lograron obtener células madre pluripotentes reprogramando fibroblastos embrionarios, neonatales y adultos y células del tejido adiposo de ratón con combinaciones de siete sustancias químicas de pequeño tamaño molecular. Fueron denominadas “chemically induced pluripotent stem cells” (CiPSCs), nombre que traduzco al español como células madre pluripotentes inducidas químicamente (CMPiQ).

Después de probar 10 000 sustancias químicas de pequeño tamaño molecular encontraron siete que, administradas con una secuencia apropiada, les permitieron obtener las CMPiQ en forma satisfactoria. Cuatro de ellas son indispensables para lograr la reprogramación de los fibroblastos, pues en su ausencia no se produce reprogramación: CHIR99021 (CHIR) (C), inhibidor de la glucógeno-sintetasa cinasa 3; 616452, inhibidor del factor de crecimiento transformador-beta; forskolin, forskolina (FSK) (F), agonista del AMP cíclico y 3-deazaneplanocin A, o DZNep (Z), inhibidor de la hidrolasa de S-adenosilhomocisteína. La combinación de estas cuatro sustancias (C6FZ) fue capaz de inducir la formación de CMPiQ a partir de fibroblastos embrionarios y adultos de ratón.

NUEVO MÉTODO DE REPROGRAMACIÓN CELULAR

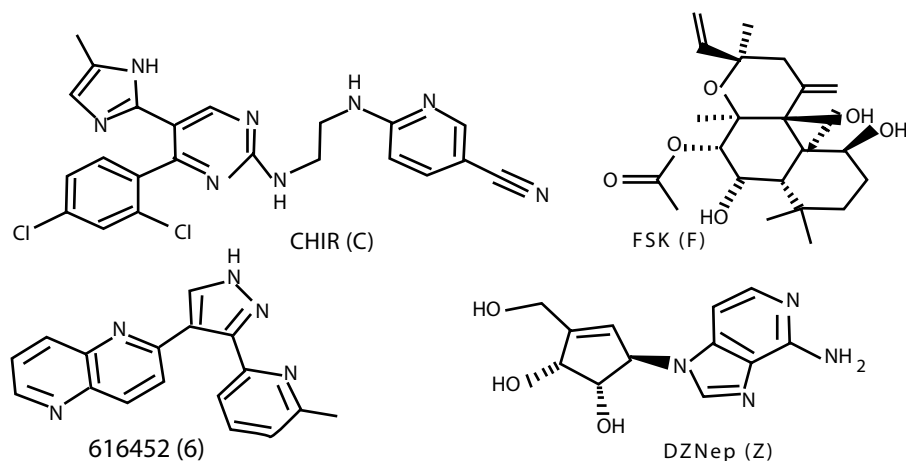


Figura 1. Estructura molecular de las cuatro sustancias indispensables para la reprogramación de células somáticas a células madre pluripotentes inducidas químicamente (CMPiQ) (1).

Con la incorporación de ácido valproico (V), inhibidor de las deacetilasas de histona, *tranylcypromine* o tranilcipromina (T), inhibidora de la demetilación de H3K4, (combinación VC6TFZ) y un ligando sintético del receptor de ácido retinoico (TTNPB) se logra aumentar la eficiencia del proceso a 0,2 %, lo cual significa que se produce 1 colonia de CMPiQ por cada 500 fibroblastos tratados, cifra que es similar a la que alcanzan con el uso de genes de los factores de transcripción de Yamanaka: *Oct 4*, *Sox2*, *Klf4* y *cMyc*,

La reprogramación ocurre progresivamente en los fibroblastos que crecen y se dividen en el medio de cultivo contenido de los químicos reprogramadores (Figura 2). La desdiferenciación avanza hasta que se

forman colonias de células de aspecto epitelioide, que expresan el marcador GFP de color verde, asociado a la expresión del factor de transcripción Oct4, fundamental para la pluripotencia. Estas células expresan la mayoría de los marcadores de las células embrionarias pero en cantidad menor, pues están incompletamente reprogramadas. La reprogramación fue completada y estabilizada al colocarlas durante 12 días en el medio 2i que produce la inhibición dual de la glucógeno-sintetasa-cinasa-3 y de la señalización relacionada con la cinasa de proteínas activada por mitógenos (2). Así lograron CMPiQ estables, similares a las células madre embrionarias y a las CMP inducidas por *Oct 4*, *Sox2*, *Klf4* y *cMyc* en sus perfiles de expresión genética, estado epigenético,

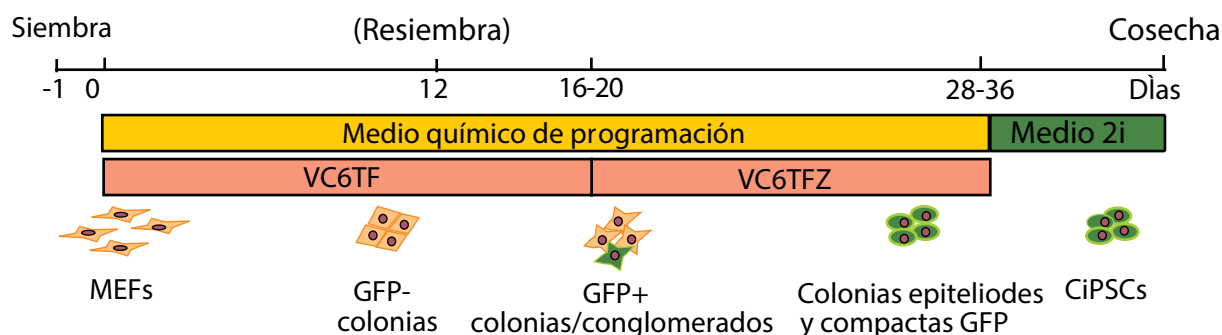


Figura 2. Pasos en el proceso de reprogramación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) *in vitro* por sustancias químicas de molécula pequeña. Tarda 40 días. Durante los primeros 16 días el medio contiene cinco sustancias (VC6TF). El día 16 se agrega Z. El día 28 se cambia el medio de cultivo colocando las células en el medio 2i y a los 40 días se cosechan las CMPiQ. Las células completan su desdiferenciación y se estabilizan en el medio 2i (1).

potencial de diferenciación y transmisión por la línea germinal. Conservaron su integridad cromosómica en 13 pasajes y generaron quimeras 100 % viables (6 meses de estudio).

La inducción de pluripotencia en células somáticas por factores definidos se conoció en el año 2006 cuando el grupo de Shinya Yamanaka en Japón publicó por primera vez (3) la reprogramación de fibroblastos a células madre pluripotentes inducidas (CMPi) por solo 4 genes de factores de transcripción insertados con vectores retrovirales, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *cMyc* (OSKM), también llamados factores de Yamanaka en su honor. En el año 2009 Shen Ding y su equipo en California, Estados Unidos, utilizó los factores de transcripción proteicos Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc (OSKM) unidos a péptidos penetrantes (poliarginina de 11 residuos) y obtuvo células madre pluripotentes inducidas por proteínas CMPip (4). En 2010 Derrick Rossi y sus colegas de la Universidad de Harvard, produjeron CMP inducidas por ácidos ribonucleicos mensajeros modificados codificadores de los mismos factores OSKM y Lin 28 (CMPiR) (5). Mucho antes, en 1962, John B Gurdon reprogramó núcleos de células somáticas transfiriéndolos a ovocitos enucleados (6). Gurdon y Yamanaka fueron galardonados con el premio Nobel en Fisiología o Medicina del año 2012 “por el descubrimiento de que las células maduras pueden ser reprogramadas para volverse pluripotentes” (7).

El trabajo aquí reseñado demuestra que es posible reactivar el programa endógeno de la pluripotencia modulando vías moleculares no específicas de pluripotencia con sustancias de pequeño tamaño molecular (1).

En la fase temprana de la reprogramación en respuesta a VC6TF se observó la inducción de la expresión de *Sall4* y *Sox2*, dos genes relacionados con la pluripotencia, y varios marcadores del endodermo extra-embriónico: *Gata4*, *Gata6* y *Sox17*. Estos tres son requeridos para la activación de *Sall4* y viceversa, pero no la de *Sox2*, lo cual sugiere una red de retroalimentación positiva formada por *Sall4*, *Gata4*, *Gata6* y *Sox17*. La eliminación de *Sall4* o de los marcadores del endodermo extraembriónico trastorna la activación de *Oct4* y el establecimiento subsecuente de la pluripotencia. Dichos hallazgos demuestran la existencia de una vía molecular mediada por *Sall4* que actúa en la fase temprana de la reprogramación química. Este paso se parece a la desdiferenciación mediada por *Sall4* que ocurre cuando se produce la regeneración de las extremidades perdidas en los

anfibios. DZNep agregado en la fase tardía de la reprogramación química mejoró de manera importante la expresión de *Oct4* disminuyendo la metilación del ADN y de H3K9 en su promotor. En resumen, dicen los autores del trabajo, que el interruptor maestro que gobierna la pluripotencia, la expresión de *Oct4*, que se mantiene reprimida en las células somáticas por múltiples modificaciones epigenéticas, es liberado de la represión por el modulador epigenético DZNep y estimulado por la expresión de *Sox2* y *Sall4* inducida por C6F. Los genes maestros de pluripotencia *Oct4* y *Sox2* podrían activar otros genes relacionados con la pluripotencia y desarrollar el proceso de reprogramación, junto con la activación de *Nanog* y la silenciación de *Gata6* en presencia de 2i, tal como se muestra esquemáticamente en la Figura 3.

Las moléculas pequeñas son ventajosas respecto a la manipulación genética o el uso de compuestos de alto peso molecular difíciles de sintetizar como las proteínas o el ARNm, porque atraviesan la membrana celular, no producen respuesta inmune, pueden ser sintetizadas, preservadas y estandarizadas más fácilmente y son costo-efectivas. Sus efectos inhibidores o activadores de la función de proteínas específicas son frecuentemente reversibles y pueden ser ajustados con precisión mediante variaciones en su concentración. La reprogramación química es preferible sobre la que utiliza genes porque tiene mucho menor riesgo de alterar el genoma y provocar

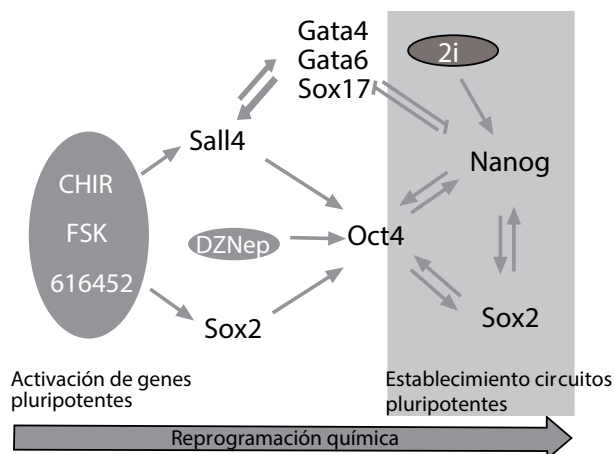


Figura 3. Mecanismo de la reprogramación nuclear inducida por agentes químicos de bajo tamaño molecular propuesto por Hou y col. (1).

mutaciones. Constituye un avance muy significativo en el campo de la reprogramación celular y el estudio de las células madre.

El siguiente paso debe ser la demostración de la efectividad de este método para reprogramar células humanas y más adelante el estudio de sus potenciales aplicaciones en la medicina regenerativa.

Una revisión extensa (8) sobre la reprogramación inducida por factores de transcripción y las múltiples aplicaciones de las CMPi en ciencias básicas para la comprensión del desarrollo embrionario, la fisiopatología de numerosas enfermedades, el desarrollo de drogas y el potencial de aplicaciones terapéuticas fue realizada previamente.

Glosario:

Célula madre: una célula capaz de auto-renovación y diferenciación. Puede formar copias de sí misma y dar origen a otros tipos de células.

Pluripotencia: Capacidad para diferenciarse en todos los tipos de células que se encuentran en el embrión y el adulto. Las células pluripotentes no pueden formar el trofoectodermo y ello las distingue de las totipotentes.

Reprogramación celular: es un cambio en la expresión genética que permite que un tipo de célula se transforme en un tipo distinto. Es consecuencia de la reprogramación del núcleo celular, la cual determina el cambio del fenotipo de la célula

REFERENCIAS

1. Hou P, Li Y, Zhang X, Liu C, Guan J, Li H, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. *Scienceexpress* <http://www.sciencemag.org/content/early/recent/> / 18 July 2013 / Page 1/ 10.1126/science.1239278. Consultado 23/7/2013
2. Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol.* 6, e253 (2008). doi:10.1371/journal.pbio.0060253 Medline
3. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676.
4. Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, Han DW, Lin T, et al. Generation of induced pluripotent stem cells using recombinant proteins. *Cell Stem Cell.* 2009;4(5):381-384.
5. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, et al. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010;7:1-13.
6. Gurdon JB. Adult frogs derived from the nuclei of single somatic cells. *Dev Biol.* 1962;4:256-273.
7. Cruz L. Descubrimientos sobre reprogramación nuclear merecen el Premio Nobel en 2012. *Gac Méd Caracas.* 2013;121(3):199-208
8. Cruz L. Conversión de células diferenciadas en células madre pluripotentes inducidas por factores de transcripción definidos (reprogramación nuclear y celular). En: Briceño-Iragorry L, Colmenares Arreaza G, editores. *Trabajos de Incorporación y Discursos de Recepción en la Academia Nacional de Medicina.* Tomo XIX. Caracas: Editorial Ateproca; 2013.p.1-124.