

Estudio del envejecimiento con un modelo celular del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford

Dra. Lilia Cruz de Montbrun

Individuo de Número

e-mail: lcruz987@gmail.com

RESUMEN

Se presentan en forma resumida los principales hallazgos del trabajo de Liu y col. (1), investigadores del Instituto Salk, California, publicado en abril de 2011, donde se describe un modelo celular in vitro del síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (SPHG), basado en células madre pluripotentes inducidas por reprogramación de fibroblastos. Tiene gran interés porque ofrece la posibilidad de estudiar la fisiopatología de las enfermedades que cursan con envejecimiento rápido, prematuro y ayudar a comprender mejor los procesos de envejecimiento que ocurren en la población humana general. Se incluye información básica relacionada con la progeria.

Palabras clave: Progeria. Envejecimiento. Células madre pluripotentes inducidas. Síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford. iPSC.

SUMMARY

A summary of the main findings published in April, 2011 by Liu et al (1), researchers at the Salk Institute, California, where a cellular in vitro model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS) was described based on induced pluripotent stem cells derived from reprogrammed fibroblasts. It is of great interest because it allows the study of the pathogenesis of premature, rapid aging and helps understand ageing of the general human population. Basic information about progeria is included.

Key words: Progeria. Ageing. Induced pluripotent stem cells. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. iPSC.

El término progeria se refiere a un grupo de enfermedades genéticas muy raras que se manifiestan por signos y síntomas de envejecimiento prematuro y acelerado. Comprende los síndromes de: 1) Hutchinson-Gilford, 2) Werner y 3) Cockayne (2).

Los pacientes que sufren el síndrome de progeria de Hutchinson-Gilford (SPHG) tienen una esperanza de vida inferior a los 13 años y la muerte se debe a complicaciones de arterioesclerosis y degeneración del músculo liso vascular, como ataques cardíacos y accidentes cerebro-vasculares. Presentan retraso del crecimiento, macrocefalia, anomalías en el rostro, alopecia, piel de aspecto delgado y envejecido, poca grasa subcutánea, trastornos articulares y diabetes insulino-resistente. El desarrollo intelectual y la motricidad básica no están alterados. El recién nacido es de aspecto normal, pero su peso y talla aumentan muy lentamente. Desarrollan rasgos faciales característicos: ojos prominentes, nariz delgada y puntiaguda, mandíbula pequeña, labios finos, protrusión de las orejas (3,4).

El síndrome fue descrito por primera vez en 1886 por Jonathan Hutchinson (5) y por Hastings Gilford (6), independientemente, en 1897. Es muy raro: aparece en 1 de cada 4 millones de nacidos vivos. Es causado por una mutación puntual nueva, autosómica dominante en el gen *LMNA*, que codifica la síntesis de dos proteínas estructurales, lámina A y lámina C, de la lámina del núcleo, una armazón que ayuda a mantener la estructura de la cromatina y organizar



Figura 1. Foto de paciente.

Scaffidi P, Gordon L, Misteli T. The Cell Nucleus and Aging: Tantalizing Clues and Hopeful Promises. *PLoS Biol* 2005;3(11): e395. doi:10.1371/journal.pbio.0030395

procesos como la síntesis de ADN y ARN (3,7). Las láminas A y C son muy similares en su secuencia de aminoácidos, pero la lámina A es un poco más larga (7).

La mutación del gene *LMNA* (7) que se ha encontrado en la mayoría de los pacientes con SPHG es una mutación puntual que reemplaza al nucleótido citosina con timina en la posición 1824 (C1824T), también llamada Gli608Gli para referirse a la posición en la molécula de lámina A afectada. Como resultado de la mutación se produce una versión anormal de lámina A llamada progerina, la cual tiene 50 aminoácidos menos en uno de sus extremos y no puede ser procesada correctamente dentro de las células. Cuando se incorpora en la lámina del núcleo altera la forma y ocasiona inestabilidad de la envoltura nuclear. Su acumulación progresiva parece dañar la estructura y la función del núcleo, lo que lleva a la muerte celular prematura. Otras mutaciones en el mismo gen han sido identificadas en un pequeño número de personas que padecen del SPHG.

En 2006 Kazutoshi Takahashi y Shinya Yamanaka descubrieron que células somáticas como los fibroblastos pueden ser reprogramadas por genes de cuatro factores de transcripción, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4* y *c-Myc*, actualmente conocidos como los 4 factores de

Yamanaka (4FY), insertados con vectores retrovirales. Esta reprogramación convierte células diferenciadas en células madre pluripotentes inducidas (CMPi), muy similares a las células madre embrionarias (CME) las cuales proliferan con facilidad *in vitro* y pueden diferenciarse en todos los tipos celulares especializados (8).

El modelo celular de SPHG descrito por Liu y col. (1) se logró convirtiendo fibroblastos originalmente aislados de pacientes portadores de la mutación clásica de *LMNA*, Gli608Gli, (fibroblastos-SPHG) en CMPi, las cuales fueron diferenciadas en células de músculo liso vascular y fibroblastos. Fueron comparadas con células normales.

Los fibroblastos-SPHG originales presentaban: morfología anormal del núcleo, progerina, baja expresión de los componentes de la lámina: lámina B1 y LAP2b, pérdida de los marcadores de heterocromatina H3K9me3, HP1a y HDAC1, y expresión reducida del marcador de proliferación nuclear Ki67.

Fibroblastos-SPHG transducidos con los 4FY fueron convertidos en CMPi-SPHG, las cuales se comportaron de manera similar a las CMPi humanas de control: La expresión de las proteínas lámina A/C y progerina estaba ausente, los patrones de metilación y los perfiles de ARNm correspondientes a todo el genoma mostraban mejor correlación con las CMPi de los controles y con las CME, que con los fibroblastos originales (SPHG). La lámina nuclear y el aspecto del núcleo tenían características similares a las de CME normales. Es decir, que las CMPi-SPHG carecen de las alteraciones epigenéticas y de la envoltura nuclear asociadas con el envejecimiento prematuro.

Cuando las CMPi-SPHG fueron diferenciadas *in vitro* para formar células especializadas se observó la reaparición de la progerina, junto con lámina A/C, en cambio, en los controles aumentó la lámina A/C, pero no la progerina.

El envejecimiento celular puede ser observado *in vitro* realizando pases sucesivos en el medio de cultivo, donde las células se reproducen produciendo varias generaciones de células hijas.

En pases sucesivos de las células musculares lisas que se diferenciaron a partir de las CMPi-SPHG se observó un aumento creciente de la frecuencia de núcleos de forma anormal y pérdida de la marca de heterocromatina H3K9me3. Al quinto pase mostraban las características típicas de senescencia prematura: aumento de la β -galactosidasa asociada a senescencia,

reducción de la longitud de los telómeros, disminución del número de células positivas para Ki67, alteraciones de la proliferación celular y aumento de transcritos asociados a senescencia.

En los fibroblastos diferenciados a partir de las CMPi-SPHG se detectó la expresión de progerina al quinto pase. La pérdida de marcadores de lámina y de heterocromatina ocurrió más tardíamente (pase 10) que en las células musculares lisas.

Varios experimentos demostraron la relación causal entre progerina y senescencia acelerada:

1. La expresión ectópica de progerina inducida en células de músculo liso vascular humano (CML) de cultivos primarios produjo trastornos de la proliferación celular y defectos del núcleo similares a los observados en las CML derivadas de las CMPi-SPHG.
2. Para silenciar la expresión de progerina, las CMPi-SPHG fueron transducidas con un vector lentiviral que expresa un ARN de horquilla corta, supresor específico de progerina. Las células tratadas mostraron normalidad en el cariotipo y la expresión de lámina, marcadores epigenéticos y de pluripotencia. Cuando se diferenciaron en cuerpos embrioides presentaron significativa disminución de ARNm para progerina y de progerina, pero no de lámina A. Las células musculares lisas diferenciadas a partir de las células madre corregidas mejoraron notablemente en su capacidad de proliferación y presentaron disminución de los transcritos relacionados con senescencia.
3. La silenciación de la expresión de la progerina en fibroblastos recién diferenciados a partir de CMPi-SPHG por transducción con el ARN corrector (shRNA) restableció la normalidad en la morfología nuclear y los marcadores de heterocromatina, la cual se mantuvo en cultivos sucesivos.

Otro aspecto importante del trabajo fue la identificación de un blanco hasta entonces desconocido para la acción de la progerina: la subunidad catalítica de la “cinasa de proteína dependiente de ADN”, con la cual se une fuertemente e inhibe su actividad.

Los fibroblastos primarios de enfermos de SPHG tenían disminuidas las subunidades catalítica y reguladoras de la enzima. La reprogramación restableció la normalidad en las CMPi-SPHG. La deficiencia en la expresión de estas proteínas reapareció en las células musculares lisas que

se diferenciaron a partir de ellas, lo cual sugiere que tal deficiencia podría influir en el fenotipo de la enfermedad. Esta idea es reforzada por la comprobación de que la eliminación de la subunidad catalítica de la enzima en células musculares lisas vasculares primarias redujo su proliferación. También demostraron que en fibroblastos aislados de individuos que envejecen normalmente ocurre una pérdida progresiva de todas las subunidades de la enzima. Ya se conocía anteriormente que ratones deficientes en cualquiera de los componentes de la enzima presentan envejecimiento acelerado. La deficiencia de la “cinasa de proteína dependiente de ADN” puede constituir un nuevo marcador de envejecimiento tanto prematuro como fisiológico.

La progerina presente en los fibroblastos parece inducir cambios epigenómicos muy importantes relacionados con varias vías moleculares vinculadas con la regulación del desarrollo y la transcripción. Estos cambios estaban ausentes en las CMPi-SPHG, coincidiendo con la falta de progerina en esas células. La supresión reversible de la expresión de la progerina por la reprogramación y la subsecuente reactivación con la diferenciación, proporcionan un modelo para estudiar las patologías relacionadas con el envejecimiento humano prematuro. Se sabe que la progerina se acumula principalmente en las células musculares lisas de las arterias de los pacientes con SPHG y la degeneración del músculo liso vascular es una de las características de la arterioesclerosis asociada con la progeria.

Durante el envejecimiento fisiológico aumentan progresivamente los niveles de progerina y hay mucha similitud entre el desarrollo de arterioesclerosis en personas que envejecen normalmente y las enfermas de progeria. La senescencia vascular ha sido implicada en la arterioesclerosis de la población normal. En este trabajo se demostró que las células musculares lisas derivadas de las células reprogramadas alcanzan más rápidamente que las normales el fenotipo senescente y que la progerina sería el factor clave responsable.

El envejecimiento que ocurre en personas normales es un proceso lento y complejo. El envejecimiento rápido de las células musculares lisas y fibroblastos derivados de CMPi de los enfermos de progeria constituye un modelo *in vitro* para el estudio del envejecimiento vascular, la patogénesis de enfermedades asociadas a la edad y de varias laminopatías humanas.

Es muy interesante la demostración de que los fibroblastos con defectos nucleares y fenotipo

senescente de los enfermos de progeria pueden ser bien reprogramados; que las células madre pluripotentes inducidas a partir de ellos tengan aspecto similar a las CMPi y CME normales, que la reprogramación produzca un completo “*resetting*” de la arquitectura nuclear, el epigenoma y la expresión genética global y que la diferenciación de las CMPi-SPHG lleve a la reaparición de la expresión de progerina en células como las musculares lisas y fibroblastos, vinculadas con el fenotipo de la enfermedad.

Quedó claro que el déficit que se observa en las células de los enfermos depende de la acumulación de progerina en las células diferenciadas, uno de cuyos efectos es la inactivación de la enzima “quinasa de proteína dependiente de ADN”. Es de gran importancia la demostración de que el fenotipo patológico se corrige con la supresión de la expresión de progerina.

La rapidez del envejecimiento en la progeria hace más accesible la investigación del envejecimiento normal que ocurre con mucha lentitud.

REFERENCIAS

1. Liu GH, Barkho BZ, Ruiz S, Diep D, Qu J, Yang SL, et al. Recapitulation of premature ageing with iPSCs from Hutchinson–Gilford progeria syndrome. *Nature*. 2011;472,221-225.
2. U.S. National Library of Medicine. Genetics Home Reference. Progeria. [Informe en internet] Disponible en: <http://ghr.nlm.nih.gov/search?query=progeria>. Consultado abril 15, 2011
3. U.S. National Library of Medicine. Genetics Home Reference. Hutchinson-Gilford progeria syndrome. [Informe en internet] Julio 2007. Disponible en <http://ghr.nlm.nih.gov/condition/hutchinson-gilford-progeria-syndrome>. Consultado abril 15, 2011
4. Medline Plus Zieve D, David R. Progeria. [informe en internet] Marzo 21, 2011. Disponible en <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001657.htm> Consultado abril 15, 2011
5. Hutchinson J (1886). “Case of congenital absence of hair, with atrophic condition of the skin and its appendages, in a boy whose mother had been almost wholly bald from alopecia areata from the age of six”. 1886 *Lancet* I: 923.
6. Gilford H; Shepherd, RC “Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age”. *Br Med J*. 1904;2(5157):914-918.
7. U.S. National Library of Medicine. Genetics Home Reference. Genes. LMNA [informe en internet]. Abril 2011. Disponible en <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LMNA>. Consultado abril 15, 2011
8. 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.

Gac Méd Caracas 2012;120(1):71-73

La Gaceta Médica de Caracas hace 100, 50, 25 años

Dr. J M Avilán Rovira

Individuo de Número