

Novedades Científicas, ANM. año 1, número 5. 21/5/2009
Comisión de Ciencias Básicas



REPROGRAMACION NUCLEAR Y CELULAR

Dra. Lilia Cruz de Montbrun

Miembro Correspondiente Nacional, puesto número 6.

RESUMEN:

La posibilidad de usar células sanas para reemplazar las que están enfermas (terapia celular) en el tratamiento de numerosas enfermedades degenerativas y genéticas ha estimulado intensos esfuerzos de investigación en todo el mundo con el fin de desarrollar métodos que permitan obtener la gran variedad de células necesarias, que sean seguras y eficaces para los pacientes y aceptables desde el punto de vista ético. Avances en esa dirección se han logrado recientemente con la introducción de nuevas técnicas de reprogramación nuclear y celular: cambios provocados en la expresión genética de un tipo de célula permiten que ésta se convierta en un tipo diferente. Así, por ejemplo, una célula cutánea se convierte en una neurona o una de páncreas exocrino en una célula beta productora de insulina (1).

En este trabajo nos referimos a la reprogramación de células diferenciadas a un estado pluripotencial para generar las llamadas **células madre pluripotentes inducidas, CMPI**, (en inglés iPSC), similares en morfología y función a las células madre embrionarias:

1.- Reprogramación por genes de factores de transcripción introducidos a las células por vectores virales.

Genes de *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* y retrovirus fueron utilizados con éxito por primera vez en la literatura para reprogramar fibroblastos de ratón (2). Con diversas combinaciones de factores de transcripción y vectores, en varios tipos celulares y especies, incluyendo humana, y con amplias variaciones en eficiencia y rapidez se ha obtenido **CMPI** (3,4,5). Destaca la alta eficiencia y rapidez de reprogramación a CMPIh de queratinocitos primarios provenientes de biopsias de piel y de un solo pelo arrancado de la cabeza de un adulto, fuentes potencialmente muy favorables (4). Es muy interesante que la reprogramación de células madre neurales del adulto a CMPI puede lograrse con el solo factor **OCT4**, puesto que expresan en forma endógena Sox2, c-Myc y Klf4 (5).

Existe riesgo de que los factores genéticos extraños insertados en el genoma de la célula blanco ocasionen mutaciones y otros cambios. *c-Myc* and *Klf4* son oncogénicos. Estos riesgos se pueden reducir con el uso de vectores que no se integran al genoma y que se eliminan espontáneamente de las células después de varios pasos en el cultivo (6)

2.- Reprogramación por proteínas recombinantes

H. Zhou y col. (7) utilizaron, en vez de material genético, **los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*, que son proteínas, combinadas por su extremo carboxílico con el péptido poliarginina (11R)** capaces de atravesar las membranas celular y nuclear, para obtener células madre pluripotentes inducidas a partir de fibroblastos murinos, sin los riesgos antes mencionados.

Sería muy recomendable utilizar las proteínas recombinantes en los queratinocitos primarios, los cuales, según Assen y col (4) son mucho más fáciles de reprogramar que los fibroblastos o en células madre neurales, las cuales requieren un solo factor (5).

Perspectiva: Los avances logrados en reprogramación celular son de alta significación para la investigación básica y clínica y hacen cada vez más factibles las tan esperadas terapias celulares con células específicas para pacientes específicos.

Reprogramación Nuclear

Definición:

Cambio en la expresión genética que permite que un tipo de célula se transforme en un tipo distinto

Ejemplos:

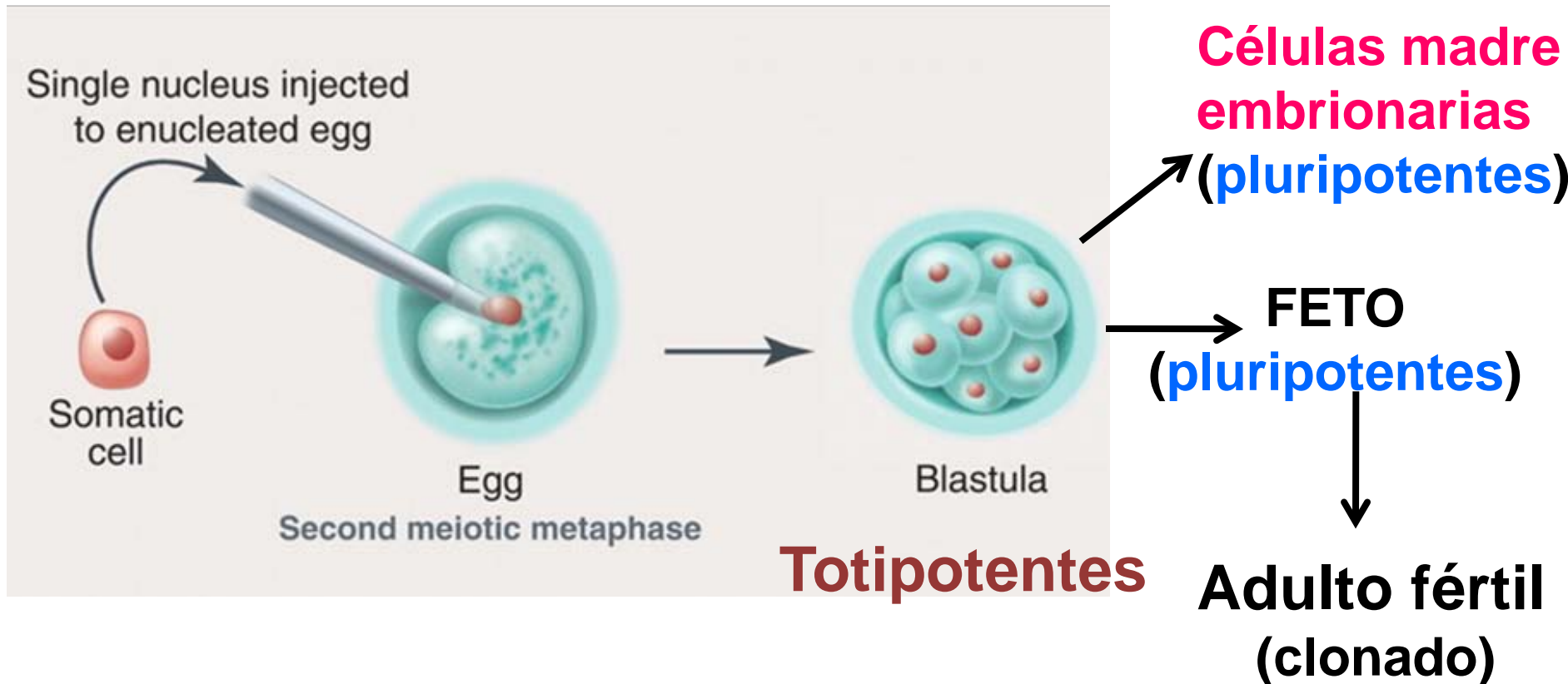
Fibroblastos se convierten en células madre pluripotenciales (CMP) similares a las células embrionarias

Células hepáticas se convierten en células que producen insulina

Importancia de las investigaciones sobre reprogramación nuclear y celular

- Conocer los factores que determinan que las células se mantengan estables en su estado fisiológico, sea diferenciado o indiferenciado y los mecanismos de cambio de un estado a otro
- Posibilidad de obtener células sanas para terapia de reemplazo celular autólogo evitando el uso de inmunosupresión
- Cultivo de líneas celulares patológicas para estudiar in vitro la naturaleza de la enfermedad y probar drogas y otras opciones terapéuticas

Reprogramación del núcleo de una célula somática por transferencia a un óvulo enucleado



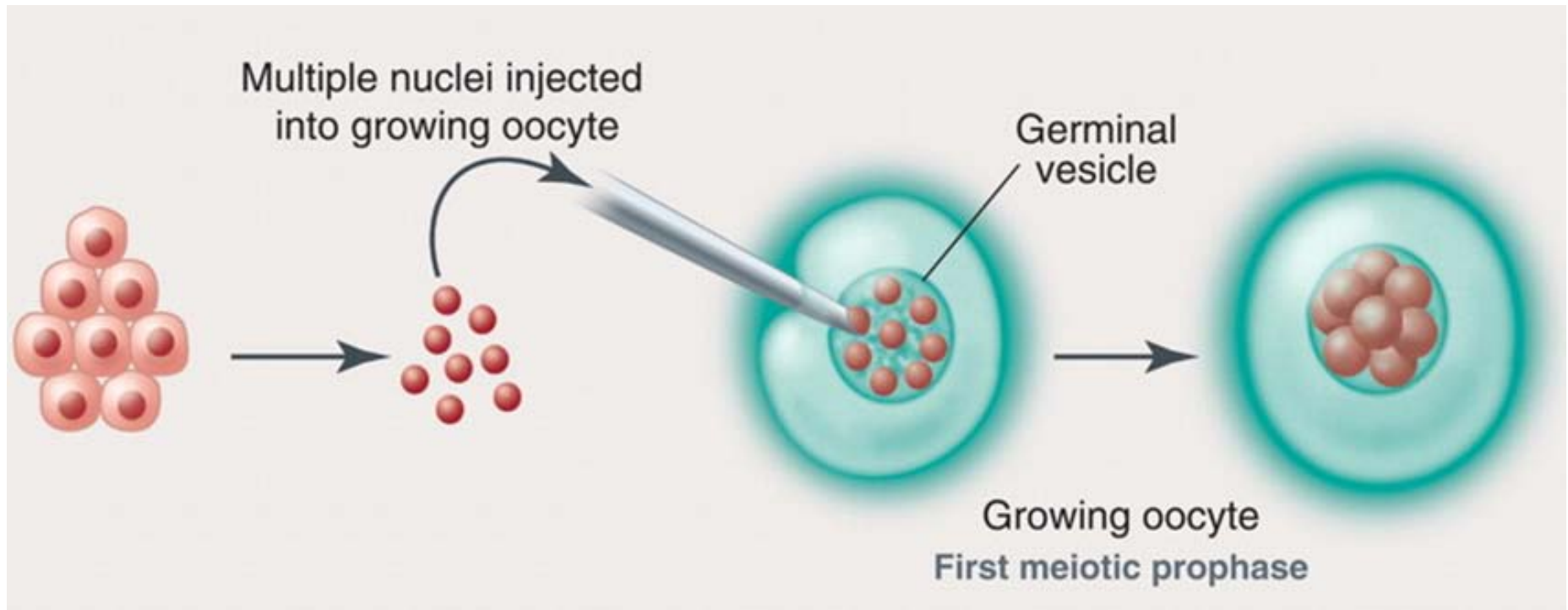
1962: Primer anfibio obtenido por clonación (J.B.Gurdon)

1996: Primer mamífero clonado: la oveja Dolly (I. Wilmut y K. Campbell)

2007: Primer primate obtenido por transferencia nuclear (J. A. Byrne)

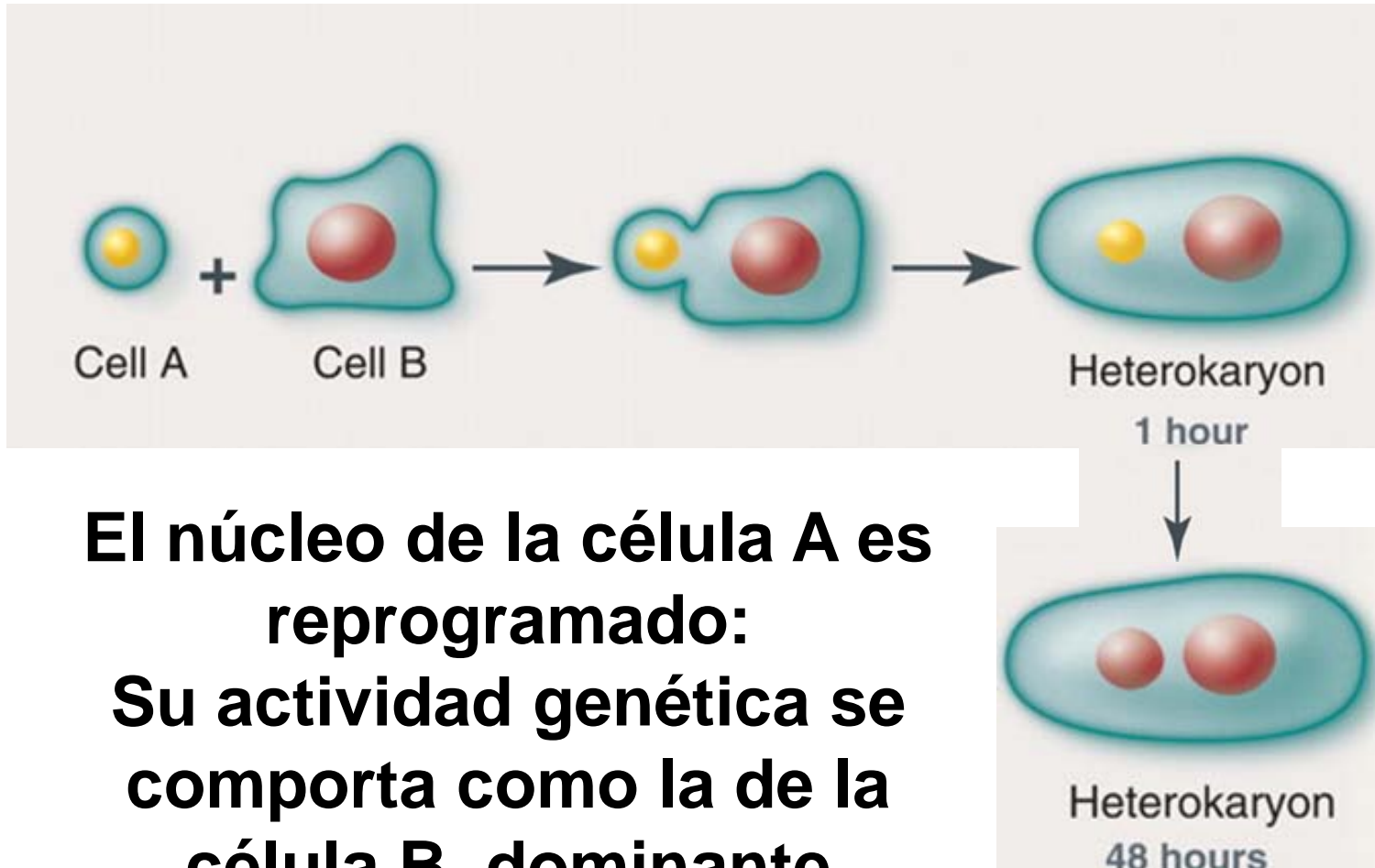
Es muy probable que el óvulo humano enucleado también contenga los componentes necesarios para la reprogramación del núcleo, pero la clonación humana reproductiva está prohibida por la mayoría de las legislaciones

Transferencia de múltiples núcleos de células somáticas a un oocito de anfibio



Todos los núcleos se reprograman a estado embrionario pero la célula no se divide

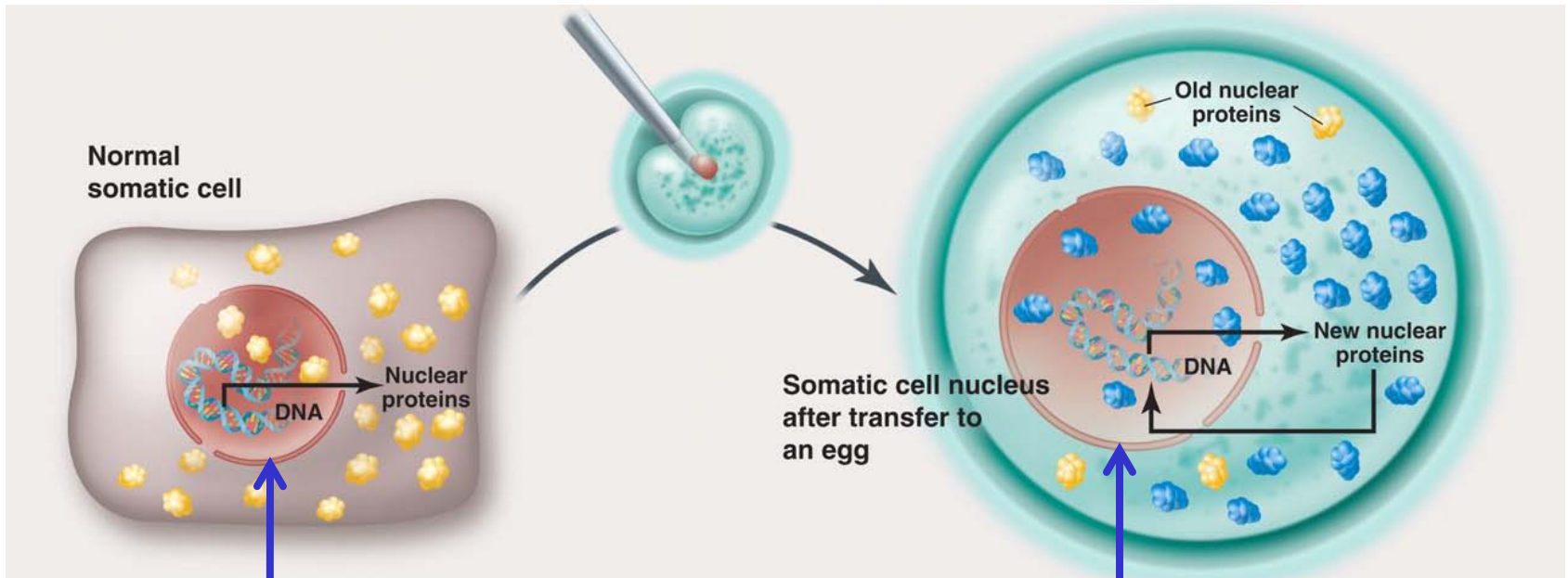
Reprogramación nuclear por fusión celular



**El núcleo de la célula A es reprogramado:
Su actividad genética se comporta como la de la célula B, dominante**

- Los experimentos de transferencia nuclear demostraron que la **diferenciación celular es reversible y se produce por factores epigenéticos, sin modificar la secuencia del ADN de los cromosomas.**
- La necesidad de obtener células madre pluripotentes **sin utilizar embriones ni ovocitos (difíciles de conseguir y éticamente cuestionables)** estimula investigaciones sobre los factores reguladores y reprogramadores

Intercambio de proteínas nucleares en una célula somática y después de la transferencia del núcleo a un óvulo enucleado



Núcleo diferenciado



**Núcleo transferido
y reprogramado
por proteínas**

Factores de transcripción

Son proteínas que participan en la regulación de la transcripción del ADN, activando o reprimiendo la expresión de diversos genes

Pueden actuar uniéndose a secuencias concretas de ADN, a otros factores o directamente a la ARN polimerasa.

En células humanas existen aprox 2500

Reprogramación nuclear y celular para inducir la formación de células madre pluripotentes

- 1.- Por genes de factores de transcripción
unidos a vectores virales**
- 2.- Por proteínas recombinantes:
Factores de transcripción unidos
a poliarginina**

Reprogramación por genes de factores de transcripción unidos a vectores retrovirales



Shinya Yamanaka,
M.D., Ph.D.
Institute for Frontier
Medical Sciences
Universidad de Kyoto,
Japón

S. Yamanaka concibe la idea de reprogramar el núcleo de células somáticas a un estado pluripotente, con factores reguladores de la transcripción genética.

Comienza a trabajar con una lista de 24 candidatos. Logra obtener resultados efectivos **al insertar en el núcleo celular con vectores retrovirales, los genes que codifican sólo 4 factores de transcripción :**

OCT4, SOX2,

KLF4, c-MYC

Producen líneas de células madre pluripotentes que se comportan morfológica y funcionalmente como las células madre embrionarias

Las denominan

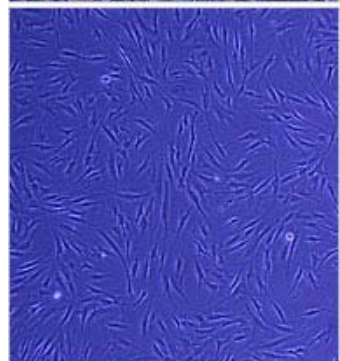
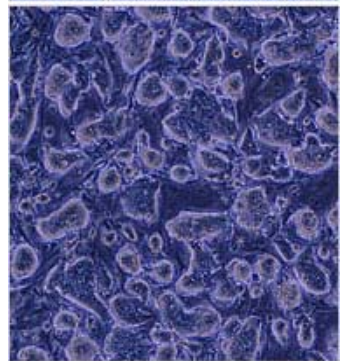
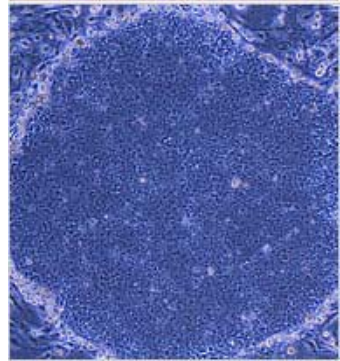
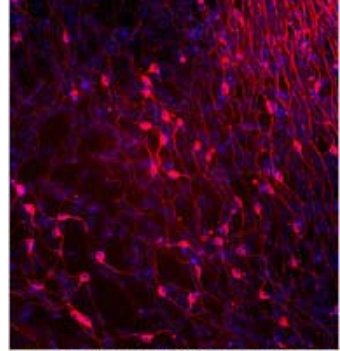
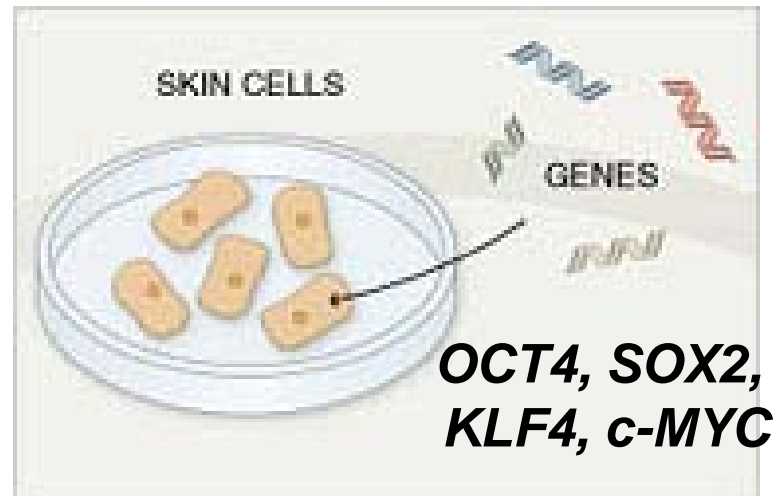
Induced Pluripotent Stem Cells (iPSC)

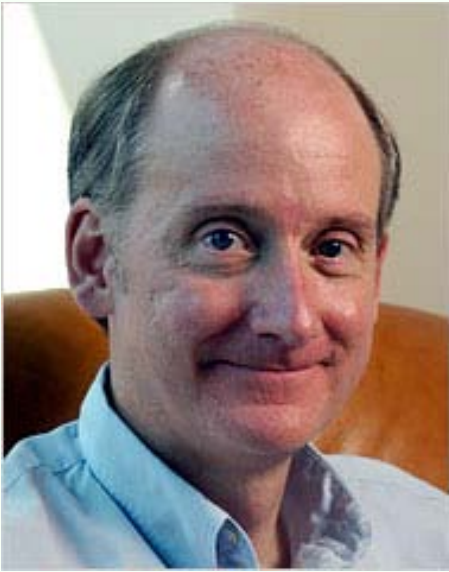
que traducimos como

Células Madre Pluripotentes inducidas (CMPi)

El trabajo fue publicado en el año 2006

[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.





James A. Thomson
Universidad de
Wisconsin

**J. Yu y col, Induced Pluripotent Stem Cell Lines
Derived from Human Somatic Cells.
Science 2007; 318(5858) 1917 – 1920**

**Células somáticas humanas
son reprogramadas a CMPi
por genes exógenos de los factores
OCT4, SOX2, NANOG, LIN28
introducidos con lentivirus**

**Las células madre pluripotenciales inducidas
tienen las propiedades características de las
células madre embrionarias**

De los cuatro factores utilizados para la reprogramación nuclear y celular

OCT4, SOX2, NANOG, LIN28:

OCT4 y SOX2: indispensables

NANOG aumentó hasta 200 veces la eficacia

LIN28 mejora la recuperación de colonias, pero se puede prescindir de él

JA Thomas y col. Reprogramaron fibroblastos fetales humanos (línea bien caracterizada IMR90) y una línea de fibroblastos postnatales humanos de piel de la frente.

Equipo de Investigadores del Centro de Medicina Regenerativa de Barcelona, España, dirigidos por Juan Carlos Izpisúa, **Obtuvieron células madre pluripotentes humanas a partir de queratinocitos primarios reprogramados**



Aasen, T y col. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes
Nature Biotech. 2008; 26(11):1276-1284

Inducción de células madre pluripotentes humanas (CMPHi) a partir de queratinocitos primarios

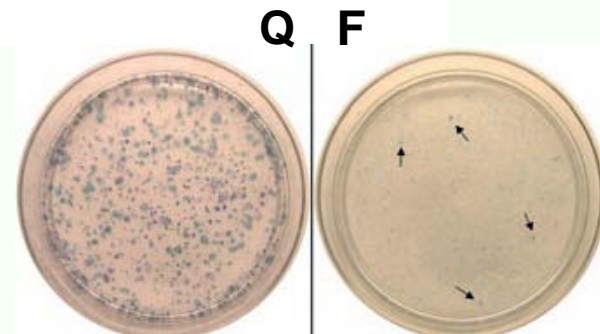
Método de reprogramación:

Transducción retroviral de factores de transcripción:

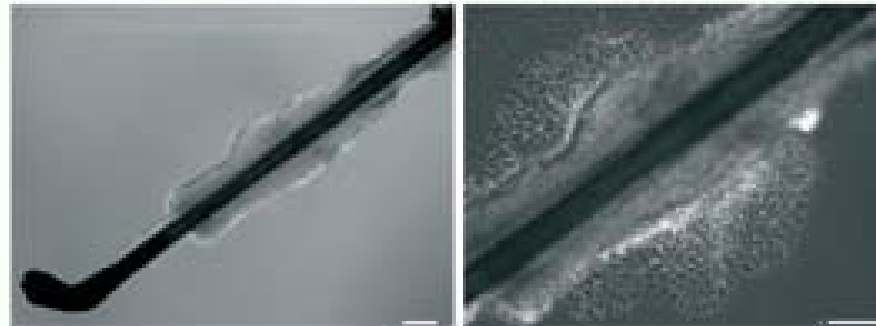
Cuatro: *OCT4*, *SOX2*, *KLF4*, *c-MYC*

Tres: *OCT4*, *SOX2*, *KLF*

Rapidez : en 10 días de cultivo a partir de la fecha de la infección se obtienen las colonias de CMPHi.
Eficiencia 1 % (En comparación con fibroblastos: 2 veces mas rápido y 100 veces mas eficaz)



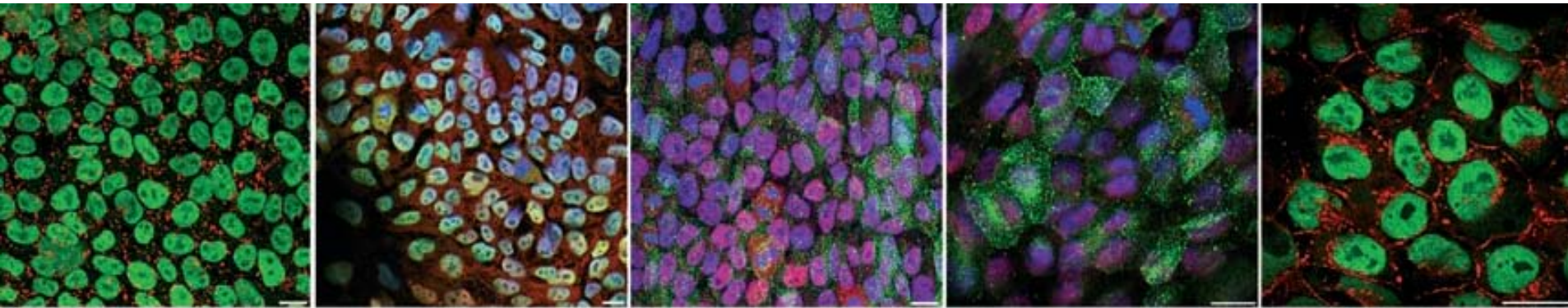
Fuentes fácilmente accesibles para la producción de células en el laboratorio y eventualmente para la terapia clínica: Basta un solo pelo de un adulto o una biopsia de epidermis



Pelo humano en cultivo

Células madre pluripotentes humanas inducidas (CMPHi) a partir de queratinocitos primarios

Inmunofluorescencia



OCT4, SSEA3

OCT4, IGF1R,
DAPI

TRA1-81, SOX2
DAPI

TRA1-60,
NANOG, DAPI

OCT4, CX43

Expresión de marcadores de las células embrionarias presentes en las **CAMPHi**

Antígenos de superficie SSEA3, TRA-1-60, TRA-1-81 y receptor IGF1

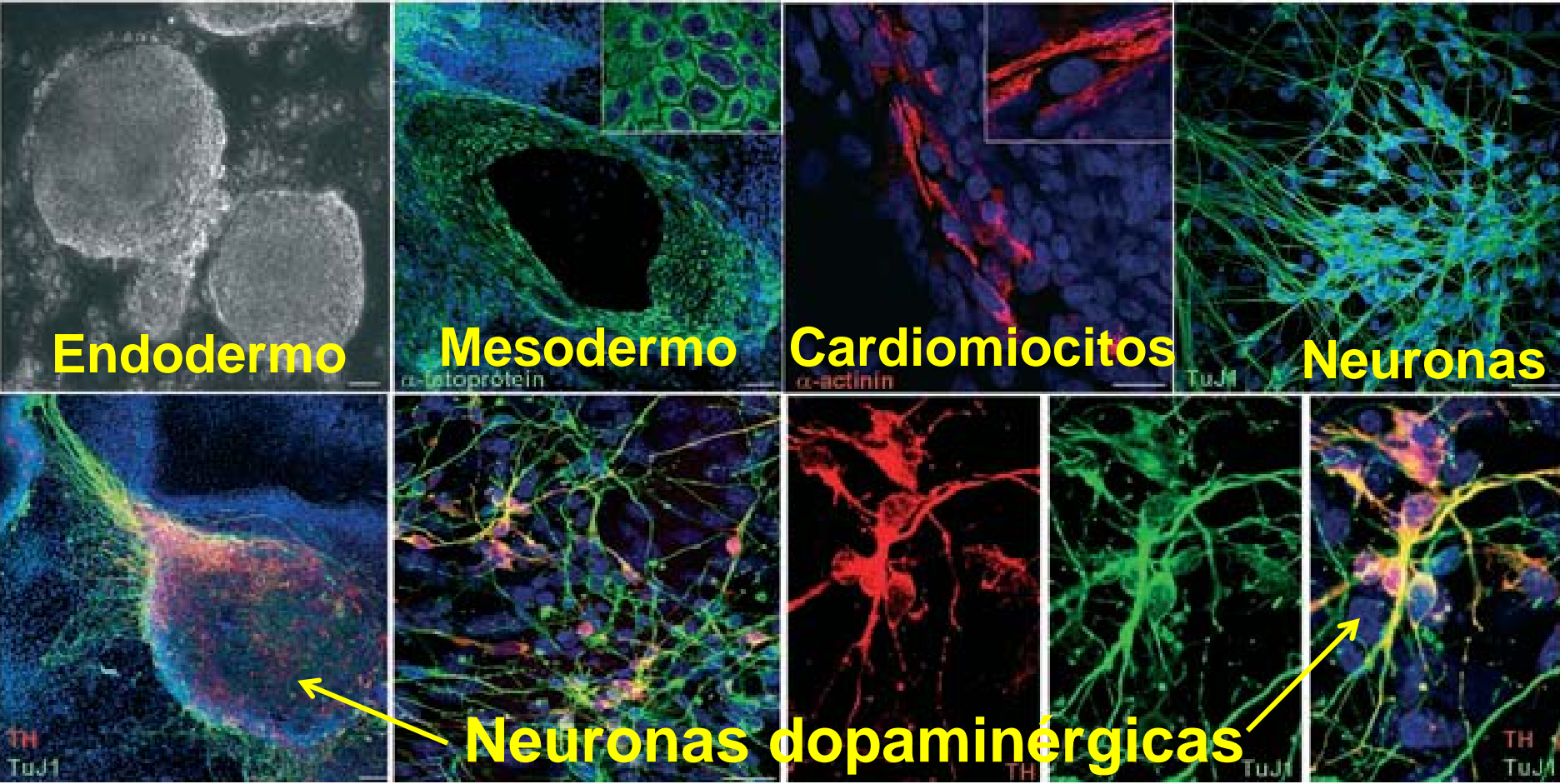
Factores de transcripción nuclear OCT4, SOX2, NANOG

Conexina 43, proteína de la unión intercelular (gap)

Aasen, T y col. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes

Nature Biotech. 2008; 26(11):1276-1284

Células diferenciadas a partir de Células Madre Pluripotentes Humanas inducidas por reprogramación de queratinocitos



Aasen, T y col. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nature Biotech. 2008; 26(11):1276-1284

Generación de células madre pluripotentes por genes de factores de transcripción unidos a vectores virales

Combinaciones efectivas:

4 genes: *OCT4, SOX2, KLF4, c-MYC*

3 genes: *OCT4, SOX2, KLF4*

2 genes: *OCT4, KLF4*

1 gene: *OCT4*

4 genes: *OCT4, SOX2, NANOG, LIN28*

Células Madre Pluripotentes inducidas por Genes de Factores de Transcripción

Fuentes de células somáticas

Ratón:

A partir de derivados de las 3 capas germinales:

Mesodermo: fibroblastos

Endodermo: células epiteliales (hepatocitos y estómago)

Ectodermo: queratinocitos

células madre neurales adultas (OCT4)

Humano:

Fibroblastos de la dermis (*OCT4, SOX2, KLF4*)

Queratinocitos primarios de biopsia de piel juvenil y pelo del adulto (método de alta eficiencia y rapidez)

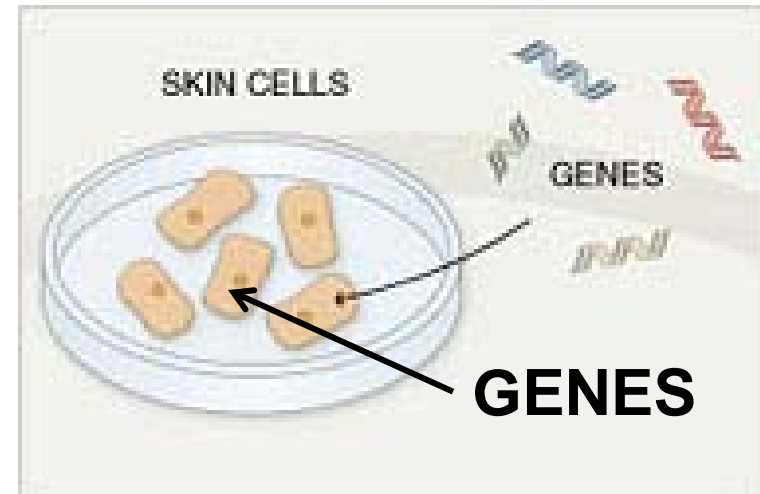
Características de las células madre pluripotenciales inducidas por transgenes retrovirales

- 1. Reprogramación global transcripcional y epigenética**
- 2. Capacidad de auto-renovación adquirida**
- 3. Pluripotencialidad**
- 4. Silenciación de los transgenes retrovirales**
- 5. Expresión endógena de factores de transcripción**

Limitaciones de la reprogramación celular por genes de factores de transcripción insertados con vectores virales

Los trabajos de S Yamanaka, JA Thomson y otros autores son muy importantes porque han demostrado que la reprogramación in vitro de células somáticas al estado embrionario puede lograrse con muy pocos factores de transcripción.

Aplicación clínica es limitada por el riesgo que implica la presencia continua de material genético extraño en las células con la posibilidad de generar mutaciones en el sitio de inserción viral en el genoma y tumores.



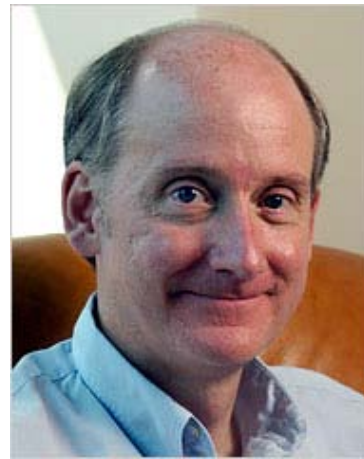
Células madre pluripotenciales humanas inducidas (CMPHi) libres de secuencias de vector y transgenes a partir de fibroblastos de piel neonatal fueron obtenidas por:

Una sola transfección de **vectores episomales basados en oriP/EBNA1 (antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr) combinados con OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, KLF4 y SV40LT** seguida por pérdida espontánea de dichos vectores, ocurrida con sucesivos ciclos de división celular

Eficiencia baja: 3 a 5 colonias de CMPHi por millón de células somáticas iniciales

Continuaban replicándose normalmente en cultivo después de 7 meses de la transfección viral y conservando sus características similares a las de las células embrionarias

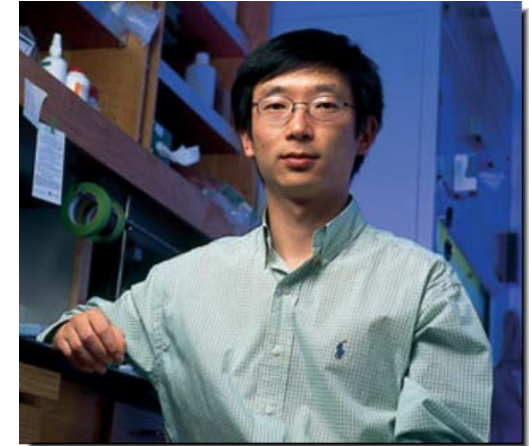
Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. **Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. Science. Mayo 2009; 324: 797-801**



REPROGRAMACIÓN NUCLEAR POR PROTEINAS

**AVANCE MUY IMPORTANTE
(Abril de 2009)**

**Por primera vez se logra la
reprogramación nuclear y
celular **sin introducir material
genético** extraño en las células**



**Sheng Ding,
PhD en Química,
The Scripps Research
Institute,
La Jolla, California**

**Zhou H, Wu S, Joo JY, Zhu S, D W Han, T Lin, S Trauger, G Bien, S Yao, Y
Zhu, G Siuzdak, H R Schöler, L Duan y Sheng Ding Generation of Induced
Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. Cell Stem Cell. 2009;
4 (5):381-384**

REPROGRAMACIÓN NUCLEAR POR PROTEINAS RECOMBINANTES

Estrategia: Hacer llegar al núcleo celular los factores de transcripción que van a modificar la expresión genética endógena

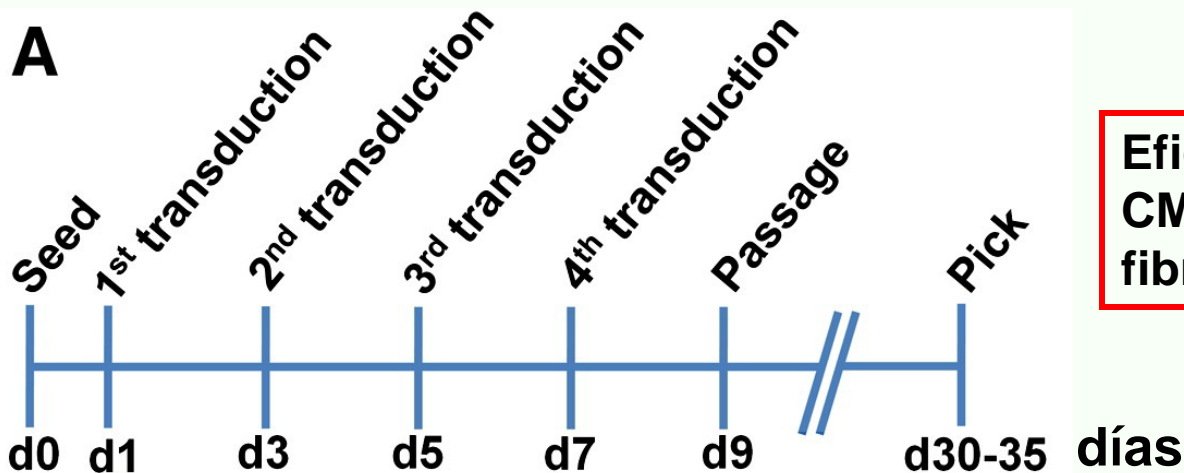
Los FT son proteínas

Deben ser presentadas en formas que atraviesen las membranas celular y nuclear

La combinación con el péptido poli-arginina de 11 residuos les confiere capacidad de penetración.

Reprogramación celular por tratamiento transitorio con proteínas reguladoras de la expresión genética

Las proteínas recombinantes utilizadas conjuntamente fueron **los factores de transcripción *Oct4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4*** combinados por su extremo carboxílico con el péptido poliarginina (11R).



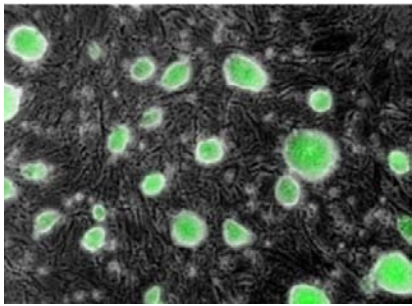
Eficiencia: 3 colonias de CMPip por cada 50000 fibroblastos tratados

El tratamiento con las 4 proteínas reprogramadoras recombinantes purificadas, *Oct4-11R*, *Sox2-11R*, *Klf4-11R* y *c-Myc-11R*, capaces de penetrar en las células, es suficiente para que **fibroblastos embrionarios murinos** en cultivo se conviertan en ***células madre pluripotenciales (CMPip)*** morfológica y funcionalmente equivalentes a células embrionarias: capaces de autorenovarse, diferenciarse en todo tipo de tejidos, incorporarse a embriones y dar origen a quimeras que transmiten el genoma del núcleo reprogramado a su descendencia a través de la línea germinal.



FETO





Ventajas de la reprogramación celular con proteínas recombinantes vs reprogramación con genes exógenos

- 1. Elimina el riesgo de modificar el genoma de la célula blanco por secuencias genéticas exógenas y, por lo tanto se logra células madre pluripotentes inducidas, CMPI, (piPSC) más seguras.**
- 2. El método reprogramador por transducción de proteínas (protein transduction method) es mucho más simple y rápido que los más avanzados métodos genéticos disponibles hasta el presente**
- 3. Esta ampliamente disponible la capacidad para producir en gran escala las proteínas recombinantes**
- 4. El método reprogramador está definido químicamente y podría aplicarse en forma más amplia y económica**

CONCLUSIONES

Los métodos de reprogramación nuclear y celular están progresando muy rápidamente

Para mejorar la seguridad del procedimiento, su eficacia y rapidez, sería muy recomendable utilizar las proteínas recombinantes en los queratinocitos primarios, los cuales, según Assen y col. son mucho más fáciles de reprogramar que los fibroblastos. También en células madre neurales, las cuales requieren un solo factor de transcripción externo.

PERSPECTIVA

Los avances logrados en reprogramación celular son de alta significación para la investigación básica y clínica y hacen cada vez más factibles las tan esperadas terapias celulares con células específicas para pacientes específicos.

Bibliografía:

1. Gurdon JB y Melton DA Nuclear Reprogramming in Cells. Science 2008; 322: 1811 -1815
2. Takahashi K y Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006; 126(4):663-676.
3. J. Yu y col, Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells .Science 2007; 318(5858) 1917 – 1920
4. Aasen T y col. Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes Nature Biotech. 2008; 26(11):1276-1284.
5. Kim JB y col. Oct4-Induced Pluripotency in Adult Neural Stem Cells. Cell. 2009;136:411-419
6. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, y Thomson JA. Human Induced Pluripotent Stem Cells Free of Vector and Transgene Sequences. Science. 2009; 324: 797-801
7. Zhou, H y col. Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. Cell Stem Cell, 2009, 4 (5):381-384