



# Células troncales pluripotenciales inducidas: herramienta para terapia celular y lucha contra el cáncer

Karlen Gazarian



## Células troncales y diferenciadas

El desarrollo del organismo multicelular se inicia de una sola célula, el cigoto, y termina con alrededor de 200 tipos de células que forman tejidos y órganos del cuerpo, *soma*. En la formación del *soma* participan células troncales (también llamadas “células madre”) y células diferenciadas. Las primeras mantienen su estado troncal mediante el uso de dos mecanismos de división: *simétrico* (ambas células hermanas siguen siendo troncales) y *asimétrico* (una de las células hermanas es troncal y la otra inicia su diferenciación). La división simétrica aumenta el número de células de la población troncal, mientras que en la segunda este número se mantiene.

Las células troncales cumplen dos objetivos fundamentales: primero, de ellas se derivan las células del *soma* durante el desarrollo del organismo; y segunda, producen más células troncales durante la vida del individuo, para sustituir a las que mueren (regeneración).

## Potencialidad de las células troncales

Las células troncales se distinguen por tener diferente potencial de dar origen a los distintos tipos de células diferenciadas. El potencial máximo, o *totipotencialidad*, lo tiene el óvulo (y su forma fertilizada, el cigoto), que en el transcurso de su formación en el ovario acumula en su citoplasma factores reguladores que programan el desarrollo embrionario (Figura 1).

Mediante la división simétrica del cigoto, estos factores se distribuyen en las células y determinan el estado troncal de las células *pluripotenciales* (células troncales embrionarias, ESC, por las siglas en inglés de *embryonic stem cells*), localizadas en el interior del *blastocisto*, por lo que se las conoce como “masa celular interna” (ICM, por las siglas en inglés de *inner cell mass*). Estas células pluripotenciales de masa interna se denominan ICM-SC.

En el siguiente estadio de desarrollo (*epiblasto*), las células madre embrionarias mantienen la pluripotencialidad, pero con algunos cambios en sus características (se definen como epi-células troncales, o Epi-SC).

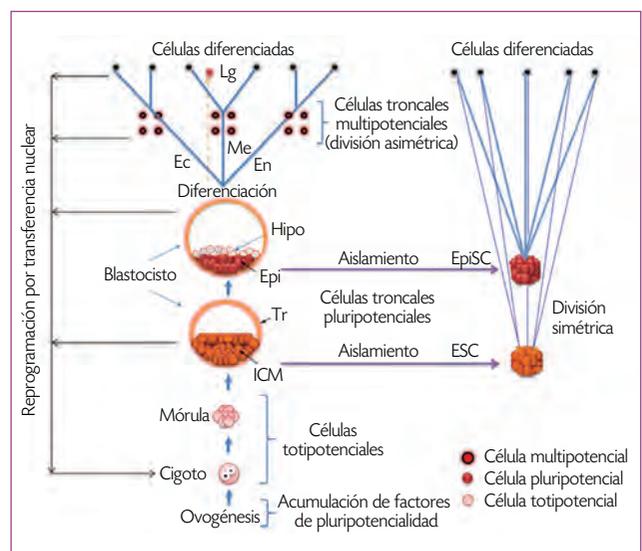


Figura 1. Potencialidad de las células troncales.

Después de este estadio, comienzan los procesos de diferenciación, en el transcurso de los cuales las Epi-SC forman las células de las tres capas embrionarias –ectodermo, endodermo y mesodermo–, progenitoras de todos los tipos celulares de tejidos y órganos.

En esta transición, las Epi-SC pierden la pluripotencialidad y se derivan en células diferenciadas y células troncales adultas multipotenciales de los tejidos. Estas últimas utilizan la división simétrica para alcanzar el nivel de la población troncal necesaria en el tejido, y en el resto de la vida del tejido utilizan la división asimétrica para autorrenovarse y para derivarse en células diferenciadas del tejido.

Un pequeño grupo de Epi-ESC de masa interna mantiene la pluripotencialidad, formando progenitoras de células germinales primarias (PGC, por las siglas en inglés de *primary germinal cells*), las cuales migran y se depositan en las gónadas para convertirse en espermatozoides en el testículo u óvulos en el ovario, y generar cigotos totipotenciales en la siguiente generación.

### Genes de pluripotencialidad de las células troncales embrionarias

Los embriólogos sabían desde hace mucho tiempo que el citoplasma del óvulo contiene factores que determinan la totipotencialidad y pluripotencialidad embrionaria, y los denominaron “factores morfogénicos”. En los años cincuenta se realizaron los primeros experimentos de “clonación” de anfibios mediante el trasplante de núcleos de células diferenciadas al citoplasma del óvulo (Briggs y King, 1952), que continua-

ron en peces (Gazarian y colaboradores, 1979) y por último en mamíferos. Con el nacimiento de la famosa oveja Dolly en 1997 (Campbell y colaboradores, 2007) se demostró que los factores acumulados en el citoplasma del óvulo (ovoplasma) son capaces de reprogramar el núcleo de una célula diferenciada para convertirlo en un núcleo adecuado al de una célula troncal embrionaria.

En los últimos 10 a 15 años, los investigadores han aislado e investigado cientos de genes que codifican para los factores que determinan el estado pluripotencial en las células troncales embrionarias. Los genes denominados Oct3/4, Sox2 y Nanog fueron reconocidos como el equipo principal que controla miles de genes que forman el circuito regulatorio de la pluripotencialidad. En las células troncales embrionarias, estos tres genes mantienen al circuito en estado activo, y al mismo tiempo reprimen los genes de diferenciación de las tres capas embrionarias (Figura 2).

Las proteínas producidas por cada uno de estos tres genes pueden unirse a sitios específicos en las regiones promotoras de los genes del circuito, y al unirse a ellos activan o reprimen la actividad de dichos genes. Boyer y colaboradores (2005) determinaron que el gen Oct3/4 tiene sitios de unión en 623 genes; el Sox2, en 1 271; Nanog, en 1 687, y todos juntos en 323 genes. Son estos genes los que se expresan en el proceso de ovogénesis, y sus productos –factores de pluripotencialidad– se almacenan en el ovoplasma en forma inactiva. La fecundación provoca su traslado al núcleo, donde se unen con promotores de genes y programan el estado pluripotencial del núcleo de las células troncales embrionarias en la masa interna del blastocisto.



Figura 2. El circuito de genes de pluripotencialidad controlados por los Oct3/4, Sox2 y Nanog.

En las células troncales embrionarias, el equipo de Oct3/4, Sox2 y Nanog mantiene a los genes del circuito de pluripotencialidad en su forma activa, y a los genes de diferenciación reprimidos hasta el siguiente estadio, cuando se inicia la diferenciación de ectodermo, endodermo y mesodermo.

No se sabe cómo ocurre esta activación de un grupo y la inactivación del otro. Se supone que un papel importante lo desempeña la proteína P53: se une con el promotor de Nanog y reprime su actividad. Tras de la inactivación del gen Nanog se inactivan los genes Oct3/4, Sox2 y el circuito de pluripotencialidad. A partir de este momento, y durante toda la vida del organismo, estos genes no estarán activos en las células normales, pero pueden ser activados en células troncales de tejidos y células malignas (cáncer).

### ● **Reprogramación de células diferenciadas**

Hasta 2006, los investigadores expresaban en células diferenciadas los genes de pluripotencialidad en forma individual, lo que no lograba activar el circuito entero.

En 2006, Shinya Yamanaka y su colaborador Kazutoshi Takahashi, de la Universidad de Kioto (Japón), lograron por primera vez transferir a las células diferenciadas 24 genes del circuito de pluripotencialidad, e indujeron cambios globales epigenéticos (Delgado-Coello, 2011) que se tradujeron en la activación del circuito de los genes de pluripotencialidad, y la inactivación de los genes de diferenciación y conversión (reprogramación) de las células diferenciadas en pluripotenciales con las características de las células troncales embrionarias.

Disminuyendo el número de genes transferidos, encontraron que sólo un conjunto de cuatro genes—Oct3/4, Sox2, Klf4 y cMyc— es suficiente para inducir los cambios. Los autores denominaron a las células epigenéticamente transformadas como *iPSC* (*induced Pluripotent Stem Cells*, células troncales pluripotenciales inducidas). En junio de 2007, el grupo de Rudolf Jaenisch (Estados Unidos), reconocido por sus aportaciones a la clonación y los mecanismos de epigenética, confirmó estos resultados (Wernig y colaboradores, 2007). A partir de este momento se inicia el uso extenso de la me-



todología de generación e investigación de las células troncales pluripotenciales inducidas, iPSC.

Como ya se ha mencionado, las primeras células iPSC fueron obtenidas gracias al uso de genes Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc, de los cuales Klf4 y cMyc son oncogénicos (causan cáncer). Para evitar este efecto, James Thomson y colaboradoras (Estados Unidos) demostraron que se pueden sustituir por Nanog y Lin28 (Yu y colaboradores, 2009).

### ● **Obtención y características de las iPSC**

El experimento de Yamanaka no habría sido el éxito que fue sin el uso de algún vector retroviral (como el virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1, VIH-1, o el virus de la leucemia) como vehículo de transferencia y expresión, pues sólo un vector así es capaz de introducir en una célula los grupos de genes

necesarios para inducir la actividad del circuito de la pluripotencialidad.

Esa posibilidad se logra mediante la infección múltiple de la célula con retrovirus. El retrovirus de Moloney, que fue utilizado inicialmente, y los lentivirus (VIH) que se utilizaron posteriormente en otros laboratorios tienen un genoma formado por una molécula de ARN y una enzima transcriptasa inversa, que produce una copia de éste hecha de ADN, la cual se inserta en algún sitio del genoma celular en forma de provirus. Los genes de reprogramación insertados en el provirus se expresan bajo el control de los reguladores del virus y la acción de las enzimas celulares. Luego de un periodo breve, la expresión se detiene gracias a mecanismos epigenéticos. Sin embargo, la expresión temporal de genes es suficiente para inducir la expresión de los genes celulares de pluripotencialidad e iniciar así la cadena de procesos de reprogramación, lo cual hace que la célula diferenciada sea cada vez más parecida a una célula troncal embrionaria en morfología y en marcadores exteriores e interiores.

En la primera etapa, que dura de 12 a 14 días, los cambios no son definitivos. Dependiendo de si las condiciones son favorables o no, la célula puede seguirse reprogramando o regresar al estado inicial. En el segundo periodo (10-12 días), cuando la actividad de los propios genes de factores de reprogramación sustituye los exógenos (que se apagan), el proceso de reprogramación se fortalece y la célula pasa al estado de iPSC. Las iPSC obtenidas a partir de células diferenciadas mimetizan a las células troncales embrionarias (Figura 3) y pueden sustituirlas en estudios básicos de pluripotencialidad y generar células diferenciadas para uso práctico (Yamanaka, 2009).

## Aplicaciones de las iPSC

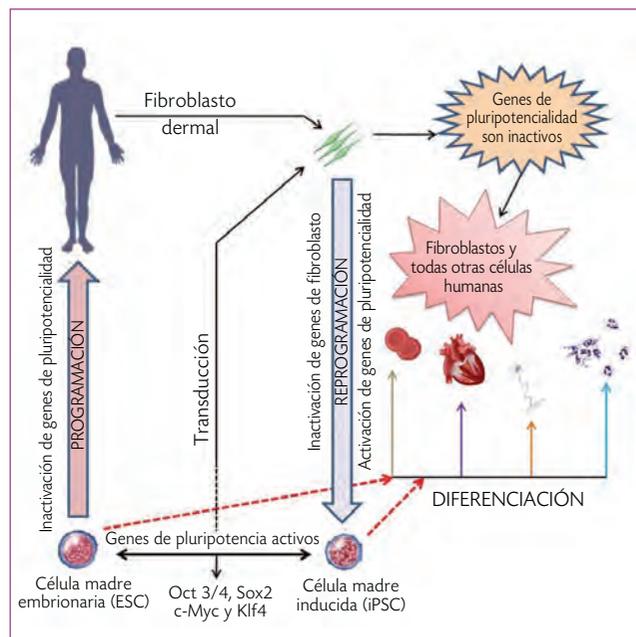
a) *Medicina regenerativa*: según Mason y Dunnill (2008) es un campo de estudios básicos aplicados y pruebas iniciales en el uso clínico de células obtenidas de fuentes troncales como material biológico vivo para terapia de enfermedades cardíacas, neurodegenerativas, diabetes, artritis, etcétera.

A nivel científico, su tarea es producir conocimiento sobre los mecanismos de diferenciación, des-dife-

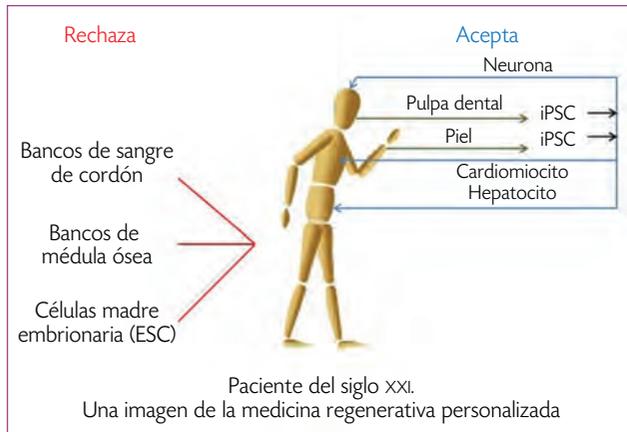
renciación y trans-diferenciación (conversión de una célula derivada de una capa a otra capa embrionaria), y desarrollar técnicas para su aplicación segura y eficiente en la clínica. Las células desarrolladas a partir de células troncales embrionarias no pueden ser utilizadas clínicamente por razones éticas, porque su obtención supone la destrucción de embriones vivos. La demanda creciente de la medicina regenerativa impulsa la necesidad de desarrollar fuentes seguras de células sin el uso de embriones como una tarea de primordial importancia.

La metodología de reprogramación de células somáticas cambia la situación de manera drástica. Las iPSC no sólo sustituyen a las células troncales embrionarias, sino resuelven tres problemas de gran importancia que no pueden resolver éstas: 1) el ya mencionado problema ético; 2) el problema del rechazo inmunológico (pues se utilizan las células del propio paciente), y 3) se elimina la necesidad de tener bancos de células, que ofrecen material de baja calidad, alto precio y con la necesidad de buscar muestras inmunológicamente compatibles.

Con las células troncales pluripotenciales inducidas (iPSC), la medicina regenerativa se convierte en *medicina regenerativa personalizada* (Figura 4), en la cual el



**Figura 3.** La pluripotencialidad de las células iPSC producidas a partir de células diferenciadas (fibroblastos de piel como modelo).



**Figura 4.** Perspectivas de la medicina regenerativa personalizada que abren las iPSC.

paciente es fuente de células completamente compatibles, recién obtenidas, no congeladas, etcétera. En la etapa actual, la metodología de obtención de iPSC tiene por lo menos dos problemas por resolver: eliminar el uso de retrovirus (una alternativa es utilizar, en lugar de los genes, sus productos) y realizar pruebas para tener permisos del uso seguro de las iPSC en la clínica.

b) *Reprogramación de cáncer:* el cáncer es una transformación poligénica de la célula que resulta en cambios en el funcionamiento de un patrón de genes que controlan los procesos bioquímico-fisiológicos, energéticos, del ciclo celular, estado epigenético y, más importante, en la pérdida de la respuesta normal a factores de regulación sistémica dentro del organismo.

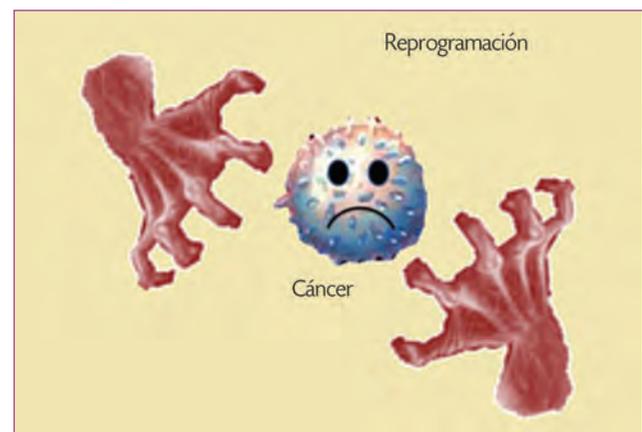
Uno de los avances importantes en cancerología reciente fue el descubrimiento de células troncales de cáncer: una pequeña fracción de la población tumoral con la capacidad de auto-renovarse (igual que las células adultas de tejido normal). Las células troncales provienen de células del cuerpo del tumor, e inician nuevos tumores después de un periodo prolongado de remisión. Según el concepto de células troncales de cáncer, la metástasis es resultado de la migración de estas células hacia otros sitios, donde inician nuevos tumores.

Los investigadores buscan células troncales para destruirlas o inducir en ellas el estado de células troncales normales. La metodología de reprogramación puede proponer una solución radical a este problema, ya que estudios recientes revelan muchas similitudes entre los procesos de reprogramación y carcinogénesis.

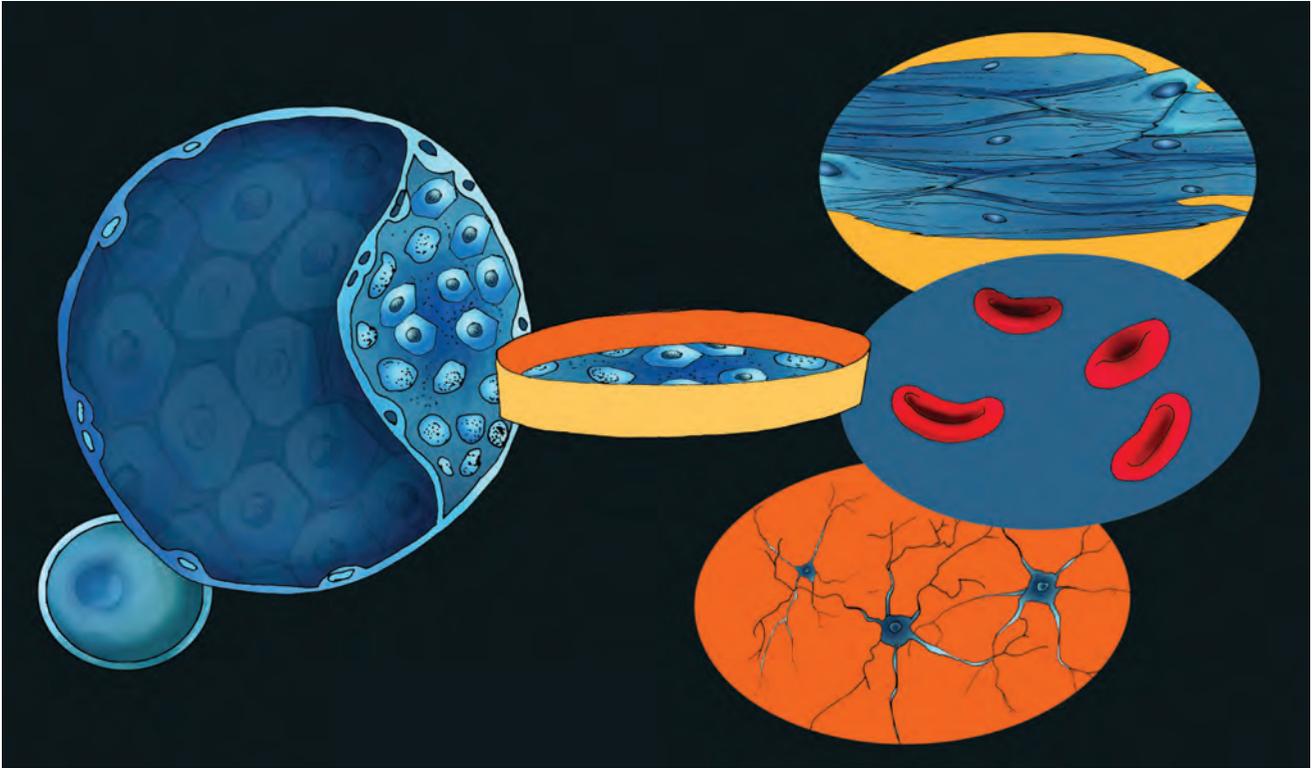
## Similitudes entre reprogramación y carcinogénesis

1) *Los mismos factores impiden la carcinogénesis y la reprogramación:* en la célula normal funciona el mecanismo de control del ciclo celular, que determina cierto número de ciclos de división para la célula. Tanto la carcinogénesis como la reprogramación eliminan el control del ciclo celular, por lo que las divisiones proceden sin parar y la célula se vuelve inmortal. En ambas ocasiones esto ocurre por la inhibición del gen p53 y su blanco principal, p21. El gen p53 es un conocido supresor de carcinogénesis, al inducir la detención del ciclo celular, la senescencia, la reparación de ADN y la apoptosis. Este gen p53 está mutado en más de 50% de los tumores. En forma similar, este gen es una barrera de la reprogramación tal que el silenciamiento de p53 aumenta el porcentaje de células iPSC.

2) *Los mismos genes promueven la reprogramación y la carcinogénesis:* en la búsqueda de genes de inducción de iPSC, Takahashi y Yamanaka incluyeron en el grupo de genes reprogramadores a cMyc, un factor de oncogénesis. Esto significa que cMyc induce cambios necesarios tanto para la reprogramación como para el cáncer. Además, una de las propiedades clave de las iPSC (igual que las células troncales embrionarias) es la formación de tumores (teratomas) después de ser trasplantados a ratones inmunocomprometidos. Si las iPSC no muestran capacidad teratogénica, se considera que carecen de pluripotencialidad. Las células diferenciadas no inducen tumores y adquieren esta capacidad sólo cuando hay reprogramación y malignización. Por



**Figura 5.** Reprogramación enfocada al cáncer.



supuesto, las vías de cáncer y de formación de iPSC coinciden, y por ello los estudios de los mecanismos de reprogramación y carcinogénesis son de utilidad mutua, y la investigación del mecanismo de reprogramación es un camino hacia el desarrollo de nuevas estrategias contra el cáncer.

3) *La reprogramación puede detener el crecimiento del cáncer*: basándose en las similitudes entre el cáncer y las iPSC, se han iniciado experimentos de reprogramación de las células tumorales. Utikal y colaboradores (2009) utilizaron el melanoma como modelo y reportaron que tanto las células normales, melanocitos, como las de melanoma, pudieron convertirse en iPSC con la diferencia de que el melanoma no requería Sox2. En el trabajo publicado por un grupo japonés (Miyoshi y colaboradores, 2010) se reprogramaron varias líneas de cáncer gastrointestinal. Según el reporte, las células reprogramadas expresaban marcadores de células troncales embrionarias: NANOG, OCT3/4, SOX2, KLF4 y c-MYC, y marcadores de membrana: SSEA-4, Tra-1-60, Tra-1-81 y Tra-2-49.

En nuestro trabajo (que se realiza en colaboración con el grupo del doctor Vicente Madrid, del Instituto

Nacional de Salud Pública, en Cuernavaca, Morelos) nos enfocamos en el cáncer cervicouterino (línea SiHa), en el cual los oncógenos que causan los cambios malignos son las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano (VPH). La proteína E6 forma un complejo con p53 y la envía al sistema de degradación, lo que produce falta de la proteína p21 (inhibidor de CDKs), disminución de la fosforilación del RB y liberación de los factores de transcripción E2F, que en conjunto provocan la proliferación incontrolable. El E7 forma un complejo con el RB y suprime completamente su participación en el control del ciclo celular. Nuestros resultados muestran que la expresión forzada de genes de reprogramación en células SiHa baja la expresión de los genes E6 y E7, e inhibe el crecimiento de tumores.

## Conclusiones

1. El advenimiento de la tecnología vanguardista de la reprogramación global del epigenoma de células diferenciadas que resulta en su conversión a células pluripotenciales semejantes (pero no idénticas) a las células troncales embrionarias, denominadas células

troncales pluripotenciales inducidas (iPSC), abre una nueva era en el campo de estudios básicos del desarrollo celular y el papel de los genes reguladores en la pluripotencialidad.

2. Las iPSC proveen nuevas posibilidades para el desarrollo de la medicina regenerativa personalizada sin limitaciones éticas ni dependencia del mercado de células de baja calidad y alto precio almacenadas en bancos.

3. Una de las aportaciones importantes se espera que sea en cancerología básica y aplicada.

Por estas aportaciones revolucionarias a la ciencia básica y a la medicina regenerativa, en sólo cinco años, John Gurdon, por trabajos de la reprogramación mediante la transferencia nuclear, y Shinya Yamanaka, por el descubrimiento de la posibilidad de la reprogramación con el uso de genes de pluripotencialidad, fueron ganadores del premio Nobel en fisiología o medicina 2012.

#### Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Conacyt (CB-2007 SEP-Conacyt, proyecto 82794). El autor agradece a Ricardo Cevallos por su contribución importante en la preparación del manuscrito y a Jonathan Alcántar Fernández por la preparación de las ilustraciones y correcciones del texto.

**Karlen Gazarian** es investigador y jefe del Laboratorio de Genética Molecular en el Departamento de Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Es especialista en biología y genética molecular, biología del desarrollo y embriología experimental. Es egresado de la Universidad Estatal de Erevan, Armenia; fue jefe del Departamento de Embriología de la Facultad de Biología de la Universidad Estatal de Moscú, jefe de Laboratorio de Citología en el Departamento de Radiobiología del Instituto Kurchatov de Energía Atómica, y jefe de Departamento de Embriogenética del Instituto de Genética Molecular de la Academia de Ciencias de la URSS. Sus áreas de trabajo son la diferenciación celular, la transgénesis y la clonación de animales. Desde 1996 trabaja en la UNAM. Fue ganador del premio a la mejor solicitud de patente en la UNAM y el premio CANIFARMA.

karlen@unam.mx

#### Lecturas recomendadas

- Boyer, L. A., T. I. Lee, M. F. Cole y colaboradores (2005), "Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells", *Cell*, 122: 947-956.
- Briggs, R. y T. J. King (1952), "Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Frog's Eggs", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 38: 455-463.
- Campbell, K. H., R. Alberio, I. Choi y colaboradores (2007), "Cloning: Eight Years after Dolly", *Reprod. Domestic Anim.*, 40(4): 256-268.
- Corette, J. E., J. Pruszk, M. Varadaralan y colaboradores (2010), "Generation of iPSCs from Cultured Malignant Cells", *Blood*, 115: 4039-4042.
- Delgado-Coello, B. A. (2011), "¿Qué es la epigenética?", *Ciencia*, 62: 73-82.
- Gazarian, K. G., N. Hung y colaboradores (1979), "Nuclear Transplantation in *Teleosts Misgurnus Fossilis*", *Nature*, 280: 585-587.
- Mason, C. y P. Dunnill (2008), "A Brief Definition of Regenerative Medicine", *Regenerative Medicine*, 3: 1-5.
- Miyoshi, N., N. Ishii y colaboradores (2010), "Defined Factors Induce Reprogramming of Gastrointestinal Cancer Cells", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107: 40-45.
- Takahashi, K. y S. Yamanaka (2006), "Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors", *Cell*, 126: 663-676.
- Utikal, J., N. Maherali y colaboradores (2009), "Sox2 is Dispensable for the Reprogramming of Melanocytes and Melanoma Cells into Induced Pluripotent Stem Cells", *J. Cell Science*, 122: 3502-3510.
- Wernig, M., A. Meissner, R. Foreman y colaboradores (2007), "In Vitro Reprogramming of Fibroblasts into a Pluripotent ES-cell-like State", *Nature*, 448: 318-324.
- Yamanaka, S. (2009), "A Fresh Look at iPSC", *Cell*, 137: 13-17.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, K. Smuga-Otto y colaboradores (2009), "Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells", *Science*, 318: 1917-1920.

