

Un gran paso en Medicina Regenerativa sin utilizar células madre embrionarias

El 27 de Enero la revista *Nature* ha publicado on line un importante trabajo que supone otro avance en la dirección de la medicina regenerativa sin utilizar células embrionarias. Un comentario del **Prof. Nicolás Jouve** al artículo:

T Vierbuchen, A. Ostermeier, ZP Pang, Y Kokubu' Thomas C. Südhof and M. Wernig
Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors. Nature advance online publication 27 January 2010 | doi:10.1038/nature08797.

Abstract: La diferenciación celular y el compromiso de linaje se consideran procesos sólidos e irreversibles durante el desarrollo. Trabajos recientes han demostrado que los fibroblastos de ratón y humanos pueden ser reprogramados a un estado celular pluripotente con una combinación de cuatro factores de transcripción (experimentos de Yamanaka)-. Esto planteó la cuestión de si los factores de transcripción podían inducir directamente a otros destinos definidos de células somáticas, y no sólo hacia un estado indiferenciado. La hipótesis que se planteó es si una expresión combinatoria de factores de transcripción neuronales linaje-específica podría convertir los fibroblastos directamente en neuronas. A partir de un grupo de diecinueve genes sólo tres, *Ascl1*, *Brn2* (también llamado *Pou3f2*) y *Myt1*, es suficiente para convertir rápida y eficientemente los fibroblastos embrionarios y postnatales de ratón en neuronas funcionales in vitro . Estas células neuronales inducidas (células iN) expresan varias proteínas específicas de neurona, y tienen potencialidad de generar sinapsis funcional. A partir de linajes de células no-neuronales, se podrían obtener células iN con importantes implicaciones en estudios de desarrollo neural, modelización de enfermedad neurológica y medicina regenerativa.

Primer paso: la reprogramación de células adultas hacia células pluripotentes (Noviembre 2007)

A finales de 2007, investigaciones de varios grupos habían demostrado que es posible una reprogramación genética de células diferenciadas y que éste método es mejor y más seguro para atacar la producción de células válidas para el trasplante de tejidos deteriorados, que la vía seguida hasta entonces con células madre procedentes de embriones. Con la reprogramación genética a partir de células adultas diferenciadas se resolvían dos problemas, uno técnico, al poder utilizarse células del propio paciente, soslayando el problema del rechazo, y el segundo ético, al no tener que utilizar embriones.

Todo empezó a finales de 2006, cuando los japoneses Kazutoshi Takahashi and Shinya Yamanaka¹, del Departamento de Células Madre de la Universidad de Kyoto, experimentando en ratón, demostraron la posibilidad de reprogramar células de la piel y fibroblastos, hacia células madre pluripotentes, mediante la modificación de las células somáticas con cuatro factores genéticos: *Oct3/4*, *Sox2*, *c-Myc* y *Klf4* que eran introducidos en el genoma receptor por medio de virus atenuados. Estas células, que se denominaron iPS (=induced pluripotent stem cells), presentan la morfología y las propiedades de crecimiento de las células madre embrionarias y también expresan proteínas propias de dichas células. Sin embargo, en los primeros experimentos, el trasplante subcutáneo de células iPS en ratones causaba tumores, que afectaban a una variedad de tejidos de las tres capas germinales, ectodermo, mesodermo y endodermo. Por otra parte, la inyección de las células iPS en blastocistos de ratón, generan el desarrollo embrionario, lo cual demuestra que se comportan como las células embrionarias.

Prácticamente al mismo tiempo, en noviembre de 2007, de nuevo el Dr.Yamanaka² en Japón, y el del Dr. James Thompson en la Universidad de Wisconsin-Madison, con procedimientos distintos, publicaron el logro de la reprogramación de células de la piel y del tejido conectivo, fibroblastos, convirtiéndolas en células madre pluripotentes, capaces de diferenciarse en cualquier tejido del cuerpo humano. En el caso del Dr.Thompson la desprogramación se obtenía mediante la transformación de las células somáticas por la introducción de cuatro genes parcialmente comunes a los de Yamanaka, los llamados *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* y *Lin28*³.

El resultado de estas investigaciones fue muy importante al haberse conseguido que células somáticas de tejidos adultos y por tanto ya diferenciadas, se comportasen y actuaran como células madre embrionarias. Los linajes celulares de aquellas células somáticas se transformaban en células pluripotentes, capaces de dirigir su especialización hacia células cardiacas, óseas, neuronas o de cualquier otra especialidad celular. Los dos trabajos tuvieron mucha repercusión tras su publicación en *Cell* y *Science*, dos de las mejores revistas científicas de la especialidad. Las células pluripotentes humanas producidas en ambos casos habrían de servir para su uso en medicina regenerativa, pero antes habrían de superar ciertos controles, como los relativos a la eliminación de riesgos debidos a los vectores retrovirales utilizados para la

¹ K. Takahashi, S.Yamanaka, «Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors», en *Cell* 126 (2006), pp. 1-14

² K. Takahashi, K. Tanabe, S.Yamanaka, M. Ohnuki, M. Narita, T. Ichisaka, K. Tomoda, «Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors» DOI:10.1016/j.cell. (2007) 11.019

³ J.A. Thompson y col. «Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells». Published Online November 20, 2007. *Science* DOI: 10.1126/science.1151526

introducción de los genes en las células de la piel, la formación de tumores y su bajo rendimiento.

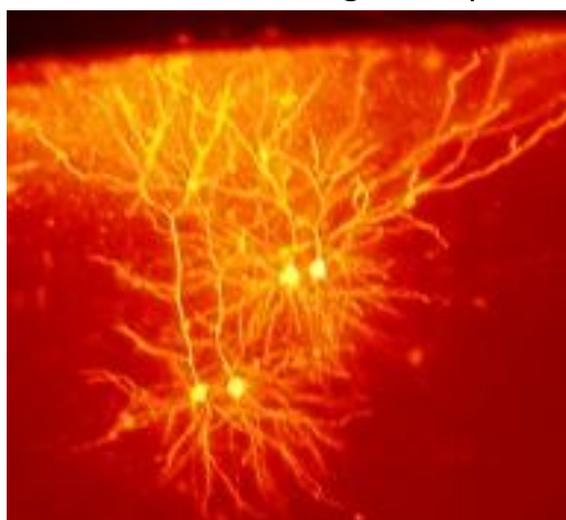
Segundo paso: La reprogramación sin pasar por células pluripotentes (Nature Enero 2010)

En una llamativa demostración de la flexibilidad celular, el equipo del Dr. Marius Wernig de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, ha dado a conocer un nuevo gran avance, continuación las anteriores investigaciones. En su trabajo el Dr. Wernig da a conocer la producción de neuronas funcionales a partir de fibroblastos (células iN = Neuronas inducidas), sin pasar por la etapa intermedia de células pluripotentes, de acuerdo con la publicación on line de *Nature* que encabeza este comentario.

La importancia de esta investigación es que al eludir el paso hacia células pluripotentes se evitan las posibilidades de formación de tumores. La investigación abre muchas posibilidades para obtener reprogramación celular hacia muchos tipos de especialidades celulares.

El trabajo se inspira en las investigaciones previas de Shinya Yamanaka de reprogramación celular con cuatro factores de transcripción (cuatro genes) que inducían la diferenciación celular para retroceder a un estado pluripotente, para a continuación, ser rediferenciadas (reprogramadas) hacia otro tipo de especialidad celular adulta. En este caso el equipo del Dr. Marius Wernig ha tratado con éxito una reprogramación directa sin marcha atrás al estadio pluripotente. La pregunta a la que obedece esta investigación y que ha sido resuelta satisfactoriamente es "**¿podemos pasar de fibroblastos de piel directamente a neuronas?**"

Para responder a esta pregunta, Wernig y sus colegas probaron la transformación de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) con un "cóctel" de 19 genes, que se expresan habitualmente en tejidos neuronales. 32 días más tarde, las células derivadas del cultivo mostraban morfologías típicas neuronales. Probando varios conjuntos de genes, los investigadores redujeron el campo a sólo tres genes: *Ascl1*, *Brn2* y *Myt1*, que mantenían la capacidad de convertir no sólo células MEFs hacia neuronas, sino también los fibroblastos postnatales (de adulto).



Este no es el primer ejemplo de la conversión de un tipo de célula adulta en otro. En 2008, por ejemplo, se habían convertido correctamente células β pancreáticas maduras de tumores en células similares en ratones adultos. El nuevo avance, sin embargo, es que

es el primero en inducir la producción de neuronas completamente funcionales (células iN), capaces de generar potenciales de acción y capaces de establecer contactos sinápticos con otras neuronas, de otro linaje somático. Wernig afirma que. "*Cuando crecen estas neuronas inducidas (iN) en un cultivo neuronal preexistente, son capaces de integrarse funcionalmente con ellas*".

Una gran ventaja de pasar por alto la etapa pluripotente es la de evitar la formación de tumores. Esto se debe a que las células pluripotentes son altamente proliferativas, de modo que pueden generar teratomas en el cerebro tras el trasplante. Por el contrario la transformación de las células somáticas (fibroblastos diferenciados) en células iN por medio de los genes *Ascl1*, *Brn2* y *Myt1* induce una parada de la división celular. En cierto modo se comportan como anticancerígenos.

No obstante, esto tiene una desventaja, y es que las células iN, muestran una incapacidad para su expansión en el cultivo. Esto es lo opuesto a lo que ocurre con las células en estado pluripotente, que permiten la producción de un gran número de células. Así, a pesar del hecho de que los investigadores han alcanzado casi el 20 % de eficiencia en la conversión (muy por encima de la eficiencia de 0,1 % o 0,01 % asociada a las células pluripotentes), queda por ver si se puede generar suficiente tejido para que sea útil en una terapia de inducción. Este es el reto hacia el futuro a partir de estas células inducidas.

Queda además otro paso a resolver relacionado con los riesgos de la manipulación genética. Incluso sin usar oncogenes. Insertar genes foráneos en el genoma puede ser potencialmente perjudicial si, por ejemplo, la manipulación activa un oncogén nativo o algún gen que interrumpa la función de un gen supresor de tumores. Este problema es analizado por Marius Wernig, que piensa que puede superarse mediante la sustitución de la transformación celular con factores genéticos con la transducción de la proteínas.

Hasta que se resuelven los problemas planteados en los experimentos del Dr. Wernig, la falta de expansión de estas células y el control de la inserción de los genes en regiones seguras de su genoma, habrá que seguir investigando Pero al mismo tiempo se abren nuevas expectativas. Una aplicación muy atractiva de este método podría ser el desarrollo de modelos para estudios de terapias de enfermedades específicas. Las aplicaciones biomédicas no serían útiles solo para las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, sino además para otras enfermedades que afectan a la actividad neuronal del cerebro, como la depresión, esquizofrenia o incluso trastornos autistas. Resueltos los problemas bioéticos de la utilización de los embriones, estamos ante lo que puede ser una nueva y esperanzadora etapa de la medicina regenerativa, que comenzó a finales del 2007, con las extraordinarias investigaciones del Dr. Yamanaka.