

PREMIO NOBEL DE MEDICINA 2012 UN NUEVO CAMINO PARA EL TRASPLANTE DE TEJIDOS

El premio Nobel de Medicina del 2012 ha sido concedido a los Doctores John Gourdon, del Instituto Gourdon en Cambridge, Gran Bretaña, y Shinya Yamanaka de la Universidad de Kioto en Japón. En 1958 el Dr. Gourdon fue el primer científico en clonar un animal utilizando un óvulo de rana con el ADN de la célula intestinal de otra cría, obteniendo un renacuajo normal; y Yamanaka, en el 2006, demostró que las células adultas pueden transformarse en células madre (*stem*) embrionarias que podrían utilizarse para la regeneración de tejidos dañados en el cerebro, corazón y otros órganos. La Asamblea del Premio Nobel, en el Instituto Karolinska en Suecia, subrayó que estos descubrimientos han cambiado por completo nuestra visión del desarrollo y especialización de las células. Todos los tejidos del cuerpo se originan de células madre antes de desarrollarse plenamente (“células adultas”), la gran esperanza de obtener células madre en el laboratorio es que puedan utilizarse para reemplazar tejidos dañados, desde heridas en la médula espinal hasta la enfermedad de Parkinson.

Examinemos a continuación algunos antecedentes de estos estudios, su potencial trascendencia y significado.

La disponibilidad de óvulos fertilizados, desechados en las Clínicas de Fertilización en el mundo, estimuló a los investigadores a intentar el cultivo de células embrionarias humanas (1).

El embrión, en el estadio de blastocisto, es una bolsa que tiene una envoltura o capa de células externas y una zona interna engrosada denominada la masa de células internas ICM (“internal cell mass”). La envoltura es la que, producida la implantación, da lugar a la placenta. La “masa celular interna”, ICM, es la que forma el feto (1).

Hace ya algún tiempo que experimentos realizados en animales menores demostraron que al colocar el blastocisto en un petri o placa de cultivo de células, la envoltura o capa celular externa se colapsa y eventualmente desaparece quedando solo la “masa de células internas”. Estas células pueden, con medios apropiados, cultivarse indefinidamente en el laboratorio.

Con algunas variantes de procedimiento estos mismos experimentos se realizaron en primates, y en 1998 James A. Thomson y col., de la Universidad de

Wisconsin, lo lograron, igualmente, con las células del blastocisto humano. Desde entonces se pueden cultivar células derivadas de la blástula humana. Estas son las llamadas células madre (*stem*) embrionarias humanas (1).

Las células madre tienen variable potencial: solamente el cigoto y los descendientes de las primeras dos divisiones son totipotentes, capaces de formar embrión y placenta (2). Después de alrededor de cuatro días, luego de la fertilización, estas células comienzan a especializarse, proceso que se llama diferenciación.

Llámesese células madre embrionarias o ES (embryonic stem) a las derivadas de la ICM (3).

Las células ICM (en los primeros 5 - 6 días después de la formación del cigoto) son pluripotentes, esto es, capaces de diferenciarse en cualquiera de las células que forman las tres capas germinales (2).

Avanzado el proceso de diferenciación, 15 - 16 días, las células embrionarias se hacen multipotentes, esto es, solo pueden formar algunas de las células de la misma hoja germinal de donde provienen (2).

El proceso de diferenciación es normalmente unidireccional. Producido el nacimiento del nuevo ser los órganos están constituidos por células diferenciadas o adultas. Sin embargo, la mayoría de los tejidos en los órganos tienen una reserva de células madre (“stem”) multipotentes, capaces de producir un limitado rango de células diferenciadas, que sirve para reemplazar a las células que se dañan o mueren. Por ejemplo, en el intestino delgado, las células madre pueden producir cuatro líneas de linaje propio (células de Paneth, células “globet” o productoras de moco, células columnares absorbentes y células enteroendocrinas) (2).

Tener en el laboratorio por tiempo indefinido, semanas o meses, cultivos de “células embrionarias pluripotentes humanas” constituye un asunto que ha originado gran expectativa por la trascendencia que puede tener para el futuro de la medicina (4) (5).

Las células embrionarias e indiferenciadas con estímulos específicos apropiados, factores de crecimiento, transcritores y otras moléculas del

lenguaje intercelular -que cada vez se descubren y definen con mayor precisión- pueden diferenciarse en tejidos específicos.

En la medida en que se reconozcan mejor los factores que determinan la diferenciación celular específica, se estará en condiciones de producir células y tejidos para usarlos en la terapia médica. La idea es poder reemplazar las células dañadas, en distintos órganos, por células normales. Por eso es que se habla de “ingeniería de tejidos y órganos”. Y se ha comenzado a patentar procedimientos de formación de células o tejidos para corregir condiciones patológicas en diversos órganos.

Sin embargo, los cultivos de células madre embrionarias humanas no escapan al problema básico derivado de la individualidad biológica genética.

Cada línea de células madre tiene la especificidad genética del embrión de dónde provino, de tal manera que estarán siempre expuestas a las reacciones inmunológicas del organismo receptor. En otras palabras, los pacientes tratados con estas células tendrían que, como los pacientes de trasplantes de órganos, someterse a terapias inmunosupresoras.

La única forma de evitar estas reacciones inmunológicas es que las células embrionarias madre reemplazantes sean derivadas del propio paciente en que se quiere reemplazar algún tejido enfermo y esto sólo puede obtenerse a través de la clonación terapéutica o clonación de investigación (6) (7).

Solo así se garantizaría un trasplante o reemplazo tisular sin la limitación del rechazo inmunológico.

La clonación terapéutica o clonación de investigación se consigue por la técnica de “transferencia nuclear de células somáticas o clonación”, que consiste en extraer el material genético nuclear, de una célula adulta e introducirlo en un huevo al que se le ha extraído el núcleo, “ovum vacío”. De este nuevo híbrido se desarrollará un embrión y de éste se obtienen las células madre pluripotentes. Se logra así revertir el reloj del desarrollo celular y retrotraerlo a la condición de célula embrionaria, proceso que se ha denominado “reprogramación celular”. Una célula adulta se ha reprogramado, en el laboratorio, a célula embrionaria (7).

Lograda la técnica de transferencia nuclear de células somáticas o clonación, hubo grandes esperanzas de poder, a partir de esas células pluripotentes humanas, reemplazar tejidos dañados y tener armas para curar enfermedades.

Laboratorios como *Advanced Cell Technology* e investigadores como Gerarld Schatten de la Universidad de Pittsburg (8, 9), y luego Hwang, Moon y col. (10) de la Universidad de Seúl en Corea del sur, comunicaron sucesivos estudios donde se alternaron resultados alentadores con fracasos.

Pronto, sin embargo, se fue aprendiendo que conseguir la diferenciación específica de las líneas cultivadas de células embrionarias, si bien se obtenía con algún éxito en animales menores, no resultaba igualmente feliz en el caso de las células madre embrionarias humanas obtenidas por clonación.

Los experimentos en múltiples laboratorios, académicos y privados, que se han desarrollado, sobre todo en Estados Unidos e Inglaterra, con el objeto de inducir la diferenciación específica en los cultivos de células madre embrionarias humanas, no han resultado, hasta ahora, del todo felices. Se han reportado éxitos parciales pero a la larga se ha concluido que todavía no se obtienen células diferenciadas específicas a voluntad y confiables (11).

Así las cosas, vino el experimento de Shinya Yamanaka y sus colaboradores, de la Universidad de Kyoto, Japón, en agosto del 2006. Ellos le dieron la vuelta al problema de reprogramación celular utilizando una tecnología nueva para transformar células adultas en células pluripotentes sin la necesidad de usar huevos o embriones (12).

Lo primero que hicieron fue identificar un cóctel de dos docenas de genes diferentes que están activos en las células pluripotentes pero silentes en las células adultas.

Cuando estos genes, usando retrovirus como vehículos, fueron introducidos en células de la piel del pericote, ellos fueron capaces de reprogramar a las células de la piel en células pluripotentes. A estas células les dieron el nombre de iPSGs (“induced pluripotent stem cells”). (12) (13) (14) (15) (16)

Dado que, en los últimos años los investigadores, como hemos antes subrayado, han estado embarcados en la tarea de lograr manejar células embrionarias para conseguir su diferenciación en células específicas que pudieran ser utilizadas en la medicina, enfrentando problemas éticos y políticos, la noticia del experimento de Yamanaka fue tomada con un poco de escepticismo. Sin embargo, pronto se comprobó que la nueva técnica era válida y hoy cientos de científicos están trabajando en todo el mundo para investigar el potencial de las “induced pluripotent stem cells” (iPSCs) siguiendo el procedimiento del grupo japonés, con la meta de saber si estas células pueden servir para tratar enfermedades humanas que hasta hoy desafían curación, tales como diabetes tipo 1, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

Sucesivos experimentos fueron demostrando, al grupo de investigadores japoneses, que no eran indispensables un gran número de genes para inducir la formación de iPSCs, y eventualmente comunicaron que con solo cuatro genes, *Oct4*, *Sox2*, *Klf* y *c-Myc*, ello era posible (17) (18) (19).

La figura 1 (página opuesta), tomada de la comunicación de Konrad Hochedlinger, profesor asociado de la Universidad de Harvard, en el número de mayo de 2010 de *Scientific American* (11), da una idea de cómo los cuatro genes se insertan usando la cadena genómica de un retrovirus inyectada en las células de la piel de pericotes. El virus incorporó los genes en el ADN del pericote, y estos genes comenzaron a reprogramar las células de la piel en células madre pluripotentes inducidas (iPSCs).

Se muestra de manera esquemática cómo Yamanaka inserta cuatro genes, normalmente activos en embriones, en un retrovirus modificado que luego es inyectado en la célula de la piel del pericote. El virus se inserta en el ADN del pericote y los genes inician la reprogramación de las células de la piel convirtiéndolas en células pluripotentes inducidas (iPSCs).

El gen *Oct4*, también llamado POU5F1, se localiza en el cromosoma 6 y está constituido por 114 317 bases. Codifica el factor de transcripción de la familia POU:

POU5F1, proteína que está críticamente involucrada en la capacidad de autorenovación e indiferenciación de las células madre embrionarias.

El gen *Sox2* se localiza en el cromosoma 3 y está constituido por 2 503 bases. Codifica la proteína SRY-BOX2, también conocida como Sox2, que es un factor de transcripción cuya función es esencial en el mantenimiento de la renovación de las células madre no diferenciadas.

El gen *Myc* se localiza en el cromosoma 8 y contiene 5 359 bases. Este gen codifica una fosfoproteína nuclear multifuncional que juega un rol importante en el ciclo celular, apoptosis y transformación celular. Se trata de un factor de transcripción que regula varios genes específicos. Su mutación, sobreexpresión, rearrreglo y translocación se ha asociado con una variedad de tumores hematopoyéticos, leucemias y linfomas, incluyendo el “Linfoma de Burkitt”.

El gen *Klf4* se localiza en el cromosoma 9 y contiene 4 621 bases. Codifica una proteína que constituye un factor de transcripción con acciones activadoras y represoras.

Estos estudios se han realizado con cultivos celulares de células adultas fibroblásticas y de la piel de pericotes y de seres humanos.

Como ya hemos señalado, el estudio del grupo japonés se ha repetido en múltiples laboratorios y, actualmente, se han reprogramado células adultas en el pericote, en el hombre, en la rata y en el mono, especies con las que se está trabajando las iPSCs, intensamente (11) (20) (21).

Es interesante que algunos investigadores han logrado reprogramar células usando un virus que no se integra permanentemente en el ADN celular, (figura 2) consiguiendo igualmente la producción de células iPSCs, y que han reportado la inducción de células pluripotentes (iPSCs) usando solamente tres o dos de los genes reprogramadores y aun con solo las proteínas de transcripción de los genes reprogramadores (figura 3). (19) (21)

Figura 1.
Se muestra de manera esquemática cómo Yamanaka insertó cuatro genes, normalmente activos en embriones, en un retrovirus modificado que luego fue inyectado en la célula de la piel del pericote.

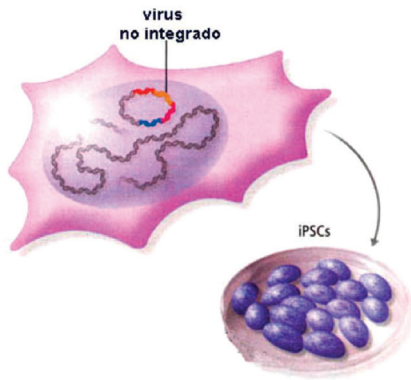
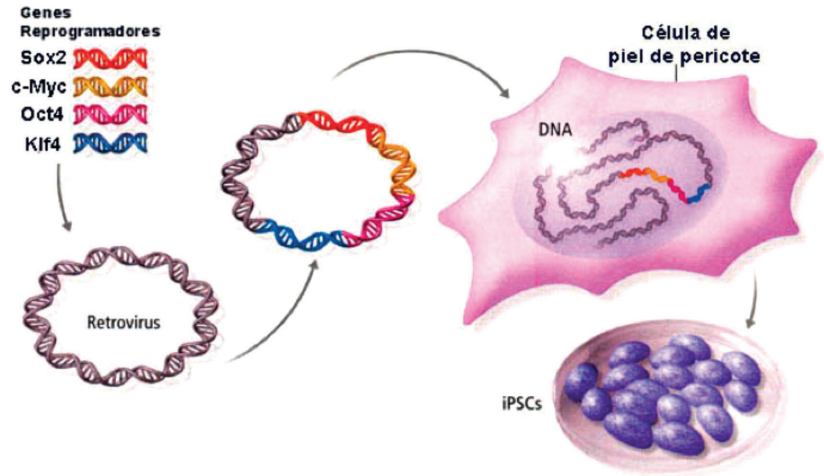
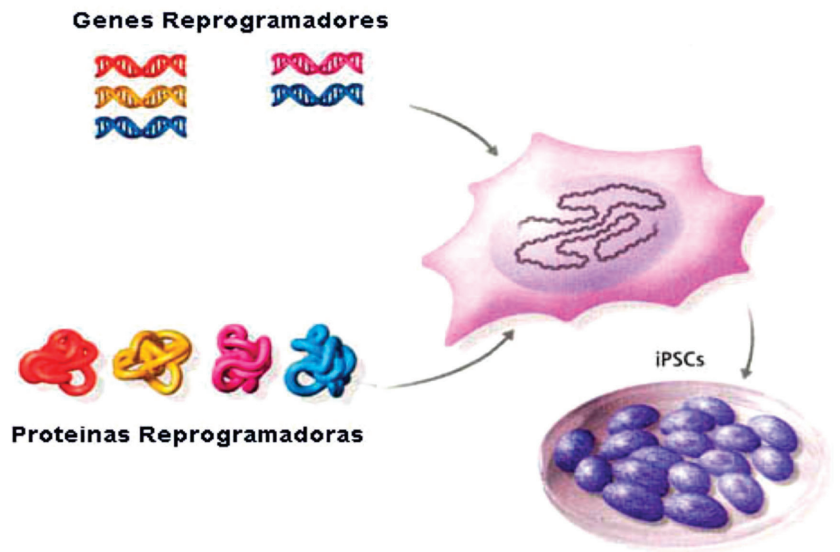


Figura 2.
Otros investigadores, reproduciendo el trabajo de Yamanaka con células de pericote y humanas, han utilizado virus que no se integran permanentemente al ADN celular, logrando, igualmente, la producción de iPSCs.

Figura 3.
Otros investigadores han logrado los mismos resultados que en los experimentos de Yamanaka utilizando solamente tres o dos de los cuatro genes y también usando solo las proteínas codificadas por los cuatro genes reprogramadores.



(figuras 1, 2 y 3 tomadas de Hochedlinger K. *Scientific American*, May 2010).

El descubrimiento de las iPSCs, que ha merecido el Premio Nobel del 2012, ha sido acogido con interés porque evita los problemas que trae la técnica de reprogramar células adultas usando la clonación. No se necesitan “ovums”, ni embriones y, por lo tanto, no traen problemas morales ni éticos. Sin embargo, estas nuevas células no dejan de tener sus problemas propios. Los controles de calidad y seguridad son delicados y todavía están por establecerse de manera definitiva. Todavía está por definirse plenamente qué son, en realidad, estas células y sus capacidades.

Aunque al microscopio, las colonias de iPSCs pueden lucir como las células madre embrionarias, mostrando incluso marcadores moleculares asociados a las células pluripotentes, la prueba inequívoca de su pluripotencia viene dada por tests funcionales. ¿Pueden estas células hacer todo lo que por definición hacen las células pluripotentes? Aún en las colonias de células embrionarias se pueden encontrar algunas células incapaces, que no son pluripotentes como las verdaderas células madre embrionarias, y por ello los científicos han desarrollado algunos tests de rutina para calibrar la pluripotencia (11).

Estas pruebas estrictas para calificar la pluripotencia son:

- a. La habilidad de las células madre de producir una variedad de células de diferente tipo en una placa de cultivo cuando son estimuladas con factores específicos de diferenciación;
- b. La habilidad de las células madre de producir un teratoma (un tumor que contiene células de todos los linajes embrionarios) cuando son inyectadas debajo de la piel a un pericote;
- c. La capacidad, cuando son inyectadas en un embrión inicial de un pericote, de incorporarse al crecimiento embrionario y contribuir al desarrollo de los tejidos de distinto linaje, incluyendo células germinales, en el pericote recién nacido resultante.

Mientras que las células madre embrionarias generalmente pasan todas estas pruebas estrictas, algunas de las células iPSCs obtenidas no lo hacen.

Un examen cuidadoso de las células que fallan ha revelado que los virus usados para introducir los cuatro factores de reprogramación de los genes en las células de la piel no han silenciado algunos de sus propios genes, dando como resultado células que no tienen, auténticamente, la calidad de pluripotentes.

Como los científicos, por razones éticas, no pueden realizar estas pruebas estrictas de pluripotencia en humanos (no se pueden inyectar iPSCs en embriones humanos tempranos para ver si se incorporan al desarrollo), es absolutamente crítico asegurarse que las iPSCs humanas llenan los otros criterios de pluripotencia.

Ahora los estudios están dirigidos a centrarse en las células iPSCs que son capaces de pasar estas pruebas estrictas de pluripotencia y buscar puntualizar los elementos que distinguen a las células buenas (pluripotentes) de las células malas (no pluripotentes). Así como evitar los factores técnicos que pueden conducir a resultados no favorables y dominar los procedimientos para la diferenciación celular (22-26).

No obstante las incógnitas todavía pendientes de aclarar en relación con las iPSCs, su potencial terapéutico futuro para enfermedades tan devastadoras como lesiones de la médula espinal, diabetes I, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, ha merecido el reconocimiento de la Asamblea del Premio Nobel.

De otro lado, el avance que se ha sancionado con este premio es el haber logrado una técnica para la reprogramación celular, lo que ha significado la adquisición de un nuevo concepto sobre la información contenida en el genoma de la célula adulta y la ocurrencia de “factores de transcripción maestros”, capaces de inducir el linaje específico de las células.

Referencias

1. ARIAS STELLA, Javier. Del experimento de la oveja Dolly al cultivo de células embrionarias Troncales y totipotentes humanas. *Diagnósticos*. Vol. 40, N°1, Enero-Febrero, pp. 32-45, 2001.
2. ALISON, M, R. and ISLAM, S. Attributes of Adult Stem cells. *J. Pathol.* 217: 140-160, 2009.
3. PEDERSEN, R, A. Embryonic Stem Cells for Medicine. *Scientific American*, April, 1989.
4. MARSHAL, E. The Business of stem cells. *Science*, 287: 1419-21, 2000.
5. SPAR, D. The Business of Stem Cells. *N. Engl. J. Med.* 351: 211-213, 2004.
6. ARIAS STELLA, J. Clonación, biología, Medicina y Derechos Humanos. *Folia Dermatológica Peruana*. 13: 55-7, 2002.
7. ARIAS STELLA, J. La clonación Terapéutica y los Derechos Humanos. *Acta Herediana*, 37: 46-58, 2005.
8. CIBELLI, J. LANZA, R. y WEST, M. The first human cloned embryo. *Scientific American*, January, 2002.
9. SIMERLY, C., DOMINKO, T., NAVARA, Ch., PAYNE, Ch., CAPVANO, S. GOSMAN, G., CHONG, K., TAKAHASHI, D., CHACE, C. COMPTON, D. HEWITSON, L., SHATTEN, G. Molecular correlates of Primate Nuclear Transfer Failures. *Science* 300: 297, April 2003.
10. WOO SUK HWANG, SHIN YONG MOON and col. Evidence of a Pluripotent Human Embryonic stem cell line derived from a cloned Blastocyst. *Science* 303, pp. 1669-74, 12 March 2004. Published online 12 February 2004 [Doi: 10.1126/SCIENCE, 1094515 (in Science Express Reports).
11. HOCHEDLINGER, Konrad. Your inner healers. Reprogramming cells from your own body could give them the therapeutic power of embryonic stem cells, without the political controversy. *Scientific American*, pp. 239-35, May 2010.
12. TAKASHI, K. and YANAMAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* 126: 663-676, August 25, 2006.
13. MITSUI K., TOKUZAWA, Y., ITOH, H., SEGAWA, K., MURAKAMI, M., TAKAHASHI, K., MARUYAMA, M., MAEDA, M. and YAMANAKA, S. The homeoprotein nanog is Required for Maintenance of Pluripotency in Mouse Epiblast and ES Cells. *Cell*, 113: 631-642, May 30, 2003.
14. TAKAHASHI, K., MITSUI, K. and YAMANAKA, S. Role of Eras in promoting tumour-like properties in mouse embryonic stem cells. *Nature* 423: 541-545, 29 May, 2003.
15. KANATSU-SHINOHARA, M., INQUE, K., LEE, J., YOSHIMOTO, M., OGONUKI, N., MIKI, H., BABA, S., KATO, T., KASUKI, Y., TOYOKINI, S., TOYOSHIMA, M., SHINOHARA, T. Generation of Pluripotent Stem Cells from Neonatal Mouse Testis. *Cell*, 119: 1001-1012, December 29, 2004.
16. ARIAS STELLA, J. Un Nuevo camino para el trasplante de tejidos. Sobre las células madre ("stem") pluripotentes inducidas. *Diagnóstico*, 50(1), Enero-Marzo 2011.
17. YAMANAKA, S. Strategies and New Developments in the Generation of Patient-Specific Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 1: 39-49, July 2007.
18. OKITA, K. ICHISAKA, T. and YAMANAKA, S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448: 313-318, July 19, 2007.
19. LEWITZKY, M. and YAMANAKA, S. Reprogramming somatic cells towards pluripotency by defined factors. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 467-473, 2007.. ZAEHRES, H. and SCHÖLER, H. R. Induction of Pluripotency: From Mouse to Human. *Cell*, 131: 834-5, November 30, 2007.
20. ZAHRES, H. and SCHÖLER, H. R. Induction of Pluripotency: From Mouse to Human. *Cell*, 131: 834-5, November 30, 2007.

21. TAKAHASHI, K. TANABE, K. OHNUKI, M., NARITA, M., ICHISAKA, T., TOMODA, K. and YAMANAKA, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131: 861-872, November 30, 2007.
22. NAKAGAWA, M., KOYANAGI, M., TANABE, K., TAKAHASHI, K., ICHISAKA, T., AOI, T., OKITA, K., MOCHIDUKI, Y., TAKIZAWA, N. and YAMANAKA, S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1): 101-106, January, 2008.
23. YAMANAKA, S. Shinya Yamanaka Reprograms Human Adult Cells into Embryonic-like Stem Cells. Breakthrough accelerates new avenues of stem cell research. From: PR/Communications. <http://www.gladstone.ucsf.edu/gladstone/site/publicaffairs>. The Gladstone Institute of Cardiovascular Disease, News. 2007.
24. OKITA, K., NAKAGAWA, M., HYENJHONG, H., ICHISAKA, T., and YAMANAKA, S. Generation of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Vectors. *Science*, 322: 949-953, November 7, 2008.
25. NARAZAKI, G., UOSAKI, H., HYENJONG, H., OKITA, K., KIM, B., MATSUOKA, S., YAMANAKA, S. and YAMASHITA, J. K. Directed and Systematic Differentiation of Cardiovascular Cells from Mouse induced Pluripotent Stem Cells. *Circulation*, 118: 498-506, July, 2008.
26. HYUN, I., HOCHEDLINGER, K., JAENISH, R. and YAMANAKA, S. New Advances in iPS Cell. *Cell Stem Cell*, 1(4): 367-368, October 11, 2007.