

REPROGRAMACIÓN CELULAR: BASES CONCEPTUALES Y PERSPECTIVAS

González Figueroa H¹.

González Molfino H.M

RESUMEN

Pocos avances recientes han revolucionado tanto la biología del desarrollo como la reprogramación de células por transferencia nuclear. Desde 1952 a la fecha, se ha acumulado suficiente información teórica así como tecnologías de avanzada, para desmitificar el paradigma de la irreversibilidad de la diferenciación celular.

El cigoto totipotente cuando empieza a segmentarse da origen al blastocisto, estado embrionario cuyas células de la masa celular interna son pluripotentes y capaces de originar los linajes celulares de las tres capas germinales. Estas células son las denominadas células madre embrionarias.

La diversidad celular en un organismo adulto es consecuencia del control epigenético de la expresión génica que restringe progresivamente la pluripotencia y permite que algunas de ellas proliferen continuamente durante la vida del individuo, otras estén en reposo proliferativo y unas pocas alcancen una masa adecuada y dejen de proliferar. Sin embargo en todas estas poblaciones celulares, existen grupos pequeños que son pluripotentes y se denominan células madre adultas.

La transferencia de núcleos somáticos a citoplasma de ovocitos o de cigotos demostró que su información genética puede ser reprogramada y regresarla al estado de pluripotencia. Los conocimientos señalados, han permitido emplear esta biotecnología con fines reproductivos y terapéuticos pero cuya aplicación en humanos es cuestionada desde el punto de vista de la bioética.

Recientemente se ha logrado fusionar células madre embrionarias con células somáticas adultas, logrando que la célula híbrida resultante vuelva al estado pluripotente. Además se ha descubierto que la pluripotencia es consecuencia de la

¹ Laboratorio de Biotecnología y Fisiología Animal. Instituto de Genética y Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Ricardo Palma. Av. Benavides 5440. Santiago de Surco. Lima – Perú. E-mail: hgonzales@mail.urp.edu.pe

expresión del gen Nanog y los factores de transcripción Oct 4, Sox2, c-Myc, y Klf4 respectivamente. Aunque los mecanismos moleculares que promueven la pluripotencia recién se están esclareciendo, sin embargo, actualmente, es posible reprogramar núcleos somáticos directamente inyectando los factores de transcripción mencionados anteriormente.

En el presente trabajo se revisan las bases conceptuales de la proliferación celular y de la transferencia y reprogramación nuclear con la finalidad de que se conozcan algunos de los logros y de las limitaciones de las biotécnicas utilizadas tanto en la clonación terapéutica como en la reproductiva, así como las perspectivas que su aplicación permite vislumbrar hacia un futuro próximo.

Palabras claves: células madre, proliferación celular, transferencia nuclear, reprogramación nuclear

SUMMARY

Few recent advances have revolutionized the development biology as reprogramming cell reprogramming by nuclear transference. From 1952 to the date, there is accumulated sufficient theoretical information as well as advanced technologies to demystify the paradigm of the cell differentiation irreversibility.

Totipotent zygote when begins to be segmented gives origin to blastocyst embryo, whose cells of the internal cell mass are pluripotent and with capacity to differentiate cell lineages of the three germinal layers. These cells are called embryonic stem cells.

Adult cell diversity is consequence of gene expression epigenetic control that restricts progressively the pluripotential state and permits that some of them proliferate continuously during the cycle life other they be resting proliferative and some few they reach an adequate mass and to stop proliferating. Nevertheless in all these cell populations, small groups exist that are pluripotent and are denominated as adult stem cells.

Somatic nuclei transfer to oocytes or zygotes cytoplasm showed that its genetic information can be reprogrammed and to return at pluripotent state. This knowledge have been permitting to use this biotechnology in therapeutic and reproductive cloning but whose application in humans is questioned since bioethics stand point.

Recently it has managed to fuse embryonic stem cell with adult somatic cells, achieving that the resultant hybrid cell return to pluripotent state. Besides it has

been shown that the pluripotent state is maintained for Nanog gene expression and Oct 4, Sox2, c-Myc, Klf4 transcription factors. Only just, are being known that pluripotency promoting molecular mechanisms, nevertheless, actuality, is possible to make directly reprogrammed.

Throughout this paper, we will review conceptual bases about cell proliferation, nuclear transfer and nuclear reprogrammed. Likewise some of the achievements and limitations of the techniques used, both in therapeutic and in the reproductive cloning, as well as the perspectives that its application allows to glimpse within a close future.

Key words: stem cells, cellular proliferation, nuclear transfer, nuclear reprogramming

INTRODUCCIÓN

La fecundación es la piedra angular del desarrollo que inicia la construcción de un nuevo individuo. El cigoto, al segmentarse, da lugar al blastocisto, estructura embrionaria formada por dos poblaciones celulares: la masa celular interna y el trofoblasto.

Está ampliamente aceptado que el proceso del desarrollo embrionario depende de la activación y/o desactivación de los genes contenidos en el genoma celular, regulado por la interacción de factores citoplasmáticos y nucleares. La distribución de estos factores en el citoplasma condicionan, de alguna manera, las cualidades: totipotente, pluripotente, multipotente o unipotente que aparecen de modo secuencial durante la diferenciación celular. Si bien es cierto que el conte-

nido del genoma es el mismo en todos los estados del desarrollo, la actividad génica se va restringiendo. La célula totipotente es capaz de originar un individuo completo, la pluripotente tienen información disponible para producir linajes celulares de las tres capas germinales, la multipotente da lugar a estirpes celulares de la capa germinal de donde ella se origina, mientras que la unipotente sólo a células hijas de su misma estirpe. El cigoto es una célula totipotente mientras las células de la masa celular interna del blastocisto son pluripotentes y se les denominan células madre embrionarias. Existen evidencias de que desde la vida embriofetal a la adulta, van surgiendo células madre en los tejidos somáticos, como parte de la estrategia del organismo para su renovación en condiciones fisiológicas o ante un daño que altera la homeostasis celular.

Estas bases conceptuales están permitiendo, desde hace más de medio siglo, transferir *in vitro* núcleos somáticos diferenciados al citoplasma de ovocitos sin fecundar o de cigotos enucleados, consiguiendo reprogramar la información génica que permite el reinicio de la segmentación embrionaria, inclusive, hasta blastocisto; luego de lo cual, derivar sus células de la masa celular interna, a un tipo celular específico. Los mecanismos moleculares que regulan la pluripotencia recién se están descubriendo. Es muy probable que el gen Nanog y cuatro factores de transcripción sean los responsables del mantenimiento de la pluripotencia y además de reprogramar la información genética de los núcleos de las células somáticas.

En este artículo de revisión, se presentan las bases conceptuales acerca de la proliferación celular, la transferencia nuclear y la reprogramación celular, así como las perspectivas de esta biotecnología relacionadas con una mejora de calidad de la salud y de seguridad alimentaria.

TRANSFERENCIA Y REPROGRAMACIÓN NUCLEAR

Todas las células del cuerpo de un individuo adulto descienden del cigoto. La segmentación del cigoto inicia la proliferación celular que origina, por

diferenciación, una amplia diversidad de linajes que se distribuyen y se estabilizan en los diferentes tejidos y órganos de un adulto. El mantenimiento y proliferación de una estirpe celular determinada, están relacionados con la progresión de su ciclo celular.

CICLO CELULAR

El ciclo celular es un proceso altamente ordenado que origina la duplicación y la transmisión de la información genética de una generación a la siguiente. Es un proceso bifásico, regulado por señales externas e internas; comprende una fase de interfase, donde se produce la replicación del ADN y otra de división, en la cual el material genético replicado se distribuye en dos células hijas. (Israels & Israels, 2001).

El conjunto de procesos que ocurren durante el ciclo celular llevan un orden y supervisión estrictos porque la célula dispone de un complejo sistema de regulación interna que “que enciende y apaga” esta maquinaria en los momentos apropiados y coordina las actividades que permiten obtener el producto final. El sistema de control gobierna la progresión del ciclo celular mediante la activación y la inactivación cíclica de proteínas y complejos proteicos que inician o regulan la replicación del ADN, la

mitosis y la citocinesis. Estas corresponden a una amplia gama de proteínas, entre las que se encuentran diferentes tipos de cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas (aparecen y desaparecen a lo largo del ciclo), que actúan regulando positivamente el ciclo. Por otro lado, la fosfoproteína 16 (p16) que inhibe los complejos CDK4-ciclina D y CDK6-ciclina D y las fosfoproteínas p21, p27 y p53 son moléculas inhibidoras de ciclinas (CDKIs) y participan regulando negativamente el ciclo celular (den Elzen & Pines, 2001).

Cuando se produce cualquier error, la célula dispone de puntos de control que detienen el ciclo celular y ponen en marcha el sistema de reparación. En el caso de no producirse dicha reparación la célula programa su propia muerte.

Está plenamente aceptado que existen un punto de restricción y tres puntos de control en el ciclo celular de los eucariontes.

El punto de restricción está casi al final de G₁ y es crucial para que la célula pueda proseguir y completar el ciclo celular. Este punto está controlado, de preferencia, por señales externas y depende de la transducción de estas, para que la célula complete el ciclo. Los complejos Cdk4 y cdk6-ciclina D, fosforilan la proteína Rb (proteína del retinoblastoma) permi-

tiendo que se libere el factor de transcripción E2F, el que estimula la síntesis de Cdk2 y ciclina E, ambos necesarios para el progreso de G₁ a S. La inactivación de Rb es mantenida a lo largo del ciclo por la concentración de distintos complejos cdk-ciclina pero, una vez que las ciclinas se degradan, el Rb se activa y se une al factor de transcripción E2F (Furstenthal et al., 2001). Casi al lado del punto de restricción, se encuentra el primer punto de control, siempre en G₁. Para superarlo, la célula necesita alcanzar un tamaño adecuado, tener disponibilidad de sustratos y que su material genético esté intacto. Participan en este control, Cdk2-ciclina E, que al igual que los involucrados en el punto de restricción, también inactivan a Rb y favorecen el trabajo de E2F para activar las enzimas necesarias que de inicio a la síntesis del ADN en el periodo S de la interfase. Los encargados de la inhibición en este punto de control son la fosfoproteína 53 (p53) y la fosfoproteína 21 (p21). La p53, denominada “guardián del genoma”, tiene funciones importantes. Detiene el ciclo celular en el punto de control G₁/S, activa proteínas de reparación del ADN, cuando reconoce daño o mutación en el ADN y además promueve la apoptosis si el daño en el ADN es irreparable. De esta manera se evita que proliferen las células que con ADN anormal. La

p53 usualmente se encuentra en la célula pero es muy inestable en condiciones normales. Para evitar su degradación está asociada a la proteína Mdm2. Si existe una alteración en el ADN, se activan enzimas que separan la p53 de Mdm2, una mayor concentración de p53 estimula la síntesis de p21 que se une a Cdk2-ciclina E, inhibiendo la acción del complejo e impidiendo que la célula no pueda entrar al periodo S. (Alarcón-Vargas & Ronai, 2002).

Durante G_1 , también se forma el Complejo de Reconocimiento de Origen (ORC), que reconoce secuencias de bases en el ADN, denominadas "orígenes de replicación". De inmediato otras proteínas (como Cdc6 y Mcm) se unen para constituir el complejo de pre-replicación (pre-RC). El sistema Cdk2-ciclina A degrada las proteínas del pre-RC y activa las enzimas necesarias para la replicación, de esta forma impide que la "maquinaria" de replicación se active cuando aún no ha concluido el ciclo y que la replicación sólo ocurra una sola vez (De Pamphiles, 2005).

Las células que inician el periodo G_1 pueden detener su progresión y entrar en un estado de reposo proliferativo denominado G_0 . En este periodo pueden permanecer durante días, semanas o años antes de activarse y continuar con las otras fases del ciclo, y en ocasiones nunca más dividirse.

Las fibras musculares esqueléticas que no se dividen, pero sí renuevan sus organelas citoplasmáticas (Félix & Karsenti, 1997).

Al final del periodo G_2 , se encuentra otro punto de control regulado por los complejos Cdk1-ciclina A y ciclina B. Este control verifica que el material genético se haya duplicado completamente y que no tenga errores, además de que el medio extracelular sea el adecuado. Si hay daño celular, p53 se activa y promueve la transcripción de p21, inhibidor de Cdk, y, en el caso de que todo falle, estimula la apoptosis. La capacidad de reparación de errores en G_2 (CRG_2) disminuye en varios casos: con la edad, en individuos con desordenes genéticos con fragilidad cromosómica y con predisposición a neoplasias y en los individuos con ataxia telangiectasia (Pincheira et al., 2001). Cdk1-ciclina A y ciclina B, además, inician el ensamblaje de los microtúbulos del huso acromático activando la proteína Mad2 para impedir la degradación de la segurina, y de esta forma bloquean la segregación de las cromátidas hermanas. En este punto también participa p53 inhibiendo los complejos Cdk 1,2, 4 y 6-ciclina. Entre metafase y anafase se encuentra el último punto de control relacionado con la asociación de los cromosomas al huso el huso acromático. Si se detecta que algunos de los

cinetócoros no están unidos, se inactiva el complejo APC- cdc20 y se inhibe la liberación de la separasa, de manera que las cromátidas hermanas se separen y migran a los polos de la célula. El complejo APC- cdc20, es importante también para controlar la salida de la células de mitosis (Sullivan & Morgan, 2007).

Todos los organismos eucariontes multicelulares se componen de células especializadas y bien diferenciadas que le dan forma y tamaño. La estabilidad estructural y funcional dependerá de tres procesos fundamentales: el crecimiento celular, la muerte celular y la proliferación celular, así como de la relación entre ellas.

En consecuencia se puede afirmar que la proliferación celular es el resultado de la activación los complejos (ciclinas-CDKs); en respuesta a la transducción de señales mediadas por mitógenos, de esta manera las células en organismos multicelulares proliferan solo cuando se requieren más células. Basado en este concepto, las poblaciones celulares de un organismo adulto pueden agruparse como: células proliferativas, células en reposo proliferativo y células no proliferativas. El células del tejido epitelial se renuevan durante toda la vida del organismo, esta característica lo ubican como una población proliferativa, las poblaciones que forman el

tejido muscular estriado, el óseo, el parénquima hepático entre otros se denominan poblaciones en reposo proliferativo, quedan recluidas en un estanco denominado G_0 , y sólo reinician el periodo G_1 y prosiguen el ciclo en respuesta a un daño mecánico de las mismas y por último las poblaciones no proliferativas representadas por las células nerviosas. Esta forma de clasificar las poblaciones celulares que conforman el cuerpo de un adulto, debe ser reformulada, puesto que hay evidencias que dan cuenta de que las neuronas son capaces de dividirse durante la vida de un organismo, por lo tanto el ejemplo ideal de esta población celular estaría dado por las poblaciones de eritrocitos humanos que son anucleados.

Como se puede apreciar la mayoría de las células de un individuo adulto no suelen proliferar, salvo para mantenimiento de algunos órganos o tejidos como la piel y la sangre. Así mismo, prácticamente en todos los tejidos hay algunas células que, aunque habitualmente no se dividen; en condiciones particulares pueden hacerlo y regenerar el tejido correspondiente. Experimentalmente, se ha observado que estas células tienen capacidad de reproducirse y generar otros tejidos distintos, por lo que se les denomina células madre adultas.

TRANSFERENCIA NUCLEAR O CLONACIÓN

El cuerpo de un individuo adulto está formado por cerca de 200 tipos celulares con una estructura y funciones definidas, relacionadas entre sí, para mantener la estabilidad territorial del organismo. A pesar de sus formas y funciones diferentes, todas ellas tienen el mismo genoma. La equivalencia genómica fue descubierta en experimentos de transferencia de núcleos de células somáticas de epitelio intestinal de renacuajo, al citoplasma de ovocitos enucleados de *Rana pipiens* (Briggs & King, 1952), logrando conseguir animales adultos. Este primer caso de clonación animal reproductiva, sirvió además para entender la plasticidad de los núcleos somáticos en reprogramar su información genética cuando se encuentran en un microambiente adecuado. La reproducción experimentalmente de estos resultados en *Xenopus laevis* (Gurdon & Uehlinger, 1966; Laskey & Gurdon 1970; Gurdon & Byrne, 2003), en ratón (Lin & Florence, 1973); en conejo (Bromhall, 1975), entre otros, permite aseverar que los patrones de reprogramación nuclear de las células somáticas son idénticos en todas las especies animales.

El primer éxito en clonación de mamífero ocurrió en 1981 cuando Illmensee & Hoppe fusionaron el cigoto

enucleado de ratón con núcleo de una célula proveniente del blastocisto de otro ratón. Ellos separaron los núcleos de las células del trofoblasto y lo inyectaron, mediante microcirugía, en el citoplasma de un ovocito enucleado y comprobaron que el núcleo transferido era capaz de mantener parcialmente el desarrollo embrionario en ausencia del núcleo del ovocito. Sin embargo cuando la fusión ocurre con núcleos provenientes de las células de la masa celular interna del blastocisto, el progreso de segmentación ocurre sin ningún problema y si además, los blastocistos resultantes fueron transferidos al útero de una hembra, sincronizada hormonalmente, se produjo el nacimiento de tres ratones clonados: dos hembras y un macho, a juzgar por las características correspondientes al genoma del núcleo de la masa celular interna. Ellos concluyeron que los núcleos de las células de la masa celular interna del blastocisto de ratón, mantienen su capacidad totipotente. Estos resultados no han logrado ser reproducibles en experimentos posteriores.

El uso de mamíferos, como modelos experimentales, en biología del desarrollo es muy difícil. Sin embargo, usando técnicas de electro fusión o virus Sendai, se lograron fusionar embriones de 8 o 16 células con ovocitos enucleados de oveja, y se obtuvieron dos animales clonados en perfecto estado de salud (Wi-

lladsen, 1986). Cuando se usaron blastómeros, aislados de embriones de 8 células, y ovocitos maduros, sin corpúsculo polar, de conejo se produjeron clones viables. El diseño experimental consistió, por un lado, aislar blastómeros de un embrión de 8 células y por otro, eliminar el corpúsculo polar de ovocitos maduros; uno de los blastómeros fue inyectado al espacio perivitelino y se promovió la fusión mediante la electro fusión o virus Sendai. Los embriones híbridos se colocaron en el útero de una hembra pseudopreñada y después de 30 días nacieron conejitos genéticamente idénticos (Stice & Robl, 1988). Pero el primer mamífero clonado usando células epiteliales de las glándulas mamarias de una oveja fue la “famosa” oveja “Dolly” (Wilmut et al., 1997), experimentos posteriores se han repetido obteniéndose clones de ratón, conejos, porcinos, vacunos, cabras, equinos entre otros mamíferos.

CONTROL EPIGENÉTICO DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

La diversidad celular en un organismo adulto está determinada por la activación o el silenciamiento de algunos genes promovidos por cambios epigenéticos que reprograman la función del genoma durante el desarrollo (Reik et al., 2001; Surani, 2001).

El término epigenético ha sido definido como *“los cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin una alteración en la secuencia de nucleótidos del ADN.”* (Wolffe & Matzke, 1999). La regulación epigenética puede ser entendida como un mecanismo complejo mediante el cual la información génica es selectivamente activada o desactivada en las células para proporcionar una información más ordenada y especificada, comparada con el genoma completo. Las modificaciones epigenéticas pueden implicar la metilación de residuos de citosina en el ADN y/o cambios en la estructura de la cromatina que regulan la expresión génica (Nakao, 2001). La metilación del ADN en dinucleótidos CpG es uno de los mecanismos epigenéticos implicados en la regulación de la expresión génica en mamíferos. Los patrones de metilación son específicos para cada especie y tipo de tejido. La maquinaria implicada comprende diferentes proteínas reguladoras incluyendo a las ADN metiltransferasas, desmetilasas putativas, proteínas de unión a CpG metilados, enzimas modificadoras de histonas y complejos remodeladores de la cromatina. La metilación del ADN es de vital importancia para mantener el silenciamiento génico en el desarrollo normal, la impronta genómica y la inactivación del cromosoma X (Ro-

dríguez et.al., 2004). La metilación puede prevenir que ciertos factores de transcripción se unan a los dímeros CpG (Campanero et al., 2000) y puede también inducir una asociación preferencial con histonas desacetiladas (Eden et.al., 1998). Esta asociación es mediada por proteínas de las familias de MBD y de MeCP que movilizan los complejos represores de transcripción que contienen histonas deacetilasas (Bird & Wolffe, 1999) e histonas metilasas (Bannister et.al., 2001). La demetilación del ADN y/o la acetilación de las histonas pueden inducir cambios estructurales en la cromatina que activan la expresión génica durante la diferenciación (Avni & Rao, 2000). En consecuencia, las modificaciones epigenéticas son necesarias para que ocurra la reprogramación de núcleos somáticos.

REPROGRAMACIÓN CELULAR DIRECTA

Está comprobado que la reprogramación celular por transferencia nuclear (Wakayama et al., 1998) por fusión celular (Cowan et al., 2005) y por híbridos resultantes de células madre embrionarias con células somáticas (Serov et al., 2001) permite el restablecimiento del estado pluripotente de núcleos somáticos (Hochedlinger & Jaenisch, 2006). Los mecanismos mo-

leculares de la reprogramación aun se están comprendiendo. La demetilación del promotor del ADN es necesaria para que ocurra la reprogramación epigenética de los núcleos de células somáticas. Experimentos de transferencia nuclear y de ADN de células del timo de ratón a citoplasma de ovocitos de *Xenopus*, para analizar el mecanismo de activación del gen marcador de célula madre Oct 4, sugieren que la demetilación del ADN del núcleo somático precede a la reprogramación y es absolutamente necesaria para la transcripción del gen Oct 4. Además es selectiva, sólo ocurre en el segmento promotor del gen Oct 4, específicamente en la secuencia GGGAGGG (Simonsson & Gurdon, 2004). Observaciones realizadas *in silico* para analizar la expresión de los genes de la familia Oct 4, demuestran que cuando el gen no se reprograma en su totalidad la pluripotencia no es completa (Bortvin et.al., 2003)

En experimentos de fusión celular, se han determinado algunos factores en células madre embrionarias que inducen la reprogramación de núcleos somáticos. Se han identificado cuatro factores de transcripción que inducen la reprogramación de fibroblastos al estado pluripotente. Takahashi & Yamanaka (2006) explicaron que pueden obtenerse células pluripotentes inducidas (iPS) directamente del cultivo de

fibroblastos que expresen la actividad del gen Fbx15, por introducción retroviral de los factores de transcripción Oct4, Sox2, c-Myc y K14. Sin embargo, las iPS que expresaban Fbx15 eran significativamente diferentes de las células madre embrionarias en la capacidad de expresión de sus genes y en los patrones de metilación de su ADN, lo que indicaba que el desarrollo potencial de las células iPS era restringido, en comparación con el de las células madre embrionarias. Ellos concluyen que la generación de células pluripotentes directamente de cultivos de fibroblastos representa un avance importante para entender los mecanismos que gobiernan la reprogramación nuclear.

Recientemente Maherali et al., (2007) descubrieron que la expresión del transgen Oct 4 no es requerida para el mantenimiento de las células iPS, señalan que el programa de expresión génica endógeno ha sido suficientemente reactivado para mantener la pluripotencia. Consideran que las iPS obtenidas tienen un epigenoma similar al de las células madre embrionarias. Sugieren que la expresión exógena del Oct 4 y posiblemente también de Sox2, de c-Myc, y de Klf4 sólo son necesarias durante los pasos iniciales de la reprogramación para gatillar los cambios transcripcionales y epigenéticos que conducen a la pluripotencia. Así mismo encontraron que las células

iPS que expresan Nanog son fenotípica y molecularmente diferentes a las iPS que expresan Fbx15, descritas anteriormente. El gen Nanog es esencial para el desarrollo embrionario y es requerido para el mantenimiento de la pluripotencia porque inhibe la diferenciación en el endodermo primordial. (Chambers et.al. 2003).

Varias señales extrínsecas tales como LIF, BMP y Wnt pueden mantener la autorenovación y la pluripotencia de las células madre embrionarias a través de la regulación de los “genes de pluripotencia”. Un único factor de transcripción homeobox, Nanog, es la clave que inicia el “efecto cascada” de estas señales. Niveles elevados de Nanog pueden mantener la autorenovación de las células madre embrionarias de ratón independientemente de LIF y permitir el crecimiento de células madre embrionarias humanas sin células nutricias. Además las vías de señalizaciones externas, los factores de transcripción internos tales como FoxD3, P53 y el Oct 4 también están implicados en la regulación de la expresión de Nanog. Funcionalmente, Nanog trabaja junto con otros factores de pluripotencia tales como el Oct 4 y Sox2 para controlar un conjunto de genes que regulan y afianzan la pluripotencia de las células madre embrionarias. Éstos factores claves forman una red reguladora para conservar o limitar cada

nivel de expresión, que mantiene las características de las células madre embrionarias (Pan & Thomson, 2007) Sin lugar a dudas, el camino para entender los mecanismos moleculares de la reprogramación celular se están despejando rápidamente, Nanog, Oct 4, Sox2, c-Myc, y Klf4 parecen ser los más firmes candidatos involucrados en la reprogramación epigenética.

PERSPECTIVAS

Desde 1952 que se inicia la investigación en anfibios sobre transferencia nuclear somática, se ha acumulado abundante información y se ha conseguido logros tecnológicos extraordinarios en este campo fascinante de la biología del desarrollo. En estas casi seis décadas se ha aprendido, en primer lugar, que el material genético no se pierde, generalmente, durante el desarrollo y la diferenciación celular. Que las células somáticas tienen la capacidad de reprogramar la expresión de los genes hasta el estado pluripotente. Que la mayoría de los genes, incluso en las células con diferenciación terminal, pueden ser reactivados. También que un solo núcleo somático tiene la capacidad replicativa suficiente para formar un nuevo organismo completo. Por último que durante el ciclo vital de un organismo, las células cambian sus fenotipos, y en algunos casos la expresión nuclear de los genes

se reprograma a través de sus linajes. Estos resultados indican que las barreras teóricas formuladas en base al dogma de la irreversibilidad de las células diferenciadas y que pudieron haber imposibilitado el uso de estas células, como una fuente para contribuir a la formación de otra diferente, se ha superado (Pomerantz & Blau, 2004).

En este desarrollo han sido claves las nuevas biotecnologías basadas en la biología y genética molecular y el avance en la ciencia informática que han permitido la obtención y el análisis de la información genética. Esto ha posibilitado el desarrollo de la nueva genómica con un valor potencial impresionante para la ganadería, para el diagnóstico y cura de enfermedades, para la preservación del germoplasma de animales en peligro de extinción y quizás para la producción de clones idénticos, como modelos, en la investigación científica.

Para la clonación terapéutica, la aceptación que Nanog es el gen rector de la pluripotencia de las células madre embrionarias es muy importante para su uso en las biotécnicas de reprogramación nuclear, actuales y futuras que serán de suma importancia, sobretudo, porque dejarán de destruirse embriones humanos. Aunque todavía no se han realizado experimentos con células humanas, la utilización de las células pluripotentes inducidas (iPS)

puede ser lo más esperanzador para mejorar de calidad de la salud humana pues se podrán efectuar trasplantes de tejidos sanos en personas aquejadas por diversos tipos de enfermedades. Se espera producir órganos completos en el laboratorio, para reemplazar los que se encuentran lesionados en pacientes con enfermedades devastadoras como cáncer, dolencias cardíacas, diabetes y mal de Parkinson, entre otras.

Si bien es cierto que la eficiencia de estas tecnologías hasta la fecha ha sido baja, su potencialidad es enorme, de modo que se espera que dentro de muy poco tiempo se pueda utilizar comercialmente para incrementar tanto la productividad, como el bienestar de las poblaciones de animales de granja. Serán una realidad los animales clonados y manipulados genéticamente mediante la introducción de genes humanos, que se utilizarán para producir proteínas humanas, cuya deficiencia causa una serie de enfermedades. Así como derivar células iPS, por ejemplo, a tejido muscular constituirá un logro trascendental para obtener proteínas animales, sin animales, y de esta manera contribuir a la seguridad alimentaria.

Sin embargo es necesario en países como el nuestro, promover el conocimiento y los alcances de estas biotecnologías de avanzada y propi-

ciar la investigación básica en biología reproductiva con la finalidad de formar una “masa crítica” de excelencia capaz de transferir estas tecnologías usando como modelos experimentales especies endémicas para la investigación básica, aplicada y productiva.

LITERATURA CITADA

- ALARCÓN-VARGAS, D. & RONAI, Z. 2002. p53-Mdm2-the affair that never ends. *Carcinogenesis*. 23(4):541-547
- AVNI, O. & RAO, A. 2000. T cell differentiation: a mechanistic view. *Curr Opin Immunol* 12: 654-659.
- BANNISTER, AJ.; ZEGERMAN P.; PARTRIDGE JF.; MISKA EA.; THOMAS JO.; ALLSHIRE, RC. & KOUZARIDES, T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* 410: 120-124.
- BIRD, AP. & WOLFFE AP. 1999. Methylation-induced repression—belts, braces, and chromatin. *Cell* 99 : 451-454
- BORTVIN, A.; EGGAN, K.; SKALETSKY, H.; AKUTSU, H.; BERRY, DL.; YANAGIMACHI, R.; PAGE, DC. & JAENISCH, R. 2003. Incomplete reactivation of

- Oct4-related genes in mouse embryos cloned from somatic nuclei. *Development* 130, 1673-1680
- BRIGGS, R. & KING, T.J. 1952. Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs' eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 38: 455-463`
- BROMHALL, J D. 1975. Nuclear transplantation in rabbit oocytes. *Nature* 258:719-722.
- CAMPANERO, MR.; ARMSTRONG, MI. & FLEMINGTON EK. 2000. CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 6481-6486.
- CHAMBERS, I.; COLBY, D.; ROBERTSON, M.; NICHOLS, J.; LEE, S.; TWEEDIE, S. & SMITH, A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113: 643-655.
- COWAN, C.A.; ATIENZA, J.; MELTON, D A. & EGGAN, K. 2005. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science* 309, 1369-1373.
- DEN ELZEN, N. & PINES, J. 2001. Cyclin A is destroyed in prometaphase and can delay chromosome alignment and anaphase *J Cell Biol* 153 (1) 121-135
- DEPAMPHILES, ML. 2005. Cell cycle dependent regulation of the origin recognition complex *Cell Cycle* 4(1): 70-79
- EDEN, S.; HASHIMSHONY, T.; KESHET, I.; CEDAR, H. & THORNE, A W. 1998. DNA methylation models histone acetylation. *Nature* 394: 842-843 |
- FÉLIX, AM. & KARSENTI, E. 1997. La división celular. *Mundo Científico* 154:123-130
- FURSTENTHAL, L.; KAISER, BK.; SWANSON, C. & JACKSON, PK. 2001. Cyclin E uses Cdc6 as a chromatin-associated receptor required for DNA replication *J Cell Biol* 152(6): 1267-1278
- GURDON, JB. & BYRNE, JA. 2003. The first half-century of nuclear transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 809-814
- GURDON, JB. & UEHLINGER, V. 1966. "Fertile" Intestine Nuclei. *Nature* 210, 1240 - 1241.
- HOCHEDLINGER, K. & JAE-NISCH, R. 2006. Nuclear reprogramming and pluripotency. *Nature* 441, 1061-1067.
- ILLMENSEE, K. & HOPPE, PC. 1981. Nuclear transplantation in *Mus musculus*: Developmental potential of nuclei from preimplantation embryos. *Cell* 23: 9-18.
- ISRAELS, ED. & ISRAELS, LG. 2001. The Cell Cycle. *Stem Cells* 19:88-91

- LASKEY, RA. & GURDON, JB. 1970. Genetic content of adult somatic cells tested by nuclear transplantation from cultured cell. *Nature* 228: 1332 - 1334
- LIN, TP. & FLORENCE, J. 1973. Cell fusion induced by a virus within the zona pellucida of mouse eggs. *Nature*. 242, 47 - 4 . 1973
- NAKAO, M. 2001. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene*. 278: 25-31.
- PAN, G. & THOMSON, JA. 2007. Nanog and transcriptional networks in embryonic stem cell pluripotency. *Cell Research*. 17: 42-49
- PINCHEIRA, J.; BRAVO, M.; NAVARRETE, MH.; MARCELAIN, K.; LÓPEZ-SÁEZ, JF. & DE LA TORRE, C.2001. Ataxia telangiectasia: G₂ checkpoint and chromosomal damage in proliferating lymphocytes. *Mutagenesis* 16: 419-422.
- POMERANTZ, J. & BLAU, HM. 2004. Nuclear reprogramming: A key to stem cell function in regenerative medicine *Nature Cell Biol*. 6 :810-817
- REIK, W.; DEAN, W. & WALTER, J. 2001. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293: 1089–1093.
- RODRÍGUEZ, M.; TÉLLEZ, N.; CERBÓN, MA.; LÓPEZ, M. & CERVANTES, A. 2004. Metilación del ADN: un fenómeno epigenético de importancia médica. *Rev Invest Clín*.56: 56-71.
- SEROV, O.; MATVEEVA, N.; KUZNETSOV, S.; KAF-TANOVSKAYA, E. & MITTMANN, J. 2001. Embryonic hybrid cells: a powerful tool for studying pluripotency and reprogramming of the differentiated cell chromosomes *An. Acad. Bras. Cienc*.73: 561-568
- SIMONSSON, S. & GURDON, J. 2004. DNA demethylation is necessary for the epigenetic reprogramming of somatic cell nuclei. *Nature Cell Biol*. 6: 984-991
- STICE, S L. & ROBL, J M. 1988. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos. *Biol. Reprod*. 39, 657–664
- SULLIVAN, M. & MORGAN, DO. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature Rev Mol Cell Biol*. 8: 1-10
- SURANI, MA. 2001. Reprogramming of genome function through epigenetic inheritance. *Nature* 414: 122–128.
- TAKAHASHI, K. & YAMANAKA, S. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663–676.

- THOMSON, JA.; ITSKOVITZ-ELDOR, J.; SHAPIRO, SS.; WAKNITZ, MA. & SWIERGIEL, JJ. 1998. Embryonic stem cell line from human blastocysts. *Science*;282:1145-1147
- WAKAYAMA, T.; PERRY, AC.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, KR. & YANAGIMACHI, R. 1998. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. *Nature* 394, 369-374.
- WILLADSEN, S M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 320, 63-65
- WILMUT, I.; SCHNIEKE, AE.; MCWHIR, J.; KIND, AJ. & CAMPBELL, KHS. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813
- WOLFFE, AP. & MATZKE, MA. 1999. Epigenetics: regulation through repression. *Science*. 286: 481-486.