



18. Enfermedades neurodegenerativas y reprogramación celular: potencial terapéutico y promesa de rejuvenecimiento

Marianne Lehmann, Martina Canatelli Mallat,
Priscila Chiavellini, Oscar A. Brown, Rodolfo G. Goya

El envejecimiento se encuentra asociado a un aumento en la incidencia de enfermedades neurodegenerativas tanto en el hombre como en los animales de laboratorio. En el hombre, este fenómeno se manifiesta en dos enfermedades principales, la de Alzheimer y la de Parkinson. En la actualidad sólo se dispone de tratamientos paliativos para ambas dolencias, por lo que existe un gran interés en el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En este contexto, las tecnologías de reprogramación celular han iniciado la era de la terapia celular personalizada, que no sólo muestra un claro potencial para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, sino que nos trae la promesa del rejuvenecimiento de individuos de edad avanzada. En este capítulo describiremos la evidencia emergente de que el envejecimiento es un fenómeno epigenético reversible. Subsecuentemente, pasaremos a describir los nuevos métodos de reprogramación que están exentos de los riesgos implicados en la técnica de reprogramación convencional que requiere la generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) en una etapa intermedia. El mayor de estos riesgos es la capacidad tumorigénica de las iPSC. Una de las nuevas técnicas, llamada reprogramación de linaje o transdiferenciación, consiste en la conversión directa de un

tipo celular adulto en otro por medio de la expresión transgénica de factores de transcripción específicos del linaje o micro-ARN. Otro método, llamado reprogramación directa mediada por factores de pluripotencialidad, utiliza un sistema universal de factores de transcripción y permite generar una población celular de progenitores multipotentes rejuvenecidos, que pueden diferenciarse en tipos celulares particulares en respuesta a factores de diferenciación específicos. La tercera y última parte del capítulo se dedicará a una breve revisión de los estudios que demuestran la potencial relevancia de los métodos de reprogramación directa para el tratamiento de las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson.

Índice

1.	Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento.....	4
2.	Células madre	6
2.1.	Células madre embrionarias.....	8
3.	Rejuvenecimiento por reprogramación celular	9
3.1.	La ruta hacia la reprogramación celular	9
3.2.	Envejecimiento y epigenética: la promesa del rejuvenecimiento por reprogramación celular	9
4.	Estrategias de reprogramación celular directa	15
4.1.	Reprogramación de linaje	15
4.2.	Reprogramación directa mediada por factores de pluripotencialidad.....	16
4.3.	Generación de células neurales por reprogramación de linaje y reprogramación directa mediada por factores de pluripotencialidad	17
5.	Medicina regenerativa para el cerebro senil	23
5.1.	Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Parkinson	23
5.2.	Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Alzheimer	26
6.	Consideraciones finales	29
7.	Bibliografía.....	30

1. Enfermedades neurodegenerativas relacionadas con el envejecimiento

El envejecimiento está asociado a la declinación cognitiva y al aumento de incidencia de enfermedades neurodegenerativas. En el sistema nervioso central, las neuronas dopaminérgicas y colinérgicas se encuentran entre las células más susceptibles a los efectos deletéreos de la vejez [1-3]. De este modo, el sistema colinérgico del prosencéfalo basal sufre cambios que van de alteraciones neurodegenerativas leves durante el envejecimiento normal hasta la atrofia grave en el mal de Alzheimer, la enfermedad neurodegenerativa asociada a la demencia más común en personas de edad avanzada. La degeneración colinérgica en la enfermedad de Alzheimer parece tener lugar en un contexto de atrofia asociada a la edad, y la exacerbada degeneración es un cambio que puede detectarse en etapas muy tempranas del deterioro cognitivo. En la rata, el envejecimiento se da en paralelo con cambios degenerativos y/o atróficos en el sistema colinérgico basal del cerebro anterior; estos cambios morfológicos están asociados a una disminución en la capacidad de aprendizaje espacial.

La enfermedad de Parkinson es un trastorno neurológico asociado a la degeneración y pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra del cerebro medio, lo cual genera una gran reducción de los niveles de dopamina en el cuerpo estriado. Cuando el 50-60% de las neuronas dopaminérgicas nigricas se degeneran y el 70-80% de las terminaciones dopaminérgicas en el cuerpo estriado se agotan, síntomas motores como el temblor en reposo, la rigidez muscular, la bradicinesia y la inestabilidad postural se tornan evidentes. Esta enfermedad afecta al 0,3-1% de la población y es el reflejo más importante de la vulnerabilidad de las neuronas dopaminérgicas al envejecimiento, el único factor de riesgo inequívoco para Parkinson. En la rata, el envejecimiento está asociado a la degeneración progresiva y pérdida de un grupo diferente de neuronas dopaminérgicas centrales, las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares hipotalámicas, cuyo papel fisiológico es ejercer un control tónico inhibitorio de la secreción de prolactina y de la proliferación de células lactotropas en la glándula pituitaria anterior. La disfunción progresiva y la pérdida de neuronas tuberoinfundibulares hipotalámicas durante el envejecimiento normal en la rata hembra están correlacionadas con una hiperprolactinemia crónica y con el desarrollo de prolactinomas hipofisarios. Aunque las ratas envejecidas no presentan síntomas parkinsonianos incluso en edades avanzadas (32 meses), en esta edad pierden entre el 35 y el 40% de las neuronas dopaminérgicas nigrales y muestran un marcado déficit en la función motora [4].

En los seres humanos, el envejecimiento normal también se asocia con una disminución progresiva en la capacidad motriz y una pérdida gradual de neuronas dopaminérgicas nigrales. Por

lo tanto, el deterioro progresivo de la función cognitiva y la disminución gradual de la actividad central de las neuronas dopaminérgicas parecen representar características básicas del envejecimiento normal, tanto en los roedores de laboratorio como en los seres humanos. La exacerbación de estos procesos conduciría a enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson, respectivamente.

En este contexto, la reprogramación celular surge como una tecnología con gran potencial que promete hacer posible la implementación de una medicina regenerativa personalizada dirigida a prevenir o retrasar la progresión de las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson. Además, la reciente evidencia de que la reprogramación celular puede rejuvenecer células de individuos seniles conlleva la promesa de lograr, quizás en un futuro no muy lejano, la cura definitiva para los trastornos cerebrales (y otros) relacionados con la edad, es decir, lograr el rejuvenecimiento.

2. Células madre

Las células madre o troncales poseen dos características esenciales que las definen. En primer lugar, son capaces de autorrenovarse, es decir, dividirse produciendo nuevas células madre, manteniendo así la población celular. A su vez, bajo condiciones fisiológicas o experimentales específicas, las células madre pueden realizar divisiones celulares asimétricas, que dan como resultado dos células diferentes [5]; una es todavía una célula madre, pero la otra ha comenzado un proceso de diferenciación celular. Hablamos entonces de su potencialidad para originar células maduras de diferentes linajes. Las células madre pueden clasificarse teniendo en cuenta diferentes criterios, como su procedencia o su capacidad de regeneración.

- Según su procedencia, podemos dividir las células madre en células madre adultas, embrionarias e inducidas. Las células madre adultas, también conocidas como células madre somáticas, residen dentro de áreas específicas denominadas nichos y han sido identificadas en diferentes órganos y tejidos [6,7]. Pueden permanecer quiescentes por largos períodos de tiempo, pero también pueden proliferar bajo ciertas circunstancias. Están presentes en muy bajo número en cada tejido y poseen una limitada capacidad de proliferación, por lo que la generación de cantidades significativas de este tipo celular en el laboratorio resulta difícil. Por otro lado se encuentran las células madre embrionarias, que sólo existen en las primeras fases del desarrollo embrionario. Se obtienen del macizo celular interno del blastocisto y son capaces de producir cualquier tipo de célula del organismo (Fig. 1), pero no así de dar lugar a un organismo nuevo, dado que no pueden diferenciarse a células de trofoectodermo, las que dan lugar a los tejidos extraembrionarios, como la placenta. Bajo condiciones adecuadas, estas células conservan la capacidad de dividirse y hacer copias de sí mismas indefinidamente. Finalmente, encontramos las células madre inducidas, que, a diferencia de las anteriores, se producen de manera artificial y están programadas para comportarse como células madre embrionarias.
- Según su capacidad de regeneración y potencialidad de diferenciación, es decir, la capacidad de una célula para diferenciarse en otros tipos celulares, se encuentran en primer lugar las células madre totipotentes, que pueden crecer y formar un organismo completo, es decir, pueden diferenciarse hacia todos los tipos celulares, embrionarios y extraembrionarios. La célula madre totipotente por excelencia es el cigoto. Las células madre pluripotentes están presentes en estadios tempranos del desarrollo embrionario y poseen una alta capacidad de autorrenovación. Son las que pueden diferenciarse a cualquier tipo celular del organismo, es decir, pueden dar origen a las tres capas germinales (ectodermo, mesodermo y endodermo), pero no pueden formar un organismo completo. Las células madre multipotentes son las que sólo pueden diferenciarse en múltiples, pero limitados, tipos celulares. Pueden generar

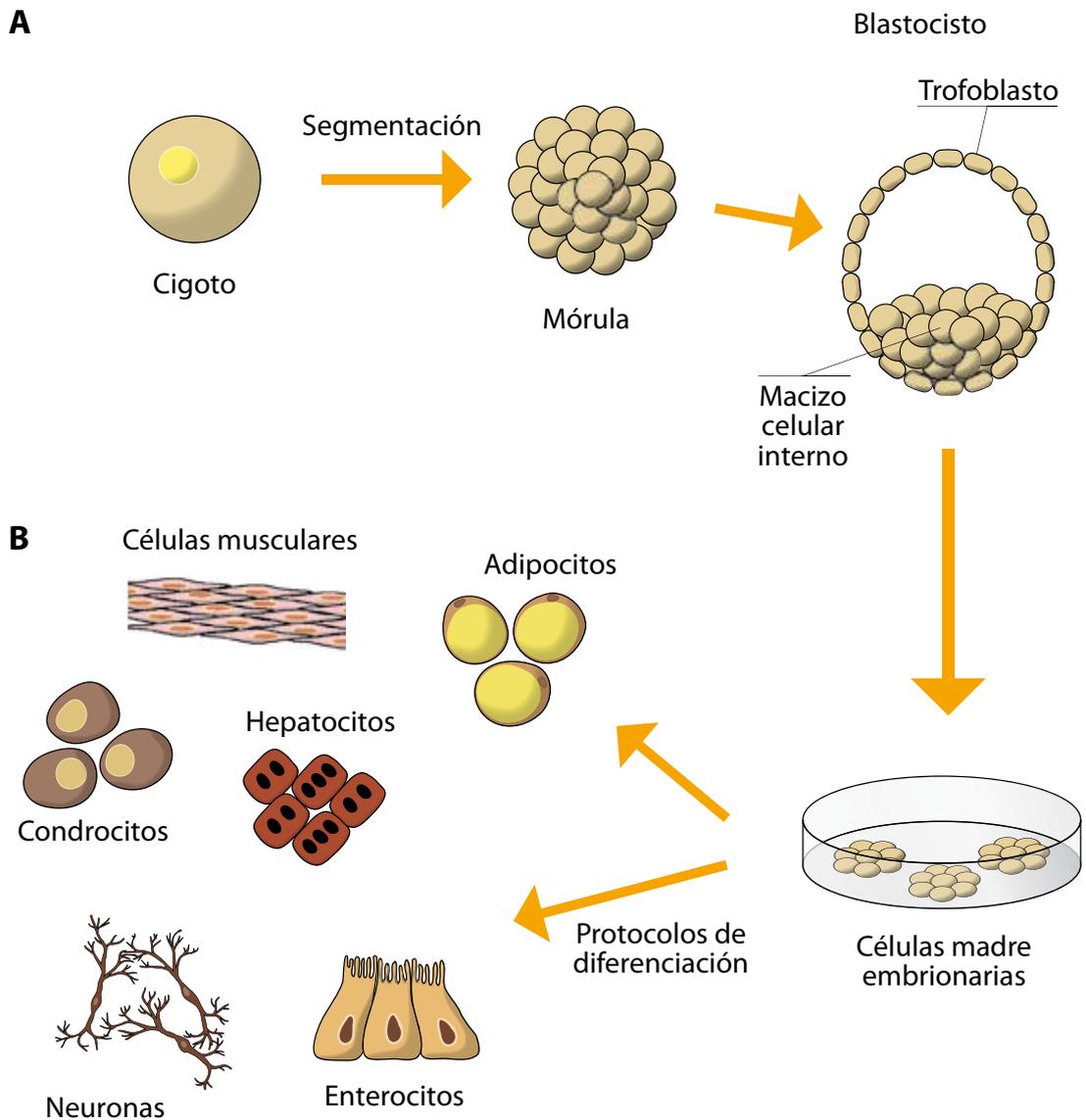


Figura 1. Desarrollo embrionario y derivación de células madre embrionarias. a) Primeras etapas del desarrollo embrionario, en donde un cigoto da lugar a la formación del blastocisto; b) Derivación de células madre a partir del macizo celular interno. *In vitro*, estas células tienen la capacidad de diferenciarse a cualquier tipo celular de las tres capas germinales mediante la aplicación de protocolos definidos.

células de su propia capa o linaje embrionario de origen, aunque la ciencia actual ha demostrado que estos límites son flexibles. Las células madre oligopotentes, como las células madre neurales, pueden dar lugar a unos pocos tipos celulares, y, finalmente, las células madre unipotentes pueden formar únicamente un tipo celular particular.

2.1. Células madre embrionarias

Las células madre embrionarias fueron aisladas por primera vez en 1998 por Thomson [8]. Tras la fecundación, el cigoto experimenta un marcado aumento de su actividad metabólica, necesario para que se inicie la segmentación, que consiste en una serie de divisiones mitóticas del cigoto en células hijas o blastómeras. Las primeras 12-16 blastómeras conforman la mórula. Después de aproximadamente cuatro días desde que ocurre la fecundación, se originan espacios entre las células centrales de la mórula y comienza a fluir líquido hacia esta cavidad emergente, lo que permite la separación de dos poblaciones celulares: una externa y una interna. A partir de la primera, denominada trofoblasto, se originan, entre otras estructuras, parte de la placenta y el cordón umbilical. La población interna localizada en el centro del embrión, que se conoce como el macizo celular interno, está constituida por las células madre embrionarias, que son las que darán origen al embrión propiamente dicho. Al embrión en este estadio del desarrollo se lo denomina blastocisto. El cigoto contiene toda la información genética y epigenética necesaria para el desarrollo del embrión. Las primeras ocho células que constituyen la mórula se caracterizan por tener la capacidad para dar origen a un organismo completo (totipotencialidad). En la siguiente etapa embrionaria, cuando se forma el blastocisto, ocurre la primera división funcional entre grupos de células. En este proceso, las células madre embrionarias del macizo celular interno darán origen al embrión, pero no al trofoblasto, que está compuesto por otro tipo de células multipotentes, que darán lugar a las estructuras extraembrionarias [9] (Fig. 1).

Las células madre embrionarias son pluripotentes por naturaleza y pueden dar lugar a más de 200 tipos celulares. Bajo condiciones de cultivo apropiadas, pueden ser inducidas a diferenciarse en una gran variedad de tipos celulares somáticos útiles, incluyendo neuronas, glía, células -pancreáticas, hepatocitos, cardiomiocitos y muchos otros. No sorprende que estas características hayan generado un enorme interés en su uso potencial como modelo del desarrollo humano, como una herramienta para la prueba y descubrimiento de drogas terapéuticas, y como una fuente celular para la medicina regenerativa.

3. Rejuvenecimiento por reprogramación celular

3.1. La ruta hacia la reprogramación celular

La generación de células madre pluripotentes inducidas (iPSC) a partir de células somáticas ha demostrado que las células somáticas de mamíferos adultos pueden reprogramarse a un estado pluripotente por sobreexpresión de un pequeño número de factores de transcripción embrionarios [10]. La pluripotencia inducida constituye la síntesis de logros científicos y de tecnologías desarrolladas en las últimas seis décadas. Entre los esfuerzos pioneros que allanaron el camino a la reprogramación celular, deben mencionarse los estudios de John Gurdon y colaboradores en los años sesenta [11]. Sus estudios seminales en ranas demostraron que la clonación animal es posible. Luego siguió la clonación de mamíferos mediante transferencia nuclear de células somáticas (SCNT), lograda en 1996 con el nacimiento de la oveja Dolly [12]. Estos hallazgos sugirieron firmemente que el genoma de la célula somática es de una plasticidad notable. En la década de 1980, se descubrió que un solo factor de transcripción, el MYOD, puede convertir los fibroblastos en células de músculo esquelético demostrando así que el destino celular puede ser cambiado a través de la sobreexpresión de este factor de transcripción específico [13]. Todos estos hallazgos contradijeron la doctrina fundamental de que las células terminalmente diferenciadas están determinadas en su especialización de manera irreversible. Estos hallazgos también revelaron que en el citoplasma de un ovocito maduro hay moléculas capaces de reprogramar un núcleo somático, poniendo en marcha el programa de desarrollo de un nuevo individuo.

La identidad de esas moléculas comenzó a emerger en 2006, cuando Takahashi y Yamanaka demostraron que la transferencia de los cuatro genes de pluripotencia *oct4*, *klf4*, *sox2* y *c-myc* (genes OKSM) a fibroblastos de ratón puede reprogramarlos, llevando a las células a un estado (estadio iPSC) en el que se comportan como células madre embrionarias (CME) [10]. Estos descubrimientos han abierto un horizonte de posibilidades inimaginables para el desarrollo de estrategias terapéuticas personalizadas.

3.2. Envejecimiento y epigenética: la promesa del rejuvenecimiento por reprogramación celular

A la luz de un creciente número de trabajos que demuestran que la reprogramación de células somáticas de personas de edad avanzada las rejuvenece hasta un estadio embrionario (un tema que se examinará brevemente a continuación), la visión emergente es que el envejecimiento constituye un fenómeno epigenético reversible donde el daño asociado al ADN no parece des-

empeñar un papel significativo (para revisiones del tema, consulte las referencias [14-16]). Estudios en organismos modelo, como levaduras, gusanos y moscas, han demostrado que el envejecimiento se asocia con cambios progresivos en la regulación de la cromatina.

En células jóvenes, el genoma posee un nivel relativamente alto de represión que se debe en parte a la existencia de niveles relativamente altos de metilación del ADN y de la histona H3 trimetilada en las lisinas 9 (H3K9me3) y 27 (H3K27me3), y la histona H4 trimetilada en la lisina 20 (H4K20me3), todas ellas consideradas como marcas epigenéticas represoras que están asociadas con una cromatina reprimida transcripcionalmente, así como niveles relativamente bajos de histona H3 trimetilada en la lisina 4 (H3K4me3) y la histona H4 acetilada en la lisina 16 (H4K16ac), ambas asociadas con la activación de la cromatina y, por tanto, consideradas marcas epigenéticas activadoras. El envejecimiento parece estar asociado a la desrepresión progresiva de la actividad transcripcional de la cromatina, que se genera en parte por reducción de la metilación del ADN, disminución de las marcas epigenéticas represoras, como H3K9me3, H3K27me3 y H4K20me3, y aumento en los niveles de marcas de activación, como H3K4me3 y H4K16ac (Fig. 2, esquema superior). La acetilación y la metilación de este grupo de histonas se consigue específicamente mediante una serie de complejos proteicos asociados con la cromatina, como las histona metiltransferasas y las histona desmetilasas, las histona desacetilasas (incluidas las sirtuinas), el complejo policomb, los grupos trithorax y otros (para revisiones del tema, consulte [17-20]). Las marcas epigenéticas están influenciadas por factores ambientales tanto endógenos como las hormonas, como exógenos, como la nutrición.

Un núcleo de estudios recientes sugiere firmemente que, cuando las células de individuos viejos son reprogramadas al estadio de iPSC, muchas de las marcas epigenéticas de envejecimiento, si no todas, son borradas (Fig. 2, esquema central). Si las iPSC derivadas de individuos envejecidos se vuelven a diferenciar al tipo celular original, las células que se generan muestran las características estructurales y funcionales típicas de células obtenidas de individuos jóvenes. Asimismo, se ha demostrado que la reprogramación de fibroblastos de piel obtenidos de individuos viejos a células iPSC y su subsecuente diferenciación a neuronas inducidas (es decir, neuronas derivadas de las iPSC) rejuvenece su perfil transcriptomal y su compartimentación nucleocitoplásmica, haciéndolas comparables a fibroblastos provenientes de donantes jóvenes [21].

Si, por otro lado, se generan neuronas inducidas (iN) por transdiferenciación, un proceso que no pasa por una fase de pluripotencia transitoria, las iN transdiferenciadas conservan el perfil transcriptomal típico de células viejas y muestran una compartimentación nucleocitoplásmica alterada, como en el caso de los fibroblastos viejos [21]. Esto llevó a la conclusión de que es necesario que exista un estadio transitorio de pluripotencia durante la reprogramación celular para borrar completamente las marcas de envejecimiento en el epigenoma (Fig. 3).

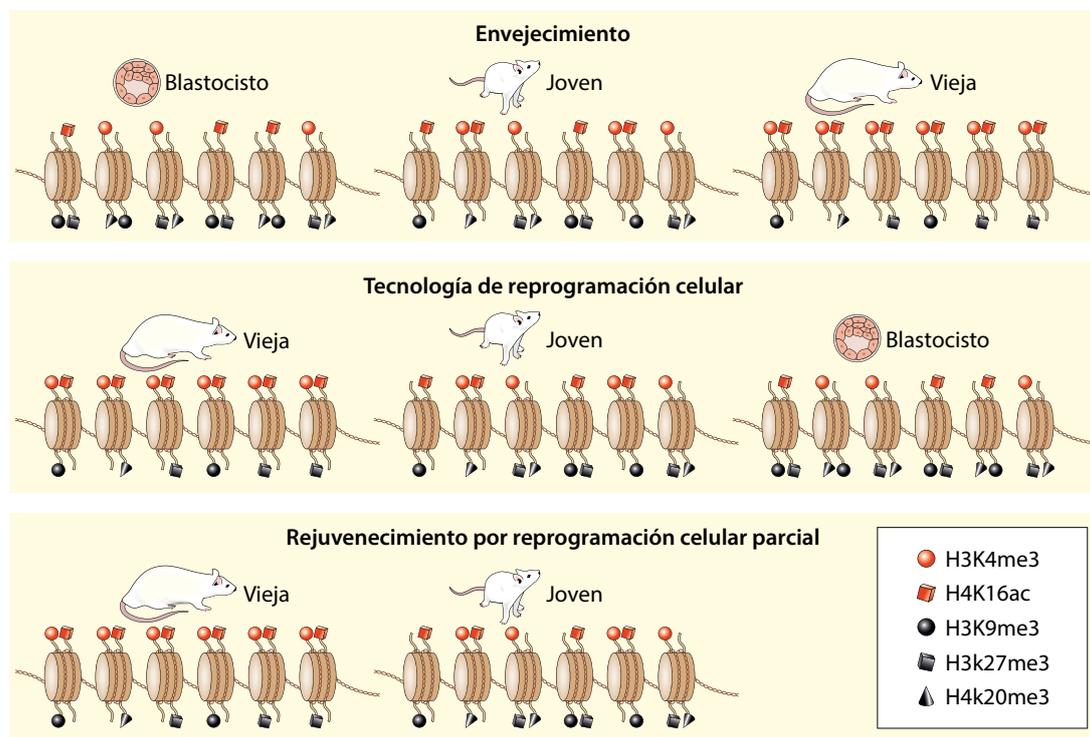


Figura 2. Diagramas que representan los cambios epigenéticos que ocurren en la cromatina durante el envejecimiento y durante la reprogramación celular. El diagrama superior representa algunos de los cambios progresivos en la metilación y acetilación de las histonas H3 y H4 y de la metilación del ADN durante el envejecimiento. El diagrama inferior representa los cambios cronológicos que parecen ocurrir en esas mismas marcas epigenéticas durante el rejuvenecimiento y la desdiferenciación que ocurren inducidos por los genes de pluripotencialidad de Yamanaka et al.

Los símbolos rojos representan las marcas activadoras de la cromatina, mientras que los símbolos negros representan las marcas epigenéticas represoras. Los asteriscos apoyados en una barra negra representan los grupos represores que metilan el ADN. Las líneas onduladas azules representan transcritos génicos (ARN). Las referencias gráficas al pie ilustran los símbolos descritos aquí.

En otro estudio, los fibroblastos cutáneos de donantes humanos centenarios sanos se desdiferenciaron al estadio iPSC y se volvieron a diferenciar a fibroblastos. En los fibroblastos así obtenidos se observó que la longitud de los telómeros se había restablecido y que los perfiles de expresión génica, los niveles de estrés oxidativo y el metabolismo mitocondrial eran comparables a los de los fibroblastos de seres humanos jóvenes [22]. En resumen, dichos fibroblastos estaban rejuvenecidos (el sueño de los alquimistas) (Fig. 4).

El rejuvenecimiento por reprogramación celular es uno de los nuevos horizontes abiertos por la tecnología de la reprogramación celular. Un estudio reciente, particularmente prometedor, de-

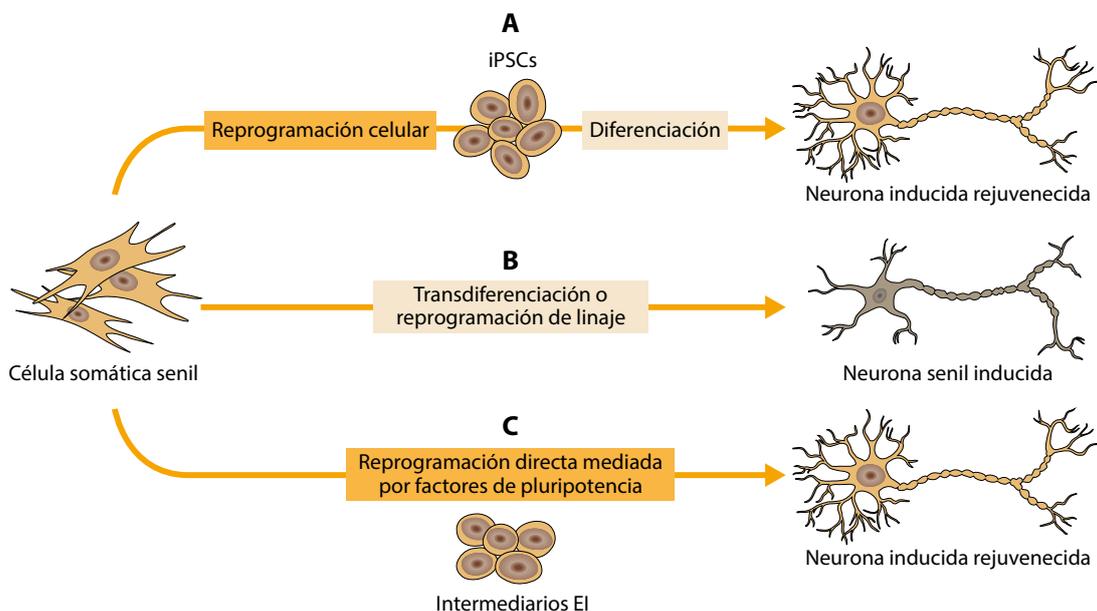


Figura 3. Diagramas que representan las tres estrategias centrales de reprogramación celular que existen hoy (2017). El diagrama superior ilustra la reprogramación convencional que se basa en transferir los cuatro genes de Yamanaka a una célula somática para convertirla en células madre pluripotentes inducidas, que subsecuentemente es diferenciada por exposición a un cóctel adecuado de factores de diferenciación a la célula somática deseada. Esta célula estará rejuvenecida.

El diagrama central resume el método de reprogramación de linaje o transdiferenciación. Se basa en sobreexpresar en la célula somática de partida un pequeño grupo de genes que típicamente se expresan en la célula de destino. Por este procedimiento se logra la transdiferenciación directa, sin pasar por un estadio transitorio de pluripotencia, de la célula de origen en la célula somática deseada. La reprogramación de linaje no rejuvenece la célula de destino.

El diagrama inferior esquematiza el método de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia. Se basa en la expresión transitoria (4-5 días) de los cuatro genes de Yamanaka en la célula somática de origen. Esto conduce a la generación de intermediarios multi- o pluripotentes que aún conservan la identidad de la célula de partida, pero que pueden diferenciarse, con un cóctel de factores de reprogramación adecuados, a diferentes células somáticas de destino. Las células somáticas así obtenidas estarán rejuvenecidas respecto a la célula de origen. Las células en azul se rejuvenecen; las marrones, no.

muestra que la reprogramación parcial cíclica en ratones transgénicos progénicos portadores de un casete regulable Tet-On, el cual alberga los cuatro genes de pluripotencia de Yamanaka, cuya expresión se activa en ciclos que consisten en un período de dos días de sobreexpresión transgénica (logrado mediante la administración del antibiótico doxiciclina al agua de bebida) seguida de un período de cinco días de silenciamiento (efectuado mediante la remoción de la doxiciclina), puede prolongar su tiempo de supervivencia en un 30% respecto a controles no tratados

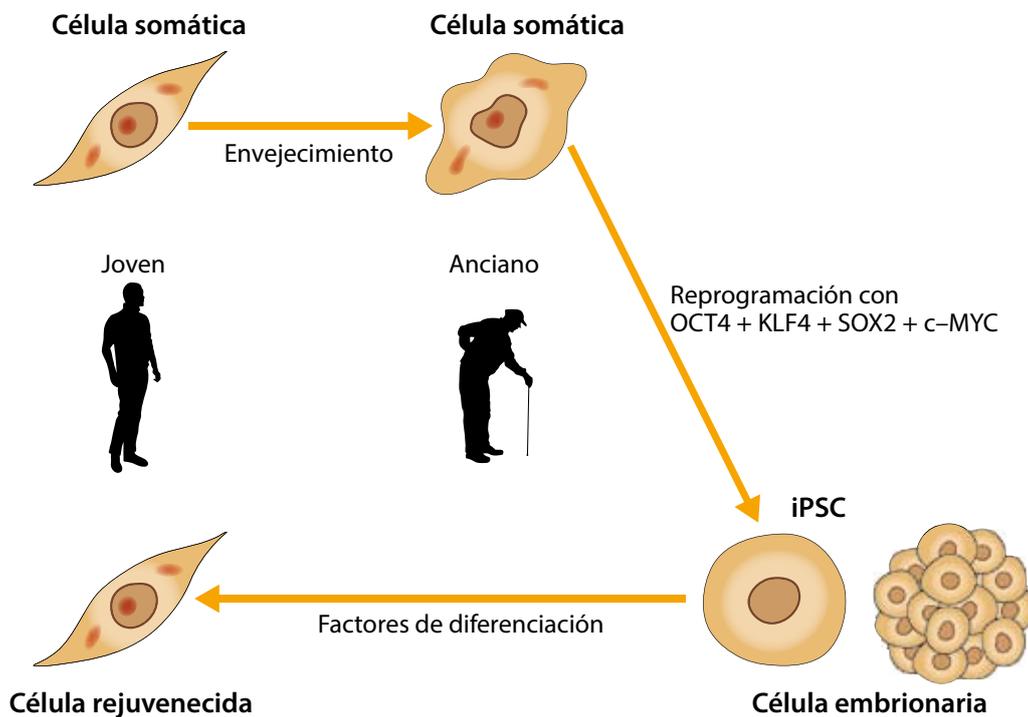


Figura 4. Rejuvenecimiento de fibroblastos cutáneos de voluntarios centenarios sanos por reprogramación celular.

La célula superior izquierda representa un fibroblasto cutáneo aislado de un voluntario joven. La célula a su derecha esquematiza un fibroblasto cutáneo obtenido de un voluntario centenario sano. En cultivo, la primera célula muestra las características morfológicas, metabólicas y génicas de una célula normal. Por el contrario, los fibroblastos de los voluntarios centenarios muestran alteraciones seniles, como alteración de la morfología celular y de sus organelos, déficits metabólicos, menor producción de energía por parte de las mitocondrias, acortamiento de telómeros y, consecuentemente, declinación de su capacidad proliferativa. Los perfiles de expresión génica son típicos de los que se observan en las células seniles.

Cuando se reprograman estos fibroblastos seniles a células madre pluripotentes inducidas y subsecuentemente se diferencian (por incubación con un cóctel de factores de diferenciación adecuados) nuevamente a fibroblastos, se observa un rejuvenecimiento pleno de las células resultantes que son indistinguibles de fibroblastos procedentes de un voluntario joven. Sucintamente, se observa que los telómeros de las células rejuvenecidas han recuperado su longitud juvenil, que su capacidad proliferativa ahora es la de una célula de un individuo joven. Las mitocondrias producen niveles de energía semejantes a los de las células de individuos jóvenes, el perfil de expresión génica es ahora el típico de la célula de un hombre joven, y la morfología celular y de los organelos es la de una célula joven (Lapasset et al, 2011).

[23]. El análisis de los órganos internos reveló que muchos signos de senescencia desaparecieron en ratones adultos (seniles) después de unos pocos ciclos de reprogramación parcial. Éste es, a nuestro entender, el primer estudio que revela que el rejuvenecimiento *in vivo* puede lograrse mediante la estrategia de reprogramación celular parcial cíclica.

Aunque los autores no describen una evaluación de los cerebros de los animales rejuvenecidos, parece probable que algunos marcadores de envejecimiento hayan podido ser atenuados en ellos. Es razonable esperar que a este trabajo le seguirá una corriente de estudios utilizando la reprogramación celular parcial cíclica para lograr un rejuvenecimiento *in vivo*. Resulta también razonable esperar que estos estudios incluyan estrategias de rejuvenecimiento en modelos animales con enfermedades neurodegenerativas. Teniendo en cuenta que el ritmo de publicaciones sobre reprogramación celular es cada vez más acelerado, existe una clara promesa de que, en un futuro no muy lejano, las tecnologías médicas desarrollarán no sólo estrategias de reprogramación celular parcial cíclica para tratar enfermedades cerebrales relacionadas con la edad hasta ahora incurables, como las enfermedades de Alzheimer y de Parkinson, sino también para revertir la declinación funcional (como el deterioro de la memoria) que se produce en el cerebro humano durante el envejecimiento normal.

4. Estrategias de reprogramación celular directa

La primera estrategia de reprogramación de células mediada por iPSC fue la desarrollada por el grupo de Yamanaka, cuyo objetivo, como se mencionó anteriormente, consistió en la conversión de una línea celular somática en iPSC que posteriormente pueden ser rediferenciadas a distintos tipos específicos de células somáticas de interés. Este método sigue siendo la estrategia más ampliamente utilizada para convertir un tipo de célula somática en otro, y es el único procedimiento utilizado hasta ahora para rejuvenecer células y animales. Desde su desarrollo en 2006, la tecnología iPSC ha sido ampliamente caracterizada; por ejemplo, se ha demostrado que el origen celular influye en el potencial de diferenciación de iPSC *in vitro* a diferentes tipos de células. Sin embargo, también se sabe que los pasajes reiterados de las iPSC atenúan en gran medida estas diferencias.

A pesar de las virtudes de la tecnología iPSC, el procedimiento en su conjunto es arduo, largo y costoso. Dado que los protocolos para generar iPSC comprenden numerosas etapas, la eficiencia con la que se genera el tipo de célula final puede ser baja. Además, existen cuestiones preocupantes en relación con la seguridad de las células derivadas de iPSC, y éstas necesitan ser probadas antes de que puedan utilizarse clínicamente. Es importante notar que los ensayos comúnmente usados para demostrar pluripotencia incluyen la verificación de la capacidad de las iPSC para generar teratomas. Por lo tanto, el potencial tumorigeno de las iPSC contaminantes que no lleguen a diferenciarse aumenta el riesgo en cualquier aplicación clínica de células somáticas generadas por este procedimiento. Estos obstáculos han llevado al desarrollo de otras formas de reprogramación celular que implican la conversión directa entre distintos tipos de células. Estas estrategias se describen a continuación e ilustran en la figura 3.

4.1. Reprogramación de linaje

En 1987 surgió un método de reprogramación celular para la generación de tipos celulares específicos, conocido como reprogramación de linaje o transdiferenciación [13]. Este método consiste en la conversión directa de un tipo de célula somática en otro por expresión ectópica de múltiples factores de transcripción específicos del linaje o micro-ARN (miARN), sin que la célula pase por el estadio de célula madre pluripotente. Dichos factores específicos de linaje son genes que normalmente se expresan en la célula de destino. Esta estrategia utiliza factores que muestran expresión específica en las células diana. Así, la transferencia génica mediada por adenovirus de una combinación de genes que codifican para tres factores de transcripción fue capaz de reprogramar eficientemente células pancreáticas exocrinas a células β funcionales en ratones, lo

que constituyó la primera evidencia documentada de reprogramación celular *in vivo* por factores definidos. Una serie de estudios ha demostrado que la transdiferenciación puede producir una amplia gama de tipos de células médicamente relevantes, como los cardiomiocitos y las neuronas. Las células transdiferenciadas presentan una funcionalidad equivalente a la de las células diferenciadas de iPSC o sus homólogos de origen natural y no muestran tumorigenicidad cuando son trasplantadas *in vivo*. Sin embargo, pueden mostrar memoria residual de las células de origen y diferencias de identidad, así como potencial proliferativo restringido, diversidad limitada de tipo celular e incluso senescencia, lo que a su vez puede afectar sustancialmente a su potencial aplicación en terapia regenerativa. Por otra parte, cuando la reprogramación de linaje se aplica a las células somáticas de donantes añosos para generar células neurales (o de cualquier otro tipo), las neuronas inducidas mantienen las características relacionadas con la edad de los donantes, lo que representa una limitación adicional para su uso en la terapia celular.

4.2. Reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia

También ha surgido otra estrategia en medicina regenerativa denominada reprogramación directa o reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia [24]. Este procedimiento utiliza células somáticas totalmente diferenciadas y las convierte en otros tipos de células somáticas a partir de la expresión transitoria de genes de pluripotencia, usualmente durante 3-5 días, y genera intermediarios epigenéticamente inestables que responden a cócteles apropiados de factores de diferenciación específicos.

La estrategia de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia se originó a partir de observaciones iniciales que indicaban que las iPSC se generan de una manera secuencial o estocástica. Esto llevó a la hipótesis de que podría ser posible manipular las células en un estadio temprano de reprogramación altamente inestable en términos epigenéticos, inducido por los factores de pluripotencia de Yamanaka. En presencia de factores de diferenciación apropiados, estos intermediarios epigenéticamente inestables pueden diferenciarse en diversos linajes de células somáticas con perfiles epigenéticos más estables. Este nuevo método posee varias ventajas, como el uso de un conjunto universal de genes de pluripotencia y la capacidad para generar poblaciones de células progenitoras multipotentes rejuvenecidas que pueden diferenciarse a diversas células específicas de tejido en condiciones definidas.

Aunque la hipótesis inicial fue que en la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia los intermediarios epigenéticamente inestables no pasan por un estadio de pluripotenciali, estudios posteriores demostraron que, cuando se utiliza reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia para generar cardiomiocitos reprogramados o células madre neurales,

la mayoría de las células inducidas derivadas de fibroblastos de ratón por conversión inducida con OSKM pasa a través de un estado transitorio de pluripotencia, como lo demuestra la reactivación del cromosoma X y la expresión de NANOG y OCT4 endógenos. Esta evidencia ha sido reforzada por un estudio que demuestra que, cuando la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia se utiliza para generar células madre neurales inducidas (iNSC) a partir de fibroblastos de ratón, las colonias de iNSC reprimen los transgenes retrovirales y reactivan los cromosomas X silenciados, que son características de pluripotencia. En vista de estas pruebas, ahora los términos intermediarios epigenéticamente inestables e intermedios pluripotentes se consideran equivalentes. El hecho de que la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia implique una etapa transitoria de pluripotencia hace concebible que, a diferencia de la reprogramación de linaje, la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia aplicada a células somáticas de donantes viejos pueda borrar al menos parte de las marcas epigenéticas del envejecimiento. Esta hipótesis es apoyada por un estudio citado anteriormente [15] que documenta que la sobreexpresión transitoria de los genes *OSKM* no sólo puede rejuvenecer las células somáticas de ratones progericos, sino también que es capaz de rejuvenecer a dichos ratones, aumentando su longevidad. La reprogramación de linaje y la reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia comparten en común una conversión directa de un tipo de célula a otro, dependiendo de señales específicas para ayudar a que las células originales alcancen el destino deseado de tipo celular, y ambas son específicas del paciente. En contraste con la reprogramación prolongada de células mediada por iPSC, en las estrategias directas la conversión ocurre normalmente en un corto período de tiempo y las células inducidas no tienen potencial tumorigeno. Una diferencia significativa entre reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia y reprogramación de linaje es que la primera genera células precursoras multipotentes, mientras que la última pasa de las células somáticas de origen directamente a las células terminales deseadas.

4.3. Generación de células neurales por reprogramación de linaje y reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia

Existe un gran interés en reprogramar células somáticas a neuronas maduras y precursores neurales, que puedan ser después utilizados para implementar terapia celular para enfermedades neurodegenerativas, como Alzheimer y Parkinson (para una detallada revisión, consulte [25]). En esta sección se hará mención de los procedimientos de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia y reprogramación de linaje usados para generar tales células, dejando para las secciones en que se traten patologías específicas el desarrollo de procedimientos para obtener subtipos neuronales como neuronas dopaminérgicas.

Se ha demostrado que las células somáticas no neurales pueden transdiferenciarse a neuronas funcionales mediante factores de transcripción determinantes de linaje. Inicialmente se convirtieron eficientemente fibroblastos de ratón y de humano en neuronas funcionales *in vitro*, mediante la transferencia de genes codificantes para factores de transcripción específicos del linaje y/o miRNA, bajo condiciones experimentales precisas. Se ha visto que los fibroblastos embrionarios y posnatales de ratón en los que se sobreexpresan tres factores de transcripción específicamente neurales, a saber, BRN2, ASCL1 y MYT1L, combinación conocida como BAM, pueden convertirse en iN. Las iN resultantes muestran morfología y múltiples marcadores típicos de neuronas. Cuando se combinan fibroblastos humanos con el factor de transcripción de neurodiferenciación D1 (NEUROD1), BAM puede convertir fibroblastos humanos en iN, que también son capaces de disparar potenciales de acción y formar sinapsis funcionales con neuronas corticales maduras murinas en cocultivo. Poco después de este descubrimiento, diversos grupos informaron la generación exitosa de iN a partir de fibroblastos humanos. Estos resultados muestran claramente que la sobreexpresión de un número limitado de factores maestros es suficiente para dirigir, de manera relativamente rápida y directa, cambios específicos de linaje en células derivadas de distintas capas embrionarias. En efecto, la conversión de linaje no está restringida a la misma capa germinal o al mismo linaje, ya que las células del mesodermo, como los fibroblastos, pueden dar lugar a neuronas, que son células derivadas del ectodermo. Por ejemplo, se obtuvieron iN a partir de hepatocitos terminalmente diferenciados, derivados del endodermo, utilizando la combinación de factores de transcripción neuronales (NEUROD1), + BAM. La generación de iN parece obedecer una secuencia de eventos epigenéticos. En el caso de la reprogramación de fibroblastos de ratón a iN mediada por BAM, ASCL1 puede que actúe como un factor de transcripción desencadenante que luego recluta BRN2 a su sitio de unión, y MYT1L se requeriría en etapas posteriores de la maduración. Entonces, ASCL1 se presenta como un factor de transcripción clave ('máster'), que ejerce un papel central para diferentes destinos celulares dependiendo del momento de la expresión y del tipo celular de partida. Otros estudios han señalado que la expresión de factores regulatorios específicos de subtipos celulares en fibroblastos humanos y murinos provoca el establecimiento de subtipos neuronales específicos, como neuronas dopaminérgicas y glutamatérgicas (véanse las secciones sobre enfermedad de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer).

La generación de iN partiendo de linajes no neurales puede tener aplicaciones significativas en estudios de desarrollo neuronal y modelado de enfermedades neurológicas, dado que pueden ser derivadas de pacientes. En principio, dichas iN también pueden ser usadas en medicina regenerativa. Sin embargo, no serían adecuadas para tratamientos de trasplante, porque, debido a su limitada capacidad para proliferar, son pocas las células que sobreviven y se integran funcionalmente al cerebro, lo cual indica efectividad limitada. Además, el hecho de que las células diferenciadas sean posmitóticas y que no se dividan hace que el proceso de generación de suficientes células sea laborioso. En este contexto, las células madre y progenitoras emergen como

tipos celulares más apropiados para obtener cantidades adecuadas. Consecuentemente, diversos estudios se han enfocado en la generación de iNSC, que mantienen las propiedades de multipotencialidad y autorrenovación, y en las células progenitoras neurales inducidas (iNPC) a partir de fibroblastos, mediante reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia y reprogramación de linaje. La estrategia de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia fue usada por primera vez por Kim et al en 2011 [26], quienes demostraron que la inducción transitoria de los cuatro factores de Yamanaka durante 3-5 días, seguida por una señalización apropiada con factores de diferenciación, puede convertir fibroblastos en iNPC funcionales de manera eficiente. Por ejemplo, cuando se cultivan fibroblastos epigenéticamente inestables de ratón inducidos por los factores de reprogramación OSKM en un medio que contenga las moléculas neurógenas, factor de crecimiento de fibroblasto (FGF) 2, FGF4 y factor de crecimiento epidérmico, después de 8-9 días en cultivo se generan colonias de células que muestran varias características de células progenitoras neurales. Este proceso es altamente eficiente y específico, y sólo requiere un único paso, que se completa en 13 días. En comparación con las iN, las iNPC tienen la clara ventaja de ser expandibles *in vitro* y de mantener la capacidad de dar lugar a múltiples subtipos neuronales y células gliales. Sin embargo, las poblaciones celulares generadas suelen ser heterogéneas y las iNPC han mostrado una escasa multipotencialidad. También se describió la conversión directa de fibroblastos primarios humanos a iNPC establemente expandibles mediante expresión transitoria y restringida de los cuatro factores de Yamanaka. Asimismo, se ha logrado la generación de iNPC tripotentes a partir de fibroblastos adultos humanos por reprogramación directa, usando sólo Oct4. Como las NSC expresan endógenamente, los tres factores de reprogramación de Yamanaka, SOX2, KLF4 y c-MYC, pero no OCT4, Thier et al, en 2012 [27], investigaron si se podían convertir fibroblastos de ratón en iNSC. Demostraron que, cuando la expresión de OCT4 es selectivamente reprimida después del día 5, manteniendo los otros tres genes sobreexpresados, se generan colonias de iNSC. Se informó también de la generación de iNSC a partir de fibroblastos humanos y de ratón por reprogramación directa con un único factor: el SOX2. Las iNSC expresan marcadores de células madre neurales y se asemejan a las células madre neurales endógenas en su morfología, capacidad de autorrenovación y perfil de expresión génica. Se pueden diferenciar a varios tipos de neuronas maduras, lo cual indica multipotencialidad. Al ser implantadas, estas iNSC sobreviven y se integran en el cerebro de ratón y, contrariamente a las células madre neurales derivadas de iPSC, no son tumorigénicas. Estas iNSC, además, exhiben una gran capacidad de autorrenovación, comparadas con la capacidad limitada de pasajes que toleran las iNPC, que pueden expandirse sólo por unos pocos pasajes. Esta última característica resulta crítica en su aplicabilidad en la clínica. Aparentemente estas células carecen de la capacidad para diferenciarse en oligodendrocitos.

Otros enfoques combinan la expresión de los factores de Yamanaka con factores de transcripción neurales tempranos, que después pueden ayudar a impulsar a los intermediarios epigené-

ticamente inestables hacia células progenitoras neurales. En esta área, demostraron que determinados conjuntos de factores de transcripción altamente expresados en células progenitoras neurales son suficientes para transdiferenciar fibroblastos de ratón a iNPC proliferativos [28]. Con tal propósito, se comenzó con un grupo de genes candidatos para factores de transcripción, y, eliminando uno a uno, se encontró que SOX2 y *forkhead box protein G1* (FOXG1) son capaces de generar iNPC bipotentes y autorrenovables, que dan lugar a astrocitos y neuronas funcionales. Cuando se agregó el gen para BRN2, se generaron iNPC tripotentes que también pudieron ser diferenciadas a oligodendrocitos. Además, FOXG1 y BRN2 solos mostraron capacidad para inducir células de tipo células progenitoras neurales, lo que generó neuronas menos maduras, aunque esos precursores sí produjeron astrocitos y oligodendrocitos capaces de integrarse en cerebros de ratones Shiverer (mutantes, desmielinizados). Sin embargo, la población resultante fue heterogénea, y se observó contaminación con células madre pluripotentes con formación de teratomas postrasplante en modelos animales de iNPC.

Una estrategia similar de reprogramación para la conversión directa de fibroblastos a iNSC comenzó con tres factores de transcripción de pluripotencia junto con ocho factores de transcripción específicos neurales y, por eliminación sistemática, la lista de factores efectivos fue reducida a un menor número. Considerando que *neurogenin 2* (factor de transcripción neurogenina 2) y LIM3 son factores específicos para tipos celulares más diferenciados, como neuronas motoras, estos factores pueden ser excluidos de la combinación de factores de reprogramación. Mediante este procedimiento se generaron eficientemente líneas celulares que se asemejan notablemente a NSC en términos de morfología, expresión de marcadores genéticos, potencial de diferenciación y capacidad de autorrenovación. Esto se llevó a cabo con una combinación de cuatro factores o una combinación de cinco factores (cuatro factores y E47). En resumen, en este estudio se demostró que SOX2, c-MYC, KLF4 y BRN4 son factores activos suficientes para inducir transdiferenciación de fibroblastos de ratón a iNSC. Fue un proceso gradual en el que el programa transcripcional de los fibroblastos fue silenciado progresivamente. En otro enfoque de transdiferenciación, se demostró que las células de Sertoli, que derivan de mesodermo, pueden ser directamente convertidas a iNSC/iNPC. Estas células expresaron múltiples marcadores específicos de células madre neurales, exhibieron un perfil de expresión génica global de células madre neurales y fueron capaces de autorrenovarse y diferenciarse a glía y a neuronas electrofisiológicamente funcionales. Esto se logró por la sobreexpresión de nueve factores de reprogramación específicos para células madre neurales.

La expresión ectópica de los genes de reprogramación OCT4, SOX2 y Nanog en astrocitos en cultivos conteniendo citocinas específicas activó el programa génico de células madre neurales y generó células inducidas expresando marcadores de células madre neurales o precursor neural. La expresión ectópica de los micro-ARN llamados miR-9/9* y miR-124 promueve la conversión

directa de fibroblastos humanos a neuronas inmaduras, un proceso facilitado por NEUROD2. La adición de los factores de transcripción neurógenos ASCL1 y MYT1L potenció la tasa de conversión y la maduración de las neuronas convertidas, mientras que la expresión de estos factores de transcripción solos, sin los micro-ARN, fue ineficaz. La combinación de miR-124 con el factor de transcripción BRN2 y MYT1L puede convertir fibroblastos humanos adultos en iN funcionales sin la adición de ningún factor de transcripción iniciador como ASCL1. Estas iN humanas exhiben marcadores de expresión génica típicos, morfología neuronal, disparan potenciales de acción y producen sinapsis funcionales entre ellas. La coexpresión de miR-9/*-124 con BCL11B, DLX1, DLX2 y MYT1L (factor de transcripción altamente expresado en el cuerpo estriado en desarrollo) puede guiar la conversión de fibroblastos humanos adultos y postnatales hacia una población enriquecida en neuronas. Estas son comparables a las neuronas espinosas mediales (MSN) del cuerpo estriado, una subpoblación neuronal que desempeña un papel crucial en el control motor y muestra una susceptibilidad selectiva a la muerte celular en la enfermedad de Huntington. Trasplantadas en el cerebro de un ratón, estas células humanas reprogramadas persistieron *in situ* más de seis meses, exhibiendo propiedades de membrana comparables a MSN nativas y proyecciones extendidas a los blancos anatómicamente normales de MSN. Como esta conversión directa saltea el estadio de célula madre pluripotente o multipotente, las neuronas directamente reprogramadas por micro-ARN retendrían el perfil de la edad del donante original. Usando un enfoque de reprogramación celular basado en micro-ARN, se pudieron convertir eficientemente fibroblastos a neuronas de donantes abarcando desde neonatos hasta adultos centenarios, que retuvieron múltiples características asociadas a la edad. Para evaluar la edad celular se utilizó el método del reloj epigenético, considerado un marcador altamente preciso, basado en la metilación del ADN [29] se evaluaron los perfiles génicos asociados a la edad basados en el nivel de expresión génica, miARN y 'marcas celulares' consideradas como rasgos distintivos de la edad para finalmente demostrar el mantenimiento de la edad de las células donantes originales durante la conversión a neuronas. Estas neuronas humanas convertidas de manera directa pueden ser útiles para estudiar trastornos neuronales relacionados con la edad, mientras que las células derivadas de iPSC resultan poco apropiadas para recapitular fenotipos específicamente observados en células envejecidas. Como se mencionó anteriormente, la inducción de pluripotencia en fibroblastos adultos revierte la edad celular hacia un estadio embrionario, borrando las marcas epigenéticas de la edad. Esta característica (juventud) se mantiene incluso después de la diferenciación a neuronas. La figura 5 muestra un resumen gráfico de los estudios señalados en esta sección.

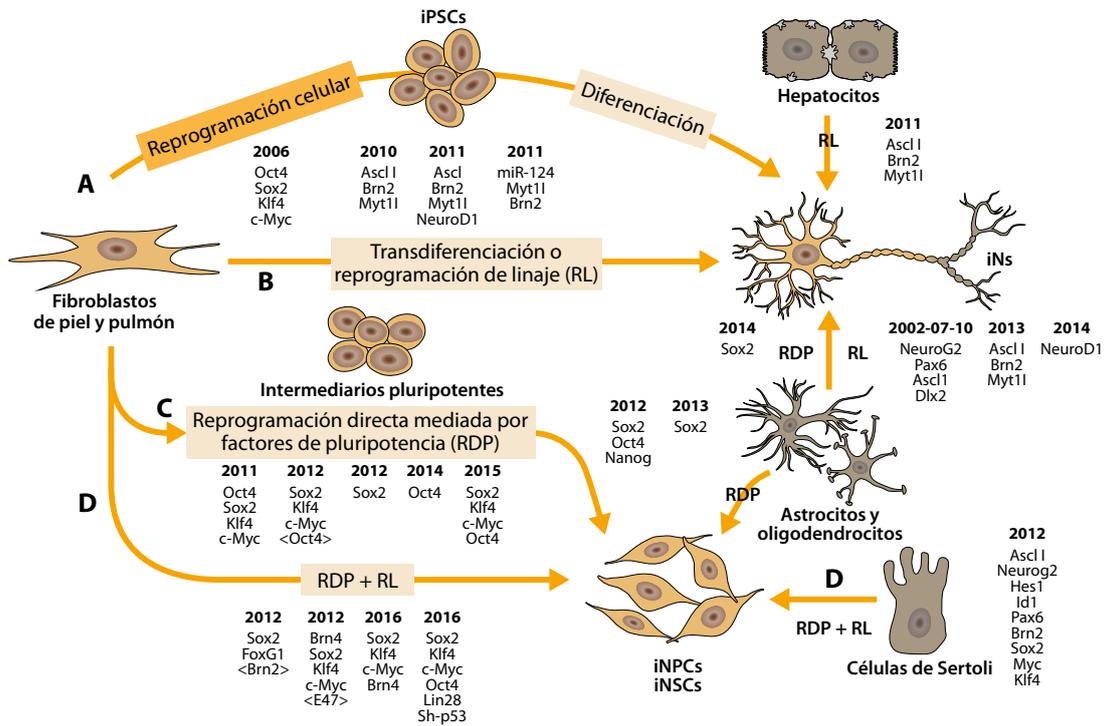


Figura 5. Resumen gráfico de los distintos procedimientos de reprogramación celular que se han descrito para generar neuronas inducidas, células madre neurales inducidas o células progenitoras neurales inducidas. Se muestran listas encabezadas por el año en que se publicó un determinado trabajo de obtención de células neurales o células madre pluripotentes inducidas por reprogramación. Los factores empleados aparecen debajo del año.

5. Medicina regenerativa para el cerebro senil

5.1. Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Parkinson

Gracias a la aparición de las técnicas de reprogramación celular, los investigadores dedicados al estudio de enfermedad de Parkinson han obtenido iPSC, iN e iNSC/iNPC a partir de células somáticas de pacientes (para una detallada revisión, consulte [25]). Actualmente es posible obtener neuronas por diferenciación de iPSC y por conversión directa de fibroblastos.

En un estudio, los precursores neurales derivados de iPSC se trataron con *sonic hedgehog* (SHH) y FGF8. La mayoría de las células se diferenció a un fenotipo positivo para tubulina- β III con morfología neuronal, mostrando marcadores típicos de neuronas dopaminérgicas del cerebro medio. Se demostró recuperación funcional en ratas con Parkinson después del trasplante celular. A su vez, se utilizó la técnica de separación de células activadas por fluorescencia para eliminar la fracción celular que no logró diferenciarse, debido al riesgo que implica la formación de teratomas para la terapia celular. No se observaron tumores ocho semanas postrasplante. Se llevó a cabo un test de comportamiento para comparar los animales tratados con los que recibieron células no sometidas a separación de células activadas por fluorescencia, presentando entre ellos una tasa de recuperación similar. Este estudio reveló que las neuronas dopaminérgicas derivadas de iPSC generan integración sináptica y función dopaminérgica al trasplantarse en el cerebro adulto de ratas modelo de enfermedad de Parkinson.

Recientemente se ha logrado obtener neuronas dopaminérgicas humanas a partir de iPSC. Las iPSC se diferenciaron en precursores del cerebro medio, que fueron tratados con SHH y WNT, y 25 días después se observaron neuronas dopaminérgicas inducidas (iDA) por transdiferenciación, cuya identidad fue confirmada mediante análisis de los perfiles molecular, bioquímico y electrofisiológico de dichas células. Éstas se mantuvieron *in vitro* durante varios meses. Se demostró la supervivencia y función *in vivo* de las neuronas iDA en tres modelos animales de enfermedad de Parkinson. En ratas y ratones tratados con la toxina dopaminérgica 6-OHDA, las células mostraron mejor supervivencia y mejoras en test de acinesia. También se observó una restauración completa del comportamiento rotacional inducido por anfetamina. El trasplante de estas células a monos con enfermedad de Parkinson logró una excelente supervivencia celular, función y escalabilidad, y reveló un gran potencial para la aplicación de terapia celular en pacientes con enfermedad de Parkinson.

En una estrategia directa que combina los factores de transcripción ASCLI, NURR1y LMX1A, se generaron neuronas iDA funcionales a partir de fibroblastos murinos y humanos sin pasar por el

estadio de progenitor. Este estudio también indicó que se pueden generar neuronas dopaminérgicas a partir de células de pacientes con enfermedad de Parkinson. Recientemente, la eficiencia de reprogramación de células humanas a neuronas iDA por combinación de ASCL1/NURR1/LMX1A se ha mejorado enormemente gracias a la adición del miR-124 no codificante y una combinación de factores neurotróficos y moléculas pequeñas. Dicha eficiencia se mejoró aún más para obtener neuronas TH+/TUJ1+ a partir de fibroblastos de feto humano, con las neuronas iDA generadas expresando marcadores dopaminérgicos como AADC, ALDH, DAT, VMAT2, PITX3, NURR1, FOXA2 y EN 1. La mayor eficiencia de conversión (el 60% de rendimiento) se logró con fibroblastos de feto humano; dicha eficiencia es inversamente proporcional a la edad del donante de los fibroblastos, y es del 16, el 11 y el 8% con edades de donantes de 0 (bebés), 31 y 96 años, respectivamente.

Otro estudio demostró que la combinación de los factores de transcripción ASCL1 y NURR1, junto con factores neurotróficos como SHH y FGF8B, es capaz de transdiferenciar fibroblastos embrionarios murinos a iN, incluyendo neuronas dopaminérgicas y células panneuronales. Se utilizó la combinación de los nueve genes *ASCL1*, *NGN2*, *HES1*, *ID1*, *PAX6*, *BNR2*, *c-MYC*, *KLG4* y *SOX2* para reprogramar fibroblastos murinos fetales y postnatales a iN, de los cuales el 10% expresó TH, EN1 y PITX3. A su vez, se informó de que la generación de neuronas a partir de iNPC derivadas de fibroblastos adultos de ratón causa en un 90% células neurales TH+/TUJ1. Estas neuronas se generaron a partir de iNPC, mediante la sobreexpresión de BRN2, SOX2 y FOXA2, con o sin exposición a SHH y FGF8.

En cuanto a estudios con células neurales inducidas en modelos animales de enfermedad de Parkinson, se ha descrito que se puede inducir la diferenciación de iPSC a neuronas dopaminérgicas e implantar dichas células subsecuentemente en el cerebro de ratas modelo de enfermedad de Parkinson, donde son capaces de generar mejorías en el comportamiento. Estas neuronas dopaminérgicas se integran sinápticamente al cerebro fetal y funcionan en el cerebro adulto de las ratas modelo de enfermedad de Parkinson después del trasplante. En otro estudio en el cual se emplearon monos cangrejeros con enfermedad de Parkinson, se observó que las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio derivadas de iPSC sobrevivieron más de dos años después del trasplante autólogo. En uno de los animales en los que el protocolo fue altamente exitoso, el implante unilateral de las neuronas dopaminérgicas del cerebro medio derivadas de monos cangrejeros-iPSC indujo una mejora progresiva de la función motora en el sitio contralateral al trasplante, y la actividad motora aumentó sin necesidad de inmunosupresión. Los análisis *post mortem* revelaron la supervivencia de neuronas tipo dopaminérgicas del cerebro medio y un crecimiento extenso dentro del putamen trasplantado.

Otro estudio demostró que las iNSC *per se* poseen efectos terapéuticos en un modelo de ratón con enfermedad de Parkinson. El estudio reveló que las iNSC modificadas para sobreexpresión

sar el factor de transcripción LMX1A (iNSC-LMX1A) mejoran aún más su eficacia terapéutica al ser trasplantadas en ratones modelos de enfermedad de Parkinson. Se encontró que las iNSC-LMX1A generan un aumento del rendimiento de neuronas dopaminérgicas y mayores niveles de dopamina *in vitro*, comparando con iNSC control que expresan GFP (iNSC-GFP). Cuando se trasplantaron iNSC-GFP e iNSC-LMX1A a ratones con enfermedad de Parkinson, ambos grupos mostraron una disminución de rotaciones ipsilaterales inducidas por anfetamina; sin embargo, los ratones que recibieron iNSC-LMX1A se recuperaron mejor que los que recibieron iNSC-GFP. Este estudio demostró por primera vez que las iNSC obtenidas por conversión directa de células somáticas tienen efectos terapéuticos al trasplantarse en ratones modelos de enfermedad de Parkinson. Considerando que LMX1A posee un papel esencial en la especificación de neuronas dopaminérgicas, los resultados anteriores sugieren que dicho factor de transcripción podría ser empleado para incrementar la diferenciación de iNSC en neuronas dopaminérgicas. Recientemente, se ha descrito un protocolo que utiliza medios completamente definidos para la generación de neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral a partir de hPSC. Este protocolo utiliza dos líneas *reporter knock-in* (LMX1A-eGFP y PITX-eGFP) que permiten el seguimiento *in vivo* e *in vitro*. Entre las múltiples líneas hPSC embrionarias e inducidas, este protocolo aumentó coherentemente tanto el rendimiento como la proporción de progenitores neurales (OTX2/FOXA2/LMX1A) y neuronas (FOXA2/TH/PITX3) que presentaron propiedades metabólicas y electrofisiológicas características de las neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral.

Sin embargo, debe señalarse que las NSC poseen mayor tendencia a diferenciarse a glía que a neuronas funcionales después de un trasplante, lo cual implica una desventaja para la terapia de reemplazo neuronal que tiene como fin tratar enfermedad de Parkinson y otras enfermedades neurodegenerativas. Se sabe que los progenitores dopaminérgicos pueden generarse, bajo condiciones ambientales modificadas adecuadamente, mediante una estrategia de reprogramación directa mediada por factores de pluripotencia similar a la utilizada para generar iNSC, lo cual ofrece una alternativa interesante. Aunque estos progenitores dopaminérgicos están más comprometidos que las NSC, aún no son neuronas terminalmente diferenciadas. Recientemente se demostró que los fibroblastos de ratón pueden ser directamente reprogramados hacia progenitores dopaminérgicos de cerebro medio por expresión transitoria (cinco días) de los cuatro genes de Yamanaka y subsecuente exposición a SHH y FGF8 durante ocho días. Los progenitores dopaminérgicos inducidos se generaron en los 13 días siguientes, y fueron células funcionales y autorrenovables. Aunque las técnicas de reprogramación directa son muy prometedoras para el tratamiento de enfermedad de Parkinson, hasta ahora no se ha documentado la obtención de auténticas neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral por reprogramación directa de células humanas. Existen varias estrategias alternativas para generar neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo ventral humanas. Dichas estrategias no se tratarán en este capítulo.

5.2. Potencial terapéutico de la reprogramación celular para la enfermedad de Alzheimer

La terapia con células madre para la enfermedad de Alzheimer se probó tanto con células madre adultas como con iPSC. Aquí nos centraremos en el potencial de las células neurales inducidas para el tratamiento de enfermedad de Alzheimer en pacientes y en modelos animales con esta enfermedad (para una detallada revisión, consulte [25]).

Los primeros estadios de enfermedad de Alzheimer se caracterizan por la pérdida temprana de neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior, de modo que el reemplazo de las neuronas colinérgicas se torna relevante como objetivo terapéutico. En este contexto, resulta interesante que las neuronas colinérgicas del cerebro basal anterior pueden obtenerse a partir de células embrionarias humanas y posiblemente también a partir de iPSC humanas. Se ha demostrado también que se pueden reprogramar fibroblastos obtenidos de la piel de individuos normales y de pacientes con enfermedad de Alzheimer genética hacia neuronas glutamatérgicas funcionales mediante sobreexpresión de un amplio grupo de reguladores transcripcionales del cerebro anterior (BRN2, MYT1L, ZIC1, OLIG2 y ASCL1) en presencia de factores de supervivencia neurales. Otra estrategia utilizó dos moléculas pequeñas, forskolina y dorsomorfina, para permitir que el factor de transcripción neurogenina 2 lograra una conversión directa de fibroblastos de pulmón de feto humano hacia neuronas colinérgicas, con un alto nivel de pureza (mayor del 90%) y eficiencia (más del 99% de las células expresaron factor de transcripción neurogenina 2), de modo que se evitó el pasaje por el estadio de pluripotencia. Las neuronas colinérgicas humanas inducidas presentaron propiedades electrofisiológicas de neuronas maduras, así como características de tipo neuronal. La adición del factor de transcripción SOX11 permitió una eficiente conversión de fibroblastos extraídos de la piel de individuos adultos y postnatales, sanos y con enfermedad de Alzheimer, en neuronas colinérgicas. Se ha logrado también convertir fibroblastos humanos de individuos normales y con enfermedad de Alzheimer en iN sin utilizar transgenes. En lugar de esto, utilizaron una combinación de siete moléculas pequeñas (a la que nos referiremos como VCRFSGY), ácido valproico, CHIR99021, Repsox, forskolina, SP600125 (un inhibidor de la cinasa JNK), GO6983, (un inhibidor de la proteincinasa-C, G) e Y-27632 (inhibidor del ROCK, Y), que logró una conversión directa de los fibroblastos hacia neuronas, evitando el estadio de progenitor neural. Las neuronas humanas obtenidas presentaron características similares a neuronas derivadas de iPSC e iN humanas en cuanto a su morfología, perfil de expresión génica y propiedades electrofisiológicas. Esta técnica de inducción química ofrece una alternativa para la modelización de enfermedades neurológicas y para la medicina regenerativa. Otro tipo de células prometedoras para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer son los progenitores neurales restringidos generados durante la neurogenia normal, que representan un estadio intermedio entre las células progenitoras neurales multipotentes y las neuronas diferenciadas terminalmen-

te. Son células autorrenovables, capaces de migrar en el sistema nervioso, y poseen una mayor tendencia de diferenciarse a neuronas que a células gliales tanto *in vivo* como *in vitro*. A su vez, cuando se inyectan en la zona subventricular de roedores, los progenitores neurales restringidos pueden migrar ampliamente, integrarse en regiones variadas del cerebro y diferenciarse en varios subtipos neuronales, contribuyendo a la plasticidad y reparación del cerebro. Sin embargo, obtener los progenitores neurales restringidos con un alto grado de pureza a partir de tejido nervioso normal es laborioso, lo que constituye un impedimento para realizar otros estudios o aplicaciones en los cuales se requiere un número considerable de células. Esta limitación puede sortearse haciendo uso de la reprogramación celular, ya que recientemente se ha demostrado que utilizando sólo tres factores de transcripción definidos –SOX2, c-MYC y BRN2 o BRN4– se pueden convertir fibroblastos de feto humano en progenitores neurales restringidos humanos inducidos. Estos son autorrenovables y presentan características neuronales distintivas, como expresión de múltiples marcadores neuronales, perfil transcripcional y morfología neuronal. Pueden diferenciarse en varios subtipos neuronales con propiedades funcionales, pero no se pueden diferenciar a células gliales. De esta manera, una conversión directa y eficiente de células somáticas hacia progenitores neurales restringidos humanos inducidos ofrece una nueva fuente de células para estudios de desarrollo neuronal y para terapia de reemplazo celular en pacientes con enfermedad de Alzheimer.

También se utiliza la reprogramación celular para modelar enfermedad de Alzheimer con iPSC derivadas de pacientes con enfermedad de Alzheimer. Las iPSC derivadas de pacientes con enfermedad de Alzheimer genético fueron establecidas en 2011, confirmando que la producción de un péptido altamente tóxico, A β 42, está aumentada en todas las líneas de iPSC específicas de pacientes. Además, las neuronas derivadas de iPSC con mutaciones responden drásticamente a moduladores e inhibidores de la γ -secretasa, señalando el potencial de estas células para el hallazgo de drogas aplicables al tratamiento de enfermedad de Alzheimer. En un estudio de expresión génica en neuronas derivadas de iPSC de un paciente con enfermedad de Alzheimer de 82 años de edad se observaron cambios significativos en la expresión de genes entre las células primarias y las neuronas inducidas. En otro estudio se generaron neuronas a partir de iPSC de pacientes con enfermedad de Alzheimer tanto esporádica como genética, y esta última está causada por la duplicación del gen que codifica la proteína precursora amiloidea. Estas células mostraron altos niveles de A β 40. También se demostraron características patológicas clave de las neuronas derivadas de iPSC de pacientes con enfermedad de Alzheimer, entre ellas un incremento de la tau fosforilada y de su actividad cinasa (GSK). A su vez, hay evidencia de que estas células son más vulnerables a la muerte celular mediada por glutamato y que la acumulación de oligómeros β amiloide induce estrés oxidativo, y el resultado es la apoptosis. Se observó acumulación de oligómeros β amiloide tanto en células neuronales derivadas de un paciente con enfermedad de Alzheimer esporádico como en las derivadas de un paciente que porta la mutación patógena proteína precursora amiloidea-E693D.

En otro estudio se administraron células humanas tipo macrófago derivadas de iPSC (iPSC-ML) de forma intracerebral a ratones 5XFAD (modelo de enfermedad de Alzheimer). Nos referiremos a dichas células como células iPSML/NEP2, dado que expresan una enzima proteolítica del péptido β amiloide, la neprilisina-2 (NEP2), y la forma fusionada del receptor para Fc de un anticuerpo de simple cadena específico para β amiloide. Se obtuvo como resultado una reducción significativa del nivel de β amiloide en el fluido intersticial del cerebro. Los autores de este trabajo concluyeron que las células iPSC-ML/NEP2 podrían utilizarse como agente terapéutico en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer. En otro estudio se trasplantaron precursores de neuronas colinérgicas derivados de iPSC humanas de manera bilateral en el hipocampo de ratones transgénicos que expresan la proteína precursora amiloidea humana. Estos ratones muestran una deposición progresiva de β amiloides y déficits en la memoria espacial a las ocho semanas de edad. En este caso, el resultado obtenido fue una mejora en la memoria espacial en comparación con los ratones control. Cuarenta y cinco días después del trasplante de los precursores neurales se detectaron en el hipocampo de los ratones transgénicos neuronas colinérgicas humanas positivas para colina acetiltransferasa y neuronas gabérgicas humanas positivas para el transportador del ácido gamma aminobutírico.

6. Consideraciones finales

Las enfermedades neurodegenerativas consisten en trastornos neurológicos que constituyen un problema de creciente impacto médico y económico. En este contexto, el desarrollo de estrategias novedosas como la medicina regenerativa abre nuevos caminos para la terapia de patologías cerebrales. La reprogramación celular está emergiendo como una tecnología prometedora para hacer posible la implementación de medicina regenerativa en enfermedades neurodegenerativas hasta el momento incurables. Un camino diferente para tratar trastornos cerebrales asociados a la edad emerge de la idea de rejuvenecer un organismo entero mediante ciclos de reprogramación celular parcial, lo cual podría lograrse en un futuro mediano. El rejuvenecimiento representa una terapia definitiva para las patologías del cerebro relacionadas con la edad.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, podemos decir que la generación de células neurales *in vitro* y, en menor medida, *in vivo*, es un campo de investigación en pleno desarrollo, cuyo objetivo es establecer protocolos efectivos para la producción de stocks celulares derivados de los mismos pacientes, particularmente iNSC e iNPC, que pueden utilizarse de manera segura para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer y otras patologías neurológicas. Si bien las estrategias de reprogramación directa se encuentran en expansión, la tecnología de iPSC continúa siendo la principal fuente de células neurales inducidas. A pesar de que el uso de células neurales derivadas del paciente es ideal para la implementación de medicina regenerativa personalizada en el cerebro, la obtención de dichas células es un proceso arduo, y el tiempo necesario para llevarlo a cabo es una limitante para el uso rutinario de esta tecnología en el tratamiento de enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson. Una alternativa que se está considerando es la creación de bancos de células inducidas, que, al igual que los bancos de sangre, serían mucho más prácticos y efectivos que la terapia celular.

7. Bibliografía

1. Grothe M, Heinsen H, Teipel SJ. Atrophy of the cholinergic basal forebrain over the adult age range and in early stages of Alzheimer's disease. *Biol Psych* 2011; 71: 805-13.
2. Fischer W, Chen KS, Gage FH, Bjorklund A. Progressive decline in spatial learning and integrity of forebrain cholinergic neurons in rats during aging. *Neurobiol Aging* 1992; 13: 9-23.
3. De Rijk MC, Breteler MM, Graveland GA, Ott A, Grobbee DE, van der Meche F, et al. Prevalence of Parkinson's disease in the elderly: the Rotterdam Study. *Neurology* 1995; 45: 2143-6.
4. Sánchez HL, Silva LB, Portiansky EL, Herenu CB, Goya RG, Zuccolilli GO. Dopaminergic mesencephalic systems and behavioral performance in very old rats. *Neuroscience* 2008; 154: 1598-606.
5. Inaba M, Yamashita YM. Asymmetric Stem Cell Division: Precision for Robustness. *Cell Stem Cell* 2012; 11: 461-9.
6. Brittan M, Wright NA. Stem cell in gastrointestinal structure and neoplastic development. *Gut* 2004; 53: 899-910.
7. Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004; 78: 433-46.
8. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998; 282: 1145-7.
9. Mummery C. Induced pluripotent stem cells—a cautionary note. *N Engl J Med* 2012; 364: 2160-2.
10. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
11. Gurdon JB. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *J Embryol Exp Morphol* 1962; 10: 622-40.

12. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997;385: 810-3.
13. Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* 1987; 51: 987-1000.
14. Rando TA, Chang HY. Aging, rejuvenation, and epigenetic reprogramming: resetting the aging clock. *Cell* 2012; 148: 46-57.
15. Ocampo A, Reddy P, Izpisua Belmonte JC. Anti-Aging Strategies Based on Cellular Reprogramming; *Trends Mol Med* 2016; 22: 725-38.
16. López-León M, Goya RG. The emerging view of aging as a reversible epigenetic process. *Gerontology* 2017; 63: 426-31.
17. Greer EL, Maures TJ, Hauswirth AG, Green EM, Leeman DS, Maro GS, et al. Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 2010; 466: 383-7.
18. Han S, Brunet A. Histone methylation makes its mark on longevity. *Trends Cell Biol* 2012; 22: 42-9.
19. Benayoun BA, Pollina EA, Brunet A. Epigenetic regulation of ageing: linking environmental inputs to genomic stability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16: 593-610.
20. Sen P, Shah PP, Nativio R, Berger SL. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. *Cell* 2016; 166: 822-39.
21. Mertens J, Paquola AC, Ku M, Hatch E, Böhnke L, Ladjevardi S, et al. Directly reprogrammed human neurons retain aging-associated transcriptomic signatures and reveal age-related nucleocytoplasmic defects. *Cell Stem Cell* 2015; 17: 705-18.
22. Lapasset L, Milhavet O, Prieur A, Besnard E, Babled A, Aït-Hamou N, et al. Rejuvenating senescent and centenarian human cells by reprogramming through the pluripotent state. *Genes Dev* 2011; 25: 2248-53.
23. Ocampo A, Reddy P, Martinez-Redondo P, Platero-Luengo A, Hatanaka F, Hishida T, et al. In vivo amelioration of age-associated hallmarks by partial reprogramming. *Cell* 2016; 167: 1719-33.

24. Kim J, Ambasudhan R, Ding S. Direct lineage reprogramming to neural cells. *Curr Opin Neurobiol* 2012; 22: 778-84.
25. López-León M, Outeiro TF, Goya RG. Cell reprogramming: Therapeutic potential and the promise of rejuvenation for the aging brain. *Ageing Res Rev* 2017; 40: 168-81.
26. Kim J, Efe JA, Zhu S, Talantova M, Yuan X, Wang S, et al. Direct reprogramming of mouse fibroblasts to neural progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 7838-43.
27. Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, Gorris R, Herms S, Opitz T, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 473-9.
28. Lujan E, Chanda S, Ahlenius H, Sudhof TC, Wernig M. Direct conversion of mouse fibroblasts to self-renewing, tripotent neural precursor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 10: 2527-32.
29. Horvath S. DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biol* 2013; 14: 3156.