

# Células madre embrionarias humanas derivadas por transferencia nuclear de células somáticas

Masahito Tachibana,<sup>1</sup> Paula Amato,<sup>2</sup> Michelle Sparman,<sup>1</sup> Nuria Marti Gutiérrez,<sup>1</sup> Rebecca Tippner-Hedges,<sup>1</sup> Hong Ma,<sup>1</sup> Eunju Kang,<sup>1</sup> Alimujiang Fulati,<sup>1</sup> Hyo-Sang Lee,<sup>1,6</sup> Hathaitip Sritanaudomchai,<sup>3</sup> Keith Masterson,<sup>2</sup> Janine Larson,<sup>2</sup> Deborah Eaton,<sup>2</sup> Karen Sadler-Fredd,<sup>2</sup> David Battaglia,<sup>2</sup> David Lee,<sup>2</sup> Diana Wu,<sup>2</sup> Jeffrey Jensen,<sup>1,4</sup> Phillip Patton,<sup>2</sup> Sumita Gokhale,<sup>5</sup> Richard L Stouffer,<sup>1,2</sup> Don Wolf,<sup>1</sup> Shoukhrat Mitalipov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Division of Reproductive & Developmental Sciences, Oregon National Primate Research Center, Oregon Health & Science University. EE.UU.

<sup>2</sup> Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics and Gynecology, Oregon Health & Science University. EE.UU.

<sup>3</sup> Department of Oral Biology, Faculty of Dentistry, Mahidol University. Tailandia.

<sup>4</sup> Women's Health Research Unit, Oregon Health & Science University. EE.UU.

<sup>5</sup> Boston University School of Medicine. EE.UU.

<sup>6</sup> Present address: Laboratory Animal Center, Osong Medical Innovation Foundation. República de Corea.

Cell, Volume 153, Issue 6, 6 June 2013, Pages 1228-1238

Reproducción 2013;28:116-124

## Resumen

*La reprogramación de células somáticas en células madre embrionarias (CME) pluripotentes mediante la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) se ha vislumbrado como un enfoque para generar células madre embrionarias por transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) compatibles con el paciente para el estudio del mecanismo de las enfermedades y para el desarrollo de terapéuticas específicas. Los intentos previos de producir CME por transferencia nuclear han fracasado debido a la detención temprana de los embriones derivados por TNCS. En este estudio se identifica la salida prematura de meiosis en oocitos humanos y la falla de activación subóptima como factores claves responsables de estos resultados. La optimización de los enfoques para obtener células somáticas por transferencia nuclear diseñados para evitar estas limitaciones, permitió la derivación de CME humanas por transferencia nuclear. Cuando se aplicó a oocitos humanos de alta calidad, se derivaron líneas de CME humanas por transferencia nuclear de solamente 2 oocitos. Las CME obtenidas por transferencia nuclear exhibieron "cariotipo diploide normal" y heredaron el "genoma nuclear" exclusivamente de las células somáticas de los pro-*

*genitores. La expresión génica y los perfiles de diferenciación de las CME por transferencia nuclear humana fueron similares a los de las CME derivadas de embriones, lo que sugiere una reprogramación eficiente de las células somáticas a un estado pluripotente.*

## Introducción

Factores citoplasmáticos presentes en oocitos maduros detenidos en metafase II (MII) enucleados o libres de huso acromático (citoplastos) les confieren la más que singular y única capacidad de restaurar la identidad del núcleo de células somáticas transplantadas a él (transferencia nuclear de células somáticas) al "estado embrionario" (reprogramación). Desde el descubrimiento inicial en anfibios el éxito de la TNCS en un rango de diferentes especies de mamíferos ha demostrado que esta actividad de reprogramación en oocitos enucleados o libres del huso (citoplastos) es universal. Sin embargo, a pesar de numerosas aplicaciones de la TNCS para clonación animal, la naturaleza de estos factores de reprogramación es aún desconocida en su mayor parte.

En el humano la TNCS permitiría generar

CME personalizadas a partir de células somáticas del paciente para el estudio de la fisiopatología o del tratamiento por terapia celular del mismo. Sin embargo, la derivación de CME por transferencia nuclear aún no se ha logrado dentro de la última década a pesar de numerosos intentos, debido a la detención temprana del desarrollo embrionario (estadio de 8 células) presumiblemente por la incapacidad de activar genes embrionarios críticos del núcleo celular somático del donante.

Curiosamente la remoción del material genético nuclear (cromosomas) de los oocitos humanos (citoplasto) tiene un impacto negativo sobre su capacidad de producir reprogramación. Sin embargo, cuando se transplanta el núcleo de una célula somática a un oocito intacto el embrión poliploide resultante puede desarrollarse hasta blastocisto y facilita la generación de CME. ¿Hay factores críticos de reprogramación en el oocito en MII que están físicamente asociados con los cromosomas o con el huso acromático y que son extraídos o disminuyen críticamente con la enucleación?. Por supuesto se pueden considerar otras alternativas. Otra característica importante es que el ADN nuclear es un complemento idéntico (*Exclusive match*) de las células somáticas de los progenitores (paterno y materno), mientras que el ADN mitocondrial se origina exclusivamente en los oocitos.

## Resultados

### Protocolo de optimización para transferencia nuclear de célula somática en modelo de primate no humano

La presente investigación comienza con la optimización del uso del “sobre” de virus de Japón inactivado por hemaglutinina para fusionar (electrofusión) los núcleos de las células somáticas donantes con oocitos en MII enucleados mientras se mantiene el citoplasto en meiosis. La tasa de fusión fue 100% después del tratamiento, pero lo inesperado fue que los embriones de TNCS generados por fusión con hemaglutinina de virus de Japón no progresaron más allá de la fase de mórula compactada cuando se usó la activación estándar (ionomicina / dimetilaminopiridina). En los monos los embriones de TNCS producidos por electrofusión desarrollan blasto-

cistos. Por ello postulamos que la exposición del citoplasto a un pulso eléctrico (electroporación) parece ser beneficiosa para la reprogramación de transferencia nuclear de células madre, quizá como un estímulo suplementario de activación. Los resultados indican que aunque el estímulo de la electroporación no es imprescindible para la fusión celular, colabora a la activación adecuada del citoplasto que sigue a la TNCS.

El uso de tricostatina A (un inhibidor de la deacetilación de la estrona) promueve la mejora de la reprogramación de la TNCS en varias especies de mamíferos; las concentraciones altas pueden afectar negativamente la calidad del blastocisto y la calidad del linaje epiblastico. *La conclusión fue que este protocolo optimizado en el modelo de primates no humanos era adecuado para servir de punto de partida para pruebas ulteriores con oocitos humanos.*

### Producción de blastocistos humanos por transferencia nuclear de células somáticas y de líneas de células madre embrionarias por transferencia nuclear

Se usaron oocitos MII de voluntarias sanas que fueron sometidos al procedimiento de TNCS pacientes del programa regular de reproducción asistida y fibroblastos de origen fetal sincronizados en fase G0-G1 del ciclo celular, como donantes nucleares. Después de la confirmación de la fusión, los oocitos fueron activados por electroporación y DMAP (Dimetil-Amino-Piridina).

Los resultados indicaron que aunque el estímulo de electroporación no es requerido para la fusión nuclear, estimula la activación apropiada del citoplasto después de la TNCS.

Inhibidores de la deacetilasa de histona (Tricostatina A) han sido asociados a una mejora de la reprogramación por trasplante nuclear de células en varias especies de mamíferos.

Solamente concentraciones de 10 nMs favorecieron la derivación en el mono de líneas estables de CME.

Inicialmente oocitos humanos en metafase II provenientes de voluntarias sanas fueron expuestos al procedimiento para las células somáticas de transferencia nuclear que produjo los mejores resultados en los primates no humanos. Los oocitos fueron obtenidos siguiendo los protocolos

habituales de estimulación ovárica y de aspiración folicular transvaginal. Fibroblastos humanos dérmicos de origen fetal sincronizados en fase G0-G1 del ciclo celular fueron utilizados para donación nuclear. La remoción del huso y la fusión asistida por virus de Hemaglutinina de Japón-E (HVJ-E) se realizó dentro de los 60' de la obtención del oocito. 95,2% de los oocitos sobrevivieron a la remoción del huso de la mitosis II (MII) y la introducción del núcleo de fibroblastos donados mostró un 100% de eficacia en la fusión usando HVJ-E. Después de la fusión los oocitos fueron activados con electroporación/DMAP y expuestos a tricostatina A (10 nM) por 12 hs. La mayoría de los embriones sin cafeína (81,7%) formaron 1-2 pronúcleos en el momento de retirarlos del TSA, se desarrollaron hasta la etapa de 8 células y 86,7% clivaron; lo que sugiere que algunos embriones no exhibieron PN visibles en el momento del examen. La mayoría (61,5%) llegaron a la etapa de 8 células, pero pocos lo hicieron hasta la fase de mórula compacta y blastocisto (11,5%). Nuestro protocolo de TNCS, por lo tanto, permite la reprogramación de las células somáticas humanas hasta la *etapa embrionaria*, pero exhibieron un trofoectodermo pobremente organizado y una masa celular interna pequeña o aún indetectable. Grandes células blastoméricas-símiles no estaban presentes en la mayoría. Seis blastocistos fueron cultivados en capa *feeder* para examinar su capacidad de mantener la derivación a CME. La mayoría fracasó.

Había entonces que mejorar la calidad embrionaria. Para evaluar si la remoción del huso en los oocitos humanos puede inducir la salida espontánea de meiosis se introdujeron núcleos "somáticos" en oocitos en MII intactos y se observó con microscopía polarizada. Todos los núcleos de células somáticas introducidos formaron estructuras tipo huso, visibles dentro de los 30' de la fusión. No se observó formación del huso cuando el núcleo de la célula somática fue fusionado con oocitos manipulados sin huso acromático. La conclusión fue que los oocitos humanos en fase II (MII) se activan prematuramente con la remoción del huso. Había que mantener el arresto meiótico durante la manipulación. Se usó cafeína, un inhibidor de la fosfatasa proteica que previene la activación prematura y mejora el

desarrollo de embriones generados por TNCS.

La transferencia del núcleo de células somáticas, en estas condiciones, formó eficientemente un huso acromático detectable por microscopía birrefringente. 23,5% de los blastocistos tratados con cafeína se desarrollaron con masas celulares internas visibles y prominentes similares a las observadas en embriones producidos por FIV.

Ocho (8) blastocistos expuestos a cafeína y producidos por TNCS fueron utilizados para aislar CME; todos se adhirieron a los fibroblastos de embriones de ratón y 4 formaron excrescencias de masa celular interna que originaron colonias de CME símiles con morfología y características de crecimiento típicas. Esto es similar a lo encontrado en los estudios previos con blastocistos humanos derivados de FIV y supera a lo acontecido con embriones manipulados para transferencia del huso acromático (38%).

Tomados en su conjunto nuestros hallazgos indican que el protocolo diseñado para el modelo del mono mantiene también el desarrollo de blastocistos humanos obtenidos por TNCS. Sin embargo, la baja calidad de los blastocistos logrados de esta manera impidió el aislamiento de CME. La incorporación ulterior de cafeína durante la enucleación y la fusión permitió mejorar el desarrollo del blastocisto y la derivación de la línea de CME.

#### **Posibilidad de reproducir los resultados de la transferencia nuclear de células somáticas humanas**

Las 4 líneas de CME humanas obtenidas por transferencia nuclear derivaron de 8 oocitos tomados de una única donante, después de un solo ciclo de estimulación; se usaron fibroblastos dérmicos fetales como células donantes nucleares siguiendo el protocolo de los autores, que incorpora cafeína. Se obtuvieron 5 blastocistos que dieron origen a 4 líneas de CME humanas por transferencia nuclear. Para poder generar células madre pluripotentes específicas para pacientes individuales es imprescindible obtener resultados reproducibles con células somáticas derivadas de varios pacientes y con diferentes donantes de oocitos, para lo cual se obtuvo un cultivo de fibroblastos dérmicos de una paciente con síndrome de Leigh (encefalopatía necrotizante debida a deficiencia del complejo mitocondrial).

Se colectaron además un total de 15 y 5 oocitos MII de 2 donantes voluntarias que fueron utilizadas para efectuar TNCS con los fibroblastos obtenidos. Todos los oocitos sobrevivieron a la remoción del huso acromático y se fusionaron exitosamente con las células donantes de los núcleos.

Después de la activación y del cultivo se originaron 4 y 3 blastocistos con los oocitos donados. Después de la siembra sobre fibroblastos embrionarios de ratón y pasaje manual se establecieron 2 líneas estables de CME por transferencia nuclear; una de cada cohorte de oocitos. Estos resultados confirman la reproducibilidad de nuestros protocolos de TNCS.

### **Análisis retrospectivo de factores que afectan el éxito de la transferencia nuclear de células somáticas humanas**

Se hizo un análisis comparativo retrospectivo de los procedimientos de estimulación ovárica y del número de oocitos obtenidos por ciclo con el desarrollo de embriones originados por TNCS y con el resultado de la derivación de CME por transferencia nuclear (CME-TN). Los ciclos de donación de oocitos se dividieron en 3 grupos basados en el rango de oocitos MII maduros colectados por ciclo: 10 o < de 10 (5 donantes); entre 11-15 oocitos (2 donantes) y  $\geq 16$  oocitos (3 donantes); aunque la sobrevivencia después de la remoción del huso, de la fusión, de la formación pronuclear y del clivaje fue similar, más embriones derivados del último grupo ( $\geq 16$  MII) detuvieron su crecimiento después de la etapa de 8 células, comparados con los otros dos. Además, la calidad de los blastocistos recuperados por TNCS correlacionó inversamente con el número de oocitos colectados por ciclo. Mientras 5 líneas de CME-TN derivaron de donantes que produjeron  $\leq 10$  oocitos por ciclo, solamente 1 se recuperó del grupo que produjo 11-15 y ninguna del grupo  $\geq 16$ . El pico de los niveles sistémicos de E2 en las donantes de oocitos antes de la administración de hCG correlacionó con el número de oocitos obtenidos. Estas observaciones implican que un número elevado de oocitos colectados con los protocolos de estimulación ovárica está relacionado con una calidad oocitaria pobre

y con una capacidad reducida de reprogramación en el contexto de la TNCS.

Se analizó luego el impacto de los agonistas y antagonistas de GnRH usados en la supresión pituitaria de las donantes de oocitos sobre la reserva ovárica basal de las mismas, evaluada por dosaje de hormona anti-mulleriana (HaM) y recuento de folículos antrales (RFAs). Donantes con reserva ovárica alta (4 ciclos) recibieron agonistas de GnRH (Lupron) y las restantes (6 ciclos) recibieron antagonistas (Ganirelix). El promedio de oocitos en MII en los dos grupos fue estadísticamente similar. Sin embargo, el desarrollo embrionario más allá de la etapa de 8 células de los embriones producidos por TNCS fue subóptima para los oocitos producidos cuando se usó tratamiento con agonistas de GnRH (pacientes con reserva ovárica alta); además, la totalidad de las 6 líneas de CME por transferencia nuclear derivaron exclusivamente de oocitos obtenidos de ciclos tratados con antagonistas de GnRH. Basados en estas observaciones es posible inferir que la supresión pituitaria con antagonistas de GnRH durante la estimulación ovárica pueda impactar positivamente en la capacidad oocitaria de reprogramación, haciéndolos compatibles con el desarrollo de blastocistos obtenidos por transferencia nuclear de células somáticas y el aislamiento de CME.

Por último, observamos si la formación de pronúcleos puede usarse como marcador predictivo para los resultados del trasplante nuclear de células somáticas. A pesar del número restringido de embriones analizados obtenidos por TNCS, es razonable concluir que la formación pronuclear visible no correlaciona directamente con la derivación de CME por transferencia nuclear.

### **Análisis de células madre embrionarias por transferencia nuclear humanas**

Para confirmar el origen y definir el grado de reprogramación de las células obtenidas por TNCS hemos expandido y analizado extensamente las 4 líneas de CME derivadas de fibroblastos dérmicos humanos fetales designadas como hE-SO-NT1, 2, 3 y 4; usando tipología microsatelital para 23 marcadores que identifican en el mapa 22 autosomas humanos y 1 lo-

cus ligado a la X por genotipificación genómica nuclear.

Los resultados vincularon inequívocamente las 4 líneas de transferencia nuclear de CME a los fibroblastos fetales nucleares del donante sin contribución significativa de alelos oocitarios. La característica definitoria de la TNCS es que el genoma mitocondrial, en los embriones resultantes de la TNCSs y en las CME de transferencia nuclear, es contribuido mayoritariamente por el oocito. Durante la fusión del citoplasto con los fibroblastos donantes del núcleo, una pequeña porción del DNA mitocondrial de la célula somática es co-transferido al embrión obtenido, lo que puede resultar en heteroplasma. El análisis citogenético por bandeado G indica que las 4 líneas de CME por transferencia somática contienen un cariotipo femenino euploide normal (46XX) sin anomalías numéricas o estructurales.

Para evaluar la pluripotencia de las líneas de CME por transferencia nuclear examinamos la expresión de marcadores genéricos de células madre por inmunocitoquímica y comparamos los resultados con los de dos líneas de CME derivadas de fertilización in vitro (hESO-7 y -8). Estas líneas de control de CME y las 4 de CME por transferencia nuclear se establecieron a partir de oocitos donados por el mismo donante (donante de oocitos A) y por lo tanto llevaban idéntico DNA mitocondrial. Igual que los controles, todas las líneas de CME por transferencia nuclear expresaron OCT-4, NANOG, SOX2, SSEA-4, TRA-1-60 y Tra-1-81. Además, cuando se las inyectó en ratones SCID inmunodeficientes, todas las líneas de CME por transferencia nuclear produjeron tumores que contenían tejidos y tipos celulares representativos de las tres líneas germinales. Un análisis de diferenciación in vitro demostró la eficiente formación de “cuerpos embrioides” en cultivo suspendido que después de la adherencia formaron espontáneamente cardiomiocitos contráctiles.

Por último, realizamos análisis de expresión en microarray de la línea celular hESO-NT1 y comparamos los resultados con el control de FIV hESO-7 y con las células somáticas de los progenitores HDF-f usando la plataforma PrimeView de Affymetrix. Inicialmente 3 réplicas biológicas de cada muestra se compararon entre

sí. Para comparación la señal detectada por cada juego de sondas fue colocada en un “gráfico de dispersión” (scattergraph) y se calculó el valor de correlación. Este análisis demostró una correlación de transcripción de 99% dentro de cada tipo celular, sugiriendo que existen mínimas variaciones entre las réplicas biológicas colectadas de diferentes placas de cultivo. Cada uno de los tipos de CME derivadas de transferencia nuclear y de fertilización in vitro fueron comparadas entre sí y con células somáticas (HDF-f). Como se esperaba, ambos tipos de células madre mostraron baja correlación transcripcional con los fibroblastos. Dentro de 50 genes se observaron muchos pluripotentes conocidos incluyendo LIN28, POU5F1, NANOG y SOX2. Por el contrario, las CME derivadas por FIV y TNCS fueron similares entre ellas. Se observaron algunas diferencias transcripcionales entre CME por transferencia nuclear humana y sus similares procedentes de FIV. Sin embargo, ningún gen pluripotente conocido fue incluido en esta lista. Curiosamente el gen mayor de histocompatibilidad HLA-C se mostró claramente suprimido con hESO-NT1 comparado con hESO-7.

## Discusión

Se demuestra “por primera vez” la exitosa reprogramación de células somáticas humanas en CME por TNCS. Hemos identificado varios pasos incluyendo la remoción del huso, la fusión de la célula donada y la activación del citoplasto que son críticos para la reprogramación celular y el desarrollo del blastocisto originado por trasplante nuclear de células somáticas. Estudios previos indican que el arresto meiótico en oocitos humanos en fase II es inestable, de manera tal que manipulaciones inoportunas pueden inducir la salida rápida de la metafase. Sin embargo, la integración exitosa y la reprogramación dentro de la interfase (G0/G1) del núcleo de la célula somática, en el citoplasto en MII, son críticamente importantes y dependientes de los eventos de la remodelación nuclear asociados con elevadas actividades meióticas de las quinasas presentes en el citoplasto. El citoplasto meiótico induce a la rápida descomposición de la membrana nuclear y condensación primitiva de los cromosomas en los

núcleos transplantados en interfase y los convierte en estructuras fusiformes (spindle like). Se ha propuesto que se requiere la “descomposición de la membrana nuclear” y la “condensación prematura de los cromosomas” para la sincronización precisa del ciclo celular entre el núcleo en interfase donado y el citoplasto mitótico receptor. Estas drásticas transformaciones cromatínicas están asociadas con una reprogramación eficiente y con una mejoría en el desarrollo de los embriones obtenidos por TNCS. Una remodelación nuclear fallida o incompleta conduce a temprana detención del desarrollo.

Otro hallazgo estableció que la transcripción somática celular específica y los factores epigenéticos, manteniendo la identidad celular, se disocian de la cromatina durante el desmembramiento de la membrana nuclear y la condensación prematura de los cromosomas y son activamente reemplazados por programas específicos del oocito. Sugerimos aquí que la retención de la actividad meiótica en el citoplasto humano de MII ayudado por la enucleación en presencia de cafeína y de la hemaglutinina de fusión, basada en el virus de Japón-E, estimula la conversión de los núcleos de las células somáticas en estructuras fusiformes. Además, los embriones humanos provenientes de trasplante nuclear de células somáticas, generados con nuestro criterio, se desarrollan hasta blastocistos y CME transferencia nuclear.

Un hallazgo importante adicional de nuestro estudio es que los tratamientos comunes de activación, que involucran la exposición a ionomicina y 6- dimetilaminoperoxidasa, no son suficientes para lograr el desarrollo de embriones humanos por TNCS. Durante la fertilización normal la penetración del espermatozoide desencadena la activación oocitaria que es crítica para la finalización de la meiosis y para la iniciación de las divisiones mitóticas. La activación oocitaria por la penetración espermática es también crítica para completar la meiosis, para la iniciación de las divisiones mitóticas y para que el citoplasma del oocito adquiera las actividades de reprogramación y metabólicas necesarias para sostener el desarrollo subsiguiente. Actualmente la eficacia de los protocolos artificiales de activación se mide comúnmente por inducción del desarrollo partenogenético en oocitos en MII intactos y es gene-

ralmente aceptado que si la activación artificial sostiene el desarrollo embrionario partenogenético hasta blastocisto y CME, tales tratamientos deberían ser suficientes para inducir resultados similares con citoplastos reconstruidos por TNCS. Sin embargo, en estos estudios determinamos que el tratamiento suplementario por electroporación fue crítico para la activación del citoplasto y la reprogramación subsiguiente fue compatible con el mejoramiento del desarrollo de las células somáticas por transferencia nuclear y la derivación de CME. Por ello es razonable especular que los requerimientos para la activación del oocito o del citoplasto en los sistemas de transferencia nuclear de células somáticas y de partenogénesis son diferentes.

Demostramos también que la reprogramación de las células somáticas por transferencia nuclear humana depende de la calidad del oocito. Particularmente la “recuperación de gran número de oocitos” que son consecuencia de los protocolos de estimulación ovárica con agonistas, se correlacionan negativamente con el desarrollo de los blastocistos humanos originados por TNCS. Por ello es posible especular que los protocolos de estimulación ovárica utilizados rutinariamente en los tratamientos de fertilización *in vitro* podrían o deberían ser modificados, si el objetivo es obtener por derivación CME por TNCS. Correlativamente oocitos de calidad subóptima derivados por maduración *in vitro* o de otras fuentes, podrían ser inadecuados para transferencia nuclear de células somáticas. Nuevos estudios sobre las dosis de gonadotrofinas y los regímenes de supresión pituitaria deben ser evaluados en el contexto de la obtención de oocitos humanos adecuados para la transferencia nuclear de células somáticas.

Es también importante hacer notar que la calidad oocitaria está últimamente vinculada a la constitución genética individual de los donantes de oocitos. Realmente algunas cohortes de oocitos no mantienen el desarrollo de blastocistos para TNCS con los protocolos actuales, mientras que se ha publicado la formación eficiente de blastocistos (23%) usando protocolos diferentes que involucran electrofusión, seguida de activación con ionóforo de Ca y DMAP (4-dimethylaminopyridine o DMAP/citochalasin D).

Sin embargo, reflejando lo que presumimos

como una calidad oocitaria excepcional de una donante, ella produjo 5 blastocistos a partir de 8 oocitos, que “a posteriori” originaron la derivación de 4 líneas de CME por transferencia nuclear (CME-TN) resultantes de la transferencia. Curiosamente una donación oocitaria previa de esta donante estuvo también asociada con resultados excepcionales que originaron la derivación de 4 líneas de CME resultantes de transferencia de husos mitóticos. Aunque los factores genéticos subyacentes que contribuyen a la calidad oocitaria permanecen desconocidos, algunos alelos FMR-1, definidos por la secuencia de la repetición de nucleótidos CGG, correlacionaron con “calidad oocitaria superior” y con el éxito de FIV. Claramente se necesitan más estudios para dilucidar los parámetros asociados con una calidad óptima de oocitos para la TNCS.

Debido a las dificultades del pasado para alcanzar el último objetivo en la producción de CME por transferencia nuclear, se presumió habitualmente que la derivación de CME por vía de la TNCS requeriría un número extraordinario de oocitos y, por lo tanto, no podría ser perfeccionada para uso terapéutico generalizado. Sin embargo, nuestros protocolos modificados de TNCS permitieron la derivación de por lo menos una línea de CME de cada ciclo de donación oocitaria.

Una batería de pruebas de pluripotencia realizada en CME por transferencia nuclear demostró sus similitudes con las genuinas CME derivadas de fertilización *in vitro*. La interrogación transcripcional indicó que las CME por transferencia nuclear se diferenciaban del tipo de expresión génica de las células somáticas progenitoras por una hiperregulación de los genes asociados a pluripotencia. Además, las CME por transferencia nuclear demostraron la habilidad de diferenciarse hacia una variedad de otros tipos celulares en los tumores teratomatosos. La diferenciación dirigida *in vitro* indujo la formación de cardio-miocytes contráctiles demostrando su potencial para la medicina regenerativa. El análisis genético demostró que las 4 líneas de CME por transferencia nuclear probadas hasta hoy, actualmente contenían todos los cariotipos normales diploides sin anomalías cromosómicas groseras o contribución del genoma oocitario aparte del ADN mitocondrial.

Un abordaje para la derivación de células madre pluripotentes “paciente-específicas” que excluye el uso de embriones se basa en la reprogramación de células somáticas por expresión inducida de unos pocos factores de transcripción críticos (“células madre pluripotentes inducidas”). Estudios recientes concluyeron que estas células madre pluripotentes inducidas, se caracterizan por altas frecuencias de alteraciones del número de copias subcromosomales, cuando se comparan con las CME derivadas de FIV. Algunos de estos cambios genéticos estaban asociados con el proceso de reprogramación mismo, mientras que otros podrían haber sido heredados de las células somáticas de los padres. Además, se describió también la metilación específica de las células madre pluripotentes inducidas y anomalías transcripcionales en regiones señalizadas (*imprinted*) y en el cromosoma X. La comparación directa entre células madre pluripotentes inducidas y CME por transferencia nuclear en el ratón indicó que tales anomalías son menos frecuentes en estas últimas, concluyendo que la reprogramación basada en las células somáticas por transferencia nuclear es más eficiente en restaurar la identidad epigenética de las células somáticas parentales. Ulteriores comparaciones de las características genéticas, epigenéticas y transcripcionales de las CME de transferencia nuclear, de las CME de fertilización *in vitro* y de las células madre humanas pluripotentes inducidas están claramente justificadas.

Por último, una de las diferencias fundamentales de la reprogramación basada en la TNCS, es que las CME de transferencia nuclear contienen DNA “mitocondrial” originado casi exclusivamente en el oocito. Este hecho es generalmente menospreciado, pero puede representar una ventaja sobre la derivación de células madre pluripotentes inducidas porque ella asegura que las CME de transferencia nuclear adquieran el potencial de producir células metabólicamente funcionales y tejidos para terapias celulares en forma independiente del DNA mitocondrial de la célula donante del núcleo. De esta manera la TNCS ofrece una estrategia para la corrección de las mutaciones del DNA mitocondrial y para el rescate de la función metabólica de células pluripotentes de pacientes con enfermedades del DNA mitocondrial heredadas o adquiridas.

## Análisis, desarrollo y comentarios por Aníbal A Acosta

Profesor Emérito de Obstetricia y Ginecología. Eastern Virginia Medical School. Norfolk. Virginia. EE.UU.

Miembro Correspondiente Nacional de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

Desde hace más de 50 años, desde el regreso de mi primer viaje al extranjero, comenzaron a vislumbrarse las evidencias preliminares de una inminente irrupción de la citogenética y de la genética molecular en los campos etiológico, diagnóstico y terapéutico de la medicina reproductiva humana. Lenta pero inexorablemente esta premonición se concretó hasta límites que hacen difícil para el clínico mantenerse alerta y actualizado en las múltiples facetas de investigación básica, etiología, diagnóstico y terapéutica que se han abierto y se abren día a día. Presentí que la genética iba a tomar una participación fundamental en nuestra especialidad y, a pesar de mi inapropiado y rudimentario entrenamiento en ese campo, he seguido, con considerable interés y desgraciadamente con defectuosa formación, la creciente participación y la fastuosa contribución que la genética ha tenido, sigue teniendo y va a continuar injertando en el campo de la reproducción humana. Mis colaboradores, sin excepción, sufrieron y conocen bien esta obsesión y mi insistencia en tratar de enviar para su entrenamiento, en centros que yo conocía y respetaba, a algunos de ellos para que suplieran mis deficiencias.

La reprogramación de células somáticas en células madre embrionarias pluripotentes se ha pronosticado como una forma de generar células madre embrionarias compatibles con pacientes, para estudiar “mecanismos patológicos” y desarrollar “terapéuticas específicas” en ellas o en personas normales.

Este trabajo que hoy seleccionamos y comentamos, enjundioso, minucioso, de complejo diseño, sobre el que pretendo llamar la atención, es a mi juicio metodológicamente cuidadoso, útil en el juzgamiento de las metodologías pasadas y detallado en la evaluación de las experiencias previas y de las técnicas actualmente utilizadas.

Es, además, una rica fuente de información, sugerencias, evaluación y referencias, y por sobre todo, es un ejemplo invalorable de colaboración científica. Responde a la importancia que tendría la generación y reprogramación de células madre embrionarias pluripotentes obtenidas mediante transferencia nuclear de núcleos provenientes de células somáticas a citoplastos (oocitos enucleados o libres del huso) para el estudio de los mecanismos de enfermedad y para el desarrollo de terapéuticas específicas. En el humano esto no se ha logrado todavía. Se identifican, además, los factores de fracaso: “abandono prematuro de la meiosis” y “activación defectuosa”. Se intentan también aquí enfoques optimizados de “transferencia nuclear de células somáticas”. El objetivo se consiguió solo en 2 (dos) oocitos que mostraron cariotipos diploides normales y heredaron el genoma nuclear exclusivamente de células somáticas de los progenitores. La “expresión génica” y los “perfiles de diferenciación de las células madre embrionarias” obtenidas por transferencia nuclear fueron similares a los de las células madre embrionarias “derivadas de embriones”, lo que sugiere una reprogramación eficiente de las células somáticas a un estado “pluripotente”.

La relación fisiológica de influencias funcionales en la interacción núcleo-citoplasmática ofrece aun hoy muchos clarooscuros. En esta publicación, con múltiples objetivos evidenciables, se investigan varios y se clarifican algunos tales como factores citoplasmáticos presentes en los oocitos maduros en metafase II que tienen la habilidad de recomponer (reset) la identidad del núcleo de las “células somáticas transplantadas” retro trayéndolas al “estado embrionario”, lo que es universal. Sin embargo, la naturaleza de los factores oocitarios de reprogramación y su mecanismo de acción “se desconocen”.

En el humano la transferencia nuclear de células somáticas” podría ser una forma de generar “células madre embrionarias personalizadas” a partir de las células somáticas del paciente, lo que podría permitir el estudio de la enfermedad en cuestión y consecuentemente instrumentar las terapias celulares indicadas basadas en esos resultados. El obstáculo responsable para el desarrollo de este protocolo se hace muy difícil de identificar debido a una detención embrionaria

en la etapa de 8 células producida por falla(s) en la activación de genes embrionarios críticos en el núcleo somático del donante o porque los pasos necesarios para la transferencia nuclear de células somáticas (TNCS) influye negativamente en la calidad del ooplasto haciendo imposible la reprogramación. Los autores se concentran en el “oocito meiótico” humano porque éste es inestable y puede ser fácilmente perturbado por manipulación mecánica (enucleación e introducción del núcleo celular donado) que pueden influir en la retención de factores meióticos en “el citoplasto” y evalúan primordialmente el “arresto meiótico” porque esta fase es inestable y puede ser fácilmente perturbada por manipulación mecánica del oocito.

Los autores se proponen, además, evaluar la exactitud, la eficacia y el incremento del rendimiento del análisis cromosómico prenatal utilizando microarrays en un estudio cooperativo de 29 centros actuando en cooperación con un “laboratorio único central”.

Dos dificultades fundamentales se identifican en él: la “salida prematura de meiosis” y una “activación subóptima” en los oocitos humanos, como los principales factores responsables de ellas.

Las líneas de células madre embrionarias obtenidas por transferencia nuclear que fueron derivadas de 2 oocitos mostraron cariotipo diploide y heredaron el genoma nuclear exclusivamente de las células somáticas de los progenitores. La expresión génica y los perfiles de diferenciación de las células somáticas derivadas de transferencia nuclear fueron similares a los de las células madre embrionarias embrio-derivadas, sugiriendo una reprogramación eficiente de las células somáticas a un estado pluripotente.

Hasta aquí las conclusiones. Sin embargo, la lectura detenida y minuciosa de este excelente trabajo nos obliga a los clínicos a reflexionar con extremada cautela.

Factores citoplasmáticos en el citoplasma de oocitos maduros detenidos en metafase II tienen la asombrosa capacidad de restablecer la identidad de los núcleos de células somáticas transplantados a ellos, al estado embrionario, capacidad que es universal en una cantidad de especies diferentes de mamíferos. El mecanismo, sin embargo, permanece oscuro, pero nuestra curiosidad científica y ansiedad terapéutica son y serán imperecederas.